

Изучение взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами CD133⁺ стволовых клеток и CD133⁻ дифференцированных клеток глиомы

В.Е. Шевченко¹, И.С. Брюховецкий^{2,3}, Е.А. Савченко⁴, Н.Е. Арноцкая¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²Школа биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8;

³ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

⁴ООО «АПТО-ФАРМ»; Россия, 115446 Москва, Коломенский проезд, 13А

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Лечение мультиформной глиобластомы остается малоэффективным из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли, обусловленных высоким опухолевым потенциалом, устойчивостью к химиолучевой терапии и повышенной диссеминацией стволовых клеток глиомы (СКГ). Молекулярные механизмы взаимодействия этих клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ) практически не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается сигнализацию ВКМ-рецепторного взаимодействия (ВКМ-РВ) для СКГ и дифференцированных клеток глиомы (ДКГ).

Цель исследования – методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ.

Результаты. Идентифицированы 1990 белков, 18 из которых связаны с процессом ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ по сравнению с CD133⁻ ДКГ, 10 из которых имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Отмечено повышение в CD133⁺ СКГ экспрессии 4 белков, активирующих сигнальный каскад ВКМ-РВ.

Заключение. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов к обнаружению потенциальных мишеней для терапии мультиформной глиобластомы.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, стволовые клетки глиомы, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия

Для цитирования: Шевченко В.Е., Брюховецкий И.С., Савченко Е.А., Арноцкая Н.Е. Изучение взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами CD133⁺ стволовых клеток и CD133⁻ дифференцированных клеток глиомы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):63–72.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-63-72

Study of interaction between extracellular matrix proteins and receptors of CD133⁺ stem cells and CD133⁻ differentiated glioma cells

V.E. Shevchenko¹, I.S. Bryukhovetskiy^{2,3}, E.A. Savchenko⁴, N.E. Arnotskaya¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²School of Biomedicine, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok 690091, Russia;

³National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok 690059, Russia;

⁴Limited Liability Company "APTO-FARM"; 13A Kolomenskiy Proezd, Moscow 115446, Russia

Background. Treatment of glioblastoma multiforme remains little effective due to the rapidly developing recurrence of the tumor, due to its high tumorigenic potential, resistance to chemoradiation therapy and increased dissemination of glioma stem cells (GSC). Molecular mechanisms of these cell interaction with extracellular matrix (ECM) are practically not studied. At present, it is also not clear the signaling of the ECM-receptor interaction (ECM-RI) differs for GSC and differentiated glioma cells (GDC).

Objective: using high-resolution proteomic mass spectrometry to study the determinant expression of the ECM-receptor interaction signaling cascade in CD133⁺ GSC and CD133⁻ GDC.

Results. 1990 proteins are identified, 18 of which are associated with the ECM-RI process. Positive regulation of 14 ECM-RI proteins was found in CD133⁺ GSC compared with CD133⁻ GDC, ten had more than 2 times increased expression. Increase in the CD133⁺ GSC level of 4 proteins activating the ECM-RI signaling cascade was noted.

Conclusion. Important regularities are determined that could be used for the development of new approaches for detection of potential therapy targets of glioblastoma multiforme.

Key words: extracellular matrix, glioma stem cells, glioblastoma multiforme, proteome, mass-spectrometry

For citation: Shevchenko V.E., Bryukhovetskiy I.S., Savchenko E.A., Arnotskaya N.E. Study of interaction between extracellular matrix proteins and receptors of CD133⁺ stem cells and CD133⁻ differentiated glioma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):63–72.

Введение

Мультиформная глиобластома (МГБ) – первичная высокоинвазивная глиальная опухоль головного мозга человека с крайне неблагоприятным прогнозом. Каждый год во всем мире диагностируется около 240 тыс. случаев опухолей головного мозга, большинство из которых составляет МГБ [1]. Несмотря на прогресс, достигнутый в терапии рака, лечение МГБ остается малоэффективным из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли [2]. Раковые клетки, выходящие из первичной опухоли, быстро проникают в нормальную паренхиму головного мозга и образуют рецидивы. Такие инвазивные клетки относительно устойчивы к радио- и химиотерапии [2], что еще более усложняет лечение этого заболевания.

Миграция и инвазия клеток МГБ регулируются несколькими факторами, включающими изменения как в самой мигрирующей клетке, так и в микроокружении опухоли. Клеточные и молекулярные механизмы агрессивной инвазии клеток МГБ малоизучены и требуют дополнительных исследований для адаптации будущей терапии МГБ к таргетированию инвазивных клеток. Считают, что, в отличие от других солидных злокачественных опухолей, клетки МГБ не используют внутрисосудистые или лимфатические пути для миграции [3], а перемещаются через внеклеточное пространство мозговой ткани [4, 5]. Этот процесс инвазии отличается от процесса миграции, так как клетки МГБ пересекают тканевые барьеры посредством как адгезии, так и деградации внеклеточного матрикса (ВКМ), ремоделирования их цитоскелета и клеточного объема [4, 5].

Хорошо известно, что отдельные раковые клетки могут инвазировать, используя мезенхимальный или амeboидный способ перемещения, или диссеминировать из исходной массы опухоли в виде кластеров [4]. Клетки МГБ в основном используют 1-й тип миграции, наиболее эффективный при их перемещении из основной опухолевой массы [6]. Эти одиночные опухолевые клетки не детектируются современными диагностическими методами визуализации и могут давать опухолевые рецидивы. Такой тип миграции напоминает инвазию нейральных стволовых клеток в период эмбрионального развития или во время процессов репарации в поврежденных тканях взрослого мозга [7].

Адгезия клеток к белкам ВКМ приводит к образованию клеточно-матриксных точечных контактов, известных как фокальная адгезия, которая обеспечивает взаимодействие клеток со своей микроокружением и играет важную роль в процессах инвазии и метастазирования раковых клеток, включая МГБ [8]. Фокаль-

ная адгезия выполняет свою структурную и сигнальную роль посредством связывания ВКМ с актиновым цитоскелетом клеток, генерируя силы натяжения, необходимые для миграции клеток и ее регулирования [9].

Инвазивность МГБ и радио-/химиорезистентность заметно коррелируют с субпопуляцией стволовых клеток глиомы (СКГ) [10, 11], способных самообновляться, инициировать и поддерживать рост опухоли, образуя рецидивы [12]. Двухнаправленный обмен информацией между СКГ и микроокружением опухоли регулирует не только их свойства стволовости, но способствует пролиферации, ангиогенезу и инвазии [13].

Несмотря на то что инвазивная природа клеток МГБ связана с резистентностью к терапии, остается неясным, какие молекулярные механизмы включены в инвазию СКГ, являются ли СКГ более инвазивными, чем нестволовые, и не определен их вклад в инвазивный фенотип клеток опухоли. Появляются доказательства того, что протеины, включенные в процессы миграции и инвазии, положительно регулируются в СКГ [14]. Кроме этого, предполагаемые маркеры СКГ обнаружены на переднем крае опухоли [15], что указывает на их участие в процессах инвазии.

Обогащение МГБ опухолевыми стволовыми клетками может происходить либо из-за симметричного деления СКГ, либо путем перепрограммирования нестволовых клеток глиомы, что приводит к фенотипической пластичности в популяции опухоли [16]. Концепция дедифференцировки нестволовых клеток глиомы в СКГ усложнила понимание гетерогенности МГБ, потенциального механизма терапевтического рецидива, резистентности к противоопухолевым терапиям и проблем, связанных с разработкой терапевтических стратегий. В связи с этим становится актуальным сравнение протеомного профиля СКГ и дифференцированных клеток глиомы (ДКГ) для изучения молекулярных механизмов инвазии СКГ, что может привести в дальнейшем к открытию новых терапевтических мишеней, обеспечивающих более эффективные методы лечения этого заболевания.

В настоящем исследовании впервые проведен нано-ВЭЖХ-МС/МС-анализ лизатов CD133⁺- и CD133⁻-клеток, полученных из глиомасфер линии клеток U87MG, для сравнения протеомов СКГ и ДКГ. Основное внимание было уделено дифференциально экспрессированным белкам (ДЭБ) ВКМ-рецепторного взаимодействия (ВКМ-РВ), играющего важную роль в процессах диссеминации опухолевых клеток. Мы идентифицировали 1990 белков, 18 из которых связаны с ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ по сравнению

с CD133⁻ ДКГ, 1 из которых имел повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Отмечено увеличение в CD133⁺ СКГ уровней 4 белков, активирующих сигналинг ВКМ-РВ. Полученные данные и выявленные закономерности, на наш взгляд, указывают на возможность таргетирования сигнального каскада ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ, что может использоваться при разработке новых терапевтических схем для лечения МГБ.

Материалы и методы

Реактивы. Для всех процедур использовали дистиллированную воду, очищенную и обессоленную с помощью Milli-Q (Millipore Corporation, США). Ацетонитрил (ACN) HPLC gradient grade был получен из Prolabo (США); 98–100 % муравьиная кислота (FA) – из Merck (США); гидрокарбонат аммония NH₄HCO₃, дитиотреитол, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), трис-(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), трифторуксусная кислота (ТФА) и мочевины – из Fluka (США); 99,7 % уксусная кислота, 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол (ТФЕ), иодацетамид и трипсин, метилированный по лизинам, – из Sigma-Aldrich (США); соляная кислота (чистая) и KCl (чистый) – из Химмед (Россия).

Клеточные культуры. CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ получали из клеточной культуры глиобластомы человека линии U87MG (American Type Culture Collection, Manassas, VA, США) ранее описанным методом [17]. Клетки культивировали в культуральной среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с низким содержанием глюкозы и с 10 % FBS (фетальная бычья сыворотка) при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂. Адгезивные клетки культивировали до достижения 80 % конfluence и пассировали из расчета 1:3. Для получения глиомасфер опухолевые клетки U87MG ресуспендировали в бессывороточной среде DMEM (Gibco, Life Technologies, Россия) с добавлением L-глутамина (2 мМ, Life Technologies, Россия), B27 (Life Technologies, Россия), базового фактора роста фибробластов (bFGF, 20 нг/мл, Sigma-Aldrich, США), эпидермального фактора роста (EGF, 20 нг/мл, Sigma-Aldrich, США), пенициллина/стрептомицина (100 ед/мл), гепарина (5 мкг/мл, ОАО «Синтез», Россия) и затем культивировали в 6-луночном планшете из неадгезивного пластика при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % содержанием CO₂. Новые факторы роста добавляли каждые 3 дня. Проводили несколько пассажей (1 раз в неделю) для увеличения количества клеток [18]. При достижении достаточного количества клеток (порядка 10⁶ клеток) CD133⁺ СКГ выделяли методом иммуносортинга, используя магнитные шарики с иммобилизованными на них антителами к CD133 (CD133 MicroBeadKit (Miltenyi Biotec, Германия)) в соответствии с рекомендациями производителя. При нанесении клеточной суспензии на колонку давали CD133⁺ СКГ сначала связаться с антителами на магнитных шариках (50 нм) при инкубировании

клеток в присутствии блокирующего агента в течение 30 мин при +4 °С, а CD133⁻ ДКГ – свободно пройти через колонку. Как только несвязавшиеся CD133⁻ ДКГ элюировали из колонки, колонку удаляли из магнитного поля клеточного сепаратора, а CD133⁺ СКГ вымывали с помощью буфера [18] и культивировали в среде, используемой ранее. Чистоту CD133⁺ СКГ оценивали методом проточной цитометрии с CD133-антителами (5–10 мкг/мл, Miltenyi Biotec, Германия) и она превышала 90 % [18]. Дополнительно проводили иммуногистохимическое окрашивание CD133⁺ СКГ для выявления маркеров Sox2 и нестина.

Приготовление образцов для масс-спектрометрии.

Два образца клеток глиомасфер (CD133⁻ и CD133⁺-клетки) криоконсервировали в фосфатном буферном растворе при температуре –80 °С до использования. После оттаивания клетки лизировали с помощью Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Лизаты опухолевых клеток подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений ранее описанным методом [18]. После ферментативного расщепления (трипсинолиза) образцов лизатов высушенных клеток [18] 4 мкл раствора пептидов анализировали методом нано-ВЭЖХ-МС/МС для подтверждения полноты трипсинолиза. Образцы концентрировали при температуре 30 °С в центрифужном концентраторе Labconco CentriVap для полного удаления бикарбоната аммония.

Триптические пептиды растворяли в мобильной фазе (30 % ацетонитрила, 70 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты, pH 2,7) и разделяли на 24 фракции с использованием хроматографа Dionex Ulti Mate 3000 (Dionex, США), снабженного коллектором фракций и катионообменной колонкой MIC-10-CP (материал Poros 10S, 1 мм × 10 см, Thermo Fisher Scientific, Inc.) [18]. Полученные фракции концентрировали при температуре 30 °С в центрифужном концентраторе и повторно разбавляли 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили с использованием нано-ВЭЖХ-Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с источником ионизации NanoSpray [18]. Для обработки масс-спектрометрических данных применяли программное обеспечение MaxQuant (версия 1.6.1.0; Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Германия). Таблицу полученных белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости различий в уровнях белков, полученных методом *label-free*. Значимыми считали различия при уровне достоверности $p < 0,05$ для парного t-критерия Стьюдента.

Аннотирование биологических и молекулярных функций и сигнальных путей белков проводили с по-

мощью баз данных PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), Gene-Ontology (<http://www.geneontology.org/>), Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) и KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Анализ сети PPI (белок-белковых взаимодействий) выполняли с использованием базы данных STRING v10 (<https://string-db.org>).

Результаты

Для лучшего понимания биологических процессов и сигнальных путей, отличающих СКГ от дифференцированных опухолевых клеток, был проведен протеомный анализ лизатов этих клеток. Мы использовали *label-free* количественный протеомный нано-ВЭЖХ-МС/МС-метод для обнаружения и сравнения ДЭБ в 2 образцах (в триплетах): CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ. Протеомный анализ триптических пептидов с помощью программного обеспечения MaxQuant идентифицировал в общей сложности 1990 белков путем сопоставления 47978 МС/МС-спектров с пептидными последовательностями в базе данных Swiss-Prot_human с ложным уровнем обнаружения (FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов.

Дополнительная обработка данных с помощью программы Perseus идентифицировала следующее количество белков: Sample01 (CD133⁺ СКГ) – 1891 белок по 9124 пептидам (из них 7906 уникальных пептидов); Sample02 (CD133⁻ ДКГ) – 1748 белков по 8816 пептидам (из них 7598 уникальных пептидов). Из них 97,6 % были идентифицированы по совпадению двух и более пептидов и 2,4 % – по совпадению одного пептида. Процент сиквенс-покрытия исследуемых белков варьировал от 0,2 до 77,0 %, а именно: 1496 белков с сиквенс-покрытием до 20 %; 414 – от 20 до 40 %; 63 – от 40 до 60 %; 17 – от 60 до 77,3 %. Коэффициенты корреляции Пирсона между образцами CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ варьировали от 0,74 до 0,93.

Белки, идентифицированные в образцах CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ, анализировали на процент перекрытия. Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для двух клеточных популяций: 1649 белков (83 % из 1990 белков) были обнаружены во всех клеточных лизатах, 242 белка (12 %, 525 пептидов) – только в CD133⁺ СКГ, а 99 белков (5 %, 217 пептидов) – только в CD133⁻ ДКГ.

Из этих белков 589 были ДЭБ и имели статистически значимые изменения ($p < 0,05$) экспрессии в клеточной линии CD133⁺ СКГ по сравнению с CD133⁻ ДКГ с кратностью изменения >2 или $<0,5$. Использование 1 в качестве порогового логарифмического соотношения показало, что экспрессия 358 белков была выше, а экспрессия 231 белка была ниже в CD133⁺ СКГ по сравнению с CD133⁻ ДКГ. Повышение экспрессии более чем на порядок наблюдали у 60 ДЭБ, включая KIF6, MYH11, DLD, NPC2, TMEM165, UBXN1, BLVRA, H2AFY. Одновременно снижение экспрессии более чем на порядок отмечали для 62 ДЭБ, включая DNX57,

CSA2, KIF7, MYNN, RGPD3, SUMO2, ARHGEF18, SRSF9.

Динамический диапазон для идентифицированных белков составлял 6 порядков (от $4,1 \times 10^8$ до 363), что позволило выявить низкокопийные белки, такие как гемоксидаза 2, фактор сплайсинга 1, десмоглеин 1, кальпонин 3 и др. Также были идентифицированы прогностические маркеры МГБ (IDH1/2), специфические маркеры мезенхимальных (CD44, интегрин $\alpha 5$ и $\beta 1$) и прогениторных (член А3 семейства альдегиддегидрогеназы 1) стволовых клеток глиобластомы и маркеры пронеурональной дифференцировки нейтральных прогениторных стволовых клеток (тубулин $\beta 3$, нестин).

Полученные данные протеомного картирования белков различных типов клеток были подвергнуты сравнительному биоинформатическому анализу.

В дальнейшем в анализ каждой из групп сравнения были включены только ДЭБ. Каждый из 589 ДЭБ в клеточных линиях CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ классифицировали по клеточной локализации с использованием открытых баз данных, указанных выше. Если один белок был обнаружен в более чем 1 клеточном компартменте, он также учитывался. Клеточная локализация ДЭБ в основном включала структурные компоненты клетки (GO:0005623; 40,6 %), органеллы (GO:0043226; 28,5 %), протеиновые комплексы (GO:0032991; 18,1 %), мембрану (GO:0016020; 9,4 %). Таким образом, значительная часть белков относилась к внутриклеточной локализации.

Классификация белков по биологическим процессам показала, что большинство ДЭБ вовлечены в метаболический (GO:0008152; 27,5 %) и клеточные (GO:0009987; 32,3 %) процессы, организацию клеточных компонентов или биогенез (GO:0071840; 11,0 %), локализацию (GO:0051179; 7,9 %), биологическую регуляцию (GO:0065007; 6,5 %), ответ на стимулы (GO:0050896; 4,9 %), развитие (GO:0032502; 4,0 %). Основная часть ДЭБ выполняла связывающие (GO:0005488; 38,9 %) и каталитические (GO:0003824; 39,6 %) молекулярные функции, проявляла структурную (GO:0005198; 9,2 %) и транспортную (GO:0005215; 5,9 %) активность. Большинство ДЭБ относились к следующим классам белков: связывающие нуклеиновые кислоты (PC00171; 18,2 %), гидролазы (PC00121; 11,4 %), оксидоредуктазы (PC00176; 9,6 %), ферментативные модуляторы (PC00095; 7,5 %), белки цитоскелета (PC00085; 7,0 %), трансферазы (PC00220; 6,5 %), транскрипционные факторы (PC00218; 5,4 %), сигнальные молекулы (PC00207; 3,5 %).

Учитывая важную роль ВКМ-РВ в инвазии и диссеминации МГБ, мы изучили экспрессию белков, связанных с этим сигналингом. В результате протеомного анализа идентифицированы 18 детерминант сигнального каскада ВКМ-РВ. Увеличенная экспрессия наблюдалась у 14 протеинов ($p < 0,05$), из них 10 ДЭБ имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза в CD133⁺ СКГ по сравнению с ДКГ (см. таблицу).

Достоверно не изменяли экспрессию 4 протеина (COL6A2, ITGA3, LAMA2, TNC). Дополнительно проанализировали изменение экспрессии белков FERMT2, LOXL2, HDAC2 и FBN1, участие которых в регуляции процесса ВКМ-РВ доказано.

Детерминанты взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами клеток, экспрессия которых различается ($p < 0,05$) между CD133⁺ стволовыми клетками и CD133⁻ дифференцированными клетками глиомы

Determinants of interaction between extracellular matrix proteins and cell receptors, the expression of which differs ($p < 0.05$) between CD133⁺ stem cells and CD133⁻ differentiated glioma cells

Индекс гена Gene index	Название белка Protein name	Число идентифицированных пептидов Number of identified peptides	CD133 ⁺ стволовые клетки глиомы/CD133 ⁻ дифференцированные клетки глиомы CD133 ⁺ glioma stem cells/CD133 ⁻ differentiated glioma cells
CD44	CD44 антиген CD44 antigen	8	1,54
COL1A1	Коллаген типа 1 $\alpha 1$ Collagen type 1 $\alpha 1$	2	1,52
COL1A2	Коллаген типа 1 α Collagen type 1 α	3	1,85
COL6A1	Коллаген типа 4 $\alpha 1$ Collagen type 4 $\alpha 1$	3	8,46
COL6A3	Коллаген типа 4 $\alpha 3$ Collagen type 4 $\alpha 3$	16	2,31
FN1	Фибронектин 1 Fibronectin 1	8	2,26
HMMR	Рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности Hyaluronan-mediated motility receptor	3	1,76
ITGA2	Интегрин $\alpha 2$ Integrin $\alpha 2$	7	2,90
ITGA5	Интегрин $\alpha 5$ Integrin $\alpha 5$	3	3,62
ITGB1	Интегрин $\beta 1$ Integrin $\beta 1$	12	4,50
ITGB3	Интегрин $\beta 3$ Integrin $\beta 1$	9	2,24
ITGAV	Интегрин $\alpha 5$ Integrin $\alpha 5$	2	5,07
LAMB1	Ламинин $\beta 1$ Laminin $\beta 1$	5	8,84
LAMC1	Ламинин $\gamma 1$ Laminin $\gamma 1$	5	2,77

Обсуждение

При проведении исследования мы использовали глиомасферы, образованные из линии клеток U87MG МГБ человека в суспензионных условиях, в качестве модельной системы и единого источника для получения и изучения CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ. По предварительным данным, CD133⁺ СКГ, полученные из глиомасфер линий клеток первичных глиом, обладали высоким опухолевым потенциалом. Ста CD133⁺-клеток, введенных в мозг ксенографтов, хватало для индукции МГБ, похожей на первоначальную опухоль [19, 20]. CD133⁻-клетки, выделенные из глиомасфер, образованных при культивировании клеток первичной опухоли в адгезивных условиях, также обладали стволовоподобными свойствами, тогда как CD133⁻-клетки МГБ, полученные после CD133⁺-иммуносортинга из суспензии клеток глиомасфер, такими свойствами не обладали, имели очень низкий опухолевый потенциал, не образовывали глиомасфер и несли на своей поверхности маркеры 3 направлений нейтральной дифференцировки [20], что, по мнению ряда исследователей, давало все основания приписать им статус ДКГ [21]. Выход CD133⁺ СКГ в наших опытах не превышал 5 %.

В настоящей работе впервые выполнен сравнительный протеомный анализ CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ. Основное внимание было уделено ДЭБ ВКМ-РВ, играющего важную роль в процессах диссеминации опухолевых клеток. Мы идентифицировали 1990 белков, 18 из них связаны с ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ по сравнению с CD133⁻ ДКГ, 10 из которых (COL6A1, COL6A3, FN1, ITGA2, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, LAMB1, LAMC1) имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Схема белок-белковых взаимодействий идентифицированных детерминант ВКМ-РВ, экспрессия которых статистически значимо ($p < 0,05$) различалась в 2 клеточных популяциях, приведена на рисунке.

По сравнению с ДКГ СКГ проявляют устойчивость к химиолучевой терапии и агрессивную инвазию, часто вследствие кооптации сигнальных путей, относящихся к физиологии нормальных стволовых клеток [19]. После первоначального лечения большинство опухолей МГБ рецидивирует локально в местах, возникающих на периферии полости, полученной после резекции первичной опухоли. Недавно S. Munthe и соавт. сообщили, что клетки глиомы на периферии опухоли имеют фенотип СКГ [22]. СКГ локализованы внутри особых микроокружений, называемых нишами, где поддерживается их стволовость. Инициирование опухоли, выживание и инвазия регулируются динамически сложным взаимодействием между СКГ и различными компонентами микроокружения, включая клетки стромы хозяина [23]. С другой стороны, инвазивная область внешнего края опухоли также представляет собой специфическую микросреду, которая может стать

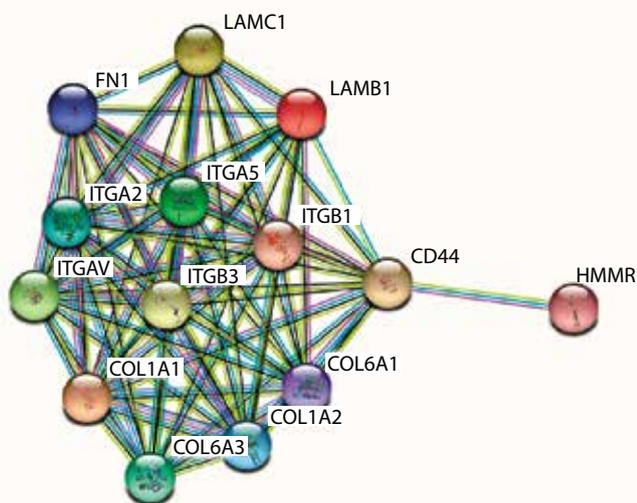


Схема белок-белковых взаимодействий идентифицированных детерминант рецепторного взаимодействия внеклеточного матрикса, экспрессия которых различалась ($p < 0,05$) в $CD133^+$ стволовых клетках и $CD133^-$ дифференцированных клетках глиомы

Diagram of protein-protein interactions of identified determinants of receptor interaction of extracellular matrix, expression of which differed ($p < 0.05$) between $CD133^+$ stem cells and $CD133^-$ differentiated glioma cells

еще одной нишей для СКГ [24]. В настоящее время мало известно о молекулярных особенностях инвазии СКГ, в том числе из зоны ниш на периферии опухоли.

Результаты исследования МГБ показали, что инвазия опухоли не происходит случайным образом; раковые клетки следуют по отдельным анатомическим структурам и склонны мигрировать вдоль трактов белого вещества, в периваскулярных пространствах, избегая определенных областей серого вещества [25]. Несмотря на обширное вторжение в паренхиму головного мозга и периваскулярные пространства, распространение опухоли вдоль цереброспинальной жидкости наблюдается только в 2 % случаев, а метастазы за пределами нейраксиса отмечались редко [26]. Это говорит в пользу того, что клеточная инвазия глиомы происходит в определенных тканевых отсеках. С учетом того, что внеклеточное пространство намного меньше, чем инвазивная клетка глиомы, и астроцитарные отростки покрывают приблизительно 99 % сосудистой сети [5], вообще удивительно, что опухолевая клетка способна двигаться через мозг. Результаты исследования показали, что клетки МГБ подвергаются нескольким генетическим и фенотипическим изменениям, которые позволяют им переключаться в инвазивный фенотип. Этим изменениям способствуют хемоаттрактантные и репульсивные сигналы, которые возникают при взаимодействии опухолевых клеток с их микро-средой [27].

Фокальная адгезия позволяет клеткам взаимодействовать с окружающей средой и имеет важное значение в эмбриональном развитии, поддержании целостности тканей и функций органов [28]. Фокальная адгезия выполняет структурную и сигнальную роль, связывая белки ВКМ с актиновым цитоскелетом,

и генерирует силу тяги, необходимую для миграции клеток и ее регуляции. Белки фокальной адгезии включают мембранные белки, такие как интегрины, которые соединяют компоненты ВКМ с актиновым цитоскелетом клеток [28].

Интегрины являются гетеродимерными рецепторами клеточной поверхности для гликопротеинов ВКМ и состоят из нековалентно связанных α - и β -субъединиц, пронизывающих клеточную мембрану. У млекопитающих охарактеризованы 18 α - и 8 β -субъединиц, которые образуют 24 уникальных интегринавых гетеродимера, распознающих определенные типы белков ВКМ [29]. Например, Arg-Gly-Asp (RGD), связывающие интегрины, распознают компоненты ВКМ, содержащие RGD-трипептидный мотив, такие как фибронектин, витронектин и фибриноген. Интегрины, связывающие Leu-Asp-Val (LDV), распознают LDV-связанные последовательности во ВКМ, такие как молекула адгезии сосудистых клеток 1 (MAdCAM-1) и молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1); интегрины, содержащие А-домен, взаимодействуют с ламинином и коллагеном; интегрины, не содержащие А-домен, связывают ламинин [30]. Взаимодействие между α - и β -субъединицами модулируется лигандами ВКМ, тем самым изменяя конформацию интегринавых α - β -гетеродимеров, и распространяется на их цитоплазматические хвосты, связанные с рядом белков фокальной адгезии. Бета-цепь имеет функциональное значение для классификации интегринов. Так, интегрины с $\beta 1$ - или $\beta 3$ -цепью преимущественно вовлечены во взаимодействие клетки с ВКМ.

Протеомный анализ идентифицировал 7 α -/ β -субъединиц интегринавых рецепторов. Среди них 5 были ДЭБ (ITGA2, ITGA5, ITGB1, ITGB3, ITGAV) и имели повышенную экспрессию в $CD133^+$ СКГ (см. таблицу). Интегрин ITGA2 образует гетеродимер с субъединицей интегрина $\beta 1$ в виде трансмембранного рецептора для адгезии клеток к ВКМ. Интегрин $\alpha 2\beta 1$ является основным рецептором коллагена, а также может связывать ламинин, фибронектин и Е-кадгерин. Он сверхэкспрессирован в различных раковых клетках, но отсутствует или слабо представлен в покоящихся эндотелиальных клетках [31]. Показано, что интегрин $\alpha 2\beta 1$ способствует миграции раковых клеток и инвазии, а также ангиогенезу. Кроме этого, его профили экспрессии в раковых клетках положительно коррелируют с их агрессивным поведением во время опухолевой прогрессии [32]. Таким образом, ITGA2 может представлять собой перспективную мишень для разработки таргетной терапии рака.

Интегрин $\alpha 5$ (ITGA5) связывается преимущественно с интегрином $\beta 1$ и считается одним из наиболее представленных интегринов во ВКМ. Он активно участвует в процессах адгезии, передаче межклеточных сигналов и вовлечен в процессы инвазии и онкогенеза [33]. Миграция, инвазия и пролиферация раковых клеток могут быть значительно супрессированы при

нокауте гена *ITGA5* в МГБ по сравнению с нормальными глиальными клетками [34].

Гипоксия и витронектин могут увеличивать экспрессию интегринового рецептора $\alpha\beta3$, в состав которого входит *ITGAV*, на цитоплазматической мембране клеток МГБ и стимулировать их инвазию [35]. Поскольку он в избытке присутствует на эндотелиальных клетках, многие исследования в основном фокусируются на его роли в опухолевом ангиогенезе и эпителиально-мезенхимальном переходе. Однако недавно показано, что повышенная экспрессия интегринового рецептора $\alpha\beta3$ на клетках МГБ является плохим прогностическим фактором заболевания [36].

Внеклеточный матрикс значительно влияет на клиническое поведение опухолей. Биологические изменения во ВКМ могут непосредственно регулировать адгезию и диссеминацию клеток, поэтому большое внимание уделяется изучению роли ВКМ-связанных белков в опухолевой прогрессии. Количество ВКМ в опухолевой ткани больше, чем в нормальной ткани мозга (50 % против 20 %) [37]. Нерегулируемая динамика ВКМ является отличительной особенностью рака. Состав ВКМ глиомы отличается от такового у здорового мозга, тогда как универсальные компоненты ВКМ экспрессируются равномерно в здоровом мозге, уровни фибриллярных белков и ламинина повышены в МГБ [38]. Ряд белков ВКМ синтезируется самими клетками МГБ, к ним относятся ламинины, коллагены и фибронектин.

Ламинины представляют собой семейство больших внеклеточных гетеротримерных гликопротеинов базальной мембраны и обычно экспрессированы вокруг кровеносных сосудов. Как известно, МГБ – широко васкуляризированный тип опухоли. Ламинины играют важную роль во многих фундаментальных биологических процессах, включая эмбриогенез, опухолевую инвазию, дифференцировку тканей и заживление ран [39]. Как видно из таблицы, экспрессия *LAMB1* и *LAMC1* увеличена в $CD133^+$ СКГ в 8,84 и 2,77 раза соответственно. Синтез фибриллярных белков, таких как *COL6A1* и *COL6A3*, повышен в $CD133^+$ СКГ в 8,46 и 2,31 раза соответственно.

Фибронектин (FN1) является важным белком ВКМ, который сверхэкспрессирован при нескольких видах рака и участвует в отдельных этапах онкогенеза. В частности, повышенные уровни FN1 наблюдаются в образцах опухолей и периферической крови [40] у пациентов с глиобластомой. FN1 также модулирует в концентрационной манере адгезию, пролиферацию и дифференцировку СКГ [41]. Экспрессия FN1 увеличивается в мигрирующем крае опухолевой массы (глиомезенхимальный узел). Специфическое ингибирование фибронектинсвязывающих интегринов уменьшает миграцию опухолевых клеток [42]. Экспрессия FN1 повышена в $CD133^+$ СКГ (см. таблицу) по сравнению с дифференцированными клетками МГБ.

Взаимодействие компонента ВКМ гиалуронана с его рецепторами HMMR и CD44, которые сверхэкспрессированы в клетках глиомы, является основным условием для инвазии глиомы [43]. Опосредованный гиалуронатом рецептор подвижности (HMMR) – это онкоген, который играет важную роль в прогрессии солидных опухолей [44]. HMMR экспрессирован практически повсеместно в образцах человеческих глиом и его экспрессия выше в МГБ, чем в глиомах более низкой злокачественности. Клеточные линии глиомы также имеют более высокий уровень HMMR, чем нормальные астроциты человека [43]. HMMR и CD44 являются двумя рецепторами для гиалуронана, важного компонента микроокружения при большинстве злокачественных опухолей. CD44 идентифицирован как маркер опухолевых стволовых клеток и непосредственно регулирует их при различных видах рака, включая глиобластому [45]. HMMR образует комплекс с CD44, который при связывании с гиалуронатом активирует внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие выживаемость, пролиферацию и инвазию опухолевых клеток [46]. По нашим данным, уровни HMMR и CD44 повышены в $CD133^+$ СКГ по сравнению с $CD133^-$ ДКГ в 1,76 и 1,54 раза соответственно.

FERMT2 является важным регулятором активности интегринов, адгезии клеток к ВКМ и участвует в канцерогенезе и опухолевой прогрессии [47]. По нашим данным, уровни FERMT2 увеличены в клетках $CD133^+$ СКГ в 3,56 раза. Механизм действия FERMT2 частично связан с уменьшением экспрессии каспазы 3 (CASP3) [48]. В нашем исследовании также отмечается снижение уровня CASP3 в клетках $CD133^+$ СКГ в 0,45 раза по сравнению с ДКГ.

Белки ВКМ коллаген и эластин являются хорошо известными субстратами для лизилоксидазы (LOX) – подобного протеина 2 (LOXL2) [49], секретируемой медьзависимой аминоксидазы, члена семейства LOX. Повышенная экспрессия LOXL2 усиливает пролиферацию и инвазию клеток глиомы [50]. Существует взаимодействие между LOXL2 и HDAC2, а их экспрессии коррелирует между собой в образцах ткани глиомы, что подтверждает синергическую онкогенную роль этих 2 белков [50]. Таким образом, LOXL2 является перспективным прогностическим биомаркером и потенциальной терапевтической мишенью для пациентов с глиомой. По результатам нашего анализа в $CD133^+$ СКГ наблюдается увеличение экспрессии LOXL2 и HDAC2 в 9,02 и 1,74 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с ДКГ.

Новые данные свидетельствуют о том, что фибриллы участвуют в онкогенезе [51]. Фибриллы являются первичными компонентами микрофибрилл во ВКМ многих эластичных и неэластичных соединительных тканей. Фибриллин 1 (FBN1), фибриллин 2 (FBN2) и фибриллин 3 (FBN3) составляют семейство фибриллинов. Показано, что FBN1 играет важную роль в поддержании плюрипотентности эмбриональных и опухолевых

стволовых клеток [52]. Мы наблюдали повышение уровня FBN1 в CD133⁺ СКГ в 6,2 раза.

Заключение

В настоящем исследовании впервые проведен сравнительный протеомный анализ CD133⁺ СКГ и CD133⁻ ДКГ. Основное внимание было уделено ДЭБ ВКМ-РВ, играющего важную роль в процессах диссеминации опухолевых клеток. Мы идентифицировали 1990 белков, 18 из них связаны с ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ

по сравнению с CD133⁻ ДКГ, 10 из которых (COL6A1, COL6A3, FN1, ITGA2, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, LAMB1, LAMC1) имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Отмечено повышение в CD133⁺ СКГ уровней 4 белков (FERMT2, LOXL2, HDAC2, FBN1), активирующих сигналинг ВКМ-РВ. Представленные результаты, на наш взгляд, указывают на возможность целенаправленного терапевтического воздействия на сигнальный каскад ВКМ-РВ в CD133⁺ СКГ, что может использоваться при разработке новых схем лечения МГБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Holland E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6242–4. PMID: 10841526.
- Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31. DOI: 10.1038/nrc2818. PMID: 20414201.
- Beauchesne P. Extra-neural metastases of malignant gliomas: Myth or reality? *Cancers* 2011;3:461–77. DOI: 10.3390/cancers3010461. PMID: 24212625.
- Bolteus A.J., Berens M.E., Pilkington G.J. Migration and invasion in brain neoplasms. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001;1(3):225–32. PMID: 11898522.
- Cuddapah V.A., Robel S., Watkins S. et al. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* 2014;15(7):455–65. DOI: 10.1038/nrn3765. PMID: 24946761.
- Claes A., Idema A.J., Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 2007;114(5):443–58. DOI: 10.1007/s00401-007-0293-7. PMID: 17805551.
- Cayre M., Canoll P., Goldman J.E. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 2009;88(1):41–63. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.02.001. PMID: 19428961.
- Le Clainche C., Carlier M.F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008;88(2):489–513. DOI: 10.1152/physrev.00021.2007. PMID: 18391171.
- Huttenlocher A., Horwitz A.R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2011;3(9):a005074. DOI: 10.1101/cshperspect.a005074. PMID: 21885598.
- Roos A., Ding Z., Loftus J.C., Tran N.L. Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 2017;7:120. DOI: 10.3389/fonc.2017.00120. PMID: 28670569.
- Kang S.K., Park J.B., Cha S.H. Multipotent, dedifferentiated cancer stem-like cells from brain gliomas. *Stem Cells Dev* 2006;15(3):423–35. DOI: 10.1089/scd.2006.15.423. PMID: 16846378.
- Chen J., McKay R.M., Parada L.F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models and stem cells. *Cell* 2012;149(1):36–47. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009. PMID: 22464322.
- Persano L., Rampazzo E., Basso G. et al. Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* 2013;85(5):612–22. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.10.001. PMID: 23063412.
- Ortensi B., Osti D., Pellegatta S. et al. Rai is a new regulator of neural progenitor migration and glioblastoma invasion. *Stem Cells* 2012;30(5):817–32. DOI: 10.1002/stem.1056. PMID: 22311806.
- Cheng L., Wu Q., Guryanova O.A. et al. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406(4):643–8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.123. PMID: 21371437.
- Safa A.R., Saadatzadeh M.R., Cohen-Gadol A.A. et al. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis* 2015;2(2):152–63. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.02.001. PMID: 26137500.
- Tirino V., Desiderio V., Paino F. et al. Methods for cancer stem cell detection and isolation. *Methods Mol Biol* 2012;879:513–29. DOI: 10.1007/978-1-61779-815-3_32. PMID: 22610581.
- Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans. *Cell Transplantation* 2014;9:1–42. DOI: 10.3727/096368914X684907. PMID: 25303679.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396–401. DOI: 10.1038/nature03128. PMID: 15549107.
- Beier D., Hau P., Proescholdt M. et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007;67(9):4010–5. PMID: 17483311.
- Beier C.P., Beier D. CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011;3:701–10. PMID: 21196345.
- Munthe S., Petterson S.A., Dahlrot R.H. et al. Glioma cells in the tumor periphery have a stem cell phenotype. *PLoS One* 2016;11(5):e0155106. DOI: 10.1371/journal.pone.0155106. PMID: 27171431.
- Cheng L., Huang Z., Zhou W. et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 2013;153(1):139–52. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.021. PMID: 23540695.
- Hambardzumyan D., Bergers G. Glioblastoma: defining tumor niches. *Trends Cancer* 2015;1(4):252–65. DOI: 10.1016/j.trecan.2015.10.009. PMID: 27088132.
- Matsukado Y., Maccarty C.S., Kernohan J.W. The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg* 1961;18:636–44. DOI: 10.3171/jns.1961.18.5.0636. PMID: 13768222.
- Muller C., Holtschmidt J., Auer M. et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl*

- Med 2014;6(247):247ra101.
DOI: 10.1126/scitranslmed.3009095.
PMID: 25080476.
27. Glass R., Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta Neuropathol* 2014;128:347–62.
DOI: 10.1007/s00401-014-1274-2.
PMID: 24722970.
28. Wu C. Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell Adhesion Mig* 2007;1(1):13–8. PMID: 19262093.
29. Arnaout M.A., Goodman S.L., Xiong J.P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(5):495–507.
DOI: 10.1016/j.ceb.2007.08.002.
PMID: 17928215.
30. Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 19):3901–3.
DOI: 10.1242/jcs.03098.
PMID: 16988024.
31. Madamanchi A., Santoro S.A., Zutter M.M. alpha2beta1 Integrin. *Adv Exp Med Biol* 2014;819:41–60.
DOI: 10.1007/978-94-017-9153-3_3.
PMID: 25023166.
32. Danen E.H. Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr Pharm Des* 2005;11(7):881–91.
PMID: 15777241.
33. Xie J.J., Guo J.C., Wu Z.Y. et al. Integrin alpha5 promotes tumor progression and is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2016;48:69–75.
DOI: 10.1016/j.humpath.2015.09.029.
PMID: 26772401.
34. Feng L., Ma J., Ji H. et al. miR-330-5p suppresses glioblastoma cell proliferation and invasiveness through targeting ITGA5. *Biosci Rep* 2017;37(3).
DOI: 10.1042/BSR20170019.
PMID: 28336765.
35. Skuli N., Monferran S., Delmas C. et al. Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res* 2009;69(8):3308–16.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2158.
PMID: 19351861.
36. Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):9–22. DOI: 10.1038/nrc2748.
PMID: 20029421.
37. Klekner Á., Hutóczy G., Virga J. et al. Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain. *Clin Neurol Neurosurg* 2015;139:138–43.
PMID: 26451999.
38. Serres E., Debarbieux F., Stanchi F. et al. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane *in vitro* and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* 2014;33(26):3451–62.
DOI: 10.1038/onc.2013.305.
PMID: 23912459.
39. Ryan M.C., Christiano A.M., Engvall E. et al. The functions of laminins: lessons from *in vivo* studies. *Matrix Biol* 1996;15(6):369–81. PMID: 9049976.
40. Caffo M., Germanò A., Caruso G. et al. An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* 2004;146(10):1113–8.
DOI: 10.1007/s00701-004-0344-y.
PMID: 15309586.
41. Yu Q., Xue Y., Liu J. et al. Fibronectin promotes the malignancy of glioma stem-like cells via modulation of cell adhesion, differentiation, proliferation and chemoresistance. *Front Mol Neurosci* 2018;11:130. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00130. PMID: 29706869.
42. Yeh W.L., Lu D.Y., Liou H.C. et al. A forward loop between glioma and microglia: glioma-derived extracellular matrix-activated microglia secrete IL-18 to enhance the migration of glioma cells. *J Cell Physiol* 2012;227(2):558–68.
DOI: 10.1002/jcp.22746.
PMID: 21442623
43. Wiranowska M., Ladd S., Moscinski L.C. et al. Modulation of hyaluronan production by CD44 positive glioma cells. *Int J Cancer* 2010;127(3):532–42.
DOI: 10.1002/ijc.25085. PMID: 19957333.
44. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002;277(7):4589–92.
DOI: 10.1074/jbc.R100038200.
PMID: 11717317.
45. Anido J., Saez-Borderias A., Gonzalez-Junca A. et al. TGF-beta receptor inhibitors target the CD44(high)/Id1(high) glioma-initiating cell population in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2010;18(6):655–68. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.10.023. PMID: 21156287.
46. Hamilton S.R., Fard S.F., Paiwand F.F. et al. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm(CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282(22):16667–80.
DOI: 10.1074/jbc.M702078200.
PMID: 17392272.
47. Zhao T., Guan L., Yu Y. et al. Kindlin-2 promotes genome instability in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2013;330(2):208–16.
DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.043.
PMID: 23211537.
48. Ghoobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55(3):178–94. PMID: 15890640.
49. Kim Y.M., Kim E.C., Kim Y. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol Biol Rep* 2011;38(1):145–9.
DOI: 10.1007/s11033-010-0088-0.
PMID: 20306300.
50. Du X.G., Zhu M.J. Clinical relevance of lysyl oxidase-like 2 and functional mechanisms in glioma. *Onco Targets Ther* 2018;11:2699–708. DOI: 10.2147/OTT.S164056. PMID: 29785119.
51. Guo Q., Song Y., Zhang H. et al. Detection of hypermethylated fibrillin-1 in the stool samples of colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2013;30(4):695.
DOI: 10.1007/s12032-013-0695-4.
PMID: 23963856.
52. Cierna Z., Mego M., Jurisica I. et al. Fibrillin-1 (FBN-1) a new marker of germ cell neoplasia *in situ*. *BMC Cancer* 2016;16:597. DOI: 10.1186/s12885-016-2644-z. PMID: 27487789.

Вклад авторов

В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, протеомный анализ лизатов опухолевых клеток, анализ литературы, написание текста рукописи;

И.С. Брюховецкий: биоинформационный анализ полученных данных;

Е.А. Савченко: получение CD133⁺ стволовых клеток глиомы и CD133⁻ дифференцированных клеток глиомы;

Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов для протеомного анализа.

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: developing the research design, proteomics analysis of tumor cell lysate, literature analysis, article writing;

I.S. Bryukhovetskiy: bioinformatics analysis of the obtained data;

E.A. Savchenko: preparation of glioma CD133⁺ stem cells and glioma CD133⁻ differentiated cells;

N.E. Arnotskaya: sample preparation for proteomics analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

В. Е. Шевченко/V. E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

И. С. Брюховецкий/I. S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>

Е. А. Савченко/E. A. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0003-1433-5533>

Н. Е. Арноцкая/N. E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.