

УДК 577.2+577.29+57.021021

## Влияние эндогенной экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов на резистентность клеток колоректального рака к химиотерапии

© 2019 Д.В. МАЛЬЦЕВА<sup>1,2,\*</sup>, М.П. РАЙГОРОДСКАЯ<sup>2</sup>, Г.А. БЕЛЯКОВА<sup>3</sup>, А. ТУРЧИНОВИЧ<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117998

<sup>2</sup>Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991

<sup>4</sup>The company SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309, Germany

<sup>5</sup>Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120, Germany

\*e-mail: dmaltseva@gmail.com

Поступила в редакцию 19.09.2019 г.

После доработки 25.09.2019 г.

Принята к публикации 09.10.2019 г.

В настоящей работе было осуществлено ингибирование экспрессии гена *LAMA5*, кодирующего  $\alpha 5$ -цепь ламининов, в клетках линии HT29. Обработка клеток 5-фторурацилом (5FU) и регорафенибом (RF) показала, что ингибирование экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов увеличивает чувствительность клеток HT29 к действию 5FU в 2,2 раза и не влияет на их чувствительность к действию RF. Полученные данные транскриптомного анализа указывают на активацию сигнальных путей стресса эндоплазматического ретикулума как на возможную причину изменения чувствительности клеток к 5FU. В случае с RF этот эффект может нивелироваться двукратным снижением экспрессии основного транспортера RF в клетках HT29.

**Ключевые слова:** апоптоз, колоректальный рак, лекарственная резистентность, нокдаун, регорафениб, стресс эндоплазматического ретикулума, 5-фторурацил,  $\alpha 5$ -цепь ламининов, эндогенная экспрессия, HT29, *LAMA5*, UPR.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-29-35

Трансформация нормальных тканей в опухолевые инициируется генетическими нарушениями в клетках, а злокачественное преобразование, скорость прогрессирования заболевания и процесс метастазирования во многом зависят от взаимодействия опухолевых клеток с компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ) [1, 2]. Накопленные за последние годы данные свидетельствуют о том, что компоненты ВКМ оказывают существенное влияние и на чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии [1]. Механизм такого

влияния может быть основан на способности компонентов ВКМ, посредством их взаимодействия с рецепторами на поверхности клетки, регулировать баланс между сигналами выживания и апоптоза [2]. Важнейшими компонентами ВКМ и основными строительными блоками базальной мембраны, слоя ВКМ, непосредственно прилегающего к плазматической мембране клеток, служат ламинины. Ламинины представляют собой гетеротримерные гликопротеины, состоящие из одной  $\alpha$ -, одной  $\beta$ - и одной  $\gamma$ -цепи ( $\alpha\beta\gamma$ ) [3].

**Список сокращений:** ВКМ – внеклеточный матрикс; ДМСО – диметилсульфоксид; кРНК (shRNA) – короткая шпилечная РНК; МТТ – 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; ОП<sub>570</sub> – оптическая плотность при длине волны 570 нм; DPBS – фосфатный буфер в модификации Дульбекко; 5FU – 5-фторурацил; IC<sub>50</sub> – концентрация препарата, соответствующая полумаксимальному ингибированию жизнеспособности клеток; RIN (RNA integrity number) – параметр качества РНК; RF – регорафениб.

В настоящее время у человека известно 12 различных генов, кодирующих цепи ламининов, которые образуют 16 гетеротримерных комплексов (изоформ ламининов) [3]. Важная роль различных изоформ ламининов показана на всех основных стадиях процесса метастазирования [2, 4]. Среди ламининов, для которых ранее обнаруживалось модулирующее действие сигналов апоптоза отмечаются изоформы, содержащие  $\alpha 5$ -цепь (ламинины 511 и 521) и ламинин 332 [2, 3, 5].

Продуцироваться ламинины могут как непосредственно опухолевыми клетками (эндогенная экспрессия), так и клетками, окружающих тканей. В настоящей работе исследовали влияние эндогенной экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов в клетках колоректального рака на их чувствительность к химиотерапевтическим агентам. Для этого в клетках линии колоректальной аденокарциномы HT29 был осуществлен нокдаун гена *LAMA5*, кодирующего  $\alpha 5$ -цепь ламининов, с помощью трансдукции клеток лентивирусными частицами, содержащими кРНК с последовательностью, комплементарной гену *LAMA5*. Оценка изменения чувствительности клеток к химиотерапевтическим агентам проводилась с использованием стандартных препаратов, применяемых для терапии колоректального рака: 5-фторурацила (5FU) и регорафениба (RF) [6, 7].

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: 1× DPBS («ПанЭко», Россия); питательная среда для культивирования клеток McCoy's 5A (Gibco, США); фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco); 100× раствор антибиотиков пенициллина и стрептомицина Pen Strep (Gibco); раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко»); 5-фторурацил (Sigma, США); регорафениб (Abcam, США); реагент для оценки жизнеспособности клеток МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (AppliChem, Германия); культу-

ральные флаконы и 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария), ДМСО (Sigma, Германия).

### Культивирование клеточных культур и ингибирование эндогенной экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов

Для ингибирования экспрессии гена *LAMA5*, кодирующего  $\alpha 5$ -цепи ламининов, клетки линии колоректальной аденокарциномы HT29 были трансдуцированы лентивирусными частицами, кодирующими кРНК к последовательности гена *LAMA5* (HT29-shLAMA5). В качестве контроля использовали линию HT29, трансдуцированную лентивирусными частицами, содержащими «бессмысленную» кРНК, последовательность которой не является комплементарной ни к одному из генов человека (HT29-shCtrl). Последовательности shCtrl и shLAMA5 приведены в табл. 1. Снижение экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов в клетках HT29-shLAMA5 в 3,8 раза по сравнению с контрольной линией HT29-shCtrl на уровне белка было подтверждено методом In-Cell ELISA. Клетки исходной линии HT29, а также линий HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl культивировали в питательной среде McCoy's 5A с добавлением 10%-ного FBS, 1× раствора антибиотиков пенициллина и стрептомицина так же, как было описано ранее [8].

### Оценка влияния ингибирования экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов на жизнеспособность клеток линии HT29 при действии химиотерапевтических агентов

Оценку влияния ингибирования экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов на жизнеспособность клеток при действии химиотерапевтических агентов 5FU и RF проводили так же, как было описано ранее [5] с некоторыми модификациями. Клетки линий HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl, а также исходной линии HT29 помещали в лунки 96-луночного планшета по 5000 клеток в 100 мкл культуральной среды и инкубировали при +37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 24 ч. Затем в каждую лунку вносили по 10 мкл культуральной среды, содержащей 5FU или RF так, чтобы конечная концентрация

Таблица 1

### Последовательности кРНК, используемые в исследовании

The sequences of shRNAs used in the study

кРНК	Последовательность
shLAMA5	5'-GATCCACTGGATCAGGCTGACTATTTCTCGAGAAATAGTCAGCCTGATCCAGTTTTTTG
shCtrl	5'-GATCCCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTG

химиотерапевтического агента составляла: 0, 0,1, 1, 4, 10, 40, 100, 250, 500 и 1000 мкМ, или 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 4, 10, 50, 100 мкМ, соответственно. Клетки инкубировали в течение 120 ч или 48 ч, соответственно, при +37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В случае 5FU, через 72 ч среду из лунок отбирали, заменяли на свежую и сразу добавляли по 10 мкл раствора 5FU в такой же концентрации.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью реагента МТТ. Для этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ в DPBS с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Затем среду из лунок полностью отбирали, образовавшуюся соль формазана растворяли в 150 мкл ДМСО. Измерения оптической плотности ОП<sub>570</sub> проводили на планшетном спектрофлуориметре SpectroMax iD3. Все эксперименты поставлены в двух повторностях. Измерения для каждой точки проводились в пяти лунках.

#### Анализ экспрессии генов с использованием микрочипов

Для оценки влияния ингибирования экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов на профиль экспрессии генов, был проведен сравнительный транскриптомный анализ в клетках HT29-shCtrl и HT29-shLAMA5 с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, США). Выделение, анализ качества и количества РНК проводили как было описано ранее [9, 10]. Для всех выделенных образцов РНК значения RIN превышали 9,5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов для гибридизации на микрочипы проводили в соответствии с протоколом производителя. Гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили как было описано ранее [11, 12]. Обработку CEL-файлов, полученных при сканировании микрочипов, проводили с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0. Неаннотированные наборы проб на микрочипе были исключены из анализа. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе было выбрано значение 6,0 в логарифмической шкале Affymetrix. Гены, для которых уровень сигнала находился ниже этого уровня, рассматривались как неэкспрессирующиеся.

#### Статистическая обработка данных

Анализ кривых зависимостей выживаемости клеток от концентрации химиотерапевтических препаратов и расчет доз полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток (IC<sub>50</sub>)

проводили как было описано в работе [13] с помощью программы для статистической обработки данных RStudio и расширения программного пакета drc [14].

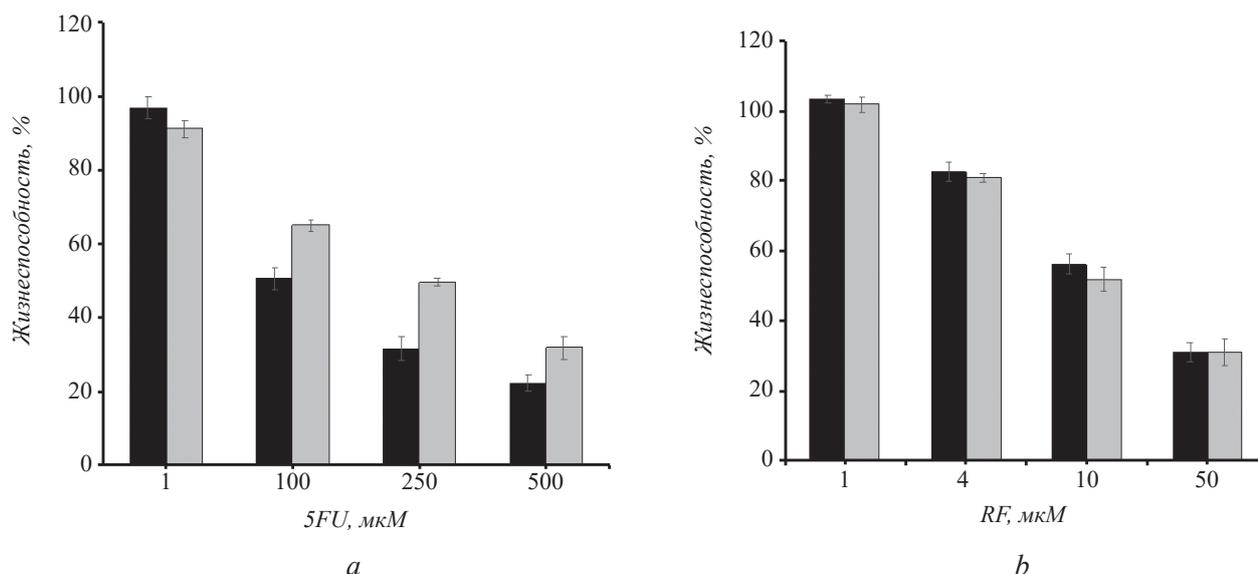
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние ингибирования экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов на жизнеспособность клеток линии HT29

В качестве модельной клеточной линии была выбрана линия HT29, которая является стандартной моделью в исследованиях колоректального рака и характеризуется наиболее эпителиальным фенотипом, по сравнению с другими линиями этого типа опухолей [15]. Для оценки влияния эндогенной активации  $\alpha 5$ -цепи ламининов в клетках колоректального рака на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам был осуществлен нокаун гена *LAMA5*, кодирующего данный белок, в клетках линии HT29. Нокаун проводили с помощью трансдукции клеток лентивирусными частицами, содержащими кРНК к гену *LAMA5* (HT29-shLAMA5). В качестве контрольной линии использовали линию HT29, трансдуцированную контрольной кРНК с «бессмысленной» последовательностью (HT29-shCtrl).

Анализ чувствительности клеток к действию 5FU показал, что полумаксимальное ингибирование жизнеспособности клеток контрольной линии HT29-shCtrl достигается при концентрации цитостатика 224 мкМ. Поскольку значение IC<sub>50</sub> оказалось близким к полученному авторами ранее значению (237 мкМ) для исходной линии HT29 (статья в печати), можно сделать вывод, что трансдукция клеток HT29 лентивирусными частицами сама по себе не оказала значимого воздействия на клетки. Однако, значение IC<sub>50</sub> для клеток линии HT29-shLAMA5 составило 102 мкМ (рис. 1а). Таким образом, ингибирование эндогенной экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов способствовало увеличению чувствительности клеток к 5FU в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контрольной линией.

Интересно, что чувствительность линий HT29-shCtrl и HT29-shLAMA5 к действию RF оказалась практически одинаковой (рис. 1б). Значения доз полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток составили 11,3 и 10,6 мкМ, соответственно. Отметим, что RF принципиально отличается от 5FU как по химической структуре, так и по механизму цитостатического действия [6, 16]. По-видимому, эндогенная экспрессия  $\alpha 5$ -цепи ламининов имеет разное



**Рис. 1.** Оценка жизнеспособности клеток контрольной линии HT29-shCtrl (светлые столбики) и линии HT29-shLAMA5 (темные столбики) с нокдауном гена *LAMA5* при действии химиотерапевтических агентов 5FU (a) и RF (b) в разной концентрации. Приведены результаты одного из экспериментов

**Fig. 1.** The curves of cell viability obtained for HT29-shCtrl and HT29-shLAMA5 cell lines under the action of chemotherapeutic agents 5FU (a) and RF (b). The results of one representative experiment

значение в отношении чувствительности клеток колоректального рака к действию цитостатических агентов с разным механизмом действия.

#### Оценка изменения экспрессии генов в результате ингибирования экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов и поиск возможного механизма увеличения чувствительности клеток к действию 5FU

Чтобы выявить возможные механизмы увеличения чувствительности клеток HT29-shLAMA5 к 5FU, а также возможные причины различия вли-

яния ингибирования экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов на чувствительность клеток к действию исследуемых в работе цитостатиков, был проанализирован профиль экспрессии генов в клеточных линиях HT29-shCtrl и HT29-shLAMA5 с помощью микрочипов Affymetrix.

Проведенный анализ показал, что нокдаун гена *LAMA5* в клетках HT29 ассоциирован с увеличением экспрессии генов, вовлеченных в так называемый ответ клетки на стресс эндоплазматического ретикулума (ER-стресс) (табл. 2). ER-стресс – механизм ответа клетки на стрессовое

Таблица 2

#### Увеличение экспрессии генов, ассоциированных с ER-стрессом, в результате нокдауна гена *LAMA5* в клетках HT29

The expression changes of genes associated with ER stress in response to the knockdown of *LAMA5* in HT29 cells

Ген	Увеличение экспрессии, кол-во раз	Ветвь ER-стресса [17, 19, 20]
<i>ERN1</i> (IRE1 $\alpha$ )	1,6	IRE1 $\alpha$
<i>XBP1</i>	1,3	IRE1 $\alpha$ , ATF6
<i>PPP1R15A</i> (GADD34)	1,6	PERK
<i>DDIT3</i> (CHOP)	1,9	IRE1 $\alpha$ , PERK, ATF6
<i>DDIT4</i>	2,9	PERK
<i>CHAC1</i>	2,7	PERK
<i>TRIB3</i>	2,0	PERK
<i>SESN2</i>	2,2	PERK, IRE1 $\alpha$
<i>VEGFA</i>	1,8	IRE1 $\alpha$

*Примечание:* В скобках указано обозначение белка, отличающееся от обозначения соответствующего гена.

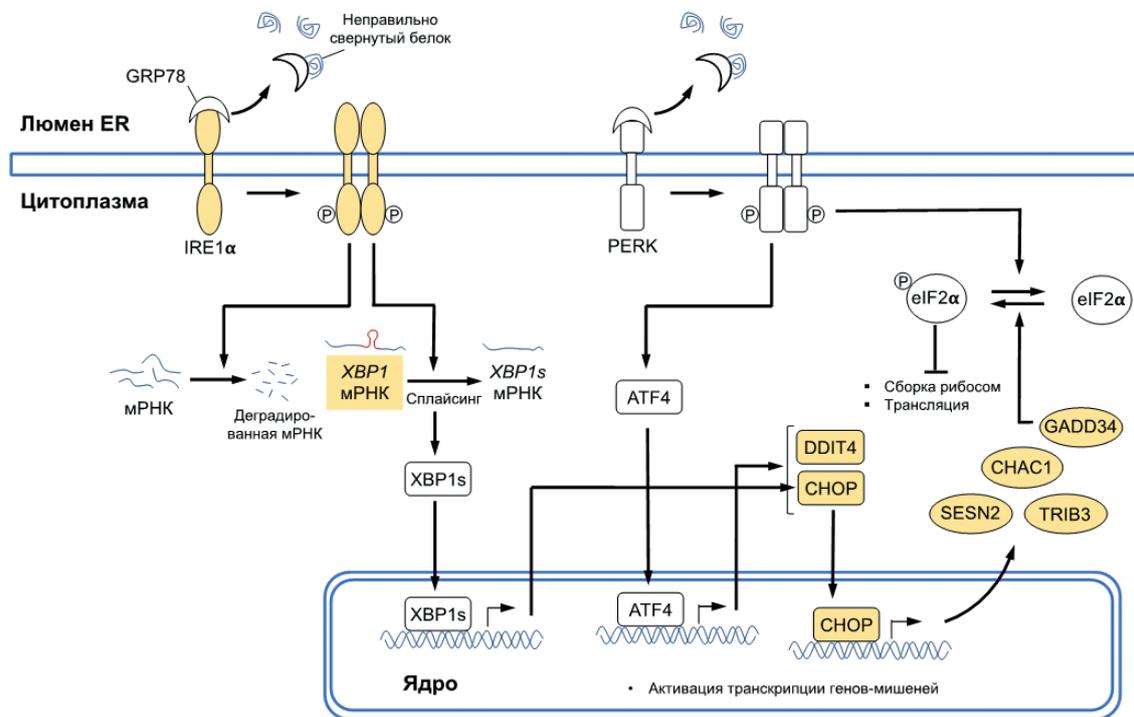
*Note:* The designation of the protein is indicated in parentheses if it differs from the designation of the corresponding gene.

воздействие, который наиболее ярко проявляется при накоплении в эндоплазматическом ретикулуме недосинтезированных или неправильно свернутых белков (unfolded protein response, UPR), однако, может быть вызван и другими стрессовыми воздействиями и процессами [17, 18]. Важной особенностью этого механизма является то, что его запуск может способствовать как выживаемости клеток, так и приводить к запуску апоптоза. В клетках HT29-shLAMA5 отмечалось повышение экспрессии генов белков, вовлеченных преимущественно в две из трех (IRE1 $\alpha$  и PERK) ветви ER-стресса (табл. 2, рис. 2). Так, наблюдалось увеличение экспрессии гена одного из сенсоров ER-стресса *ERN1* (белок IRE1 $\alpha$ ), а также генов *DDIT3*, *PPP1R15A*, *CHAC1*, *TRIB3*, *SESN2*, *VEGFA*, экспрессия которых отмечается как результат активации PERK- и IRE1 $\alpha$ - и ATF6-ветвей ER-стресса [18–20].

Интересно, что запуск апоптоза при обработке клеток сорафенибom, близким структурным аналогом регорафениба (RF), также задействует сигнальные пути ER-стресса [21]. Однако в настоящем исследовании активация ER-стресса

не приводила к увеличению чувствительности клеток HT29-shLAMA5 к RF. Это могло быть связано с изменением транспорта препарата в клетку. Из шестнадцати известных транспортеров RF, в клетках HT29 и HT29-shCtrl по данным транскриптомного анализа экспрессируются только три *SLCO4A1*, *ABCB10* и *ABCG2*. Последний из них, *ABCG2* (BCRP, breast cancer resistance protein), является основным транспортером RF [22]. При этом ингибирование эндогенной экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов сопровождалось падением экспрессии этого транспортера в 2 раза, тогда как экспрессия двух других транспортеров продолжала оставаться на низком уровне. Таким образом, в случае с RF, эффект активации ER-стресса в клетках HT29 в результате нокадауна гена *LAMA5*, по-видимому, нивелируется уменьшением количества основного транспортера RF в клетку.

Сенсорами ER-стресса служат три трансмембранных белка эндоплазматического ретикулума IRE1 $\alpha$ , PERK и ATF6. В норме все три сенсора связаны с шапероном эндоплазматического ретикулума GRP78. Образование таких белковых комплексов препятствует транслокации ATF6 в аппарат



**Рис. 2.** Схематическое изображение сенсоров ER-стресса и запускаемых им сигнальных каскадов и событий. Желтым выделены «участники» двух ветвей ER-стресса из трех (IRE1 $\alpha$  и PERK), для которых отмечалось увеличение экспрессии кодирующих их генов в результате нокадауна гена *LAMA5* в клетках HT29. GRP78 – шаперон эндоплазматического ретикулума. Остальные обозначения см. в табл. 2

**Fig. 2.** A schematic representation of the ER-stress sensors and signaling cascades triggered by them. The participants of two ER-stress branch (IRE1 $\alpha$  and PERK) for which there was an increase in the expression of the genes encoding them are highlighted in yellow. GRP78 is a chaperone of the endoplasmic reticulum. The other designation see in Table 2

Гольджи, где происходит его процессинг до фрагмента p50, а также димеризации и последующей активации IRE1 $\alpha$  и PERK (рис. 2) [17]. В классическом варианте ER-стресса в люмене эндоплазматического ретикулума происходит накопление неправильно свернутых белков, которые начинают конкурировать за связывание с GRP78, поскольку последний обладает большим сродством к ним. В результате происходит высвобождение IRE1 $\alpha$ , PERK и ATF6 из их комплексов с GRP78 и активация сигнальных путей ER-стресса. В клетках линии HT29-shLAMA5 наблюдался сниженный в 1,3 раза уровень экспрессии гена *HSPA5*, кодирующего GRP78. Несмотря на небольшое снижение, при пересчете на количество белковых молекул изменение экспрессии этого шаперона может быть существенным, поскольку уровень экспрессии *HSPA5* во всех исследуемых линиях детектировался как очень высокий относительно среднего уровня экспрессии генов. Таким образом, уменьшение экспрессии *HSPA5* может быть одним из возможных механизмов активации ER-стресса в клетках HT29 в результате нокдауна гена *LAMA5*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-14-01338).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Leight J.L., Drain A.P., Weaver V.M. Extracellular matrix remodeling and stiffening modulate tumor phenotype and treatment response. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, 2017, 1, 313–334.
- Maltseva D.V., Rodin S.A. Laminins in metastatic cancer. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 350–371.
- Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2012, 28, 523–553.
- Shkurnikov M.Y., Maltseva D.V., Knyazev E.N., Alekseev B.Y. Expression of stroma components in the lymph nodes affected by prostate cancer metastases. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 701–706.
- Maltseva D.V., Zakharova G.S., Rodin S.A., Tonevitsky A.G. The effect of laminins on chemoresistance of colorectal cancer cells. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, 67, 2148–2151.
- Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 330–338.
- Gill S., Dowden S., Colwell B., Collins L.L., Berry S. Navigating later lines of treatment for advanced colorectal cancer – Optimizing targeted biological therapies to improve outcomes. *Cancer Treat. Rev.*, 2014, 40, 1171–1181.
- Mal'tseva D.V., Makarova Y.A., Raigorodskaya M.P., Rodin S.A. Effects of laminins 332 and 411 on the epithelial–mesenchymal status of colorectal cancer Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166, 377–382.
- Khaustova N.A., Maltseva D.V., Oliveira-Ferrer L., et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochim.*, 2017, 142, 197–206.
- Krainova N.A., Khaustova N.A., Makeeva D.S., et al. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49, 743–749.
- Sakharov D.A., Maltseva D.V., Riabenko E.A., et al. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2012, 112.
- Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., et al. The Transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules.*, 2017, 22, 808.
- Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Shamshiev A.T., et al. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett.*, 1996, 392, 166–8.
- Ritz C., Baty F., Streibig J.C., Gerhard D. Dose-response analysis using R. *PLoS One.*, 2015, 10, e0146021.
- Maltseva D.V., Makarova J.A., Khristichenko A.Y., et al. Epithelial to Mesenchymal transition marker in 2D and 3D colon cancer cell cultures in the presence of laminin 332 and 411. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 291–298.
- Wilhelm S.M., Dumas J., Adnane L., et al. Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer.*, 2011, 129, 245–255.
- Grootjans J., Kaser A., Kaufman R.J., Blumberg R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, 16, 469–484.
- Avril T., Vauléon E., Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis.*, 2017, 6, e373–e373.
- Rashid H.-O., Yadav R.K., Kim H.-R., Chae H.-J. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 2015, 11, 1956–1977.
- Liu Z., Lv Y., Zhao N., Guan G., Wang J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis.*, 2015, 6, e1822–e1822.
- Rahmani M., Davis E.M., Crabtree T.R., et al. The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, 27, 5499–513.
- Fujita K., Masuo Y., Yamazaki E., et al. Involvement of the transporters p-glycoprotein and breast cancer resistance protein in dermal distribution of the multikinase inhibitor regorafenib and its active metabolites. *J. Pharm. Sci.*, 2017, 106, 2632–2641.

## Effect of Endogenous Expression of the Laminin $\alpha$ 5 Chain on Chemotherapy Resistance of Colorectal Cancer Cells

D.V. MALTSEVA<sup>1,2,\*</sup>, M.P. RAIGORODSKAYA<sup>2</sup>, G.A. BELYAKOVA<sup>3</sup>, and A. TURCHINOVICH<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

<sup>2</sup>*BioClinicum Scientific Research Center, Moscow, 115088 Russia*

<sup>3</sup>*Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, 119991 Russia*

<sup>4</sup>*SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309 Germany*

<sup>5</sup>*Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120 Germany*

\*e-mail: dmaltseva@gmail.com

Received September 19, 2019

Revised September 25, 2019

Accepted October 9, 2019

**Abstract**—The expression of the *LAMA5* gene encoding the laminin  $\alpha$ 5 chain has been inhibited in the line HT29 cells. The treatment with 5-fluorouracil (5FU) and regorafenib (RF) showed that the knockdown of *LAMA5* increases the sensitivity of the HT29 cells to 5FU by 2.2 times and does not affect their sensitivity to RF. The data of transcriptome analysis indicate that the observed changes in the sensitivity to 5FU may be caused by an activation of signaling pathways of the endoplasmic reticulum stress in the HT29 cells. In the case of RF, this effect can be compensated by a 2-fold decrease in the expression of the main RF transporter in HT29 cells.

**Key words:** apoptosis, colorectal cancer, laminins, drug resistance, knockdown, regorafenib, endoplasmic reticulum stress, 5-fluorouracil, laminin  $\alpha$ 5 chain, endogenous expression, HT29, *LAMA5*, UPR.

**Funding**—The study was supported by the Russian Science Foundation (Project 17-14-01338).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-5-29-35