

ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА NOTCH1 ДЛЯ ПРОГРЕССИИ КАРЦИНОМ ЛЁГКОГО И ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 М.В. Васильева¹, Н.В. Хромова¹, Б.П. Копнин¹, В.Б. Дугина², П.Б. Копнин^{1*}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: pbkopnin@mail.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.06.2022

После доработки 26.08.2022

Принята к публикации 27.08.2022

Рак лёгкого и колоректальный рак являются одними из самых распространённых типов рака и характеризуются неблагоприятным прогнозом с относительно высокой вероятностью летального исхода. Одну из ключевых ролей в прогрессии данных типов злокачественных новообразований играют мутации генов, кодирующих компоненты основных внутри- и межклеточных сигнальных путей, в частности *NOTCH1*, продуктом которого является одноименный рецептор Notch1 сигнального пути Notch. Сигнальный путь Notch принимает участие в поддержании гомеостаза эпителия кишечника и структурно-функциональных элементов лёгких, поэтому неудивительно, что его конститутивная активность и гиперактивность, возникающая в результате соматических мутаций генов, продукты которых непосредственным образом задействованы в его запуске, может приводить к прогрессии указанных типов рака. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на фенотип, характеристики и Notch-зависимые сигнальные пути клеток карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека. Для подавления экспрессии *NOTCH1* методом РНК-интерференции была выбрана наиболее эффективная последовательность миРНК из нескольких вариантов, отобранных по результатам биоинформатического анализа, и получены соответствующие клеточные сублинии, A549 и HCT116. Исследование основных биологических характеристик данных сублиний *in vitro* показало, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению темпов клеточной пролиферации, способности к колониеобразованию в адгезивных условиях и миграционной активности в камере Бойдена. ПЦР-анализ выявил достоверное снижение экспрессии некоторых целевых генов сигнального пути Notch, потенциально вовлечённых в механизмы формирования и поддержания более инвазивного и злокачественного фенотипа клеток. Эксперименты *in vivo* на иммунодефицитных бестимусных самках мышей линии Balb/c nu/nu подтвердили полученные результаты *in vitro*: подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению темпов роста подкожных ксенографтов, сформированных клетками исследуемых сублиний. Таким образом, ингибирование экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1, потенциально приводит к снижению злокачественных характеристик клеток карцином лёгкого и толстой кишки человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак лёгкого, колоректальный рак, сигнальный путь Notch, опухолевая прогрессия, пролиферация, инвазия, исследования на иммунодефицитных мышах.

DOI: 10.31857/S0320972522100153, **EDN:** BDPANV

ВВЕДЕНИЕ

Рак лёгкого и колоректальный рак являются одними из самых распространённых типов рака и характеризуются неблагоприятным прогнозом с относительно высокой вероятностью летального исхода. По данным Нацио-

нального института онкологии США (<https://www.cancer.gov/>), на рак лёгкого и бронхов приходилось 12,4% всех диагностированных случаев онкологических заболеваний в 2021 г., в то время как 5-летняя относительная выживаемость составляла всего 21,7% (по данным за 2011–2017 гг.). На колоректальный рак прихо-

Принятые сокращения: ЗНО – злокачественные новообразования; миРНК – малая интерферирующая РНК; GSI – ингибиторы γ -секретазы.

* Адресат для корреспонденции.

дилось 7,9% всех случаев, а 5-летняя относительная выживаемость составляла 64,7%.

Мутации генов, кодирующих компоненты основных внутри- и межклеточных сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в прогрессии злокачественных новообразований (ЗНО). По данным портала Национального института онкологии США GDC (National cancer institute Genomic Data Commons Portal, <https://portal.gdc.cancer.gov/>), мутации *NOTCH1* выявлены в половине случаев при раке лёгкого и бронхов и практически в 70% случаев – при колоректальном раке.

Ген *NOTCH1* кодирует один из четырёх одноимённых трансмембранных рецепторов семейства Notch у человека (Notch1–4). При связывании с соответствующим лигандом запускается серия протеолических расщеплений рецептора с высвобождением его внутриклеточного домена NICD1 (Notch intracellular domain), который транслоцируется в ядро и запускает экспрессию ряда целевых генов [1]. Сигнальный путь Notch, в частности, играет одну из ключевых ролей в поддержании гомеостаза эпителия кишечника, а также формировании альвеол, эпителия, стромы и сосудистой сети лёгких. Однако, согласно литературным данным, конститутивная активность и гиперактивность сигнального пути Notch, возникающая в результате соматических мутаций генов, продукты которых непосредственным образом задействованы в его запуске, может приводить к неконтрольной пролиферации, нарушению клеточного цикла и механизмов клеточной гибели, повышению выживаемости, приобретению более злокачественного и/или локомоторного фенотипа, изменению активности Notch-зависимых сигнальных путей, обладающих проонкогенным потенциалом при раке лёгкого и колоректальном раке [2, 3]. Таким образом, подавление экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1, потенциально может способствовать нормализации клеточного фенотипа и снижению темпов опухолевой прогрессии.

Актуальность изучения сигнального пути Notch не вызывает сомнений, при этом на сегодняшний день опубликовано большое количество литературных данных по исследованию последствий его ингибирования. Однако большинство из них посвящено либо ингибированию всех членов семейства сигнального пути Notch, либо ограничивается изучением узкого набора молекулярно-биологических характеристик клеток с подавленной экспрессией гена, кодирующего один из рецепторов семейства Notch, поэтому целью настоящего исследо-

вания является комплексное изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на фенотип и биологические характеристики опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*, а также на экспрессию целевых генов сигнального пути Notch, вовлечённых в ключевые механизмы прогрессии ЗНО, на клеточных моделях карцином лёгкого и толстой кишки человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе были использованы клеточные линии карцином лёгкого A549 (ATCC® CCL-185™) и толстой кишки HCT116 (ATCC® CCL-247™) человека, полученные из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection). Клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM high glucose («Cytiva», США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки HyClone Defined Fetal Bovine Serum («Cytiva», США) и 20 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С.

РНК-интерференция *NOTCH1*. Для получения стабильных клеточных сублиний A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1* специфические шпилечные структуры малых интерферирующих РНК (миРНК), содержащие одну из пяти вариантов 21-нуклеотидных последовательностей (соответствуют позициям мРНК *NOTCH1* версии NM_017617.5), выбранных нами с помощью инструментов базы данных National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), были синтезированы («Евроген», Россия) и клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1-puro («Sigma-Aldrich», США). Вектор pLKO.1-puro shGFP («Sigma-Aldrich») был использован в качестве контроля.

Экспериментальными векторами совместно со вспомогательными плазмидами pDR8.2, pVSV-G («Addgene», США) были трансфицированы клетки-паковщики 293T (ATCC® CRL-3216™) в присутствии GeneJuice transfection reagent («Merck Millipore», Германия). Трёхжды после трансфекции супернатанты, содержащие вирусные частицы, собирали раз в сутки и фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм («Merck Millipore»). Исследуемые клеточные культуры были инфицированы вирусными частицами в присутствии реагента Polybrene (10 мкг/мл, «Merck Millipore»), затем подвергались дальнейшей селекции в среде, содержащей 1 мкг/мл пурамицина («Sigma-Aldrich»), в течение 5–6 дней.

По результатам анализа тотальной РНК и белка данных клеток была оценена эффективность использованных конструкций.

Полимеразная цепная реакция. Тотальная РНК была выделена из инфицированных клеток с помощью реагента Trizol («Invitrogen», США). Количество РНК в пробах было детектировано с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция обратной транскрипции была проведена для синтеза первой цепи кДНК с помощью обратной транскриптазы М-MLV («Promega», США). Стандартная ПЦР-реакция проводилась с помощью ПЦР-амплификатора Bio-Rad Dyad DNA Engine («Bio-Rad», США), после чего полученную реакционную смесь разделяли электрофоретически в 1,5%-ном агарозном геле. Относительную интенсивность флуоресценции полос оценивали с помощью Total Lab ver. 2.0 («Nonlinear Dynamics», США). Образцы нормировали по количеству ПЦР-про-

дукта *TUBA1A*. Интенсивность флуоресценции полос контрольных сублиний на диаграммах принята за единицу. Реакцию ПЦР в реальном времени проводили на ПЦР-амплификаторе Bio-Rad CFX96 Real-Time System («Bio-Rad»), используя реагенты SYBR Green I («Евроген»). С помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager были получены значения *Ct* для целевых и референсного (*TUBA1A*) генов. Относительные уровни экспрессии были вычислены с использованием $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода. Используемые в работе пары праймеров и размеры получаемых продуктов представлены в таблице.

Иммуноблоттинг. Тотальные лизаты готовили из клеточных культур по достижению ими субконфлюентного монослоя с использованием буфера Lysis-M («Roche», США). Количество белка в пробах определялось методом Бредфорда. Лизаты электрофоретически разделялись в 8–12%-ном гради-

Праймеры и размеры получаемых продуктов

Ген	Последовательности праймеров (5'→3')	Размер продукта
<i>NOTCH1</i>	F – CACCCATGACCACTACCCAGTT R – CCTCGGACCAATCAGAGATGTT	250
<i>TUBA1A</i>	F – GTTGGTCTGGAATTCTGTCTCAG R – AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC	288
<i>SNAIL1</i>	F – ACTGCAACAAGGAATACCTCAG R – GCACTGGTACTTCTTGACATCTG	242
<i>HES1</i>	F – ACACGACACCGGATAAACCAA R – GCCGCGAGCTATCTTTCTTCA	150
<i>TWIST1</i>	F – CACGAGCGGCTCAGCTACGC R – CGCTGCCCGTCTGGGAATCAC	313
<i>NANOG</i>	F – AAGGTCCCGGTCAAGAAACAG R – CTTCTGCGTCACACCATTGC	237
<i>POU5F1</i>	F – GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT R – GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
<i>NES</i>	F – GCGGCTGCGGGCTACTGAAA R – ATCCAAGACGCCGGCCCTCT	281
<i>SOX2</i>	F – TGGACAGTTACGCGCACAT R – CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215
<i>C-MYC</i>	F – GGCTCCTGGCAAAAGGTCA R – CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	119
<i>WNT1</i>	F – TCCCCTTTGTCCTGCGTTTT R – TGTTCAATGGCTCCACGACA	231
<i>CDH1</i>	F – GTCTGTAGGAAGGCACAGCC R – TGCAACGTCGTTACGAGTCA	285

Примечание. F – forward, прямой праймер; R – reverse, обратный праймер.

ентном Ds-Na-ПААГ с помощью системы Mini-PROTEAN («Bio-Rad») и переносились на PVDF-мембрану с низкой автофлуоресценцией («Merck Millipore») с помощью системы полусухого переноса белков Power Blotter System («Invitrogen»). Для блокировки мест неспецифического связывания антител использовался SuperBlock («Thermo Fisher Scientific»). Мембраны инкубировали с первичными антителами к Notch1 (C-20, 1 : 500, «Santa Cruz Biotechnology», США), α -тубулину (B-5-1-2, 1 : 500, «Santa Cruz Biotechnology»), затем с соответствующими вторичными — Alexa Fluor 488 (1 : 2000, «Thermo Fisher Scientific»). Визуализацию полос проводили с помощью сканера Typhoon 9410 («GE Healthcare», США). Относительную интенсивность флуоресценции полос оценивали с помощью Total Lab ver. 2.0. Образцы нормировали по количеству α -тубулина. Интенсивность флуоресценции полос контрольных сублиний на диаграммах принята за единицу.

Световая микроскопия. Микрофотографии живых клеточных культур в фазовом контрасте получали с помощью микроскопа Axiovert 200 с использованием лицензированного программного обеспечения AxioVision («Carl Zeiss», Германия).

In vitro тесты. Определение скорости роста клеточных культур. Клетки сублиний НСТ116 и А549 высевали на чашку Петри в количестве $0,5 \times 10^5$. Каждые 48 ч в течение 6 дней проводили подсчёт количества клеток с помощью камеры Горяева.

Определение миграционной активности клеток в камере Бойдена. Анализ проводили в плашке с интегрированными камерами Бойдена с диаметром пор 8 мкм, на фильтр которых высевали $0,5 \times 10^5$ клеток. Спустя сутки инкубации клетки, оставшиеся на верхней поверхности фильтра, удаляли, мигрировавшие клетки фиксировали холодным (-20°C) чистым метанолом, окрашивали связывающимся с ДНК 1 мкМ раствором красителя DAPI (4',6'-диамидино-2-фенилиндола) («Sigma-Aldrich») в фосфатно-солевом буфере (PBS). Миграционную активность определяли подсчётом клеток на нижней поверхности фильтра с помощью микроскопа Axiovert 200.

Анализ способности к колониеобразованию. Для анализа колониеобразования в адгезивных условиях клетки высевали в количестве 500 клеток на 10-см чашку Петри, инкубировали 14 суток, фиксировали 70%-ным этанолом и окрашивали красителем Гимза («ПанЭко»). Количество и размер колоний рассчитывали с помощью программы Total Lab ver. 2.0,

используя модуль Colony Counter («Nonlinear Dynamics»).

Определение скорости роста ксенографтов in vivo. Исследования проводили на иммунодефицитных бестимусных самках мышей линии Balb/c nu/nu возрастом 7–8 недель, весом 15–20 г. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 12–16 особей. Для определения скорости роста ксенографтов животным подкожно вводили суспензию клеток (10^6) в стерильном физиологическом растворе. Линейные параметры ксенографтов (т.е. их «длина» и «ширина») измеряли с помощью штангенциркуля раз в трое суток в течение 2,5–3 недель. На основании полученных данных был рассчитан их объём по следующей формуле: «ширина»² \times «длина» \times 0,5, где «ширина» \leq «длина», и были построены кривые зависимости данных объёмов от количества суток после инъекции клеток. По окончании исследования экспериментальных животных терминировали парами эфира и производили извлечение ксенографтов.

Статистический анализ. Данные на диаграммах и графиках представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по результатам минимум трёх независимых экспериментов. Для оценки статистической значимости результаты были проанализированы с помощью *t*-теста Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение клеточных сублиний с подавленной экспрессией NOTCH1. Методами ПЦР-анализа и иммуноблоттинга нами была подтверждена экспрессия NOTCH1 на уровне мРНК и белка как в исходных клетках линий карцином лёгкого А549 и толстой кишки НСТ116 человека, так и в полученных нами контрольных клеточных сублиниях shGFP. На основании биоинформатического анализа нами были выбраны 5 последовательностей миРНК, потенциально позволяющих подавить экспрессию NOTCH1 методом РНК-интерференции (рис. 1, а). Наибольшую эффективность для обеих клеточных линий А549 и НСТ116, по данным ПЦР-анализа, в том числе в режиме реального времени, продемонстрировала последовательность №1 (5'-GATGCCAAATGCCTGCCAGAA-3', соответствующая позициям 1165–1185 мРНК NOTCH1) (рис. 1, б и в), что подтвердилось на уровне экспрессии белка по результатам иммуноблоттинга (рис. 1, г), поэтому она была выбрана для дальнейших исследований.

По данным световой микроскопии, клетки обеих контрольных сублиний характеризовались прерывистыми и фрагментированными межклеточными контактами, в то время как клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* выглядели более эпителиоидными (рис. 1, д).

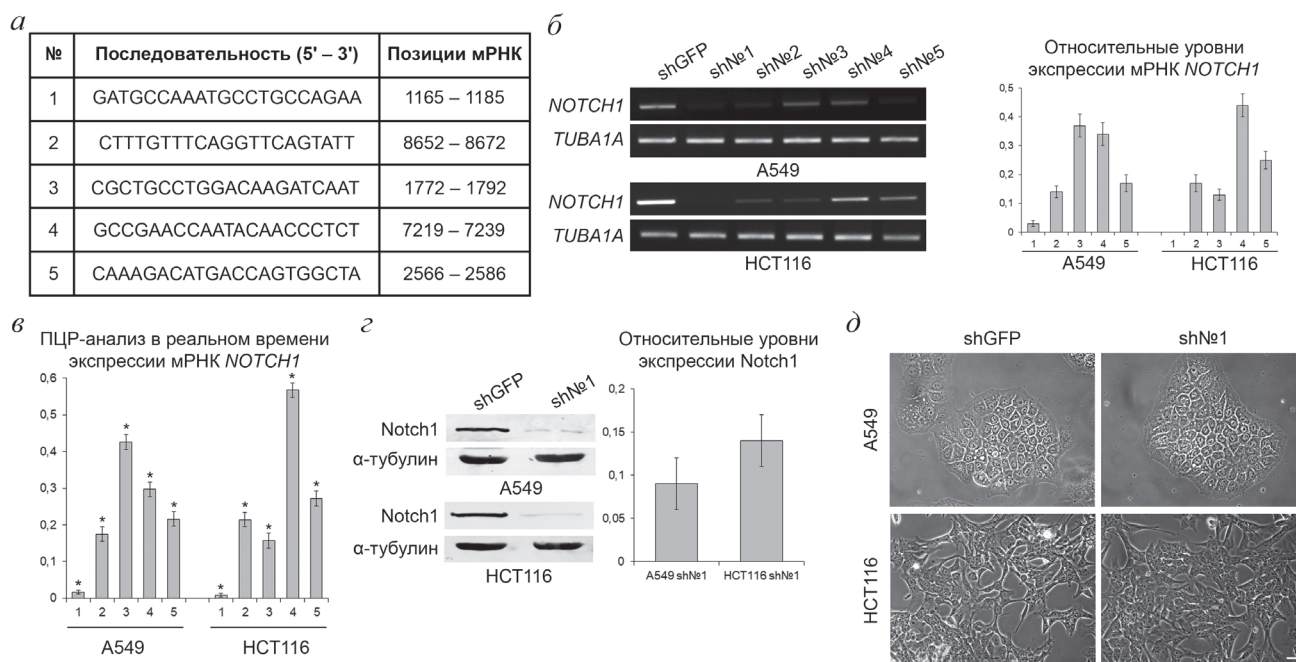


Рис. 1. Создание клеточных сублиний A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1*. *а* – Выбранные нами варианты последовательностей миРНК для РНК-интерференции *NOTCH1*. *б* – ПЦР-анализ экспрессии *NOTCH1* в полученных клеточных сублиниях (слева) и диаграмма относительной интенсивности флуоресценции полос (справа). *в* – ПЦР-анализ в режиме реального времени экспрессии *NOTCH1* в полученных клеточных сублиниях. *г* – Иммуноблоттинг Notch1 в клеточных сублиниях с вариантом миРНК №1 (слева) и диаграмма относительной интенсивности флуоресценции полос (справа). *д* – Микрофотографии клеток сублиний shGFP и sh№1, масштаб – 20 мкм. Экспрессия *NOTCH1* (на уровнях мРНК и белка) на диаграммах нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу; * $p < 0,05$

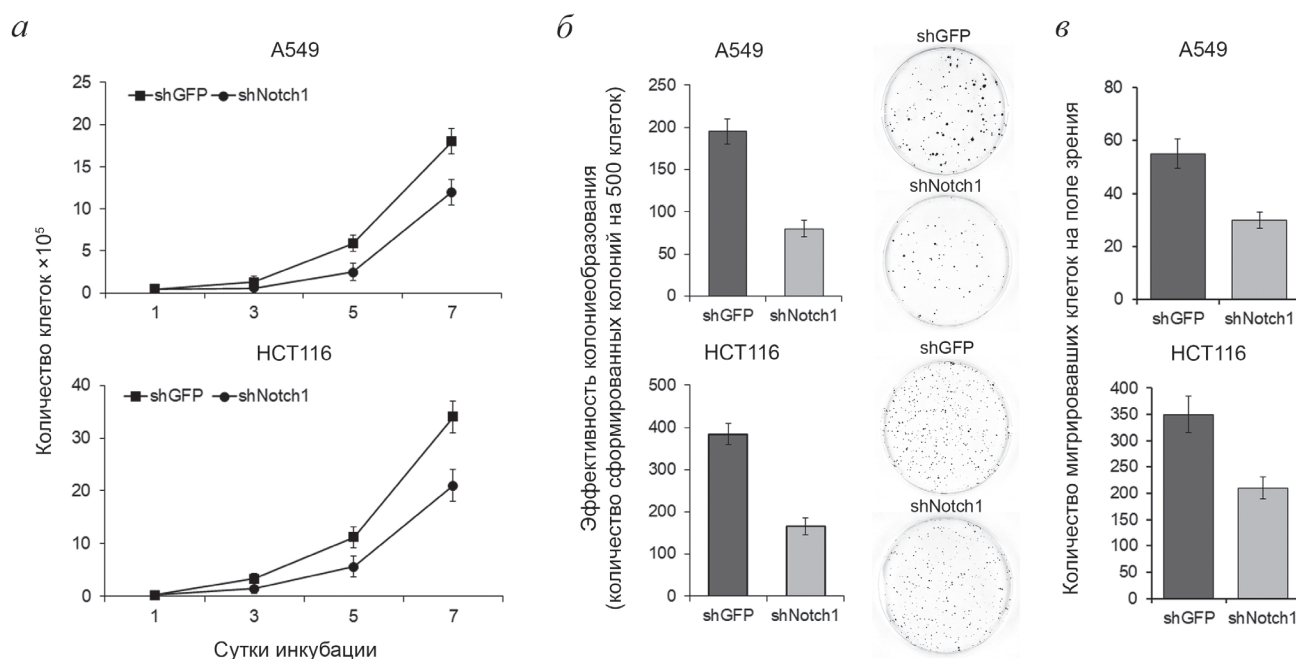


Рис. 2. Анализ основных биологических характеристик полученных клеточных сублиний A549 и HCT116 *in vitro*. Анализ клеточной пролиферации (*а*), анализ колониеобразования в адгезивных условиях (*б*) и миграционная активность клеток в камере Бойдена (*в*)

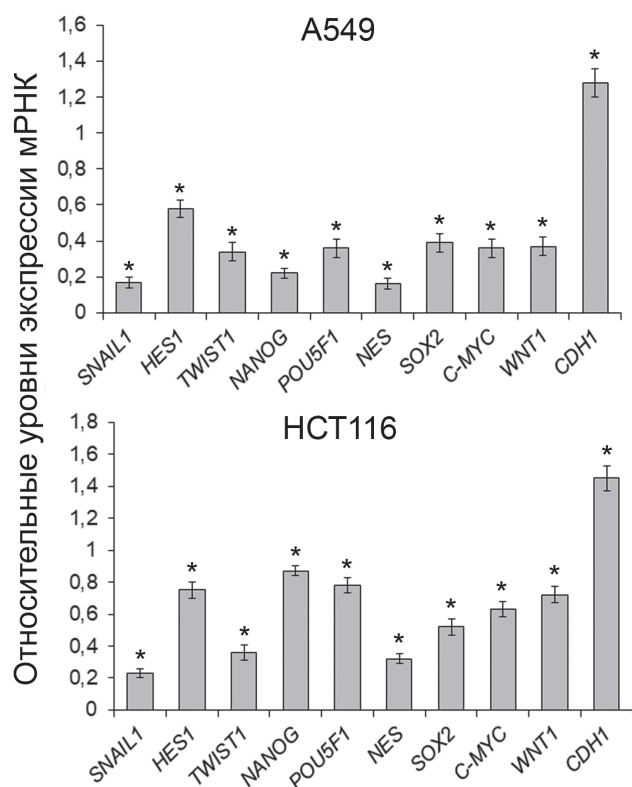


Рис. 3. ПЦР-анализ в режиме реального времени некоторых генов, задействованных в механизмах формирования и поддержания более инвазивного и злокачественного фенотипа клеток A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*; экспрессия каждого гена нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу; * $p < 0,05$

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на клеточный фенотип и морфологию. Следующим этапом нашей работы стал анализ основных биологических характеристик полученных клеточных сублиний A549 и HCT116 *in vitro*. Подавление экспрессии *NOTCH1* оказало непосредственное влияние на скорость пролиферации клеток обеих сублиний, A549 и HCT116, так, на 7-е сутки инкубации темпы пролиферации клеток сублиний sh№1 снизились до 1,6 раз по сравнению с контрольными (рис. 2, а). Эффективность колониеобразования в адгезивных условиях также снижалась в среднем в 2,4 раза при подавлении экспрессии *NOTCH1* (рис. 2, б). Миграционная активность клеток с подавленной экспрессией *NOTCH1* снижалась до 1,8 раз (рис. 2, в).

Полученные данные свидетельствуют о снижении инвазивного и пролиферативного потенциалов клеток карцином лёгкого и толстой кишки при подавлении экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1.

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на Notch-зависимый сигналинг. Мы проанализировали влияние подавления экспрессии *NOTCH1*

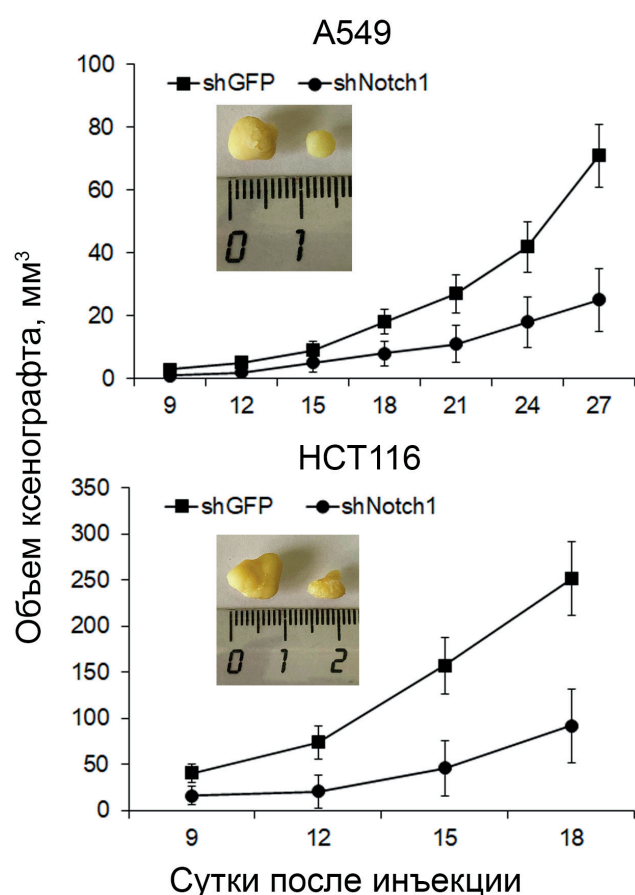


Рис. 4. Динамика роста подкожных ксенографтов, сформированных сублиниями A549 и HCT116, и фотографии извлечённых терминальных опухолей

на экспрессию некоторых генов, задействованных в механизмах формирования и поддержания более инвазивного и злокачественного фенотипа клеток карцином лёгкого и толстой кишки. По данным ПЦР-анализа в режиме реального времени было выявлено, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к статистически значимому снижению экспрессии таких генов, а также к увеличению экспрессии *CDH1* (белковый продукт – E-кадгерин, компонент межклеточных адгезионных контактов) (рис. 3).

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на динамику роста опухолей. Для подтверждения полученных результатов *in vitro* было решено провести эксперименты *in vivo* по оценке влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на динамику роста подкожных ксенографтов, сформированных клетками исследуемых сублиний A549 и HCT116. Клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* действительно демонстрировали сниженные темпы роста ксенографтов (более чем в 2,5 раза на момент окончания эксперимента по сравнению с контрольными) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Характеристики опухолевых клеток, такие как пролиферативный, миграционный и инвазивный потенциал, обуславливают их способность к прогрессии, метастазированию, приобретению резистентности к химио- и радиотерапии, а также рецидивированию. В данной работе нами было продемонстрировано, что подавление экспрессии гена, кодирующего рецептор сигнального пути Notch (Notch1), приводит к снижению вышеперечисленных потенциалов *in vitro* и, как следствие, подавлению опухолевого роста *in vivo*. Экспрессия целевых генов сигнального пути Notch и активность Notch-зависимых сигнальных путей также задействованы в механизмах опухолевой прогрессии, поэтому нами была исследована экспрессия некоторых таких генов, отобранных по результатам анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), связанных с формированием клеточных контактов (*SNAIL1*, *WNT1*, *CDH1*) (<https://www.genome.jp/pathway/hsa04520+6615>), клеточной морфологией (*NES*) (<https://www.genome.jp/entry/K07609>), клеточным ростом и выживаемостью (*TWIST1*, *NANOG*) (<https://www.genome.jp/pathway/hsa05205+7291>), поддержанием плюрипотентности стволовых клеток (*POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*) (<https://www.genome.jp/pathway/hsa04550+5462>), протоонкогенов и регуляторов их экспрессии (*C-MYC*, *HES1*) (<https://www.genome.jp/pathway/map05224+K06054>). Согласно литературным данным, приобретение более эпителиоидного фенотипа опухолевыми клетками, осуществляемое, в частности, за счёт нормализации экспрессии E-кадгерина (*CDH1*), снижает их миграционный и инвазивный потенциалы, в частности, при раке лёгкого [4]. В данной работе мы продемонстрировали, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к достоверному снижению экспрессии вышеперечисленных генов (кроме *CDH1*) и повышению экспрессии E-кадгерина с приобретением более эпителиоидного фенотипа опухолевыми клетками карцином лёгкого и толстой кишки человека.

Важность разработки терапевтических возможностей для ингибирования сигнального пути Notch и его компонентов при лечении ЗНО различных нозологий не оставляет сомнений. На сегодняшний день существует несколько классов ингибиторов сигнального пути Notch, наиболее распространённым и многочисленным из которых является класс ингибиторов γ -секретазы – GSI (gamma-secretase inhibitors). γ -Секретаза осуществляет последний

этап серии протеолитических расщеплений рецепторов семейства Notch для высвобождения внутриклеточного домена NICD. Эффективное блокирование связывания γ -секретазы с частично расщеплёнными рецепторами семейства Notch приводит к невозможности запуска самого сигнального пути в опухолевых клетках [5]. GSI продемонстрировали высокую эффективность подавления опухолевого роста на различных моделях *in vitro* и *in vivo*, например, на трастузумаб-резистентном ErbB-2-позитивном раке молочной железы [6]. Однако, по результатам многочисленных доклинических исследований, применение GSI сильно ограничено из-за повышенной токсичности, выражающейся, в частности, метаплазией бокаловидных клеток кишечного эпителия, угнетением пролиферативного потенциала клеток кишечных крипт и атопическим дерматитом [7–10]. Детектированные «off-side» эффекты применения GSI обусловлены тем, что, кроме рецепторов Notch, γ -секретаза имеет более 90 известных субстратов в клетках человека, поэтому прогнозирование последствий их применения на сегодняшний день представляется невозможным.

Более того, авторы научных публикаций, посвящённых изучению ингибирования сигнального пути Notch на моделях клеточных линий человека, зачастую используют в своих работах именно GSI, однако исследования последних лет свидетельствуют о том, что глобальное ингибирование сигнального пути Notch с учётом многочисленных данных о многообразии ролей его компонентов в прогрессии солидных опухолей представляется не рациональной терапевтической стратегией. В частности, было продемонстрировано, что Notch1 и Notch2 антагонистично влияют на рост, инвазию и метастазирование при раке мочевого пузыря [11–13]. Таким образом, при разработке ингибиторов сигнального пути Notch и его компонентов необходимо учитывать, что они могут проявлять как опухоль-супрессирующие, так и онкогенные свойства в зависимости от типа ткани и микроокружения опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ингибирование экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1, потенциально приводит к снижению злокачественных характеристик клеток карцином лёгкого и толстой кишки человека *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, полученные в результате исследования данные могут иметь практическую ценность при разработке новых подходов в таргетной терапии.

Вклад авторов. М.В. Васильева – анализ литературных данных, получение экспериментальных данных, написание текста статьи; Н.В. Хромова – получение экспериментальных данных; Б.П. Копнин – статистическая обработка данных; В.Б. Дугина – получение экспериментальных данных; П.Б. Копнин – разработка концепции исследования, получение экспериментальных данных, написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00321).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Протокол исследования на животных одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kopan, R., and Ilgan, M. X. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell*, **137**, 216-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
2. Radtke, F., Clevers, H., and Riccio, O. (2006) From gut homeostasis to cancer, *Curr. Mol. Med.*, **6**, 275-289, doi: 10.2174/156652406776894527.
3. Xu, K., Moghal, N., and Egan, S. E. (2012) Notch signaling in lung development and disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **727**, 89-98, doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_7.
4. Salon, C., Lantuejoul, S., Eymin, B., Gazeri, S., Brambilla, C., et al. (2005) The E-cadherin-beta-catenin complex and its implication in lung cancer progression and prognosis, *Future Oncol.*, **1**, 649-660, doi: 10.2217/14796694.1.5.649.
5. Yang, G., Zhou, R., Guo, X., Yan, C., Lei, J., et al. (2021) Structural basis of γ -secretase inhibition and modulation by small molecule drugs, *Cell*, **184**, 521-533, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.049.
6. Pandya, K., Meeke, K., Clementz, A. G., Rogowski, A., Roberts, J., et al. (2011) Targeting both Notch and ErbB-2 signalling pathways is required for prevention of ErbB-2-positive breast tumour recurrence, *Br. J. Cancer*, **105**, 796-806, doi: 10.1038/bjc.2011.321.
7. Van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., et al. (2005) Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells, *Nature*, **435**, 959-963, doi: 10.1038/nature03659.
8. Krop, I., Demuth, T., Guthrie, T., Wen, P. Y., Mason, W. P., et al. (2012) Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the γ -secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 2307-2313, doi: 10.1200/JCO.2011.39.1540.
9. Dumortier, A., Durham, A. D., Piazza, M. D., Vauclair, S., Koch, U., et al. (2010) Atopic dermatitis-like disease and associated lethal myeloproliferative disorder arise from loss of Notch signaling in the murine skin, *PLoS One*, **5**, e9258, doi: 10.1371/journal.pone.0009258.
10. Messersmith, W. A., Shapiro, G. I., Cleary, J. M., Jimeno, A., Dasari, A., et al. (2015) A Phase I, dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral γ -secretase inhibitor PF-03084014, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 60-67, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0607.
11. Greife, A., Jankowiak, S., Steinbring, J., Nikpour, P., Niegisch, G., et al. (2014) Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma, *BMC Cancer*, **14**, 628, doi: 10.1186/1471-2407-14-628.
12. Maraver, A., Fernandez-Marcos, P. J., Cash, T. P., Mendez-Pertuz, M., Duenas, M., et al. (2015) NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression, *J. Clin. Invest.*, **125**, 824-830, doi: 10.1172/JCI78185.
13. Rampias, T., Vgenopoulou, P., Avgeris, M., Polyzos, A., Stravodimos, K., et al. (2014) A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer, *Nat. Med.*, **20**, 1199-1205, doi: 10.1038/nm.3678.

SIGNIFICANCE OF NOTCH1 EXPRESSION IN THE PROGRESSION OF HUMAN LUNG AND COLORECTAL CANCERS

M. V. Vasileva¹, N. V. Khromova¹, B. P. Kopnin¹, V. B. Dugina², and P. B. Kopnin^{1*}

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 115478 Moscow, Russia; e-mail: pbkopnin@mail.ru

² Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

Lung and colorectal cancers are the most common types of cancer characterized by a poor prognosis and a high mortality rate. Mutations in the genes encoding components of the main intra- and extracellular signaling pathways, in particular the *NOTCH1* gene (Notch1, a member of the Notch family of receptors), play one of the key roles in progression of these malignancies. Notch signaling is involved in maintaining homeostasis of the intestinal epithelium and structural and functional lung elements. Therefore, it is not surprising that the constitutive activity and hyperactivity of Notch signaling due to somatic mutations in genes coding for the products directly involved into its activation, could lead to the progression of these cancer types. The aim of our study was to investigate how the *NOTCH1* downregulation via RNA interference (RNAi) affects the phenotype, characteristics, and Notch-dependent signaling of human A549 lung and HCT116 colorectal carcinoma cells. Several small harpin RNAs (shRNAs) were selected using the bioinformatic analysis and tested for their ability to suppress the *NOTCH1* expression. The most efficient one was used to produce the A549 and HCT116 cells with *NOTCH1* knockdown. The obtained cell lines demonstrated decreased proliferation rates, reduced colony-forming capacity under adhesive conditions, and decreased migration activity in a Boyden chamber. The *NOTCH1* knockdown also significantly decreased expression of some Notch signaling target genes potentially involved in the acquisition and maintenance of more invasive and malignant cell phenotype. *In vivo* experiments in immunodeficient athymic female Balb/c nu/nu mice confirmed the results obtained *in vitro*: the *NOTCH1* inhibition decreased the growth rates of the subcutaneous xenografts formed by A549 and HCT116 tumor cells. Therefore, downregulation of the gene encoding the Notch1 receptor potentially reduces malignant characteristics of human lung and colorectal carcinoma cells.

Keywords: lung cancer, colorectal cancer, Notch signaling, tumor progression, proliferation, invasion, nude mice assay