

# Белки мембранных микродоменов и их участие в онкогенезе

И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, А.В. Комельков

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Борисовна Зборовская zborovskaya@mail.ru

Липидные рафты плазматических мембран формируются холестерином, сфингомиелидами и гликофинголипидами, а также различными белками. Эти микродомены участвуют в различных клеточных процессах, таких как перестройка мембраны, интернализация белков, передача сигналов, через них осуществляется проникновение вирусов внутрь клетки. Часть липидных рафтов стабилизирована специальными микродоменобразующими белками (МОБ). На сегодняшний день известно несколько семейств таких белков: кавеолы, SPFH-семейство, тетраспанины, галектины, которые не только поддерживают целостность микродоменов, но и формируют «сигнасомы» и, таким образом, являются регуляторами многих сигнальных путей. Участие различных классов МОБ необходимо для нормального функционирования комплексов ростовых факторов с их рецепторами, регуляции интегринов, факторов реорганизации клеточного скелета и внеклеточного матрикса, везикулярного транспорта и т. д. МОБ вовлечены практически во все аспекты жизнедеятельности клетки, однако до сих пор классы МОБ принято рассматривать отдельно друг от друга. В представленном обзоре проведен анализ участия МОБ разных семейств в общих сигнальных путях, ассоциированных с канцерогенезом.

**Ключевые слова:** мембранные микродомены, микродоменобразующие белки, кавеолы, флотиллины, стоматины, тетраспанины, галектины, сигнальная трансдукция, экзосомы, опухолевая прогрессия

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-16-29

## Microdomain forming proteins in oncogenesis

I.B. Zborovskaya, S.A. Galetskiy, A.V. Komel'kov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russia

Lipid rafts are lateral assemblies of cholesterol, sphingomyelin, glycosphingolipids and specific proteins within cell plasma membrane. These microdomains are involved into a number of important cellular processes including membrane rearrangement, protein internalization, signal transduction, entry of viruses into the cell. Some of lipid rafts are stabilized by special microdomain-forming proteins such as caveolins, SPFH domain containing superfamily, tetraspanins, galectins, which maintain integrity of rafts and regulate signal transduction via forming of "signalosomes". Involvement of the different lipid rafts is necessary in many situations such as binding of growth factors with their receptors, integrin regulation, cytoskeleton and extracellular matrix rearrangements, vesicular transport, etc.

However, such classes of microdomain-forming proteins are still considered separately from each other. In this review we tried to perform complex analysis of microdomain-forming proteins in regulation of cancer associated processes.

**Key words:** membrane microdomains, microdomain-forming proteins, caveolin, flotillin, stomatin, tetraspanin, galectin, signal transduction, exosomes, tumor progression

### Общие сведения о мембранных микродоменах

Плазматическая мембрана (ПМ) — чрезвычайно организованная бислоенная клеточная структура, содержащая сложные липиды и белки. ПМ участвует во многих клеточных процессах, обеспечивая барьерную, транспортную, матричную, маркерную и рецепторную функции.

Жидкостно-мозаичная модель строения ПМ, предложенная в 1972 г. S.J. Singer и G.L. Nicolson [1], претерпела значительные изменения. Уже в 1973 г. A. Stier и E. Sackmann, используя физические методы при изучении микросомальной фракции клеток печени, показали существование особых участков в ПМ — мембранных микродоменов (Membrane Lipid Rafts, MLR) [2]. Еще 15 лет назад велись активные споры, касающиеся самой возможности существования этих лабильных

динамичных структур ПМ, не говоря уже о спектре белков и липидов, входящих в их состав [3]. Ныне наличие мембранных микродоменов, имеющих сложный уровень организации, и их участие во многих жизненно важных клеточных процессах уже не подвергается сомнениям.

В 2006 г. на авторитетном симпозиуме по липидным рафтам и клеточным функциям (Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function) мембранные микродомены были определены как упорядоченные, наноразмерные (10–200 нм), гетерогенные, высоко динамичные домены, которые компартиментализуют клеточные процессы. Стабильное состояние покоя в этих структурах может активироваться объединением специфических липид-липидных, белково-липидных и белок-белковых

взаимодействий. Липидные рафты соединены с цитоскелетом и обогащены минорными типами липидов (гликосфинголипиды, ганглиозиды, стеролы и липиды с насыщенными жирными кислотами), что обеспечивает их плотную структуру и возможность экспериментального выделения из мембран неионными детергентами при низкой температуре. Повышенная концентрация сфинголипидов, в частности ганглиозида GM1, и холестерина является характерным признаком рафтов. Мембранные микродомены участвуют в целом спектре клеточных процессов, таких как перестройка мембраны, интернализация белков, везикулярный и ионный транспорт, через эти структуры осуществляется проникновение вирусов внутрь клетки и взаимодействие с внеклеточным матриксом. Микродомены в первую очередь участвуют в импорте и экспорте различных молекул, т. е. обеспечивают процессы передачи клеточных сигналов (сигнальную трансдукцию) внутри и вне клетки [4–6].

Плазматические микродомены имеют в своем составе специальные рафтообразующие белки нескольких семейств (кавеолины, SPFH-семейство, тетраспанины, галектины и клатрины), которые не только формируют и стабилизируют мембранные микродомены, удлиняя период их существования, но и аффинны к различным белкам – участникам определенных сигнальных путей (рис. 1). Некоторые рафтообразующие белки способны формировать микродомены не только в ПМ, но и в эндоплазматическом ретикулуме (эрлины) и митохондриях (прохибитины). Данные мембранные структуры могут инвагинировать в сторону цитоплазмы (кавеолы) или не инвагинировать (плоские рафты), что во многом зависит от их белкового состава.

Существует некоторое разночтение в обозначении данного типа белков. В англоязычной литературе их часто обозначают как LRP (Lipid Rafts Proteins), но с учетом факта концентрации в липидных рафтах огромного количества сигнальных белков, рецепторов, ферментов и т. п. наиболее адекватным, с нашей точки зрения, является термин «микродоменобразующие белки» (МОБ).

Все белки, связанные с биологическими мембранами, в зависимости от локализации делятся на категории: интегральные, полуинтегральные (погруженные одним концом во внешний или внутренний липидный слой) и поверхностные (расположенные на внутренней или внешней стороне мембраны). МОБ могут пронизывать ПМ насквозь (тетраспанины), частично встраиваться в нее с внутренней стороны мембраны (кавеолины, SPFH-семейство, иногда клатрины), располагаться с внешней (галектины) или с внутренней (клатрины) стороны ПМ (рис. 2).

Функции МОБ чрезвычайно разнообразны, однако большинство из них опосредуется через способность формировать «сигнасомы», т. е. концентрировать внутри мембранного микродомена рецепторы и сигнальные молекулы разных каскадов, осуществляя их регуляцию и облегчая перекрестные взаимодействия, поскольку МОБ могут создавать комплексы с резидентными белками и формировать сети [7–9].

Кроме того, МОБ во многом определяют адгезивные свойства клеток, их взаимодействие с внеклеточным матриксом, иммунный статус, что, безусловно, играет важную роль в процессах инвазии и метастазирования [4, 10–13]. Мембранные микродомены опосредуют и процессы программированной клеточной гибели, аккумулируя анти- и проапоптотические мо-

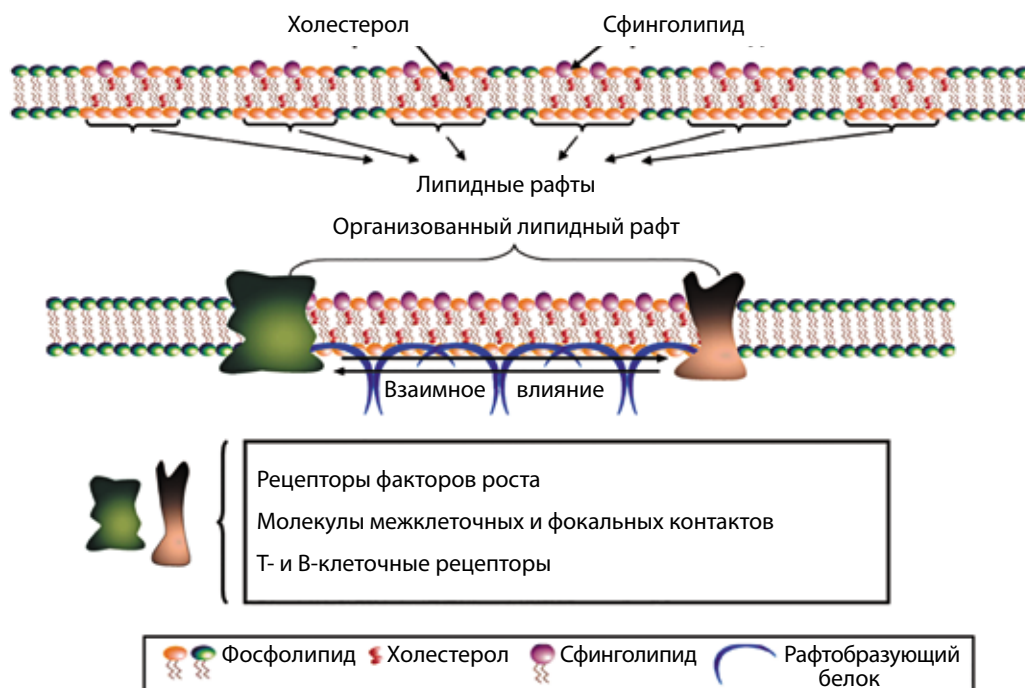


Рис. 1. Липидные «рафты» – микродомены в составе клеточных мембран

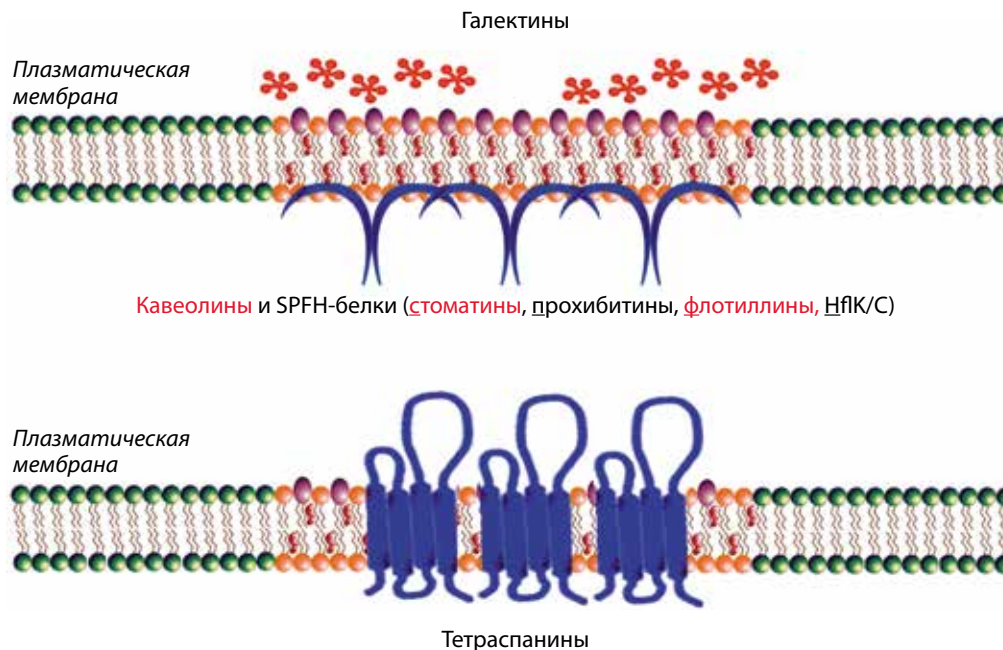


Рис. 2. Разнообразие микродоменобразующих белков

лекулы в специальных структурах CASMER (Cluster of Apoptotic Signaling Molecule-enriched Rafts) [14].

В связи с возрастающим интересом к механизмам везикулярного транспорта и таким мембранным структурам, как экзосомы, следует отметить, что белки липидных рафтов играют важнейшую роль не только в формировании этих внеклеточных микровезикул, но и переносятся с ними в другие, часто отдаленные клетки и ткани, влияя на сигнальную трансдукцию клеток-мишеней [15–17].

Таким образом, липидные рафты осуществляют регуляцию широкого спектра сигнальных каскадов и участвуют практически во всех аспектах жизнедеятельности клетки. Поскольку с современной точки зрения рак является генетическим заболеванием, обусловленным изменениями, вызывающими нарушение молекулярной системы передачи сигналов, изменения в микродоменных мембранных структурах, сопряженные с опухолевой трансформацией и прогрессией, привлекают пристальное внимание молекулярных онкологов и позволяют использовать изменения содержания или нарушения структуры МОБ в качестве диагностических и прогностических молекулярных маркеров в клинической практике.

Однако, несмотря на то, что в последние годы активно проводятся исследования в области строения липидных рафтов, механизмы их функционирования, а следовательно и роль отдельных белковых и липидных компонентов нуждаются в более детальном изучении. Такие исследования определяют возможность их эффективного использования для раскрытия механизмов патогенеза целого спектра болезней человека, в том числе диабета, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

### Краткая характеристика некоторых основных семейств микродоменобразующих белков

**Семейство белков кавеолинов** является одним из наиболее изученных семейств МОБ и представлено тремя генами – *CAV-1*, *CAV-2* и *CAV-3*, которые с учетом изоформ кодируют 6 белков, имеющих сходное строение. Кавеолины – чрезвычайно «консервативные белки», а их гомологи обнаружены у различных представителей Metazoa [18].

Кавеолин-1 и кавеолин-2 экспрессируются в большинстве тканей, преимущественно в эпителиальных и эндотелиальных клетках, адипоцитах, фибробластах и пневмоцитах. Кавеолин-3 относится к тканеспецифичным белкам и синтезируется исключительно мышечными клетками.

Молекулы кавеолинов частично встроены в ПМ, не пронизывая ее насквозь, а образуя петлю с концами, направленными в сторону цитоплазмы (рис. 3). Они являются принципиальными компонентами кавеол-образных впячиваний ПМ, но могут входить в состав плоских рафтов (рис. 4). Молекулы кавеолина-1 и кавеолина-3 формируют стабильные гомоолигомерные комплексы (как правило, кавеолин-1 формирует гептаолигомеры) [19], однако кавеолин-1 также может формировать гетероолигомерные комплексы с кавеолином-2 [20, 21].

Кавеолин-1 впервые был открыт в качестве субстрата для фосфорилирования тирозинкиназы Src. Этот белок имеет 2 ключевых сайта фосфорилирования, 3 сайта пальмитоилирования по сайту для связывания с актином на каждом конце молекулы и домен CSD (Caveolin Scaffolding Domain). За счет этого специального домена кавеолин-1 и кавеолин-3 могут регуляторно взаимодействовать с широким спектром



белков, таких как EGFR, Src, eNOS, PKC- $\alpha$  и др. Именно при изучении кавеолинов в 1994 г. группа ученых предложила теорию «сигнасомы», согласно которой кавеолин-1 не только поддерживает целостность липидных рафтов, но и формирует платформы, где координиру-

ется и регулируется передача сигналов, а также осуществляется взаимодействие сигнальных белков разных каскадов [22]. За последние годы данная теория нашла множество экспериментальных подтверждений, и важная роль кавеолинов и других МОБ в процессах

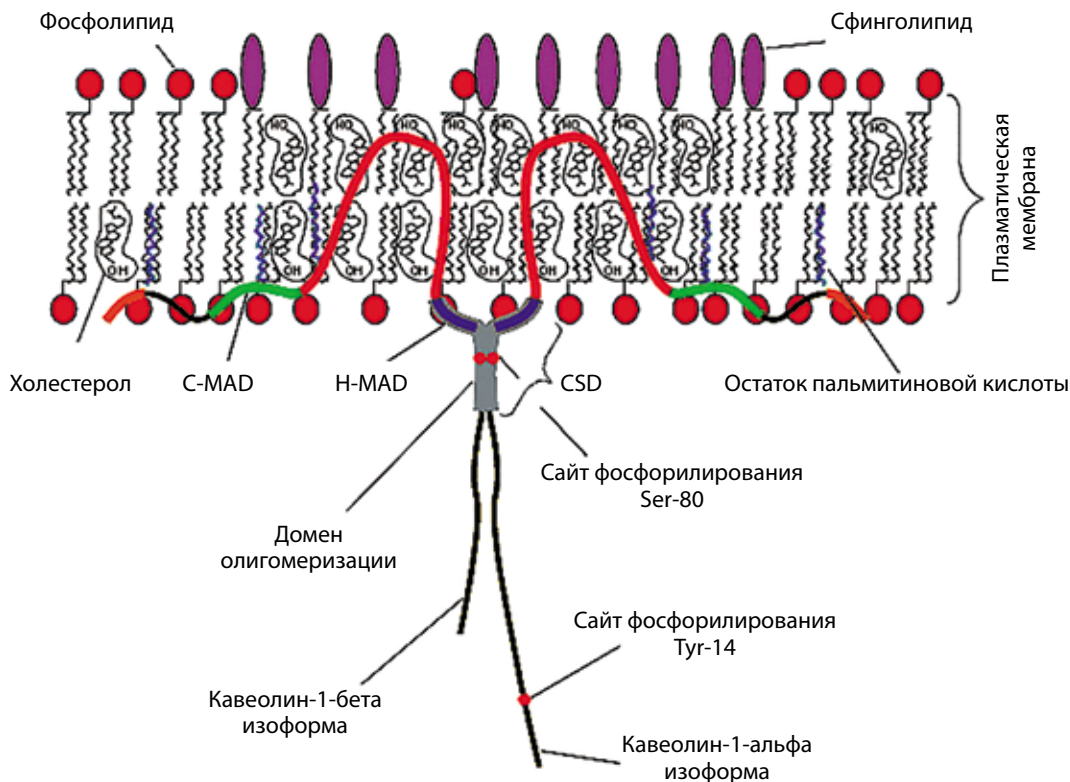


Рис. 3. Структура кавеолина-1 (адаптировано из [22])

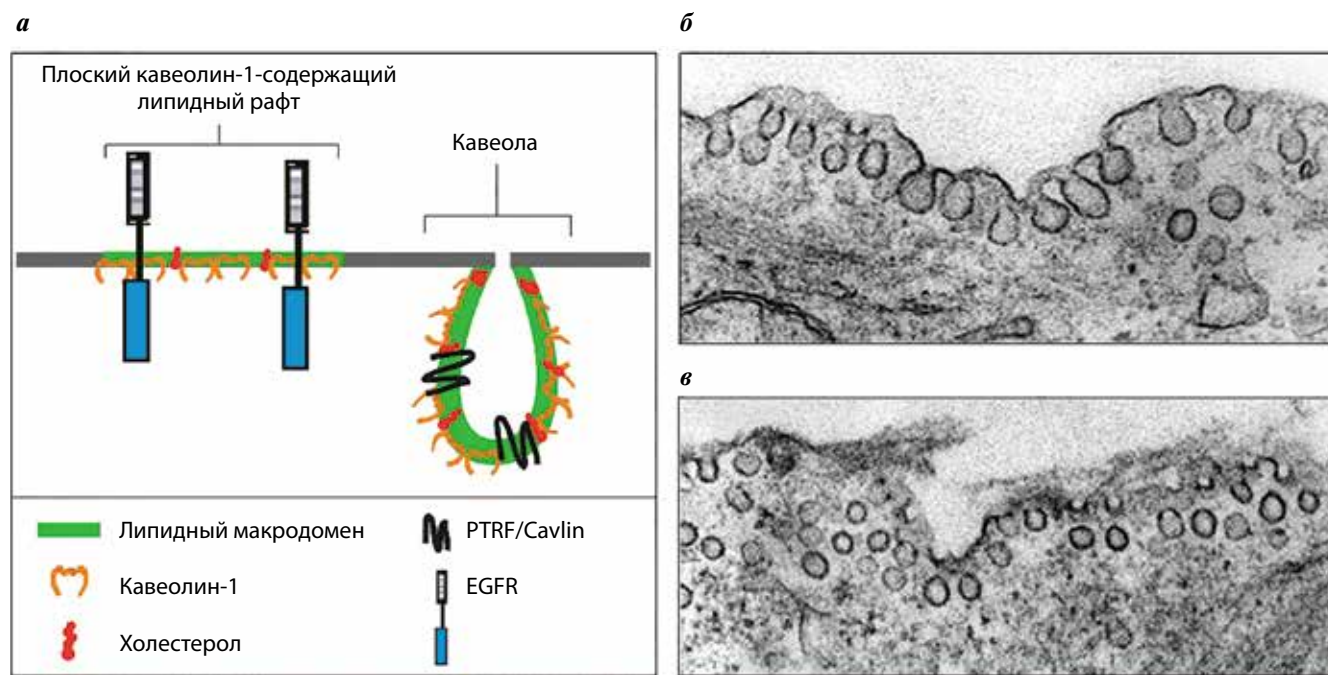


Рис. 4. Типы кавеолинсодержащих липидных микродоменов и их структура: а – схема кавеолинсодержащих микродоменов (адаптировано из [10]; электронная фотография кавеол на срезе, сделанном перпендикулярно (б) и параллельно (в) поверхности миоэпителиальных клеток (адаптировано из [110])

сигнальной трансдукции в нормальных и трансформированных клетках ныне не подвергается сомнению.

Большой интерес исследователей сигнальной трансдукции вызывает влияние МОБ, и в частности кавеолина-1, на активность факторов роста и их рецепторов, однако полученная на данный момент информация достаточно противоречива. Методами коиммунопреципитации и кофракционирования уже довольно давно продемонстрирована кавеолярная локализация EGFR и ERBB2. Более того, в экспериментах *in vitro* выявлено, что кавеолин-1 за счет домена CSD может напрямую взаимодействовать с молекулами EGFR, подавляя трансактивацию последних [23]. Следует отметить, что существуют исследования, в ходе которых не выявлена колокализация EGFR и кавеолина-1 [24], а получены прямо противоположные данные о том, что именно стимуляция клеток EGF приводит к миграции EGFR в кавеолы [25]. Данные противоречия подробно разбираются в обзорах [26, 27].

Воздействие на клетки EGF приводит к Src-зависимому фосфорилированию кавеолина-1 по Tyr14, что привлекает к мембране такие белки, как Csk (ингибитор Src-киназы) и Grb7 (участник Ras-МАРК-каскада) [7, 28]. Неоднократно показано и ингибирующее влияние кавеолина-1 на EGFR-Ras-МАРК-сигнальный путь. Так, кавеолин-1 подавляет активность таких нижележащих участников пути, как Raf-1, MEK-1 и Erk2, причем с MEK-1 и Erk2 кавеолин-1 может связываться непосредственно [8, 29].

Путем формирования сигнальных платформ, компартиментализуя, поляризуя, модулируя и интегрируя сигнальные каскады, кавеолы участвуют в процессах клеточной адгезии, динаминзависимого эндоцитоза, регуляции холестерина обмена, поглощения глюкозы, образования и поддержания липидных капель в адипоцитах и др. [4, 7, 21].

Эксперименты на клеточных линиях, нокаутных по гену *CAV-1*, убедительно доказали, что кавеолин-1 — важный участник организации движения и поляризации клеток. Фенотипически клетки демонстрировали явные нарушения актиновой архитектуры, биохимически — повышенную активность Ras и Cdc42 и сниженную активность Rho. В то же время наблюдалась и повышенная активность Src-киназы из-за отсутствия Csk. Известно, что Src активирует Ras и Cdc42 по многим путям и подавляет экспрессию Rho через активацию p190RhoGAP. Восстановление же нормальной экспрессии кавеолина-1 приводило к нормализации как фенотипа клеток, так и активности Src и Rho ГТФаз [30].

При миграции кавеолиновые рафты, как правило, концентрируются в отстающем конце клетки, где они взаимодействуют с актиновым цитоскелетом посредством белка филамин. Однако кавеолин-1, особенно его фосфорилированная форма pTyr14, обнаруживается и на лидирующем конце клетки. Одно из объяснений этого факта заключается в том, что кавеолин-1 является важным участником формирования фокаль-

ных контактов, где он может привлекать к ПМ ингибитор Src-киназы — Csk [31].

На стадии инвазии трансформированные клетки формируют цитоплазматические выросты — инвадоподии, на клеточной поверхности которых локализуются матриксные металлопротеазы (ММП) — ММП-2, ММП-9 и МТ1-ММП (ММП-14). Это обеспечивает эффективное разрушение межклеточного матрикса и направленное продвижение клетки в окружающие ткани. На сегодняшний день существует большое количество работ, описывающих влияние кавеолина-1 на экспрессию и активность ММП, которые оказывают многостороннее влияние на трансформированные клетки и участвуют во всех этапах метастазирования [32, 33]. Во-первых, кавеолин-1 колокализуется с ММП-2 и ММП-14 и при этом может влиять на активность последней, что приводит к снижению активации про-ММП-2 [34, 35]. Во-вторых, в различных типах клеток снижение экспрессии кавеолина-1 ведет к повышению активности и экспрессии ММП-2 и ММП-9 и наоборот [36, 37]. Более того, кавеолин-1 также оказывает влияние на такой мультифункциональный белок, как EMMPRIN (он же CD147 или basigin) [20], регулируя уровень его гликозилирования, что в итоге приводит к подавлению его функции активатора металлопротеаз [38, 39].

Изменениям в функционировании кавеолинов отводится важная роль в регуляции формирования трансформированного и метастатического фенотипов клеток, а его экспрессия неоднократно исследовалась в качестве диагностических и прогностических маркеров в клинических тестах. Надо заметить, что клинические корреляции не всегда однозначны и зависят от множества факторов (гистологического типа опухоли, стадии заболевания и т. д.) [7], что вполне объяснимо с учетом участия кавеолинов в целом ряде как опухолепромотирующих, так и супрессирующих сигнальных путей.

**Суперсемейство белков SPFH.** Белки семейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C) также характеризуются большой эволюционной консервативностью и встречаются не только у разнообразных представителей эукариот, но и у бактерий [40]. У млекопитающих семейство SPFH доменосодержащих белков включает флотиллины, прохибитин, стоматин, стоматинподобные белки и эрлины, которые ассоциированы с мембранными микродоменами разных клеточных органелл [11, 41].

Наиболее изученными представителями данного семейства являются флотиллины, открытые в 1997 г. при изучении регенерации аксонов. У человека выявлено 2 белка (флотиллин-1 и флотиллин-2) (рис. 5а), демонстрирующих высокую степень гомологии. В клетке флотиллины преимущественно локализуются в ПМ, но обнаруживаются и в аппарате Гольджи, эндосомах, мультивезикулярных тельцах, лизосомах и фагосомах. Как и кавеолы, олигомеризуясь, они могут формировать впячивания в ПМ, но часто формируют и плос-

кие рафты. Флотиллины экспрессируются практически во всех тканях млекопитающих, но их наибольшее содержание характерно для нервной, жировой, мышечной тканей и эритроцитов. Они играют важную роль во многих физиологических процессах, главным образом благодаря кластеризации рецепторов на мембране (создание «сигнасом»), регуляции клатриннезависимого эндоцитоза и динамики актинового цитоскелета. Флотиллины также участвуют в активации Т-лимфоцитов и процессах поглощения глюкозы [11, 42, 43].

Существуют «сигнасомы», содержащие только белки семейства SPFH, что определяет некоторые особенности в передаче ими клеточных сигналов. Судя по всему, флотиллины осуществляют динаминнезависимый эндоцитоз GPI-заякоренных, а также ряда других белков [11, 44].

В настоящее время заметно увеличилось количество работ, указывающих как на прямую, так и на опосредованную регуляцию флотиллинами процессов адгезии и миграции клеток. Есть данные об обратном влиянии процессов формирования межклеточных контактов и состояния внеклеточного матрикса на экспрессию флотиллинов. Сейчас очевидно, что флотиллиновые микродомены необходимы для сборки, динамической ассоциации и стабилизации кадхериновых комплексов в зоне контактов и активизации кадхеринового сигналинга. При разрушении контактов экспрессия флотиллина-1 сильно снижается, но восстанавливается при образовании связей между клетками [33]. Кроме того, имеются сведения об участии флотиллина-2 совместно с Rab11 и SNX4 в рециклизации E-кадхеринов, по крайней мере в клетках карциномы A431, хотя эти данные требуют подтверждения в других клеточных системах [45]. Флотиллины опосредованно участвуют в ремоделировании актинового цитоскелета и активации Rho ГТФаз [4, 11, 46].

Известно также, что флотиллин-1 оказывает митогенное влияние на клетки. Отмечено, что во время S-фазы клеточного цикла в клетках аденокарциномы простаты человека экспрессия флотиллина-1 достигает

своего пика, и белок транспортируется из ПМ в ядро совместно с белком PTOV-1 (Prostate Tumor Overexpressed). Ядерные функции обоих белков неизвестны, однако гиперэкспрессия PTOV-1 или флотиллина-1 усиливает пролиферацию клеток. Митогенное действие флотиллина-1 может быть также связано с его способностью изменять активность киназы Auroга B, которая необходима для правильного формирования метафазной пластинки и расхождения хромосом во время митоза. Подавление экспрессии *FLOT-1* приводит к уменьшению количества и активности Auroга B киназы, в результате чего нарушается процесс деления, появляются полиядерные клетки и клетки с несколькими веретенами деления. При этом наблюдается значительное снижение скорости пролиферации клеток [47].

Экспрессия флотиллина-2 при опухолевой трансформации клеток также изменяется [11]. Показано, что уровень флотиллина-2 повышается в клетках и метастазах меланомы и коррелирует со стадией опухолевой прогрессии. Гиперэкспрессия флотиллина-2 в низкотуморогенных и низкометастазных линиях меланомы человека резко увеличивает их туморогенность, инвазивность и способность к метастазированию *in vivo*, даже при отсутствии ростовых факторов. При этом наблюдается увеличение количества кровеносных сосудов в формируемых опухолях. Поиск возможных механизмов действия флотиллина-2 на клетки меланомы привел к обнаружению того, что в этих клетках флотиллин-2 взаимодействует с трансмембранным рецептором PAR-1, увеличивая его экспрессию. PAR-1 – трансмембранный рецептор тромбина, связанный с G-белками, который участвует в регуляции многих сигнальных путей, а его повышенная экспрессия является известным фактором неблагоприятного прогноза при меланоме. Гиперэкспрессия PAR-1 и гиперэкспрессия флотиллина-2 в клеточных линиях меланомы вызывают сходные изменения фенотипа клеток [48].

Очевидно, что участие флотиллинов как в злокачественной трансформации клеток, так и в опухолевой

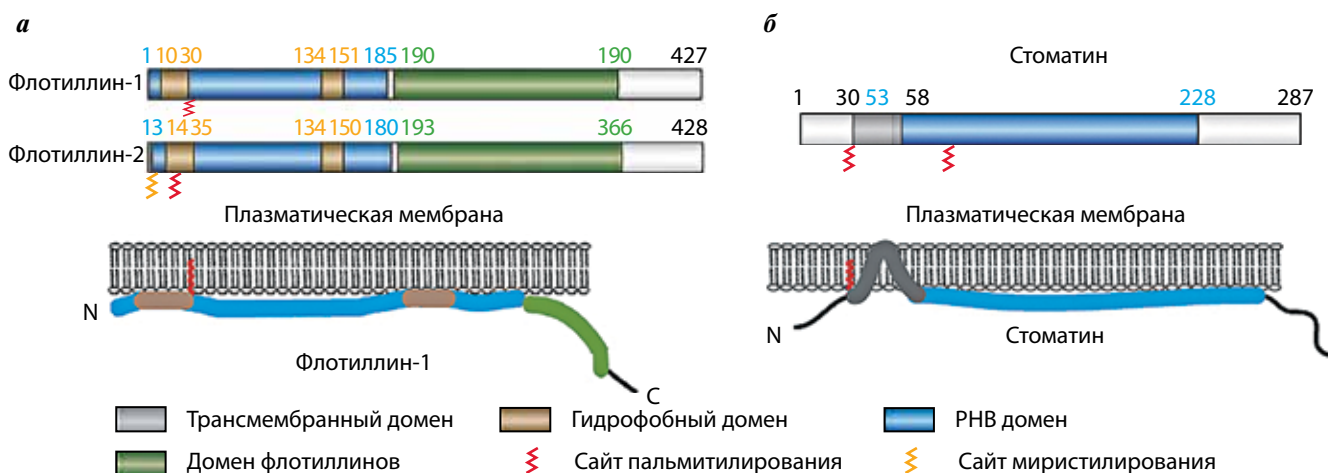


Рис. 5. Структура флотиллинов (а) и стоматина (б) (адаптировано из [42])



прогрессии, при которой приобретение локомоторного фенотипа играет важнейшую роль, может быть обусловлено их способностью влиять на такие процессы, как перестройка актинового цитоскелета и изменение функционирования межклеточных и фокальных контактов, не говоря уже о модулировании и других сигнальных путей.

Стоматин и его гомологи представляют особый подкласс семейства SPFH доменсодержащих белков. Стоматин впервые обнаружен в ПМ эритроцитов в 1982 г. Стоматин экспрессируется во всех типах тканей; наибольшее содержание белка обнаруживается в печени, эритроцитах, скелетных и сердечной мышцах, в то время как ткани легкого, селезенки и головного мозга им обеднены. Как и другие члены SPFH семейства, *STOM* является очень консервативным геном [49, 50].

Стоматин локализуется в липидных рафтах ПМ и выделяется совместно с флотиллинами в составе детергент-устойчивых мембран (рис. 5б). Однако флотиллины и стоматин не копреципитируются и, следовательно, не взаимодействуют друг с другом, локализуясь в разных мембранных микродоменах. Помимо ПМ, стоматин обнаруживается в расположенных около ядра эндо- и лизосомах, а также может ассоциироваться с липидными каплями. Стоматин способен к олигомеризации и образованию комплексов из 9–12 молекул благодаря гидрофобной последовательности из 9 аминокислот на С-конце белка, 3 из которых участвуют также в связывании стоматина с липидными рафтами. Стоматин подвергается фосфорилированию по остатку Ser9 при действии на клетки циклического аденозинмонофосфата, и пальмитоилированию по Cys-29 и Cys-86 [51, 52].

Гомологи стоматина обнаружены в организме позвоночных, беспозвоночных животных и растений. У млекопитающих семейство стоматинов включает стоматинподобные белки SLP-1 (stomatin-like protein 1), SLP-2, SLP-3 и NPHS2 (podocin), имеющие сходные топологию и строение со стоматином. Наибольший уровень экспрессии SLP-1 обнаруживается в сердечной мышце и ткани головного мозга, в то время как SLP-3 экспрессируется только в чувствительных обонятельных нейронах. SLP-2 широко экспрессируется в различных тканях организма, однако наибольший уровень его мРНК обнаруживается в коже, сердечной мышце, печени и поджелудочной железе. Следует отметить, что при высоком уровне гомологии (40–89 %) все белки семейства стоматинов характеризуются уникальной структурой внутриклеточного домена [50].

На сегодняшний день функции стоматина и его гомологов мало изучены. Известно, что они могут модулировать ионный трафик и функционирование митохондрий. Недавно показано, что SLP-2 регулирует экспрессию интерлейкина 2 путем активации NF-κB-ассоциированного сигнального пути, что, возможно, определяет уровень иммунного ответа. Повышение уровня экспрессии стоматинподобных белков связывают с бактериальной и вирусной инфекцией [53].

В последнее время все больше внимания уделяется изучению стоматинподобных белков при злокачественных новообразованиях, поскольку выяснилось, что уровень экспрессии *SLP-2* повышается при раке легкого, пищевода, молочной железы, глотки, эндометрия и др. и коррелирует с размером опухоли, статусом метастазирования, стадией заболевания [54–56], а также с наличием экспрессии рецептора *HER2/neu* в опухолевых клетках [57]. Одновременное повышение уровня экспрессии *SLP-2* и *HER2/neu* при раке молочной железы (РМЖ) являлось гораздо более значимым прогностическим фактором, чем повышенный уровень экспрессии каждого отдельного гена.

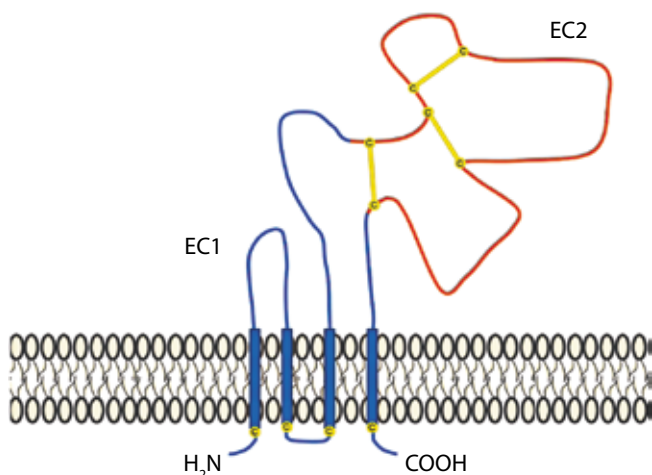
О значении белков семейства в везикулярном транспорте известно немного, однако практически все опухолевые экзосомы содержат флотиллины не только в составе мембран, но и внутри секреторируемых микровезикул [15, 16]. По нашим предварительным данным, белки липидных микродоменов дифференциально представлены в микровезикулярной фракции образцов крови больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ): перманентно присутствуют белки *Stom-1*, *Flot1* и *Flot2* и отсутствует белок *Cav-1*. При сравнении «парных» препаратов, полученных от одного и того же пациента, обнаружено, что уровень белков *Stom-1*, *Flot1* и *Flot2* в микровезикулярной фракции крови снижается после удаления первичного опухолевого узла.

Безусловно, выяснение механизмов действия SPFH-семейства белков требует дополнительных исследований, если учесть их влияние на свойства трансформированных клеток и прогрессию опухолей.

**Тетраспанины.** Семейство тетраспанинов включает большое количество белков, имеющих схожую структуру. Тетраспанины – очень консервативные белки – встречаются у всех Metazoa, у многих грибов и более примитивных организмов [58]. Только у человека выявлено 33 представителя данного семейства. Отдельные представители семейства встречаются во всех типах клеток организма, другие могут быть узкоспециализированными [59].

Как следует из названия белков, они 4 раза пересекают ПМ (см. рис. 2, рис. 6). Все тетраспанины имеют 4 высококонсервативных трансмембранных домена и 2 внеклеточные петли: EC1-короткую и EC2-длинную, содержащие высоковариабельный домен, различающий членов семейства и отвечающий за связь с белками-партнерами. Как и другие МОБ, тетраспанины способны взаимодействовать с холестерином и подвергаться посттрансляционным модификациям, в частности присоединению остатков пальмитиновой кислоты. Большинство тетраспанинов подвергается пальмитоилированию в цистеинобогатых районах, локализованных вблизи трансмембранного домена [60].

На ПМ тетраспанины формируют целые динамические сети, организовывая и объединяя сигнальные молекулы, регулируя их активность и тем самым, как и другие МОБ, участвуя в таких фундаментальных био-



**Рис. 6.** Структура тетраспанинов. Синим цветом отмечены консервативные домены, красным – высоковариабельный домен, различающий членов семейства и отвечающий за связь с белками-партнерами, желтым – дисульфидные мостики, связывающие цистеин-богатые районы (адаптировано из [60])

логических процессах, как дифференцировка, пролиферация, адгезия, миграция, иммунный ответ и др. Список белков, взаимодействующих с тетраспанинами, чрезвычайно велик и включает интегрины, комплексы гистосовместимости МНС-I и МНС-II, рецепторы ростовых факторов, c-Kit, протеазы MT1-MMP, ADAM и многие другие [61]. В обзоре исследователей из Мельбурна и Брисбейна подробно описаны известные функции 33 тетраспанинов, их связь с процессами опухолевой прогрессии и нарушения экспрессии при различных типах солидных опухолей и гемобластозах [59]. Особое внимание молекулярных онкологов в последние годы привлекли некоторые тетраспанины, в частности TSPAN8, TSPAN24 (CD151) и TSPAN30 (CD63), нарушения экспрессии которых ассоциированы с канцерогенезом.

Известно, что CD151 формирует очень стабильные ламининсвязывающие комплексы с интегринными ( $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 4$ ) и другими молекулами клеточной мембраны, контролируя тем самым различные процессы, связанные с адгезией и миграцией клеток, а также сохранением тканевой архитектуры [59, 62, 63]. В опытах с ксенографтами глиобластом человека показано, что разрушение таких комплексов приводит к снижению уровня активации EGFR, FAK и малых GTPаз, что, в свою очередь, увеличивает сроки жизни мышей-опухоленосителей [64]. Следует отметить, что FAK может напрямую связываться с тетраспанинами CD151 и CD9 [65].

Повышенная экспрессия некоторых интегринов при ряде онкопатологий является маркером плохого прогноза. Недавно показано, что при НМРЛ, особенно в группе плоскоклеточного рака легкого, суперэкспрессия интегринного  $\beta 4$  (ITGB4) строго ассоциирована с сосудистой инвазией и с уменьшением сроков общей выживаемости пациентов. На основании анализа панели из 50 генов, включающей компоненты EGFR-

и PI3K-сигнальных путей, авторы, наряду с другими (например, мутантным p53), зафиксировали изменения экспрессии ламинина и CD151 [66]. Экспрессия CD151- $\alpha\beta 1$  комплекса может служить прогностическим маркером при HER2-негативном РМЖ [67] и глиобластоме [64]. С учетом того, что тетраспанин CD151, наряду с другими МОБ, активно участвует в формировании сигнальных платформ для интегринов (рис. 7) [68], данные результаты вполне закономерны, а его протуморогенные и прометастатические функции вполне очевидны. Об этом же свидетельствует тот факт, что моноклональные антитела CD151 mAb 9B, диссоциирующие комплекс  $\alpha\beta 1$  с экстраклеточным доменом CD151, ингибируют ангиогенез, подвижность и инвазивность клеток, что дает возможность рассматривать ингибиторы CD151 в качестве терапевтических агентов [59, 65, 68].

Кроме взаимодействия с интегринными CD151-содержащими рафты в опухолевых клетках активно аккумулируют рецепторы факторов роста (HGFR, EGFR и TGF- $\beta 1$ R) и участвуют в активации MMP (MMP-2, MMP-7 и MMP-9). В последнее время активно обсуждается роль CD151 как фактора, обеспечивающего распределение сигнальных молекул в «сигналосомах» и взаимодействие между рецепторами и их лигандами, которое регулирует процессы инвазии, неоангиогенеза и метастазирования [12, 69, 70].

Отдельные тетраспанины могут влиять на интегринные и миграционные свойства клеток по-разному. Так, суперэкспрессия CD82 (TSPAN27 или KAI1) приводит к сильному снижению подвижности клеток, в то время как повышенные количества CD151 ее ускоряют [71]. CD82 и CD151 могут напрямую взаимодействовать с РКС, причем CD82 негативно регулирует РКС, стимулирующую миграцию, и секвестрирует ее от активирующего действия CD151 [72].

Клинические данные с высокой достоверностью подтверждают экспериментальные исследования о прометастатических свойствах TSPAN8 и TSPAN24 (CD151) [73, 74]. TSPAN8 и CD151 редко обнаруживаются в плазме здоровых доноров и пациентов с другими патологиями, но перманентно выявляются в плазме онкологических больных. Поэтому данные тетраспанины могут служить маркерами наличия рака желудка, толстой и прямой кишки, поджелудочной железы и легкого [59, 74]. Скорее всего, их присутствие в плазме при различных типах опухолей связано с высокой продукцией экзосом.

Следует отметить, что мембраны всех экзосом содержат тетраспанины, которые, возможно, участвуют в сортировке содержимого микровезикул. Существует мнение, что репертуар отдельных тетраспанинов служит «адресом» или же «паролем» для попадания экзосом в определенные типы клеток [13, 40, 75].

По последним данным, представленным группой датских исследователей, анализировавших белковый состав экзосом в группах из 431 образца от больных НМРЛ и 150 образцов доноров с помощью мультимар-



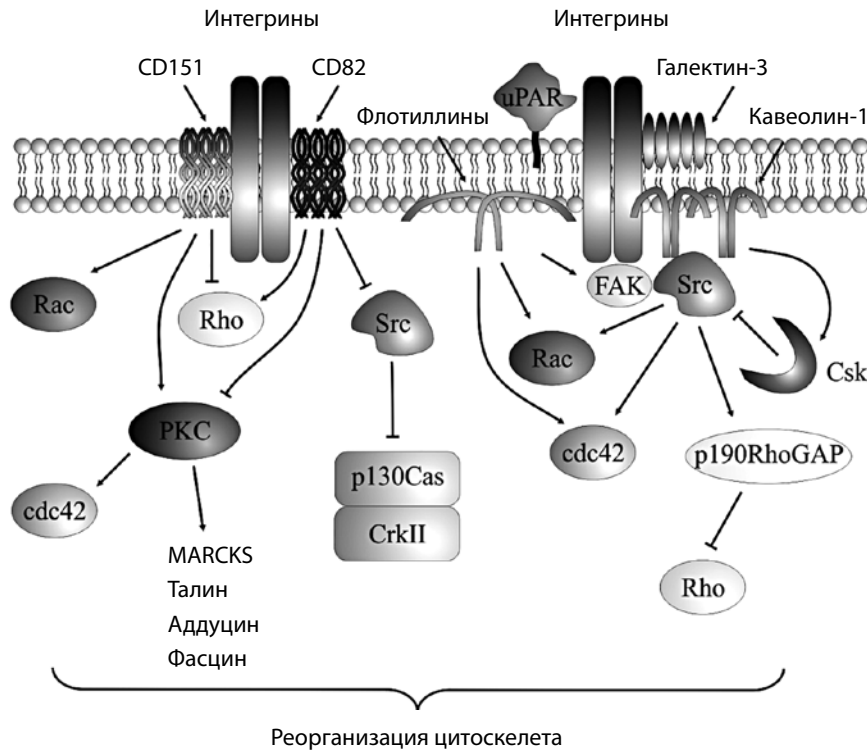


Рис. 7. Роль рафтообразующих белков в регуляции интегринов и их сигнальных путей [12]

керной панели из 49 антител к различным белкам, TSPAN8, CD151 и CD171 входят в группу маркеров, с высокой долей достоверности ( $p = 0,0002$ ) отличающихся в этих группах. Следует отметить, что CD151 детектируется главным образом в экзосомах, продуцируемых клетками аденокарциномы, но не плоскоклеточного рака [76].

Тетраспанины 3, 29 и 30 (CD9, CD81 и CD63) конститутивно представлены в экзосомах и являются их маркерами [15, 17]. Интересно, что CD9 может напрямую взаимодействовать с EGFR, снижая скорость активации последнего [77]. Помимо регуляции трансактивации рецепторов, тетраспанины CD9 и CD81 осуществляют тонкую регуляцию «затухания» сигнала от EGFR. CD81 напрямую взаимодействует с Rac-белками, снижая их инактивацию, что приводит к увеличению миграции клеток [78]. CD151, CD9, TSPAN2 и CD81 часто колокализуются в липидных рафтах и с MMP [70, 79, 80]. Показано, что CD9, TSPAN2 и CD81, не влияя на биосинтез MMP-14, препятствуют ее деградации в лизосомах [79]. Усиленная экспрессия CD9 в клеточной линии мелкоклеточного рака легкого приводит к снижению экспрессии как MMP-2, так и MMP-14 [81]. Кроме того, тот факт, что опухолевые экзосомы, в отличие от нормы, содержат большее количество CD63, согласно последним данным промотирующего эпителиально-мезенхимальный переход и создание преметастатических ниш [80], использование тетраспанинов CD9, CD81 и CD63 в группах сравнения экзосом от онкологических больных требует, на наш взгляд, тщательной проверки и использования адекватных контролей.

**Галектины** ( $\beta$ -галактозидсвязывающие белки) относятся к семейству лектинов – белков, связывающихся с углеводными «хвостами» N-гликанов и гликобелков. Все галектины имеют 1 или 2 консервативные последовательности CRDs (Carbohydrate Recognition Domains), содержащие около 130 аминокислотных остатков. Взаимодействие димерных или пентамерных галектинов с гликобелками формирует на внешней стороне ПМ специфические сети, обеспечивающие стабилизацию мембранных микродоменов и перекрестные взаимодействия между сигнальными белками [10]. Современные данные о структуре и функции членов семейства галектинов представлены в обзоре I.R. Nabi и соавт. [9]. У млекопитающих описано 15 типов галектинов, и подавляющее большинство имеющихся публикаций посвящено роли галектинов внутри клетки, причем особое место занимают исследования галектина-1, галектина-3 и галектина-4, что связано с их участием в иммунном ответе и злокачественной трансформации. Этим галектинам отводится и роль регуляторов клеточной адгезии и миграции, а значит и процессов метастазирования [9, 10, 82–85]. Повышенную концентрацию галектина-1 и галектина-3 часто обнаруживают в различных типах опухолей человека.

Галектины вносят весомый вклад в регуляцию активности металлопротеаз. Повышение экспрессии галектина-7 приводит к усилению как транскрипции, так и ферментативной активности MMP-2 и MMP-9 [82, 86]. В то же время снижение количества галектина-1 приводит к такому же эффекту [87]. Галектины, помимо влияния на активность металлопротеаз, са-

ми же являются их субстратами. Так, галектин-1 является субстратом MMP-2 и MMP-11 [88], а галектин-3 разрезается как MMP-2, так и MMP-9, что приводит к потере олигомеризации галектинов и повышению сродства к ламинину [89].

Интересно, что могут существовать конкурентные взаимоотношения между ингибирующим взаимодействием EGFR с кавеолином-1 и активирующей связью с галектиновыми рафтами [10]. В клетках РМЖ галектины взаимодействуют с EGFR, защищая его от ингибирующего воздействия кавеолина-1, что приводит к усилению сигнальных каскадов от рецептора и стимуляции опухолевого роста. Стимуляция при участии Gal3 интегринопосредованного RhoA сигналинга и клеточной миграции зависит от фосфорилирования кавеолина-1 (Cav1-P) [90].

### Регуляция экспрессии микродоменобразующих белков

Очевидно, что МОБ разных семейств могут совместно участвовать в регуляции сигнальных путей клетки. Что же регулирует сами МОБ? К сожалению, транскрипционная регуляция отдельных МОБ недостаточно изучена, но уже сейчас можно выделить ряд транскрипционных факторов, регулирующих некоторые семейства. Например, p53 и NF-κB участвуют в регуляции тетраспанина CD82 (TSPAN27), кавеолина-1 и галектина-3 [84, 91, 92]. *Flot1* – таргетный ген для p63 и p73 [93] и других транскрипционных факторов [94]. Экспрессия *Flot1* и *Flot2* сильно изменяется и при обработке клеток ретиноевой кислотой. Такой мощный транскрипционный фактор, как Sp1, регулирует кавеолин-1, флотиллин-1 и тетраспанин CD151 [70, 95, 96]. Кавеолин-1 и флотиллин-1 также регулируются транскрипционным фактором Ets-1 [11, 97].

В современной научной литературе существует большое количество работ, посвященных исследованию эпигенетической регуляции белковой экспрессии с помощью микроРНК, но до создания полноценной картины еще очень далеко. Примечательно, что трансляция многих МОБ подавляется одинаковыми микроРНК, причем именно теми, активность которых ассоциирована с канцерогенезом.

miR-124 и miR-138 являются супрессорами опухолевого роста. Потеря экспрессии этих микроРНК усиливает миграцию, инвазию и пролиферацию опухолевых клеток, а также коррелирует с показателями прогрессии злокачественных опухолей различных локализаций и снижением показателей выживаемости пациентов при гепатоцеллюлярной карциноме, РМЖ, раке предстательной железы, прямой кишки, пищевода, поджелудочной железы, мочевого пузыря, почки, шейки матки, а также при гематобластозах и глиомах. Примечательно, что мишенями этих микроРНК являются мРНК генов *FLOT1*, *FLOT2*, и *CAV-1*, причем в 3' UTR мРНК флотиллина-1 miR-124 имеет 39 сайтов связывания. Кроме того, данная микроРНК является негативным регуля-

тором экспрессии выше упоминавшегося транскрипционного фактора Sp1 [84, 98, 99].

МикроРНК-1, теряющая экспрессию в связи с развитием рака легкого, предстательной железы, мочевого пузыря, щитовидной железы, почки, рабдомиосаркомы, гепатоцеллюлярной карциномы и острого миелоидного лейкоза, регулирует экспрессию кавеолина-1, кавеолина-2, флотиллина-2, стоматина, тетраспанина-4 и галектина-3 [84, 98, 100].

Исследовать активность микроРНК в отношении формирования мембранных микродоменов крайне сложно, так как miR-124 и miR-1, например, помимо МОБ имеют более 200 верифицированных мишеней каждая. В их число входят также мРНК других мембранных белков, в частности сиаломуцина (CD164), рецепторов интегрин 1 и EGF, белков цитоскелета, везикулярного транспорта, транскрипционных факторов и многих других.

Сходная ситуация наблюдается и для miR-138, которая является негативным регулятором транскрипции многих генов МОБ, включая *FLOT1*, *FLOT2* и *CAV-1*. Важно, что инактивация этой микроРНК приводит к конститутивной активации NF-κB [101]. Наиболее изученные miR-21 (онкоген) и группа let-7 (микроРНК-онкосупрессоры), изменение экспрессии которых тесно связано с различными этапами опухолевой прогрессии, также регулируют МОБ [84, 100, 102]. Существуют данные о регуляции флотиллина-1 miR-485 и miR-506 [103, 104], флотиллина-2 miR-34a [105] и галектина-3 miR-22 [106]. Вышеупомянутые микроРНК часто обнаруживаются в составе экзосом.

Анализ состава микроРНК экзосом, проведенный с использованием методов глубокого секвенирования 14 (!) библиотек, выявил наличие 593 miR, причем 49 % представлены только 5 микроРНК (miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p, и miR-99b-5p). Среди 20 наиболее часто встречающихся в составе экзосом микроРНК обнаружена и онкосупрессорная miR-181b, регулирующая экспрессию TSPAN8 [107].

Эпигенетическая регуляция генной экспрессии с помощью микроРНК очень сложна. Проведенный нами поиск микроРНК, регулирующих транскрипцию некоторых упомянутых в обзоре тетраспанинов в информационных базах Diana (diana.imis.athena-innovation.gr) и Target Scan (www.targetscan.org) выявил следующее. мРНК маркерных для экзосом тетраспанинов 3 и 29 (CD9, CD81) являются мишенями для 72 и 122 (!) микроРНК, причем только 2 из них – miR-548 и miR-330-5p – совпадают. Интересно, что регуляторами экспрессии TSPAN8, наряду с другими (всего их 33), являются эти же микроРНК. Удивительно, но только 2 из более чем 2500 известных микроРНК человека (miR-124 и miR-506), относящиеся к онкосупрессорам, регулируют транскрипцию CD151, повышенная экспрессия которого тесно связана с опухолевой прогрессией. Следует еще раз подчеркнуть, что мишенями miR-124 являются также мРНК генов *FLOT1*, *FLOT2*, и *CAV-1*, а мишенью miR-506 – *FLOT1*.

Уже упоминавшийся CD63 (TSPAN30), роль которого в онкогенезе неоднозначна, регулируется только одной из известных на сегодняшний день микроРНК — miR-490-3p, изменение экспрессии которой связывают с усилением клеточной пролиферации, миграции и инвазии, а также стимуляцией эпителиально-мезенхимального перехода [108]. Авторы утверждают, что причина этих изменений — тот факт, что мишенью miR-490-3p является *ERGIC3* (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment Protein 3). Неизвестно, входит ли *ERGIC3* в состав микродоменов, но этот белок связан с эндоплазматическим ретикуломом, имеет 2 трансмембранных домена, и его экспрессия часто повышается в клетках самых разных типов эпителиальных опухолей [109]. Поскольку, по последним данным, CD63 также промотирует эпителиально-мезенхимальный переход [80], возникает вопрос, какие взаимоотношения существуют между этими двумя мишенями miR-490-3p.

В данном обзоре мы только обозначили некоторые аспекты регуляции экспрессии МОБ. Данный вопрос нуждается в тщательном и многопрофильном анализе с привлечением экспериментальных, биоинформационных и клинических данных.

### Заключение

Таким образом, большинство белков мембранных микродоменов высококонсервативны, широко распространены как в тканях, так и среди разнообразных представителей Metazoa, обладают высокой функциональной активностью, что, безусловно, указывает на их высокую значимость для организма в целом. МОБ являются тонкими регуляторами широкого спектра сигнальных путей, оказывая влияние почти на все аспекты жизнедеятельности клетки, локализуясь и работая преимущественно в ПМ.

Единой картины о многообразии и возможном взаимодействии различных семейств МОБ на сегодняшний день нет.

До сих пор принято рассматривать классы МОБ отдельно друг от друга, и имеющиеся данные представляют собой разрозненные публикации, посвященные анализу белков конкретных семейств. Тем не менее, если принимать во внимание наличие ряда общих черт и регуляторных белков-мишеней, функционирование МОБ различных семейств может и должно быть тесно взаимосвязано, и, безусловно, нуждается в комплексном рассмотрении. Тот факт, что нокаутные животные по отдельным представителям описанных семейств жизнеспособны, лишь еще раз подчеркивает функциональную взаимосвязь различных МОБ между собой.

Таким образом, подход, в котором будут учтены особенности взаимодействия или, вероятно, взаимозаменяемости МОБ, в будущем позволит экспериментально выявить пути взаимной регуляции и совместного функционирования разных семейств этих белков, а значит, способствовать значительному углублению знаний о функциях ПМ в целом. Мы стоим на пороге понимания того, как перераспределяются сигналы внутри клетки и как на ПМ «презентируется» клеточное состояние. При изучении МОБ также может быть получен ответ на вопрос, почему разные типы клеток на одинаковые сигналы могут реагировать по-своему. Исследования, посвященные нарушениям функционирования клеточной ПМ в целом и мембранных микродоменов в частности, крайне важны для идентификации механизмов канцерогенеза, регуляции сигнальной трансдукции в опухолевых клетках и поиске новых маркеров прогрессии и мишеней для терапии.

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 14-04-01706А «Роль малых ГТФаз RalA, RalB и Arf6, а также белков липидных микродоменов Flot1 и Flot2 в биогенезе и секреции экзосом, продуцируемых неопластическими клетками различного гистогенеза».*

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(4023): 720–31.
- Stier A., Sackmann E. Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 1973;311(3):400–8.
- Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003;32:257–83.
- Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(2):532–45.
- Nicolson G.L. Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. *Cancer Res* 2015;75(7):1169–76.
- Веснина Л.Э. Липидные рафты: роль в регуляции функционального состояния клеточных мембран. *Актуальные проблемы современной медицины* 2014;13(2(42)):5–9. [Vesnina L.E. Lipid rafts: role in the regulation of the functional status of cellular membranes. *Aktual'nye problemy suchsnogo meditsiny = Actual Problems Modern Medicine* 2014;132 (42):5–9. (In Russ.)].
- Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. Caveolae and signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(4): 225–37.
- Chavan T.S., Muratcioglu S., Marszalek R. et al. Plasma membrane regulates Ras signaling networks. *Cellular logistics* 2015;5(4):e1136374.
- Nabi I.R., Shankar J., Dennis J.W. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci* 2015;128(13):2213–9.
- Lajoie P., Goetz J.G., Dennis J.W. et al. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol* 2009;185(3):381–5.



11. Bodin S., Planchon D., Rios Morris E. et al. Flotillins in intercellular adhesion – from cellular physiology to human diseases. *J Cell Sci* 2014;127(Pt 24): 5139–47.
12. Архипова К.А., Зборовская И.Б. Микродомен-образующие белки разных семейств в регуляции общих сигнальных путей клетки. Биологические мембраны 2012;29(6):387–99. [Arkhipova K.A., Zborovskaya I.B. Microdomain-forming proteins of different families in the regulation of general signaling cellular pathways. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes* 2012;29 (6):387–99. (In Russ.)].
13. Rocha-Perugini V., Sanchez-Madrid F., Martinez Del Hoyo G. Function and Dynamics of Tetraspanins during Antigen Recognition and Immunological Synapse Formation. *Front Immunol* 2015;6:653.
14. Mollinedo F., Gajate C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul* 2015;57:130–46.
15. Villarroya-Beltri C., Baixauli F., Gutierrez-Vazquez C. et al. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014;28:3–13.
16. Iraci N., Leonardi T., Gessler F. et al. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):171.
17. Zhang H.G., Grizzle W.E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am J Pathol* 2014;184(1):28–41.
18. Kirkham M., Nixon S.J., Howes M.T. et al. Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 12):2075–86.
19. Fernandez I., Ying Y., Albanesi J. et al. Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(17):11193–8.
20. Williams T.M., Lisanti M.P. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004;5(3):214.
21. Bastiani M., Parton R.G. Caveolae at a glance. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 22):3831–6.
22. Lisanti M.P., Scherer P.E., Tang Z. et al. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 1994;4(7):231–5.
23. Couet J., Sargiacomo M., Lisanti M.P. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 1997;272(48):30429–38.
24. Roepstorff K., Thomsen P., Sandvig K. et al. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem* 2002;277(21):18954–60.
25. Matveev S.V., Smart E.J. Heterologous desensitization of EGF receptors and PDGF receptors by sequestration in caveolae. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(4):935–46.
26. Pike L.J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746(3):260–73.
27. de Laurentiis A., Donovan L., Arcaro A. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J* 2007;1:12–32.
28. Lee H., Volonte D., Galbiati F. et al. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site(Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 2000;14(11):1750–75.
29. Engelman J.A., Zhang X.L., Razani B. et al. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J Biol Chem* 1999;274(45):32333–41.
30. Grande-Garcia A., Echarri A., de Rooij J. et al. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 2007;177(4):683–94.
31. Beardsley A., Fang K., Mertz H. et al. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 2005;280(5): 3541–7.
32. Yu H., Shen H., Zhang Y. et al. CAV1 promotes HCC cell progression and metastasis through Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS One* 2014, 9(9):e106451.
33. Brown G.T., Murray G.I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 2015;237(3):273–81.
34. Han F., Zhu H.G. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010;159(1): 443–50.
35. Aga M., Bradley J.M., Wanchu R. et al. Differential effects of caveolin-1 and -2 knockdown on aqueous outflow and altered extracellular matrix turnover in caveolin-silenced trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(9):5497–509.
36. Williams T.M., Medina F., Badano I. et al. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis *in vivo*. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase(MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem* 2004;279(49):51630–46.
37. Jia L., Wang S., Zhou H. et al. Caveolin-1 up-regulates CD147 glycosylation and the invasive capability of murine hepatocarcinoma cell lines. *Int J Biochem Cell B* 2006;38(9):1584–93.
38. Tang W., Hemler M.E. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* 2004;279(12):11112–8.
39. Muramatsu T. Basigin(CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem* 2016;159(5):481–90.
40. Andreu Z., Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014;5:442.
41. Rivera-Milla E., Stuermer C.A., Malaga-Trillo E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(3):343–57.
42. Browman D.T., Hoegg M.B., Robbins S.M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell B* 2007;17(8):394–402.
43. Stuermer C.A. The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell B* 2010;20(1):6–13.
44. Chowdhury I., Thompson W.E., Thomas K. Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Cell Physiol* 2014;229(8):998–1004.
45. Solis G.P., Hulsbusch N., Radon Y. et al. Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Mol Biol Cell* 2013;24(17):2689–702.
46. Koch J.C., Solis G.P., Bodrikov V. et al. Upregulation of reggie-1/flotillin-2 promotes axon regeneration in the rat optic nerve *in vivo* and neurite growth *in vitro*. *Neurobiol Dis* 2013;51:168–76.
47. Gomez V., Sese M., Santamaria A. et al. Regulation of aurora B kinase by the lipid raft protein flotillin-1. *J Biol Chem* 2010;285(27):20683–90.
48. Hazarika P., McCarty M. F., Prieto V.G. et al. Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Res* 2004;64(20):7361–9.
49. Gallagher P.G., Romana M., Lieman J.H. et al. cDNA structure, tissue-specific expression, and chromosomal localization of the murine band 7.2b gene. *Blood* 1995;86(1):359–65.
50. Lapatsina L., Brand J., Poole K. et al. Stomatin-domain proteins. *Eur J Cell Biol* 2012;91(4):240–5.
51. Snyers L., Umlauf E., Prohaska R. Oligomeric nature of the integral membrane protein stomatin. *J Biological Chem* 1998;273(27):17221–6.
52. Umlauf E., Mairhofer M., Prohaska R. Characterization of the stomatin domain involved in homo-oligomerization and lipid raft association. *J Biol Chem* 2006;281(33):23349–56.
53. Chi H., Hu Y.H. Stomatin-like protein 2 of turbot *Scophthalmus maximus*: Gene cloning, expression profiling and immunoregulatory properties. *Fish Shellfish Immunol* 2016;49:436–41.
54. Chang D., Ma K., Gong M. et al. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2010;15(2):104–10.

55. Zhang L., Ding F., Cao W. et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(5):1639–46.
56. Cui Z., Zhang L., Hua Z. et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed and related to cell growth in human endometrial adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2007;17(4):829–33.
57. Cao W., Zhang B., Li J. et al. SLP-2 overexpression could serve as a prognostic factor in node positive and HER2 negative breast cancer. *Pathology* 2011;43(7):713–8.
58. Huang S., Tian H., Chen Z. et al. The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evol Biol* 2010;10:306.
59. Detchokul S., Williams E. D., Parker M. W. et al. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *Br J Pharmacol* 2014;171(24):5462–90.
60. Beckwith K.A., Byrd J.C., Muthusamy N. Tetraspanins as therapeutic targets in hematological malignancy: a concise review. *Front Physiol* 2015;6:91.
61. Levy S., Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology* 2005;20:218–24.
62. Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 23):4143–51.
63. Kumari S., Devi G. t., Badana A. et al. CD151-A Striking Marker for Cancer Therapy. *Biomark Cancer* 2015;7:7–11.
64. Zhou P., Erfani S., Liu Z. et al. CD151-alpha3beta1 integrin complexes are prognostic markers of glioblastoma and cooperate with EGFR to drive tumor cell motility and invasion. *Oncotarget* 2015;6(30):29675–93.
65. Qin Y., Mohandessi S., Gordon L. et al. Regulation of FAK Activity by Tetraspan Proteins: Potential Clinical Implications in Cancer. *Crit Rev Oncog* 2015;20(5–6):391–405.
66. Stewart R.L., West D., Wang C. et al. Elevated integrin alpha6beta4 expression is associated with venous invasion and decreased overall survival in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2016;54:174–83.
67. Romanska H. M., Potemski P., Kusinska R. et al. Expression of CD151/Tspan24 and integrin alpha 3 complex in aid of prognostication of HER2-negative high-grade ductal carcinoma in situ. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(8):9471–8.
68. Ke A.W., Zhang P.F., Shen Y.H. et al. Generation and characterization of a tetraspanin CD151/integrin alpha6beta1-binding domain competitively binding monoclonal antibody for inhibition of tumor progression in HCC. *Oncotarget* 2016;7(5):6314–22.
69. Berditchevski F., Odintsova E. ErbB receptors and tetraspanins: Casting the net wider. *Int J Biochem Cell B* 2016;7(Pt A):68–71.
70. Sadej R., Grudowska A., Turczyk L. et al. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. *Lab Invest* 2014;94(1):41–51.
71. Hong I.K., Jin Y.J., Byun H.J. et al. Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J Biol Chem* 2006;281(34):24279–92.
72. Miranti C.K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cellular Signalling* 2009;21(2):196–211.
73. Nazarenko I., Rana S., Baumann A. et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010;70(4):1668–78.
74. Yue S., Mu W., Erb U. et al. The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. *Oncotarget* 2015;6(4):2366–84.
75. Rana S., Zöller M. The Functional Importance of Tetraspanins in Exosomes Emerging Concepts of Tumor Exosomes-Mediated Cell-Cell Communication. Edited by Z.-H. Zhang. Springer Science + Business Media. New York, 2013. Pp. 69–106.
76. Sandfeld-Paulsen B., Jakobsen K.R., Baek R. et al. Exosomal Proteins as Diagnostic Biomarkers in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016.
77. Murayama Y., Shinomura Y., Oritani K. et al. The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol* 2008;216(1):135–43.
78. Tejera E., Rocha-Perugini V., Lopez-Martin S. et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell* 2013;24(3):261–73.
79. Laffleur M.A., Xu D., Hemler M.E. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009;20(7):2030–40.
80. Seubert B., Cui H., Simonavicius N. et al. Tetraspanin CD63 acts as a pro-metastatic factor via beta-catenin stabilization. *Int J Cancer* 2015;136(10):2304–15.
81. Saito Y., Tachibana I., Takeda Y. et al. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(19):9557–65.
82. Cao Z.Q., Guo X.L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* 2016;7(5):314–24.
83. Wang L., Guo X.L. Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression. *Biomed Pharmacother* 2016;78:165–71.
84. Timoshenko A.V. Towards molecular mechanisms regulating the expression of galectins in cancer cells under microenvironmental stress conditions. *Cell Mol Life Sci* 2015;2(22):4327–40.
85. Argueso P., Mauris J., Uchino Y. Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer. *Tissue Barriers* 2015;3(3):e1026505.
86. Demers M., Magnaldo T., Stpierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res* 2005;65(12):5205–10.
87. Wu M.H., Hong T.M., Cheng H.W. et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009;7(3):311–8.
88. Prudova A., auf dem Keller U., Butler G.S. et al. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(5):894–911.
89. Ochieng J., Green B., Evans S. et al. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1379(1):97–106.
90. Goetz J.G., Joshi B., Lajoie P. et al. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell B* 2008;180(6):1261–75.
91. Bist A., Fielding C.J., Fielding P.E. p53 regulates caveolin gene transcription, cell cholesterol, and growth by a novel mechanism. *Biochemistry* 2000;39(8):1966–72.
92. Dumic J., Lauc G., Flogel M. Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB. *Cell Physiol Biochem* 2000;10(3):149–58.
93. Sasaki Y., Oshima Y., Koyama R. et al. Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of p53 family members. *Mol Cancer Res* 2008;6(3):395–406.
94. Banning A., Ockenga W., Finger F. et al. Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes. *PLoS One* 2012;7(9):e45514.
95. Cao S., Fernandez-Zapico M.E., Jin D. et al. KLF11-mediated repression antagonizes Sp1/sterol-responsive element-binding protein-induced transcriptional activation of caveolin-1 in response to cholesterol signaling. *J Biol Chem* 2005;280(3):1901–10.
96. Wang J., Liu X., Ni P. et al. SP1 is required for basal activation and chromatin accessibility of CD151 promoter in liver cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393(2):291–6.
97. Kathuria H., Cao Y.X., Ramirez M.I. et al. Transcription of the caveolin-1 gene is differentially regulated in lung type I epithelial and endothelial cell lines. A role for ETS proteins in epithelial cell expression. *J Biol Chem* 2004;279(29):30028–36.

98. Hoshino I., Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. *Surgery today* 2013;43(5):467–78.
99. Butz H., Szabo P.M., Khella H.W. et al. miRNA-target network reveals miR-124 as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1. *Oncotarget* 2015;6(14):12543–57.
100. Sygitowicz G., Tomaniak M., Blaszczyk O. et al. Circulating microribonucleic acids miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results. *Arch Cardiovasc Dis* 2015;108(12):634–42.
101. Gong H., Song L., Lin C. et al. Down-regulation of miR-138 sustains NF-kappaB activation and promotes lipid raft formation in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1083–93.
102. Wu L., Zhao Q., Zhu X. et al. A novel function of microRNA let-7d in regulation of galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain. *Brain Pathol* 2010;20(6):1042–54.
103. Kang M., Ren M.P., Zhao L. et al. miR-485-5p acts as a negative regulator in gastric cancer progression by targeting flotillin-1. *Am J Transl Res* 2015;7(11):2212–22.
104. Yang F.Q., Zhang H.M., Chen S.J. et al. MiR-506 is down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and inhibits cell growth and metastasis via targeting FLOT1. *PLoS One* 2015;10(3):e0120258.
105. Liu R., Xie H., Luo C. et al. Identification of FLOT2 as a novel target for microRNA-34a in melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(6):993–1006.
106. Yang Q., Jiang W., Zhuang C. et al. microRNA-22 downregulation of galectin-9 influences lymphocyte apoptosis and tumor cell proliferation in liver cancer. *Oncology reports* 2015;34(4):1771–8.
107. Huang X., Yuan T., Tschannen M. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013;14:319.
108. Zhang L.Y., Liu M., Li X. et al. miR-490-3p modulates cell growth and epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by targeting endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 (ERGIC3). *J Biol Chem* 2013;288(6):4035–47.
109. Lin Q.H., Zhang K.D., Duan H.X. et al. ERGIC3, which is regulated by miR-203a, is a potential biomarker for non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2015;106(10):1463–73.
110. Sandvig K., Torgersen M.L., Raa H.A. et al. Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 2008;129(3):267–76.