

**FUNCTIONAL CROSSTALK BETWEEN NOTCH AND RUNX-2 SIGNALING
REVEALS A TARGETABLE AXIS IN FIBROSIS**

Meera Alaji¹ (post-graduate student), **Daniil Panshin**² (post-graduate student), **Anna Malashicheva**² (Dr. Sci.)

Scientific supervisor – PhD, Professor Ruslan Al-Shekhadat¹

¹ITMO University

²Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology
meeraalage@gmail.com

Abstract

The Fibrosis, characterized by excessive extracellular matrix deposition, leads to progressive organ dysfunction and has limited therapeutic options due to the pleiotropic nature of master regulators like TGF- β . Identifying downstream effectors and cooperating pathways is therefore critical. Here, we investigated the interplay between Notch and Runx-2 signaling pathways in human hepatic stellate cells (HSCs) and lung fibroblasts as models of liver and lung fibrosis. Lentiviral overexpression of N1ICD and Runx-2, together with shRNA-mediated knockdown of CSL (RBP- $\text{J}\kappa$) and Runx-2, revealed a previously unrecognized crosstalk between these pathways. GF- β 1 signaling compensated for RBP- $\text{J}\kappa$ knockdown by upregulating the Notch target HEY1, revealing a compensatory mechanism. Furthermore, co-overexpression of N1ICD and Runx-2 synergistically enhanced Runx-2 expression, identifying a positive feedback loop that amplifies the fibrotic phenotype. These findings define a critical downstream signaling nexus where Notch and Runx-2 pathways converge and cooperate, offering a novel and more selective target for anti-fibrotic therapy development.

Keywords

Fibrosis, Notch signaling, Runx-2, TGF- β , hepatic stellate cells, lung fibroblasts, crosstalk.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕРЕКРЕСТНЫЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ
СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ NOTCH И RUNX-2 ВЫЯВЛЯЕТ ПОТЕНЦИАЛЬНУЮ
МИШЕНЬ ПРИ ФИБРОЗЕ**

Альажи М.¹ (аспирант), **Паншин Д. Д.**² (аспирант), **Малашичева А. Б.**² (доктор наук)
Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор Аль-Шехадат Р. И.¹

¹Университет ИТМО

²Лаборатория Регенеративной Биомедицины, Институт Цитологии
meeraalage@gmail.com

Аннотация

Фиброз, характеризующийся избыточным отложением внеклеточного матрикса, приводит к прогрессирующей дисфункции органов и имеет ограниченные возможности терапевтического вмешательства из-за плеiotропной природы главных регуляторов, таких как TGF- β . В связи с этим критически важным является выявление нисходящих эффекторов и взаимодействующих сигнальных путей. В данном исследовании мы изучили взаимосвязь между сигнальными путями Notch и Runx-2 в звездчатых клетках печени человека и фибробластах легких, используемых в качестве моделей фиброза печени и легких. Lentивирусная гиперэкспрессия N1ICD и Runx-2, а также нокдаун CSL (RBP- $\text{J}\kappa$) и Runx-2 с помощью shРНК, выявили ранее неизвестный перекрестный взаимодействие между этими путями. Было обнаружено, что сигналинг TGF- β 1 компенсирует нокдаун RBP- $\text{J}\kappa$, повышая экспрессию гена-мишени Notch — HEY1, что указывает на существование компенсаторного

механизма. Кроме того, совместная гиперэкспрессия N1ICD и Runx-2 синергически усиливала экспрессию Runx-2, выявляя петлю положительной обратной связи, которая усиливает фиброзный фенотип. Полученные данные определяют критический нисходящий сигнальный узел, в котором пути Notch и Runx-2 сходятся и функционируют синергично, что открывает возможности для разработки новой, более селективной мишени для антифиброзной терапии.

Ключевые слова

Фиброз, сигнальный путь Notch, Runx-2, TGF- β , звездчатые клетки печени, фибробласты легких, перекрестное взаимодействие.

Fibrosis, the pathological outcome of dysregulated wound healing characterized by excessive scar tissue deposition, is a major cause of organ dysfunction worldwide with limited therapeutic options [1]. The transforming growth factor-beta (TGF- β) pathway is a master regulator of this process [2], but its pleiotropic roles in homeostasis and immunity complicate therapeutic inhibition [2,3]. Consequently, identifying downstream effectors and cooperating pathways is critical for developing precise therapies. The Notch signaling pathway has emerged as a key regulator of fibrogenesis in multiple organs [4]. Independently, Runt-related transcription factors (Runx), particularly Runx-2, act as TGF- β -responsive, pro-fibrotic drivers [5]. While both pathways are implicated, the potential crosstalk between Notch, TGF- β and Runx-2 signaling pathways in fibrosis remains entirely unexplored. Decoding this interaction may reveal a novel, targetable axis central to the fibrotic phenotype.

To investigate the interplay between Notch, TGF- β and Runx-2 signaling pathways in fibrosis, we employ a dual-model strategy. We worked on primary human hepatic stellate cells (HSCs)—the central effector cells in liver fibrosis— and primary human lung fibroblasts as a model for lung fibrosis. We are delineating this crosstalk through genetic manipulation in our cellular models. For overexpression, we use lentiviral vectors to deliver and stably express the Notch transcription factor (Notch1 Intracellular Domain, N1ICD) and the Runx-2 gene. For knockdown, we use lentiviral vectors encoding short hairpin RNAs (shRNAs) to specifically degrade the mRNA of target genes, such as the canonical Notch transcription factor CSL (RBP-J κ) and Runx-2. Concurrently, initial mechanistic studies in a human lung fibroblast model have already revealed critical interactions. Specifically, TGF- β 1 signaling compensated for RBP-J κ knockdown by upregulating the Notch target HEY1. Furthermore, co-overexpression of N1ICD and Runx-2 synergistically enhanced Runx-2 expression, identifying a potential positive feedback loop between these pathways.

We have uncovered a critical functional crosstalk between Notch and Runx-2 pathways, characterized by compensatory signaling and a positive feedback loop that potentiates fibrosis. This axis defines a downstream signaling nexus, offering a novel and more selective target for anti-fibrotic therapy development.

Literature

1. El Ayadi A., Jay J. W., Prasai A. Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring // *Int J Mol Sci*. 2020. Т. 21, № 3. С. 1105.
2. Zheng K.-X. и др. Dihydroergotamine ameliorates liver fibrosis by targeting transforming growth factor β type II receptor // *World Journal of Gastroenterology*. 2023. Т. 29, № 20. С. 3103.
3. Wang X.-L., Yang M., Wang Y. Roles of transforming growth factor- β signaling in liver disease // *World J Hepatol*. 2024. Т. 16, № 7. С. 973–979.
4. Andersson E. R., Sandberg R., Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function // *Development*. Cambridge, England, 2011. Т. 138, № 17. С. 3593–3612.
5. Feng Y. и др. Runt-related transcription factors: from pathogenesis to therapeutic targets in multiple-organ fibrosis // *Front. Cell Dev. Biol. Frontiers*, 2025. Т. 13.

