

Роль белков Notch в процессах канцерогенеза

М.В. Новикова, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, П.Б. Копнин

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Павел Борисович Копнин pbkopnin@mail.ru

Трансмембранные рецепторы семейства Notch, представленные у человека 4 белками (Notch1–4), активируются при непосредственном физическом контакте с клетками, содержащими Notch-лиганды семейств Jagged и Dll. Такое взаимодействие приводит к серии протеолитических расщеплений рецептора, в результате чего его внутриклеточный домен транслоцируется в ядро, и происходит активация транскрипции генов, регулирующих баланс между пролиферацией, клеточной смертью и дифференцировкой. Белки семейства Notch оказывают влияние на внутриклеточные сигнальные пути и межклеточные взаимодействия большинства типов клеток. Notch не только регулирует многие этапы эмбриогенеза, но и участвует в поддержании гомеостаза тканей и органов взрослого организма.

Нарушения активации Notch приводят к различным заболеваниям, в том числе участвуют в канцерогенезе. Наиболее хорошо исследованы нарушения Notch при различных гемобластозах, однако в последние годы выявлено их участие и в инициации и прогрессии солидных опухолей человека. Способность Notch выступать в качестве онкогена или проявлять свойства опухолевого супрессора зависит не только от гистогенетического типа экспрессирующих его клеток, но и от их микроокружения.

В обзоре рассматриваются как канонический сигнальный путь Notch, так и неканонические механизмы его активации, эпигенетическая регуляция, а также современные данные об опухоле-супрессирующих и опухоле-прототирующих эффектах этих белков в злокачественных новообразованиях человека. Отдельное внимание уделено взаимодействию между Notch и другими сигнальными путями, контролирующими процессы эпителиально-мезенхимального перехода, формирования и поддержания фенотипа стволовых клеток и специфических ниш, дифференцировки и ангиогенеза как при нормальном развитии, так и в контексте канцерогенеза. Фармакологическое регулирование активации Notch может быть одним из подходов к терапии многих злокачественных новообразований человека.

Ключевые слова: Notch, канцерогенез, микроокружение, стволовые клетки опухоли, эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез, эмбриогенез, внутриклеточная передача сигнала, микроРНК

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-30-42

The role of Notch pathway in carcinogenesis

M. V. Novikova, V. A. Rybko, N. V. Khromova, M. D. Farmakovskaya, P. B. Kopnin

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Notch transmembrane receptors family in humans consists of 4 proteins (Notch1–4) which are activated upon direct contact of cells, carrying appropriate ligands of Jagged or Dll families. This interaction leads to certain proteolytic events resulting in Notch intracellular domain translocation to the nucleus, where it activates various signaling pathways regulating the balance between cellular proliferation, apoptosis or differentiation.

Proteins of the Notch family influence intra- and intercellular pathways and communications of the majority of cell types. These receptors regulate both embryogenesis and adult organs and tissues homeostasis sustenance. Dysregulation of Notch signaling result in various diseases, and carcinogenesis as well. These Notch alterations are better studied in various hemoblastoses but it's involvement in solid tumors carcinogenesis has recently been shown. Notch pro- or antioncogenic action depends not only on the type of transformed cells but also on their microenvironment.

This review is dedicated to canonical Notch signaling, as well as to non-canonical actions, epigenetic regulation and current pro- and antioncogenic functions in human malignancies. Special attention is drawn to interaction between Notch and other signaling pathways controlling epithelia-to-mesenchyma transition of cells, stem cells formation, sustention of specific niches, cellular differentiation, angiogenesis both during embryogenesis and in pathological conditions. Pharmacological regulation of Notch activation could be a promising way of anticancer therapy.

Key words: Notch, carcinogenesis, microenvironment, tumor stem cells, epithelia-to-mesenchyma transition, angiogenesis, embryogenesis, signaling pathways, micro-RNA

Введение

Все больше данных свидетельствуют о том, что рост опухолей определяется не только самими трансформированными клетками, но и стромой. Микроокружение, в частности опухолевая строма (базальная

мембрана, клетки иммунной системы, клетки капилляров, мезенхимальные клетки и внеклеточный матрикс), активно влияют на трансформированные клетки. По мере прогрессии характеристики неопластических клеток и самих опухолей (скорость пролиферации,

гистологическая организация, фенотипические особенности стромальных клеток и внеклеточного матрикса) изменяются, так же как и их взаимодействие с микроокружением, что способствует инвазии и метастазированию.

Межклеточные взаимодействия, осуществляемые как растворимыми, так и мембраносвязанными сигнальными молекулами, также играют значительную роль в онкогенезе. Особое место среди сигнальных молекул занимают трансмембранные рецепторы семейства Notch, осуществляющие регуляторные воздействия при непосредственном физическом контакте с клетками, содержащими Notch-лиганды.

Notch-зависимые сигнальные пути регулируют пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, индукцию неоангиогенеза, метастазирование, изменение свойств стромальных фибробластов, формирование преметастатических ниш и т. д. По-видимому, активация сигнального пути Notch может отвечать и за приобретение стромальными клетками, в частности опухоль-ассоциированными фибробластами, способности стимулировать рост и инвазию многих опухолей эпителиального происхождения [1].

Поиск новых безопасных путей прерывания активации сигнального каскада Notch в опухолевых тканях может дать дополнительные эффективные способы лечения определенных злокачественных опухолей. Детальное изучение путей взаимодействия опухолевых и стромальных клеток различных органов лежит в основе перспективных терапевтических возможностей.

История открытия

Сигнальный путь Notch регулирует многие внутриклеточные и межклеточные сигнальные пути у большинства типов клеток. Трансмембранный белок Notch был открыт при изучении модельного организма *Drosophila melanogaster* в лаборатории Томаса Ханта Моргана в марте 1913 г. В следующем году Джон С. Декстер описал потерю части ткани с дистального кончика крыла у *D. melanogaster* при повреждении гена *NOTCH*. Позднее было получено больше данных об аномалиях в развитии *D. melanogaster* при дефектах *NOTCH*, например о нетипичном расположении щетинок, что свидетельствует о плейотропности данного сигнального пути. Впервые непосредственное участие сигнального пути Notch в онтогенезе доказал Дональд Полсон в 30-е годы XX века, работая с гемизиготными по *NOTCH* эмбрионами *D. melanogaster*. У таких особей не развивались мезодерма и энтодерма, в то время как из большей части эктодермы формировались нервные клетки в ущерб гиподермальным клеткам. Прорывом в изучении сигнального пути Notch стало клонирование, а затем и секвенирование гена [2].

Рецепторы семейства Notch (далее просто Notch, если не указано иное) — очень большие трансмембранные белки (около 300 кДа), содержащие внутриклеточный и внеклеточный домены. Поиск гомологов

у представителей различных видов, включая *Caenorhabditis elegans* [3] и позвоночных [4], значительно расширил сравнительно скудные знания, полученные только на основании изучения Notch у *D. melanogaster*. Например, работа, проведенная уже на *C. elegans*, выявила связь между активацией сигнального каскада Notch и активностью γ -секретазы [5]. В дальнейшем это привело к появлению теории о том, что внутриклеточная часть рецептора Notch отщепляется, затем транслоцируется в ядро и направленно регулирует транскрипцию целевых генов [6]. Открытие пресенилина, каталитической субъединицы комплекса γ -секретазы, мутации которой вызывают потерю протеолитической активности γ -секретазы и способствуют развитию болезни Альцгеймера, привело к интенсификации исследований сигнального пути Notch [7].

В процессе изучения генов и молекулярных механизмов, вовлеченных в запуск Notch, как на модельных организмах, так и на клеточных линиях установлена прямая связь между нарушениями Notch-сигналинга и развитием ряда заболеваний человека. Мутации в рецепторах и лигандах являются непосредственной причиной нарушения нормального развития организма и связаны с возникновением различных опухолей [8]. Гиперактивация, впрочем как и гипоактивация, сигнального пути Notch коррелирует с развитием различных форм неоплазий у мыши [9] и человека [10]. Ключевые компоненты каскада Notch могли бы выступать в качестве мишеней для таргетной терапии, но они необходимы для кроветворения, формирования костной ткани, эпидермиса, нормальной работы кишечника и т. д. [11].

Таким образом, исследование сигнального пути Notch, начавшееся со случайного обнаружения нетипичного фенотипа *D. melanogaster*, не только заполнило пробелы в знаниях о молекулярных механизмах онтогенеза и развитии различных патологий, но и поставило новые вопросы.

Канонический сигнальный каскад Notch

Сигнальный путь Notch по сравнению с другими основными путями, такими как Wnt, Shh, TGF- β /BMP, является уникальным по многим причинам. Во-первых, запуск канонического сигнального каскада Notch производится по юкстакринному механизму, т. е. передача сигнала осуществляется только при непосредственном физическом контакте двух клеток, одна из которых несет лиганд, а другая — соответствующий рецептор, в то время как многие пути используют паракринный механизм посредством лигандов, секретлируемых в межклеточное пространство и достигающих клетки-мишени путем диффузии и/или с помощью активного транспорта. Такая особенность связана с тем, что и лиганды, и рецепторы Notch являются трансмембранными белками и, соответственно, «заякорены» в клеточной мембране [12]. Во-вторых, Notch — плейотропный сигнальный путь, который зависит от кле-

точного контекста и многих других факторов. Например, он может регулировать латеральное ингибирование, определять клеточную судьбу, а также границы органов в процессе морфогенеза у *D. melanogaster* [13]. Активация или ингибирование Notch-сигналинга может повлечь за собой ряд различных клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка или клеточная смерть, в зависимости от контекста и типа клеток. Синаптическая пластичность, память и обучение как у плодовых мушек [14], так и у человека [15] связаны с активацией сигнального пути Notch, что свидетельствует о его важности для уже дифференцированных клеток.

Активация канонического сигнального каскада происходит при связывании лиганда с рецептором на поверхностях двух контактирующих клеток, что приводит к отщеплению внутриклеточной части рецептора и ее транслокации в ядро с последующим взаимодействием с транскрипционными факторами и кофакторами для активации транскрипции целевых генов (рис. 1) [16]. Степень активации четко контролируется воздействием различных факторов на основные компоненты канонического сигнального каскада, и этот механизм консервативен у большинства видов.

Рецепторы Notch представляют собой мультидоменные трансмембранные белки I типа [12]. У млеко-

питающих, включая человека, они представлены 4 паралогами (Notch1–4), в то время как у *D. melanogaster* присутствует только 1 гомолог Notch. Они синтезируются в ЭПР и с помощью экзоцитоза попадают на внешнюю сторону плазматической мембраны. В ЭПР сигнальная N-концевая аминокислотная последовательность отщепляется, и внеклеточный домен рецептора Notch подвергается модификациям гликозилтрансферазами [17]. Для его активации необходимо O-гликозилирование в ЭПР [18], в то время как дальнейшее присоединение к этой цепи O-ксилозы используется для его негативной регуляции [19]. Внеклеточный домен изначально подвергается протеолизу в комплексе Гольджи фуриноподобной протеазой [20]. Разрезанные фрагменты удерживаются вместе нековалентными взаимодействиями, и рецептор переносится на поверхность клетки для дальнейшего взаимодействия с лигандами.

Лиганды Notch семейств Delta и Serrate также являются трансмембранными белками I типа, содержащими большой внеклеточный домен и относительно короткий внутриклеточный домен [12]. У млекопитающих они представлены 3 белками семейства Delta (Dll1, Dll3, Dll4) и 2 белками семейства Serrate (Jagged1, Jagged2). После связывания лиганда происходит эндоцитоз комплекса лиганд–рецептор, рецептор Notch

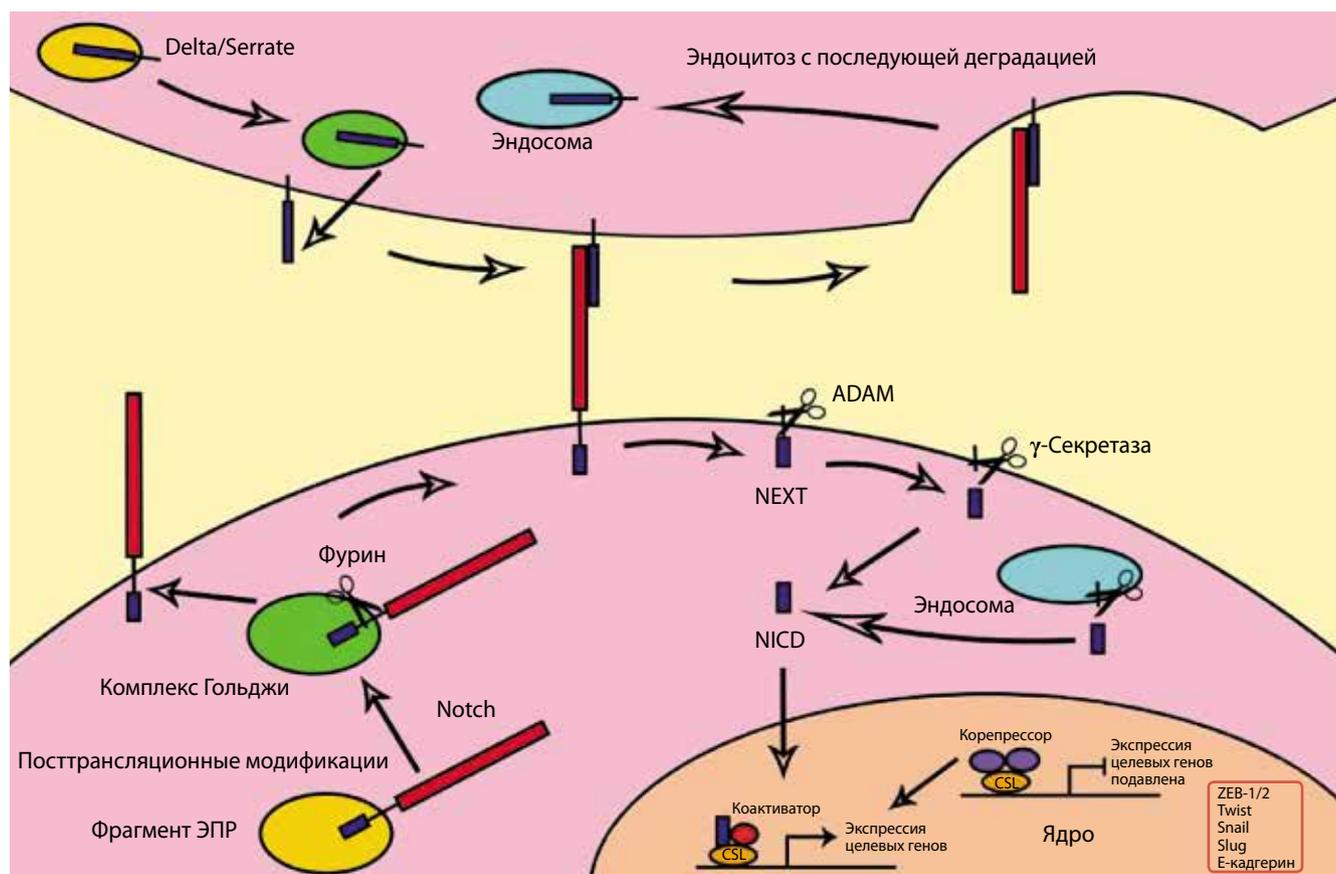


Рис. 1. Схема канонического сигнального пути Notch. Указаны основные участники и некоторые целевые гены, влияющие на активацию эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). ЭПР – эндоплазматический ретикулум

подвергается конформационным изменениям, что делает доступным сайт протеолитического расщепления металлопротеиназой ADAM. Это влечет за собой высвобождение внеклеточного домена [21]. Образовавшаяся после протеолиза часть рецептора NEXT (Notch extracellular truncated form) все еще закреплена в мембране, но подвергается дальнейшему протеолизу γ -секретазой с образованием NICD (Notch intracellular domain), который транспортируется в ядро [22].

В ядре NICD взаимодействует с ДНК-связывающим транскрипционным фактором CSL (RBP- $\text{J}\kappa$ у млекопитающих) и кофактором Mam/MAML1–3 [23]. В отсутствие NICD CSL связывается с ДНК в комплексе с различными кофакторами и подавляет транскрипцию целевых генов сигнального пути Notch [24]. NICD связывается с CSL и Mam, корепрессорный комплекс разбирается, что приводит к снятию репрессии с генов [25] и активации транскрипции, в частности за счет привлечения ацетилтрансферазы гистонов и других комплексов ремоделирования хроматина [26]. Далее NICD подвергается фосфорилированию, например циклинзависимой киназой 8 (CDK8) [27], и полиубиквитинированию [28], что приводит к протеасомной деградации и терминации сигнала [27] (см. рис. 1).

Целевые гены Notch. Сигнальный путь Notch сильно зависит от клеточного контекста, однако некоторые гены активируются им во многих типах тканей. Учеными открыто множество генов, контролируемых сигнальным путем Notch, связанных как непосредственно с клеточным циклом (*CyclinD1*, *NRARP*, *NF- κ B*, *TP21*, *pre-Ta*), так и со злокачественной трансформацией клеток (*C-MYC*, *IGF1-R*, *SURVIVIN*, *SLUG*) (табл. 1). Белки HES1 и HEY1, прямые мишени сигнального пути Notch, действуют как репрессоры транскрипции, непосредственно связываясь с ДНК с помощью специальных доменов. Среди большинства клеточных линий сигнальный путь Notch поддерживает клетки в дедифференцированном состоянии, хотя в кератиноцитах он способствует пролиферации [29] (см. табл. 1).

Роль сигнального пути Notch в эмбриогенезе и поддержании гомеостаза взрослого организма

Сигнальный путь Notch регулирует эмбриогенез и поддержание гомеостаза практически всех тканей и органов человека. Его действие во многом зависит от клеточного контекста, например, при одних условиях он может стимулировать пролиферацию, а при других — апоптоз или дифференцировку клеток. Следовательно, его влияние на различные внутриклеточные сигнальные пути определяет судьбу клетки [30].

Сигнальный путь Notch в эмбриогенезе. Латеральная спецификация (более общий и точный термин, чем «латеральное торможение», который часто используется, когда речь заходит о сигнальном пути Notch) описывает механизм, который позволяет клеткам влиять на судьбу своих «соседей». Тем не менее, в большинстве случаев можно говорить о Notch-зависимом лате-

Таблица 1. Целевые гены Notch (адаптировано из [29])

Ген	Функция
<i>HES1</i>	Транскрипционный фактор; регулирует клеточный цикл и дифференцировку
<i>HEY1</i>	Транскрипционный фактор; регулирует клеточный цикл и дифференцировку
<i>CyclinD1</i>	Регулирует клеточный цикл
<i>NRARP</i>	Негативный регулятор сигнального пути Notch; регулирует пролиферацию
<i>NF-κB</i>	Регулирует пролиферацию и апоптоз
<i>TP21</i>	Ингибитор циклинзависимых киназ
<i>C-MYC</i>	Транскрипционный фактор; регулирует пролиферацию, апоптоз и дифференцировку
<i>IGF1-R</i>	Рецептор инсулиноподобного фактора роста; регулирует пролиферацию и дифференцировку
<i>SURVIVIN</i>	Антиапоптотический белок
<i>SLUG</i>	Транскрипционный фактор; индуктор ЭМП
<i>NANOG</i>	Транскрипционный фактор; регулирует плюрипотентность и самообновление эмбриональных стволовых клеток

ральном торможении. Дифференцировка нейробластов в нейрогенной области у эмбриона *D. melanogaster* — классический пример участия сигнального каскада Notch в онтогенезе. При этом клетка, дифференцирующаяся в нейробласт, ингибирует аналогичный процесс у близлежащих клеток. В процессе морфогенеза такое действие влечет за собой двух основных последствий: во-первых, сигнальный путь Notch способствует сегрегации специфических клеточных типов от других, онтогенетически эквивалентных клеток, и во-вторых, он обеспечивает формирование границ между разными типами тканей [13].

Аналогичная функция сигнального пути Notch была открыта при изучении процесса дифференцировки периферической нервной системы у *D. melanogaster*, в частности при анализе клеток-предшественников сенсорной системы. Благодаря асимметричной активации данного сигнального каскада после деления клетки одна из дочерних клеток становится принимающей сигнал, в то время как другая — посылающей сигнал. Потомки данных клеток вновь используют сигнальный путь Notch при следующем клеточном делении для определения своей клеточной «судьбы» (волосы, нейроны, оболочка нейронов и т. д.) [13].

Сигнальный путь Notch регулирует эмбриональное развитие и активен в недифференцированных клетках эмбриональной нервной системы. Во взрослом мозге его экспрессия снижается и ограничивается [31]. Данный сигнальный каскад поддерживает популяцию нейронных стволовых клеток, а также стимулирует дифференцировку глиальных клеток [13].

Мышь, нокаутная по *NOTCH*, умирает на 11-й день эмбрионального развития, и среди прочих причин можно выделить потерю нейробластов и преждевременную дифференцировку нейронов [32]. При развитии нервной системы клетка, посылающая сигнал, дифференцируется в нейрональную клетку-предшественника, в то время как клетки, принимающие сигнал, остаются в недифференцированном состоянии. Как было показано, этот процесс коррелирует со снижением экспрессии *HES1*, *HES5*, пронеуральных генов и Notch-лигандов в недифференцированных предшественниках [33].

ЭМП – процесс, с помощью которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип, позволяющий им терять межклеточную адгезию и мигрировать. Во время эмбриогенеза в результате ЭМП образуются клетки, дающие начало многим тканям взрослого организма. ЭМП можно рассматривать как дедифференцировку клеток. Именно благодаря этому процессу формируется мезодерма, из которой впоследствии образуется широкий спектр клеток, в том числе предшественники миобластов, остеобластов и фибробластов. ЭМП также обеспечивает миграцию и дифференцировку клеток нервного гребня, из производных которых формируются глиальные и нервные клетки, железистая ткань надпочечников, пигмент-содержащие клетки эпидермиса, скелетная и соединительная ткани. Индукцию ЭМП могут регулировать несколько сигнальных путей, также участвующих и в самообновлении стволовых клеток, такие как Wnt, Shh и Notch [34].

Сигнальный путь Notch в ангиогенезе. Для формирования зрелых сосудов в строго определенных местах одна эндотелиальная клетка становится «концевой» (“tip”), а соседние клетки приобретают “stalk”-фенотип (образуют просвет сосуда). Специализация и поддержание эндотелиальных клеток в данных состояниях также регулируются сигнальным путем Notch. В частности, Dll4, трансмембранный лиганд рецептора Notch, связывается с ним на клетках со “stalk”-фенотипом, что приводит к подавлению в них “tip”-фенотипа. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин участвует в регуляции экспрессии Dll4 в клетке на уровне транскрипции генов. Активация сигнального пути Notch в “stalk”-клетках ингибирует экспрессию генов *VEGFR2* и *NRP*. *JAGGED1* экспрессируется только в “stalk”-клетках и поддерживает их фенотип [35].

Сигнальный путь Notch в стволовых клетках. Сигнальный путь Notch вовлечен в регуляцию количества стволовых клеток во многих тканях, поэтому его часто называют сигнальным путем стволовых клеток. В контексте данной статьи невозможно рассмотреть весь спектр стволовых клеток, судьбу которых регулирует данный сигнальный каскад. Тем не менее, хочется подчеркнуть, что активность этого сигнального каскада необходима и задействована в процессах клеточной дифференцировки, деления и стабильности стволовых

клеток практически в каждом органе, включая кишечник, органы кроветворения, эпителий, мышцы, мезенхиму, нервную систему, зародышевые листки и т. д. [36].

Например, средняя кишка взрослой особи *D. melanogaster* содержит особые стволовые клетки, которые при асимметричном делении воспроизводят себя, а также дают начало энтеробластам, благодаря чему обеспечивается поддержание фиксированного количества стволовых клеток. Часть энтеробластов в дальнейшем дифференцируется в энтероэндокринные клетки [37]. Как было показано, сигнальный путь Notch определяет асимметричное деление стволовых клеток в средней кишке взрослой особи *D. melanogaster*. Dll1/3/4 активно экспрессируются в стволовых клетках и индуцируют дифференцировку окружающих энтеробластов в энтероциты, в то время как недостаточное количество лиганда способствует дифференцировке в эндокринные клетки [38].

Сигнальный путь Notch в гемопоэзе. Кроветворение – результат четко контролируемого баланса между самообновлением и дифференцировкой гемопоэтических стволовых клеток. В процессе гемопоэза гены *NOTCH* экспрессируются на различных стадиях развития клеток крови. Четкая регуляция уровня экспрессии и степени активации этого сигнального каскада поддерживает баланс между дифференцировкой и пролиферацией стволовых клеток и их потомков. Активация сигнального пути Notch в гемопоэтических клетках происходит при их взаимодействии друг с другом и со стромальными клетками костного мозга, экспрессирующими Notch-лиганды: Jagged1, Dll1 и Dll4 [39]. Их экспрессия наблюдается также в тимусе, что указывает на важность этого сигнального каскада в образовании Т-клеток [40]. В сочетании с IL-7 он стимулирует раннее развитие Т-клеток, в то время как совместно с GM-CSF приводит к дифференцировке предшественников в миелоидные клетки [41]. Среди клеток миелоидного ряда повышенная экспрессия *NOTCH1* и *NOTCH2* отмечена в гранулоцитах [42]. Экспрессия *NOTCH1* также снижается в процессе созревания клеток-предшественников эритроидного ряда. Показано, что гиперактивность сигнального пути Notch способна сделать гемопоэтические стволовые клетки бессмертными, что может приводить к неоплазиям [43].

Сигнальный путь Notch в злокачественных опухолях человека

Сигнальный путь Notch контролирует большинство ключевых процессов в клетках, поэтому все больше исследований направлено на его изучение в контексте патологий, в частности канцерогенеза. Он способен стимулировать как деление, так и апоптоз клеток в зависимости от микроокружения. Принимая во внимание, с одной стороны, роль сигнального пути Notch в этих процессах, а с другой – его активное участие в коммуникации различных типов клеток

и поддержании так называемых преметастатических ниш, можно предположить, что этот сигнальный каскад проявляет как опухоль-промотирующую, так и опухоль-супрессирующую активность, причем в пределах одной и той же опухоли, в зависимости от состояния клетки и ее микроокружения [8] (рис. 2). Способность сигнального пути Notch выступать в качестве онкогена или проявлять свойства опухолевого супрессора зависит не только от гистогенетического типа экспрессирующих его клеток, но и от их микроокружения.

Сигнальный путь Notch как онкоген. Первое доказательство вовлеченности сигнального пути Notch в канцерогенез появилось при изучении Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ). Нарушения в этом сигнальном каскаде отмечены примерно в 10–20 % всех случаев ОЛЛ. В 1991 г. L.W. Ellisen с соавт. описали транслокацию t(7;9)(q34;q34.4), характерную для данного заболевания, которая приводит к образованию химерного белка Notch1/TCR β , имитирующего NICD [4]. Эта транслокация встречается достаточно редко, всего в 1 % случаев Т-ОЛЛ. Однако 13 лет спустя была обнаружена активирующая мутация гена *NOTCH1* примерно в 56 % случаев Т-ОЛЛ, что доказывает большую важность этого сигнального каскада в развитии данного заболевания [44]. Наиболее характерными являются мутации в HD-домене, которые обеспечивают лиганд-независимую активацию, или в PEST-домене, которые приводят к увеличению времени жизни NICD. Примечательно, что на моделях Т-ОЛЛ на экспериментальных животных описанные активирующие мутации в *NOTCH1* имеют слабый онкогенный потенциал [45].

Недавние исследования обнаружили активирующие мутации в *NOTCH1* при хронической лимфоци-

тарной лейкемии (ХЛЛ). Инициация данного заболевания зависит от мутаций в генах иммуноглобулинов. *NOTCH1*-активирующие мутации (в основном сдвиг рамки считывания в кодоне 2515) ослабляют Fbw7-зависимую деградацию Notch1. Подобные мутации были также обнаружены у 31 % пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Данные результаты дают основание полагать, что, хотя мутации в *NOTCH1* не являются характерными для ХЛЛ и тем более не индуцируют заболевание, они коррелируют с неблагоприятным прогнозом [46].

Со времени открытия мутаций в *NOTCH1* при Т-клеточной острой лимфобластной лимфоме нарушенную регуляцию сигнального пути Notch связывают и со многими солидными опухолями (нейробластома, рак молочной и предстательной желез и т. д.) [47]. Считается, что его роль в онкогенезе в основном проонкогенная, хотя существует ряд данных, указывающих на его опухоль-супрессирующую активность (рак шейки матки, плоскоклеточный рак кожи, мелкоклеточный рак легкого) [48] (табл. 2).

Онкогенный сигнальный путь Notch в солидных опухолях был впервые обнаружен при изучении вируса мышинной опухоли молочной железы (mouse mammary tumor virus). Интеграция вируса в специфический локус генома хозяина приводит к нарушению экспрессии близлежащих генов, например экспрессии конститутивно активной формы *NOTCH4*. На мышинных моделях показано, что активация Notch может стимулировать прогрессию рака молочной железы, а повышенная экспрессия *NOTCH1* или *JAGGED1* в образцах рака молочной железы человека коррелирует с неблагоприятным прогнозом [49].

Эндотелиальные клетки, видимо, играют более активную роль в опухолевом росте и метастазирова-

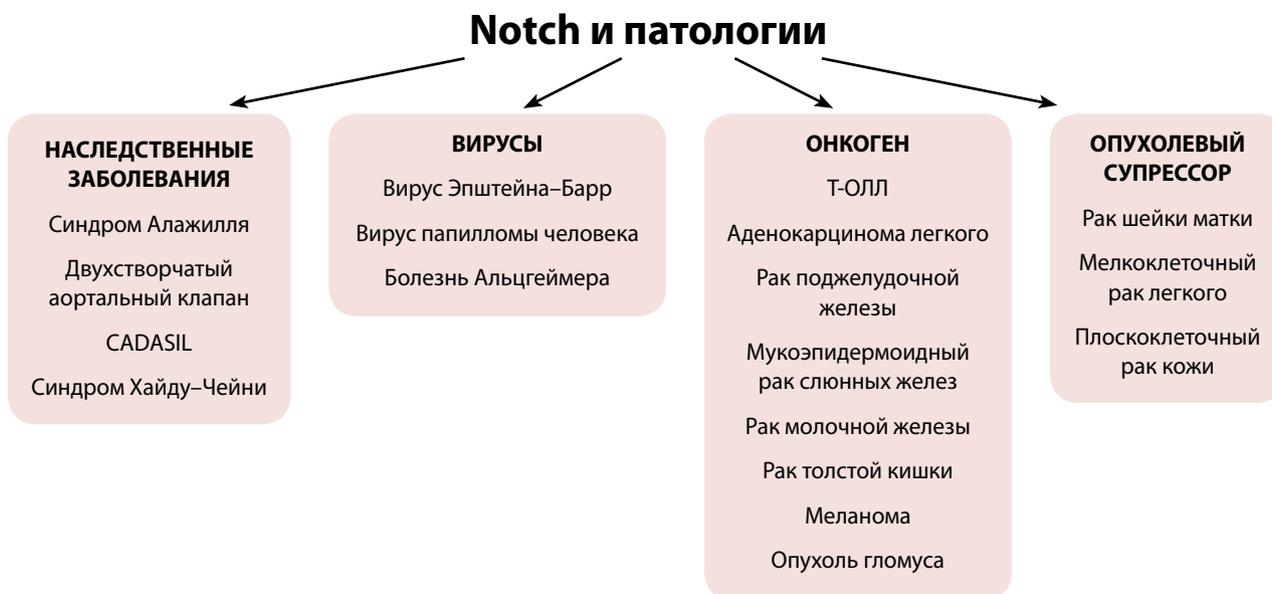


Рис. 2. Основные последствия патологического Notch-сигналинга. CADASIL – аутосомно-доминантная церебральная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией; синдром Хайду–Чейни – остеолит дистальных отделов конечностей (акродентоостеодисплазия)

Таблица 2. Двойная роль Notch в канцерогенезе (адаптировано из [58])

Тип рака	Роль Notch	Мутации	Предполагаемые или наблюдаемые последствия
Т-ОЛЛ	Онкоген	<i>NOTCH1</i> <i>FBXW7</i>	Лиганд-независимая активация Notch; стабилизация NICD
ХЛЛ	Онкоген	<i>NOTCH1</i>	Стабилизация NICD; коррелирует с неблагоприятным прогнозом
Немелкоклеточный рак легкого	Онкоген	<i>NOTCH1</i>	Стабилизация NICD; коррелирует с неблагоприятным прогнозом
Гепатоцеллюлярный рак	Опухолевый супрессор	Нет	Эндогенная активация Notch инициирует остановку роста и апоптоз; активированный Notch коррелирует с благоприятным прогнозом
Хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ)	Опухолевый супрессор	<i>NCSTN</i> <i>MAML1</i> <i>APH1A</i> <i>NOTCH2</i>	Мутации, приводящие к потере функции; активация Notch ингибирует дифференцировку миелоидных клеток-предшественников
Плоскоклеточный рак кожи	Опухолевый супрессор	<i>NOTCH1</i> <i>NOTCH2</i> <i>NOTCH3</i>	Укороченная или лиганд-связанная неактивная форма рецепторов; прогнозируемое снижение дифференцировки
В-ОЛЛ	Опухолевый супрессор	Нет	Эндо- или экзогенная активация Notch индуцирует остановку роста и апоптоз

нии, чем принято считать. Показано, что они секретируют растворимые вещества, которые через паракринный механизм способствуют формированию опухолевых стволовых клеток (ОСК) при различных онкопатологиях. Как отмечено несколькими группами исследователей, ОСК накапливаются в периваскулярном пространстве. Эндотелиальные клетки микрососудов мозга человека могут активировать сигнальный путь Notch в близлежащих клетках глиобластомы по юстакринному механизму [50].

Сигнальный путь Notch как опухолевый супрессор. Несмотря на данные об онкогенных свойствах сигнального пути Notch, он может выполнять опухолевую супрессирующую функцию.

В эпидермисе лиганды и рецепторы Notch экспрессируются в супрабазальных клетках. *In vitro* активация сигнального пути Notch индуцирует их дифференцировку и арест клеточного цикла [51]. Условный нокаут *NOTCH1* в коже приводит к значительному увеличению базального эпидермального слоя [52]. В соответствии с опухоль-супрессирующей функцией сигнального пути Notch в коже, потеря *NOTCH1* приводит к развитию карциномы из базальных клеток у мышей [53]. В коже Notch1 действует как опухолевый супрессор путем подавления других сигнальных путей — Wnt и Shh [54].

Недавно были опубликованы данные, продемонстрировавшие опухоль-супрессирующее свойство Notch в гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК) [9]. Чтобы получить более полную картину механизма инициации и прогрессии ГЦК, была создана трансгенная мышь с органоспецифической делецией в клетках печени генов, кодирующих белок ретинобластомы (*RB*), и двух других генов из родственных семейств — *TP107* и *TP130*. В данной модели инактивация сигнального пути Rb приводит к увеличению числа стволовых клеток или

клеток-предшественников в печени и к развитию ГЦК. На основании полученных данных сделано предположение, что эти клетки инициируют ГЦК при инактивации Rb. Далее с помощью биоинформатических методов было показано, что в таких клетках также был активирован сигнальный путь Notch. Это дает основание полагать, что он играет онкогенную роль в инициации ГЦК. Однако его ингибирование в данной модели с помощью специфического ингибитора γ -секретазы DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) приводило к ускоренному развитию ГЦК. «Насильственная» активация сигнального пути Notch при использовании NICD-фрагмента повлекла за собой арест клеточного цикла и апоптоз клеток ГЦК, полученных как от мыши, так и от человека. Чтобы оценить клиническую значимость данного наблюдения, были проведены исследования на предмет активации Notch-сигналинга у пациентов, и обнаружено, что у больных с благоприятным прогнозом уровень экспрессии Notch-зависимых генов (например, *HES1*) значительно выше [55].

Делеция никастрина (*NCSTN*), основного компонента комплекса γ -секретазы, с последующей инактивацией сигнального пути Notch или совместная делеция *NOTCH1* и *NOTCH2* у мышей могут приводить к миелолипролиферативному синдрому, имеющему общие черты с ХММЛ человека. С помощью биоинформатических методов выявлено, что сигнальный путь Notch ингибировал процесс дифференцировки полипотентных клеток-предшественников в моноциты/гранулоциты. Такое явление частично опосредовано прямым подавлением промоторов PU.1 и C/EBP α с помощью *HES1*. Обнаружено, что примерно 12 % пациентов с ХММЛ имеют инактивирующие мутации в генах *NCSTN*, *MAML1*, *NOTCH2*, *APH1A*, вовлеченных

в Notch-зависимую передачу сигнала. Данные мутации уникальны для ХММЛ и не обнаружены при других миелопролиферативных заболеваниях, таких как истинная полицитемия и миелофиброз [55].

Более того, недавние исследования плоскоклеточного рака головы и шеи выявили мутации *NOTCH1-4*. Идентифицировано 28 различных мутаций *NOTCH1* у 17,5 % проанализированных пациентов. Из этих нарушений 11 представлены нонсенс-мутациями или вставками/делециями, приводящими к потере функции, а оставшиеся 17 – миссенс-мутациями. Последние в основном локализовались во внеклеточном домене в EGF-повторах, необходимых для взаимодействия рецептора с лигандом [56]. У 11 % проанализированных пациентов также обнаружены различные мутации в *NOTCH2* и *NOTCH3*, приводящие к потере функции [57]. Значение этих мутаций в прогрессии плоскоклеточного рака головы и шеи требует дальнейших исследований, но тем не менее они подтверждают роль сигнального пути Notch как опухолевого супрессора при данной патологии.

Сигнальный путь Notch и ЭМП. Взаимодействие между сигнальными путями и их сильная зависимость от микроокружения делают терапию злокачественных новообразований очень сложной. Есть данные, указывающие на то, что ЭМП причастен к появлению ОСК в солидных опухолях [34]. Это крайне важно, учитывая тот факт, что основным свойством ОСК является их туморогенность.

Недавние исследования выявили, что взаимодействие между сигнальными путями Notch и Wnt/ β -катенин обеспечивает бесконтрольное самообновление ОСК, что приводит к ОСК-зависимому рецидиву после лечения. Сигнальный путь Notch контролирует формирование как ОСК, так и ЭМП-фенотипов. Действительно, Notch-зависимый ЭМП делает поляризованные эпителиальные клетки подвижными и инвазивными из-за потери E-кадгерина (мембранный гликопротеин, принимающий участие в клеточных контактах), что приводит к активации β -катенина и распространению раковых клеток и ОСК первичной опухоли. Сигнальный путь Notch взаимодействует с рядом онкогенных сигнальных путей, транскрипционными и ростовыми факторами (Snail, Slug, TGF- β и т. д.), регулируя тем самым различные патологические процессы, ассоциированные с развитием неоплазии, прогрессию рака и возможности терапии [59].

Взаимодействие Jagged1 и Notch1 индуцирует гиперэкспрессию Slug и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для многих типов карцином. Slug очень важен для Notch-зависимого ЭМП, так как подавляет экспрессию E-кадгерина, что приводит к активации β -катенина и устойчивости к анокиису. Ингибирование Notch-сигналинга в ксенографтах, образованных Slug-позитивными/E-кадгерин-негативными клетками рака молочной железы, ингибирует опухолевый рост и метастазирование [60].

Кроме того, сигнальный путь Notch может регулировать и другой белок, важный для ЭМП, – Snail. Во-первых, данный сигнальный каскад направленно активирует транскрипцию Snail, во-вторых, он усиливает активацию LOX за счет усиления связывания HIF-1 α с промотором LOX, что, в свою очередь, стабилизирует Snail. Следовательно, сигнальный путь Notch требуется для индукции ЭМП в условиях гипоксии и увеличивает инвазивность опухолевых клеток. Он также вовлечен в приобретение фенотипа ЭМП гемцитабин-устойчивыми клетками при раке поджелудочной железы. Более того, он стимулирует в них экспрессию виментина, ZEB1, NF- κ B. Подавление сигнального пути Notch снижает инвазивность этих клеток. Следовательно, его ингибирование современными терапевтическими методами может использоваться для преодоления проблемы лекарственной устойчивости и ЭМП опухолевых клеток [61].

Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что гипоксия потенциально может ингибировать дифференцировку опухолевых клеток и, таким образом, играет непосредственную роль в процессе поддержания популяции ОСК. Сигнальный путь Notch принимает участие в поддержании дедифференцированного состояния у различных типов клеток в условиях гипоксии. В таких клетках формирование комплекса HIF-1 α /NICD повышает уровень активации сигнального пути Notch [62].

Потеря эпителиального фенотипа и приобретение мезенхимальных черт могут способствовать формированию метастазов при колоректальном раке. Активность сигнальных путей Wnt, Notch, TGF- β и экспрессия мезенхимальных и эпителиальных маркеров исследованы в первичных опухолях толстой кишки и соответствующих им метастазах. Экспрессия мезенхимальных (виментин, фибронектин) и эпителиальных (E-кадгерин) маркеров коррелировала с маркерами активности сигнальных каскадов Wnt (β -катенин), Notch (HES1), TGF- β (фосфо-SMAD2). Первичные опухоли характеризуются аномальной экспрессией виментина и активированными сигнальными путями Notch и TGF- β . Удивительно, но многие метастазы утрачивали ядерный HES1 и фосфо-SMAD2, что указывает на снижение активности Notch-сигналинга и TGF- β во вторичных очагах роста опухолей толстой кишки [63].

Сигнальный путь Notch и микроокружение опухоли. Фибробласты, основной клеточный компонент соединительной ткани (стромы), могут приобретать активированный фенотип, превращаясь в миофибробласты, которые характеризуются экспрессией α -гладкомышечного актина и способствуют заживлению ран. Как только процесс заживления окончен, они удаляются из ткани [64]. Опухоль-ассоциированные фибробласты фенотипически сходны с миофибробластами [65].

В начале 90-х годов XX века было показано, что прививаемость и темпы роста ксенографтов рака мо-

лочной железы человека могут быть повышены при совместной инъекции трансформированных клеток с фибробластами или продуцируемыми ими растворимыми факторами. Тем не менее, спектр растворимых факторов, секретируемых фибробластами и ускоряющих темпы роста опухоли, по-прежнему остается в значительной степени неизвестным. Недавно показано, что продукция и секреция фибробластами IL-6 прямо коррелирует со способностью органоспецифичных фибробластов повышать темпы роста клеток ERα-положительного рака молочной железы и способствовать инвазии. Выдвинуто предположение, что IL-6, используя аутокринный или паракринный механизм, способствует росту и инвазии рака молочной железы через STAT3 и его эффекторы, такие как Notch3, Jagged1 и CA IX [65].

Неканонический сигнальный путь Notch и растворимые лиганды

Недавние исследования выявили несколько молекулярных механизмов действия сигнального пути Notch, называемых неканоническими. Интересно, что большинство примеров неканонического Notch-сигналинга связаны с патологическими состояниями, включая злокачественные заболевания, в то время как нормальные клеточные процессы демонстрируют канонический путь регуляции сигнального каскада Notch [66].

Как описано ранее, активация канонического сигнального пути Notch начинается с взаимодействия лиганда и рецептора, что запускает каскад реакций, приводящих к образованию фрагмента NICD. Однако активация T-клеточного рецептора приводит к быстрому появлению NICD, причем этот процесс может происходить в отсутствие лиганда. При изучении клеток иммунной системы *D. melanogaster* показано, что NICD может быть выщеплен вне зависимости от того, произошло взаимодействие лиганда и рецептора или нет. Такой NICD стабилизируется HIF-1α. Наблюдаемая лиганд-независимая активация сигнального пути Notch в иммунных клетках *D. melanogaster*, возможно, существует и у млекопитающих. Роль мембраносвязанных Notch-рецепторов обнаружена в дендритных клетках, которые активирует PI3K. Этот неканонический сигнальный путь регулирует экспрессию супрессорного цитокина IL-10 дендритными клетками в ответ на липополисахариды. С тех пор как стало известно, что дифференцировка в T-хелперы характеризуется неканоническими механизмами действия сигнального пути Notch, резонно представить терапевтическую стратегию, которая могла бы блокировать неканонический путь, не влияя на канонический, необходимый для поддержания гомеостаза и нормального функционирования клеток и тканей. Однако для достижения этой цели необходимо гораздо более детальное понимание различных неканонических механизмов активации Notch-сигналинга [67].

Ингибирование γ-секретазы не блокирует все Notch-зависимые процессы в опухолевых клетках, что демонстрирует роль неканонического сигнального пути Notch в канцерогенезе. Хотя часто при его неканоническом механизме действия ядерная локализация NICD все-таки требуется для онкогенеза. Далее кратко приведем характерные примеры участия неканонического пути Notch в канцерогенезе [68].

Продемонстрировано, что неканонический сигнальный путь Notch регулирует развитие T-клеток и лейкозов посредством активации сигнального пути NF-κB. В данном исследовании использована мышьяная модель с гиперэкспрессией *NOTCH3* специфически в T-клетках, которая приводила к развитию лейкоза. Суперэкспрессия *NOTCH3* конститутивно активирует NF-κB, возможно, за счет взаимодействия с IKKα [68].

При использовании RBP-Jк-нокаутной мыши выявлено, что неканонический механизм действия сигнального пути Notch (рецептор — Notch4) вовлечен в процесс развития рака молочной железы, в то время как канонический требуется для нормального формирования молочных желез. Такая дифференциальная регуляция дает возможность терапевтически направленно воздействовать на неканонический путь Notch для подавления онкогенеза, не влияя на развитие и гомеостаз тканей, обеспечивающихся каноническим сигнальным путем Notch. В клетках линий рака молочной железы неканоническая активация данного пути регулирует экспрессию IL-6, который, в свою очередь, воздействует на опухолевые клетки, увеличивая их онкогенный потенциал [69].

Неканонический Notch-сигналинг также вовлечен в регуляцию метаболизма опухолевых клеток. Как продемонстрировано, не ядерный, а цитоплазматический или мембраносвязанный NICD в клетках HeLa блокирует вызванный голодом апоптоз. Полная ядерная локализация NICD (отсутствие его где-либо вне ядра) подавляет антиапоптотическую активность, следовательно, данный сигнальный каскад контролирует апоптоз через цитоплазматический неканонический путь. Неканонический сигнальный путь Notch индуцирует пролиферацию и поддержание ОСК через митохондриальные и метаболические сигнальные пути, взаимодействуя с PTEN-индуцируемой киназой 1 (*PINK1*), что активирует сигнальный путь mTORC2/Akt [19].

Сигнальный путь Notch важен для дифференцировки CD4⁺ T-клеток в специфические T-хелперы. При использовании кондиционного нокаута RBP-Jк в T-клетках выявлено, что он регулирует их дифференцировку независимо от RBP-Jк, а следовательно, неканонически. Также отмечено, что активация и пролиферация CD4⁺ T-клеток не ухудшаются при делеции RBP-Jк. Следовательно, при активации, пролиферации и дифференцировке T-клеток стимулируются неканонические функции сигнального пути Notch совместно с NF-κB. В клетках иммунной системы Notch3

совместно с NF-κB регулирует экспрессию FoxP3. Notch1 также может инициировать активацию NF-κB при цитоплазматическом взаимодействии с компонентами сигналом Т-клеток. Так, например, он инициирует формирование комплекса CARMA1/BCL10/MALT1 (CBM). Данные исследования демонстрируют, что в формировании комплекса CBM участвует по большей части цитозольный, а не ядерный Notch1 [70].

Как известно, опухоль-ассоциированные эндотелиальные клетки экспрессируют *JAGGED1* и *DLL4*, которые активируют сигнальный путь Notch в клетках рака толстой кишки. Однако, как установили авторы, данный сигнальный каскад может активироваться не только при непосредственном взаимодействии двух клеток, но и с помощью паракринного/ангиокринного механизма, используя растворимый лиганд Jagged1. Такая нетипичная форма лиганда, возможно, отщепляется от полноразмерного Jagged1 с помощью металлопротеиназы ADAM17, что приводит к появлению усеченной растворимой формы лиганда, способной стимулировать сигнальный путь Notch без непосредственного взаимодействия двух клеток [50].

При исследовании биологических эффектов растворимых форм лигандов Notch различными группами ученых получены противоречивые данные. Показано, что растворимые формы человеческих Jagged1 и Dll1, состоящие только из внеклеточного домена, ингиби-

руют сигнальный путь Notch, в то время как другие группы исследователей утверждают, что растворимая форма Jagged1 способна активировать Notch в нескольких типах клеток, что приводит, например, к дифференцировке кератиноцитов, созреванию дендритных клеток, апоптозу лейкоэмических В-клеток, ингибированию дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников. Растворимая форма Jagged1 естественного происхождения обнаружена в коже человека, где она приводит к активации сигнального пути Notch, индуцирующей эпителиальную дифференцировку. Основным фактором, определяющим, будет ли растворимый лиганд активировать или подавлять Notch-сигналинг, скорее всего, является специфическая структура лиганда, возникающая из-за разрезания разными протеиназами, посттрансляционных модификаций и т. д. [50] (рис. 3).

Регуляция сигнального пути Notch на эпигенетическом уровне

В последние годы активно изучается эпигенетическая регуляция экспрессии генов в контексте онкопатологий. Метилирование или ацетилирование компонентов сигнального пути Notch отмечено не было, однако накапливающиеся данные указывают на то, что компоненты этого пути регулируются с помощью микроРНК [71]. В рамках данного обзора рассмотрены

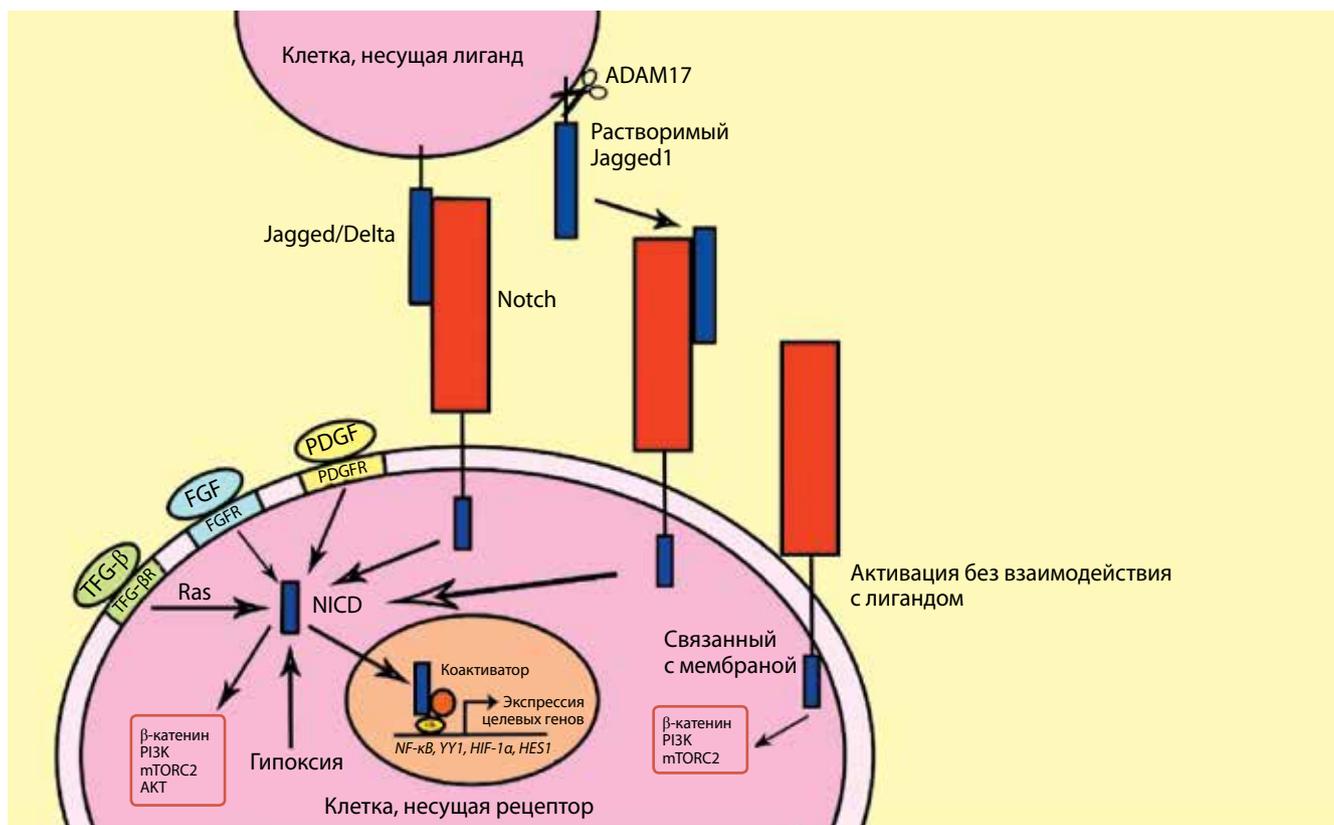


Рис. 3. Схема неканонического сигнального пути Notch. Показаны механизмы активации сигнального пути Notch — как канонический, так и с помощью растворимого лиганда Jagged1 и без взаимодействия с лигандом. Указаны основные сигнальные пути, влияющие на цитоплазматический NICD и контролирующиеся им, а также целевые гены сигнального пути Notch

Таблица 3. Некоторые микроРНК, регулирующие экспрессию генов сигнального пути Notch и Notch-зависимых генов

МикроРНК	Тип опухоли/трансформированных клеток	Гены-мишени	Источник
Семейство miR-34			
miR-34a	• Рак поджелудочной железы, легких, молочной железы; меланома, глиома • ОСК простаты и толстой кишки	• TP53/NOTCH1/NOTCH2/JAGGED1/HES1 • NOTCH1	[74–76]
miR-34b/c	Меланома и глиома	NOTCH1/NOTCH2	[72]
miR-34c-3p	Глиома	NOTCH2	[72]
Семейство miR-200			
miR-200	Плоскоклеточный рак пищевода	ZEB-1/NOTCH3	[77]
miR-200b	Клеточная линия рака поджелудочной железы	JAGGED1/2, HES1, HEG2, BCL-2	[73]
miR-200c/miR-141	Аденокарцинома поджелудочной железы и рак молочной железы базального типа	ZEB-1/NOTCH (JAGGED1, MAML2, MAML3)	[78]
МикроРНК других семейств			
miR-199-5p	Медуллобластома и остеосаркома	NOTCH1/JAGGED1/HES1/DLL1	[71]
miR-146a	Рак молочной железы	NOTCH/NUMB	[79]
miR-1	Рак толстой кишки	NOTCH3	[59]
miR-143	Опухоли гломуса	NOTCH1–3	[59]

наиболее изученные семейства микроРНК, контролирующие сигнальный путь Notch.

Гипертранскрипция miR-34c-3p в клетках глиобластомы снижает уровень экспрессии *NOTCH2*, что приводит к ингибированию пролиферации, снижению инвазии и индукции апоптоза [72]. Трансфекция miR-200b клеток поджелудочной железы линии Rink-1 снижает уровень экспрессии *JAGGED1/2* и Notch-зависимых генов: *HES1*, *HEY2*, *BCL-2*, что приводит к ингибированию пролиферации [73]. miR-199-5p регулирует *HES1*, ответственный за клеточный рост и поддержание популяции ОСК, в медуллобластомах [71] (табл. 3).

Заключение

Учитывая, что сигнальный путь Notch участвует во многих фундаментальных процессах – от эмбрионального развития до поддержания гомеостаза в тканях сформировавшегося организма, неудивительно, что его aberrантная активация может приводить к самым различным патологиям. Роль сигнального каскада Notch в онкогенезе активно изучается, и множество исследований показало, что он способствует пролиферации опухолевых клеток, выживанию ОСК, индукции ЭМП и устойчивости к химиотерапии. Однако для различных видов неоплазий доказаны как его онкогенные, так и опухоль-супрессирующие свойства.

В зависимости от клеточного контекста Notch может способствовать поддержанию субпопуляции стволовых клеток или вызывать дифференцировку. Основные компоненты сигнального пути Notch могут подвергаться мутациям, что приводит к повышенной или пониженной Notch-сигнализации, влекущей за собой клеточную трансформацию.

Дальнейшие исследования сигнального пути Notch должны быть нацелены на детальный анализ взаимодействия его рецепторов и лигандов с точки зрения микроокружения. Для разработки успешной стратегии противоопухолевой терапии необходимо изучить факторы микроокружения, модулирующие Notch-сигналинг. Более того, с ростом интереса к клиническому применению ингибиторов γ -секретазы и антител, блокирующих Notch-лиганды, важно изучить все возможные последствия ингибирования сигнального пути Notch. В то время как ингибирование Notch для подавления опухолевого роста с помощью препаратов, уже находящихся на различных стадиях клинических испытаний для лечения болезни Альцгеймера, может быть эффективно в случаях, когда Notch обладает онкогенным потенциалом, его активация с помощью пептидов или антител может быть использована при лечении злокачественных новообразований, в которых он является опухолевым супрессором.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рыбко В.А., Копнин Б.П., Хромова Н.В. и др. Роль изменений активности белков Notch в онкогенезе: множественные механизмы и возможности прикладного использования. *Клиническая онкогематология* 2011;4(2):103–10. [Rybko V.A., Kopnin B.P., Khromova N.V. et al. Role of Notch signaling in tumorigenesis: multiple mechanisms and therapeutic potential. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2011;4(2):103–10. (In Russ.)].
2. Kidd S., Kelley M.R., Young M.W. et al. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* 1986;6(9):3094–108.
3. Greenwald I. The lin-12 locus of *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 1987;6(2):70–3.
4. Ellisen L.W., Bird J., West D.C. et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991;66(4):649–61.
5. Francis R., McGrath R., Zhang J. et al. Aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 2002;3(1):85–97.
6. Schroeter E.H., Kisslinger J.A., Kopan R. et al. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 1998;393(6683):382–6.
7. Strooper B.D., Annaert W., Cupers P. et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999;398(6727):518–22.
8. Louvi A., Artavanis-Tsakonas S. Notch and disease: a growing field. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23(4):473–80.
9. Demehri S., Turkoz A., Kopan R. Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. *Cancer Cell* 2009;16(1):55–66.
10. Wang N.J., Sanborn Z., Arnett K.L. et al. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(43):17761–6.
11. Koch U., Lehal R., Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development* 2013;140(4):689–704.
12. Kopan R., Ilgan M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009;137(2):216–33.
13. Bray S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev* 2006;7(9):678–89.
14. Lieber T., Kidd S., Struhl G. DSL-Notch signaling in the *Drosophila* brain in response to olfactory stimulation. *Neuron* 2011;69(3):468–81.
15. Alberi L., Lui S., Wang Y. et al. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron* 2011;69(3):437–44.
16. Andersson E.R., Sandberg R., Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 2011;138(17):3593–612.
17. Rana N.A., Haltiwanger R.S. Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Curr Opin Struct Biol* 2011;21(5):583–9.
18. Acar M., Jafar-Nejad H., Takeuchi H. et al. Rumi is a CAPI10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* 2008;132(2):247–58.
19. Lee T.V., Sethi M.K., Leonardi J. et al. Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet* 2013;9(6):35–47.
20. Loegeat F., Bessia C., Brou C. et al. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):8108–12.
21. Weinmaster G., Fischer J.A. Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? *Dev Cell* 2011;21(1):134–44.
22. Jorissen E., De Strooper B. Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr Top Dev Biol* 2010;92:201–30.
23. Borggrefe T., Liefke R. Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle* 2012;11(2):264–76.
24. Nagel A.C., Krejci A., Tenin G. et al. Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10433–41.
25. Oswald F., Winkler M., Cao Y. et al. RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10379–90.
26. Wallberg A.E., Pedersen K., Lendahl U. et al. P300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* 2002;22(22):7812–9.
27. Hubbard E.J., Wu G., Kitajewski J. et al. Sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev* 1997;11(23):3182–93.
28. Fryer C.J., White J.B., Jones K.A. Mastermind recruits CycC: CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 2004;16(4):509–20.
29. Capaccione K.M., Pine S.R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013;34(7):1420–30.
30. Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 1998;12(12):1751–62.
31. Ohlstein B., Spradling A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* 2007;315(5814):988–92.
32. Bicker F., Schmidt M.H. EGFL7: a new player in homeostasis of the nervous system. *Cell Cycle* 2010;9(7):1263–9.
33. Pompa J.L., Wakeham A., Correia K.M. et al. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 1997;124(6):1139–48.
34. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704–15.
35. Quaegebeur A., Lange C., Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 2011;71(3):406–24.
36. Perdigo C.N., Bardin A.J. Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(2):2307–22.
37. Carlson M.E., Hsu M., Conboy I.M. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 2008;454(7203):528–32.
38. Ohlstein B., Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2006;439(7075):470–4.
39. Bigas A., Robert-Moreno A., Espinosa L. The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 2010;54(6):1175–88.
40. Fernández-Sánchez V., Pelayo R., Flores-Guzmán P. et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47(4):205–13.
41. Pooter R.F., Schmitt T.M., Pompa J.L. et al. Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors. *J Immunol* 2006;176(9):5267–75.
42. Varnum-Finney B., Brashem-Stein C., Bernstein I.D. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 2003;101(5):1784–9.
43. Ohishi K., Katayama N., Shiku H. et al. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14(2):143–50.
44. Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306(5694):269–71.
45. Thompson B.J., Buonamici S., Sulis M.L. et al. The SCFFBW7 ubiquitin

- ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med* 2007;204(8):1825–35.
46. Chiang M.Y., Xu L., Shestova O. et al. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest* 2008;118(9):3181–94.
47. Fabbri G., Rasi S., Rossi D. et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208(7):1389–401.
48. Ranganathan P., Weaver K.L., Capobianco A.J. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 2011;11(5):338–51.
49. Wang Z., Li Y., Banerjee S., Sarkar F.H. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett* 2009;279(1):8–12.
50. Lu J., Ye X., Fan F. et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 2013;23(2):171–85.
51. Reedijk M., Odorcic S., Chang L. et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 2005;65(18):8530–7.
52. Nguyen B., Lefort K., Mandinova A. et al. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev* 2006;20(8):1028–42.
53. Rangarajan A., Talora C., Okuyama R. et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001;20(13):3427–36.
54. Nicolas M., Wolfner A., Raj K. et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003;33(3):416–21.
55. Viatour P., Ehmer U., Saddic L.A. et al. Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. *J Exp Med* 2011;208(10):1963–76.
56. Klinakis A., Lobry C., Abdel-Wahab O. et al. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature* 2011;473(7346):230–3.
57. Agrawal N., Frederick M.J., Pickering C.R. et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in *NOTCH1*. *Science* 2011;333(6046):1154–7.
58. Lobry C., Oh P., Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* 2011;208(10):1931–5.
59. Wang Z., Li Y., Kong D. et al. Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Lett* 2010;292(2):141–8.
60. Leong K.G., Niessen K., Kulic I. et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 2007;204(12):2935–48.
61. Wang Z., Li Y., Kong D. et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res* 2009;69(6):2400–7.
62. Sahlgren C., Gustafsson M.V., Jin S. et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(17):6392–7.
63. Jakowlew S.B. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(3):435–57.
64. Serini G., Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999;250(2):273–83.
65. Studebaker A.W., Storci G., Werbeck J.L. et al. Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res* 2008;68(21):9087–95.
66. Minter L.M., Osborne B.A. Canonical and non-canonical Notch signaling in CD4⁺ T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012;360:99–114.
67. Gentle M.E., Rose A., Bugeon L. et al. Noncanonical Notch signaling modulates cytokine responses of dendritic cells to inflammatory stimuli. *J Immunol* 2012;189(3):1274–84.
68. Vacca A., Felli M.P., Palermo R. et al. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J* 2006;25(5):1000–8.
69. Jin S., Mutvei A.P., Chivukula I.V. et al. Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKK α /IKK β . *Oncogene* 2013;32(41):4892–902.
70. Ayaz F., Osborne B.A. Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol* 2014;4:345.
71. Garzia L., Andolfo I., Cusanelli E. et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One* 2009;4(3):4998.
72. Wu Z., Wu Y., Tian Y. et al. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells. *Oncol Lett* 2013;6(5):1447–52.
73. Wang Z., Banerjee S., Ahmad A. et al. Activated K-ras and INK4a/Arf deficiency cooperate during the development of pancreatic cancer by activation of Notch and NF- κ B signaling pathways. *PLoS One* 2011;6(6):20537.
74. Ji Q., Hao X., Zhang M. et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009;4(8):6816.
75. Pang R.T., Leung C.O., Ye T.M. et al. MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2010;31(6):1037–44.
76. Bu P., Chen K.Y., Chen J.H. et al. A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;12(5):602–15.
77. Ohashi S., Natsuzaka M., Naganuma S. et al. A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2011;71(21):6836–47.
78. Brabletz S., Bajdak K., Meidhof S. et al. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 2011;30(4):770–82.
79. Wang X., Lu H., Li T. et al. Krüppel-like factor 8 promotes tumorigenic mammary stem cell induction by targeting miR-146a. *Am J Cancer Res* 2013;3(4):356–73.