

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-137-148>

# Транскриптомный анализ нейральных стволовых и прогениторных клеток в сравнении со стволовыми клетками глиобластомы

В.Е. Шевченко<sup>1</sup>, Н.Е. Арноцкая<sup>1</sup>, Т.И. Кушнир<sup>1</sup>, А.С. Брюховецкий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>Клинический госпиталь «НейроВита»; Россия, 121359 Москва, ул. Маршала Тимошенко, 7, стр. 1

**Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко [vshev2015@yandex.ru](mailto:vshev2015@yandex.ru)

**Введение.** В настоящее время отсутствует эффективная терапия глиобластомы. Отчасти это объясняется высокой степенью внутриопухолевой гетерогенности данной опухоли, источником которой, как полагают, являются стволовые клетки глиобластомы (СКГБ). Вопрос о происхождении СКГБ, имеющий большое значение для улучшения клинических результатов, пока остается открытым. Считается, что СКГБ могут образовываться в результате онкогенной трансформации нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК), имеющих схожие с ними морфологические и функциональные свойства. Несмотря на заметный прогресс в выяснении природы СКГБ, пока мало известно о специфически экспрессируемых генах и транскриптах в этих клетках по сравнению с НСПК. В связи с этим актуально изучение молекулярных механизмов глиоматоза с использованием модельных клеточных систем на основе различных клонов СКГБ (например, содержащих маркер CD133) в сравнении с НСПК.

**Цель исследования** – провести сравнительный транскриптомный анализ CD133<sup>+</sup>-НСПК и CD133<sup>+</sup>-СКГБ для определения молекулярно-генетических различий между фенотипами этих клеток и идентификации потенциальных мишеней для терапевтического воздействия на СКГБ.

**Материалы и методы.** Использовались высокочувствительный транскриптомный анализ на микрочипах высокой плотности, клеточные технологии и современный биоинформатический анализ.

**Результаты.** Транскриптомный анализ CD133<sup>+</sup>-СКГБ и CD133<sup>+</sup>-НСПК идентифицировал 1825 дифференциально экспрессированных генов. Установлены биологические процессы и сигнальные каскады, активированные в CD133<sup>+</sup>-СКГБ. Показано, что значительные транскриптомные aberrации в CD133<sup>+</sup>-СКГБ по сравнению с CD133<sup>+</sup>-НСПК прежде всего обусловлены группой транскриптов, регулируемых сигнальными каскадами SHH (Sonic Hedgehog), mTOR (mammalian target of rapamycin), ALK (anaplastic lymphoma kinase), факторами транскрипции E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*. Идентифицированы и аннотированы 6 транскриптов (AQP9, TOX15, HOXB2, STEAP3, TREM1, RFC2), высокоэкспрессированных в CD133<sup>+</sup>-СКГБ и тесно связанных с выживаемостью больных глиобластомой, которые могут являться потенциальными мишенями для терапевтического воздействия на CD133<sup>+</sup>-СКГБ.

**Заключение.** Полученные данные указывают на ряд значительных молекулярно-генетических различий между двумя фенотипами клеток, что может использоваться при разработке новых терапевтических подходов для лечения глиобластомы.

**Ключевые слова:** глиобластома, стволовые клетки глиобластомы, нейральные стволовые клетки, прогениторные клетки, транскриптомика

**Для цитирования:** Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Кушнир Т.И., Брюховецкий А.С. Транскриптомный анализ нейральных стволовых и прогениторных клеток в сравнении со стволовыми клетками глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):137–48. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-137-148>

## Transcriptomic analysis of neural stem and progenitor cells in comparison with glioblastoma stem cells

V.E. Shevchenko<sup>1</sup>, N.E. Arnotskaya<sup>1</sup>, T.I. Kushnir<sup>1</sup>, A.S. Bryukhovetskiy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>Clinical Hospital “NeuroVita”; Bld. 1, 7 Marshala Tymoshenko St., Moscow 121359, Russia

**Contacts:** Valery Evgenievich Shevchenko [vshev2015@yandex.ru](mailto:vshev2015@yandex.ru)

**Introduction.** There is currently no effective therapy for the treatment of glioblastoma. This is partly explained by the high degree of intra- and intertumor heterogeneity of GB, the source of which is believed to be glioblastoma stem cells (GSC). The question of the origin of GSC, which is important for improving clinical outcomes, still remains open. It is believed that GSCs can be formed as a result of oncogenic transformation of neural stem and progenitor cells (NSPCs), which have morphological and functional properties similar to them. Despite significant progress in elucidating the nature of GSCs, little is yet known about the specifically expressed genes and transcripts in these cells in comparison with NSPCs. In this regard, it becomes relevant to study the molecular mechanisms of gliomagenesis using model cell systems based on various clones of GSC.

**Aim.** To conduct a comparative transcriptomic analysis of CD133<sup>-</sup>-NSPCs and CD133<sup>+</sup>-GSCs to study the molecular genetic differences between the phenotypes of these cells and identify potential targets for therapeutic effects on GSCs.

**Materials and methods.** Used: highly sensitive transcriptomic analysis on high-density microarrays, cellular technologies, modern bioinformatics analysis.

**Results.** Transcriptomic analysis of CD133<sup>-</sup>-GSCs and CD133<sup>+</sup>-NSPCs identified 1825 differentially expressed genes. The biological processes and signaling cascades activated in CD133<sup>-</sup>-GSCs have been established. It was shown that significant transcriptomic aberrations in CD133<sup>-</sup>-GSC compared to CD133<sup>+</sup>-NSPC are primarily due to a group of transcripts regulated by the SHH (Sonic Hedgehog), mTOR (mammalian target of rapamycin), ALK (anaplastic lymphoma kinase) signaling cascades, transcription factors E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, as well as oncogenes *ERBB2* and *KRAS*. Six transcripts (AQP9, TOX15, HOXB2, STEAP3, TREM1, RFC2) highly expressed in CD133<sup>-</sup>-GSC and closely associated with the survival of patients with glioblastoma, which may be potential targets for therapeutic effects on CD133<sup>-</sup>-GSC associated with gliomagenesis, which may be potential targets for therapeutic effects on CD133<sup>-</sup>-GSC, have been identified and annotated.

**Conclusion.** The data obtained indicate a number of significant molecular genetic differences between the two cell phenotypes, which can be used in the development of new therapeutic approaches for the treatment of glioblastoma.

**Keywords:** glioblastoma, glioblastoma stem cells, neural stem cells, progenitor cells, transcriptomics

**For citation:** Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Kushnir T.I., Bryukhovetskiy A.S. Transcriptomic analysis of neural stem and progenitor cells in comparison with glioblastoma stem cells. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):137–48. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-137-148>

## ВВЕДЕНИЕ

Среди первичных опухолей головного мозга у взрослых глиобластома (ГБ) является наиболее распространенной и тяжелой формой заболевания. Средняя продолжительность жизни пациентов с данной патологией составляет 15 мес [1]. Стандартная терапия ГБ обеспечивает только ограниченный терапевтический эффект из-за быстроразвивающихся рецидивов [2]. Отчасти это объясняется высокой степенью внутриопухолевой гетерогенности, источником которой, как полагают, является небольшая субпопуляция стволовых клеток ГБ (СКГБ) [3]. Эти клетки устойчивы к облучению и генотоксической терапии и способны проникать в нормальную паренхиму головного мозга [2]. Стволовые клетки ГБ являются критически важными терапевтическими мишенями, так как их деление приводит к восстановлению опухоли и развитию рецидива после терапии [4].

Примечательно, что СКГБ морфологически похожи на нормальные нейральные стволовые клетки и их потомки — прогениторные клетки — и проявляют общие с ними функциональные свойства стволовости и мультипотентной дифференцировки [5]. Однако в отличие от нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) СКГБ теряют контроль над поддержанием баланса между этими двумя процессами [5]. Стволовые клетки ГБ также экспрессируют некоторые маркеры, ассоциированные с НСПК, включая CD133, CD24, EGFR и GFAP.

Считается, что СКГБ могут образовываться в результате онкогенной трансформации НСПК, которые

находятся в периваскулярных нишах головного мозга взрослого человека [6]. Неконтролируемая пролиферация внутри этих ограниченных нейрогенных областей приводит к созданию резервуара туморогенных клеток, образующих основную массу опухоли [7].

Недавние эксперименты показали, что СКГБ могут возникнуть из НСПК субвентрикулярной зоны, так как эти клетки в большей степени подвержены онкогенной трансформации по сравнению с НСПК гиппокампа или дифференцированными клетками [8]. Как и в случае многих солидных опухолей, ГБ имеет иерархическую организацию, отражающую нормальную систему стволовых клеток [7].

Согласно недавно полученным данным, СКГБ могут также возникать в результате репрограммирования нестволовых клеток ГБ (не-СКГБ), что приводит к фенотипической пластичности в популяции опухоли [9]. Например, показано, что эпигенетические модификации способны превратить не-СКГБ в СКГБ [10]. Концепция дедифференцировки не-СКГБ в СКГБ усложнила понимание гетерогенности ГБ, потенциального механизма терапевтического рецидива, резистентности к противоопухолевой терапии, а также вопросов, связанных с разработкой терапевтических стратегий. Таким образом, происхождение СКГБ остается неясным, что создает серьезную проблему в понимании нейробиологии ГБ. Дополнительные сложности связаны со способностью СКГБ модифицировать окружение опухоли, в том числе с помощью собственного пула внеклеточных частиц [11].

Предпринимались попытки систематизировать генетические aberrации в СКГБ и связанные с ними

нарушения сигнальных путей [12]. Однако это оказалось трудной задачей и не привело к обнаружению генов-драйверов и их транскриптов в редкой популяции СКГБ на фоне гетерогенной популяции опухолевых клеток. Идентификация генов и сигнальных путей, связанных с глиомагенезом, с использованием генетических и биохимических методов для больших популяций опухолевых клеток может привести к ошибочным выводам, поскольку будут получены только средние значения молекулярных сигнатур.

Несмотря на заметный прогресс в выяснении природы СКГБ, пока мало известно о специфически экспрессируемых генах и транскриптах в этих клетках по сравнению с НСПК. В связи с этим актуальным становится изучение молекулярных механизмов глиомагенеза с использованием модельных клеточных систем на основе различных клонов СКГБ (например, содержащих маркер CD133), в сравнении с НСПК.

В настоящем исследовании впервые использована экспериментальная модельная система для изучения молекулярно-генетических различий между СКГБ и НСПК. В качестве линий клеток применяли CD133<sup>+</sup>-СКГБ (далее – СКГБ), полученные из глиомасфер культуры иммортализованных клеток U87MG ГБ человека, и CD133<sup>+</sup>-НСПК (далее – НСПК), выделенные из нейросфер культуры клеток обонятельной выстилки верхнего носового хода человека. Сравнительный транскриптомный анализ СКГБ и НСПК идентифицировал 1825 дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ). В результате биоинформатического анализа установлены биологические процессы и сигнальные каскады, активированные в СКГБ. Показано, что значительные транскриптомные aberrации в СКГБ по сравнению с НСПК прежде всего связаны с действием групп генов, экспрессия которых регулируется сигнальными каскадами SHH (Sonic Hedgehog), mTOR (mammalian target of rapamycin), ALK (anaplastic lymphoma kinase), факторами транскрипции E2F1, PRC2, NOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*. Идентифицированы и аннотированы 6 транскриптов (AQP9, TOX15, NOXB2, STEAP3, TREM1, RFC2), высокоэкспрессированных в CD133<sup>+</sup>-СКГБ и тесно связанных с выживаемостью больных ГБ, которые могут являться потенциальными мишенями для терапевтического воздействия на CD133<sup>+</sup>-СКГБ.

Подтверждена целесообразность использования культур СКГБ и НСПК в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов глиомагенеза. Результаты исследования указывают на ряд значительных молекулярно-генетических различий между двумя фенотипами клеток, что может использоваться при разработке новых подходов для лечения ГБ.

**Цель исследования** – изучить молекулярно-генетические различия между СКГБ и НСПК человека и идентифицировать потенциальные мишени для терапевтического воздействия на СКГБ на экспери-

ментальной клеточной модели с использованием высокопроизводительного транскриптомного анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточная линия CD133<sup>+</sup>-СКГБ.** Эту клеточную линию получали из глиомасфер культуры иммортализованных клеток U87 MG ГБ человека методом, описанным ранее [13]. Клетки ГБ U87 культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco, Life Technologies, Россия) в 10 % фосфатном буферном растворе при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Прикрепившиеся клетки культивировали до 80 % конфлюэнтности и пассировали из расчета 1: 3. Клетки U87 MG ресуспендировали в среде для образования нейросфер: DMEM/F12 (Sigma Aldrich, США); L-глутамин (2 мМ, Life Technologies, Россия); B27 (Life Technologies, Россия); фактор роста фибробластов (bFGF) (20 нг/мл, Sigma Aldrich, США); эпидермальный фактор роста (EGF) (20 нг/мл, Sigma Aldrich, США); пенициллин/стрептомицин (100 ед/мл); гепарин (5 мкг/мл). Культивирование проводили во флаконах T75, при 37 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Добавление свежих ростовых факторов проводили через 3 сут. Прикрепившиеся клетки культивировали до достижения 80 % конфлюэнтности, затем пассировали из расчета 1: 3. При достижении достаточного общего количества клеток проводили селекцию CD133<sup>+</sup>-клеток методом иммуносортинга с использованием магнитных шариков с иммобилизованными на них антителами к CD133 (Miltenyi Biotec, Германия). После этого культивировали CD133<sup>+</sup>-клетки в той же среде (3 пассажа). Чистоту культуры оценивали с помощью точной цитометрии с антителами к CD133 (5–10 мкг/мл; Miltenyi Biotec, Германия); она превышала 90 % [13].

**Клеточная линия CD133<sup>+</sup>-НСПК.** После получения письменного информированного согласия пациента (мужчина, 42 лет, находящийся в Клиническом госпитале «НейроВита», Москва) эндоскопически забирали фрагмент обонятельной выстилки из верхнего носового хода (размерами 1 × 1 см). CD133<sup>+</sup>-НСПК выделяли из нейросфер культуры клеток эксплантированного фрагмента обонятельного эпителия по методике, описанной ранее [14]. Для получения НСПК фрагмент ткани обонятельного эпителия носа человека инкубировали с раствором коллагеназы (2 мг/мл) в течение 10 мин при 37 °С для полной диссоциации эпителия на отдельные клетки. Полученные клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (1: 1), содержащей 10 % фосфатного буферного раствора, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина и 60 мкг/мл гентамицина. Первичная культура клеток человека образовывала конфлюэнтный монослой в течение 5–7 сут. Для получения нейросфер клетки обонятельного эпителия пассировали на пластик, покрытый 0,01 % поли-L-лизинном, и культивировали

в бессывороточной среде DMEM/F-12 (1: 1), содержащей 2 мМ L-глутамин, 1 % добавки инсулина, трансферрина, селенита натрия (ITS), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, EGF и bFGF. Клетки цитосфер характеризовали по экспрессии нестина (Miltenyi Biotec, Германия), Thy1, CD90 (Miltenyi Biotec, Германия), NF200 (Sigma Aldrich, США) и GFAP (концентрация 1 мкг/мл, поликлональный, Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Россия) с помощью иммуноцитохимического анализа [13]. CD133<sup>+</sup>-НСПК выделяли методом иммуносортинга, описанным выше.

**Транскриптомный анализ.** Тотальную РНК выделяли из лизатов  $5 \times 10^6$  клеток после предварительной гомогенизации с помощью QIAshredder и очистки с применением набора реактивов RNeasy Mini Kit (Qiagen, Голландия) согласно протоколу производителя. Анализ количества и качества тотальной РНК проводили с помощью Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, США) и набора реактивов Agilent RNA Pico 6000 Kit (Agilent, США). Значение интегрального показателя сохранности РНК (RIN – RNA Integrity Number) более 8,0 принимали за пороговое значение для перехода к этапу подготовки библиотеки. Процессирование, амплификацию, мечение и гибридизацию образцов проводили в соответствии с протоколом набора реагентов GeneChip WT PLUS, а затем гибридизовали с GeneChip Human Gene 2.0 ST (Affymetrix, США) в печи для гибридизации GeneChip 640. Промывку и сканирование проводили с использованием набора Expression Wash, Stain and Scan Kit и системы GeneChip (Affymetrix, США) (станция GeneChip Fluidics 450 и сканер GeneChip 3000-7G) с программным обеспечением Affymetrix GCOS. Сгенерированные файлы CEL использовались для дальнейшей статистической обработки с помощью программы Affymetrix® Data Mining Tool 3.0 (Affymetrix, США).

**Биоинформатический анализ.** Анализ обогащения генов, использующий онтологию генов (GO, Gene Ontology; <http://geneontology.org/>) и базу сигнальных путей KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes; <http://www.kegg.jp/>), проводили с использованием программы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov/>), а также открытой базы данных PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)). Для идентификации сигнальных путей, дифференциально активируемых между СКГБ и НСПК, провели анализ обогащения набора генов с использованием программного пакета GSEA v. 4.3.2 (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). Информацию по экспрессии матричной РНК (мРНК) в опухолевой и нормальной тканях получали из базы «Атлас генома рака» (The Cancer Genome Atlas, TCGA). Корреляцию между экспрессией генов и их клинической значимостью выполнили с помощью программы UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения биологических процессов и сигнальных путей, отличающих СКГБ от НСПК, проводили сравнительный транскриптомный анализ лизатов 2 типов клеток (в триплетах). После обработки данных по уровням мРНК получен профиль экспрессии генов в СКГБ и НСПК. В результате идентифицированы 22 148 генов. Статистически значимые изменения экспрессии ( $p < 0,05$ ) с кратностью  $> 2$  или  $< 0,5$  имели 1825 генов, относящихся к ДЭГ. В СКГБ экспрессия 938 ДЭГ была выше, а экспрессия 887 ДЭГ – ниже по сравнению с НСПК. Транскрипты типичных маркеров НСПК (ASCL1, CD133, CD15, CD24, DCX, DLX2, EGFR, GSX2, GFAP, KIF4, LGALS3, NES, THBS, THY1) присутствовали в обеих популяциях клеток, однако экспрессия некоторых из них значительно различалась. Так, уровни мРНК CD24 в НСПК были в 2,2 раза ниже, а THY1 в 87,9 раза выше по сравнению с СКГБ. Согласно полученным результатам и данным TCGA, из 938 ДЭГ, положительно регулируемых в СКГБ, 66 имели экспрессию более чем на порядок выше, чем в НСПК, и включали (по данным TCGA) 18 прогностических генов для ГБ (*AQP9, SPP1, PNLIPRP3, IL1F8, TM4SF19, ATP6V0D2, VAT1L, SBSN, MCTP1, IL31RA, CA9, VSNL1, PCSK1, PTPRN, AHNAK2, LINGO2, TBX15, ENO2*). Из 887 ДЭГ, отрицательно регулируемых в СКГБ, 12 имели экспрессию более чем на порядок ниже, чем в НСПК (*PNPLA4, FAM43A, FBLN2, ANO4, CPXM2, SLIT2, PRICKLE1, TNFRSF11B, IGFBP5, LOC554202, ACTG2, THY1*), и относились к прогностическим генам для ГБ.

Для ассоциации набора генов с изменением фенотипа клеток использовали несколько методов, включая анализ обогащения генов на основе базы данных предварительно аннотированных наборов генов в терминах онтологии генов (GO) и сигнальных путей KEGG, а также разработанный сравнительно недавно метод GSEA. Первые 2 метода подтвердили, что 1825 ДЭГ обогащены в сигнальных каскадах RAP1, PI3K-Akt, p53, MAPK, а также связанных с адгезией, клеточным циклом, апоптозом, протеогликанами и обменом кальция. Интересно, что из 73 ДЭГ, кодирующих белки онкогенных сигнальных каскадов, 21 ген имел в СКГБ повышенную экспрессию, а 52 – пониженную по сравнению с НСПК.

Данные по всем генам проанализировали с помощью программы GSEA, учитывающей функциональные связи генов между собой. В некоторых случаях, например, при слабом изменении индивидуальной экспрессии отдельных генов, применение GSEA приводит к повышению чувствительности метода и получению более полной картины дифференциальной



Таблица 1. Биологические процессы и сигнальные пути для наиболее обогащенных дифференциально экспрессированных генов

Table 1. Biological processes and signaling pathway for the most enriched differentially expressed genes

Биологический процесс Biological process	Количество генов Quantity of genes	<i>p</i>	Сигнальный путь Signal pathway	Количество генов Quantity of genes	<i>p</i>
Клеточная адгезия Cell adhesion	92	4,4E-12	Молекулы клеточной адгезии Cell adhesion molecules	34	3,8E-6
Миграция клеток Cell migration	53	7,8E-10	Онкогенные сигнальные каскады Pathways in cancer	73	3,4E-4
Передача сигнала Signal transduction	149	1,4E-7	Сигнальный каскад Rap1 Rap1 signaling pathway	35	6,6E-4
Репликация ДНК DNA replication	26	3,7E-6	Сигнальный каскад PI3K-Akt PI3K-Akt signaling pathway	49	3,3E-3
Апоптотический процесс Apoptotic process	78	1,0E-5	Клеточный цикл Cell cycle	26	4,1E-3
Реакция на гипоксию Response to hypoxia	30	1,1E-5	TSP-1-индуцированный апоптоз микрососудистых эндотелиальных клеток TSP-1 Induced apoptosis in microvascular endothelial cell	5	5,3E-3
Ангиогенез Angiogenesis	39	5,0E-5	Протеогликины при раке Proteoglycans in cancer	31	6,3E-3
Деление клеток Cell division	52	7,2E-5	Сигнальный каскад p53 p53 signaling pathway	15	6,4E-3
Воспалительная реакция Inflammatory response	56	8,8E-5	Сигнальный путь фактора некроза опухоли Tumor necrosis factor signaling pathway	20	7,1E-3
Внутриклеточная передача сигнала Intracellular signal transduction	59	9,2E-5	Сигнальный каскад кальция Calcium signaling pathway	36	8,2E-3
Клеточный хемотаксис Cell chemotaxis	17	1,6E-4	Сигнальный путь MAPK MAPK signaling pathway	41	1,0E-2

экспрессии [15]. Для поиска набора генов, коррелирующих с фенотипом СКГБ, при анализе матрицы экспрессии генов СКГБ и НСПК применяли базу онкогенных данных C6. all. v2023.1.Hs.symbols.gvt из молекулярных подписей MsigDB (The Molecular Signatures Database) при ложном уровне обнаружения (false discovery rate, FDR) <0,30.

Основным результатом анализа обогащения набора генов с помощью этого метода является нормализованный показатель обогащения (normalized enrichment score, NES), отражающий степень представленности функциональных групп генов вверху или внизу их ранжированного списка. Величина прироста зависит от корреляции гена с фенотипом. Положительный NES указывает на обогащение набора генов в верхней части ранжированного списка, отрицательный NES – внизу ранжированного списка. Величина номинального значения *p* (nominal *p*-value, NOM *p*) определяет статистическую значимость показателя обогащения [16].

С помощью программы GSEA было установлено, что из 187 обогащенных наборов генов 56 имеют повышенную экспрессию в СКГБ по сравнению с НСПК. В табл. 2 представлены 11 наиболее значимых коэкспрессированных серий генов (NES = 1,63–1,40; NOM *p* <0,015; FDR <10 %), которые активно участвуют в онкогенезе и связаны с фенотипом СКГБ. Согласно данным, представленным в табл. 2, 1-е место в ранжированном списке занимает набор генов, регулируемых сигнальным каскадом SHH, ниже располагаются серии, связанные с E2F1-мишенью, кластеры генов, транскрипция которых контролируется транскрипционными факторами PRC2, HOXA9 и MYC, группы генов, регулируемых онкогенами *ERBB2* и *KRAS*.

В результате GSEA-анализа получены графики обогащения, частично представленные на рисунке, которые графически представляют показатель обогащения конкретного набора генов. Верхняя часть графика демонстрирует текущий показатель обогащения

**Таблица 2.** Анализ GSEA 11 наиболее обогащенных серий генов, имеющих повышенную экспрессию в стволовых клетках глиобластомы по сравнению с нейральными стволовыми и прогениторными клетками

**Table 2.** GSEA analysis of the 11 most enriched series of genes that have increased expression in glioblastoma stem cells compared to neural stem and progenitor cells

Серия генов Gene series	Количество генов Quantity of genes	NES	NOM <i>p</i>	FDR <i>q</i>
GCNP_SHH_UP_EARLY.V1_UP	160	1,63	0	0,038
E2F1_UP.V1_UP	171	1,62	0	0,021
PRC2_EED_DN.V1_DN	177	1,61	0	0,017
HOXA9_DN.V1_DN	168	1,52	0	0,042
RPS14_DN.V1_DN	174	1,51	0	0,038
CSR_LATE_UP.V1_UP	155	1,48	0,0040	0,044
MYC_UP.V1_UP	157	1,48	0,0038	0,042
MTOR_UP.N4.V1_UP	181	1,45	0,0019	0,049
ERBB2_UP.V1_DN	177	1,42	0,0019	0,066
KRAS.KIDNEY_UP.V1_UP	136	1,41	0,0056	0,064
ALK_DN.V1_UP	133	1,40	0,0139	0,065

**Примечание.** NES – normalized enrichment score, нормализованный показатель обогащения набора генов; NOM *p* – nominal *p*-value, номинальное значение *p* (статистическая значимость показателя обогащения); FDR *q* – false discovery rate *q*-value, уровень ложноположительных результатов для нормализованного показателя обогащения.

**Note.** NES – normalized enrichment score; NOM *p* – nominal *p*-value (statistical significance of the enrichment score); FDR *q* – false discovery rate *q*-value.

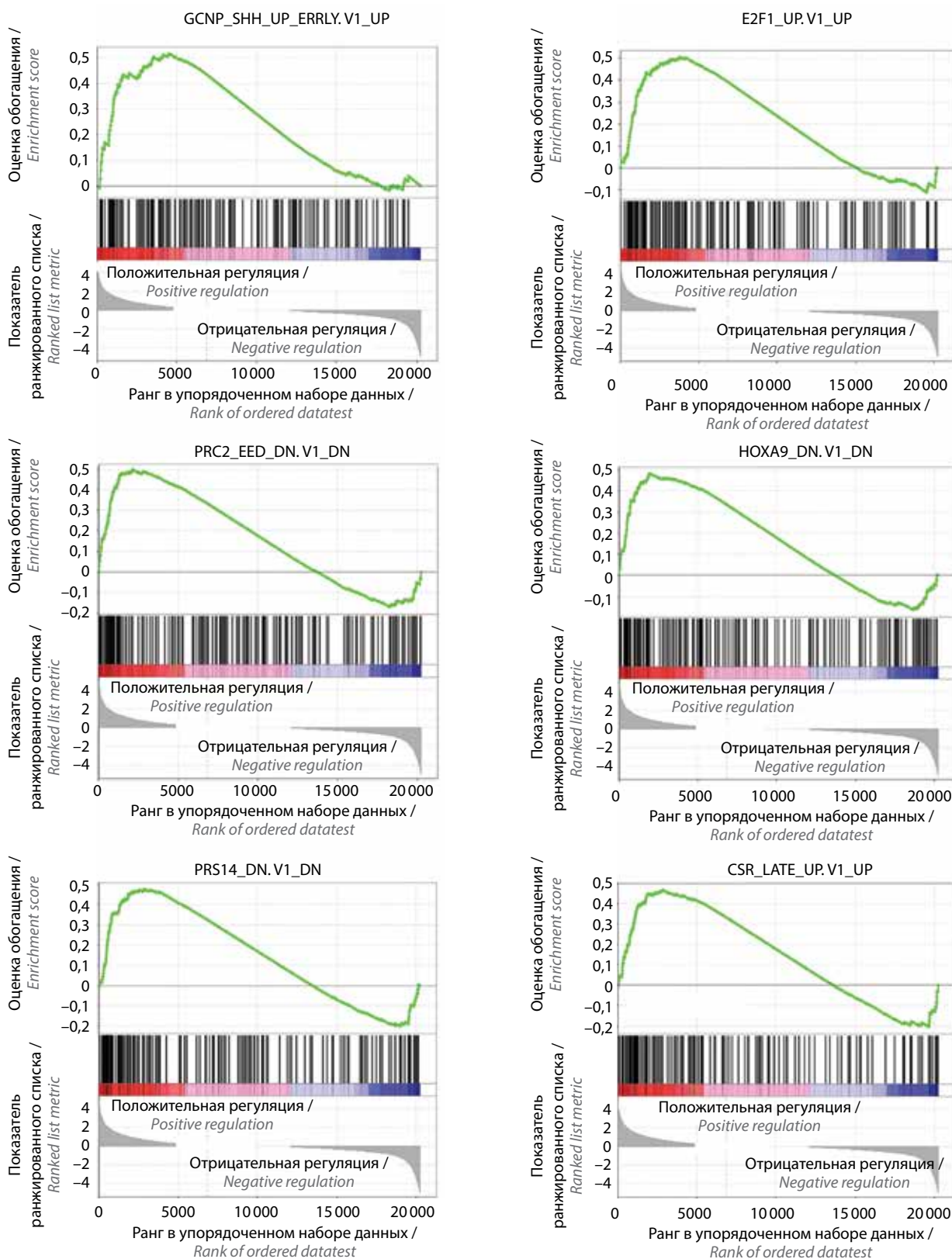
(ES) для серии генов по мере продвижения анализа по ранжированному списку. Значение на пике графика представляет собой ES для данной серии генов. Наборы генов с пиком в начале или в конце ранжированного списка обычно представляют наибольший интерес. Согласно данным, представленным на рисунке, для 6 серий генов наблюдался отчетливый более высокий максимум в начале графика, что указывает на положительную регуляцию обогащенной группы генов в СКГБ по сравнению с НСПК. Аналогичные результаты были получены для всех 11 наборов генов. Передовое подмножество генов вносит наибольший вклад в ES. Для положительного ES (как в нашем случае) переднее подмножество – это набор ДЭГ, которые положительно регулируются в СКГБ по сравнению с НСПК.

Веб-портал UALCAN провалидировал мРНК для ДЭГ, используя данные проекта TCGA. Анализ показал, что из 938 положительно регулируемых транскриптов для ДЭГ в СКГБ 85 мРНК рассматривались в TCGA как перспективные прогностические маркеры ГБ, тесно связанные с клиническими показателями. При формировании панели транскриптов, которые могут служить потенциальными мишенями для таргетирования СКГБ, принимали во внимание их уровни экспрессии в 2 популяциях клеток, параметры кривых общей выживаемости Каплана–Мейера для больных ГБ, а также экспрессию мРНК в нормальной и опухолевой тканях. В результате были отобраны перспек-

тивные транскрипты-мишени для терапевтического воздействия на СКГБ, данные по которым представлены в табл. 3. Все мРНК таргетных генов в СКГБ имели повышенную экспрессию и довольно низкие значения Logrank *p* для графиков общей выживаемости Каплана–Мейера.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Все больше данных свидетельствует о том, что СКГБ ответственны за инициацию опухоли, развитие лекарственной устойчивости и рецидива ГБ [17]. К сожалению, нет единого мнения относительно маркеров этих клеток. Источником опухоли могут быть нейральные стволовые клетки, перерожденные в СКГБ, или их потомки – прогениторные клетки, потерявшие правильный вектор миграции в зону «созревания» и осевшие в случайном месте мозговой ткани [18]. Эти 2 модели не исключают друг друга, а указывают на 2 независимых пути вариабельности, которые могут развиваться одновременно и вносить свой вклад в разнообразие клеток ГБ [18]. Многие исследователи считают, что определенные клоны СКГБ возникают в результате трансформации пула НСПК [19]. Основанием для этого служит наличие у них общих черт с НСПК, таких как экспрессия множества идентичных клеточных маркеров, самообновление и способность к мультидифференцировке [20]. Однако в отличие от НСПК СКГБ содержат обширные генетические аномалии, характерные для заболевания,



Графики обогащения 6 положительно регулируемых наборов генов для фенотипа стволовых клеток глиобластомы, полученные с помощью программы GSEA

Enrichment plots of 6 up-regulated gene sets for the glioblastoma stem cells phenotype obtained by GSEA program

и образуют опухоли, повторяющие ГБ человека при введении их в области мозга мыши, соответствующие местам возникновения данной опухоли у пациентов.

Несмотря на достигнутый прогресс в изучении СКГБ, молекулярные механизмы неопластической трансформации НСПК в СКГБ пока до конца не изучены.

**Таблица 3.** Потенциальный набор транскриптов для таргетирования стволовых клеток глиобластомы, включая отношение экспрессии дифференциально экспрессированных транскриптов стволовых клеток глиобластомы (СКГБ) и нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) ( $p < 0,05$ )

**Table 3.** Potential set of transcripts for targeting glioblastoma stem cells, including the expression ratio of differentially expressed transcripts of glioblastoma stem cells (GSC) and neural stem and progenitor cells (NSPC) ( $p < 0.05$ )

Матричная РНК Matrix RNA	Кодируемый белок Encoded protein	СКГБ/НСПК GSC/NSPC	Log-rank $p$
AQP9	Акваторин 9 Aquaporin 9	93,60	0,057
TBX15	T-бокс фактора транскрипции 15 T-box transcription factor 15	10,91	0,038
HOXB2	Гомеобокс B2 Homeobox B2	6,09	0,00076
STEAP3	Металлоредуктаза STEAP3 STEAP3 metalloredutase	3,54	0,020
TREM1	Триггерный рецептор 1, экспрессируемый на миелоидных клетках Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	2,72	0,033
RFC2	Фактор репликации C2 Replication factor C2	2,03	0,0037

**Примечание.** Log-rank  $p$  – значение  $p$  для лонгрангового критерия.

**Note.** Log-rank  $p$  –  $p$ -value for long-rank test.

Считается, что СКГБ могут появляться в результате множественных генетических и эпигенетических изменений, влияющих на внутриклеточные сигнальные пути, что приводит к трансформации клеток НСПК [20].

В этом исследовании мы сравнили паттерны экспрессии генов СКГБ и НСПК для обнаружения транскрипционных аномалий, которые могут лежать в основе глиоматоза. Чтобы изучить изменения уровней мРНК в 2 популяциях клеток, мы провели сравнительный транскриптомный анализ на микрочипах с использованием модельной системы на основе клеточных линий CD133<sup>+</sup>-СКГБ и CD133<sup>+</sup>-НСПК. Маркер клеточной поверхности CD133 одинаково экспрессируется в СКГБ и НСПК и был использован для отбора субклонов этих клеток и повышения достоверности полученных результатов.

В отличие от многочисленных транскриптомных исследований ГБ [21], которые в основном были проведены на биопсийном материале пациентов и имели ограничения, связанные с клеточной гетерогенностью, наши данные впервые получены с использованием модельной клеточной системы, содержащей CD133-положительные СКГБ и НСПК. Объединив высокочувствительный транскриптомный анализ с модельной системой СКГБ – НСПК, мы разделили популяцию злокачественных и нормальных клеток и тем самым повысили надежность полученных результатов.

Биоинформатический анализ данных проводили в несколько этапов. Сначала идентифицированы 1825 мРНК ДЭГ, которые указывали на значительные транскрипционные аномалии в СКГБ. Так, экспрес-

сия 170 мРНК изменялась более чем на порядок в СКГБ по сравнению с НСПК. Для изучения набора генов, связанного с изменением фенотипа клеток, использовали несколько биоинформатических методов, включая анализ обогащения генов в терминах GO и сигнальных путей KEGG, а также GSEA.

Результат использования первых двух методов для ДЭГ (см. табл. 1) демонстрирует обогащение многих биологических процессов и сигнальных путей в СКГБ, связанных с онкогенезом. Несмотря на широкое применение, анализы в терминах GO и KEGG представляют обогащение отдельных генов, не учитывая связь между ними и уровни их экспрессии. Данные методы могут пропускать некоторые важные гены, которые не демонстрируют существенную разницу между фенотипами. Поэтому все полученные транскрипты подвергли дальнейшему анализу с помощью программы GSEA – другого мощного аналитического метода (см. табл. 2).

С помощью анализа GSEA ранжированы обогащенные группы генов, которые положительно регулируются в СКГБ по сравнению с НСПК и расположены в порядке значимости для фенотипа СКГБ. Согласно данным, представленным в табл. 2, на 1-м месте находится кластер генов GCNP\_SHN\_UP\_EARLY\_V1\_UP, что подчеркивает его важность для СКГБ. В составе этой серии – 58 положительно экспрессируемых генов, активность которых контролируется сигнальным каскадом SHN. Ранее показана большая роль SHN в регулировании стволовости, самообновления СКГБ и их резистентности к противоопухолевой



терапии [22]. Таргетирование сигнального каскада SHH представляет значительный интерес для разработки новых видов терапии глиобластомы.

На 2-м месте находится серия генов E2F1\_UP. V1\_UP, синтез мРНК которых положительно регулируется транскрипционным фактором E2F1. Этот белок тесно связан с клеточным циклом, модулирует переход клеток из фазы покоя к синтезу ДНК, играет большую роль в апоптозе и трансдукции сигналов. Активация каскада E2F1 усиливает пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиомы [23].

Третье место занимает серия генов PRC2\_EED\_DN. V1\_DN, включающая 26 % таргетных генов, транскрипция которых контролируется PRC2 (Polycomb repressive complex 2) – членом группы Polycomb, представляющей собой важное семейство регуляторов транскрипции. Репрессивный комплекс Polycomb 2, отвечающий за триметилирование H3K27, играет большую роль в онкогенезе и считается перспективной терапевтической мишенью для эпигенетической терапии рака [24].

Согласно данным, представленным в табл. 2, группа генов HOXA9\_DN. V1\_DN по значимости для фенотипа СКГБ находится на 4-м месте и включает 46 положительно регулируемых генов, синтез мРНК которых контролируется фактором транскрипции HOXA9 (Homeobox A9). Семейство HOX регулирует активность клеток, облегчая передачу внутриклеточных сигналов. Доказано важное значение HOXA9 в прогрессировании солидных опухолей [25], а его aberrantная экспрессия тесно связана с прогнозом для пациентов с ГБ [26].

В серию RPS14\_DN. V1\_DN входят гены, транскрипты которых контролируются рибосомальным протеином RPS14, высокоэкспрессированным в глиоме [27]. Снижение его экспрессии приводит к подавлению пролиферации, миграции клеток глиомы и вызывает апоптоз клеток в опытах *in vitro*, а в опытах *in vivo* ингибирует рост опухоли [28].

Транскрипты группы генов CSR\_LATE\_UP. V1\_UP активно взаимодействуют с белком CSR (cellular stress response), структурно подобным рецептору для улавливания макрофагов. Этот белок является мощным регулятором внутриклеточных активных форм кислорода (АФК). В условиях окислительного стресса АФК значительно истощены в клетках со сверхэкспрессией CSR, который защищает клетки, удаляя АФК или побочные продукты окисления [29].

Серия генов MYC\_UP. V1\_UP содержит 30 % таргетных генов для фенотипа СКГБ, транскрипция которых положительно регулируется семейством факторов транскрипции MYC. Нами получены данные об увеличении уровней мРНК для ДЭГ этой группы, включая *TMEFF2*, *ITPR1*, *CDC47L*, *JPH1*, *CHKA*. Белок Myc связан с большинством опухолей человека и высоко экспрессируется в опухолевой ткани больных ГБ [30]. Ингибирование MYC снижает пролиферацию,

увеличивает апоптоз и, что примечательно, вызывает образование многоядерных клеток, которые затем погибают в результате митотической катастрофы [30]. Также этот белок участвует в регуляции пролиферации и выживаемости СКГБ [31].

Транскрипты серии генов MTOR\_UP. N4. V1\_UP активно взаимодействуют с семейством киназ mTOR. Эти киназы опосредуют клеточные реакции на стрессы, такие как повреждение ДНК и недостаток питательных веществ. Сигнальный каскад mTOR активирован при ГБ и является ключевым в биологии этой опухоли, способствует самообновлению, пролиферации и инфильтрации СКГБ [32]. Таргетирование mTOR может быть многообещающим подходом к профилактике и лечению ГБ.

Кластер генов ERBB2\_UP. V1\_DN тесно связан с онкогеном *ERBB2*. Сообщалось об амплификации и/или повышенной экспрессии этого гена при многих видах рака, включая ГБ. Кроме того, анализ иммунных генов и сигнатур, связанных с *ERBB2*, показал его значительную роль в опосредовании иммунного ответа на опухолевых клетках при глиоме [33].

Гены группы KRAS. KIDNEY\_UP. V1\_UP контролируются онкогеном *KRAS*. Активированный онкоген *KRAS* трансформирует нормальные прогениторные клетки в СКГБ, которые показывают нетипичную морфологию и формируют агрессивные опухоли у ксенографтов [34]. На молекулярном уровне возникали метаболические профили и профили экспрессии генов, связанные с неоплазией. Более того, активация *KRAS* приводила к значительной пролиферации опухолевых клеток [34].

Транскрипты серии генов ALK\_DN. V1\_UP тесно взаимодействуют с ALK (anaplastic lymphoma kinase) и ее лигандом – плейотрофином, необходимыми для самообновления и туморогенности СКГБ. Кроме того, плейотропин трансактивируется непосредственно SOX2, необходимым для поддержания как нейральных стволовых клеток, так и СКГБ. Ось плейотрофин – ALK может быть многообещающей мишенью для терапии ГБ [35].

Согласно полученным результатам можно сделать вывод о том, что значительные aberrации экспрессий транскриптов в СКГБ по сравнению с НСПК прежде всего связаны с действием групп генов, экспрессия которых регулируется сигнальными каскадами SHH, mTOR, ALK, факторами транскрипции E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*, что согласуется с данными других авторов [21].

На следующем этапе исследования мРНК для ДЭГ были провалидированы с учетом их связи с клинико-патологическими характеристиками больных ГБ с использованием базы TCGA. В табл. 3 представлены кандидатные транскрипты, которые могут быть мишенями для терапевтического воздействия на СКГБ. Для их идентификации использовали следующие критерии:

- 1) экспрессия мРНК должна быть выше в СКГ по сравнению с НСПК;
- 2) необходимо, чтобы наблюдалось статистически достоверное повышение экспрессии транскрипта в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью;
- 3) кривые общей выживаемости Каплана–Мейера для пациентов с высоким и низким уровнями транскриптов должны достоверно различаться.

Согласно данным, представленным в табл. 3, этим критериям удовлетворяли 6 мРНК, краткая характеристика которых представлена ниже.

Ген *AQP9* кодирует член семейства аквапоринов (AQP) – водоселективных мембранных каналов. Этот ген тесно связан с регуляцией объема клеток, участвует в патогенезе ГБ, способствует подвижности, инвазивности, образованию отеков и облегчает метаболизм в опухолевых клетках в условиях гипоксии [36]. В литературе описан ряд ингибиторов аквапоринов, включая аналоги сульфаниламидов, TGN-020 и противоэпилептические препараты [37].

Ген *TBX15* принадлежит к семейству генов Т-бокс. Фактор транскрипции *TBX15* активируется в различных опухолях и способствует неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток, помогая избежать апоптоз [38]. Экспрессия *TBX15* увеличена в глиомах человека и ассоциируется с ухудшением выживаемости пациентов с данной патологией. Кроме того, повышенная экспрессия *TBX15* связана с генами, участвующими в иммуносупрессии при глиоме [38].

Матричная РНК *HOXB2* кодирует фактор транскрипции, аномальная экспрессия которого связана с различными опухолевыми процессами. Высокая экспрессия *HOXB2* ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с ГБ и коррелирует с их возрастом. Подавление экспрессии *HOXB2* замедляет рост, инвазию и миграцию опухолевых клеток [39]. Этот ген также играет большую роль в регуляции иммунной реакции на клетки глиомы низкой степени злокачественности [40].

Продукт гена *STEAP3* активно участвует в глиоматогенезе. Высокий уровень его экспрессии ассоциируется с негативным прогнозом у пациентов с глиомами дикого типа IDH1/2 [41, 42]. Снижение экспрессии *STEAP3* уменьшает пролиферацию клеток, инвазию, образование сфер *in vitro* и рост опухоли *in vivo* [42].

Ген *TREM1* кодирует рецептор, играющий ключевую роль в воспалительных и иммунных процессах,

происходящих в микроокружении опухоли, в частности ГБ [43]. Повышенная экспрессия этого гена наблюдается в ГБ всех молекулярных подтипов и связана с плохим прогнозом [44]. Полагают, что высокая экспрессия *TREM1* обусловлена в основном проникновением в опухоль миелоидных иммунных клеток [43]. В настоящее время проходят предклинические испытания ряда пептидных ингибиторов *TREM1*, включая LR12, CF9 и др. [45].

Ген *RFC2* активно экспрессируется на уровне как мРНК, так и белка в различных типах опухолевой ткани, в том числе в ткани глиом низкой степени злокачественности. Его повышенная экспрессия коррелирует с клиническими характеристиками пациентов с данной патологией и может служить индикатором неблагоприятного прогноза [46]. Ингибирование *RFC2* снижает пролиферацию клеток глиом низкой степени злокачественности и способствует их апоптозу [46]. Терапевтическим действием при ГБ обладает ксантогумол – природный пренилированный флавоноид, выделенный из *Humulus lupulus L.* (хмеля); он ингибирует экспрессию *RFC2* [47].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Транскриптомный анализ модельной системы на основе CD133<sup>+</sup>-СКГБ и CD133<sup>+</sup>-НСПК может успешно использоваться для изучения природы СКГБ, поиска паттерна генов, подтверждающих общие признаки и отмечающих различия 2 фенотипов этих клеток. В ходе транскриптомного анализа СКГБ и НСПК идентифицированы 1825 ДЭГ. В результате использования современных биоинформатических методов установлены биологические процессы и сигнальные каскады, активированные в СКГБ. Показано, что значительные транскриптомные aberrации в СКГБ по сравнению с НСПК прежде всего обусловлены группами транскриптов, регулируемых сигнальными каскадами SHH, mTOR, ALK, факторами транскрипции E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*. Идентифицированы и аннотированы 6 транскриптов (*AQP9*, *TOX15*, *HOXB2*, *STEAP3*, *TREM1*, *RFC2*), связанных с глиоматогенезом, которые могут использоваться для таргетирования СКГБ.

Обнаруженные в ходе исследования значительные молекулярно-генетические различия между СКГБ и НСПК могут использоваться при разработке терапии, направленной против СКГБ.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- 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
- Chinnaiyan P., Won M., Wen P.Y. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro Oncol* 2018;20(5):666–73. DOI: 10.1093/neuonc/nox209
- Roos A., Ding Z., Loftus J.C. et al. Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 2017;7:120. DOI: 10.3389/fonc.2017.00120
- 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
- Corsaro A., Bajetto A., Thellung S. et al. Cellular prion protein controls stem cell-like properties of human glioblastoma tumor-initiating cells. *Oncotarget* 2016;7(25):38638–57. DOI: 10.18632/oncotarget.9575
- Basak O., Taylor V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1057–72. DOI: 10.1007/s00018-008-8544-x
- Ryskalin L., Gaglione A., Limanaqi F. et al. The autophagy status of cancer stem cells in glioblastoma multiforme: from cancer promotion to therapeutic strategies. *Int J Mol Sci* 2019;20(15):3824. DOI: 10.3390/ijms20153824
- Loras A., Gonzalez-Bonet L.G., Gutierrez-Arroyo J.L. et al. Neural stem cells as potential glioblastoma cells of origin. *Life* 2023;13(4):905. DOI: 10.3390/life13040905
- Friedmann-Morvinski D. Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* 2014;19(5):327–36. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2014011777
- Natsume A., Ito M., Katsushima K. et al. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res* 2013;73(14):4559–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0109
- Broekman M.L., Maas S.L.N., Abels E.R. et al. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol* 2018;14(8):482–95. DOI: 10.1038/s41582-018-0025-8
- McLendon R., Friedman A., Bigner D. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455(7216):1061–8. DOI: 10.1038/nature07385
- 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 tissuespecific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23(1):151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907
- Savchenko E.A., Andreeva N.A., Dmitrieva T.B. et al. Culturing of specialized glial cells (Olfactory Ensheathing Cells) of human olfactory epithelium. *Bull Exp Biol Med* 2005;139(4):510–3. DOI: 10.1007/s10517-005-0332-0
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(43):15545–50. DOI: 10.1073/pnas.0506580102
- Subramanian A., Kuehn H., Gould J. et al. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 2007;23(23):3251–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm369
- Wang X.X., Prager B.C., Wu Q.L. et al. Reciprocal signaling between glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells promotes malignant progression. *Cell Stem Cell* 2018;22(4):514–28. DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.011
- Копылов А.М., Антипова О.А., Павлова Г.В. Молекулярные маркеры нейроонкогенеза при глиобластоме головного мозга. *Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко* 2022;86(6):99–105. DOI: 10.17116/neiro20228606199
- Kopylov A.M., Antipova O.A., Pavlova G.V. Molecular markers of neuro-oncogenesis in patients with glioblastoma. *Voprosy neurokhirurgii imeni N.N. Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery* 2022;86(6):99–105. (In Russ.). DOI: 10.17116/neiro20228606199
- Suva M.L., Rheinbay E., Gillespie S.M. et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* 2014;157(3):580–94. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.030
- Sancho-Martinez I., Nivet E., Xia Y. et al. Establishment of human iPSC-based models for the study and targeting of glioma initiating cells. *Nat Commun* 2016;7(1):10743. DOI: 10.1038/ncomms10743
- Gravendeel L.A.M., Kouwenhoven M.C.M., Gevaert O. et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res* 2009;69:9065–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2307
- Wang H., Lai Q., Wang D. et al. Hedgehog signaling regulates the development and treatment of glioblastoma. *Oncol Lett* 2022;24(3):294. DOI: 10.3892/ol.2022.13414
- Liu X., Zhao J., Wu Q. et al. ANKRD22 promotes glioma proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by upregulating E2F1-mediated MELK expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2023;82(7):631–40. DOI: 10.1093/jnen/nlad034
- Chen H., Gao S., Li J. et al. Wedelolactone disrupts the interaction of EZH2-EED complex and inhibits PRC2-dependent cancer. *Oncotarget* 2015;6(15):13049–59. DOI: 10.18632/oncotarget.3790
- Tang L., Peng L., Tan C. et al. Role of HOXA9 in solid tumors: mechanistic insights and therapeutic potential. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):349. DOI: 10.1186/s12935-022-02767-9
- Gonçalves C.S., Xavier-Magalhães A., Martins E.P. et al. A novel molecular link between HOXA9 and WNT6 in glioblastoma identifies a subgroup of patients with particular poor prognosis. *Mol Oncol* 2020;14(6):1224–41. DOI: 10.1002/1878-0261.12633
- Hurtado R., Ramirez A., Nabipur L. et al. The key role of the RPS14 gene in neoplasms and solid tumors. *J Assoc Genet Technol* 2023;49(3):121–6.
- Hu S., Cai J., Fang H. et al. RPS14 promotes the development and progression of glioma via p53 signaling pathway. *Exp Cell Res* 2023;423(1):113451. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113451
- Han H.J., Tokino T., Nakamura Y. CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 1998;7(6):1039–46. DOI: 10.1093/hmg/7.6.1039
- Annibaldi D., Whitfield J.R., Favuzzi E. et al. Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nat Commun* 2014;5(1):4632. DOI: 10.1038/ncomms5632
- Fukasawa K., Kadota T., Horie T. et al. CDK8 maintains stemness and tumorigenicity of glioma stem cells by regulating the c-MYC pathway. *Oncogene* 2021;40(15):2803–15. DOI: 10.1038/s41388-021-01745-1
- Ryskalin L., Lazzeri G., Flaiban M. et al. mTOR-dependent cell proliferation in the brain. *Biomed Res Int* 2017;2017:7082696. DOI: 10.1155/2017/7082696
- Mei J., Wang T., Xu R. et al. Clinical and molecular immune characterization of ERBB2 in glioma. *Int Immunopharmacol* 2021;94:107499. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107499
- Qin Z., Liang W., Zhang Z. et al. Activated KRAS reprograms neural progenitor cells to glioma stem cell-like phenotype. *Int J Oncol* 2023;63(1):88. DOI: 10.3892/ijo.2023.5536
- Koyama-Nasu R., Haruta R., Nasu-Nishimura Y. et al. The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 2014;33(17):2236–44. DOI: 10.1038/onc.2013.168

36. Fossdal G., Vik-Mo E.O., Sandberg C. et al. Aqp 9 and brain tumor stem cells. *Sci World J* 2012;2012:1–9. DOI: 10.1100/2012/915176
37. Wang S., Solenov E.I., Yang B. Aquaporin Inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 2023;1398:317–30. DOI: 10.1007/978-981-19-7415-1\_22
38. Yan D., Yu Y., Ni Q. et al. The overexpression and clinical significance of TBX15 in human gliomas. *Sci Rep* 2023;13(1): 9771–83. DOI: 10.1038/s41598-023-36410-y
39. Li M., Wang J-F., Liu B. et al. Homeobox B2 is a potential prognostic biomarker of glioblastoma. *Rev Ass Med Bras* 2020;66:794–9. DOI: 10.1590/1806-9282.66.6.794
40. Liu Z., Wen P., Wang S. et al. HOXB2 Is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in colorectal cancer and glioma. 2023. Available at: [https://assets.researchsquare.com/files/rs-2898626/v1\\_covered\\_17aba4e5-9b9f-43d0-bc4a-2ccf1552aef5.pdf?c=1684474189](https://assets.researchsquare.com/files/rs-2898626/v1_covered_17aba4e5-9b9f-43d0-bc4a-2ccf1552aef5.pdf?c=1684474189)
41. Deng L., Zeng S., Yi Q. et al. High expression of six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 promotes the migration and invasion and predicts unfavorable prognosis in glioma. *Peer J* 2023;11:e15136. DOI: 10.7717/peerj.15136
42. Han M., Hu R., Wang S. et al. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 predicts poor prognosis and promotes glioblastoma growth and invasion. *Neoplasia* 2018;20 (6):543–54. DOI: 10.1016/j.neo.2018.04.002
43. Filippova N., Grimes J.M., Leavenworth J.W. et al. Targeting the TREM1-positive myeloid microenvironment in glioblastoma. *Neurooncol Adv* 2022;4(1):vdac149. DOI: 10.1093/oaajnl/vdac149
44. Ma K., Guo Q., Zhang X. et al. High expression of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 predicts poor prognosis in glioblastoma. *Onco Targets Ther* 2023;16:331–45. DOI: 10.2147/OTT.S407892
45. Siskind S., Brenner M., Wang P. TREM-1 modulation strategies for sepsis. *Front Immunol* 2022;13:907387. DOI: 10.3389/fimmu.2022.907387
46. Zhao X., Wang Y., Li J. et al. RFC2: a prognosis biomarker correlated with the immune signature in diffuse lower-grade gliomas. *Sci Rep* 2022;12 (1):3122–41. DOI: 10.1038/s41598-022-06197-5
47. Ho K.H., Kuo T.C., Lee Y.T. et al. Xanthohumol regulates miR-4749-5p-inhibited RFC2 signaling in enhancing temozolomide cytotoxicity to glioblastoma. *Life Sci* 2020;254:117807. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117807

#### Вклад авторов

В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, биоинформатический анализ полученных данных, написание текста статьи;  
Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов для анализа;  
Т.И. Кушнир: обзор публикаций по теме статьи, статистический анализ данных;  
А.С. Брюховецкий: транскриптомный анализ, научное редактирование.

#### Authors' contributions

V.E. Shevchenko: development of study design, bioinformatics analysis of the data obtained, article writing;  
N.E. Arnotskaya: preparation of samples for analysis;  
T.I. Kushnir: review of publications on the topic of the article, statistical data analysis;  
A.S. Bryukhovetskiy: transcriptomic analysis, scientific editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>  
Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>  
Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>  
А.С. Брюховецкий / A.S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0009-0002-1583-1774>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Финансируется в рамках государственной темы (№ 2021-76).

**Funding.** It is funded under the state budget theme (No. 2021-76).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Протокол исследования одобрен локальными этическими комитетами ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и Клинического госпиталя «НейроВита» (Москва).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** The protocol of the study was approved by the local ethics committee s of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia and of the Clinical Hospital “NeuroVita” (Moscow).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 27.09.2023. **Принята к публикации:** 16.10.2023.

**Article submitted:** 27.09.2023. **Accepted for publication:** 16.10.2023.