

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Васильева Мария Вадимовна

**ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ NOTCH-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ
НА СВОЙСТВА КЛЕТОК СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ И ПРОГРЕССИЮ
НОВООБРАЗОВАНИЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Копнин Павел Борисович

Москва – 2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. История открытия сигнального пути Notch	11
1.2. Канонический сигнальный путь Notch	12
1.3. Роль сигнального пути Notch в прогрессии опухолевых клеток.....	15
1.4. Роль сигнального пути Notch в прогрессии опухолей, обусловленной микроокружением ...	20
1.4.1. Опухоль-ассоциированные фибробласты.....	21
1.4.2. Иные типы клеточных компонентов	23
1.5. Терапевтические стратегии, связанные с сигнальным путем Notch	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Клеточные линии и культуры	33
2.2. РНК-интерференция.....	33
2.3. Экзогенная экспрессия.....	35
2.4. Полимеразная цепная реакция	35
2.5. Иммуноблоттинг	36
2.6. Микроскопия	36
2.7. <i>In vitro</i> тесты	37
2.8. Цитофлуориметрический анализ.....	38
2.9. Анализ способности мезенхимальных клеток к дифференцировке.....	38
2.10. Антитела.....	38
2.11. Люциферазный анализ.....	39
2.12. Применение ингибитора γ -секретазы – DAPT	40
2.13. Применение TGF- β 1.....	40
2.14. Применение ингибиторов рецепторов TGF- β 1	40
2.15. Иммуноферментный анализ TGF- β 1 в культуральной среде	40
2.16. Эксперименты с участием лабораторных животных.....	40
2.17. Иммуногистохимический анализ	42
2.18. Статистический анализ.....	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
3.1. Значимость экспрессии <i>NOTCH1</i> для прогрессии карцином легкого и толстой кишки человека.....	43
3.1.1. Получение клеточных сублиний с подавленной экспрессией <i>NOTCH1</i>	43
3.1.2. Влияние подавления экспрессии <i>NOTCH1</i> на клеточный фенотип и морфологию	44

3.1.3. Влияние подавления экспрессии <i>NOTCH1</i> на поддержание пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток	48
3.2. Значимость экспрессии <i>NOTCH1</i> для взаимодействия опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения	51
3.2.1. Способность первичных культур мезенхимальных клеток стимулировать опухолевый рост	51
3.2.2. Notch-зависимый механизм α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.....	55
3.2.3. Роль <i>TP53</i> в Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировке МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.....	60
3.2.4. Роль TGF- β 1 в α -SMA-позитивной дифференцировке МСКд	63
3.2.5. Универсальность механизма Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд.....	66
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	68
4.1. Значимость экспрессии <i>NOTCH1</i> для прогрессии карцином легкого и толстой кишки человека.....	68
4.2. Значимость экспрессии <i>NOTCH1</i> для взаимодействия опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ВЫВОДЫ.....	80
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	81
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	84

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Солидные злокачественные опухоли представляют собой органоподобные новообразования, формирующиеся в результате взаимодействия опухолевых клеток со своим непосредственным окружением. Микроокружение опухоли, как и строение большинства паренхиматозных органов, включает в себя клеточные компоненты, внеклеточный матрикс (ВКМ) и микробиом. Все этапы опухолевой прогрессии, включая развитие резистентности к химио- и радиотерапии, инвазию и метастазирование, обуславливаются именно двунаправленным взаимодействием, коэволюцией опухолевых клеток и их микроокружения [1, 2]. Детальное изучение молекулярных механизмов данных процессов имеет решающее значение для разработки новых высокоэффективных терапевтических стратегий.

Взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением осуществляется по юкстакринному и паракринному механизмам посредством различных сигнальных путей, в том числе Notch. Сигнальный путь Notch вовлечён во взаимодействие опухолевых клеток со всеми типами клеточных компонентов микроокружения, что неудивительно, поскольку Notch является плеiotропным сигнальным путём. Его активность необходима как для эмбрионального развития, так и для поддержания гомеостаза и регенерации тканей и органов взрослого организма, а мутации генов, кодирующих его компоненты, приводят к патологиям развития и различным заболеваниям, в том числе онкологическим. Однако, при последних сигнальный путь Notch может проявлять как опухоль-промотирующие, так и опухоль-супрессирующие свойства [3, 4, 5].

Ранее в лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством Копнина П.Б. изучались молекулярные механизмы опухолевой прогрессии, связанные с протоонкогенами RAS (от англ. rat sarcoma virus), факторами VEGF (от англ. vascular endothelial growth factor), сигнальным путём Wnt/ β -катенин и др., что позволило отработать методики определения основных биологических характеристик опухолевых клеток, пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток (ОСК) *in vitro* и *in vivo*. При работе с первичным человеческим материалом была сформирована обширная коллекция культур мезенхимальных клеток, которая дала возможность смоделировать и воссоздать, а впоследствии и изучать механизмы взаимодействия опухолевых клеток с микроокружением.

Цель исследования

Изучение роли рецептора сигнального пути Notch – NOTCH1 в опухолевой прогрессии, обусловленной свойствами самих опухолевых клеток и их взаимодействием с мезенхимальными клетками микроокружения.

Задачи исследования

1. Получить клетки линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*.
2. Исследовать значимость экспрессии *NOTCH1* для прогрессии опухолевых клеток линий A549 и HCT116.
3. Проверить наличие зависимости между долей α -SMA-позитивных клеток в первичных культурах мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности и их способностью стимулировать рост ксенографтов, сформированных клетками линии HCT116.
4. Изучить роль сигнального пути Notch в механизме α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.
5. Выявить ключевые молекулы, вовлечённые в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.
6. Подтвердить универсальность Notch-индуцированного механизма α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток при взаимодействии с несколькими линиями опухолевых клеток различного гистогенетического происхождения.

Научная новизна

Изучение вовлеченности сигнального пути Notch в процессы онкогенеза не теряет своей актуальности. На сегодняшний день проведено множество исследований по оценке побочных эффектов его ингибиторов. Однако, литературные данные указывают на то, что большинство исследователей в своих работах используют глобальное ингибирование Notch, не уделяя должного внимания его компонентам в отдельности, либо проводят ограниченный набор экспериментов по изучению молекулярно-биологических характеристик клеток с подавленной экспрессией гена, кодирующего один из рецепторов семейства Notch. В настоящем исследовании впервые применен широкий спектр методов и подходов для изучения роли

рецептора NOTCH1 сигнального пути Notch в опухолевой прогрессии, включающий оценку влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на характеристики непосредственно опухолевых клеток и на взаимодействие опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения. Данный комплексный и детальный подход к оценке роли NOTCH1 в опухолевой прогрессии позволяет наиболее точно описать молекулярные процессы, происходящие при онкогенезе, а также выявить новые потенциальные мишени для противоопухолевых терапий. В результате проведенной работы была доказана вовлеченность экспрессии *NOTCH1* в формирование более злокачественного фенотипа клеток карцином лёгкого и толстой кишки человека, в том числе в поддержание пула и фенотипа ОСК. Кроме этого, был выявлен ранее неизвестный механизм опухолевой прогрессии, реализуемый посредством взаимовлияния опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, который запускается под действием активности Notch.

Теоретическая и практическая значимость работы

Детальное изучение процессов, обуславливающих опухолевую прогрессию, является основой для разработки высокоэффективных терапевтических стратегий. В настоящем исследовании доказана важность экспрессии гена, кодирующего рецептор NOTCH1 сигнального пути Notch, для прогрессии рака лёгкого и толстой кишки человека, в том числе для поддержания пула ОСК. По данным литературы ингибирование Notch имеет множество нежелательных эффектов, поэтому, учитывая результаты проведенной работы, потенциально более эффективными мишенями для противоопухолевой терапии представляются целевые гены Notch, продукты которых вовлечены в формирование и поддержание пула и фенотипа ОСК. Кроме этого, в результате проведенной работы был выявлен молекулярный механизм взаимовлияния опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, осуществляемый посредством гетеротипического межклеточного взаимодействия через Notch. Опухолевые клетки, характеризующиеся продукцией соответствующего/-их лигандов Notch, способны запускать в NOTCH1-позитивных мезенхимальных стволовых клетках (МСК) сигнальный путь Notch, что приводит к их дифференцировке, позитивной по α -гладкомышечному актину (α -smooth muscle actin – α -SMA). Дифференцированные МСК приобретают способность к стимуляции опухолевого роста за счёт продукции ряда молекул, в том числе трансформирующего фактора роста бета 1 (transforming growth factor beta 1 – TGF- β 1). Таким образом, блокирование α -SMA может быть рассмотрено как инструмент для предотвращения дифференцировки МСК, запущенной опухолевыми клетками. Полученные данные вносят вклад

в формирование базиса для фундаментальных и дальнейших прикладных исследований в области молекулярных механизмов канцерогенеза.

Методология и методы исследования

В работе использовали комплексный подход к изучению роли активности сигнального пути Notch в опухолевой прогрессии, охватывающий широкий спектр методов *in vitro* и *in vivo*.

Для подавления экспрессии *NOTCH1* в клетках карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека применяли метод РНК-интерференции. Фенотип и морфологию клеток полученных сублиний изучали методами *in vitro*: световая микроскопия, оценка скорости пролиферации, способность к колониобразованию в адгезивных условиях, миграционная активность и *in vivo*: динамика роста подкожных ксенографтов, анализ способности к метастазированию. Для оценки влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК анализировали туморогенность, способность к колониобразованию в полужидкой среде, активность АВС-транспортёров и продукцию одного из маркеров ОСК – CD133 методом проточной цитофлуориметрии. С помощью общедоступных баз данных выбирали гены, ассоциированные с механизмами опухолевой прогрессии, и проводили количественный анализ их экспрессии методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для изучения механизма опухолевой прогрессии, обусловленного взаимодействием опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, использовали обширную коллекцию линий опухолевых клеток и первичных культур мезенхимальных клеток человека. В первую очередь изучили корреляцию между долей α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток в культуре и их способностью стимулировать рост подкожных ксенографтов, сформированных клетками HCT116. Для доказательства вовлечённости *NOTCH1* и *P53* в механизм α -SMA-позитивной дифференцировки МСК десны (МСКд) с приобретением ими опухоле-стимулирующей способности применяли методы генной инженерии: РНК-интерференция, экзогенная экспрессия и анализ транскрипционной активности. Все полученные результаты *in vitro* экспериментов (иммуноблоттинг, применение специфического ингибитора γ -секретазы, иммунофлуоресцентная микроскопия или проточная цитофлуориметрия) подтверждали *in vivo*. Для доказательства возможности аутокринной регуляции дифференцировки МСКд через TGF- β 1-зависимый сигнальный путь, в дополнение к ранее перечисленным методам, применяли ПЦР-анализ, иммуноферментный анализ (ИФА) и селективные ингибиторы рецепторов TGF- β 1. Универсальность изученного механизма доказывали на нескольких линиях опухолевых клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Подавление экспрессии *NOTCH1* в клетках линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека приводит к формированию менее злокачественного фенотипа, снижает способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК и экспрессию целевых генов сигнального пути Notch, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии.

2. Выявлена прямая зависимость между долей α -SMA-позитивных клеток в первичных культурах мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности и их способностью стимулировать рост ксенографтов, сформированных клетками линии HCT116.

3. Доказана вовлечённость сигнального пути Notch в механизм α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток десны, характеризующихся продукцией полноразмерного трансмембранного рецептора NOTCH1, с приобретением ими способности к стимуляции опухолевого роста клеток линии HCT116, характеризующихся продукцией лиганда сигнального пути Notch – JAGGED1.

4. Ключевыми молекулами, вовлечёнными в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток с приобретением ими опухолеподобной стимулирующей способности, являются опухолевый супрессор P53 (ко-фактор) и фактор TGF- β 1, действующий по механизму аутокринной регуляции.

5. Продемонстрирована универсальность Notch-индуцированного механизма α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток при взаимодействии с клетками линий рака лёгкого A549, толстой кишки LIM1215, фибросаркомы HT1080 и гепатокарциномы HEPG2 человека, характеризующимися продукцией лиганда(-ов) сигнального пути Notch – JAGGED1 и/или DLL.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (Биологические науки), направлению исследований п. 2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация выполнена с использованием высокотехнологичного оборудования и современных методов изучения молекулярных механизмов канцерогенеза. В исследовании использована обширная коллекция линий опухолевых клеток и культур первичных мезенхимальных клеток человека. Применены отработанные методики для получения биологических характеристик клеток и воссоздания модели опухоли с мезенхимальным микроокружением. Для обработки данных использованы методы статистического анализа. Совокупность подходов к выполнению работы не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов.

Результаты исследования были представлены на 5 конференциях: The EMBO workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour – microenvironment crosstalk» (Томск, Россия, 9 – 12 июля 2015 года), Молекулярная онкология: итоги и перспективы (Москва, Россия, 16 – 18 декабря 2015 года), The 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (Амстердам, Нидерланды, 30 июня – 3 июля 2018 года), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 17 – 19 декабря 2018 года) и конференция организации European Association for Cancer Research «Molecular Analysis for Precision Oncology Virtual Congress» (Онлайн, 9 – 10 октября 2020 года).

Апробация диссертации состоялась 9 апреля 2024 года на совместной научной конференции лаборатории цитогенетики отдела молекулярной биологии опухолей, группы биохимии опухолей и лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

Материалы диссертационного исследования изложены в 14 публикациях, из них 7 научных статей, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в список рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации основных результатов исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения,

выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 42 рисунками и 6 таблицами. Список литературы содержит 287 источников (8 отечественных и 276 зарубежных публикаций, 3 электронных ресурса).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История открытия сигнального пути Notch

Ген *Notch* был впервые описан в 1910-х годах при исследовании мутантов *D. Melanogaster*, которые имели зазубрины (notches) на концах своих крыльев [6, 7]. Наличие мутации только в одной из аллелей *Notch* приводило к формированию данных крыльев, в то время как мутация в обеих аллелях была летальной для дрозофил, что вдохновило учёных выделить [8] и секвенировать [9] *Notch* в 1980-х годах. В результате было обнаружено, что его белковый продукт содержит несколько EGF-подобных повторов (от англ. epidermal growth factor) и должен иметь мембранную локализацию [10]. Исследования *Notch* у *D. Melanogaster* продолжились [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17], что положило начало изучению одноименного сигнального пути. В 1988–89 годах были идентифицированы гомологи *Notch* – *Lin-12* и *Glp-1* у *C. elegans* [18, 19], которые также как и у *D. Melanogaster*, предположительно, играли роль в развитии организма нематоды [19, 20, 21]. В 1990 году гомолог *Notch* – *Xotch* был выявлен у лягушек рода *Xenopus* [22], и кДНК *Notch* млекопитающих была клонирована [23]. С тех пор исследования *Notch* у животных приобрели популярность, было детектировано множество компонентов уже сигнального пути Notch, он был признан одним из самых древних и высококонсервативных путей у *Metazoa* [24, 25, 26, 27, 28, 29]. Его плеiotропия выявлена как в процессах эмбрионального развития и поддержания гомеостаза взрослого организма, так и при различных патологиях.

В 1991 году онкогенная роль *NOTCH* была впервые доказана при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе (Т-ОЛЛ). В 1997 году было выявлено, что развитие синдрома Алажилия связано с мутацией *JAGGED1* (кодирует лиганд сигнального пути Notch) [30, 31]. После этих открытий роль сигнального пути Notch в здоровье и болезнях человека начала активно изучаться не только в рамках фундаментальной науки, но и в прикладных исследованиях. В 2006 году было начато первое клиническое исследование препарата, нацеленного на подавление активности сигнального пути Notch, – ингибитора γ -секретазы для терапии пациентов с диагнозом Т-ОЛЛ [32]. Он был остановлен из-за серьёзных побочных эффектов, однако это положило начало разработке терапевтических стратегий, направленных на подавление активности Notch. Различные антитела, низкомолекулярные селективные ингибиторы и т.д. компонентов сигнального пути Notch были протестированы в доклинических и клинических исследованиях, но на сегодняшний день ни одно из них ещё не одобрено.

1.2. Канонический сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch имеет характерные особенности. В то время как, большинство сигнальных путей обладают рецепторами, сопряжёнными с G-белком, и имеют множественные промежуточные компоненты между мембранными рецепторами и ядерными эффекторами [33, 34], канонический сигнальный путь Notch запускается без промежуточных звеньев, путём непосредственной транслокации части рецептора в ядро после серии протеолитических расщеплений [24, 35, 36]. Кроме этого, запуск данных расщеплений может быть индуцирован только при непосредственном взаимодействии поверхностей двух клеток (в том числе, клетки и внеклеточной везикулы), одна из которых несёт рецептор, а другая – лиганд.

Рецепторы сигнального пути Notch у млекопитающих представлены четырьмя паралогами – *NOTCH1-4*, которые у человека локализованы на 9, 1, 19 и 6 хромосомах, соответственно. После транскрипции предшественники рецепторов транслируются в эндоплазматическом ретикулуме, затем перемещаются в аппарат Гольджи, где гликозилируются в EGF-подобных повторах [37, 38, 39, 40]. Гликозилирование необходимо для обеспечения их стабильности и функционального состояния. Изменение основных ферментов гликозилирования значительно ингибирует активность сигнального пути Notch [41, 42, 43, 44, 45], что делает их предметом исследований и потенциальными мишенями при разработке таргетных терапий.

Гликозилированные предшественники рецепторов Notch подвергаются расщеплению в сайте S1 в аппарате Гольджи перед транспортировкой к клеточной мембране. Сайт S1 располагается в домене гетеродимеризации, в результате расщепления в данном сайте фуриноподобной протеазой рецептор превращается гетеродимер (зрелая форма). Внеклеточная и внутриклеточная части зрелого рецептора связаны последовательностью, содержащей сайт для расщепления S2. Взаимодействие внеклеточной части рецептора с лигандом провоцирует изменение конформации S2, что инициирует расщепление в данном сайте и последующий эндоцитоз части рецептора [46]. Основными ферментами, осуществляющими расщепление в сайте S2, являются дезинтегрин и металлопротеаза 10 (ADAM 10), а также её изоформы ADAM 17 и ADAMTS1 [47, 48, 49]. Продукт расщепления в сайте S2 (большая часть) состоит из трансмембранного и внутриклеточного доменов NEXT (от англ. Notch extracellular truncation) [50]. Далее NEXT подвергается расщеплению в сайте S3 ферментом γ -секретазы с высвобождением внутриклеточного эффекторного домена NICD (от англ. Notch intracellular domain). Комплекс γ -секретазы содержит каталитические субъединицы пресенилин-1 или пресенилин-2 [51, 52], АРН-1, PEN-2 и никастрин [53]. NICD транспортируется в ядро с помощью сигнала ядерной локализации NLS (от англ. nuclear localization signal) и импортинов

альфа-3, 4 и 7 [54], где действует как транскрипционный фактор регуляции транскрипции генов-мишеней, либо деградирует в цитоплазме.

При отсутствии NICD транскрипционный фактор CBF-1/Su(H)/LAG1 (CSL, также известный как recombination signal binding protein-j – RBPj) привлекает ко-репрессоры и деацетилазы гистонов для подавления транскрипции целевых генов Notch. Взаимодействие с NICD меняет конформацию CSL, что вызывает его диссоциацию с репрессорами и привлечение активаторов транскрипции генов-мишеней, одним из наиболее значимых среди которых является Mastermind-like (MAML), именно он узнаёт комплекс NICD/CSL и привлекает другие активаторы [24, 36]. Целевые гены Notch в значительной степени определяются наличием мотива Su(H) (от англ. Suppressor of hairless protein, 5'-GTGRGAR-3') в CSL, который отвечает за связывание с ДНК. Одними из наиболее характерных семейств целевых генов Notch являются HES (от англ. Hairy/Enhancer of Split) и HEY (от англ. Hairy/Enhancer of Split related to YRPW motif) [24].

Несколько более подробно рассмотрим строение рецептора Notch1 млекопитающих, так как в работе применялось создание генно-инженерных конструктов для подавления экспрессии кодирующего его гена методом РНК-интерференции. Внеклеточный домен (N-конец) рецептора содержит 36 EGF-подобных повторов и отрицательный регуляторный регион NRR (от англ. negative regulatory region). 11-й и 12-й EGF-подобные повторы обычно взаимодействуют с лигандами, хотя недавние исследования показали, что гораздо больше мотивов могут участвовать в этом. NRR состоит из трёх богатых цистеином повторов и домена гетеродимеризации. Во внутриклеточной части рецептора расположен CSL-связывающий домен, содержащий 7 анкириновых повторов. NLS расположены по обе стороны от анкириновых повторов. На конце внутриклеточного домена (С-конец) находятся консервативные мотивы, богатые пролином, глутаминовой кислотой, серином, треонином (PEST-домены), которые содержат сигналы деградации и, таким образом, определяют стабильность NICD. Остальные рецепторы Notch млекопитающих имеют аналогичную структуру, отличаясь в основном по количеству EGF-подобных повторов, уровню гликозилирования EGF-подобных повторов и длиной PEST-доменов. Количество рецепторов Notch на клеточной мембране регулируется конститутивным (жидкофазным) эндоцитозом, который сопряжён с работой убиквитинлигаз [37, 55].

Лиганды сигнального пути Notch у человека и мыши представлены тремя белками семейства Delta (DLL1, 3, 4) и двумя белками семейства Serrate (JAGGED1, 2). Их структура схожа с рецепторами Notch. Они также являются трансмембранными белками, а их внеклеточные домены содержат несколько EGF-подобных повторов, которые обеспечивают взаимодействие с соответствующими рецепторами. В отличие от рецепторов, лиганды

располагаются на мембране в виде мономеров. Количество лигандов на мембране также контролируется убиквитинированием и эндоцитозом [24].

Подробная схема сигнального пути Notch представлена на рисунке 1.

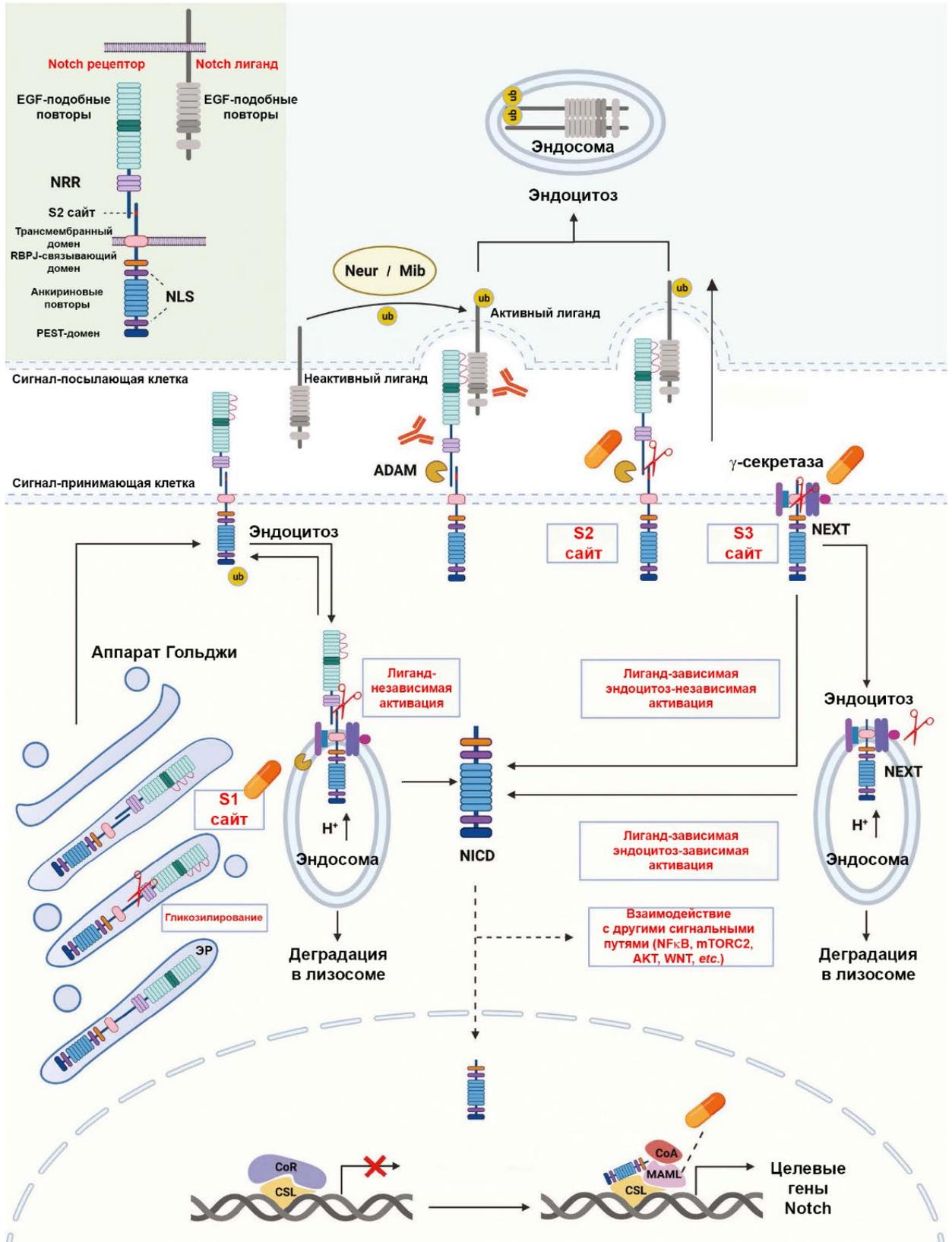


Рисунок 1 – Схема сигнального пути Notch [56]

1.3. Роль сигнального пути Notch в прогрессии опухолевых клеток

Как уже упоминалось ранее сигнальный путь Notch играет значительную роль в развитии и поддержании гомеостаза организмов *Metazoa*. Поскольку Notch является высококонсервативным сигнальным путём, недостаток его активности на стадии эмбрионального развития действительно приводит к гибели, однако эта активность сохраняется на низком уровне и во взрослом организме. Notch принимает участие в самообновлении, поддержании пула и фенотипа стволовых клеток, например нейральных стволовых клеток [57, 58, 59] и мультипотентных мезенхимальных клеток-предшественников остеобластов [60, 61]. Notch задействован в индукции дифференцировки и определении клеточной судьбы, например, клеток-предшественников сердца в клетки эндокарда и гепатобластов в клетки желчных протоков [62, 63]. Notch также необходим для регенерации тканей после повреждения или стресса, например, в процессе ангиогенеза при заживлении ран [64, 65, 66, 67] и восстановлении печени [68]. Роль Notch в формировании различных органов и тканей достаточно подробно изучена, например в сомитогенезе, кардиомиогенезе, формировании скелета, гемопоэтической системы, сосудистой сети, печени, желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), нервной системы и пр. Таким образом, неудивительно, что нарушения его активности приводят к патологиям развития и заболеваниям, затрагивающим большинство различных органов и систем органов, что служит ещё одним подтверждением важности сигнального пути Notch для функционирования нашего организма на всех его жизненных этапах.

Сигнальный путь Notch в механизмах канцерогенеза изучается с открытия его онкогенной роли при Т-ОЛЛ. Впоследствии были обнаружены мутации рецепторов *NOTCH*, приводящие к гиперактивности Notch, при различных типах онкологических заболеваний, в том числе солидных злокачественных опухолях молочной железы, лёгкого, мочевого пузыря, яичников, печени, кишечника и т.д. [3]. Согласно множеству литературных данных, гиперактивность сигнального пути Notch играет значительную роль на всех стадиях опухолевой прогрессии: регуляция клеточного цикла и пролиферация, поддержание пула и фенотипа ОСК, контроль экспрессии протоонкогенов, неоангиогенез, развитие лекарственной устойчивости, индукция эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и мезенхимально-эпителиального перехода, инвазия и метастазирование, и др.

По данным портала Национального института онкологии США за 2023 год, мутации *NOTCH1* выявлены в образцах опухолевых тканей многих злокачественных новообразований (ЗНО) различной этиологии. ЗНО, при которых детектирована наибольшая частота встречаемости мутаций *NOTCH1*, представлены на рисунке 2 [69].

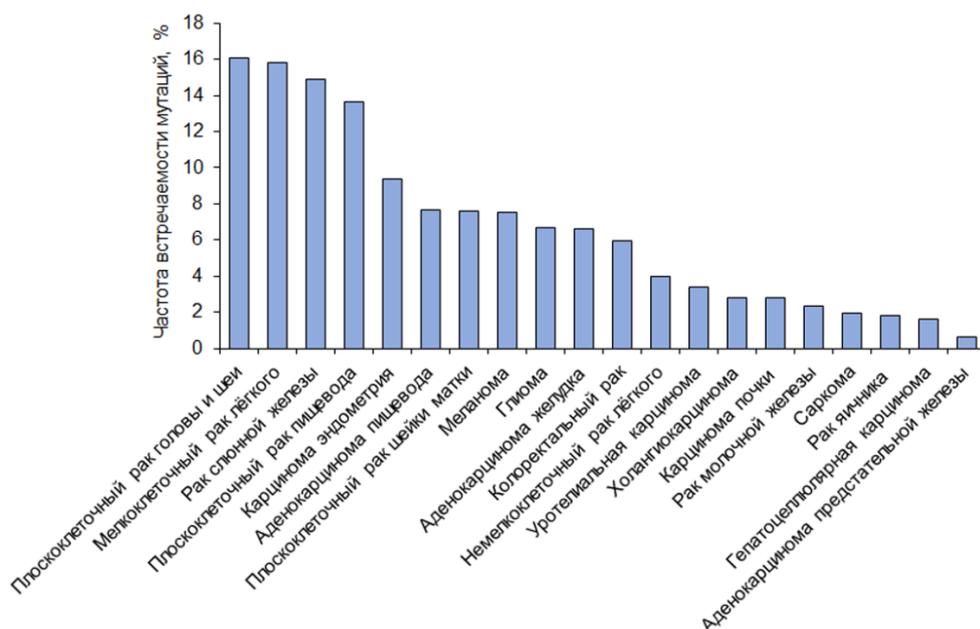


Рисунок 2 – Диаграмма распределения наибольшей частоты встречаемости мутаций *NOTCH1* при ЗНО различной этиологии

Открытие вклада сигнального пути Notch в прогрессию карцином было впервые сделано при анализе образцов опухолей молочной железы [70]. Было выявлено, что гиперэкспрессия генов, кодирующих рецептор *NOTCH1* и лиганд *JAGGED1*, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при раке молочной железы [71].

Принимая во внимание то, что данная работа выполнена на клеточных моделях рака лёгкого и толстой кишки человека, стоит рассмотреть роль сигнального пути Notch в прогрессии этих ЗНО подробнее. Рак лёгкого и бронхов был выявлен в 12,2% диагностированных случаев онкологических заболеваний в 2023 г., а 5-летняя относительная выживаемость составила 25,4% в 2013–2019 гг., согласно данным Национального института онкологии США. Колоректальный рак был выявлен в 7,8% случаев, а 5-летняя относительная выживаемость составила 65,0%. Таким образом, рак лёгкого и колоректальный рак представляют собой одни из самых распространенных типов рака с неблагоприятным прогнозом и относительно высокой вероятностью летального исхода. При раке лёгкого и бронхов активирующие (соматические, увеличение числа копий) мутации гена *NOTCH1* обнаружены в 16,4% случаев, а при колоректальном раке – в 24,3% [69].

Соматические мутации генов *NOTCH1* и *NOTCH3*, приводящие к их гиперэкспрессии, выявлены у пациентов с диагнозом аденокарцинома лёгкого [72, 73]. Данные мутации учёные связывают с потерей экспрессии *NUMB*, белковый продукт которого задействован в определении клеточной судьбы [74]. Исследования *in vitro* и *in vivo* подтвердили, что гиперэкспрессия *Notch1*, 3 способствует прогрессии аденокарциномы лёгкого [75, 76, 77].

Учитывая, что Notch вовлечён в поддержание пула и фенотипа стволовых клеток при эмбриональном развитии и во взрослом организме, он также принимает участие в поддержании пула и фенотипа ОСК и опухоль-иницирующих клеток. NOTCH3 при KRAS-ассоциированной аденокарциноме лёгкого является ключевым активатором комплекса PKC ϵ -ELF3-NOTCH3, который задействован в асимметричном делении опухоль-иницирующих клеток, что обеспечивает их самообновление, клональную экспансию и опухолевую прогрессию [78]. На мышинной модели показано, что гиперэкспрессия *Notch1* (с высвобождением NICD1) и *Myc* способна вызвать образование аденокарциномы лёгкого и благоприятствует опухолевой прогрессии, в том числе метастазированию [77]. Кроме этого, гиперэкспрессия *NOTCH1* при аденокарциноме лёгкого активирует протоонкоген *KRAS*, который может подавлять p53-зависимый апоптоз опухолевых клеток [75]. Следовательно, сигнальный путь Notch играет онкогенную роль при данном типе ЗНО. Однако, например, при плоскоклеточном раке лёгкого, активирующие мутации *NOTCH1* могут проявлять опухоль-супрессивные свойства [79]. Однако, в большинстве исследований роли сигнального пути Notch при раке лёгкого, проводимых с использованием биологического материала пациентов, используют образцы немелкоклеточного рака лёгкого не детектированной этиологии, поэтому роль Notch в прогрессии данного ЗНО требует дальнейшего изучения.

Роль сигнального пути Notch при колоректальном раке достаточно хорошо изучена. В физиологии нормального ЖКТ активность Notch необходима, так как она задействована в поддержании гомеостаза эпителия кишечника, в частности, в регулировании дифференцировки бокаловидных и стволовых клеток кишечных крипт толстой кишки [80]. При колоректальном раке часто обнаруживается значительное превышение продукции всех лигандов Notch и aberrантная активация рецептора NOTCH1 [81, 82]. Гиперактивность Notch при колоректальном раке ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [83]. Она способствует инвазии, например, через активацию белкового комплекса NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF (индуцирует активацию тирозинкиназ ABL и фосфорилирование RHOGEF) [84] и метастазированию посредством регуляции транскрипции ЭМП-ассоциированных генов, таких как *SLUG* и *SNAIL* [83]. Таким образом, гиперактивность сигнального пути Notch, также как и при аденокарциноме лёгкого, играет онкогенную роль в прогрессии колоректального рака.

Повышенная активность сигнального пути Notch при большинстве типов ЗНО может проявлять как опухоль-промотирующие, так опухоль-супрессирующие свойства. Примеры ролей сигнального пути Notch в прогрессии некоторых типов онкологических заболеваний представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Примеры ролей сигнального пути Notch в онкогенезе

№ п/п	Онкологическое заболевание	Вовлеченные компоненты сигнального пути Notch	Роль в онкологическом заболевании	Ссылки
1	2	3	4	5
Онкогенная роль				
1	Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз	NOTCH1, NOTCH3	Более 50% пациентов имеют соматические активирующие мутации <i>NOTCH1</i> . Трансплантированные гемопоэтические клетки-предшественники с конститутивно активным мутантным <i>Notch1</i> могут приводить к развитию Т-ОЛЛ у мышей.	[85, 86]
2	Лимфома маргинальной зоны селезёнки	NOTCH1, NOTCH2	Активирующие мутации <i>NOTCH1-2</i> выявлены в более чем половине случаев и ассоциированы с низкой выживаемостью.	[87]
3	В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз	NOTCH1-2, JAGGED1-2	Обнаружена конститутивная экспрессия <i>NOTCH1-2</i> и <i>JAGGED1-2</i> .	[88]
4	Аденокарцинома лёгкого	NOTCH1, NOTCH3	<i>NOTCH1</i> и <i>3</i> часто гиперэкспрессированы, что коррелирует с инвазией, метастазированием и неблагоприятным прогнозом. На моделях <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> было подтверждено, что гиперэкспрессия <i>Notch1</i> и <i>3</i> может способствовать инициации и прогрессии ЗНО.	[72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79]
5	Рак молочной железы	NOTCH1, NOTCH4, JAGGED1	Гиперэкспрессия <i>NOTCH1</i> и <i>JAGGED1</i> связана с неблагоприятным прогнозом. Мутации <i>Notch1</i> и <i>4</i> , ассоциированные с вирусом опухоли молочной железы мыши, могут инициировать развитие карциномы молочной железы у мышей.	[71, 89]
6	Колоректальный рак	NOTCH1	Часто обнаруживается повышенная продукция всех лигандов Notch и aberrантная активация NOTCH1. Гиперэкспрессия <i>Notch1</i> стимулирует пролиферацию гепатоцитов рака толстой кишки и способствует инвазии и метастазированию.	[80, 81, 82, 83, 84]
7	Рак яичника	NOTCH1, NOTCH3	Гиперэкспрессия <i>Notch1</i> и <i>3</i> ассоциирована с повышенной пролиферацией и уходом от апоптоза опухолевых клеток.	[90, 91]

№ п/п	Онкологическое заболевание	Вовлеченные компоненты сигнального пути Notch	Роль в онкологическом заболевании	Ссылки
1	2	3	4	5
8	Аденоидно-кистозная карцинома	NOTCH1, NOTCH2	Часто обнаруживаются активирующие мутации <i>NOTCH1</i> и 2. Ингибирование NOTCH1 показало эффективность на моделях ксенотрансплантатов и при терапии пациентов.	[92, 93]
9	Светлоклеточный почечно-клеточный рак	NOTCH1	Гиперэкспрессия лигандов и рецепторов Notch детектируется в образцах опухолевых тканей. Конститутивная активность NOTCH1 может приводить к повышенной пролиферации эпителиальных клеток канальцев.	[94]
10	Гепатоцеллюлярная карцинома	NOTCH1	Приблизительно в 30% образцов опухолевой ткани активирован сигнальный путь Notch. Гиперактивность Notch может инициировать образование опухолей печени у мышей. Гиперактивность Notch способствует индукции ЭМП, инвазии и метастазированию.	[95, 96, 97]
11	Глиома	NOTCH1, NOTCH2	Подавление активности сигнального пути Notch ингибиторами γ -секретазы снижает темпы роста опухоли <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> . Однако, инактивация <i>RBPj</i> , подавление <i>Notch1</i> или 2 ускоряет рост опухолей на мышинных моделях.	[98, 99, 100]
Опухоль-супрессирующая роль				
12	Плоскоклеточный рак	NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3	Инактивирующие мутации <i>NOTCH1-3</i> обнаружены в образцах опухолевой ткани. Однако, активирующие мутации <i>NOTCH1</i> и 3, вызванные мутагенами, могут провоцировать опухолевый рост DN MAML1 (Dominant-Negative Mastermind Like1), ингибитор канонического Notch, может способствовать формированию опухоли <i>de novo</i> .	[101, 102, 103]

№ п/п	Онкологическое заболевание	Вовлеченные компоненты сигнального пути Notch	Роль в онкологическом заболевании	Ссылки
1	2	3	4	5
13	Нейроэндокринные опухоли	NOTCH1, DLL3	Почти в 25% случаев мелкоклеточного рака лёгкого наблюдается инактивация целевых генов Notch. Повышенная продукция DLL3 подавляет активность Notch при мелкоклеточном раке лёгкого и карциноидных опухолях лёгкого. Для гастроэнтеропанкреатических и нейроэндокринных опухолей лёгкого характерна пониженная экспрессия генов, кодирующих компоненты Notch, и их инактивирующие мутации. Гиперэкспрессия <i>NOTCH1</i> может ингибировать рост нейроэндокринных опухолевых клеток щитовидной железы <i>in vitro</i> .	[104, 105, 106]
14	Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы	NOTCH1	Гиперэкспрессия <i>Notch1</i> способна ингибировать неоплазию интраэпителиальных клеток поджелудочной железы. Потеря экспрессии <i>Notch1</i> необходима для опухолевой прогрессии в Kras-индуцированной модели.	[107, 108]

1.4. Роль сигнального пути Notch в прогрессии опухолей, обусловленной микроокружением

Как упоминалось ранее, солидная злокачественная опухоль представляет собой органоподобное новообразование, формирующееся в результате взаимодействия опухолевых клеток со своим непосредственным окружением. Микроокружение опухоли, как и строение большинства нормальных паренхиматозных органов, включает в себя клеточные компоненты и ВКМ. Основными типами клеточных компонентов микроокружения солидных злокачественных опухолей являются мезенхимальные (в частности, опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ)), иммунные, эндотелиальные клетки и перициты [109] (Рисунок 3). Микроокружение солидных злокачественных опухолей играет значительную роль как при инициации её развития, так и на всех стадиях прогрессии. Сигнальный путь Notch в норме

активно вовлечён во взаимодействие эпителиальных клеток со всеми типами клеточных компонентов стромы паренхиматозного органа, поэтому в опухоли он также играет значительную роль во взаимодействии опухолевых клеток со всеми клеточными компонентами микроокружения [110].

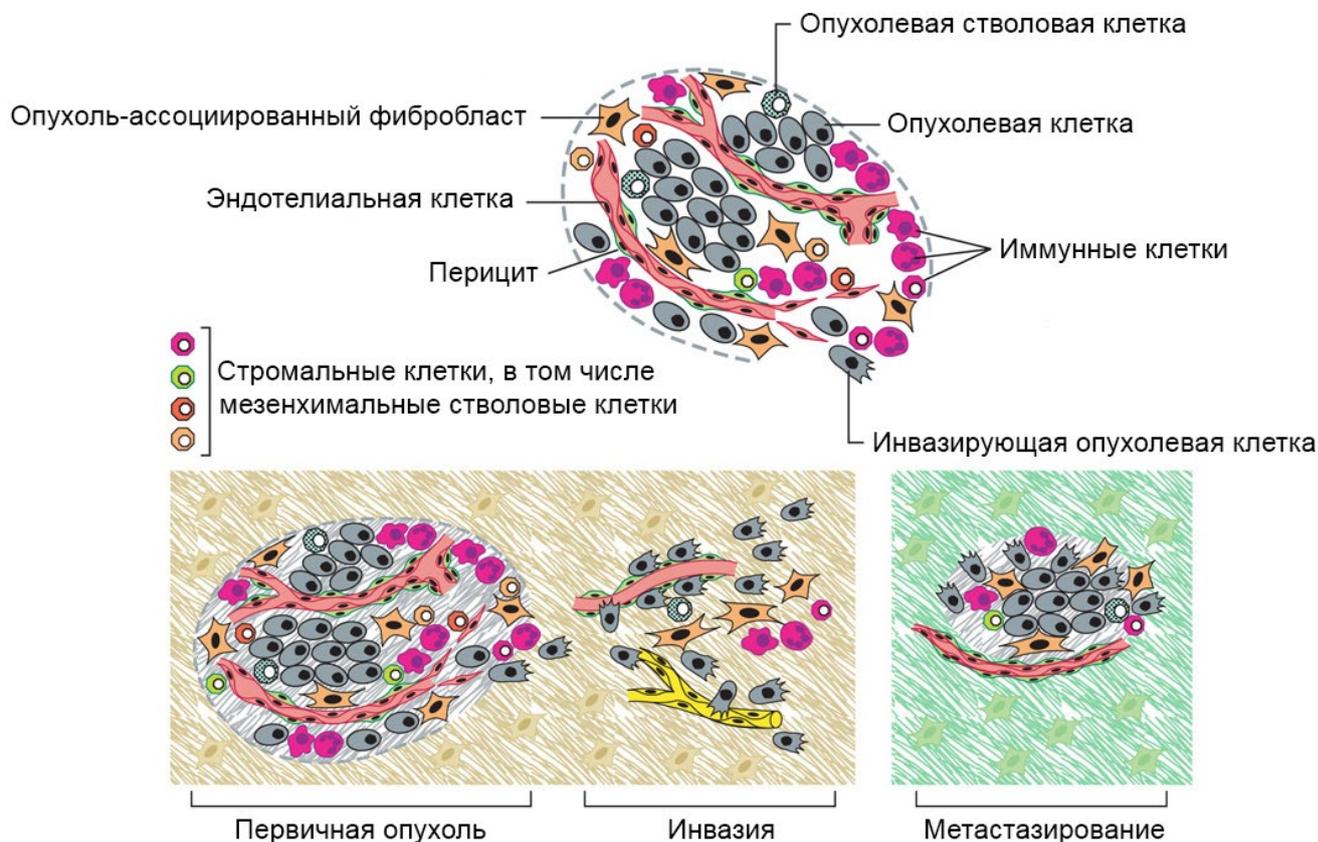


Рисунок 3 – Строение солидной злокачественной опухоли [111]

1.4.1. Опухоль-ассоциированные фибробласты

Исходя из цели исследования, в первую очередь следует уделить внимание одному из важнейших клеточных компонентов микроокружения опухоли – клеткам мезенхимального происхождения, часто упоминаемым в литературе, посвящённой молекулярной онкологии, как ОАФ.

Фибробласты были впервые идентифицированы как клетки, располагающиеся в соединительной ткани и синтезирующие коллагены, в частности, I типа [112]. Впоследствии фибробласты стали классифицироваться как интерстициальные клетки мезенхимального происхождения, которые не являются ни эпителиальными, ни эндотелиальными, ни иммунными клетками [113]. Тем не менее, их точное происхождение и функции остаются неоднозначными и сложными для определения из-за значительной фенотипической и

функциональной гетерогенности популяций этих клеток [114, 115]. Фибробласты участвуют практически во всех жизненно важных процессах, происходящих в организме, включая поддержание структуры большинства тканей, органов и заживление ран. «Покоящиеся» фибробласты активируются в ответ на повреждение ткани, гипоксию или вследствие неоплазии. Такая «активация» сопровождается снижением пролиферативной активности, экспрессией определённых маркеров, наиболее известным из которых является α -SMA, а также изменением состава синтезируемых ими компонентов ВКМ и, как следствие, его перестройкой [116, 117].

На протяжении многих лет для идентификации ОАФ, помимо α -SMA, часто использовались несколько маркеров мезенхимальных клеток: фибробласт-специфический белок 1 – FSP1 (от англ. fibroblast-specific protein 1), белок активации фибробластов FAP (от англ. fibroblast activation protein), рецепторы тромбоцитарного фактора роста PDGFR (от англ. platelet-derived growth factor receptor) α и β , десмин, рецепторная тирозинкиназа DDR2 и виментин. Последние исследования, благодаря технологии секвенирования одиночных клеток, позволили углубиться в изучение гетерогенности популяций ОАФ и идентифицировать ряд маркеров, потенциально ассоциированных с популяциями ОАФ определённого происхождения. Данный анализ включает в себя первоначальный отбор ОАФ из первичных гетерогенных культур с помощью проточной цитофлуориметрии на основании исключения эпителиальных, иммунных и эндотелиальных маркеров и/или наличия определённых маркеров, таких как CD29, FAP, PDGFR α или CD90 (Thy-1). Затем проводится сравнение транскриптома ОАФ с транскриптомами эпителиальных и других стромальных клеток известного гистогенетического происхождения. Несмотря на множество идентифицированных популяций ОАФ, большинство литературных данных указывают на ключевую роль в прогрессии многих типов ЗНО именно α -SMA-позитивных ОАФ. Однако, другие популяции ОАФ, экспрессирующие такие молекулы как FAP, декорин и подоплатин, также могут вносить в неё значительный вклад [118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125].

В солидных опухолях ОАФ располагаются как в микроокружении, так и проникают в саму опухоль. Многие литературные данные указывают на то, что основными источниками ОАФ являются «покоящиеся» в тканях фибробласты и звездчатые клетки поджелудочной железы или печени [126, 127, 128], но ими также могут быть мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга [129, 130], эндотелиальные клетки [131] и адипоциты [132]. В рамках одного опухолевого очага всегда присутствуют несколько популяций ОАФ, точное происхождение которых невозможно идентифицировать из-за фенотипической и функциональной пластичности этих клеток и отсутствия чётко определённых маркеров той или иной популяции. Фенотип ОАФ имеет много общих черт, таких как профили секреции и синтез

компонентов ВКМ, с фенотипом фибробластов, обнаруженных в нормальных тканях или в условиях заживления ран. Согласно последним исследованиям, они всё-таки имеют значительные различия в эпигеномах и транскриптомах [115]. Точная роль ОАФ в опухолевой прогрессии остаётся на сегодняшний день неоднозначной. Данные одних исследований указывают на то, что роль «активации» фибробластов в начале развития опухоли состоит в запуске клеточного или тканевого ответа на неоплазию. Такая «защитная реакция» ОАФ может носить характер физического барьера, реализуемого посредством перестройки ВКМ, и приводить к инкапсуляции опухоли в результате десмопластической реакции. Результаты других исследований показывают, что в начале развития опухоли «активация» механизмов заживления ран у фибробластов начинает контролироваться опухолевыми клетками и служит уже для дальнейшей опухолевой прогрессии [133]. Таким образом, фибробласты, скорее всего, могут обладать как опухоль-стимулирующими, так и опухоль-супрессирующими свойствами, которые зависят от их микроокружения и/или факторов, на них воздействующих. Учитывая высокую гетерогенность данных клеток, не исключено, что их популяции в одном опухолевом очаге могут обладать противоположными функциями.

1.4.2. Иные типы клеточных компонентов

Сосудистая сеть солидной злокачественной опухоли имеет атипичное строение и аномальные морфологические и функциональные особенности. Опухолевые клетки активно стимулируют ангиогенез, индуцируя прораствание существующих сосудов внутрь опухоли, что необходимо для снабжения их питательными веществами при быстро растущей плотности. Сигнальный путь Notch играет одну из ключевых ролей в данном процессе, так как его активность в норме необходима для контроля баланса между «tip» (концевыми) и «stalk» (стеблевыми) эндотелиальными клетками при ангиогенезе. Баланс продукции лигандов JAGGED1 и DLL4 эндотелиальными клетками определяет их дифференцировку в один из двух данных фенотипов. Сдвиг баланса в сторону превалирования DLL4 под воздействием проангиогенных факторов, например, факторов VEGF, приводит к формированию «tip»-клеток, что, в свою очередь, запускает в соседней эндотелиальной клетке NOTCH1-зависимое ингибирование рецептора VEGFR2/3, сдвиг баланса в сторону продукции JAGGED1 и формирование клеточного фенотипа «stalk» [66]. Данный механизм обеспечивает корректность формирования сосудистой сети. Экспрессия JAGGED1 в эндотелиальных клетках также необходима для индукции дифференцировки клеток-предшественников в перициты [134]. Учитывая противоположность ролей DLL4 и JAGGED1 в ангиогенезе, баланс их экспрессии в эндотелиальных клетках крайне важен для развития сосудистой сети опухоли [135]. Например,

при блокировании DLL4 антителами развиваются мелкие кровеносные сосуды, их плотность увеличивается, но такие сосуды не могут полноценно выполнять свои функции, вследствие чего общая перфузия опухоли снижается, и её рост замедляется [136, 137].

Сигнальный путь Notch вовлечён не только в формирование сосудистой сети опухоли, но и играет роль в её прогрессии посредством молекулярных механизмов гетеротипических взаимодействий опухоли со стромальным микроокружением. В частности, выход метастазирующих опухолевых клеток в просвет сосуда сопряжён с поддержанием «tip»-фенотипа [138]. На мышинной модели было показано, что совместное введение эндотелиальных и опухолевых, экспрессирующих JAGGED1, клеток приводит к увеличению васкуляризации опухоли, плотности сосудистой сети и повышенным темпам опухолевого роста [139]. Гиперэкспрессия JAGGED1 опухолевыми клетками стимулирует ангиогенез, васкуляризацию опухоли и, следовательно, её рост при раке предстательной железы [140]. Недавние исследования выявили, что экспрессируемые клетками эндотелия лиганды Notch могут активировать сам сигнальный путь Notch в контактирующих с ними опухолевых клетках. На модели ксенотрансплантата рака яичника было показано, что DLL4, экспрессируемый эндотелиальными клетками, активирует запуск сигнального пути Notch в опухолевых клетках, а подавление DLL4 в эндотелиальных клетках оказывает противоопухолевый эффект [141]. При глиобластоме было выявлено статистически значимое повышение активности Notch в опухолевых клетках, находящихся в непосредственной близости к эндотелиальным [98]. Эндотелиальные клетки также способствуют формированию и поддержанию пула и фенотипа ОСК через растворимую форму JAGGED1 при колоректальном раке [142]. Взаимодействия между опухолевыми и эндотелиальными клетками посредством Notch выявлены при различных типах ЗНО и характеризуются вовлечённостью других лигандов и рецепторов Notch. Например, DLL4, продуцируемый эндотелиальными клетками, активирует Notch через рецептор NOTCH3, что приводит к «активации» клеток Т-ОЛЛ и переходу заболевания в острую фазу [143]. При раке толстой кишки активация Notch в опухолевых клетках посредством взаимодействия с эндотелиальными клетками кровеносных сосудов приводит к трансэндотелиальной миграции и, следовательно, метастазированию [144]. Однако, при гепатокарциноме (ГЦК) эндотелиальный NOTCH1 подавляет экспрессию молекулы межклеточной адгезии-1, что снижает метастазирование [145]. Таким образом, роль сигнального пути Notch во взаимодействии эндотелиальных и опухолевых клеток не является однозначной. Накапливающиеся данные последних исследований только формируют базис для анализа этих гетеротипических взаимодействий.

В микроокружении опухоли всегда присутствует инфильтрат, состоящий из различных типов иммунных клеток. В настоящее время множеством исследований показано, что он играет

значительную роль в опухолевой прогрессии. Иммунные клетки микроокружения можно разделить на две группы: воспалительные (опухоль-супрессирующие) и иммуносупрессирующие (опухоль-стимулирующие) [146]. Роль сигнального пути Notch в иммунитете только с недавнего времени начала активно изучаться. Однако, на сегодняшний день уже доподлинно известно, что он активно вовлечён в дифференцировку и формирование фенотипа обеих упомянутых групп иммунных клеток.

Детекция присутствия CD8⁺ цитотоксических Т-клеток в инфильтрате имеет большую прогностическую ценность при различных типах солидных опухолей, например при колоректальном раке, раке молочной железы, головы и шеи и меланоме [147]. Такой инфильтрат ассоциирован с продукцией Т-клетками интерферонов типа I, что свидетельствует об активации врождённого иммунитета. Однако, противоопухолевый эффект такого инфильтрата подавляется привлечением опухолевыми клетками регуляторных Т-клеток и клеток-супрессоров миелоидного происхождения, что формирует иммуносупрессивную среду в микроокружении опухоли [148]. Для дифференцировки наивных CD8⁺ Т-клеток в эффекторные Т-клетки необходимо взаимодействие DLL1 с NOTCH1 или 2, которое запускает экспрессию транскрипционного фактора эомезодермина и эффекторных молекул гранзима В, интерферона- γ и перфорина [149, 150, 151]. Таким образом, сигнальный путь Notch вовлечён в инициацию противоопухолевого ответа. Однако, как противоопухолевая активность CD8⁺ Т-клеток, осуществляемая посредством лигандов Notch, продуцируемых клетками микроокружения, регулируется, когда лимфоциты инфильтрируют непосредственно в опухоль, остаётся неизвестным. Тем не менее, роль Notch в противоопухолевой функции CD8⁺ Т-клеток нельзя считать однозначной, например, подавление активности Notch в CD8⁺ Т-клетках при колоректальном раке ослабляет их цитотоксическую активность за счёт снижения экспрессии PD-1 [152].

Дальнейшая роль Notch в поддержании противоопухолевого иммунитета состоит в обеспечении активности Т-лимфоцитов. Терапия мультивалентным DLL1 приводила к снижению темпов опухолевого роста за счёт дифференцировки Т-лимфоцитов и усиления антиген-специфической цитотоксичности [153]. Таким образом, литературные данные указывают скорее на положительную роль Notch в регуляции противоопухолевого иммунитета. На мышинной модели с линия-специфичной делецией *Dll1* в CD11c-позитивных клетках было показано, что продукция CD8⁺ Т-клеток понижена, в то время как продукция регуляторных Т-клеток и клеток-супрессоров миелоидного происхождения повышена, что приводит к быстрому росту опухолей, а введение *Dll1* снижает иммуносупрессивное состояние. Однако, мыши с линия-специфичной делецией *Jagged2* в CD11c-позитивных клетках не характеризуются иммуносупрессивным фенотипом, а введение антагониста *Jagged2* снижает продукцию

регуляторных Т-клеток, что улучшает противоопухолевый иммунитет [154]. На модели колит-ассоциированного колоректального рака линия-специфичная делеция *Notch2* в CD11c-позитивных клетках вызывает нарушение дифференцировки дендритных клеток, снижает их способность к миграции и антигенпрезентирующую активность [155]. Таким образом, лиганд Dll1 и рецептор Notch2 потенциально играют положительную роль в обеспечении нормальных функций дендритных клеток, в то время как лиганд Jagged2 – отрицательную.

Активность сигнального пути Notch важна для дифференцировки моноцитов и макрофагов в опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ). Потеря CSL моноцитами блокирует дифференцировку, что элиминирует ОАМ-зависимый иммуносупрессивный эффект [156]. Совместное культивирование макрофагов с некоторыми культурами опухолевых клеток, обладающими множественной лекарственной устойчивостью и продуцирующими высокие уровни JAGGED1, приводит к повышению продукции маркеров ОАМ. Однако, при добавлении ингибиторов γ -секретазы экспрессия маркеров ОАМ исчезает [157]. Notch также принимает участие в формировании фенотипа макрофагов M1, макрофаги со сниженной активностью Notch демонстрируют ухудшение антигенпрезентирующей способности [158]. Повышение активности Notch за счёт экзогенной экспрессии NICD1 в макрофагах подавляет опухолевый рост посредством снижения доли макрофагов с фенотипом ОАМ [159]. Таким образом, поляризация макрофагов зависит от уровня активности Notch в них, которая может регулироваться посредством взаимодействия с другими клеточными компонентами микроокружения опухоли, продуцирующими лиганды Notch. Поскольку активность Notch требуется для дифференцировки в ОАМ (доказано нокаутом компонентов CSL), но при этом его чрезмерная активность (экзогенная экспрессия NICD1) блокирует её, можно сделать вывод о чрезвычайной важности уровня активности Notch для дифференцировки и обеспечения функций макрофагов.

На сегодняшний день ещё нет исследований, посвящённых влиянию активности Notch в иммунных клетках на регуляцию пула и фенотипа ОСК. Однако, например, регуляторные Т-клетки, экспрессирующие JAGGED1, запускают Notch в стволовых клетках волосяных фолликулов, что способствует их пролиферации [160].

Таким образом, сигнальный путь Notch вовлечён как в опухоль-супрессирующую, так и в опухоль-стимулирующую функцию иммунитета, регулируя фенотип CD8⁺ Т-клеток, макрофагов, клеток-супрессоров миелоидного происхождения и других клеточных компонентов.

1.5. Терапевтические стратегии, связанные с сигнальным путем Notch

Работа над исследованиями сигнального пути Notch ведётся уже не одно десятилетие, соответственно, за это время было разработано и испытано как доклинически, так и клинически множество терапевтических стратегий, нацеленных как на глобальное ингибирование Notch, так и на ингибирование его компонентов. В данном обзоре будут рассмотрены только противоопухолевые терапевтические стратегии.

Предшественники рецепторов NOTCH требуют расщепления в сайте S1 в аппарате Гольджи. На модели *D. Melanogaster* впервые было выявлено, что Ca^{2+} -АТФаза саркоэндоплазматического ретикулума SERCA (от англ. Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) является необходимым компонентом данного процесса [161]. Впоследствии было обнаружено, что нарушение функции SERCA значительно влияет на формирование зрелой формы рецепторов и может приводить к образованию их мутантных форм, особенно NOTCH1 [162]. Мутантная форма NOTCH1 играет роль онкогена, например, при Т-ОЛЛ и многих других ЗНО [163], что делает SERCA потенциальной мишенью при разработке терапевтических стратегий [164]. Тапсигаргин, гваянолид растительного происхождения, ингибирует SERCA в клетках млекопитающих. Его действие было подтверждено при раке молочной железы и лейкемии в доклинических исследованиях [165, 166]. Низкомолекулярные ингибиторы SERCA (CPA, CAD204520 и пр.) были протестированы в лабораторных условиях. Они обладали меньшей цитотоксичностью по сравнению с тапсигаргином, однако значимых результатов не продемонстрировали [164, 167].

Расщепление рецепторов NOTCH в сайте S2 обеспечивается дезинтегрином и металлопротеиназами ADAM [47, 168]. Таким образом, подобно ингибиторам SERCA, ингибиторы данных ферментов способны полностью заблокировать сигнальный путь Notch. Низкомолекулярные ингибиторы металлопротеиназ ADAM были протестированы на моделях немелкоклеточного рака лёгкого [169], ГЦК [170], почечной карциномы [171] и рака молочной железы [172]. Некоторые из них продемонстрировали эффективность *in vitro* и *in vivo*, но не были допущены до клинических исследований.

Дальнейшее расщепление NEXT в сайте S3 осуществляется комплексом γ -секретазы. Класс ингибиторов γ -секретазы (gamma secretase inhibitors – GSIs) является наиболее обширным и многочисленным среди ингибиторов сигнального пути Notch. Впервые GSIs были испытаны в клинических условиях при болезни Альцгеймера, потому что γ -секретаза участвует в катализе β -амилоидного пептида. Однако, исследование было быстро остановлено из-за серьёзных побочных эффектов применения GSIs, связанных с работой ЖКТ и даже с развитием немеланоцитарного рака кожи [173]. С тех пор исследования GSIs продолжились, но только в

основном в качестве противоопухолевой терапии. GSI продемонстрировали желаемый эффект в доклинических исследованиях на моделях различных типов ЗНО, в частности, рака молочной [174, 175], предстательной железы [176], немелкоклеточного рака лёгкого [177], колоректального рака [178] и глиомы [179]. Первое клиническое исследование GSI (MK-0752) было проведено в 2006 году с участием пациентов с диагнозом Т-ОЛЛ и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Фаза I продемонстрировала очень многообещающие результаты, однако исследование было вновь прекращено из-за значительных нарушений функций ЖКТ (NCT00100152). Другие GSI, например, PF-03084014 [180], RO4929097 [181], BMS-986115 [182], LY900009 [183] и LY3039478 [184] продемонстрировали свою противоопухолевую эффективность при различных типах ЗНО и успешно прошли фазу I клинических исследований, но только RO4929097 и PF-03084014 прошли в фазу II. RO4929097 не продемонстрировал необходимый уровень эффективности при метастатической меланоме, только у 1 пациента из 32 наблюдался частичный ответ [185]. Аналогичная ситуация наблюдалась при карциноме яичников, устойчивой к платине [186], и колоректальном раке [187]. Таким образом, RO4929097 не был допущен в фазу III/IV. PF-03084014, также называемый нирогацестат, продемонстрировал более многообещающие результаты при терапии пациентов с десмоидными опухолями (агрессивный фиброматоз), у 29% пациентов был детектирован частичный ответ, который сохранялся более 2 лет [188]. Фаза III клинических исследований нирогацестата, по данным на 2024 год, продолжается (NCT03785964).

Существуют всего несколько исследований, посвящённых разработке модуляторов компонентов комплекса γ -секретазы GSMs (от англ. gamma secretase modulators). GSMs нацелены на изменение каталитической активности γ -секретазы, а не на неселективное ингибирование как GSI. Впервые они были протестированы при болезни Альцгеймера [189]. Селективный ингибитор пресенилина-1 (компонент комплекса γ -секретазы) MRK-560 доказал свою эффективность в снижении процессинга мутантных форм NOTCH1, что приводило к остановке клеточного цикла при Т-ОЛЛ, а его действие не вызвало нарушение функций ЖКТ, характерное для GSI [190]. Однако, дальнейшего развития GSMs в противоопухолевой терапии не получили и испытываются сейчас только для лечения болезни Альцгеймера.

Принимая во внимание серьёзные побочные эффекты тотального ингибирования сигнального пути Notch, учёные сфокусировались на разработке антител к рецепторам и лигандам Notch.

Как упоминалось ранее, повышенная продукция JAGGED1 способствует опухолевой прогрессии, в частности посредством стимуляции ангиогенеза, при различных ЗНО, поэтому он может быть рассмотрен как мишень для таргетной терапии. Моноклональные антитела к JAGGED1 испытывались на моделях рака молочной железы [191], яичников [192] и др. На

сегодняшний день 15D11 является наиболее перспективным антителом по данным доклинических исследований. 15D11 усиливает чувствительность к химиотерапии, снижает рост вторичных опухолевых очагов в костях, но тоже имеет побочные эффекты [193].

DLL3 активно продуцируется и экспонируется на клеточную поверхность, например, при мелкоклеточном раке лёгкого и высокозлокачественных нейроэндокринных опухолях [194, 195]. Химиопрепараты, химически сшитые с антителом к DLL3, продемонстрировали высокую эффективность и безопасность при мелкоклеточном раке лёгкого и крупноклеточном нейроэндокринном раке на моделях ксенотрансплантатов [196]. В 2017 году Чарльз М. Рудин и коллеги впервые сообщили о значимых результатах применения ровальпитузумаба тезирин (Rova-T). У 11 из 60 пациентов с диагнозом мелкоклеточный рак лёгкого была зафиксирована высокая частота объективных ответов (ЧОО) [197]. К сожалению, фазы II и III клинических исследований провалились. Медиана общей выживаемости пациентов с рецидивирующим или рефрактерным мелкоклеточным раком лёгкого после по крайней мере двух линий терапии Rova-T составила 5,6 месяцев, а ЧОО – 12,4% [198]. Исследование Rova-T в качестве поддерживающей терапии после первой линии химиотерапии с применением препаратов на основе платины было прекращено вскоре после его начала ввиду полного отсутствия влияния на выживаемость пациентов [199]. Попытки совместить Rova-T с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ниволумаб, ипилимумаб) также не увенчались успехом [200]. Другой химиопрепарат, химически сшитый с антителом к DLL3, SC-002, продемонстрировал ЧОО 14% и частоту тяжёлых нежелательных явлений 37% при мелкоклеточном раке лёгкого в фазе I клинических исследований [201]. Некоторые новые препараты сейчас активно проходят испытания, например, AM757 (тарлатамаб, биспецифическое антитело к DLL3 и CD3) находится на фазе I клинических исследований (NCT04702737), а HPN328 (атезолизумаб, триспецифическое антитело) уже успешно прошёл её (NCT04471727).

DLL4 принимает непосредственное участие в ангиогенезе опухоли при многих типах ЗНО [202]. Применение антител к DLL4 в комбинации с ионизирующим излучением замедляет рост опухоли, благодаря формированию нефункциональных сосудов и развитию обширного некроза опухоли [203]. Моноклональное антитело к DLL4 – REGN421 (энотикумаб) в сочетании с антителами к VEGF продемонстрировало противоопухолевый эффект при раке яичников [141]. В фазе I клинических исследований энотикумаба у 2 из 32 пациентов был детектирован частичный ответ, а у 16 – снизились темпы опухолевого роста [204]. Демцизумаб, другое антитело к DLL4, продемонстрировало в фазе I клинического исследования противоопухолевую эффективность у пациентов с солидными опухолями, ранее прошедшими терапию. Однако, его применение оказалось токсичным и несло высокий риск развития сердечной недостаточности [205]. Комбинирование демцизумаба с паклитакселом позволило

достичь ЧОО 21% при резистентном к платине раке яичников [206]. На сегодняшний день разработаны антитела в виде иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом для одновременного воздействия на DLL4 и VEGF. Например, АВТ-165 продемонстрировал очень высокую эффективность и безопасность в доклинических исследованиях [207], а навицксизумаб (OMP-305B83) – умеренную противоопухолевую активность и токсичность в фазе I клинических исследований [208] при солидных опухолях.

Другие лиганды (DLL1 и JAGGED2) Notch тоже потенциально являются мишенями для разработки противоопухолевых терапий, однако данные о соответствующих препаратах в литературе на сегодняшний день отсутствуют.

Мутантный NOTCH1 принимает непосредственное участие в возникновении и прогрессии Т-ОЛЛ [85]. Кроме этого, NOTCH1 играет роль онкогена при многих типах ЗНО, что бесспорно делает его мишенью для противоопухолевой терапии. Моноклональное антитело к NOTCH1 бронтиктузумаб успешно прошло фазу I клинических исследований с участием пациентов с диагнозом метастатический колоректальный рак (NCT03031691), рецидивирующие или рефрактерные солидные опухоли (NCT01778439) и рецидивирующие или рефрактерные лимфоидные опухоли (NCT01703572). Противоопухолевый эффект был детектирован у 50% пациентов с аденоидно-кистозной карциномой ($n = 12$) [93].

Нарушение регуляции NOTCH2 может способствовать прогрессии В-клеточного лейкоза [209] и панкреатической протоковой аденокарциномы [210]. NOTCH3 также может выступать в роли онкогена при различных ЗНО, например, раке лёгкого [211], яичников [91] и ERBB2-негативном раке молочной железы [212]. OMP-59R5 (тарекстумаб), который одновременно нацелен на NOTCH2 и 3, продемонстрировал свою эффективность при панкреатической протоковой аденокарциноме [213] и мелкоклеточном раке лёгкого IV стадии (NCT01859741). Однако, в фазе II клинического исследования OMP-59R5 в сочетании с химиотерапией не продемонстрировал желаемого эффекта, а также не достиг объективного ответа при клинических исследованиях с участием пациентов с другими типами солидных опухолей. Другой химиопрепарат, химически сшитый с антителом к NOTCH3, PF-06650808, продемонстрировал частичные ответы у 5 из 40 пациентов с раком молочной железы [214]. Данные о препаратах, нацеленных на блокирование NOTCH4, в литературе отсутствуют.

Активация транскрипции целевых генов является последним этапом запуска сигнального пути Notch. RIN1, низкомолекулярный ингибитор CSL, снижает пролиферацию линий гематологических опухолевых клеток *in vitro* [215]. IMR-1, низкомолекулярный ингибитор MAML1, ингибирует рост клеточных линий, активность Notch для которых жизненно необходима, *in vitro* [216]. СВ-103, перорально активная малая молекула, модулирует функцию CSL, что приводит к блокированию активации транскрипции целевых генов. Ее эффективность

была продемонстрирована на ксенотрансплантатах рака молочной железы и лейкемии. Стоит отметить, что СВ-103 не обладала дозолимитирующей токсичностью для ЖКТ, как большинство других ингибиторов Notch [217]. Таким образом, создание данных препаратов представляется новым, возможно наиболее перспективным, витком разработки терапий, нацеленных на прерывание активности Notch.

Большинство терапевтических стратегий разрабатывались нацеленными на опухолевые клетки, за исключением антител к DLL4, направленных на угнетение сосудистой сети опухолей. Однако, на сегодняшний день, становится очевидно, что данные терапии влияют не только на сами опухолевые клетки, но и практически на все типы клеток микроокружения. Примеры таких влияний представлены в таблице 2. Как было выявлено, не все терапевтические стратегии, оказывающие негативный эффект непосредственно на опухолевые клетки, имеют опухоль-супрессирующее влияние и на микроокружение. Принимая во внимание высокую плейотропию ролей сигнального пути Notch, воздействие на микроокружение его ингибиторов для подавления опухолевого роста нуждается в дальнейших подробных исследованиях.

Таблица 2 – Примеры влияния препаратов, нацеленных на подавление сигнального пути Notch, на микроокружение солидных опухолей

Препарат	Влияние на микроокружение опухоли	Ссылка
Антитело к JAGGED1 и 2 (CTX014)	Подавление клеток-супрессоров миелоидного происхождения	[218]
Антитело к NLS NOTCH1	Ингибирование ангиогенеза	[219]
Антитело к NOTCH2 и 3 (тарекстумаб)	Угнетение функций перицитов	[220]
Молекулы, блокирующие взаимодействие NOTCH1 и JAGGED	Снижение прорастания сосудов и площади их покрытия перицитами	[221]
Препарат	Влияние на микроокружение опухоли	Ссылка
Молекулы, блокирующие взаимодействие NOTCH1 и DLL	Угнетение функций сосудов	[221]
GSI _s	M2-поляризация макрофагов	[158]
GSI (DAPT)	Гибель эндотелиальных клеток	[222]
	Ингибирование ангиогенеза	[223]
	Появление полиморфноядерных клеток-супрессоров миелоидного происхождения	[224]
	Повышение противоопухолевого иммунитета	[225]
	Повышение цитотоксичности Т-клеток	[152]
GSI (MRK-003)	Гибель эндотелиальных клеток	[226]

Сигнальный путь Notch может проявлять не только онкогенные, но опухоль-супрессирующие свойства, поэтому разработка препаратов также идёт в направлении восстановления активности Notch. Например, соединения хризина и гесперетина используются для активации Notch при дефиците NOTCH1 при анапластическом раке щитовидной железы [227, 228]. Однако анализ литературы, посвящённый подобным препаратам, выходит за рамки тематики данной работы.

Прошло более 110 лет с тех пор, как ген *Notch* был открыт у *D. melanogaster*. В данной главе кратко были рассмотрены история открытия, строение и регуляция сигнального пути, роль в развитии и поддержании гомеостаза организма, патологии и онкологические заболевания, связанные с нарушением его активности, а также терапевтические возможности и дальнейшие перспективы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточные линии и культуры

В работе использовали клеточные линии карцином лёгкого A549 (ATCC® CCL-185™), толстой кишки HCT116 (ATCC® CCL-247™) и LIM1215 (ECACC 10092301), фибросаркомы HT1080 (ATCC® CCL-121™) и ГЦК HEPG2 (ATCC® HB-8065™) человека. Все клеточные линии хранят в жидком азоте в собственном криохранилище лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM (SH30081.FS, Cytiva), содержащей 7% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone FetalClone (SH30080.02, Cytiva), 20 мкг/мл гентамицина (A011, ПанЭко), 4 mM L-глутамина (Ф1315, ПанЭко), 4,5 г/л глюкозы (50-99-7LR, ПанЭко) и 3,7 г/л NaHCO₃ (X022/130139, ПанЭко), в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

В работе также были использованы культуры мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности, полученные из первичного биологического материала. Выведенные ранее на селекционной среде мезенхимальные клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM/F12 1:1 (SH30271.FS, Cytiva), содержащей 10% ЭТС HyClone FetalClone и 40 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Все доноры подписали информированное согласие на использование своего биологического материала в научно-исследовательских целях. Этическое одобрение исследования получено от Росздравнадзора, Комитета по этике и Ученого совета ФГБНУ «ЦНИИ стоматологической и челюстно-лицевой хирургии» (№ 4/276).

Для кокультивирования опухолевых и мезенхимальных клеток последние сеяли в количестве 10×10^3 кл/см² в нескольких повторах, выращивали до субконфлюэнтного монослоя, считали, затем поверх сеяли опухолевые клетки в равном количестве и, спустя 3 суток, анализировали необходимыми методами.

2.2. РНК-интерференция

Стабильные клеточные сублинии A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1* получали с использованием лентивирусного вектора pLKO.1-puro (8453, Addgene). 21-нуклеотидную последовательность малой интерферирующей РНК (миРНК) *NOTCH1* клонировали в составе специфической шпилечной структуры в pLKO.1-puro (Рисунок 4).

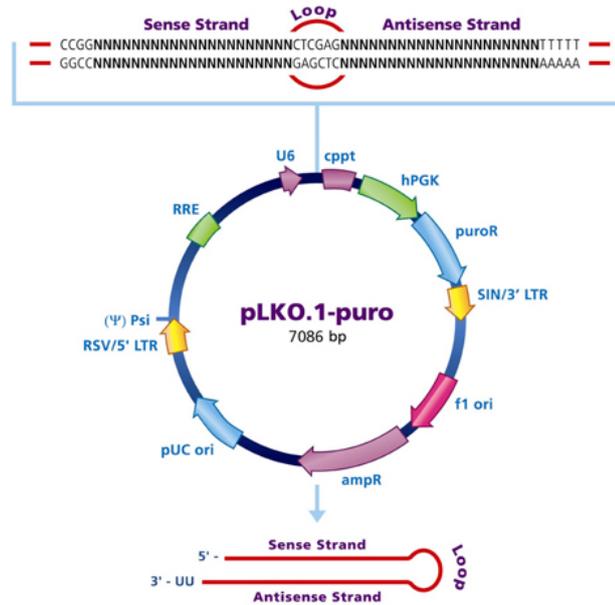


Рисунок 4 – Схематичное изображение вектора pLKO.1-puro со вставкой в виде шпилечной структуры, необходимой для РНК-интерференции целевого гена

На основании базы данных National Center for Biotechnology Information [229] с помощью биоинформатического анализа были выбраны 5 последовательности миРНК, соответствующих позициям мРНК *NOTCH1* человека (версия NM_017617.5), которые потенциально подавляют экспрессию *NOTCH1*. Выбранные последовательности синтезировали (Евроген) и клонировали в pLKO.1-puro.

Клетки-паковщики 293Т (ATCC® CRL-3216™) трансфецировали экспериментальными векторами и вспомогательными плазмидами pΔR8.2 (12263, Addgene), pVSV.G (14888, Addgene) с использованием реагента GeneJuice (70967, Merck Millipore). Супернатанты, содержащие в своем составе сформированные вирусные частицы, собирали один раз в сутки в течение трёх суток после трансфекции, затем фильтровали через мембрану (диаметр пор 0,22 мкм, EFGSW10IS, Merck Millipore). Целевые клетки инфицировали полученными вирусными частицами с использованием реагента Polybrene (TR-1003-G, Merck Millipore). Инфицированные клетки подвергали селекции в среде, содержащей 1 мкг/мл пурамицина (P7130, Sigma-Aldrich), в течение 5–6 суток. По результатам анализа тотальной РНК и/или белка оценивали эффективность созданных конструкторов.

Для подавления экспрессии *NOTCH1* в мезенхимальных клетках использовали конструктор, продемонстрировавший наибольшую эффективность в А549 и НСТ116. Его эффективность в мезенхимальных клетках была подтверждена методом ПЦР-РВ (снижение до 0,012±0,002%) и иммуноблоттинга (снижение до 0,09±0,03%). Для подавления экспрессии *TP53* в мезенхимальных клетках использовали вектор pLKO.1-puro shTP53 (19119, Addgene). В качестве контроля использовали вектор pLKO.1-puro shGFP (30323, Addgene).

2.3. Экзогенная экспрессия

Для экзогенной экспрессии *NICD1* в мезенхимальных клетках использовали вектор Notch1 intracellular domain-pcw107-V5 (64622, Addgene), *GFP* – pLenti6-GFP (35637, Addgene). Трансфекцию, инфекцию и оценку эффективности проводили по протоколу, описанному в пункте 2.2.

2.4. Полимеразная цепная реакция

Тотальную РНК инфицированных клеток получали с использованием реагента Trizol (15596018, Invitrogen). С использованием спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific) детектировали количество РНК в пробах. Далее проводили реакцию обратной транскрипции, необходимую для синтеза первой цепи кДНК, с использованием обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (M170A, Promega).

ПЦР полученных образцов кДНК проводили с использованием ПЦР-амплификатора Dyad DNA Engine (Bio-Rad). Электрофорез реакционной смеси проводили с использованием 1,5%-го агарозного геля. С помощью программы Total Lab (версия 2.0, Nonlinear Dynamics) детектировали относительную интенсивность флуоресценции полос. Образцы нормировали по количеству ПЦР-продукта *TUBA1A*.

ПЦР-РВ полученных образцов кДНК проводили с использованием готовой реакционной смеси 5×qPCRmix-HS SYBR (PK147L, Евроген) и ПЦР-амплификатора CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). Значения *Ct* для целевых и референсного (*TUBA1A*) генов вычисляли с использованием программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad). Для получения относительных уровней экспрессии целевых генов применяли $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – метод. В таблице 3 указаны праймеры к мРНК целевых генов и размеры получаемых ПЦР-продуктов.

Таблица 3 – Праймеры к мРНК целевых генов и размеры получаемых ПЦР-продуктов

Ген	Последовательность прямого праймера (5'→3')	Последовательность обратного праймера (5'→3')	Размер продукта, п.о.
<i>CDH1</i>	GTCTGTAGGAAGGCACAGCC	TGCAACGTCGTTACGAGTCA	285
<i>C-MYC</i>	GGCTCCTGGCAAAAGGTCA	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	119
<i>HES1</i>	ACACGACACCGGATAAACCAA	GCCGCGAGCTATCTTTCTTCA	150
<i>NANOG</i>	AAGGTCCCAGTCAAGAAACAG	CTTCTGCGTCACACCATTGC	237
<i>NES</i>	GCGGCTGCGGGCTACTGAAA	ATCCAAGACGCCGGCCCTCT	281
<i>NOTCH1</i>	CACCCATGACCACTACCCAGTT	CCTCGGACCAATCAGAGATGTT	250

Ген	Последовательность прямого праймера (5'→3')	Последовательность обратного праймера (5'→3')	Размер продукта, п.о.
<i>POU5F1</i>	GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT	GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
<i>SNAIL1</i>	ACTGCAACAAGGAATACCTCAG	GCACTGGTACTTCTTGACATCTG	242
<i>SOX2</i>	TGGACAGTTACGCGCACAT	CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215
<i>TGFBI</i>	TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC	GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA	122
<i>TUBA1A</i>	GTTGGTCTGGAATTCTGTCAG	AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC	288
<i>TWIST1</i>	CACGAGCGGCTCAGCTACGC	CGCTGCCCGTCTGGGAATCAC	313
<i>WNT1</i>	TCCCCTTTGTCCTGCGTTTT	TGTTCAATGGCTCCACGACA	231

Примечание. п.о. – пары оснований.

2.5. Иммуноблоттинг

По достижению клеточными культурами субконфлюэнтного монослоя готовили тотальные клеточные лизаты с использованием реагента Lysis-M (4719956001, Roche). С помощью набора реагентов Quick Start Bradford Protein Assay Kit (5000201, Bio-Rad) определяли количество белка в пробах методом Бредфорда [230]. Электрофорез полученных клеточных лизатов проводили с использованием 8–12%-ного полиакриламидного геля в системе Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Далее белки переносили на PVDF-мембрану (низкая автофлуоресценция, IPFL00005, Merck Millipore) с использованием системы полусухого переноса белков Power Blotter System (Invitrogen). Реагент SuperBlock (37515, Thermo Fisher Scientific) применяли для блокировки мест неспецифического связывания антител. Мембраны инкубировали с необходимыми первичными антителами, затем с соответствующими вторичными антителами (см. п. 2.10). Сканер Typhoon 9410 (GE Healthcare) использовали для визуализации полос. С помощью программы Total Lab (версия 2.0, Nonlinear Dynamics) детектировали относительную интенсивность флуоресценции полос. Образцы нормировали по количеству α -тубулина.

2.6. Микроскопия

Микрофотографии живых клеточных культур в фазовом контрасте получали с помощью микроскопа Axiovert 200 с использованием программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss).

Для анализа методом иммунофлуоресцентной микроскопии клетки культивировали на покровных стёклах до формирования субконфлюэнтного монослоя. Культуральную среду отбирали и промывали тёплой бессывороточной средой NuClone DMEM. Клетки фиксировали бессывороточной средой NuClone DMEM, содержащей 2% параформальдегида (от англ.

paraformaldehyde – PFA), в течение 10 минут при комнатной температуре, затем – холодным (–20°C) чистым метанолом в течение 5 минут. Покровные стёкла инкубировали с необходимыми первичными антителами, затем с соответствующими вторичными антителами (см. п. 2.10). Ядра выявляли с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich). Анализ проводили с помощью микроскопа AxioPlan 2 с использованием объектива 100×/1,30 (Carl Zeiss).

2.7. *In vitro* тесты

Клетки в количестве $0,5 \times 10^5$ штук высевали на чашку Петри для изучения динамики роста клеточных культур. С использованием камеры Горяева подсчитывали количество клеток каждые 48 часов в течение 6 суток.

Клетки в количестве $0,5 \times 10^5$ штук высевали на фильтр камер Бойдена (диаметр пор 8 мкм), интегрированных в плашку, для изучения их миграционной активности. Клетки, оставшиеся на верхней поверхности фильтра, удаляли спустя сутки инкубации. Далее мигрировавшие клетки фиксировали холодным (–20 °C) чистым метанолом и окрашивали 1 мкМ раствором DAPI в фосфатно-солевом буфере (от англ. phosphate-buffered saline – PBS) (pH = 7,4) (PM-B2092, ПанЭко). С использованием микроскопа Axiovert 200 подсчитывали количество клеток, оставшихся на нижней поверхности фильтра.

Клетки в количестве 500 штук высевали на 10-см чашку Петри для анализа колониеобразования в адгезивных условиях. Клетки инкубировали в течение 14 суток, затем фиксировали 70%-ным этанолом и окрашивали красителем Гимза (O080, ПанЭко).

Клетки в количестве 200 штук высевали на 10-см чашку Петри с неадгезивным для эукариотических клеток покрытием дна для анализа колониеобразования в полужидкой среде. Клетки инкубировали в течение 14 суток в среде, состоящей из 2,6% раствора метилцеллюлозы и среды NuClone DMEM (20% ЭТС), смешанных в пропорции 1:1. Далее клетки окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового и охлаждали до 4°C в течение 10 часов. С использованием программы Total Lab (версия 2.0, модуль Colony Counter) подсчитывали количество и размер колоний.

2.8. Цитофлуориметрический анализ

Для анализа способности клеток к исключению красителя 10^6 кл/мл ресуспендировали в растворе Хэнкса с добавлением 2% ЭТС, инкубировали с красителем Родамин 123 (R8004,

Sigma), затем с красителем пропидий йодид (P4170, Sigma). Способность к исключению красителя детектировали с помощью проточного цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences), для красителя Родамин 123 использовали фильтр 530/30 BP и для красителя пропидий йодид – 630/22 BP. Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva Software (BD Biosciences) и WinMDI (Joseph Trotter) [231].

Для анализа доли клеток в культуре, продуцирующих специфические маркеры, клетки промывали PBS, осаждали центрифугированием, ресуспендировали в PBS, содержащим 2% PFA, и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре, затем – в холодном (–20°C) чистом метаноле в течение 5 минут, считали в камере Горяева и готовили образцы с концентрацией 10^6 клеток в 100 мкл PBS. Клетки инкубировали с необходимыми первичными антителами, а затем с соответствующими вторичными антителами (см. п. 2.10). Инкубации проводили в течение 60 минут на льду, для отмывки не связавшихся антител использовали PBS. Образцы анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur™ и программного обеспечения Cell Quest software (BD Biosciences).

2.9. Анализ способности мезенхимальных клеток к дифференцировке

Для анализа использовали набор для идентификации способности МСК человека к остео (маркер – агрекан)-, адипо (FABP4)- и хондрогенной (остеокальцин) дифференцировке Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification kit (SC006, R&D Systems). Далее клетки инкубировали с необходимыми первичными антителами, а затем с соответствующими вторичными антителами (см. п. 2.10) и оценивали способность к дифференцировке по соответствующим маркерам методом иммунофлуоресцентной микроскопии (см. п. 2.6).

2.10. Антитела

В работе использовали первичные антитела к Notch1 (sc-6014, Santa Cruz Biotechnology), Jagged1 (sc-390177, Santa Cruz Biotechnology), P53 (sc-126, Santa Cruz Biotechnology), α -SMA (M0851, DAKO), F-актину (P1951, Sigma-Aldrich), α -тубулину (B-5-1-2: sc-23948, Santa Cruz Biotechnology), CD31 (560984, BD Biosciences), CD34 (550761, BD Biosciences), CD45 (555482, BD Biosciences), CD73 (550257, BD Biosciences), CD90 (559869, BD Biosciences), CD105 (MHCD10520, LifeTechnologies), CD133 (ab19898, Abcam), CD146 (560846, BD Biosciences), CD324 (612130, BD Biosciences), агрекану (AF1220, R&D Systems), виментину (M0725, DAKO), коллагену I (2150–0001, Bio-Rad), коллагену III (2150–0100, Bio-Rad), остеокальцину

(MAB1419, R&D Systems), цитокератинам 14 – 16, 19 (набор, 550953, BD Biosciences), эластину (4060–1060, Bio-Rad), P4HB (NB300–517, Novus Biologicals), FABP4 (AF1443, R&D Systems) и флуоресцентно-меченые вторичные антитела Alexa Fluor 488 (A11094, Thermo Fisher Scientific) и 633 (A30634, Thermo Fisher Scientific).

2.11. Люциферазный анализ

Для анализа транскрипционной активности *NOTCH1* был использован, полученный ранее научным руководителем к.б.н. Копниным П.Б., генно-инженерный репортерный лентивирусный конструкт на основе вектора рLA, где *Luc* находится под контролем минимального цитомегаловирусного (англ. minimum cytomegalovirus – mCMV) промотора, работа которого запускается при взаимодействии RBP, вызванного связыванием с NICD, с четырёхжды повторённой последовательностью, содержащей RBP-респонсивные элементы (Рисунок 5). Для получения модифицированных клеточных культур, содержащих данный конструкт, трансфекция и инфекция проводились по протоколу, описанному в пункте 2.2.

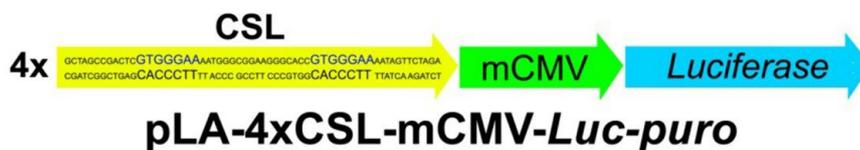


Рисунок 5 – Схема репортерного лентивирусного конструкта для оценки транскрипционной активности *NOTCH1*

Для анализа транскрипционной активности *TP53* был использован генно-инженерный репортерный лентивирусный конструкт pGF-P53-mCMV-EF1-puro (TR200, System Biosciences), где *Luc* находится под контролем P53-зависимого промотора. Работоспособность конструкта была подтверждена с помощью доксорубина и 5-фторурацила. Для получения модифицированных клеточных культур, содержащих данный конструкт, трансфекция и инфекция проводились по протоколу, описанному в пункте 2.2.

Клеточные культуры с введёнными ранее конструктами спустя 72 часа после экспериментов анализировали в системе Steady-Glo Luciferase Assay System (E2510, Promega). После взаимодействия с люминогенным субстратом люминесценцию детектировали с помощью люминометра 20/20n Luminometer (Fisher Scientific International). Полученные значения нормировали относительно концентрации белка в образцах, определённой по методу Бредфорда [230].

2.12. Применение ингибитора γ -секретазы – DAPT

Ингибитор Т-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицина (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester – DAPT) (D5942, Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкМ [232, 233] добавляли один раз в культуральную среду при посеве опухолевых на мезенхимальные клетки.

2.13. Применение TGF- β 1

Фактор TGF- β 1 (T7039, Sigma-Aldrich) добавляли один раз в культуральную среду до концентрации 10 мкг/мкл при пассаже клеток. Эксперименты начинали не ранее чем через 72 часа после добавления.

2.14. Применение ингибиторов рецепторов TGF- β 1

Селективные ингибиторы рецепторов TGF- β 1 SB-525334 (S8822, Sigma-Aldrich) и SB-505124 (S4696, Sigma-Aldrich) в концентрации 10 нМ добавляли один раз в культуральную среду при посеве опухолевых на мезенхимальные клетки.

2.15. Иммуноферментный анализ TGF- β 1 в культуральной среде

Анализ проводился с использованием набора Bio-Plex Pro™ TGF- β 3-plex Panel (171-W4001M, Bio-Rad) согласно протоколу производителя.

2.16. Эксперименты с участием лабораторных животных

Протокол исследования на животных одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (№ 05Па). Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

В экспериментах принимали участие иммунодефицитные бестимусные мыши линии BALB/c nu/nu (самки, возраст – 7–8 недель, вес – 15–20 г.). В каждой экспериментальной или контрольной группе было 8–12 животных. По окончании экспериментов животных

терминировали парами эфира и производили извлечение необходимого биологического материала.

Клетки в стерильном физиологическом растворе объемом 100 мкл вводили мышам подкожно для изучения динамики роста ксенографтов. Для экспериментов, описанных в разделе 3.1, количество клеток составляло 10^6 . Для экспериментов, описанных в разделе 3.2, количество опухолевых клеток составляло 10^6 и мезенхимальных клеток – $2,5 \times 10^6$. В качестве линейных параметров ксенографтов были приняты «длина» и «ширина». Измерения проводили с помощью штангенциркуля раз в трое суток в течение 2,5–3 недель. Объем ксенографтов рассчитывали по формуле: «ширина»² × «длина» × 0,5, где «ширина» ≤ «длина». На основании полученных данных строили кривые зависимости объёмов ксенографтов от количества суток после инъекции клеток.

Для определения минимальной прививочной дозы (анализ туморогенности) введения суспензий клеток проводили по вышеописанной схеме. Суспензии готовили с различной концентрацией клеток в диапазоне $0,125-2 \times 10^6$ с шагом, определяемым геометрической прогрессией со знаменателем равным 2. На седьмые сутки после введения определяли наличие сформированного ксенографта.

Для анализа способности к метастазированию лабораторным животным инсулиновым шприцом с длиной иглы 5 мм вводили суспензию 10^6 клеток в стерильном физиологическом растворе объемом 20 мкл в одну из долей лёгкого. Введение осуществлялось поперёк грудной клетки с правой стороны выше рёберной дуги (точка А) в верхней точке рёберно-ключичной перпендикулярной линии (точка Б), как показано на рисунке 6. Длительность эксперимента составляла 28 суток.

Для совместного введения опухолевых и мезенхимальных клеток лабораторным животным подкожно вводили смесь 10^6 опухолевых и $2,5 \times 10^6$ мезенхимальных клеток. В качестве контроля в противоположный бок подкожно вводили 10^6 опухолевых клеток.

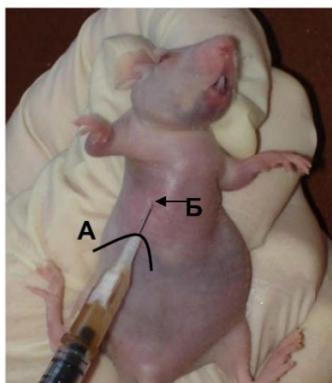


Рисунок 6 – Фотография лабораторного животного со схемой ортотопического введения опухолевых клеток

2.17. Иммуногистохимический анализ

Материал фиксировали PBS, содержащим 4% PFA, в течение 24 часов при комнатной температуре, затем – 70% этанолом в течение 4 часов. Далее материал обезвоживали в этаноле восходящей крепости (80%, 96%) по 4 часа, переносили в раствор 96% этанола с хлороформом (пропорция 1:1) на 1 час, затем дважды последовательно переносили в хлороформ на 1 час и выдерживали в растворе хлороформа с парафином (пропорция 1:1) 1 час в термостате при 37°C. Заключали материал в парафин Paraplast Plus (P3683, Sigma-Aldrich). Для изготовления серии срезов использовали ротационный микротом-криостат (Carl Zeiss) и стекла с нанесённым адгезивным покрытием поли-L-лизин (354085, Corning). Срезы с ножа собирали на дистиллированную воду, подогретую до 37°C. Расправленные срезы вылавливали на стекла, излишек воды вокруг срезов удаляли фильтровальной бумагой и помещали в термостат при 37°C на ночь. Для подготовки срезов к окрашиванию использовали высокие цилиндрические стеклянные стаканчики с притёртыми крышками. В первые два стаканчика наливали ортоксилол, в третий – 96%-ный этанол, в четвертый – 80%-ный этанол и в пятый – дистиллированную воду. Последовательно помещали в каждую ёмкость с ортоксилолом стекла на 3 минуты, далее – в спирты по нисходящей крепости на 2 минуты, затем переносили в дистиллированную воду на 5 минут. При перенесении стекол из одного стаканчика в другой их торцевую часть промокивали о фильтровальную бумагу. Срезы помещали в гематоксилин Майера на 1 минуту, промывали в проточной воде в течение 5 минут, ополаскивали дистиллированной водой, помещали в 0,1 % водный раствор эозина на 10 секунд и промывали дистиллированной водой в течение 5 минут. Далее срезы обезвоживали в этаноле восходящей крепости (70%, 80%, 96%) по 1 минуте и просветляли последовательно в двух порциях ортоксилола по 1 минуте. Помещали канадский бальзам на окрашенный срез и, не допуская его высыхания, накрывали стеклом. Анализ полученных препаратов проводили после полного застывания смолы. Анализ полученных срезов проводили с помощью микроскопа Axiovert 200. Количество метастазов в долях лёгкого подсчитывали вручную.

2.18. Статистический анализ

Программное обеспечение STATISTICA (версия 13.3) использовали для статистической обработки первичных данных. U-критерий Манна–Уитни применяли для оценки различий между группами. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$. На всех графиках и диаграммах данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Все эксперименты проводили независимо не менее трех раз.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

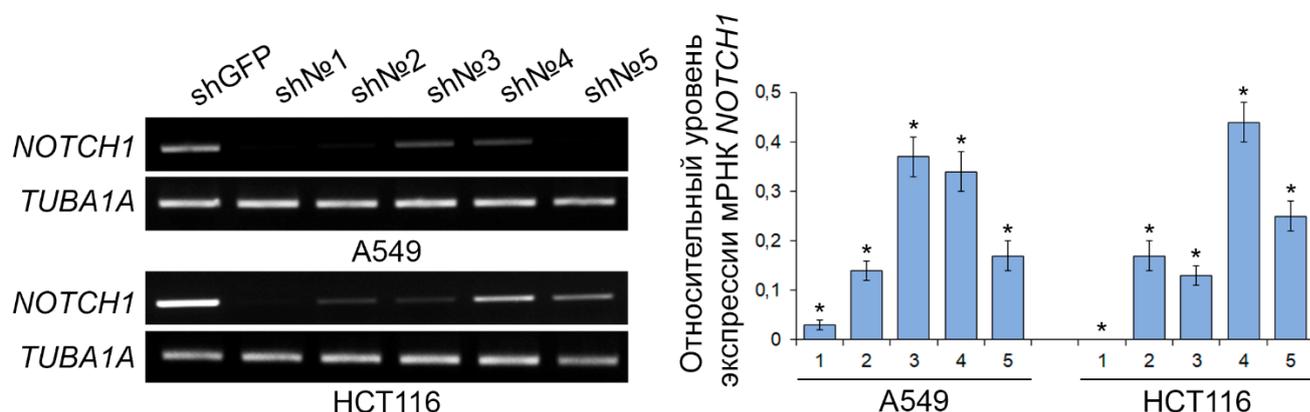
3.1. Значимость экспрессии *NOTCH1* для прогрессии карцином легкого и толстой кишки человека

3.1.1. Получение клеточных сублиний с подавленной экспрессией *NOTCH1*

Для получения стабильных клеточных сублиний рака лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1* был использован метод РНК-интерференции. По результатам биоинформатического анализа были выбраны 5 вариантов последовательностей миРНК (Таблица 4). Методами ПЦР-анализа и иммуноблоттинга была подтверждена экспрессия *NOTCH1* на уровне мРНК и белка, соответственно, как в исходных клетках A549 и HCT116, так и в контрольных клеточных сублиниях (shGFP). По данным классического ПЦР-анализа (Рисунок 7) и ПЦР-РВ (Рисунок 8) наибольшую эффективность для обеих клеточных линий продемонстрировала последовательность миРНК № 1.

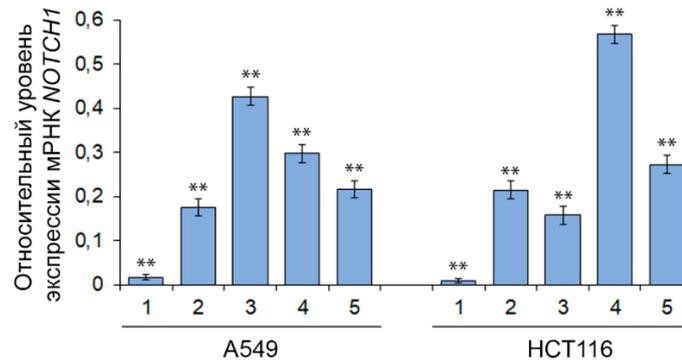
Таблица 4 – Варианты последовательностей миРНК для РНК-интерференции *NOTCH1*

№	Последовательность (5' – 3')	Позиции мРНК <i>NOTCH1</i>
1	GATGCCAAATGCCTGCCAGAA	165 – 1185
2	CTTTGTTTCAGGTTTCAGTATT	8652 – 8672
3	CGCTGCCTGGACAAGATCAAT	1772 – 1792
4	GCCGAACCAATACAACCCCTCT	7219 – 7239
5	CAAAGACATGACCAGTGGCTA	2566 – 2586



Экспрессия *NOTCH1* на диаграммах нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу, $*p < 0,05$.

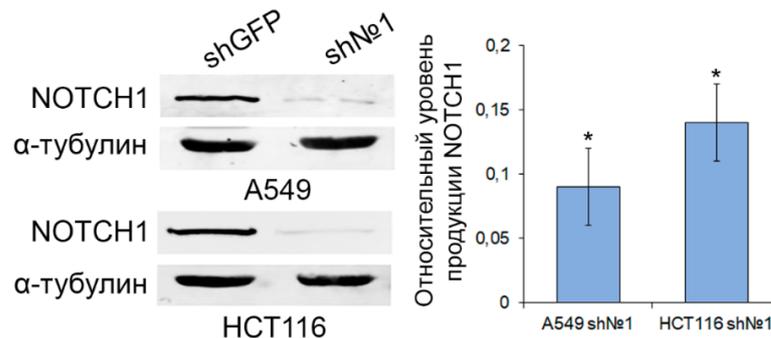
Рисунок 7 – ПЦР-анализ экспрессии *NOTCH1* в полученных клеточных сублиниях A549 и HCT116 (слева) и диаграмма относительной интенсивности флуоресценции полос (справа)



Экспрессия *NOTCH1* на диаграммах нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу, $**p < 0,01$.

Рисунок 8 – ПЦР-РВ экспрессии *NOTCH1* в полученных клеточных сублиниях A549 и HCT116

Эффективность последовательности № 1 подтвердилась на уровне экспрессии белка по результатам иммуноблоттинга *NOTCH1* (полноразмерный рецептор, ~ 300 кДа) (Рисунок 9), поэтому она была выбрана для дальнейшей работы.



Продукция *NOTCH1* на диаграмме нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу, $*p < 0,05$.

Рисунок 9 – Иммуноблоттинг *NOTCH1* в клеточных сублиниях A549 и HCT116 с вариантом последовательности миРНК №1 (слева) и диаграмма относительной интенсивности флуоресценции полос (справа)

3.1.2. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на клеточный фенотип и морфологию

Методами *in vitro* был проведен анализ основных биологических характеристик клеток полученных сублиний A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1*. Исходные и клетки контрольных сублиний A549 и HCT116 имели прерывистые и фрагментированные межклеточные контакты, однако клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* характеризовались более эпителиоидными контактами, по данным световой микроскопии (Рисунок 10).

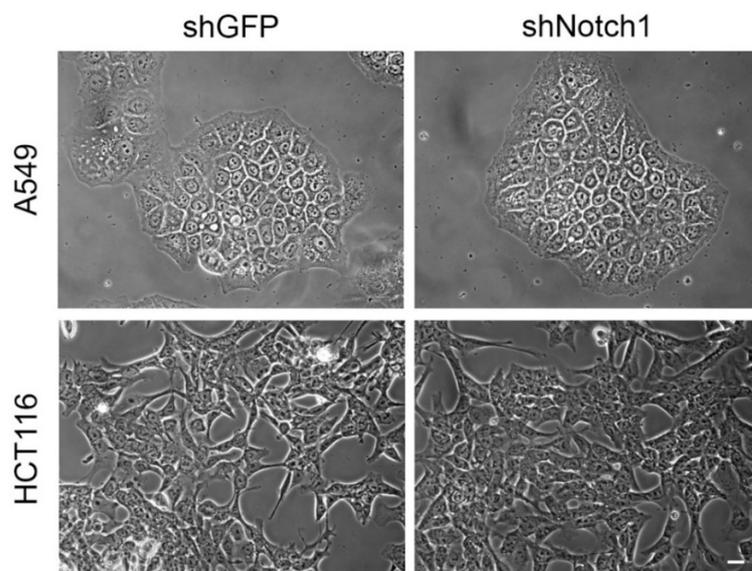


Рисунок 10 – Микрофотографии клеток A549 и HCT116 сублиний shGFP и shNotch1, масштаб – 20 мкм

Далее было изучено, как подавление экспрессии *NOTCH1* в клетках A549 и HCT116 влияет на их скорость пролиферации, эффективность колониобразования в адгезивных условиях и миграционную активность. На 7-е сутки инкубации темпы пролиферации клеток сублиний shNotch1 снизились на 32 ± 14 % для A549 и на 37 ± 14 % для HCT116 по сравнению с контрольными (Рисунок 11).

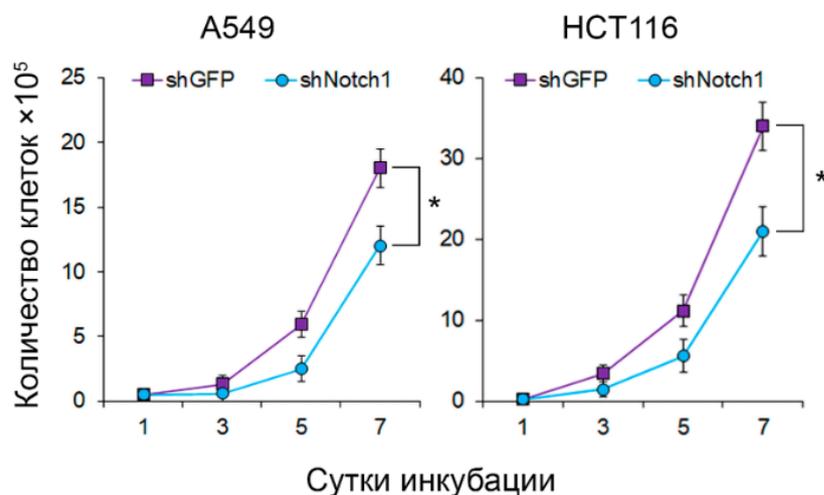


Рисунок 11 – Анализ скорости пролиферации клеток A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*, * $p < 0,05$

Эффективность колониобразования в адгезивных условиях клеток сублиний shNotch1 снизилась на 58 ± 8 % для A549 и на 57 ± 8 % для HCT116 по сравнению с контрольными (Рисунок 12). Миграционная активность клеток сублиний shNotch1 снизилась на 39 ± 10 % для A549 и на 45 ± 11 % для HCT116 по сравнению с контрольными (Рисунок 13).

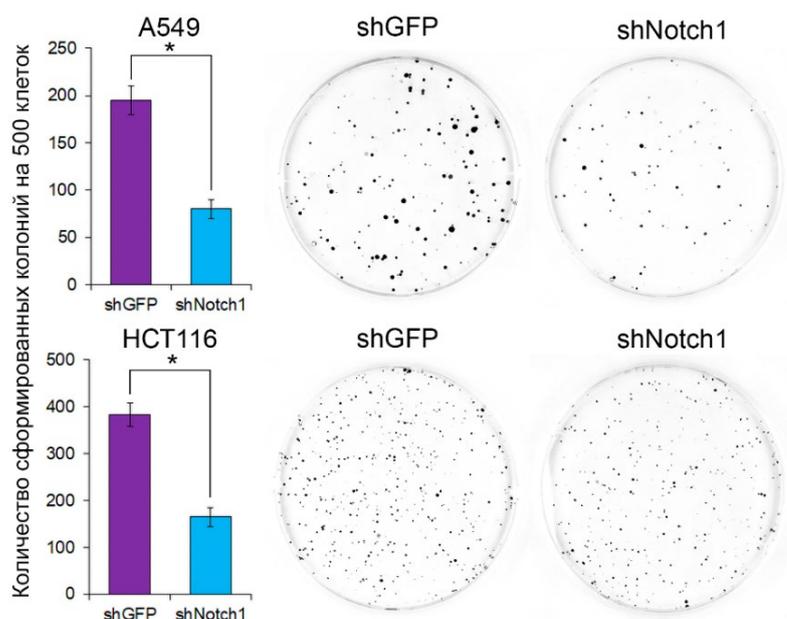


Рисунок 12 – Анализ способности к колониобразованию в адгезивных условиях клеток A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1* (слева) и фотографии чашек Петри (справа), $*p < 0,05$

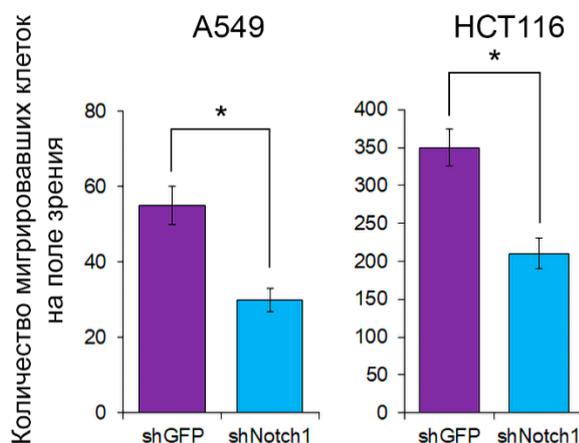


Рисунок 13 – Анализ миграционной активности в камере Бойдена клеток A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*, $*p < 0,05$

Таким образом, подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению инвазивного и пролиферативного потенциала клеток рака лёгкого и толстой кишки человека.

Основываясь на данных экспериментов *in vitro*, были проведены эксперименты *in vivo* для изучения влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на скорость роста ксенографтов. По окончании эксперимента объём ксенографтов, сформированных клетками A549 shNotch1, снизился на 62 ± 19 %, а клетками HCT116 shNotch1 – на 60 ± 22 % по сравнению с контрольными (Рисунок 14). Таким образом, подавление экспрессии *NOTCH1* снижает темпы опухолевого роста рака лёгкого и толстой кишки человека [234].

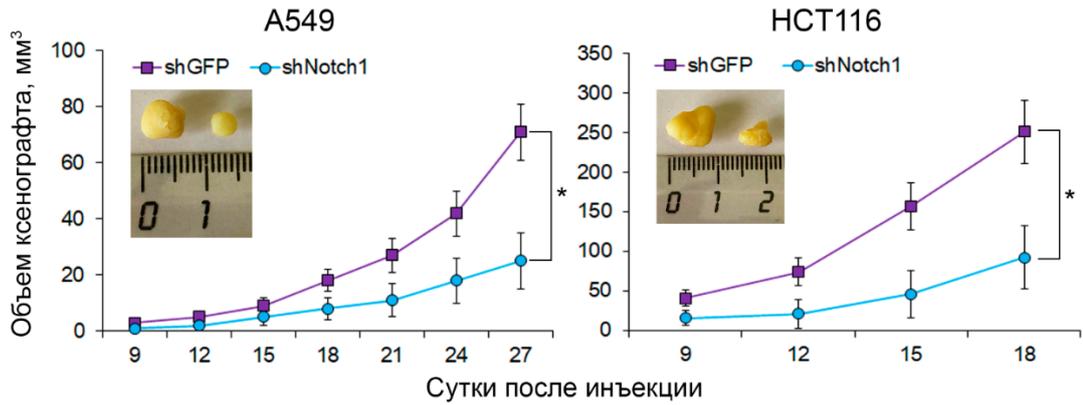


Рисунок 14 – Динамика роста подкожных ксенографтов, сформированных клетками A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1*, и фотографии извлечённых терминальных опухолей, * $p < 0,05$

Способность опухолевых клеток к метастазированию является одной из ключевых характеристик, определяющих прогрессию ЗНО, поэтому было изучено, как подавление экспрессии *NOTCH1* влияет на неё. Экспериментальным животным ортотопически вводили клетки сублиний A549 в одну из долей лёгкого и, спустя время, анализировали наличие метастазов в других долях лёгкого. Подавление экспрессии *NOTCH1* снижало как частоту случаев метастазирования (на 83 ± 5 %), так и количество самих метастазов (на 56 ± 8 %) по сравнению с контрольной сублинией (Рисунок 15). Таким образом, подавление экспрессии *NOTCH1* снижает способность к метастазированию клеток рака лёгкого человека.

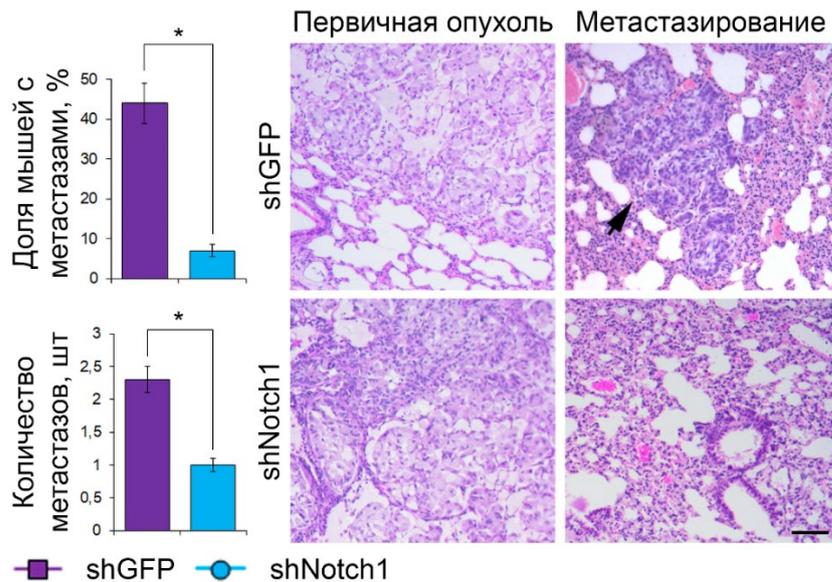


Рисунок 15 – Анализ способности к метастазированию клеток A549 при подавлении экспрессии *NOTCH1* (слева) и иммуногистохимический анализ первичной опухоли в одной из долей лёгкого и метастазов в другой, стрелкой обозначен метастаз, масштаб – 100 мкм (справа), * $p < 0,05$

3.1.3. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на поддержание пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток

Способность опухолевых клеток к метастазированию определяется, в том числе, пулом клеток с фенотипом ОСК. Принимая во внимание то, что подавление экспрессии *NOTCH1* снижало способность к метастазированию клеток А549, было решено провести один из первичных тестов по оценке доли ОСК в культуре клеток А549 и НСТ116 при подавлении экспрессии *NOTCH1* – анализ туморогенности. Туморогенный потенциал определяется по минимальной прививочной дозе клеток *in vivo*. Прививаемость клеток рассчитывалась как отношение количества мышей со сформированными ксенографтами к общему числу мышей в контрольных или экспериментальных группах. В результате было выявлено, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к увеличению минимальной прививочной дозы для обеих клеточных сублиний, то есть к снижению туморогенного потенциала клеток рака лёгкого и толстой кишки человека (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на туморогенность клеток А549 и НСТ116

Количество клеток в прививочной дозе, шт.	Число мышей со сформированными опухолями/число мышей в группе, шт.	
	shGFP	shNotch1
Клеточная линия А549		
1×10 ⁶	10/10	10/10
0,5×10 ⁶	10/10	10/10
0,25×10 ⁶	8/10	5/10
0,125×10 ⁶	6/10	0/10
Клеточная линия НСТ116		
2×10 ⁶	10/10	8/10
1×10 ⁶	10/10	5/10
0,5×10 ⁶	6/10	1/10
0,25×10 ⁶	2/10	0/10

Для достоверной оценки полученных результатов были проведены стандартные *in vitro* тесты по определению пула и фенотипа ОСК в культуре. Цитофлуориметрический анализ активности АВС-транспортеров выявил снижение доли клеток, способных к исключению красителя Родамин 123, в сублиниях shNotch1 на 50±15 % для А549 и на 54±15 % для НСТ116 по сравнению с контрольными (Рисунок 16). Эффективность колониеобразования в полужидкой среде клеток сублиний shNotch1 снизилась на 45±13 % для А549 и на 45±15 % для НСТ116 по сравнению с контрольными (Рисунок 17).

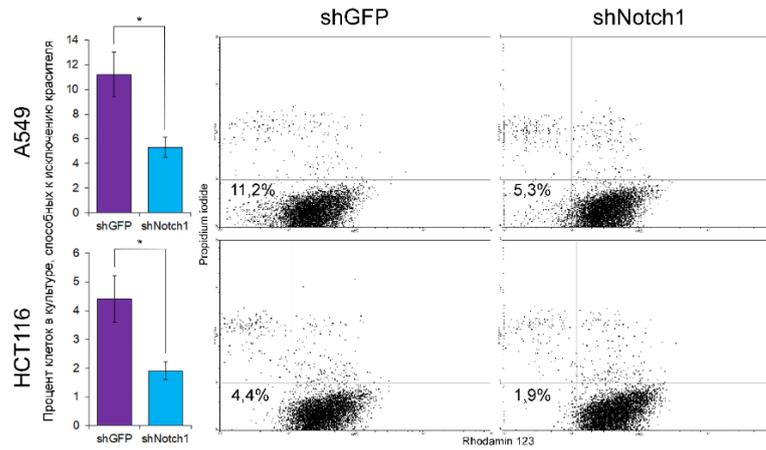


Рисунок 16 – Цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортеров на способность к исключению красителя Родамин 123 клетками A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*, * $p < 0,05$

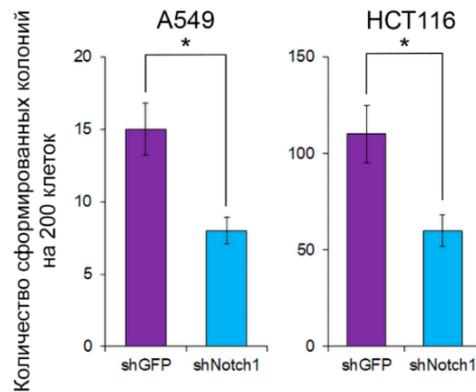


Рисунок 17 – Анализ колониеобразования в полужидкой среде клеток A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*, * $p < 0,05$

Одним из основных маркеров ОСК является CD133. Цитофлуориметрический анализ доли клеток, характеризующихся продукцией CD133, выявил её снижение в сублиниях shNotch1 на $82 \pm 7\%$ для A549 и на $78 \pm 6\%$ для HCT116 по сравнению с контролем (Рисунок 18).

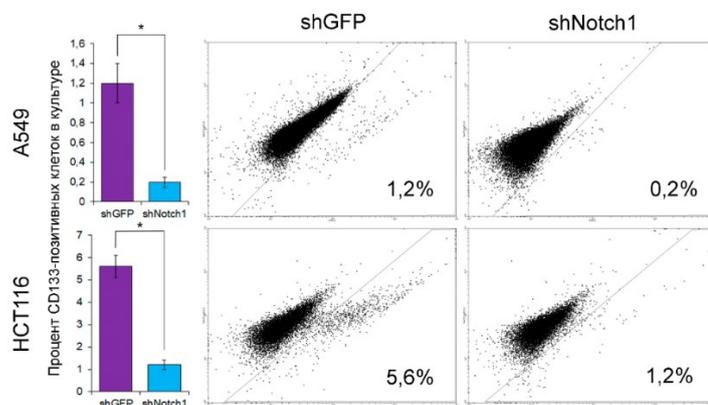
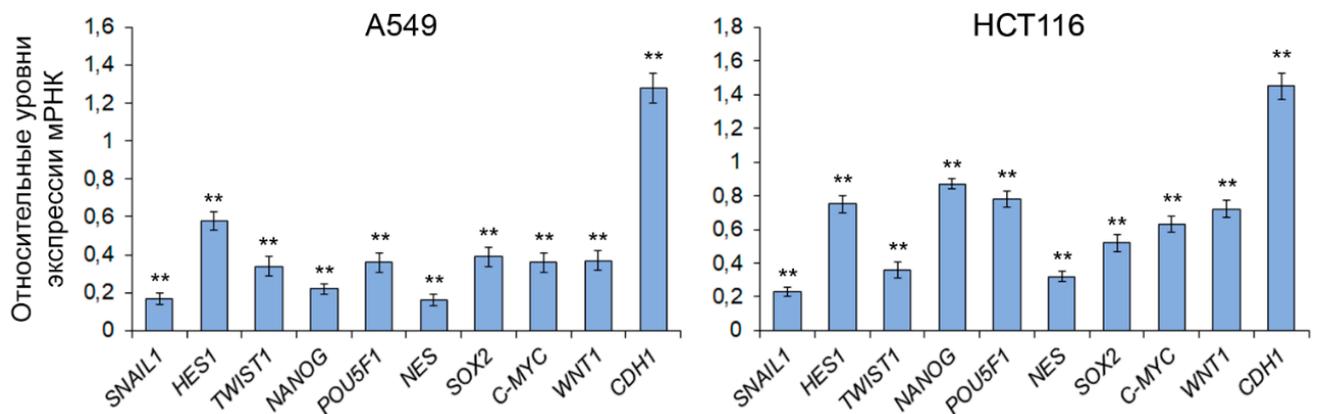


Рисунок 18 – Цитофлуориметрический анализ доли клеток A549 и HCT116, продуцирующих CD133, при подавлении экспрессии *NOTCH1*, * $p < 0,05$

Основываясь на полученных результатах, было решено проанализировать, как подавление экспрессии *NOTCH1* влияет на экспрессию генов, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии, в клетках A549 и HCT116. По результатам анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database [235] было выбрано несколько целевых генов сигнального пути Notch, связанных с формированием клеточных контактов (*SNAIL1*, *WNT1*, *CDH1*), клеточной морфологией (*NES*), клеточным ростом и выживаемостью (*TWIST1*, *NANOG*), поддержанием плюрипотентности стволовых клеток (*POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*), протоонкогенов и регуляторов их экспрессии (*C-MYC*, *HES1*). ПЦР-РВ-анализ выявил, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению экспрессии всех вышеперечисленных генов, кроме *CDH1* (белковый продукт – E-кадгерин, компонент межклеточных адгезионных контактов), экспрессия которого, наоборот, повышается (Рисунок 19) [287].



Экспрессия каждого гена нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу, ** $p < 0,01$.

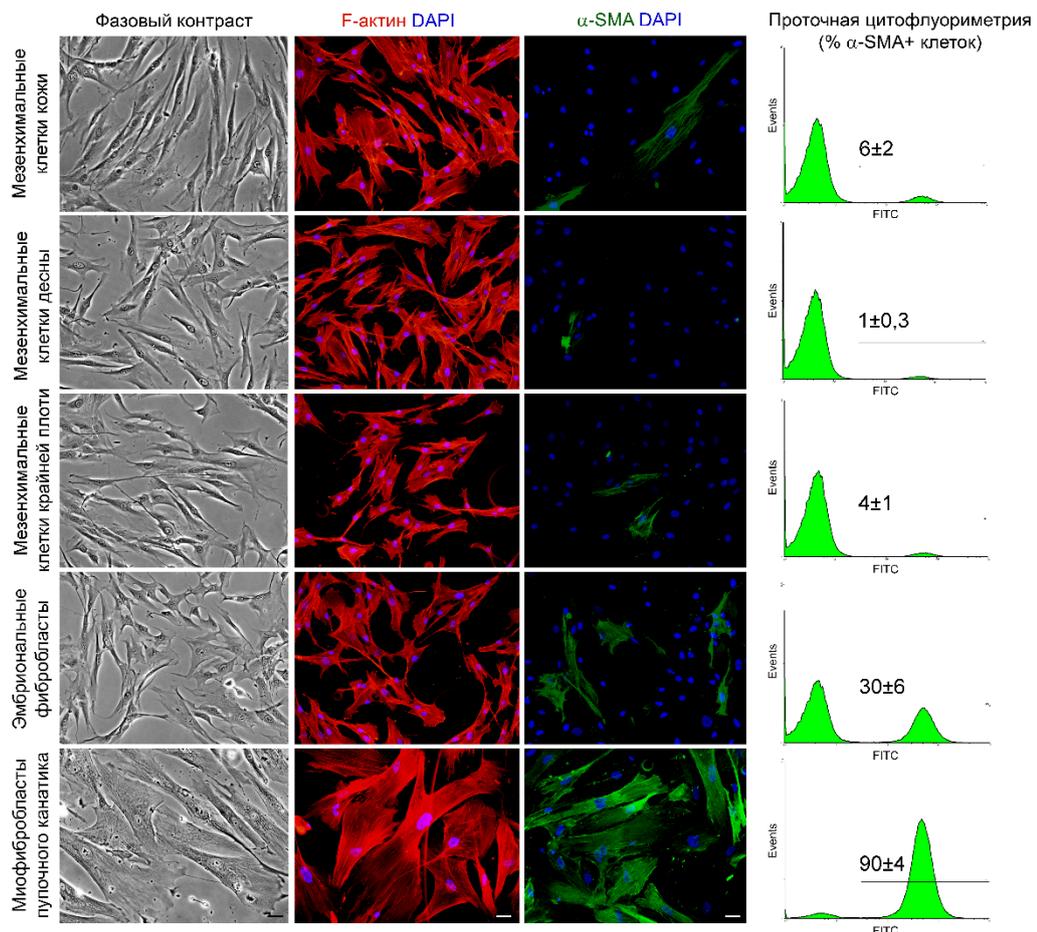
Рисунок 19 – ПЦР-РВ-анализ некоторых Notch-зависимых генов, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии, в клетках A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1*

Таким образом, экспрессия *NOTCH1* в клетках карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека необходима для поддержания пула и фенотипа ОСК, а также экспрессии Notch-зависимых генов, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии [236, 237]. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению злокачественных характеристик данных клеток *in vitro* и *in vivo*.

3.2. Значимость экспрессии *NOTCH1* для взаимодействия опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения

3.2.1. Способность первичных культур мезенхимальных клеток стимулировать опухолевый рост

В работе были использованы первичные культуры мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности: кожа, десна, крайняя плоть, эмбриональные фибробласты (ЭФ) и миофибробласты пупочного канатика (МФПК). Одним из основных маркеров большинства популяций ОАФ является продукция ими α -SMA, поэтому методами проточной цитофлуориметрии и иммунофлуоресцентной микроскопии была оценена доля α -SMA-позитивных клеток в данных культурах (Рисунок 20).



Микрофотографии (слева), иммунофлуоресцентное окрашивание маркера мезенхимальных клеток – F-актина, α -SMA (ядра визуализированы с помощью DAPI, масштаб – 100 мкм) (посередине) и цитофлуориметрический анализ доли α -SMA-позитивных клеток в культурах (справа).

Рисунок 20 – Характеристика первичных культур мезенхимальных клеток

Исследуемые культуры мезенхимальных клеток значительно отличались по доле α -SMA-позитивных клеток, поэтому было решено изучить, как эта характеристика влияет на их способность стимулировать опухолевый рост *in vivo*. Лабораторным животным подкожно вводили смесь клеток НСТ116 и культур мезенхимальных клеток, спустя 21 сутки, оценивали объём сформированных ксенографтов. В результате проведённого эксперимента было выявлено, что мезенхимальные клетки, характеризовавшиеся высоким процентом α -SMA-позитивных клеток в культуре (ЭФ и МФк), обладали ярко выраженной способностью стимулировать опухолевый рост *in vivo* (увеличение объема терминальных ксенографтов на $77\pm 8\%$ и $86\pm 4\%$, соответственно, по сравнению с контрольными, сформированными НСТ116), в то время как мезенхимальные клетки с низким процентом α -SMA-позитивных клеток в культуре (клетки кожи, десны и крайней плоти), практически не обладали ей (Рисунок 21).

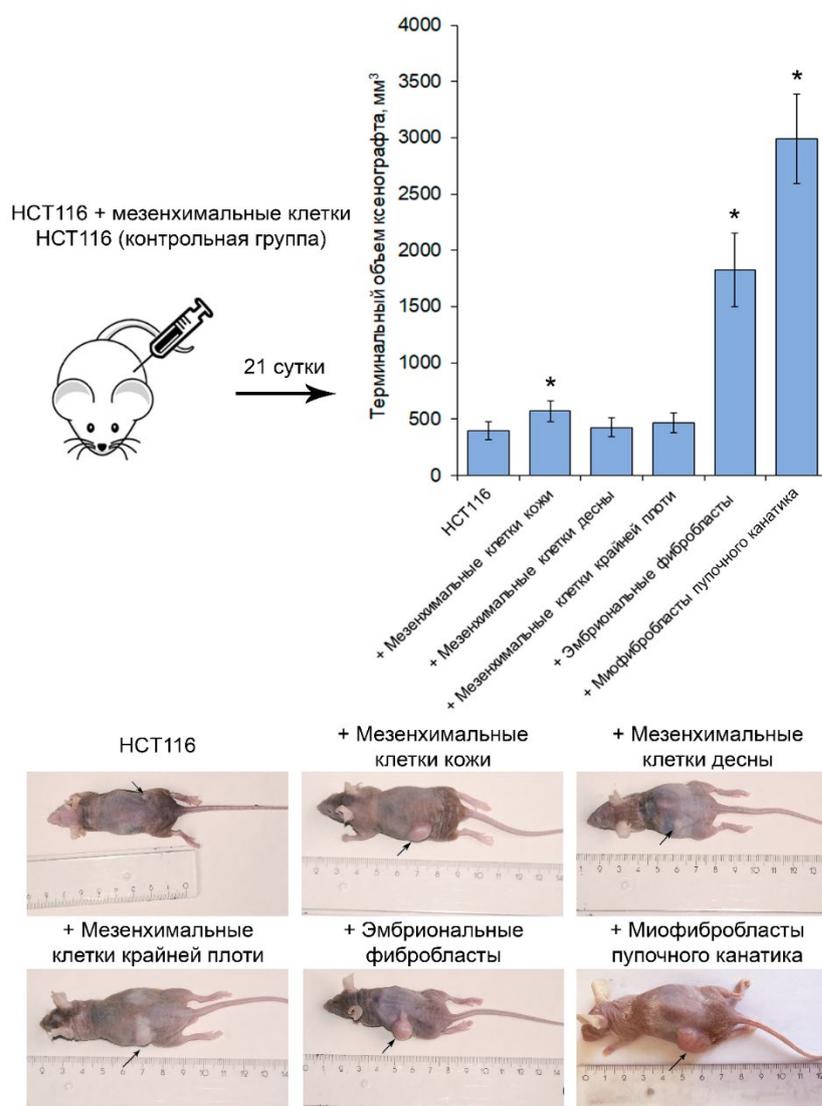


Рисунок 21 – Диаграмма терминальных объёмов подкожных ксенографтов, сформированных смесью мезенхимальных клеток и НСТ116 (сверху), фотографии терминированных лабораторных животных с ксенографтами (снизу), * $p < 0,05$

Однако, одна из культур мезенхимальных клеток десны (МКд), характеризовавшаяся $2 \pm 0,5\%$ α -SMA-позитивных клеток, обладала способностью стимулировать опухолевый рост *in vivo* в отличие от другой культуры МКд с $1 \pm 0,3\%$ α -SMA-позитивных клеток (Рисунок 22).

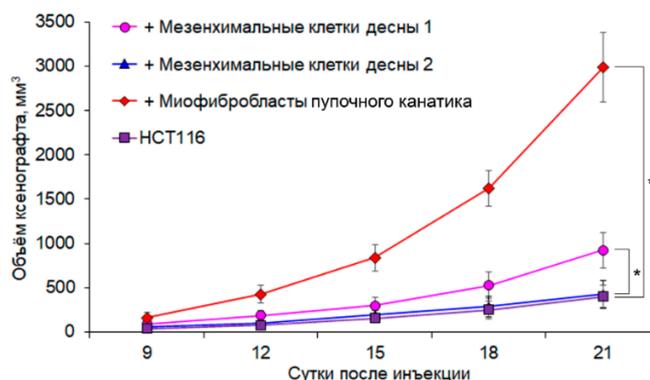


Рисунок 22 – Динамика роста подкожных ксенографтов, сформированных НСТ116 и двумя культурами МКд, по сравнению с динамикой роста подкожных ксенографтов, сформированных НСТ116 и МФпк, или только НСТ116, $*p < 0,05$

На основании полученных данных было предположено, что опухоль-стимулирующая способность МКд1 может быть обусловлена продукцией неких молекул, которой не характеризуется культура МКд2. Методом проточной цитофлуориметрии была получена более подробная характеристика культур МКд и проведено её сравнение с характеристиками МФпк, однако статистически значимых различий между культурами МКд выявлено не было (Таблица 6).

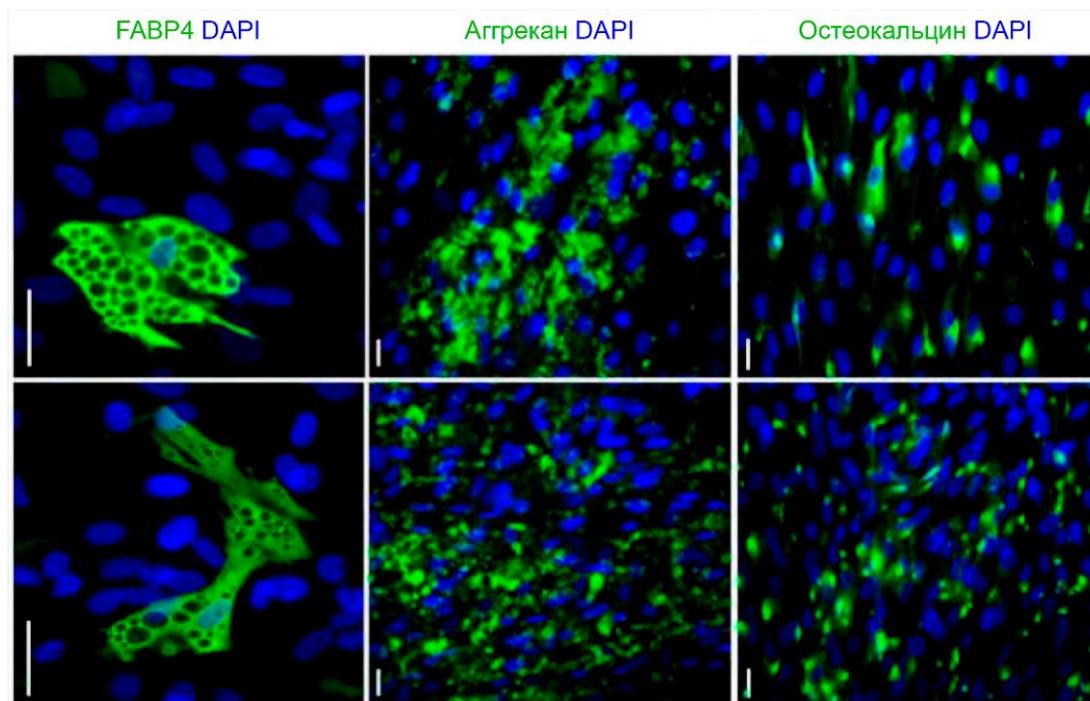
Таблица 6 – Сравнение доли (%) клеток, продуцирующих некоторые специфические маркеры, в культурах МКд и МФпк

	МКд1	МКд2	МФпк
Мезенхимальные маркеры			
CD73 (экто-5'-нуклеотидаза)	>99	>95	>99
CD90 (антиген Thy-1)	>95	>99	>99
CD105 (эндоглин)	>95	>95	>95
CD146 (МСАМ или MUC18)	>95	>95	>95
Коллаген I	>95	>99	>99
Коллаген III	>95	>95	>95
Эластин	>99	>99	>99
Виментин	>99	>99	>99
Р4НВ (пролил 4-гидроксилаза)	>99	>99	>99
Гематопоэтические/эндотелиальные маркеры			
CD31 (молекула адгезии тромбоцит-эндотелиальных клеток)	<1	<1	<0,5
CD34 (антиген гематопоэтических клеток-предшественников)	<0,1	<0,1	<0,1
CD45 (антиген лимфоцитов)	<0,5	<0,5	<0,5

Эпителиальные маркеры			
CD324 (Е-кадгерин)	<0,1	<0,1	<0,1
Цитokerатины 14 – 16, 19	<0,5	<0,5	<0,5
Маркеры дифференцировки			
Агрекан	<1	<1	<0,5
Остеокальцин	<1	<1	<0,5
FABP4 (белок, связывающий жирные кислоты)	<0,5	<0,5	<0,5
α -SMA	<2,5	<1,5	>90

Обе культуры успешно продемонстрировали способность к трём основным видам дифференцировки – хондро-, остео- и адипогенной (Рисунок 23). Таким образом, изучаемые культуры МКд можно классифицировать как мезенхимальные стволовые клетки десны (МСКд).

На основании полученных результатов, было предположено, что опухоле-стимулирующая способность МСКд1 может быть реализована посредством активности межклеточных сигнальных путей, обеспечивающих гетеротипические взаимодействия между опухолевыми и мезенхимальными клетками микроокружения.



Ядра визуализированы с помощью DAPI, масштаб – 100 и 200 мкм.

Рисунок 23 – Иммунофлуоресцентный анализ маркеров хондро- (агрекан), остео- (остеокальцин) и адипогенной (FABP4) дифференцировки культур МКд

3.2.2. Notch-зависимый механизм α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

На основании анализа данных литературы, посвящённой вовлечённости межклеточных сигнальных путей в механизмы взаимодействия опухолевых с мезенхимальными клетками микроокружения, было предположено, что в приобретении опухоль-стимулирующей способности МСКд1 может быть задействован сигнальный путь Notch. Методом иммуноблоттинга было выявлено, что МСКд1 характеризуются продукцией полноразмерного трансмембранного рецептора NOTCH1 (~300 кДа) (далее – МСКд-Notch1⁺), а МСКд2 – нет (далее – МСКд-Notch1⁻). Клетки HCT116, в свою очередь, продуцируют лиганд сигнального пути Notch – JAGGED1 (Рисунок 24).

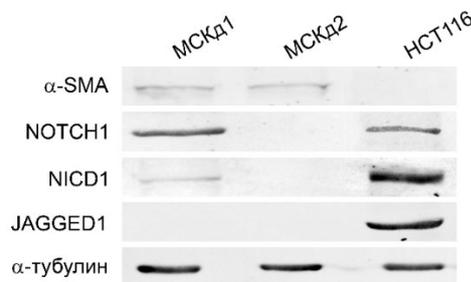
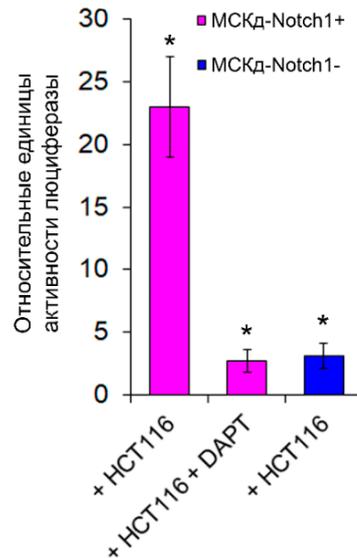


Рисунок 24 – Иммуноблоттинг α -SMA, NOTCH1, NICD1 и JAGGED1 в МСКд и HCT116

Таким образом, после контактного взаимодействия HCT116 и МСКд-Notch1⁺ в мезенхимальных клетках может быть запущен сигнальный путь Notch. Основываясь на данном предположении и результатах экспериментов *in vivo*, были проведены эксперименты по кокультивированию МСКд и HCT116 *in vitro*.

С помощью люциферазного анализа была изучена транскрипционная активность *NOTCH1* в МСКд после их контактного взаимодействия с HCT116. Для этого были получены модифицированные культуры МСКд, содержащие генно-инженерный репортерный лентивирусный конструкт, где *Luc* находится под контролем NICD1-зависимого промотора RBP (далее – МСКд RBP). Повышение транскрипционной активности *NOTCH1* (в 23±4 раза), как и ожидалось, было зафиксировано только в МСКд-Notch1⁺ RBP после их кокультивирования с HCT116. Для подтверждения полученных результатов был использован специфический ингибитор γ -секретазы – DAPT, применение которого полностью блокирует запуск сигнального пути Notch. Добавление DAPT в культуральную среду при кокультивировании МСКд-Notch1⁺ RBP и HCT116 снизило транскрипционную активность *NOTCH1* в мезенхимальных клетках до исходного уровня. Данные по оценке

транскрипционной активности *NOTCH1* в МСКд-Notch1⁻ RBP при их кокультивировании с НСТ116 в присутствии DAPT отсутствуют ввиду нецелесообразности эксперимента (Рисунок 25). Таким образом, контактное взаимодействие Notch1-позитивных МСКд и НСТ116 действительно приводит к запуску Notch в мезенхимальных клетках.



Активность люциферазы на диаграмме нормирована относительно её активности в клетках МСКд RBP, которая принята за единицу, * $p < 0,05$.

Рисунок 25 – Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* в МСКд после контактного взаимодействия с НСТ116

По данным иммунофлуоресцентной микроскопии контактное взаимодействие МСКд и НСТ116 приводило к увеличению доли α -SMA-позитивных клеток (до 50%) только в культуре МСКд-Notch1⁺, в то время как доля α -SMA-позитивных клеток в МСКд-Notch1⁻ оставалась практически на исходном уровне. Для детекции мезенхимальных клеток после их кокультивирования с НСТ116 использовали окрашивание на F-актин.

Для точной оценки доли α -SMA-позитивных МСКд после контакта с НСТ116 были созданы модифицированные культуры МСКд, стабильно экспрессирующие зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein – GFP), чтобы после их кокультивирования можно было различить опухолевые и мезенхимальные клетки при использовании проточной цитофлуориметрии. Модификация МСКд не повлияла на исходную долю α -SMA-позитивных клеток в культуре. Было выявлено увеличение доли α -SMA-позитивных МСКд-Notch1⁺ и МСКд-Notch1⁻ после взаимодействия с НСТ116 до $47 \pm 6\%$ и $3 \pm 0,5\%$, соответственно. Добавление DAPT в культуральную среду при кокультивировании МСКд-Notch1⁺ и НСТ116 снизило долю α -SMA-позитивных клеток практически до исходного уровня (до $3 \pm 0,7\%$). Данные по оценке доли α -SMA-позитивных клеток при кокультивировании МСКд-Notch1⁻ и

НСТ116 с применением DAPT отсутствуют ввиду нецелесообразности эксперимента. Результаты иммунофлуоресцентного и цитофлуориметрического анализа полностью согласовывались друг с другом (Рисунки 26, 27).

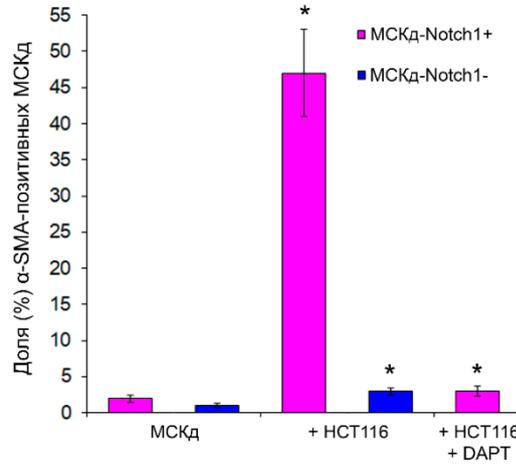


Рисунок 26 – Цитофлуориметрический анализ доли α -SMA-позитивных МСКд после контактного взаимодействия с НСТ116 в отсутствие и присутствии DAPT, $*p < 0,05$

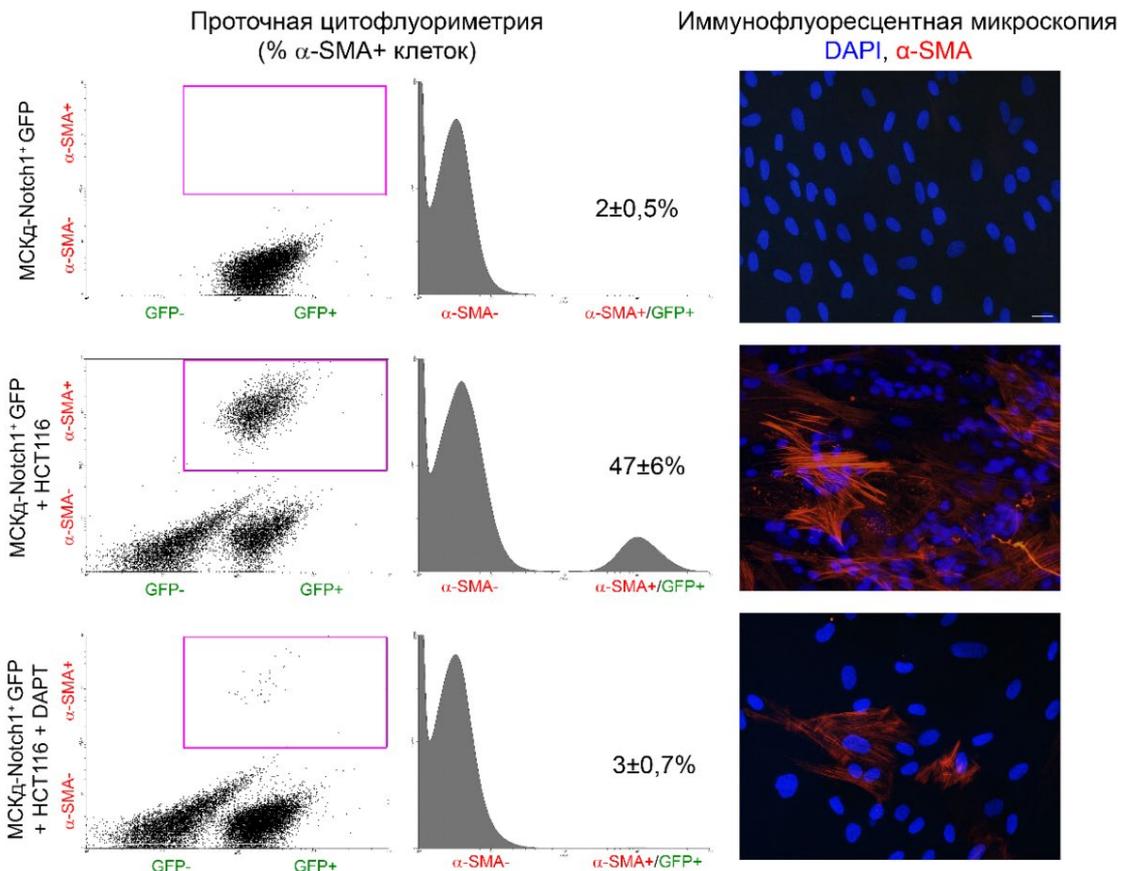


Рисунок 27 – Цитофлуориметрический (слева) и иммунофлуоресцентный (масштаб – 100 мкм, справа) анализ доли α -SMA-позитивных МСКд-Notch1⁺ после контактного взаимодействия с НСТ116 в отсутствие и присутствии DAPT

Полученные данные свидетельствуют о вовлечённости сигнального пути Notch в приобретение α -SMA-позитивной дифференцировки Notch1-позитивными МСКд после контактного взаимодействия с НСТ116.

На следующем этапе работы было изучено, насколько необходима экспрессия *NOTCH1* для α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд-Notch1⁺ с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности. Были созданы модифицированные культуры МСКд-Notch1⁺ с подавленной экспрессией *NOTCH1* (shNotch1) и МСКд-Notch1⁻ с экзогенной экспрессией *NICD1*. Методом иммуноблоттинга было выявлено отсутствие продукции α -SMA в культуре МСКд-Notch1⁺ shNotch1 и значительное повышение в МСКд-Notch1⁻ *NICD1* (Рисунок 28). По данным цитофлуориметрического анализа доля α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток в культуре МСКд-Notch1⁺ shNotch1 снизилась до $0,9\pm 0,05\%$, а в культуре МСКд-Notch1⁻ *NICD1* возросла до $53\pm 3\%$.

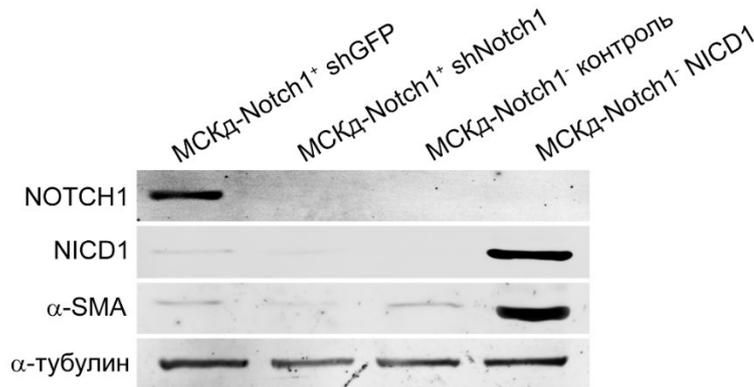
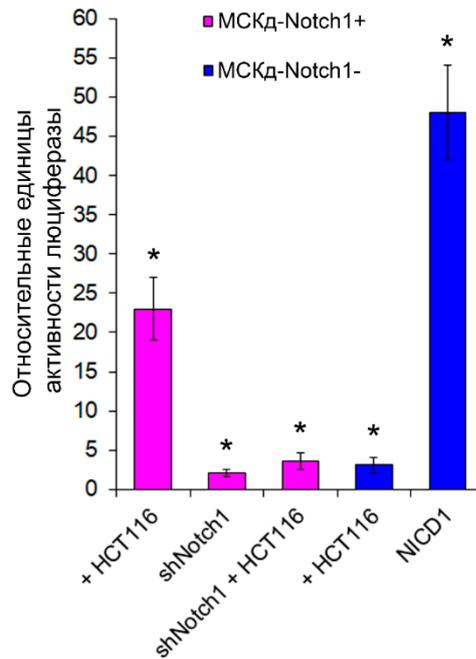


Рисунок 28 – Иммуноблоттинг NOTCH1, NICD1, α -SMA в МСКд-Notch1⁺ shNotch1 и МСКд-Notch1⁻ *NICD1*

Кокультивирование МСКд-Notch1⁺ shNotch1 RBP и НСТ116 не приводило к повышению транскрипционной активности *NOTCH1*, в то время как экзогенная экспрессия *NICD1* в МСКд-Notch1⁻ RBP повысила её в 48 ± 6 раз по сравнению с контрольными культурами (Рисунок 29). Таким образом, экспрессия *NOTCH1* необходима для индукции α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд.



Активность люциферазы на диаграмме нормирована относительно её активности в клетках контрольных культур МСКд RBP, которая принята за единицу, $*p < 0,05$.

Рисунок 29 – Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* в МСКд RBP после контактного взаимодействия с HCT116 и/или модификаций

Далее было изучено, как данная модификация культур МСКд влияет на их опухоле-стимулирующую способность. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к потере опухоле-стимулирующей способности МСКд-Notch1⁺ *in vivo*. Терминальный объём ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁺ shNotch1 и HCT116, был на 41±29% меньше, чем объём ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁺ и HCT116, и не имел статистически значимой разницы с объёмом ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁻ и HCT116. Экзогенная экспрессия *NICD1* в МСКд-Notch1⁻, напротив, приводила к приобретению опухоле-стимулирующей способности. Терминальный объём ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁻ *NICD1* и HCT116, был на 54±27% больше, чем объём ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁻ и HCT116, и не имел статистически значимой разницы с объёмом ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁺ и HCT116 (Рисунок 30).

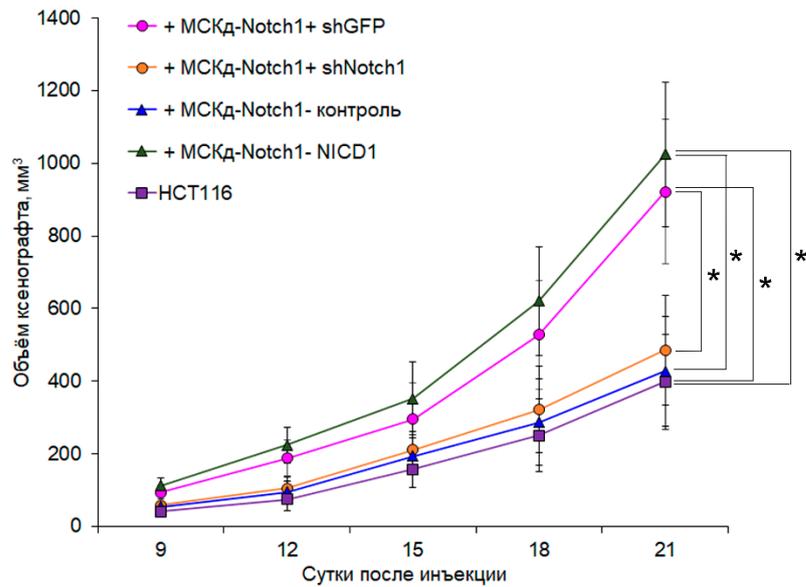


Рисунок 30 – Динамика роста подкожных ксенографтов, сформированных НСТ116 и модифицированными культурами МСКд, * $p < 0,05$

Таким образом, активность сигнального пути Notch необходима как для α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд, так и для дальнейшего приобретения ими опухоль-стимулирующей способности.

3.2.3. Роль *TP53* в Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировке МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

На следующем этапе работы было проведено изучение молекулярного механизма Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности. Роль опухолевого супрессора P53 в опухолевой прогрессии доказана для многих ЗНО различной этиологии, поэтому было решено проверить, может ли он быть задействован в исследуемом механизме. Была создана модифицированная культура МСКд-Notch1⁺ NICD1 для возможности оценки роли P53 в данном механизме без необходимости контактного взаимодействия МСКд и НСТ116. Методом РНК-интерференции была подавлена экспрессия *TP53* в исходной МСКд-Notch1⁺ и модифицированной культуре МСКд-Notch1⁺ NICD1. Эффективность подавления экспрессии *TP53* была подтверждена методами ПЦР-РВ (снижение до $1,2 \pm 0,05\%$ в МСКд-Notch1⁺ и до $1 \pm 0,04\%$ в МСКд-Notch1⁺ NICD1 shTP53) и иммуноблоттинга (снижение до $2 \pm 0,4\%$ в МСКд-Notch1⁺ и до $2,1 \pm 0,3\%$ в МСКд-Notch1⁺ NICD1 shTP53). По данным иммуноблоттинга подавление экспрессии *TP53* не оказало влияния на продукцию NICD1, однако приводило к значительному снижению продукции α -SMA в культуре МСКд-Notch1⁺ NICD1 (Рисунок 31). По данным

цитофлуориметрического анализа доля α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток в культуре МСКд-Notch1⁺ NICD1 при подавлении экспрессии *TP53* снизилась до $4,3 \pm 0,1\%$, а в исходной культуре сохранилась на первоначальном уровне. Таким образом, экспрессия *TP53* необходима для Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд.

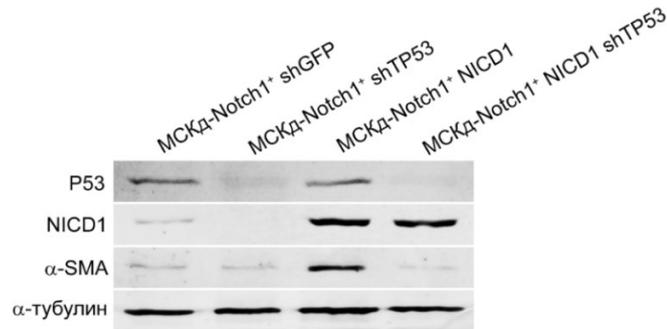
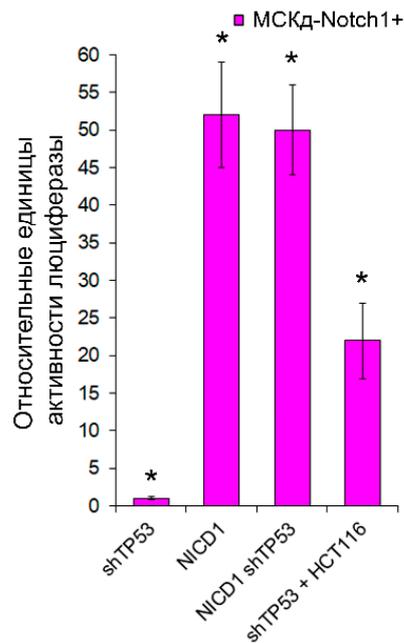


Рисунок 31 – Иммуноблоттинг P53, NICD1, α -SMA в модифицированных культурах МСКд-Notch1⁺

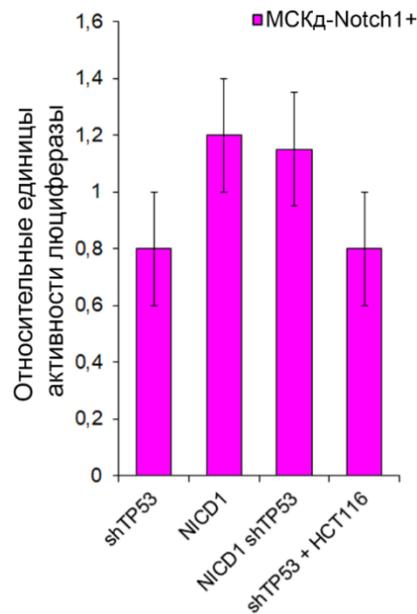
Подавление экспрессии *TP53* не оказало влияния на транскрипционную активность *NOTCH1* ни в исходных МСКд-Notch1⁺, ни при экзогенной экспрессии в них *NICD1*, ни при кокультивировании с НСТ116 (Рисунок 32). Таким образом, экспрессия *TP53* не задействована в индукции сигнального пути Notch.



Активность люциферазы на диаграмме нормирована относительно её активности в клетках контрольных культур МСКд-Notch1⁺ RBP, которая принята за единицу, * $p < 0,05$.

Рисунок 32 – Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* в МСКд-Notch1⁺ RBP после контактного взаимодействия с НСТ116 и/или модификаций

На основании полученных результатов, было решено изучить, как активность сигнального пути Notch влияет на транскрипционную активность *TP53*. Подавление экспрессии *TP53*, как и ожидалось, не повлияло на транскрипционную активность *TP53*, так как в исходных клетках МСКд-Notch1⁺ она не детектируется. Однако, ни экзогенная экспрессия NICD1 в МСКд-Notch1⁺ и МСКд-Notch1⁺ shTP53, ни кокультивирование с НСТ116 клеток МСКд-Notch1⁺ shTP53 не приводили к изменению транскрипционной активности *TP53* (Рисунок 33). Таким образом, активность сигнального пути Notch не влияет на P53-зависимую транскрипцию целевых генов.



Активность люциферазы на диаграмме нормирована относительно её активности в клетках контрольных культур МСКд-Notch1⁺ RBP, которая принята за единицу, $p > 0,05$.

Рисунок 33 – Люциферазный анализ транскрипционной активности *TP53* в культурах МСКд-Notch1⁺ RBP после контактного взаимодействия с НСТ116 и/или модификаций

Далее было изучено, как подавление экспрессии *TP53* влияет на опухоле-стимулирующую способность МСКд-Notch1⁺. Терминальный объём ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁺ shTP53 и НСТ116, был на $58 \pm 29\%$ меньше, чем объём ксенографтов, сформированных МСКд-Notch1⁺ и НСТ116, и не имел статистически значимой разницы с ксенографтами, сформированными только НСТ116. (Рисунок 34).

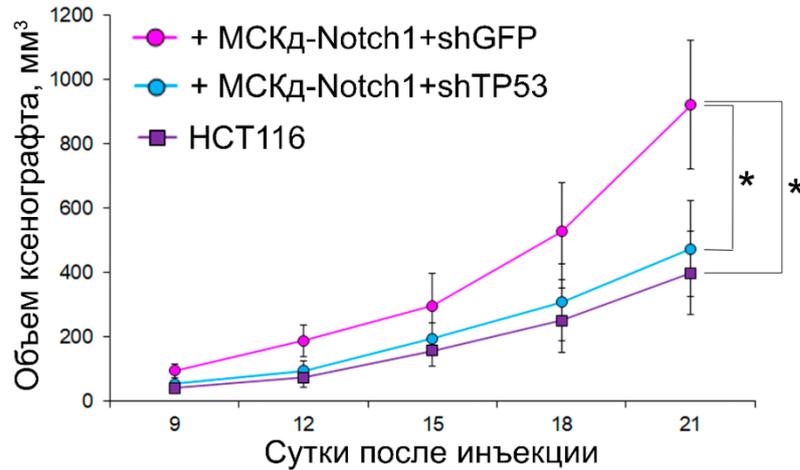


Рисунок 34 – Динамика роста ксенографтов, сформированных HCT116 и модифицированными культурами MCKd-Notch1⁺, * $p < 0,05$

Таким образом, подавление экспрессии *TP53* приводит к значительному снижению опухоль-стимулирующей способности Notch1-позитивных MCKд. Иными словами, экспрессия *TP53* не задействована в индукции сигнального пути Notch в MCKд, однако она необходима для их дальнейшей α -SMA-позитивной дифференцировки и приобретения опухоль-стимулирующей способности, что свидетельствует о непосредственной вовлечённости P53 в качестве ко-фактора в изучаемый механизм [238].

3.2.4. Роль TGF- β 1 в α -SMA-позитивной дифференцировке MCKд

На последнем этапе работы было решено изучить, продукцией каких молекул может быть обусловлена опухоль-стимулирующая способность дифференцированных MCKд-Notch1⁺. Согласно литературным данным, фактор роста опухолей TGF- β 1 играет значительную роль как в прогрессии опухолевых клеток, так и в приобретении фенотипа ОАФ, поэтому было изучено, может ли он быть задействован в исследуемом механизме.

В первую очередь был использован сам TGF- β 1 для оценки его влияния на дифференцировку MCKд-Notch1⁺. По данным цитофлуориметрического и иммунофлуоресцентного анализа, спустя 72 часа после внесения TGF- β 1 в культуральную среду MCKд-Notch1⁺ доля α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток возросла до $51 \pm 5\%$, а на 5-ый пассаж достигла $90 \pm 7\%$, что свидетельствует о способности TGF- β 1 запускать механизм α -SMA-позитивной дифференцировки MCKд-Notch1⁺ (Рисунок 35).

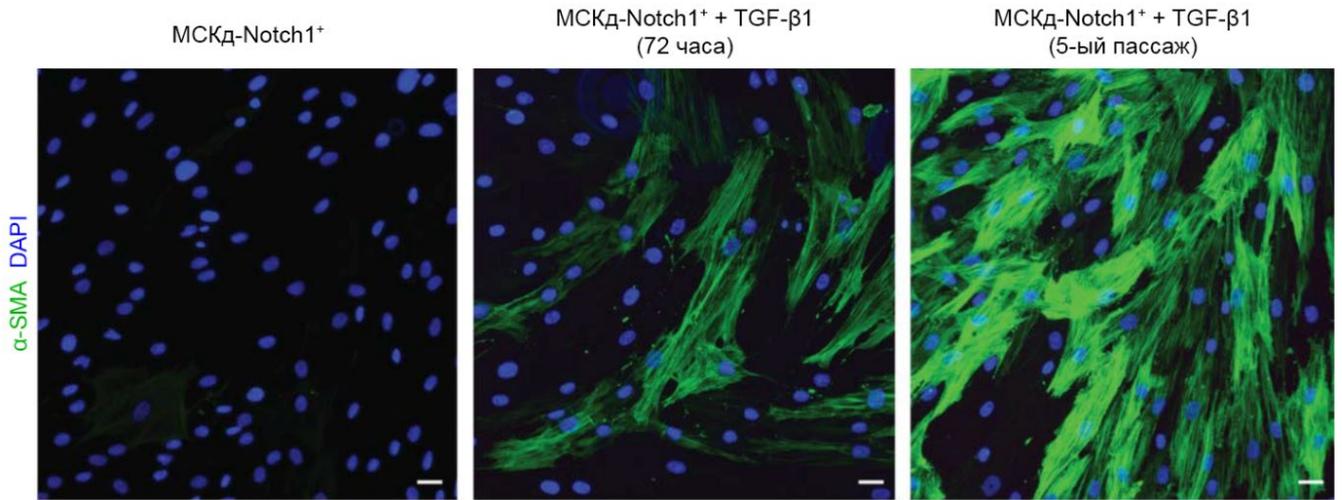


Рисунок 35 – Иммунофлуоресцентное окрашивание на α -SMA MCKd-Notch1⁺ после воздействия TGF- β 1, масштаб – 100 мкм

Для достоверной оценки уровня экспрессии *TGFB1* клетками MCKd-Notch1⁺ после их кокультивирования с НСТ116 был применён метод классического ПЦР-анализа. В качестве положительного контроля были использованы МФк, характеризующееся 90±4% α -SMA-позитивных клеток в культуре. Анализ тотальной мРНК MCKd-Notch1⁺ и НСТ116, культивированных совместно, выявил больше ПЦР-продукта *TGFB1* по сравнению со смесью мРНК MCKd-Notch1⁺ и НСТ116, культивированных отдельно, но меньше, чем в мРНК МФк (Рисунок 36). Таким образом, контактное взаимодействие MCKd-Notch1⁺ и НСТ116 приводит к увеличению экспрессии *TGFB1* MCKd-Notch1⁺.

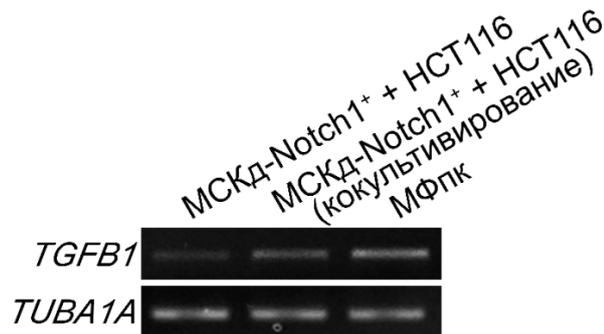
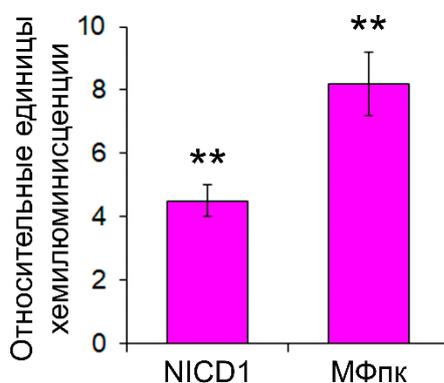


Рисунок 36 – ПЦР-анализ экспрессии *TGFB1*

Далее было изучено, как запуск сигнального пути Notch в MCKd-Notch1⁺ влияет на уровень продукции ими TGF- β 1 в культуральную среду. С помощью ИФА было выявлено, что уровень продукции TGF- β 1 при экзогенной экспрессии *NICD1* в MCKd-Notch1⁺ возрастает в 4,5±0,5 раза по сравнению с исходной культурой, однако он ниже в 1,9±0,4 раза по сравнению с

МФпк (Рисунок 37). Таким образом, запуск сигнального пути Notch в МСКд приводит к повышению продукции ими TGF- β 1.



Уровень продукции TGF- β 1 нормирован относительно его продукции клетками контрольной культуры МСКд-Notch1⁺, которая принята за единицу, ** $p < 0,01$.

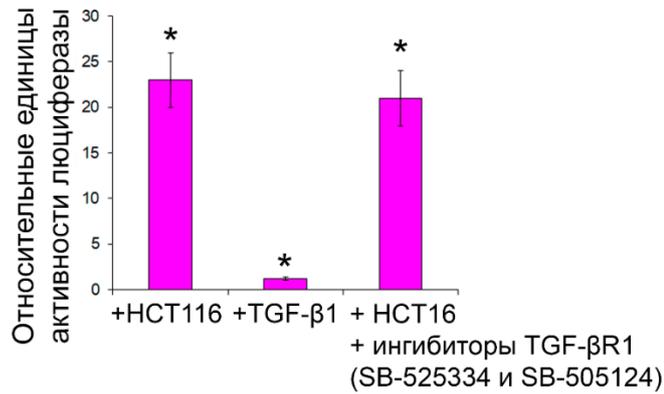
Рисунок 37 – ИФА TGF- β 1 в культуральной среде МСКд-Notch1⁺ при экзогенной экспрессии *NICD1* по сравнению с МФпк

Основываясь на полученных данных, было предположено, что α -SMA-позитивная дифференцировка МСКд-Notch1⁺ может осуществляться по механизму аутокринной регуляции через рецепторы TGF- β R1, которые присутствуют у МСКд-Notch1⁺, поэтому было изучено влияние селективных ингибиторов TGF- β R1 на транскрипционную активность *NOTCH1* и долю α -SMA-позитивных МСКд-Notch1⁺ в культуре.

Однако, ни добавление TGF- β 1 в культуральную среду МСКд-Notch1⁺ RBP, ни ингибиторов TGF- β R1 в культуральную среду при кокультивировании МСКд-Notch1⁺ RBP и НСТ116 не оказало влияния на уровень транскрипционной активности *NOTCH1* (Рисунок 38). Таким образом, активность сигнального пути Notch не зависит от TGF- β 1-сигналинга.

Добавление ингибиторов TGF- β R1 в культуральную среду МСКд-Notch1⁺ снижало долю α -SMA-позитивных клеток в культуре до $1,5 \pm 0,3\%$, а при кокультивировании с НСТ116 значительно снижало её до $6 \pm 3\%$ (Рисунок 39).

Таким образом, запуск сигнального пути Notch в Notch1-позитивных МСКд стимулирует продукцию ими TGF- β 1, а дальнейшая α -SMA-позитивная дифференцировка МСКд в культуре может осуществляться по механизму аутокринной регуляции через рецепторы TGF- β R1.



Активность люциферазы нормирована относительно её активности в клетках MCKd-Notch1⁺ RBP, которая принята за единицу, * $p < 0,05$.

Рисунок 38 – Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* в MCKd-Notch1⁺ RBP в присутствии TGF-β1 и после их контактного взаимодействия с HCT116 в присутствии/отсутствии ингибиторов TGF-βR1

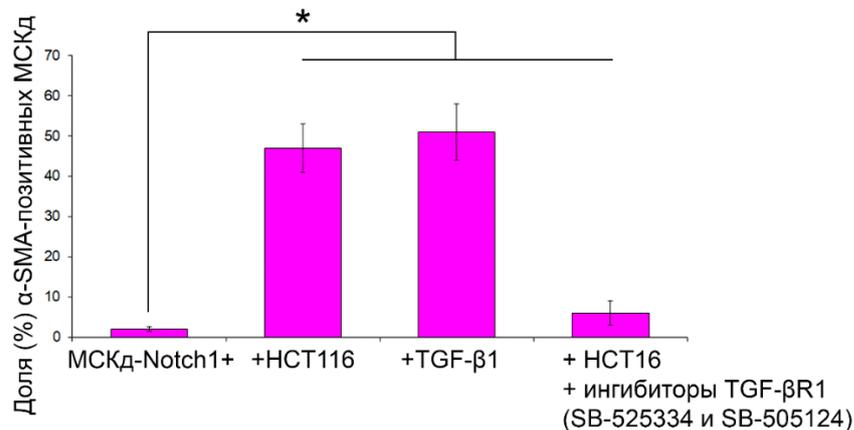
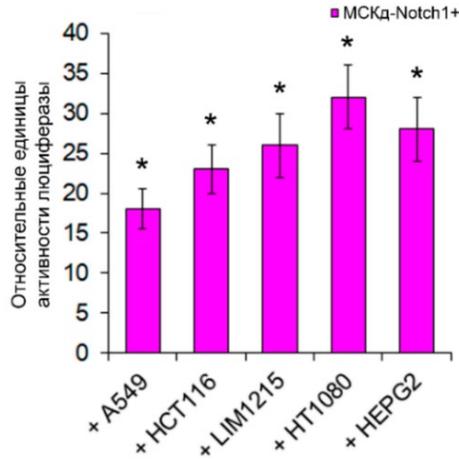


Рисунок 39 – Цитофлуориметрический анализ доли α-SMA-позитивных клеток в культуре MCKd-Notch1⁺ в присутствии TGF-β1 и после их контактного взаимодействия с HCT116 в присутствии/отсутствии ингибиторов TGF-βR1, * $p < 0,05$

3.2.5. Универсальность механизма Notch-индуцированной α-SMA-позитивной дифференцировки MCKд

В завершение работы было решено изучить, насколько универсальным является механизм Notch-индуцированной α-SMA-позитивной дифференцировки MCKд. Было проверено, может ли он быть запущен опухолевыми клетками других линий, характеризующихся экспрессией хотя бы одного из лигандов сигнального пути Notch, который достоверно способен связываться с NOTCH1, – JAGGED1 или DLL. Были выбраны несколько подходящих клеточных линий: немелкоклеточного рака лёгкого A549 [239, 240], толстой кишки LIM1215, фибросаркомы HT1080 и ГЦК HEPG2 человека. Контактное взаимодействие

клеток данных линий с МСКд-Notch1⁺ приводило к повышению транскрипционной активности *NOTCH1* в 15 – 36 раз (Рисунок 40) и увеличению доли α -SMA-позитивных МСКд-Notch1⁺ в культуре до 37 – 63 % (Рисунок 41).



Активность люциферазы на диаграмме нормирована относительно её активности в клетках культуры МСКд-Notch1⁺ RBP, которая принята за единицу, * $p < 0,05$.

Рисунок 40 – Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* в культурах МСКд-Notch1⁺ RBP после контактного взаимодействия с клетками A549, LIM1215, НТ1080 и НЕРG2

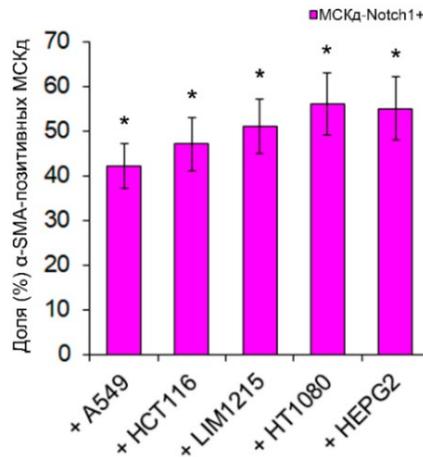


Рисунок 41 – Цитофлуориметрический анализ доли α -SMA-позитивных МСКд-Notch1⁺ после контактного взаимодействия с клетками A549, LIM1215, НТ1080 и НЕРG2, * $p < 0,05$

Таким образом, в рамках данной части работы был изучен механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСК с приобретением ими опухоле-стимулирующей способности, реализуемый посредством контактного взаимодействия МСК, характеризующихся наличием рецептора NOTCH1, и опухолевых клеток, продуцирующих хотя бы один из лигандов сигнального пути Notch, который достоверно способен связываться с NOTCH1.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Значимость экспрессии *NOTCH1* для прогрессии карцином легкого и толстой кишки человека

В рамках данной части работы была исследована значимость экспрессии гена, кодирующего рецептор сигнального пути Notch – NOTCH1, для прогрессии карцином лёгкого и толстой кишки человека. В качестве объекта исследования были выбраны именно эти типы ЗНО, поскольку они являются одними из самых распространённых и характеризуются неблагоприятным прогнозом с относительно высокой вероятностью летального исхода. Работа была выполнена на клеточных линиях немелкоклеточного рака лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека. Приобретение более злокачественного фенотипа опухолевыми клетками и их прогрессия во многом зависят от активности сигнальных путей, в частности Notch.

Характеристики опухолевых клеток, такие как пролиферативный, миграционный и инвазивный потенциал, в значительной степени обуславливают прогрессию ЗНО, поэтому в первую очередь было изучено, как подавление экспрессии *NOTCH1* влияет на фенотип и морфологию клеток A549 и HCT116. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к приобретению более эпителиоидной морфологии, снижению пролиферативного, миграционного и инвазивного потенциала *in vitro* и, как следствие, подавлению опухолевого роста *in vivo*.

Способность к метастазированию является одной из ключевых характеристик опухолевых клеток, определяющих прогрессию ЗНО. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению частоты случаев метастазирования и количества метастазов при ортотопическом введении клеток A549.

Таким образом, экспрессия *NOTCH1* важна для поддержания злокачественного фенотипа клетками рака лёгкого и толстой кишки человека.

Опухоль-иницирующие клетки впервые были детектированы в 1994 году при изучении гетерогенной культуры клеток ОМЛ, как клетки, способные формировать лимфомы при введении иммунодефицитным мышам. По многим характеристикам они были схожи с гемопоэтическими стволовыми клетками. Впоследствии опухоль-иницирующие клетки, обладающие способностью формировать опухоли *in vivo* и схожие по характеристикам со стволовыми клетками соответствующего гистогенетического происхождения, были обнаружены в подавляющем большинстве ЗНО, включая рак молочной железы, лёгкого, поджелудочной железы, колоректальный рак, ГЦК, меланому и пр. Такие клетки получили общее название – опухолевые стволовые клетки [241, 242]. Наличие пула клеток с фенотипом

ОСК обуславливает, в том числе, способность опухоли к метастазированию, поэтому на следующем этапе данной работы было решено изучить, как подавление экспрессии *NOTCH1* влияет на способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК клетками A549 и HCT116.

На сегодняшний день анализ способности клеток формировать опухоли при введении иммунодефицитным лабораторным животным, в частности мышам, признан «золотым стандартом» верификации ОСК в культуре [243]. Для проведения данного эксперимента в основном используются два типа иммунодефицитных мышей – «nude» и NOD/SCID. Мыши «nude» характеризуется отсутствием волосяного покрова и тимуса из-за мутации гена *FOXP3* и, как следствие, не имеют зрелых Т-клеток [244]. Мыши NOD/SCID не обладает врожденным и адаптивным иммунитетом и могут быть получены в результате скрещивания мыши линии NOD, не имеющей NK-клеток и антигенпрезентирующих клеток, и мыши линии SCID, не имеющей В- и Т-лимфоцитов [245]. Теоретически, одиночная ОСК, введённая в иммунодефицитное животное, должна быть способна дать начало опухоли, поэтому при проведении данного эксперимента используют широкий диапазон концентраций опухолевых клеток для выявления минимальной прививочной дозы. Однако, на практике эффективность формирования опухолей ОСК может сильно зависеть от клеточной линии, гистогенетического происхождения, модели, места и способа введения и пр. Наиболее предпочтительной является ортотопическая трансплантация, однако технически она далеко не всегда возможна [241, 246]. В данной работе был использован подкожный способ введения опухолевых клеток мышам «nude», однако этого оказалось достаточно для получения достоверных и воспроизводимых результатов. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к увеличению минимальной прививочной дозы для обеих клеточных линий A549 и HCT116, то есть к снижению их туморогенного потенциала.

В 1996 году была детектирована популяция клеток костного мозга мыши, характеризующаяся низким окрашиванием Hoechst 33342 (краситель, флуоресцирующий при связывании с двуцепочечной ДНК), которая была впоследствии названа «side-population» (SP) из-за своего расположения на точечной диаграмме проточного цитометрического анализа [247]. В 2001 году было доказано, что столь низкая способность к окрашиванию объясняется активной работой АТФ-связывающих кассетных (ATP-binding cassette – ABC) транспортеров. Белки семейства ABC-транспортеров являются трансмембранными и имеют специфический ABC-домен, который АТФ-зависимым способом позволяет удалять из клетки мелкие эндогенные молекулы, такие как ионы, пептиды, желчные кислоты, холестерол и пр. во внеклеточное пространство [248]. Нормальные стволовые клетки, как и ОСК используют данный механизм для исключения цитотоксичных веществ. Однако, роль ABC-транспортеров в приобретении и поддержании множественной лекарственной устойчивости ОСК доказана для

множества ЗНО, в том числе для плоскоклеточного рака головы и шеи, мочевого пузыря, эндометрия, яичников, поджелудочной железы, лёгкого, ГЦК, глиобластомы и пр. [249, 250, 251, 252]. В частности, с помощью SP-анализа была выявлена активность ABC-транспортеров ABCA2, MDR1 и MRP1 в клетках линий рака лёгкого H460, H23, НТВ-58, А549, Н441 и Н2170, что обеспечивало их повышенную резистентность к химиотерапевтическим препаратам первой линии – цисплатину, гемцитабину и винорелбину [253]. Цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортеров клеток А549 и НСТ116 при подавлении экспрессии *NOTCH1* был проведён с использованием двойного окрашивания на пропидий йодид для исключения мёртвых клеток и Родамин 123. В результате было показано, что подавление экспрессии *NOTCH1* снижает долю клеток, способных к исключению красителя, т.е. активность ABC-транспортеров.

Ещё одним, широко используемым тестом на детекцию ОСК в культуре является субстрат-независимое колониобразование. ОСК способны гораздо более эффективно формировать колонии из одиночных клеток и расти в виде сфероидов в неадгезивных условиях по сравнению с опухолевыми клетками, не обладающими фенотипом ОСК [254, 255]. Молекулярные механизмы, наделяющие ОСК данной способностью, на сегодняшний день остаются малоизученными. Однако, данная методика детекции ОСК в культуре имеет два неоспоримых недостатка: невозможность отличать колонии, сформированные из одной клетки, от клеточных агрегатов и выявлять покоящиеся, практически неделящиеся клетки, обладающие фенотипом ОСК [255]. Анализ колониобразования в полужидкой среде выявил уменьшение количества колоний, сформированных клетками А549 и НСТ116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*.

На сегодняшний день одним из распространённых способов детекции ОСК в культуре являются различные маркеры, которые служат для диагностики и прогнозирования течения заболевания. CD133, также известный как проминин-1, был детектирован на клеточной поверхности нейроэпителиальных стволовых клеток в 1997 году. Он является трансмембранным гликопротеином, продуцируемым эмбриональными эпителиальными и гемопоэтическими стволовыми клетками, вовлечён в организацию топологии плазматической мембраны и поддержание её липидной структуры [256, 257]. Впоследствии CD133-позитивные опухолевые клетки были обнаружены в образцах ЗНО различной этиологии: мозг, молочная железа, лёгкое, простата, поджелудочная железа, печень, яичник, кожа, ЖКТ и пр. Выделенные с помощью проточной цитофлуориметрии CD133-позитивные опухолевые клетки большинства типов ЗНО способны эффективно формировать опухоли у иммунодефицитных мышей, оставаться в недифференцированном состоянии при культивировании на бессывороточной среде и отличаются более злокачественным фенотипом [258, 259, 260, 261, 262]. Подавление

экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению доли CD133-позитивных клеток в культурах A549 и HCT116.

Активность проонкогенных сигнальных путей запускает экспрессию целевых генов, задействованных в поддержании пула и фенотипа ОСК и индукции ЭМП, без чего ключевые этапы опухолевой прогрессии, такие как инвазия, метастазирование и рецидивирование, были бы невозможны. По результатам анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database [235] было выбрано несколько целевых генов сигнального пути Notch, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии. Экспрессия *POU5F1* (также известен как *OCT4*), *SOX2*, *NANOG* играет значительную роль в эмбриогенезе и поддержании пула и фенотипа стволовых клеток, поэтому она также важна для поддержания пула и фенотипа ОСК. Роль экспрессии данных генов в индукции ЭМП тоже доказана [242, 263]. Экспрессия *SNAIL1*, *TWIST1*, *HES1* в большей степени важна для индукции и процесса ЭМП, однако она также необходима для поддержания пула и фенотипа ОСК [264]. Экспрессия *C-MYC*, кодирующего одноимённый протоонкоген, играет роль в дифференцировке и обновлении стволовых клеток. Она детектируется в опухолевых клетках при подавляющем большинстве ЗНО [264, 265]. Гиперактивность сигнального пути Wnt- β -катенин, как доказано многочисленными исследованиями, важна для поддержания пула и фенотипа ОСК и индукции ЭМП [242]. В данном эксперименте был изучен уровень экспрессии *WNT1*, кодирующего один из лигандов данного сигнального пути. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению экспрессии вышеперечисленных генов в клетках A549 и HCT116.

Е-кадгерин является одним из основных компонентов межклеточных адгезионных контактов. Снижение экспрессии кодирующего его гена – *CDH1* может свидетельствовать о запуске ЭМП и служит неблагоприятным прогнозом при большинстве типов солидных опухолей [264, 266, 267]. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к увеличению экспрессии *CDH1*. Принимая во внимание данные микроскопического анализа, согласно которому клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* выглядели более эпителиоидными, подавление экспрессии *NOTCH1* способствует нормализации клеточного фенотипа, в частности посредством частичного восстановления экспрессии *CDH1*.

Таким образом, экспрессия *NOTCH1* в клетках рака лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека необходима для поддержания пула и фенотипа ОСК, а также экспрессии Notch-зависимых генов, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии.

Несомненно, на сегодняшний день открыто множество механизмов, обуславливающих поддержание пула и фенотипа ОСК, в том числе перестройка актинового цитоскелета [268]. Однако, важность разработки терапевтических стратегий для ингибирования сигнального пути Notch и его компонентов при лечении ЗНО различной этиологии не оставляет сомнений. Как

обсуждалось в главе, посвящённой обзору литературы, на сегодняшний день существует множество классов ингибиторов Notch. Некоторые из них продемонстрировали высокую эффективность подавления опухолевого роста на различных моделях *in vitro* и *in vivo*. К сожалению, результаты множества исследований доказывают, что возможность применения GSI в клинической практике отсутствует ввиду большого количества побочных эффектов, чаще всего выражающихся в нарушении функций ЖКТ. Большинство нежелательных явлений от применения GSI можно объяснить тем, что γ -секретаза вовлечена во многие клеточные процессы и имеет более 90 известных на сегодняшний день субстратов, помимо рецепторов Notch. Следовательно, последствия терапии GSI являются мало прогнозируемыми. Таким образом, глобальное ингибирование Notch, учитывая его плейотропность в норме и при ЗНО, является не рациональной стратегией. Основываясь на полученных результатах и анализе данных литературы, можно заключить, что более целесообразным представляется смещение вектора разработок терапевтических стратегий в сторону нацеливания на подавление экспрессии Notch-зависимых генов и/или снижение активности Notch-зависимых сигнальных путей. Согласно последним литературным данным, такие исследования уже ведутся и нами, в том числе. Например, показано, что NICD1 способен образовывать комплекс с β III-тубулином в ядре. Терапия таксолом приводит к увеличению его количества, что влечет за собой накопление NICD1 и повышение экспрессии целевых генов сигнального пути Notch, связанных со злокачественной прогрессией [269]. Основываясь на этих данных, мы сфокусировались на разработках новых ингибиторов тубулина, нацеленных на сайт связывания колхицина [270].

4.2. Значимость экспрессии *NOTCH1* для взаимодействия опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения

В рамках данной части работы был исследован молекулярный механизм взаимодействия опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, реализуемый посредством активности межклеточного сигнального пути Notch. ОАФ, несомненно, являются одним из самых важных клеточных компонентов микроокружения опухоли, поскольку вовлечены во все этапы развития ЗНО: инициация, прогрессия, инвазия, метастазирование и пр. Одной из характерных черт большинства популяций ОАФ является наличие стресс-фибрилл, содержащих α -SMA. ОАФ активно секретируют молекулы, способствующие опухолевой прогрессии [271].

В первую очередь была исследована корреляционная зависимость между долей α -SMA-позитивных клеток в имеющихся первичных культурах мезенхимальных клеток человека различного гистогенетического происхождения и их опухоль-стимулирующей способностью *in vivo*. Для воссоздания модели опухоли с микроокружением была выбрана клеточная линия

карциномы толстой кишки человека HCT116. Мезенхимальные клетки активно вовлечены в поддержание структуры и гомеостаза кишечника, однако миофибробласты крайне редко встречаются в его нормальной слизистой оболочке [272]. При неопластической трансформации мезенхимальные клетки реагируют на сигналы микроокружения, в основном исходящие от опухолевых клеток, привлекаются в очаг и формируют среду, благоприятствующую росту и развитию опухоли.

Как и ожидалось, между долей α -SMA-позитивных клеток в культуре и способностью к стимуляции опухолевого роста есть прямая зависимость. Однако, одна из культур мезенхимальных клеток десны, характеризовавшаяся низким процентом α -SMA-позитивных клеток, обладала ярко выраженной опухоль-стимулирующей способностью по сравнению с культурой с практически такой же низкой долей α -SMA-позитивных клеток и идентичным гистогенетическим происхождением.

В главе, посвящённой обзору литературы, упоминалось, что, благодаря современным технологиям секвенирования одиночных клеток, было выявлено, что популяции ОАФ характеризуются высокой гетерогенностью, даже в микроокружении одного опухолевого очага. Поэтому был проведён более подробный сравнительный анализ характеристик двух данных культур, включающий анализ продукции ими некоторых мезенхимальных, гематопоэтических/эндотелиальных и эпителиальных маркеров, а также анализ способности к хондро-, остео- и адипогенной дифференцировке. Однако, значимых различий выявлено не было. Обе культуры продемонстрировали способность ко всем трём основным видам дифференцировки, поэтому могли быть классифицированы как МСК. Таким образом, было предположено, что опухоль-стимулирующая способность одной из культур МСКд может быть обусловлена воздействием опухолевых клеток посредством межклеточных сигнальных путей.

Согласно литературным данным, одним из межклеточных сигнальных путей, вовлечённых в механизмы взаимодействия опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, является Notch, причём он может играть как опухоль-стимулирующую, так и опухоль-супрессирующую роль. Например, при немеланомных ЗНО кожи активность Notch снижена в мезенхимальных клетках, находящихся в непосредственном контакте с опухолевыми очагами. Несмотря на это, потеря CSL мезенхимальными клетками достаточна для инициации многоочаговых опухолей из кератиноцитов у мышей [273], а полная инактивация Notch ассоциирована с приобретением мезенхимальными клетками фенотипа ОАФ [274]. Таким образом, можно предположить, что активность Notch необходима для обеспечения опухоль-супрессирующей функции мезенхимальных клеток. Однако, рецептор сигнального пути Notch – NOTCH1 активно вовлечён в приобретение фибробластами фенотипа, связанного со старением. Фибробласты, характеризующиеся данным фенотипом, могут принимать участие в

формировании реактивной стромы при опухолевой прогрессии [275]. Потеря экспрессии *NOTCH1* может менять фенотип фибробластов на провоспалительный. Фибробласты, характеризующееся данным фенотипом, также могут принимать участие в инициации развития опухолей. Потеря экспрессии *NOTCH1* в эпителии ассоциирована с перестройкой ВКМ, увеличением иммунного инфильтрата, «активацией» дермальных фибробластов, которые начинают продуцировать, в частности, эпидермальные факторы роста [276]. При раке толстой кишки Notch вовлечён в привлечение стромальных клеток костного мозга в опухолевый очаг и последующее приобретение ими «активированного» фенотипа [277]. На модели рака предстательной железы было показано, что продукция лиганда сигнального Notch – JAGGED1 опухолевыми клетками способствует увеличению доли α -SMA-позитивных фибробластов, развитию реактивной стромы с повышенным содержанием тенасцина-С и коллагена [140]. В данных случаях повышение активности Notch, а не её снижение, связано с «активацией» фибробластов. Исходя из вышеприведённых примеров, можно заключить, что Notch действительно играет двоякую роль в прогрессии ЗНО, обусловленной взаимодействием опухолевых и мезенхимальных (стромальных) клеток микроокружения, которая может зависеть от уровня его активности.

Принимая во внимание то, что НСТ116 характеризуются продукцией лиганда JAGGED1, было изучено, обладают ли культуры МСКд продукцией хотя бы одного из рецепторов Notch. Действительно, только культура МСКд, способная к стимуляции опухолевого роста, характеризовалась продукцией полноразмерного рецептора NOTCH1. На основании полученного результата был проведён анализ транскрипционной активности *NOTCH1* после контактного взаимодействия NOTCH1-позитивных МСКд и НСТ116. Таким образом, было выявлено, что оно действительно приводит к запуску Notch в мезенхимальных клетках. В соответствии с полученными данными была проведена серия экспериментов, доказывающих прямую зависимость между запуском сигнального пути Notch в МСКд и приобретением ими α -SMA-позитивного опухоль-стимулирующего фенотипа. Применение ингибитора γ -секретазы – DAPT достоверно приводило к подавлению транскрипционной активности *NOTCH1* в МСКд-Notch1⁺ после взаимодействия с НСТ116 и снижению доли α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток практически до уровня исходной культуры. Были созданы модифицированные культуры МСКд: Notch1-позитивные с подавленной экспрессией *NOTCH1* и Notch1-негативные с экзогенной экспрессией эффекторного домена NOTCH1 – NICD1. Экспрессия *NICD1* способна запускать Notch в клетках без связывания рецептора с лигандом. Notch1-позитивные МСКд с подавленной экспрессией *NOTCH1* практически потеряли способность к α -SMA-позитивной дифференцировке и к дальнейшей стимуляции опухолевого роста после взаимодействия с НСТ116, а Notch1-негативные МСКд с экзогенной экспрессией

NICD1, напротив, приобрели α -SMA-позитивную дифференцировку без взаимодействия с HCT116 и способность к стимуляции опухолевого роста. Таким образом, активность Notch необходима для α -SMA-позитивной дифференцировки с приобретением опухоль-стимулирующей способности МСКд.

На следующем этапе работы было проведено изучение данного молекулярного механизма дифференцировки МСКд. Согласно литературным данным, изменение функции опухолевого супрессора P53 играет роль не только в опухолевой прогрессии, обусловленной характеристиками самих опухолевых клеток, но в механизмах прогрессии, ассоциированных со свойствами клеточных компонентов микроокружения опухолей [278]. P53 дикого типа может индуцировать продукцию α -SMA, например, в макрофагах [279]. Поэтому было решено изучить вовлечённость P53 в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности. Подавление экспрессии *TP53* не повлияло на запуск сигнального пути Notch в МСКд-Notch1⁺ как после контактного взаимодействия с HCT116, так и при экзогенной экспрессии *NICD1*. Однако, оно приводило к потере способности к α -SMA-позитивной дифференцировке и стимуляции опухолевого роста. Кроме этого, запуск Notch в МСКд не оказывал никакого влияния на транскрипционную активность *TP53*. Таким образом, P53 выступает в роли ко-фактора в исследуемом механизме, то есть он не задействован в запуске Notch, но необходим для дальнейшей α -SMA-позитивной дифференцировки с приобретением опухоль-стимулирующей способности МСКд.

Согласно литературным данным, особенность фенотипа ОАФ, приобретённого после привлечения в очаг опухолевыми клетками, состоит в том, что он более не требует воздействия внешних стимулов для дальнейшего поддержания, поскольку в ОАФ запускается секреция специфических медиаторов, действующих по аутокринному механизму [280]. Фактор роста опухолей TGF- β 1 является одним из наиболее значимых стимулов привлечения мезенхимальных клеток к опухолевому очагу и их дифференцировки в ОАФ [281, 282]. TGF- β 1 вызывает у фибробластов формирование стресс-фибрилл, содержащих α -SMA, снижает их пролиферативный потенциал и способность к миграции, повышает адгезию и стимулирует секрецию широкого спектра молекул: коллагены, тенасцины, матриксные металлопротеиназы, факторы роста (в том числе сам же TGF- β 1), хемокины, цитокины и пр. Воздействие молекул, продуцируемых ОАФ, на опухолевые клетки способствует их прогрессии [283]. Действительно, воздействие TGF- β 1 на МСКд-Notch1⁺ приводило к значительному повышению доли α -SMA-позитивных клеток в культуре, но не влияло на активность Notch. Запуск Notch в МСКд-Notch1⁺ как после контактного взаимодействия с HCT116, так и при экзогенной экспрессии *NICD1*, приводил к повышению экспрессии *TGFB1* и продукции во внеклеточную среду TGF- β 1. МСКд-Notch1⁺ характеризуются наличием рецепторов TGF- β 1 – TGF- β R1. Применение их

ингибиторов не влияло на активность Notch, но приводило к потере способности к α -SMA-позитивной дифференцировке. Таким образом, запуск Notch в Notch1-позитивных МСКд стимулирует продукцию ими TGF- β 1. Однако, дальнейшая α -SMA-позитивная дифференцировка мезенхимальных клеток в культуре может происходить по механизму аутокринной регуляции при наличии рецепторов TGF- β R1 у соседних мезенхимальных клеток.

Универсальность изученного механизма Notch-зависимой α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности была подтверждена на других линиях опухолевых клеток, продуцирующих хотя бы один из лигандов Notch, который достоверно способен связываться с NOTCH1 (линии немелкоклеточного рака лёгкого A549, толстой кишки LIM1215, фибросаркомы HT1080 и ГЦК HEPG2 человека). Его схема представлена на рисунке 42. Кроме этого, по нашим данным, этот молекулярный механизм может быть запущен дистантно посредством внеклеточных везикул, продуцируемых опухолевыми клетками [284]. Таким образом, опухолевая прогрессия, обусловленная взаимодействием опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, действительно может стимулироваться посредством сигнального пути Notch.

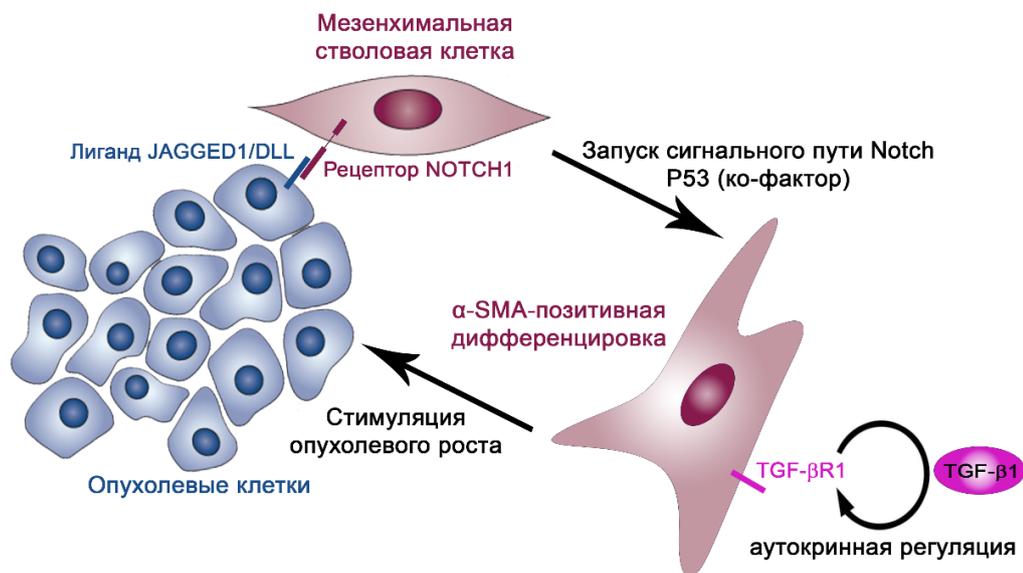


Рисунок 42 – Схема изученного механизма Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСК с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

Не только мезенхимальные клетки могут стимулировать опухолевый рост за счет своей дифференцировки, например, нами было показано, что у клеток немелкоклеточного рака лёгкого человека линии H1975 развивается устойчивость к цитотоксическому действию макрофагов в результате контакта с ними, что приводит к приобретению более

злокачественного фенотипа опухолевыми клетками, причём TGF- β также вовлечён в данный механизм [285].

Как обсуждалось в главе, посвящённой обзору литературы, многие терапевтические стратегии, нацеленные на межклеточные сигнальные пути опухолевых клеток, влияют не только на сами опухолевые клетки, но и практически на все типы клеток микроокружения, включая ОАФ. Таким образом, некоторые специалисты сосредоточились на разработках препаратов, нацеленных на подавление активности молекул, продукция которых непосредственно зависима от активности межклеточных сигнальных путей. Однако, ожидаемых результатов это пока не принесло. Например, клинические испытания ингибиторов матриксных металлопротеиназ выявили их высокий уровень токсичности и нежелательные эффекты на клетки, играющие опухоль-супрессивную роль [286]. Возможно, экспрессия рецепторов сигнального пути Notch в ОАФ может служить диагностическим или прогностическим маркером течения онкологических заболеваний.

Эпителиальный и мезенхимальный компартменты тесно связаны друг с другом не только в опухолях, но и в норме, а изменение активности межклеточных сигнальных путей, особенно таких плейотропных как Notch, в одном компартменте оказывает существенное влияние на другой. Молекулярные механизмы межклеточных гетеротипических взаимодействий, которые стремительно меняются по мере опухолевой прогрессии, несомненно, требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сигнальный путь Notch является одним из самых древних и высококонсервативных путей *Metazoa*. Он задействован в гомо- и гетеротипических взаимодействиях множества типов клеток при эмбриональном развитии и поддержании гомеостаза взрослого организма, поэтому нарушения его активности связаны с широким спектром заболеваний, в том числе онкологических.

Объектами исследования являлись клеточные линии карцином лёгкого, толстой кишки, фибросаркомы и ГЦК человека. Культуры первичных мезенхимальных клеток человека были использованы для воссоздания модели взаимодействия опухолевых клеток с микроокружением.

Целью данной работы являлось изучение роли рецептора сигнального пути Notch – NOTCH1 в опухолевой прогрессии, обусловленной свойствами самих опухолевых клеток и их взаимодействием с мезенхимальными клетками микроокружения.

Методология исследования включала биоинформатический анализ, методы генной инженерии (РНК-интерференция, экзогенная экспрессия), классические (световая микроскопия, *in vitro* тесты, ПЦР, иммуноблоттинг) и современные высокоточные методы (иммунофлуоресцентная микроскопия, ПЦР-РВ, проточная цитофлуориметрия, ИФА и пр.) анализа клеточного фенотипа и морфологии, а также *in vivo* эксперименты с участием иммунодефицитных бестимусных мышей. Ко всем полученным данным был применён статистический анализ.

Подавление экспрессии *NOTCH1* в клетках карцином лёгкого А549 и толстой кишки НСТ116 человека приводило к ослаблению их злокачественных характеристик *in vitro*: приобретение более эпителиоидного фенотипа, снижение скорости пролиферации, эффективности колониеобразования в адгезивных условиях, миграционной активности и *in vivo* – снижение скорости роста подкожных ксенографтов. Кроме этого, подавление экспрессии *NOTCH1* снижало способность к метастазированию клеток А549 при ортотопическом введении, поэтому было проанализировано влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на формирование пула и фенотипа ОСК. Действительно, клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* характеризовались снижением туморогенного потенциала, активности АВС-транспортёров, способности к колониеобразованию в полужидкой среде и доли CD133-позитивных клеток в культуре. Подавление экспрессии *NOTCH1* также приводило к снижению экспрессии целевых генов Notch, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии, и повышению экспрессии *CDH1*. Таким образом, экспрессия *NOTCH1* необходима для прогрессии клеток рака лёгкого и толстой кишки человека.

Для изучения взаимодействия опухолевых клеток с микроокружением, были получены характеристики первичных мезенхимальных клеток человека. Две культуры клеток десны обладали низкой долей α -SMA-позитивных клеток в культуре, но различной опухоль-стимулирующей способностью. С помощью *in vitro* теста была установлена их принадлежность к МСК. Методами *in vitro* и *in vivo* была доказана значимость экспрессии *NOTCH1* для α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности. Кроме этого, была доказана роль опухолевого супрессора P53 в качестве ко-фактора и фактора TGF- β 1 в данном механизме, а также продемонстрирована его универсальность на нескольких линиях опухолевых клеток человека. Таким образом, был выявлен молекулярный механизм опухолевой прогрессии, обусловленный взаимодействием опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, реализуемый посредством Notch.

Комплексный подход к изучению механизмов опухолевой прогрессии, связанных с активностью сигнальных путей, заключается не только в изучении свойств самих опухолевых клеток, но и взаимодействий опухолевых клеток с микроокружением. Такой подход формирует наиболее обширный базис для дальнейших разработок противоопухолевых терапевтических стратегий. Полученные данные вносят вклад в фундаментальные исследования молекулярных механизмов канцерогенеза и формируют базис для прикладных разработок в области диагностики онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия NOTCH1 вовлечена в прогрессию клеток линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека, в том числе в поддержание пула опухолевых клеток с фенотипом опухолевых стволовых клеток.

2. Выявлена прямая зависимость между долей мезенхимальных клеток в культуре, позитивных по α -гладкомышечному актину (α -SMA), и их опухоль-стимулирующей способностью *in vivo*.

3. Взаимодействие JAGGED1-позитивных клеток линии HCT116 индуцирует запуск сигнального пути Notch в NOTCH1-позитивных мезенхимальных стволовых клетках, что приводит к их дифференцировке, позитивной по α -гладкомышечному актину, и приобретению опухоль-стимулирующей способности.

4. Опухолевый супрессор P53 вовлечён в качестве ко-фактора в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.

5. Фактор TGF- β 1 действует по механизму аутокринной регуляции при Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.

6. Механизм α -SMA-позитивной дифференцировки NOTCH1-позитивных мезенхимальных стволовых клеток запускается при их взаимодействии с опухолевыми клетками различной гистогенетической принадлежности, продуцирующими лиганд(-ы) сигнального пути Notch – JAGGED1 или DLL.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использованный в рамках настоящего исследования комплексный подход к оценке злокачественности фенотипа опухолевых клеток может быть экстраполирован на другие клеточные линии и их генно-модифицированные производные. В первую очередь рекомендуется изучить клеточный фенотип и морфологию методами микроскопии и *in vitro* тестами на скорость клеточной пролиферации, способность к колониообразованию в адгезивных условиях, миграционную активность и *in vivo* – динамика роста ауто-/ксенографтов. Затем рекомендуется оценить пул и фенотип ОСК в исследуемой культуре методами *in vitro*: цитофлуориметрический анализ активности АВС-транспортеров на способность к исключению красителя (-ей), анализ колониообразования в полужидкой среде, анализ экспрессии (ПЦР, ПЦР-РВ или секвенирование) и/или продукции (иммуноблоттинг, цитофлуориметрия и пр.) специфических маркеров и *in vivo* – анализ способности к метастазированию и туморогенности, т.е. оценка минимальной прививочной дозы (предпочтительно ортотопическое введение). Дополнительно рекомендуется исследовать активность сигнальных путей и/или экспрессию их компонентов, связанных с исследуемыми молекулярными механизмами, воспользовавшись соответствующими базами данных для их поиска и анализа, например KEGG PATHWAY Database.

Разработанную в рамках настоящего исследования клеточную модель можно использовать для воссоздания механизмов взаимодействия опухоли со стромальным микроокружением *in vitro* и *in vivo*. При совместном культивировании опухолевых и мезенхимальных клеток рекомендуется сначала сеять на культуральный пластик последние в нескольких повторах, выращивать до субконфлюэнтного монослоя, считать, поверх сеять опухолевые клетки в равном количестве и, спустя 3–5 суток, проводить необходимые эксперименты. При подкожной ауто-/ксенотрансплантации лабораторным животным рекомендуется вводить смесь опухолевых и мезенхимальных клеток в пропорции 1:2,5–5. В качестве контроля рекомендуется подкожно ввести в противоположный бок такое же количество опухолевых клеток, как в смеси.

Разработанные модель и подход могут быть использованы как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях, например для разработки диагностических тест-систем различных типов рака.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ABC – АТФ-связывающая кассета (от англ. ATP-binding cassette)
- C. elegans* – свободноживущая почвенная нематода (от лат. *Caenorhabditis elegans*)
- CSL – комплекс белков CBF-1/Su(H)/LAG1
- D. Melanogaster* – дрозофила фруктовая (от лат. *Drosophila melanogaster*)
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (от англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole)
- DAPT – Т-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицина) (от англ. epidermal growth factor)
- EGF – эпидермальный фактор роста (от англ. epidermal growth factor)
- FAP – белок активации фибробластов (от англ. fibroblast activation protein)
- GFP – зелёный флуоресцентный белок (от англ. green fluorescent protein)
- GSIs – ингибиторы γ -секретазы (от англ. gamma secretase inhibitors)
- GSMs – модуляторы γ -секретазы (от англ. gamma secretase modulators)
- Metazoa* – подцарство многоклеточных животных
- N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)
- NEXT – внеклеточная усечённая форма рецептора Notch (от англ. Notch extracellular truncation)
- NICD – внутриклеточный домен рецептора Notch (от англ. Notch intracellular domain)
- NLS – сигнал ядерной локализации (от англ. nuclear localization signal)
- NRR – отрицательный регуляторный регион (от англ. negative regulatory region)
- PBS – фосфатно-солевой буфер (от англ. phosphate-buffered saline)
- PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста (от англ. platelet-derived growth factor receptor)
- PFA – параформальдегид (от англ. paraformaldehyde)
- RAS – семейство малых G-белков (от англ. Rat sarcoma virus)
- RBP_j или RBP – аналогичное название комплекса белков CSL (от англ. recombination signal binding protein-j)
- SERCA – Ca²⁺-АТФаза саркоэндоплазматического ретикулума (от англ. Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase)
- TGF- β – трансформирующий фактор роста бета (от англ. transforming growth factor beta)
- TGF- β R – рецептор TGF- β (от англ. TGF- β receptor)
- VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor)
- Xenopus* – род шпорцевых лягушек
- α -SMA – α -гладкомышечный актин (от англ. α -smooth muscle actin)
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ГЦК – гепатокарцинома

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ЗНО – злокачественное новообразование
ИФА – иммуноферментный анализ
миРНК – малая интерферирующая РНК
МКд – мезенхимальные клетки десны
МСК – мезенхимальная стволовая клетка
МСКд – МСК десны
МФк – миофибробласт пупочного канатика
ОАМ – опухоль-ассоциированный макрофаг
ОАФ – опухоль-ассоциированный фибробласт
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ОСК – опухолевая стволовая клетка
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – ПЦР в режиме реального времени
Т-ОЛЛ – Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз
ЧОО – частота объективных ответов
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
ЭФ – эмбриональный фибробласт

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanahan, D. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment / D. Hanahan, L.M. Coussens // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 21. – № 3. – P. 309–322.
2. Novikova, M.V. Components of the Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and Their Role in Tumor Progression / M.V. Novikova, N.V. Khromova, P.B. Kopnin // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – Vol. 82. – № 8. – P. 861–873.
3. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза / М.В. Новикова, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова [и др.] // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2015. – Т. 2. – № 3. – С. 30–42.
4. Раздел 1. Фундаментальные основы молекулярной онкологии, сигнальные пути опухолевых клеток, Notch-сигналинг: Молекулярный канцерогенез / М.В. Новикова, П.Б. Копнин; под редакцией М.А. Красильникова и И.Б. Зборовской; Министерство здравоохранения Российской Федерации, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина. – Москва: ООО «Издательский дом «АБВ-пресс», 2016. – 416 с.; 148 × 210 мм. – Авт. указаны на с. 3–4. – Библиогр.: с. 25–33. – 500 экз. – УДК 616-006-02:577.2. – Текст: непосредственный.
5. Новикова, М.В. Сигнальный путь Notch: двоякая роль в опухолевой прогрессии и терапевтические возможности при раке мочевого пузыря / М.В. Новикова, Б.П. Копнин, П.Б. Копнин // *Онкоурология*. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 108–116.
6. Metz, C.W. Incompatibility of mutant races in *Drosophila* / C.W. Metz, C.B. Bridges // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1917. – Vol. 3. – № 12. – P. 673–678.
7. Bridges, C.B. Non-disjunction as proof of the Chromosome Theory of Heredity (concluded) / C.B. Bridges // *Genetics*. – 1916. – Vol. 1. – № 2. – P. 107–163.
8. Artavanis-Tsakonas, S. Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster* / S. Artavanis-Tsakonas, M.A. Muskavitch, B. Yedvobnick // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1983. – Vol. 80. – № 7. – P. 1977–1981.
9. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats / K.A. Wharton, K.M. Johansen, T. Xu, S. Artavanis-Tsakonas // *Cell*. – 1985. – Vol. 43. – № 3. – P. 567–581.

10. Kidd, S. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors / S. Kidd, M.R. Kelley, M.W. Young // *Molecular and Cellular Biology*. – 1986. – Vol. 6. – № 9. – P. 3094–3108.
11. Johansen, K.M. The notch gene product is a glycoprotein expressed on the cell surface of both epidermal and neuronal precursor cells during *Drosophila* development / K.M. Johansen, R.G. Fehon, S. Artavanis-Tsakonas // *The Journal of Cell Biology*. – 1989. – Vol. 109. – № 5. – P. 2427–2440.
12. Precise determination of the molecular limits of a polytene chromosome band: regulatory sequences for the Notch gene are in the interband / M.C. Rykowski, S.J. Parmelee, D.A. Agard, J.W. Sedat // *Cell*. – 1988. – Vol. 54. – № 4. – P. 461–472.
13. Cagan, R.L. Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina / R.L. Cagan, D.F. Ready // *Genes & Development*. – 1989. – Vol. 3. – № 8. – P. 1099–1112.
14. The Notch locus and the genetic circuitry involved in early *Drosophila* neurogenesis / T. Xu, I. Rebay, R.J. Fleming [et al.] // *Genes & Development*. – 1990. – Vol. 4. – № 3. – P. 464–475.
15. Hartley, D.A. The embryonic expression of the Notch locus of *Drosophila melanogaster* and the implications of point mutations in the extracellular EGF-like domain of the predicted protein / D.A. Hartley, T.A. Xu, S. Artavanis-Tsakonas // *The EMBO journal*. – 1987. – Vol. 6. – № 11. – P. 3407–3417.
16. Breeden, L. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila* / L. Breeden, K. Nasmyth // *Nature*. – 1987. – Vol. 329. – № 6140. – P. 651–654.
17. Kidd, S. Transposon-dependent mutant phenotypes at the Notch locus of *Drosophila* / S. Kidd, M.W. Young // *Nature*. – 1986. – Vol. 323. – № 6083. – P. 89–91.
18. Yochem, J. The *Caenorhabditis elegans* lin-12 gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to *Drosophila* Notch / J. Yochem, K. Weston, I. Greenwald // *Nature*. – 1988. – Vol. 335. – № 6190. – P. 547–550.
19. Austin, J. Transcript analysis of glp-1 and lin-12, homologous genes required for cell interactions during development of *C. elegans* / J. Austin, J. Kimble // *Cell*. – 1989. – Vol. 58. – № 3. – P. 565–571.
20. Austin, J. glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans* / J. Austin, J. Kimble // *Cell*. – 1987. – Vol. 51. – № 4. – P. 589–599.
21. Greenwald, I.S. The lin-12 locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans* / I.S. Greenwald, P.W. Sternberg, H.R. Horvitz // *Cell*. – 1983. – Vol. 34. – № 2. – P. 435–444.
22. Coffman, C. Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch / C. Coffman, W. Harris, C. Kintner // *Science*. – 1990. – Vol. 249. – № 4975. – P. 1438–1441.

23. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences / J.D. Stubbs, C. Lekutis, K.L. Singer [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – Vol. 87. – № 21. – P. 8417–8421.
24. Kopan, R. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism / R. Kopan, M.X.G. Ilagan // *Cell*. – 2009. – Vol. 137. – № 2. – P. 216–233.
25. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes / E. Gazave, P. Lapebie, G.S. Richards [et al.] // *BMC evolutionary biology*. – 2009. – Vol. 9. – P. 249.
26. The Notch signaling pathway in the cnidarian Hydra / T. Kasbauer, P. Towb, O. Alexandrova [et al.] // *Developmental Biology*. – 2007. – Vol. 303. – № 1. – P. 376–390.
27. Artavanis-Tsakonas, S. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development / S. Artavanis-Tsakonas, M.D. Rand, R.J. Lake // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – № 5415. – P. 770–776.
28. Fernandez, R. Gene gain and loss across the metazoan tree of life / R. Fernandez, T. Gabaldon // *Nature Ecology & Evolution*. – 2020. – Vol. 4. – № 4. – P. 524–533.
29. Systematic comparison of sea urchin and sea star developmental gene regulatory networks explains how novelty is incorporated in early development / G.A. Cary, B.S. McCauley, O. Zueva [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 6235.
30. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1 / L. Li, I.D. Krantz, Y. Deng [et al.] // *Nature Genetics*. – 1997. – Vol. 16. – № 3. – P. 243–251.
31. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome / T. Oda, A.G. Elkahlon, B.L. Pike [et al.] // *Nature Genetics*. – 1997. – Vol. 16. – № 3. – P. 235–242.
32. A phase I clinical trial of the Notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias / D.J. Deangelo, R. Stone, L. Silverman [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2006. – Vol. 24. – № 18. – P. S6585.
33. Dorsam, R.T. G-protein-coupled receptors and cancer / R.T. Dorsam, J.S. Gutkind // *Nature Reviews Cancer*. – 2007. – Vol. 7. – № 2. – P. 79–94.
34. Lemmon, M.A. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger // *Cell*. – 2010. – Vol. 141. – № 7. – P. 1117–1134.
35. Targeting Notch in oncology: the path forward / S. Majumder, J.S. Crabtree, T.E. Golde [et al.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 20. – № 2. – P. 125–144.
36. Siebel, C. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease / C. Siebel, U. Lendahl // *Physiological Reviews*. – 2017. – Vol. 97. – № 4. – P. 1235–1294.

37. The canonical Notch signaling pathway: structural and biochemical insights into shape, sugar, and force / R.A. Kovall, B. Gebelein, D. Sprinzak, R. Kopan // *Developmental Cell*. – 2017. – Vol. 41. – № 3. – P. 228–241.
38. Negative regulation of notch signaling by xylose / T.V. Lee, M.K. Sethi, J. Leonardi [et al.] // *PLoS genetics*. – 2013. – Vol. 9. – № 6. – P. e1003547.
39. Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glycosylated notch epidermal growth factor repeats / M.K. Sethi, F.F.R. Buettner, V.B. Krylov [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 3. – P. 1582–1586.
40. Molecular cloning of a xylosyltransferase that transfers the second xylose to O-glycosylated epidermal growth factor repeats of notch / M.K. Sethi, F.F.R. Buettner, A. Ashikov [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 4. – P. 2739–2748.
41. Shi, S. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways / S. Shi, P. Stanley // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 9. – P. 5234–5239.
42. Neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions / T. Sasamura, N. Sasaki, F. Miyashita [et al.] // *Development*. – 2003. – Vol. 130. – № 20. – P. 4785–4795.
43. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch / D.J. Moloney, V.M. Panin, S.H. Johnston [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – № 6794. – P. 369–375.
44. Fucosylation deficiency in mice leads to colitis and adenocarcinoma / Y. Wang, D. Huang, K.-Y. Chen [et al.] // *Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 152. – № 1. – P. 193–205.
45. POGLUT1 biallelic mutations cause myopathy with reduced satellite cells, α -dystroglycan hypoglycosylation and a distinctive radiological pattern / E. Servian-Morilla, M. Cabrera-Serrano, K. Johnson [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2020. – Vol. 139. – № 3. – P. 565–582.
46. Langridge, P.D. Epsin-dependent ligand endocytosis activates Notch by force / P.D. Langridge, G. Struhl // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – № 6. – P. 1383–1396.
47. Structural basis for regulated proteolysis by the α -secretase ADAM10 / T.C.M. Seegar, L.B. Killingsworth, N. Saha [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – № 7. – P. 1638–1648.
48. Lambrecht, B.N. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity / B.N. Lambrecht, M. Vanderkerken, H. Hammad // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – Vol. 18. – № 12. – P. 745–758.
49. Macrophage-released ADAMTS1 promotes muscle stem cell activation / H. Du, C.-H. Shih, M.N. Wosczyzna [et al.] // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 669.
50. Groot, A.J. The role of Adams in Notch signaling / A.J. Groot, M.A. Vooijs // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 727. – P. 15–36.

51. Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1 / Y.M. Li, M. Xu, M.T. Lai [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 405. – № 6787. – P. 689–694.

52. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state / Y.M. Li, M.T. Lai, M. Xu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97. – № 11. – P. 6138–6143.

53. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2 / W.T. Kimberly, M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 11. – P. 6382–6387.

54. Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7 / K. Huenniger, A. Kramer, M. Soom [et al.] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2010. – Vol. 67. – № 18. – P. 3187–3196.

55. Notch-Jagged signaling complex defined by an interaction mosaic / M.R. Zeronian, O. Klykov, J. Portell I de Montserrat [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – Vol. 118. – № 30. – P. e2102502118.

56. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics / B. Zhou, W. Lin, Y. Long [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 95.

57. Baonza, A. Notch signaling directly controls cell proliferation in the Drosophila wing disc / A. Baonza, A. Garcia-Bellido // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97. – № 6. – P. 2609–2614.

58. Knust, E. The molecular genetics of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster* / E. Knust, J.A. Campos-Ortega // *News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. – 1989. – Vol. 11. – № 4. – P. 95–100.

59. Dynamic spatiotemporal coordination of neural stem cell fate decisions occurs through local feedback in the adult vertebrate brain / N. Dray, L. Mancini, U. Binshtok [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2021. – Vol. 28. – № 8. – P. 1457–1472.

60. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation / M.J. Hilton, X. Tu, X. Wu [et al.] // *Nature Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – № 3. – P. 306–314.

61. RBPj κ -dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development / Y. Dong, A.M. Jesse, A. Kohn [et al.] // *Development*. – 2010. – Vol. 137. – № 9. – P. 1461–1471.

62. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation / Y. Zong, A. Panikkar, J. Xu [et al.] // *Development*. – 2009. – Vol. 136. – № 10. – P. 1727–1739.

63. Notch signaling regulates formation of the three-dimensional architecture of intrahepatic bile ducts in mice / E.E. Sparks, K.A. Huppert, M.A. Brown [et al.] // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 51. – № 4. – P. 1391–1400.

64. Alabi, R.O. Intriguing roles for endothelial ADAM10/Notch signaling in the development of organ-specific vascular beds / R.O. Alabi, G. Farber, C.P. Blobel // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98. – № 4. – P. 2025–2061.
65. Herbert, S.P. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis / S.P. Herbert, D.Y.R. Stainier // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2011. – Vol. 12. – № 9. – P. 551–564.
66. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis / M. Hellstrom, L.-K. Phng, J.J. Hofmann [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 445. – № 7129. – P. 776–780.
67. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting / L. Jakobsson, C.A. Franco, K. Bentley [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2010. – Vol. 12. – № 10. – P. 943–953.
68. Notch-IGF1 signaling during liver regeneration drives biliary epithelial cell expansion and inhibits hepatocyte differentiation / S.E. Minnis-Lyons, S. Ferreira-Gonzalez, N. Aleksieva [et al.] // *Science Signaling*. – 2021. – Vol. 14. – № 688. – P. eaay9185.
69. The GDC Data Portal, National Cancer Institute Genomic Data Commons Portal: официальный сайт / Правительство Соединенных Штатов Америки. – URL: <https://gdc.cancer.gov/> (дата обращения: 24.03.2022). – Текст: электронный.
70. Notch signaling in breast cancer: From pathway analysis to therapy / B.M. Krishna, S. Jana, J. Singhal [et al.] // *Cancer Letters*. – 2019. – Vol. 461. – P. 123–131.
71. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival / M. Reedijk, S. Odorcic, L. Chang [et al.] // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – № 18. – P. 8530–8537.
72. Meta-analysis reveals the correlation of Notch signaling with non-small cell lung cancer progression and prognosis / X. Yuan, H. Wu, H. Xu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 10338.
73. An RFC4/Notch1 signaling feedback loop promotes NSCLC metastasis and stemness / L. Liu, T. Tao, S. Liu [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 2693.
74. Alterations of the Notch pathway in lung cancer / B. Westhoff, I.N. Colaluca, G. D’Ario [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106. – № 52. – P. 22293–22298.
75. Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53 / S. Licciulli, J.L. Avila, L. Hanlon [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 19. – P. 5974–5984.

76. The cell of origin and subtype of K-Ras-induced lung tumors are modified by Notch and Sox2 / X. Xu, L. Huang, C. Futtner [et al.] // *Genes & Development*. – 2014. – Vol. 28. – № 17. – P. 1929–1939.

77. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma / T.D. Allen, E.M. Rodriguez, K.D. Jones, J.M. Bishop // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 18. – P. 6010–6018.

78. Protein kinase C α drives a NOTCH3-dependent stem-like phenotype in mutant KRAS lung adenocarcinoma / S.A. Ali, V. Justilien, L. Jamieson [et al.] // *Cancer Cell*. – 2016. – Vol. 29. – № 3. – P. 367–378.

79. Co-expression analysis reveals mechanisms underlying the varied roles of NOTCH1 in NSCLC / S.L. Sinicropi-Yao, J.M. Amann, D.L.Y. Lopez [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. – 2019. – Vol. 14. – № 2. – P. 223–236.

80. Tyagi, A. A review on Notch signaling and colorectal cancer / A. Tyagi, A.K. Sharma, C. Damodaran // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 1549.

81. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine / S. Fre, S.K. Pallavi, M. Huyghe [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106. – № 15. – P. 6309–6314.

82. BHLHA15-positive secretory precursor cells can give rise to tumors in intestine and colon in mice / Y. Hayakawa, M. Tsuboi, S. Asfaha [et al.] // *Gastroenterology*. – 2019. – Vol. 156. – № 4. – P. 1066–1081.

83. Epithelial NOTCH signaling rewires the tumor microenvironment of colorectal cancer to drive poor-prognosis subtypes and metastasis / R. Jackstadt, S.R. van Hooff, J.D. Leach [et al.] // *Cancer Cell*. – 2019. – Vol. 36. – № 3. – P. 319–336.

84. Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF protein TRIO / M. Sonoshita, Y. Itatani, F. Kakizaki [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 198–211.

85. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia / A.P. Weng, A.A. Ferrando, W. Lee [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – № 5694. – P. 269–271.

86. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles / W.S. Pear, J.C. Aster, M.L. Scott [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – Vol. 183. – № 5. – P. 2283–2291.

87. Genetic and phenotypic attributes of splenic marginal zone lymphoma / F. Bonfiglio, A. Brusca, F. Guidetti [et al.] // *Blood*. – 2022. – Vol. 139. – № 5. – P. 732–747.

88. Notch signaling promotes disease initiation and progression in murine chronic lymphocytic leukemia / D. Tardivon, M. Antoszewski, N. Zangger [et al.] // *Blood*. – 2021. – Vol. 137. – № 22. – P. 3079–3092.

89. Callahan, R. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways / R. Callahan, G.H. Smith // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 19. – № 8. – P. 992–1001.

90. Notch signaling in serous ovarian cancer / J.W. Groeneweg, R. Foster, W.B. Growdon [et al.] // *Journal of Ovarian Research*. – 2014. – Vol. 7. – P. 95.

91. Notch3 gene amplification in ovarian cancer / J.T. Park, M. Li, K. Nakayama [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66. – № 12. – P. 6312–6318.

92. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma / A.S. Ho, K. Kannan, D.M. Roy [et al.] // *Nature Genetics*. – 2013. – Vol. 45. – № 7. – P. 791–798.

93. A phase I dose-escalation and dose-expansion study of brontictuzumab in subjects with selected solid tumors / R. Ferrarotto, G. Eckhardt, A. Patnaik [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2018. – Vol. 29. – № 7. – P. 1561–1568.

94. Notch pathway is activated via genetic and epigenetic alterations and is a therapeutic target in clear cell renal cancer / T.D. Bhagat, Y. Zou, S. Huang [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 292. – № 3. – P. 837–846.

95. Razumilava, N. Notch-driven carcinogenesis: the merging of hepatocellular cancer and cholangiocarcinoma into a common molecular liver cancer subtype / N. Razumilava, G.J. Gores // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – № 6. – P. 1244–1245.

96. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice / A. Villanueva, C. Alsinet, K. Yanger [et al.] // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 143. – № 6. – P. 1660–1669.

97. An essential role of RNF187 in Notch1 mediated metastasis of hepatocellular carcinoma / L. Zhang, J. Chen, J. Yong [et al.] // *Journal of experimental & clinical cancer research*. – 2019. – Vol. 38. – № 1. – P. 384.

98. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells / T.S. Zhu, M.A. Costello, C.E. Talsma [et al.] // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 18. – P. 6061–6072.

99. Prolonged inhibition of glioblastoma xenograft initiation and clonogenic growth following in vivo Notch blockade / Q. Chu, B.A. Orr, S. Semenkow [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2013. – Vol. 19. – № 12. – P. 3224–3233.

100. Notch1-induced brain tumor models the sonic hedgehog subgroup of human medulloblastoma / S. Natarajan, Y. Li, E.E. Miller [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 17. – P. 5381–5390.
101. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma / N. Stransky, A.M. Egloff, A.D. Tward [et al.] // *Science*. – 2011. – Vol. 333. – № 6046. – P. 1157–1160.
102. Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma / M. Natsuzaka, K.A. Whelan, S. Kagawa [et al.] // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1758.
103. Notch-effector CSL promotes squamous cell carcinoma by repressing histone demethylase KDM6B / D. Al Labban, S.-H. Jo, P. Ostano [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2018. – Vol. 128. – № 6. – P. 2581–2599.
104. Comprehensive genomic profiling of small cell lung cancer in Chinese patients and the implications for therapeutic potential / J. Hu, Y. Wang, Y. Zhang [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2019. – Vol. 8. – № 9. – P. 4338–4347.
105. Multiomic analysis of lung tumors defines pathways activated in neuroendocrine transformation / A. Quintanal-Villalonga, H. Taniguchi, Y.A. Zhan [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2021. – Vol. 11. – № 12. – P. 3028–3047.
106. Heterogeneity in signaling pathways of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a critical look at notch signaling pathway / H. Wang, Y. Chen, C.F.-D. Castillo [et al.] // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. – 2013. – Vol. 26. – № 1. – P. 139–147.
107. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer / P. Bailey, D.K. Chang, K. Nones [et al.] // *Nature*. – 2016. – Vol. 531. – № 7592. – P. 47–52.
108. Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma / L. Hanlon, J.L. Avila, R.M. Demarest [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – № 11. – P. 4280–4286.
109. Anderson, N.M. The tumor microenvironment / N.M. Anderson, M.C. Simon // *Current biology*. – 2020. – Vol. 30. – № 16. – P. 921–925.
110. Meurette, O. Notch signaling in the tumor microenvironment / O. Meurette, P. Mehlen // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 34. – № 4. – P. 536–548.
111. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – № 5. – P. 646–674.
112. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI–Atheromatous affection of arteries. 1858 / R. Virchow // *Nutrition Reviews*. – 1989. – Vol. 47. – № 1. – P. 23–25.

113. Tarin, D. Ultrastructural features of wound healing in mouse skin / D. Tarin, C.B. Croft // *Journal of Anatomy*. – 1969. – Vol. 105. – № 1. – P. 189–190.
114. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer / R. Kalluri // *Nature Reviews. Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – № 9. – P. 582–598.
115. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts / E. Sahai, I. Astsaturov, E. Cukierman [et al.] // *Nature Reviews Cancer*. – 2020. – Vol. 20. – № 3. – P. 174–186.
116. Ronnov-Jessen, L. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia / L. Ronnov-Jessen, O.W. Petersen // *Journal of Technical Methods and Pathology*. – 1993. – Vol. 68. – № 6. – P. 696–707.
117. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair / R.R. Driskell, B.M. Lichtenberger, E. Hoste [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – № 7479. – P. 277–281.
118. Single-cell transcriptomics of pancreatic cancer precursors demonstrates epithelial and microenvironmental heterogeneity as an early event in neoplastic progression / V. Bernard, A. Semaan, J. Huang [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25. – № 7. – P. 2194–2205.
119. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts / E. Elyada, M. Bolisetty, P. Laise [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2019. – Vol. 9. – № 8. – P. 1102–1123.
120. Cellular heterogeneity during mouse pancreatic ductal adenocarcinoma progression at single-cell resolution / A.N. Hosein, H. Huang, Z. Wang [et al.] // *JCI insight*. – 2019. – Vol. 5. – № 16. – P. e129212.
121. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma / J. Peng, B.-F. Sun, C.-Y. Chen [et al.] // *Cell Research*. – 2019. – Vol. 29. – № 9. – P. 725–738.
122. Single-cell analysis reveals transcriptomic remodellings in distinct cell types that contribute to human prostate cancer progression / S. Chen, G. Zhu, Y. Yang [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 87–98.
123. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing / M. Bartoschek, N. Oskolkov, M. Bocci [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 5150.
124. Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome / G. Friedman, O. Levi-Galibov, E. David [et al.] // *Nature Cancer*. – 2020. – Vol. 1. – № 7. – P. 692–708.

125. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer / A. Costa, Y. Kieffer, A. Scholer-Dahirel [et al.] // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 33. – № 3. – P. 463–479.
126. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans / M.G. Bachem, E. Schneider, H. Gross [et al.] // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 115. – № 2. – P. 421–432.
127. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis / M.V. Apte, P.S. Haber, S.J. Darby [et al.] // *Gut*. – 1999. – Vol. 44. – № 4. – P. 534–541.
128. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer / C. Yin, K.J. Evason, K. Asahina, D.Y.R. Stainier // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2013. – Vol. 123. – № 5. – P. 1902–1910.
129. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis / A.E. Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – № 7162. – P. 557–563.
130. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells / Prav. J. Mishra, Pras. J. Mishra, R. Humeniuk [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 11. – P. 4331–4339.
131. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts / E.M. Zeisberg, S. Potenta, L. Xie [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 21. – P. 10123–10128.
132. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer / L. Bochet, C. Lehuède, S. Dauvillier [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 18. – P. 5657–5668.
133. Chen, Y. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts / Y. Chen, K.M. McAndrews, R. Kalluri // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 18. – № 12. – P. 792–804.
134. A novel population of local pericyte precursor cells in tumor stroma that require Notch signaling for differentiation / A. Patenaude, S. Woerher, P. Umlandt [et al.] // *Microvascular Research*. – 2015. – Vol. 101. – P. 38–47.
135. Jagged mediates differences in normal and tumor angiogenesis by affecting tip-stalk fate decision / M. Boareto, M.K. Jolly, E. Ben-Jacob, J.N. Onuchic // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 29. – P. 3836–3844.
136. The bispecific antibody HB-32, blockade of both VEGF and DLL4 shows potent anti-angiogenic activity in vitro and anti-tumor activity in breast cancer xenograft models / R. Zhou, S. Wang, H. Wen [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2019. – Vol. 380. – № 2. – P. 141–148.

137. MMGZ01, an anti-DLL4 monoclonal antibody, promotes nonfunctional vessels and inhibits breast tumor growth / Z. Xu, Z. Wang, X. Jia [et al.] // *Cancer Letters*. – 2016. – Vol. 372. – № 1. – P. 118–127.
138. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy / C.M. Ghajar, H. Peinado, H. Mori [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2013. – Vol. 15. – № 7. – P. 807–817.
139. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling / Q. Zeng, S. Li, D.B. Chepeha [et al.] // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 8. – № 1. – P. 13–23.
140. Jagged1 upregulation in prostate epithelial cells promotes formation of reactive stroma in the Pten null mouse model for prostate cancer / Q. Su, B. Zhang, L. Zhang [et al.] // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36. – № 5. – P. 618–627.
141. Dll4 blockade in stromal cells mediates antitumor effects in preclinical models of ovarian cancer / F. Kuhnert, G. Chen, S. Coetzee [et al.] // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75. – № 19. – P. 4086–4096.
142. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1 / J. Lu, X. Ye, F. Fan [et al.] // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 23. – № 2. – P. 171–185.
143. Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy / S. Indraccolo, S. Minuzzo, M. Masiero [et al.] // *Cancer Research*. – 2009. – Vol. 69. – № 4. – P. 1314–1323.
144. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling / M. Sonoshita, M. Aoki, H. Fuwa [et al.] // *Cancer Cell*. – 2011. – Vol. 19. – № 1. – P. 125–137.
145. Notch suppresses angiogenesis and progression of hepatic metastases / D. Banerjee, S.L. Hernandez, A. Garcia [et al.] // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75. – № 8. – P. 1592–1602.
146. Hinshaw, D.C. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression / D.C. Hinshaw, L.A. Shevde // *Cancer Research*. – 2019. – Vol. 79. – № 18. – P. 4557–4566.
147. The immune contexture in cancer prognosis and treatment / W.H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautes-Fridman, G. Kroemer // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 14. – № 12. – P. 717–734.
148. Gajewski, T.F. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment / T.F. Gajewski, H. Schreiber, Y.-X. Fu // *Nature Immunology*. – 2013. – Vol. 14. – № 10. – P. 1014–1022.
149. Notch regulates cytolytic effector function in CD8⁺ T cells / O.H. Cho, H.M. Shin, L. Miele [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182. – № 6. – P. 3380–3389.

150. Notch2 signaling is required for potent antitumor immunity in vivo / K. Sugimoto, Y. Maekawa, A. Kitamura [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 184. – № 9. – P. 4673–4678.

151. Resuscitating cancer immunosurveillance: selective stimulation of DLL1-Notch signaling in T cells rescues T-cell function and inhibits tumor growth / Y. Huang, L. Lin, A. Shanker [et al.] // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 19. – P. 6122–6131.

152. Yu, W. Notch signaling pathway dampens tumor-infiltrating CD8⁺ T cells activity in patients with colorectal carcinoma / W. Yu, Y. Wang, P. Guo // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 97. – P. 535–542.

153. Multivalent forms of the Notch ligand DLL-1 enhance antitumor T-cell immunity in lung cancer and improve efficacy of EGFR-targeted therapy / A.K. Biktasova, D.F. Dudimah, R.V. Uzhachenko [et al.] // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75. – № 22. – P. 4728–4741.

154. Determinant roles of dendritic cell-expressed Notch Delta-like and Jagged ligands on anti-tumor T cell immunity / E.E. Tchekneva, M.U.L. Goruganthu, R.V. Uzhachenko [et al.] // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 95.

155. Notch-regulated dendritic cells restrain inflammation-associated colorectal carcinogenesis / L. Wang, S. Yu, E.R. Chan [et al.] // *Cancer Immunology Research*. – 2021. – VOL. 9. – № 3. – P. 348–361.

156. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages / R.A. Franklin, W. Liao, A. Sarkar [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 344. – № 6186. – P. 921–925.

157. Jagged1 promotes aromatase inhibitor resistance by modulating tumor-associated macrophage differentiation in breast cancer patients / H. Liu, J. Wang, M. Zhang [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2017. – Vol. 166. – № 1. – P. 95–107.

158. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses / Y.-C. Wang, F. He, F. Feng [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – № 12. – P. 4840–4849.

159. Forced activation of Notch in macrophages represses tumor growth by upregulating miR-125a and disabling tumor-associated macrophages / J.-L. Zhao, F. Huang, F. He [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76. – № 6. – P. 1403–1415.

160. Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation / N. Ali, B. Zirak, R. S. Rodriguez [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 169. – № 6. – P. 1119–1129.

161. Periz, G. Ca²⁺-ATPase function is required for intracellular trafficking of the Notch receptor in *Drosophila* / G. Periz, M.E. Fortini // *The EMBO journal*. – 1999. – Vol. 18. – № 21. – P. 5983–5993.

162. Pagliaro, L. Targeting oncogenic Notch signaling with SERCA inhibitors / L. Pagliaro, M. Marchesini, G. Roti // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 8.

163. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes / M.J. Malecki, C. Sanchez-Irizarry, J.L. Mitchell [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Vol. 26. – № 12. – P. 4642–4651.

164. Complementary genomic screens identify SERCA as a therapeutic target in NOTCH1 mutated cancer / G. Roti, A. Carlton, K.N. Ross [et al.] // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 23. – № 3. – P. 390–405.

165. Treiman, M. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases / M. Treiman, C. Caspersen, S.B. Christensen // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 1998. – Vol. 19. – № 4. – P. 131–135.

166. Delayed micromolar elevation in intracellular calcium precedes induction of apoptosis in thapsigargin-treated breast cancer cells / C. Jackisch, H.A. Hahm, B. Tombal [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2000. – Vol. 6. – № 7. – P. 2844–2850.

167. Blockade of oncogenic NOTCH1 with the SERCA Inhibitor CAD204520 in T-cell acute lymphoblastic leukemia / M. Marchesini, A. Gherli, A. Montanaro [et al.] // *Cell Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 27. – № 6. – P. 678–697.

168. ADAM proteases: emerging role and targeting of the non-catalytic domains / N. Saha, D. Robey, J.P. Himanen, D.B. Nikolov // *Cancer Letters*. – 2019. – Vol. 467. – P. 50–57.

169. Novel ADAM-17 inhibitor ZLDI-8 inhibits the proliferation and metastasis of chemo-resistant non-small-cell lung cancer by reversing Notch and epithelial mesenchymal transition in vitro and in vivo / H.-Y. Lu, Y.-X. Zu, X.-W. Jiang [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2019. – Vol. 148. – P. 104406.

170. MicroRNA-3163 targets ADAM-17 and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to molecular targeted agents / B. Yang, C. Wang, H. Xie [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 10. – № 10. – P. 784.

171. Guo, Z. Inhibition of ADAM-17 more effectively down-regulates the Notch pathway than that of γ -secretase in renal carcinoma / Z. Guo, X. Jin, H. Jia // *Journal of experimental & clinical cancer research*. – 2013. – Vol. 32. – № 1. – P. 26.

172. ADAM10: a new player in breast cancer progression? / M. Mullooly, P.M. McGowan, S.A. Kennedy [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 113. – № 6. – P. 945–951.

173. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease / R.S. Doody, R. Raman, M. Farlow [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 369. – № 4. – P. 341–350.

174. A novel triazole, NMK-T-057, induces autophagic cell death in breast cancer cells by inhibiting γ -secretase-mediated activation of Notch signaling / A. Das, M.K. Narayanam, S. Paul [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – Vol. 294. – № 17. – P. 6733–6750.

175. A phase I study of an oral selective gamma secretase (GS) inhibitor RO4929097 in combination with neoadjuvant paclitaxel and carboplatin in triple negative breast cancer / S. Sardesai, M. Badawi, E. Mrozek [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2020. – Vol. 38. – № 5. – P. 1400–1410.

176. Notch pathway inhibition using PF-03084014, a γ -secretase inhibitor (GSI), enhances the antitumor effect of Docetaxel in prostate cancer / D. Cui, J. Dai, J. M. Keller [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – № 20. – P. 4619–4629.

177. Pine, S.R. Rethinking gamma-secretase inhibitors for treatment of non-small-cell lung cancer: is Notch the target? / S.R. Pine // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2018. – Vol. 24. – № 24. – P. 6136–6141.

178. Gamma-secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells / T. Akiyoshi, M. Nakamura, K. Yanai [et al.] // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 134. – № 1. – P. 131–144.

179. Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence / C.A. Gilbert, M.-C. Daou, R.P. Moser, A.H. Ross // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – № 17. – P. 6870–6879.

180. A Phase I, dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral γ -secretase inhibitor PF-03084014 / W.A. Messersmith, G.I. Shapiro, J.M. Cleary [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P. 60–67.

181. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors / A.W. Tolcher, W.A. Messersmith, S.M. Mikulski [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30. – № 19. – P. 2348–2353.

182. A multi-arm phase I dose escalating study of an oral NOTCH inhibitor BMS-986115 in patients with advanced solid tumours / K.L. Aung, A.B. El-Khoueiry, K. Gelmon [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2018. – Vol. 36. – № 6. – P. 1026–1036.

183. A first-in-human phase I study of the oral Notch inhibitor, LY900009, in patients with advanced cancer / S. Pant, S.F. Jones, C.D. Kurkjian [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 56. – P. 1–9.

184. First-in-human study of LY3039478, an oral Notch signaling inhibitor in advanced or metastatic cancer / C. Massard, A. Azaro, J.-C. Soria [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2018. – Vol. 29. – № 9. – P. 1911–1917.
185. Phase 2 study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, in metastatic melanoma: SWOG 0933 / S.M. Lee, J. Moon, B.G. Redman [et al.] // *Cancer*. – 2015. – Vol. 121. – № 3. – P. 432–440.
186. A phase II study of single-agent RO4929097, a gamma-secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with recurrent platinum-resistant epithelial ovarian cancer: A study of the Princess Margaret, Chicago and California phase II consortia / I. Diaz-Padilla, M.K. Wilson, B.A. Clarke [et al.] // *Gynecologic Oncology*. – 2015. – Vol. 137. – № 2. – P. 216–222.
187. A phase II study of RO4929097 in metastatic colorectal cancer / J.R. Strosberg, T. Yeatman, J. Weber [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 48. – № 7. – P. 997–1003.
188. Clinical activity of the γ -Secretase inhibitor PF-03084014 in adults with desmoid tumors (aggressive fibromatosis) / S. Kummar, G. O’Sullivan Coyne, K.T. Do [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 35. – № 14. – P. 1561–1569.
189. Substrate-targeting gamma-secretase modulators / T.L. Kukar, T.B. Ladd, M.A. Bann [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 453. – № 7197. – P. 925–929.
190. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition / R.A. Habets, C.E. de Bock, L. Serneels [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 11. – № 494. – P. eaau6246.
191. Development of therapeutic anti-JAGGED1 antibodies for cancer therapy / M. Masiero, D. Li, P. Whiteman [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2019. – Vol. 18. – № 11. – P. 2030–2042.
192. Targeting the notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer / A.D. Steg, A.A. Katre, B. Goodman [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2011. – Vol. 17. – № 17. – P. 5674–5685.
193. Therapeutic antibody targeting tumor- and osteoblastic niche-derived Jagged1 sensitizes bone metastasis to chemotherapy / H. Zheng, Y. Bae, S. Kasimir-Bauer [et al.] // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 32. – № 6. – P. 731–747.
194. DLL3: an emerging target in small cell lung cancer / D.H. Owen, M.J. Giffin, J.M. Bailis [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 61.
195. Delta-like protein 3 expression and therapeutic targeting in neuroendocrine prostate cancer / L. Puca, K. Gavyert, V. Sailer [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 11. – № 484. – P. eaav0891.

196. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo / L.R. Saunders, A.J. Bankovich, W.C. Anderson [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 7. – № 302. – P. 136.

197. A phase 1 study evaluating Rovalpituzumab Tesirine in frontline treatment of patients with extensive-stage SCLC / C.L. Hann, T.F. Burns, A. Dowlati [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. – 2021. – Vol. 16. – № 9. – P. 1582–1588.

198. Efficacy and safety of Rovalpituzumab Tesirine in third-line and beyond patients with DLL3-expressing, relapsed/refractory small-cell lung cancer: results from the phase II TRINITY study / D. Morgensztern, B. Besse, L. Greillier [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25. – № 23. – P. 6958–6966.

199. Rovalpituzumab Tesirine as a maintenance therapy after first-line Platinum-based chemotherapy in patients with extensive-stage-SCLC: results from the phase 3 MERU study / M.L. Johnson, Z. Zvirbule, K. Laktionov [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. – 2021. – Vol. 16. – № 9. – P. 1570–1581.

200. A phase 1-2 study of Rovalpituzumab Tesirine in combination with Nivolumab plus or minus Ipilimumab in patients with previously treated extensive-stage SCLC / J. Malhotra, P. Nikolinakos, T. Leal [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. – 2021. – Vol. 16. – № 9. – P. 1559–1569.

201. SC-002 in patients with relapsed or refractory small cell lung cancer and large cell neuroendocrine carcinoma: Phase 1 study / D. Morgensztern, M. Johnson, C.M. Rudin [et al.] // *Lung Cancer*. – 2020. – Vol. 145. – P. 126–131.

202. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis / J. Ridgway, G. Zhang, Y. Wu [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 444. – № 7122. – P. 1083–1087.

203. Delta-like ligand 4-notch blockade and tumor radiation response / S.K. Liu, S.A.S. Bham, E. Fokas [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2011. – Vol. 103. – № 23. – P. 1778–1798.

204. A phase I first-in-human study of Enoticumab (REGN421), a fully human delta-like Ligand 4 (Dll4) monoclonal antibody in patients with advanced solid tumors / E.G. Chiorean, P. LoRusso, R.M. Strother [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – № 12. – P. 2695–2703.

205. A phase I dose escalation and expansion study of the anticancer stem cell agent demcizumab (anti-DLL4) in patients with previously treated solid tumors / D.C. Smith,

P.D. Eisenberg, G. Manikhas [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20. – № 24. – P. 6295–6303.

206. Demcizumab combined with paclitaxel for platinum-resistant ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancer: The SIERRA open-label phase Ib trial / R.L. Coleman, K.F. Handley, R. Burger [et al.] // *Gynecologic Oncology*. – 2020. – Vol. 157. – № 2. – P. 386–391.

207. ABT-165, a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig) Targeting DLL4 and VEGF, Demonstrates Superior Efficacy and Favorable Safety Profiles in Preclinical Models / Y. Li, J.A. Hickson, D.J. Ambrosi [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2018. – Vol. 17. – № 5. – P. 1039–1050.

208. A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab (OMP-305B83) in patients with previously treated solid tumors / A. Jimeno, K.N. Moore, M. Gordon [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2019. – Vol. 37. – № 3. – P. 461–472.

209. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma / S. Lee, K. Kumano, K. Nakazaki [et al.] // *Cancer Science*. – 2009. – Vol. 100. – № 5. – P. 920–926.

210. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma / P.K. Mazur, H. Einwachter, M. Lee [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – № 30. – P. 13438–13443.

211. Targeting specific regions of the Notch3 ligand-binding domain induces apoptosis and inhibits tumor growth in lung cancer / L. Lin, R. Mernaugh, F. Yi [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – № 2. – P. 632–638.

212. NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells / N. Yamaguchi, T. Oyama, E. Ito [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 6. – P. 1881–1888.

213. A randomized phase II trial of nab-paclitaxel and gemcitabine with tarextumab or placebo in patients with untreated metastatic pancreatic cancer / Z.I. Hu, J.C. Bendell, A. Bullock [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2019. – Vol. 8. – № 11. – P. 5148–5157.

214. A phase I, dose-escalation study of PF-06650808, an anti-Notch3 antibody-drug conjugate, in patients with breast cancer and other advanced solid tumors / L.S. Rosen, R. Wesolowski, R. Baffa [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2020. – Vol. 38. – № 1. – P. 120–130.

215. Disruption of NOTCH signaling by a small molecule inhibitor of the transcription factor RBPJ / C. Hurtado, A. Safarova, M. Smith [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 10811.

216. The small molecule IMR-1 inhibits the Notch transcriptional activation complex to suppress tumorigenesis / L. Astudillo, T.G. Da Silva, Z. Wang [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76. – № 12. – P. 3593–3603.

217. Pharmacological disruption of the Notch transcription factor complex / R. Lehal, J. Zaric, M. Vigolo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117. – № 28. – P. 16292–16301.

218. Anti-Jagged immunotherapy inhibits MDSCs and overcomes tumor-induced tolerance / R.A. Sierra, J. Trillo-Tinoco, E. Mohamed [et al.] // *Cancer Research*. – 2017. – Vol. 77. – № 20. – P. 5628–5638.

219. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors / Y. Wu, C. Cain-Hom, L. Choy [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464. – № 7291. – P. 1052–1057.

220. Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarextumab) inhibits tumor growth and decreases tumor-initiating cell frequency / W.-C. Yen, M.M. Fischer, F. Axelrod [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – № 9. – P. 2084–2095.

221. NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth / T. Kangsamaksin, A. Murtomaki, N.M. Kofler [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 182–197.

222. Non-canonical NOTCH3 signalling limits tumour angiogenesis / S. Lin, A. Negulescu, S. Bulusu [et al.] // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 16074.

223. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors / D. Paris, A. Quadros, N. Patel [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2005. – Vol. 514. – № 1. – P. 1–15.

224. The blockage of Notch signalling promoted the generation of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells with lower immunosuppression / S.-H. Wang, Q.-Y. Lu, Y.-H. Guo [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 68. – P. 90–105.

225. γ -Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma / L. Mao, Z.-L. Zhao, G.-T. Yu [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2018. – Vol. 142. – № 5. – P. 999–1009.

226. Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma / N. Cook, K.K. Frese, T.E. Bapiro [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – Vol. 209. – № 3. – P. 437–444.

227. Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo / X.-M. Yu, T. Phan, P.N. Patel [et al.] // *Cancer*. – 2013. – Vol. 119. – № 4. – P. 774–781.

228. Hesperetin activates the Notch1 signaling cascade, causes apoptosis, and induces cellular differentiation in anaplastic thyroid cancer / P.N. Patel, X.-M. Yu, R. Jaskula-Sztul, H. Chen // *Annals of Surgical Oncology*. – 2014. – Vol. 21. – P. S497–S504.

229. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information: официальный сайт / Правительство Соединенных Штатов Америки. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 06.02.2021). – Текст: электронный.

230. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

231. Повышение туморогенного потенциала клеток рака ободочной кишки человека линии HCT116 за счет увеличения содержания раковых стволовых клеток при подавлении экспрессии E-кадгерина / М.Д. Фармаковская, Н.В. Хромова, Б. П. Копнин, П.Б. Копнин // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15. – № 3. – С. 6–14.

232. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis / C. Dees, M. Tomcik, P. Zerr [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2011. – Vol. 70. – № 7. – P. 1304–1310.

233. Xu, B. Functional skeletal muscle constructs from transdifferentiated human fibroblasts / B. Xu, A. Siehr, W. Shen // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 22047.

234. Significance of NOTCH1 Expression in the Progression of Human Lung and Colorectal Cancers / M.V. Vasileva, N.V. Khromova, B.P. Kopnin [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – Vol. 87. – № 10. – P. 1199–1205.

235. KEGG PATHWAY Database: сайт / Kanehisa Laboratories. – Япония. – URL: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (дата обращения: 10.11.2021). – Текст: электронный.

236. Роль сигнального пути Notch в регуляции опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки / М.В. Новикова, Н.В. Хромова, В.А. Рыбко [и др.] // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2018. – Т. 5. – № 4. – С. 51–52.

237. Notch signalling pathway plays a crucial role in maintaining the cancer stem cell population in lung and colorectal cancer / M. Novikova, N. Khromova, V. Rybko [et al.] // *ESMO Open*. – 2018. – Vol. 3. – № S2. – P. A52–A53.

238. Notch- and P53-dependent crosstalk between tumour and stromal cells / M.V. Novikova, V. Dugina, B. Kopnin [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2020. – Vol. 31. – № S5. – P. S1236.

239. Notch-dependent crosstalk between stromal and neoplastic cells / V. Rybko, N. Khromova, M. Farmakovskaya [et al.] // *European Journal of Cancer Supplements*. – 2015. – Vol. 13. – A104. – № 1. – P. 48.

240. Роль Notch во взаимодействии трансформированных и нормальных клеток / В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2. – № 4. – С. 39.
241. O'Brien, C.A. Cancer stem cells and self-renewal / C.A. O'Brien, A. Kreso, C.H.M. Jamieson // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2010. – Vol. 16. – № 12. – P. 3113–3120.
242. Battle, E. Cancer stem cells revisited / E. Battle, H. Clevers // *Nature Medicine*. – 2017. – Vol. 23. – № 10. – P. 1124–1134.
243. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells / A.T. Collins, P.A. Berry, C. Hyde [et al.] // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – № 23. – P. 10946–10951.
244. Flanagan, S.P. «Nude», a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse / S.P. Flanagan // *Genetical Research*. – 1966. – Vol. 8. – № 3. – P. 295–309.
245. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice / L.D. Shultz, P.A. Schweitzer, S.W. Christianson [et al.] // *Journal of Immunology*. – 1995. – Vol. 154. – № 1. – P. 180–191.
246. Rosen, J.M. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm / J.M. Rosen, C.T. Jordan // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – № 5935. – P. 1670–1673.
247. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo / M.A. Goodell, K. Brose, G. Paradis [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – Vol. 183. – № 4. – P. 1797–1806.
248. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters / C. Ozvegy-Laczka, J. Cserepes, N.B. Elkind, B. Sarkadi // *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 8. – № 1. – P. 15–26.
249. Bapat, S.A. Human ovarian cancer stem cells / S.A. Bapat // *Reproduction*. – 2010. – Vol. 140. – № 1. – P. 33–41.
250. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer / C.F.B. Kim, E.L. Jackson, A.E. Woolfenden [et al.] // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – № 6. – P. 823–835.
251. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential / C. Wu, Q. Wei, V. Utomo [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 17. – P. 8216–8222.
252. Bleau, A.-M. The ABCG2 resistance network of glioblastoma / A.-M. Bleau, J.T. Huse, E.C. Holland // *Cell Cycle*. – 2009. – Vol. 8. – № 18. – P. 2936–2944.
253. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells / M.M. Ho, A.V. Ng, S. Lam, J.Y. Hung // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 10. – P. 4827–4833.

254. Clonogenic assay of cells in vitro / N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap [et al.] // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – № 5. – P. 2315–2319.

255. Pastrana, E. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells / E. Pastrana, V. Silva-Vargas, F. Doetsch // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8. – № 5. – P. 486–498.

256. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells / A.H. Yin, S. Miraglia, E.D. Zanjani [et al.] // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – № 12. – P. 5002–5012.

257. Mizrak, D. CD133: molecule of the moment / D. Mizrak, M. Brittan, M.R. Alison // *The Journal of Pathology*. – 2008. – Vol. 214. – № 1. – P. 3–9.

258. Identification of human brain tumour initiating cells / S.K. Singh, C. Hawkins, I.D. Clarke [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 432. – № 7015. – P. 396–401.

259. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer / V. Tirino, R. Camerlingo, R. Franco [et al.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2009. – Vol. 36. – № 3. – P. 446–453.

260. Lee, C.J. Pancreatic cancer stem cells / C.J. Lee, J. Dosch, D.M. Simeone // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2008. – Vol. 26. – № 17. – P. 2806–2812.

261. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity / L. Vermeulen, M. Todaro, F. de Sousa Mello [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 36. – P. 13427–13432.

262. Fujimoto, K. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression / K. Fujimoto, R.D. Beauchamp, R.H. Whitehead // *Gastroenterology*. – 2002. – Vol. 123. – № 6. – P. 1941–1948.

263. In vitro models of cancer stem cells and clinical applications / S.S. Franco, K. Szczesna, M.S. Iliou [et al.] // *BMC cancer*. – 2016. – Vol. 16. – № S2. – P. 738.

264. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review / M.R. Abbaszadegan, V. Bagheri, M.S. Razavi [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2017. – Vol. 232. – № 8. – P. 2008–2018.

265. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review / M.J. Munro, S.K. Wickremesekera, L. Peng [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. – 2018. – Vol. 71. – № 2. – P. 110–116.

266. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization / V. Tirino, V. Desiderio, F. Paino [et al.] // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2013. – Vol. 27. – № 1. – P. 13–24.

267. Pattabiraman, D.R. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? / D.R. Pattabiraman, R.A. Weinberg // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2014. – Vol. 13. – № 7. – P. 497–512.
268. Cytoplasmic actin isoforms influence on CSC-like properties / V. Dugina, M.V. Novikova, O. Sokova [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2020. – Vol. 31. – № S5. – P. S1236.
269. Nuclear β II-Tubulin Associates with the Activated Notch Receptor to Modulate Notch Signaling / T.-S. Yeh, R.-H. Hsieh, S.-C. Shen [et al.] // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 22. – P. 8334–8340.
270. The design, synthesis, and biological activities of pyrrole-based carboxamides: the novel tubulin inhibitors targeting the colchicine-binding site / S. Boichuk, A. Galembikova, K. Syuzov [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 19. – P. 5780.
271. Gascard, P. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy / P. Gascard, T.D. Tlsty // *Genes & Development*. – 2016. – Vol. 30. – № 9. – P. 1002–1019.
272. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy / R.C. Mifflin, I.V. Pinchuk, J.I. Saada, D.W. Powell // *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2011. – Vol. 300. – № 5. – P. 684–696.
273. Multifocal epithelial tumors and field cancerization from loss of mesenchymal CSL signaling / B. Hu, E. Castillo, L. Harewood [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 149. – № 6. – P. 1207–1220.
274. Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation / M.-G. Procopio, C. Laszlo, D. Al Labban [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2015. – Vol. 17. – № 9. – P. 1193–1204.
275. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence / M. Hoare, Y. Ito, T.-W. Kang [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2016. – Vol. 18. – № 9. – P. 979–992.
276. Demehri, S. Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment / S. Demehri, A. Turkoz, R. Kopan // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol. 16. – № 1. – P. 55–66.
277. Direct contacts with colon cancer cells regulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into tumor associated fibroblasts / Y. Peng, Z. Li, P. Yang [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 451. – № 1. – P. 68–73.
278. Drake, L.E. Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again? / L.E. Drake, K.F. Macleod // *The Journal of Pathology*. – 2014. – Vol. 232. – № 3. – P. 283–288.

279. Activation of the p53 pathway induces α -smooth muscle actin expression in both myeloid leukemic cells and normal macrophages / P. Secchiero, E. Rimondi, M.G. di Iasio [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2012. – Vol. 227. – № 5. – P. 1829–1837.

280. Worthley, D.L. Stromal fibroblasts in digestive cancer / D.L. Worthley, A.S. Giraud, T.C. Wang // *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*. – 2010. – Vol. 3. – № 1. – P. 117–125.

281. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth / M. Quante, S.P. Tu, H. Tomita [et al.] // *Cancer Cell*. – 2011. – Vol. 19. – № 2. – P. 257–272.

282. Calon, A. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis / A. Calon, D.V.F. Tauriello, E. Batlle // *Seminars in Cancer Biology*. – 2014. – Vol. 25. – P. 15–22.

283. Mesenchymal cells in colon cancer / V. Koliaraki, C.K. Pallangyo, F.R. Greten, G. Kollias // *Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 152. – № 5. – P. 964–979.

284. Notch-dependent tumourigenic mechanism associated with exosome signaling / M. Novikova, N. Khromova, V. Rybko [et al.] // *ESMO Open*. – 2018. – Vol. 3. – № S2. – P. A331–A332.

285. Transcriptome of lung cancer cells resistant to the cytotoxic activity of macrophages / O.V. Kovaleva, P.A. Podlesnaya, M.V. Vasileva [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2022. – Vol. 507. – № 1. – P. 312–317.

286. Dufour, A. Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer / A. Dufour, C.M. Overall // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2013. – Vol. 34. – № 4. – P. 233–242.

287. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на формирование фенотипа опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки человека / М.В. Васильева, Н.В. Хромова, С.В. Бойчук, П.Б. Копнин // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2024. – Т. 11. – № 2. – С. 97–105.