

УДК 616-006.66

ВЫЯВЛЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ

© 2023 г. А. Ю. Лупатов¹, *, А. М. Гисина¹, Я. С. Ким¹,
С. Е. Новикова¹, М. А. Пятницкий¹, К. Н. Ярыгин¹

¹ФГБНУ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

*e-mail: alupatov@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 11.07.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

Проминин-1 (CD133) является основным маркером раковых стволовых клеток колоректальной аденокарциномы – субпопуляции раковых клеток в составе опухоли, обладающих повышенной туморогенностью и ответственных за прогрессию, рецидивы и метастазирование. Данные сравнительного протеомного профилирования CD133-позитивных и CD133-негативных клеток с помощью тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения, сопряженной с жидкостной хроматографией, были получены ранее на опухолевых образцах колоректальной аденокарциномы от 5 пациентов и 2 клеточных линий. Информация о дифференциальной экспрессии белков была использована для функциональной аннотации и восходящего поиска молекулярных регуляторов с привлечением онлайн платформы geneXplain. Выявленные на уровне дифференциально экспрессирующихся белков существенные различия между клеточными линиями и клиническими образцами могут исчезать на уровне транскрипционных факторов, регулирующих дифференциальную экспрессию. Предсказанные в результате анализа клинических образцов транскрипционные факторы и мастер регуляторные молекулы легли в основу гипотетической модели молекулярного механизма регуляции профиля экспрессии, характерного для раковых стволовых клеток. В качестве ключевого регулятора дифференциальной экспрессии была предсказана малая GTPаза RhoA, в отношении которой, уже имеется информация о ее вовлеченности в проявление морфологических и функциональных особенностей, характерных для стволовых клеток опухолей.

Ключевые слова: биоинформатический анализ, колоректальная аденокарцинома, протеомное профилирование, раковые стволовые клетки, CD133, RhoA

DOI: 10.56304/S0234275823020084

Развитие биомедицинских технологий явилось причиной заметного прогресса в лечении онкологических заболеваний. Создаваемые с использованием методов биоинженерии таргетные препараты, позволили улучшить результаты лечения различных форм злокачественных новообразований, включая метастатический рак [1]. Применение генетического редактирования открыло возможность направленной доставки таргетных препаратов и коррекции генетических нарушений [2]. Большие надежды возлагаются на клеточные технологии и прежде всего клеточную иммунотерапию. Генетически модифицированные *ex vivo* эффекторные клетки иммунной системы могут оказывать терапевтический эффект при многих онкологических заболеваниях [3]. Не является исключением и ко-

лоректальный рак, являющийся одной из основных причин смертности от онкологических заболеваний в мире. Основываясь на данных генетических и постгеномных исследований, в настоящее время, активно разрабатываются новые подходы к терапии этого заболевания, которые включают использование антител и их фрагментов, аптамеров [4], а также различные варианты терапевтических вакцин [5] и адоптивной иммунотерапии [6]. Однако фактором, сдерживающим применение всех этих перспективных биотехнологий в клинике, является недостаточная информация о молекулярных мишенях, способных обеспечить эффективную элиминацию опухолевых клеток [7]. В этой связи, в качестве потенциальной мишени имеет смысл рассматривать биомолекулы, экспрессируемые раковыми стволовыми клетками (РСК), поскольку их подавление должно оказывать критическое воздействие на прогрессию опухоли [8].

Список сокращений: РСК – раковые стволовые клетки, LC-МС/МС – тандемная масс-спектрометрия, сопряженная с жидкостной хроматографией.

РСК, или как их еще называют опухоль-иницирующие клетки, представляют собой субпопуляцию злокачественных клеток в составе опухоли, обладающую способностью инициировать образование новых опухолей при трансплантации иммунодефицитным животным и давать потомство в виде более дифференцированных опухолевых клеток. Поскольку РСК обладают высокой туморогенностью на них возлагают ответственность за метастазирование и рецидивы заболевания. Целый ряд признаков характерных для нормальных стволовых клеток, таких как способность поддерживать собственную субпопуляцию путем асимметричного деления, способность к миграции, устойчивость к ксенобиотикам, характерны и для РСК, что позволило говорить об их происхождении в результате малигнизации региональных стволовых клеток [9]. Для РСК, также характерно наличие ряда молекулярных маркеров, присутствующих на нормальных стволовых клетках. Одним из таких маркеров является гликопротеин промиллин-1 (CD133), экспрессирующийся на мембране РСК. Проведенный нами анализ научных публикаций, в том числе с привлечением машинных методов, показал, что именно CD133 наиболее часто упоминается в качестве маркера РСК колоректальной аденокарциномы [10, 11] и, по видимому, может быть использован для их идентификации и выделения.

Молекулярное профилирование опухолевых клеток и последующий биоинформатический анализ являются основным путем выявления потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии. Транскриптомное профилирование позволяет обнаружить минимальное количество транскриптов и сформировать наиболее полное представление о сигнальных путях, участвующих в реализации интересующих свойств опухолевых клеток. Однако для проведения транскриптомного анализа требуется очень хорошее качество биологического материала, что не всегда возможно при использовании опухолевой ткани, полученной от пациентов. Кроме того, существенные различия между данными транскриптомного и протеомного анализа являются вполне обычной ситуацией [12]. Последний, напротив, показывает конечный этап реализации генетической программы и, следовательно, в этом плане более надежен. Однако, даже использование для профилирования тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения, сопряженной с жидкостной хроматографией (LC-MS/MS), не позволяет выявить большинство белков, представленных в клетке в низкой концентрации, например, многие транскрипционные факторы.

Ранее мы провели сравнительное LC-MS/MS профилирование субпопуляций опухолевых клеток, отличающихся по экспрессии CD133, выделенных из биопсийных образцов от пациентов с

колоректальной аденокарциномой [13], а также из двух клеточных линий колоректального рака [14]. В настоящей работе мы поставили цель использовать эти данные для моделирования молекулярной регуляции стволового фенотипа опухолевых клеток, а также для сравнения результатов, полученных на клеточных линиях и образцах опухолевой ткани пациентов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Списки дифференциально экспрессируемых CD133-позитивными и CD133-негативными клетками белков, основанные на данных LC-MS/MS профилирования, были сформированы отдельно для образца, полученного от каждого пациента и каждой клеточной линии. В них были включены белки с кратностью изменения более чем в 2.5 раза (p -value < 0.01). Данные масс-спектрометрии были депонированы в ProteomeXchange Consortium через PRIDE partner repository (PXD005108).

Для функциональной классификации белков и восходящего поиска молекулярных регуляторов их экспрессии была использована онлайн платформа geneXplain (geneXplain GmbH, Germany, <https://genexplain.com/genexplain-platform>). Функциональная классификация проводилась на основе базы данных Gene Ontology в терминах, относящихся к биологическому процессу, клеточному компоненту и молекулярной функции с минимальным количеством совпадений в группе – 7 и отсечкой по p -value – 0.001. Для определения молекулярных регуляторов экспрессии дифференциальных белков мы применили протокол восходящего анализа в автоматическом режиме. Для предсказания транскрипционных факторов, регулирующих выявленную дифференциальную экспрессию, была использована база данных TRANSFAC и выбрана взвешенная матрица с p -value < 0.001. Поиск мастер регуляторов, проводился на основе базы данных TRANSFAC (видоспецифичный) (2017.2) со следующими параметрами: поиск с максимальным радиусом 10, score cutoff 0.2, FDR cutoff 0.05, z -score cutoff 1.0.

Для проведения кластерного анализа данные обрабатывали в компьютерной программе R (The R Project for Statistical Computing, <https://www.r-project.org/>), используя иерархическую кластеризацию методом полной связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для функциональной классификации белков, дифференциально экспрессирующихся в CD133-положительных и CD133-отрицательных клетках колоректальных опухолей, и восходящего поиска молекулярных регуляторов дифференциальной экспрессии, были использованы данные протеомного профилирования, полученные нами ранее

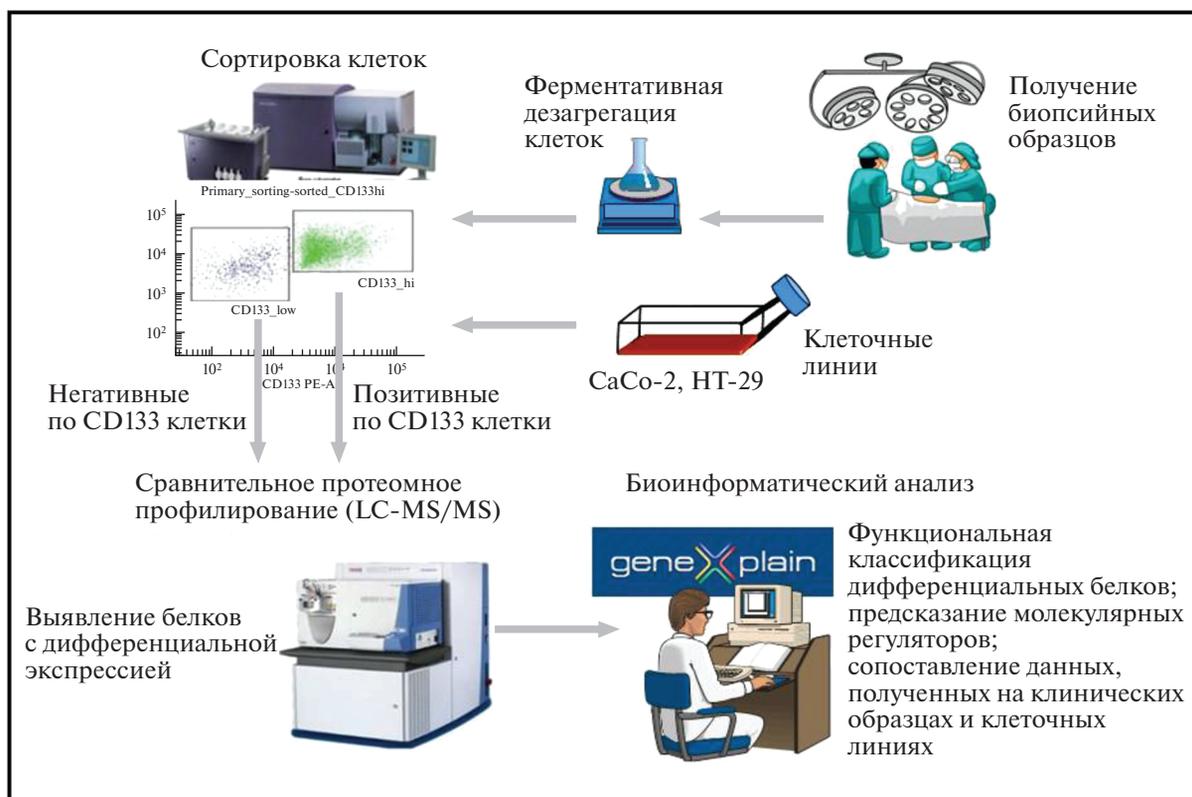


Рис. 1. Получение образцов опухолевых клеток для сравнительного протеомного профилирования и биоинформатического анализа.

Fig. 1. Obtaining tumor cell samples for comparative proteomic profiling and bioinformatic analysis.

на образцах от 5 пациентов [13] и клеточных линиях колоректальной аденокарциномы CaCo-2 и HT-29 [14]. Процедура получения данных для биоинформатического анализа отражена на рис. 1. Количество идентифицированных белков заметно отличалось в образцах ткани от разных пациентов, что, по-видимому, было связано с качеством биоматериала. В случае клеточных культур было идентифицировано более 2000 белков в каждой из линий (табл. 1). Белки с различием в экспрессии более чем в 2.5 раза составили списки дифференциально экспрессирующихся белков (табл. S1, лист 1, дополнительный материал).

Чтобы оценить различия в спектре дифференциальной экспрессии и, прежде всего, между клеточными линиями и образцами, полученными от пациентов, мы провели кластерный анализ. Согласно его результатам, несмотря на некоторые различия между биопсийными образцами, данные, полученные на клиническом материале, могут быть объединены в группу, которая существенно отличается от данных, полученных на клеточных линиях (рис. 2a). В то же время клеточные линии CaCo-2 и HT-29 также сильно отличаются между собой по спектру дифференциально экспрессирующихся белков.

Таблица 1. Общее количество идентифицированных белков и белков, дифференциально экспрессируемых CD133-положительными и CD133-негативными опухолевыми клетками

Table 1. Total number of identified proteins and number of proteins differentially expressed by CD133-positive and CD133-negative tumor cells

| Количество белков | Пациент | | | | | Клеточная линия | |
|--------------------|---------|-----|-----|------|------|-----------------|-------|
| | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | CaCo-2 | HT-29 |
| Идентифицированных | 317 | 369 | 862 | 1421 | 1602 | 2541 | 2007 |
| Дифференциальных | 36 | 7 | 71 | 86 | 19 | 39 | 35 |

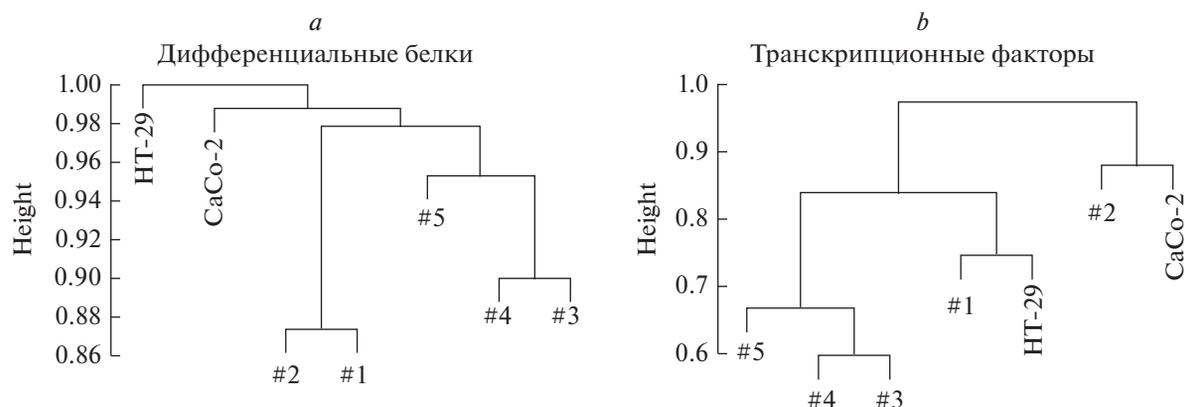


Рис. 2. Кластерный анализ данных о дифференциальной экспрессии белков в CD133-позитивных и CD133-негативных опухолевых клетках (а) и кластерный анализ предсказанных транскрипционных факторов, регулирующих дифференциальную экспрессию (б).

Fig. 2. Cluster analysis of data on differential expression of proteins in CD133-positive and CD133-negative tumor cells (a) and cluster analysis of the predicted transcription factors regulating the differential expression (b).

Такой результат поставил под сомнение релевантность данных, получаемых при использовании клеточных линий в качестве модели для поиска молекулярных мишеней для таргетной терапии. Однако причиной этого несоответствия может быть также неполнота данных, характерная для протеомного профилирования, поскольку различные наборы выявленных дифференциально экспрессирующихся белков, на самом деле, могут быть вовлечены в общие функциональные процессы и иметь общие механизмы регуляции. Чтобы изучить этот вопрос мы провели функциональную аннотацию дифференциально экспрессирующихся белков (табл. S1, лист 2–4, дополнительный материал) и восходящий поиск их молекулярных регуляторов.

С помощью анализа “Gene Ontology” на платформе geneXplain с последующей кластеризацией найденных терминов при помощи алгоритма “TreeMap functional classification” мы нашли 12 мета-терминов в группе “клеточные компоненты” общих для всех клинических образцов и клеточных линий. Мета-термины были ассоциированы с внеклеточными везикулами, экзосомами и люменами (табл. S1, лист 3, дополнительный материал). Учитывая связь CD133 с организацией мембраны и внеклеточными везикулами [15, 16], появились основания предположить определенную общность выявляемых дифференциальных белков. Кроме того, для клинических образцов было сделано предположение об участии дифференциально экспрессирующихся генов в регуляции процесса апоптоза, реакции на стресс, сборке макромолекул, включая организацию нуклеосом и ДНК. Выявленные функциональные группы содержали набор белков с повышенной экспрессией в CD133-

позитивных клетках: ANXA1, CEACAM5, CORO1A, DPEP1, MND A, MPO, PIP, S100A8 и S100A9.

Далее мы предприняли восходящий поиск транскрипционных факторов, обеспечивающих дифференциальную экспрессию выявленных белков. Предсказанные при помощи geneXplain транскрипционные факторы были объединены в списки отдельно для каждого образца (табл. S1, лист 5, дополнительный материал). Результаты кластерного анализа, проведенного на уровне транскрипционных факторов, отличались от полученных на уровне дифференциальных белков. Предсказанные в отношении обеих клеточных линий транскрипционные факторы не образовывали изолированных групп и проявляли существенно больше сходства с клиническими образцами (рис. 2b). Таким образом, результаты анализа транскрипционных факторов подтверждают возможность того, что механизмы регуляции экспрессии CD133 являются общими для клинических образцов и клеточных линий.

Для моделирования молекулярного механизма регуляции стволового фенотипа опухолевых клеток мы сформировали общий список белков на основе данных об их дифференциальной экспрессии в клинических образцах. В него вошли белки, дифференциально экспрессирующиеся в образцах не менее чем от двух пациентов. Итоговый список составил 25 белков, среди которых, 22 молекулы имели повышенную экспрессию в CD133-позитивных клетках (табл. S2, лист 1, дополнительный материал). Кроме того, был сформирован референсный список белков, экспрессия которых отличалась менее чем в 1.5 раза в образцах от двух и более пациентов. Белки, одновременно соответствующие критериям обоих списков, в списки

В качестве ключевого регулятора в построенной модели выступила молекула RhoA, взаимодействующая посредством промежуточных молекул с факторами транскрипции: C/EBPalpha, ER-alpha-L, MEF-2A, nanog, E12, PLZB, HMG1Y, DBP, SF-1, AML3, TBP, ipf1, Cdx-2 и CDP. Следует отметить, что экспрессия ключевой молекулы RhoA, фактора транскрипции HMG1Y, а также промежуточных молекул бета-катенина и ДНК-РКcs была выявлена нами у некоторых пациентов, хотя эти молекулы и не вошли в список дифференциально экспрессирующихся белков (табл. S1, лист 1, дополнительный материал).

RhoA представляет собой малую ГТФазу семейства Rho, которая участвует в организации актина, поляризации клеток, их развитии и контроле транскрипции. Сверхэкспрессия RhoA связана с пролиферацией и метастазированием опухолевых клеток [17]. Сигнальные пути, опосредованные трансформирующим фактором роста бета (TGF- β), которые контролируют прогрессию опухоли, часто имеют RhoA-зависимые механизмы [18]. RhoA является ключевым фактором в выпячивании мембраны и образовании ламелей при миграции клеток карциномы молочной железы [19]. Экспрессия RhoA заметно выше в клетках рака простаты по сравнению с доброкачественными клетками простаты, при этом повышенная экспрессия RhoA связана с повышенной летальностью и агрессивной пролиферацией опухоли. Подавление RhoA снижает жизнеспособность регулируемых андрогенами клеток и затрудняет миграцию клеток рака предстательной железы [20]. RhoA также гиперактивирована в клетках рака желудка, а ее подавление снижает их пролиферацию [21]. Экспрессия RhoA коррелирует с более выраженным лимфогенным метастазированием и инвазией при раке верхних мочевыводящих путей [22]. Снижение экспрессии RhoA также связано с повышенной чувствительностью клеточной линии рака толстой кишки HT-29 к доксорубину [23]. Все эти данные указывают на то, что RhoA обладает значительным потенциалом в качестве перспективной молекулярной мишени для противоопухолевой терапии.

Таким образом на основании данных протеомного профилирования белков, характерных для CD133-позитивных клеток, мы построили модель предполагаемых сигнальных путей, ассоциируемых с РСК колоректальной аденокарциномы. В пользу достоверности построенной модели свидетельствуют данные о совместном влиянии CD133 и Rho на топологию клеточной мембраны [24], а также описанная в литературе роль Rho в формировании более злокачественного фенотипа, характерного для РСК. Ранее мы использовали совместное транскриптомное и протеомное профилирование клеточных линий с последующим биоинформатическим анализом на плат-

форме geneXplain для поиска ключевого молекулярного регулятора экспрессии CD133. В результате предсказанный на эту роль транскрипционный фактор TRIM28 был верифицирован с помощью CRISPR-Cas9 опосредованного геномного редактирования [14]. К сожалению, при использовании клинических проб такой способ верификации затруднителен. Подтверждение сделанных предположений потребует длительного накопления и анализа постгеномных данных о клинических образцах опухолевой ткани. Несмотря на то, что в данной работе показано, как выявленные на уровне дифференциально экспрессирующихся белков различия между клеточными линиями и клиническими образцами могут сглаживаться при восходящем биоинформатическом поиске молекулярных регуляторов, вопрос о трансляции данных, полученных на клеточных линиях, на клиническую ситуацию остается открытым. По-видимому, этот вопрос должен решаться в каждом конкретном случае отдельно, в зависимости от типа опухоли и клеточной линии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала: <https://sciencejournals.ru/journal/biotech/>.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122022800499-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ganesh K., Massagué J. Targeting metastatic cancer. *Nat. Med.*, 2021, 27(1), 34–44. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4>
2. Ghaemi A., Bagheri E., Abnous K., Taghdisi S.M., Ramezani M., Alibolandi M. CRISPR-cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy. *Life Sci.*, 2021, 267, 118969. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118969>
3. Лупатов А.Ю., Каралкин П.А., Бойко А.А., Ярыгин К.Н. Аутогенная трансплантация Т-лимфоцитов как инструмент для антиген-специфической иммунотерапии онкологических заболеваний. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*, 2018, 20(3), 95–104. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-3-95-104>
4. Kavousipour S., Khademi F., Zamani M., Vakili B., Mokarram P. Novel biotechnology approaches in colorectal cancer diagnosis and therapy. *Biotechnol. Lett.*, 2017, 39(6), 785–803. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2303-8>
5. Wooster A.L., Girgis L.H., Brazeale H., Anderson T.S., Wood L.M., Lowe D.B. Dendritic cell vaccine therapy for

- colorectal cancer. *Pharmacol. Res.*, 2021, 164, 105374. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105374>
6. Aparicio C., Belver M., Enríquez L., Espeso F, Núñez L., Sánchez A., de la Fuente M.Á., González-Vallinas M. Cell Therapy for Colorectal Cancer: The Promise of Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(21), 11781. <https://doi.org/10.3390/ijms222111781>
 7. Middleton G., Robbins H., Andre F., Swanton C. A state-of-the-art review of stratified medicine in cancer: towards a future precision medicine strategy in cancer. *Ann. Oncol.*, 2022, 33(2), 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.11.004>
 8. Walcher L., Kistenmacher A.K., Suo H., Kitte R. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front. Immunol.*, 2020, 11, 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>
 9. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
 10. Ким Я.С., Кайдина А.М., Чанг Ю.Х., Ярыгин К.Н., Лупатов А.Ю. Молекулярные маркеры раковых стволовых клеток, верифицированные in vivo. *Биомедицинская химия.*, 2016, 62(3), 228–238. <https://doi.org/10.18097/PBMC20166203228>
 11. Suvorov R.E., Kim Y.S., Gisina A.M., Chiang J.H., Yarygin K.N., Lupatov A.Y. Surface Molecular Markers of Cancer Stem Cells: Computation Analysis of Full-Text Scientific Articles. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, 166(1), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4302-8>
 12. Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Ponomarenko E.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Radko S.P., Lisitsa A.V., Arshakov A.I. Why Are the Correlations between mRNA and Protein Levels so Low among the 275 Predicted Protein-Coding Genes on Human Chromosome 18? *J. Proteome Res.*, 2017, 16 (12), 4311–4318. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00348>
 13. Gisina A., Novikova S., Kim Y., Sidorov D., Bykasov S., Volchenko N., Kaprin A., Zgoda V., Yarygin K., Lupatov A. CEACAM5 overexpression is a reliable characteristic of CD133-positive colorectal cancer stem cells. *Cancer. Biomark.*, 2021, 32(1), 85–98. <https://doi.org/10.3233/CBM-203187>
 14. Kim Y.S., Potashnikova D.M., Gisina A.M., Kholodenko I.V., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Kurbatov L.K., Saidova A.A., Tvorogova A.V., Kholodenko R.V., Belousov P.V., Vorobjev I.A., Zgoda V.G., Yarygin K.N., Lupatov A.Y. TRIM28 Is a Novel Regulator of CD133 Expression Associated with Cancer Stem Cell Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(17), 9874. <https://doi.org/10.3390/ijms23179874>
 15. Bauer N., Wilsch-Bräuning M., Karbanová J., Fonsaca A.V., Strauss D., Freund D., Thiele C., Huttner W.B., Bornhäuser M., Corbeil D. Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles—a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol. Med.*, 2011, 3(7), 398–409. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100147>
 16. Bobinger T., Roeder S.S., Spruegel M.I., Fröhlich K., Beuscher V.D., Hoelter P., Lücking H., Corbeil D., Huttner H.B. Variation of membrane particle-bound CD133 in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid and intracerebral hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 2021, 134(2), 600–607. <https://doi.org/10.3171/2019.11.JNS191861>
 17. Ellenbroek S.I.J., Collard J.G. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis*, 2007, 24, 657–672. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9119-1>
 18. Bhowmick N.A., Ghiassi M., Bakin A., Aakre M., Lundquist C.A., Engel M.E., Arteaga C.L., Moses H.L. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12, 27–36. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.1.27>
 19. O'Connor K., Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases*, 2013, 4, 141–147. <https://doi.org/10.4161/sgtp.25131>
 20. Schmidt L.J., Duncan K., Yadav N., Regan K.M., Verone A.R., Lohse C.M., Pop E.A., Attwood K., Wilding G., Mohler J.L., Sebo T.J., Tindall D.J., Heemers H.V. RhoA as a mediator of clinically relevant androgen action in prostate cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, 2012, 26, 716–735. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1130>
 21. Zhang S., Tang Q., Xu F., Xue Y., Zhen Z., Deng Y., Liu M., Chen J., Liu S., Qiu M., Liao Z., Li Z., Luo D., Shi F., Zheng Y., Bi F. RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol. Cancer Res.*, 2009, 7, 570–580. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0248>
 22. Kamai T., Kawakami S., Koga F., Arai G., Takagi K., Arai K., Tsujii T., Yoshida K.I. RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. *BJU Int.*, 2003, 91, 234–238. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2003.03063.x>
 23. Doublier S., Riganti C., Voena C., Costamagna C., Aldieri E., Pescarmona G., Ghigo D., Bosia A. RhoA silencing reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 2008, 6, 1607–1620. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0251>
 24. Hori A., Nishide K., Yasukuni Y., Haga K., Kakuta W, Ishikawa Y., Hayes M.J., Ohnuma S.I., Kiyonari H., Kimura K., Kondo T., Sasai N. Prominin-1 Modulates Rho/ROCK-Mediated Membrane Morphology and Calcium-Dependent Intracellular Chloride Flux. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1), 15911. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52040-9>

Elicitation of Signaling Pathways of Colorectal Adenocarcinoma Stem Cells

A. Yu. Lupatov^{a, #}, A. M. Gisina^a, Y. S. Kim^a, S. E. Novikova^a, M. A. Pyatnitskiy^a, and K. N. Yarygin^a

^a*Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, 119121 Russia*

[#]*e-mail: alupatov@mail.ru*

Abstract—Prominin-1 (CD133) is the most well-known marker of colorectal adenocarcinoma stem cells, a subset of cancer cells within the tumor that are highly tumorigenic and are responsible for progression, recurrence, and metastasis. The comparative proteomic profiling data for CD133-positive and CD133-negative cells using high-resolution Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry were previously obtained on colorectal adenocarcinoma tumor samples from 5 patients and 2 cell lines. The information on the differential expression of proteins was used for functional annotation and upstream regulator search using the geneXplain online platform. Significant differences between cell lines and clinical samples identified at the level of differentially expressed proteins may disappear at the level of transcription factors regulating differential expression. The transcription factors and master regulatory molecules predicted from the analysis of clinical samples formed the basis for a hypothetical model of the molecular mechanism of expression profile regulation characteristic of cancer stem cells. A small GTFase RhoA was predicted as a key regulator of the differential expression, for which there is some information about its involvement in the manifestation of morphological and functional features of cancer stem cells.

Keywords: bioinformatics analysis, colorectal adenocarcinoma, proteomic profiling, cancer stem cells, CD133, RhoA