

# Сигнальный путь Notch: двоякая роль в опухолевой прогрессии и терапевтические возможности при раке мочевого пузыря

М.В. Новикова, Б.П. Копнин, П.Б. Копнин

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Павел Борисович Копнин [pbkopnin@mail.ru](mailto:pbkopnin@mail.ru)

При опухолевой прогрессии сигнальный путь Notch и его компоненты могут проявлять как опухольсупрессирующие, так и онкогенные свойства в зависимости от типа ткани и микроокружения. До недавнего времени крайне мало было известно о роли Notch в развитии рака мочевого пузыря (РМП). По данным последних исследований было выявлено, что потеря копии и снижение экспрессии гена NOTCH1 характерны для клеточных линий РМП, а активация сигнального пути Notch1 снижает клеточную пролиферацию *in vitro*, что свидетельствует о его опухольсупрессирующей роли в прогрессировании РМП. Более того, РМП может быть индуцирован тканеспецифичной инактивацией одного из компонентов комплекса  $\gamma$ -секретазы, принимающего непосредственное участие в запуске сигнального каскада Notch, *in vivo*. Однако результаты дальнейших исследований показали, что NOTCH2 является онкогеном, стимулирующим пролиферацию и метастазирование через индукцию эпителиально-мезенхимального перехода и поддержание фенотипа опухолевых стволовых клеток. Полученные данные, указывающие на противоположность свойств NOTCH1 и NOTCH2 в опухолевой прогрессии РМП, могут лечь в основу новых терапевтических подходов, связанных с воздействием на активность сигнального пути Notch.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, аденокарцинома, почечно-клеточная карцинома, рак предстательной железы, сигнальный путь Notch, онкоген, опухолевый супрессор, моноклональное антитело,  $\gamma$ -секретаз

**Для цитирования:** Новикова М.В., Копнин Б.П., Копнин П.Б. Сигнальный путь Notch: двоякая роль в опухолевой прогрессии и терапевтические возможности при раке мочевого пузыря. Онкоурология 2019;15(1):108–16.

DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-1-108-116

## Notch signaling pathway: dual role in tumour progression and therapeutic opportunities for bladder cancer

M.V. Novikova, B.P. Kopnin, P.B. Kopnin

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

During cancer progression Notch signaling pathway and its components could demonstrate oncogenic and tumor-suppressive properties depending on tissue type and cellular microenvironment. However, until recently, very little was known about Notch role in bladder cancer (BC). According to recent studies it was revealed that loss of copy number and decreased expression of NOTCH1 is the hallmark of BC cell lines; and NOTCH1 activation *in vitro* reduces cell proliferation, suggesting that NOTCH1 acts as a tumor suppressor in BC. Furthermore, BC could be promoted by bladder-specific inactivation of a component of  $\gamma$ -secretase complex, which is directly involved in Notch signaling, *in vivo*. By contrast, further studies have demonstrated that NOTCH2 acts as an oncogene which could promote cell proliferation and metastasis through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and maintaining stemness. Studies indicating that NOTCH1 and NOTCH2 have opposite effects on BC progression could give rise to novel therapeutic approaches aimed at impact on Notch activity.

**Key words:** bladder cancer, adrenocortical carcinoma, renal cell cancer, prostate cancer, Notch signaling pathway, oncogene, tumor suppressor, monoclonal antibody,  $\gamma$ -secretase

**For citation:** Novikova M.V., Kopnin B.P., Kopnin P.B. Notch signaling pathway: dual role in tumour progression and therapeutic opportunities for bladder cancer. Onkourologiya = Cancer Urology 2019;15(1):108–16.

### Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 9-е место в мире в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями и широко распространен

в странах Европы, США и Западной Азии, где выявлен наиболее высокий уровень смертности от этого заболевания [1]. За последние 25 лет число диагностированных случаев и смертность от РМП практически

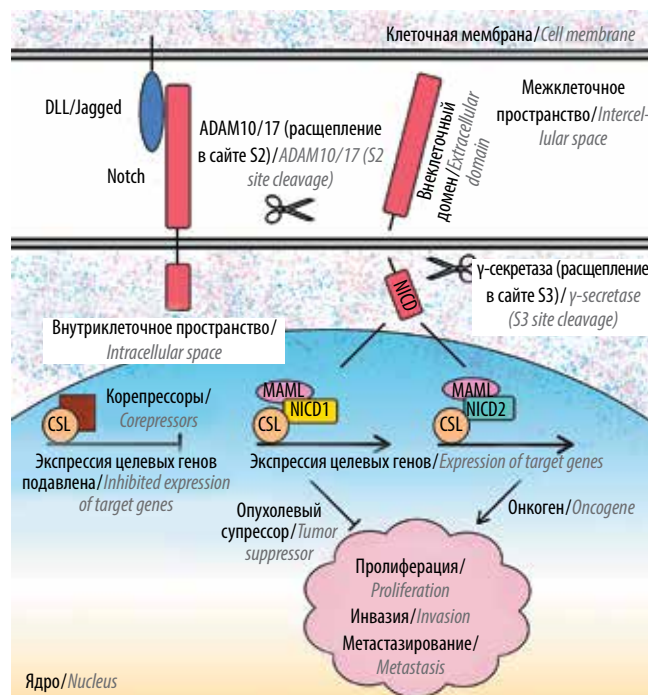
не изменились, что говорит о сложностях в точности диагностики и разработке противоопухолевых препаратов [2]. В 2016 г. управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США был одобрен новый иммунотерапевтический препарат атезолизумаб, представляющий собой моноклональное антитело, специфичное к белку PDL1 (programmed cell death 1 ligand 1), которое предотвращает взаимодействие белков PD1 и PDL1, что стимулирует запуск апоптоза в опухолевых клетках. Атезолизумаб стал первым за последние 25 лет препаратом, одобренным для терапии поздних стадий РМП [3]. Дизайн и разработка схем таргетной терапии различных злокачественных новообразований шагнули далеко вперед за последние годы, однако на сегодняшний день не существует достаточно эффективных терапевтических стратегий лечения РМП [4]. В последние годы результаты молекулярных и гистологических исследований мышечно-инвазивного и метастатического типов РМП позволили более узко классифицировать данные новообразования по молекулярным подтипам, что должно значительно упростить создание новых терапевтических препаратов [5].

В последние годы при исследовании РМП особое внимание заслуживает сигнальный путь Notch. В настоящем обзоре рассмотрены известные на сегодняшний день молекулярные механизмы опухолевой прогрессии и метастазирования РМП, связанные с мутациями компонентов сигнального пути Notch и изменением его активности, а также последние данные о терапевтических разработках, сфокусированных на Notch, которые впоследствии могут получить широкое распространение в клинической практике.

### Общая характеристика сигнального пути Notch

Сигнальный путь Notch задействован в эмбриогенезе, поддержании гомеостаза и популяций стволовых клеток многих тканей и органов человека [6], поэтому нарушения активности, вызванные точечными мутациями [7, 8] или транслокациями генов его компонентов [9, 10], обычно связаны с развитием злокачественных новообразований, так как, в частности, могут приводить к бесконтрольной клеточной пролиферации, приобретению мезенхимального фенотипа и запуску механизмов устойчивости к индукции апоптоза.

У позвоночных канонический сигнальный путь Notch активируется при непосредственном связывании рецепторов семейства Notch (Notch1–4) с внеклеточным доменом одного из лигандов семейств Delta (Dll1–4) и Serrate (Jagged1, -2) [11]. Данное взаимодействие инициирует серию протеолитических расщеплений рецептора, в результате чего внутриклеточный домен Notch – NICD (Notch intracellular domain) – транспортируется в ядро, где взаимодействует с ДНК-связывающим кофактором CSL (ком-



**Рис. 1.** Схема канонического сигнального пути Notch с учетом противоположности ролей Notch1 и Notch2 в прогрессировании рака мочевого пузыря

**Fig. 1.** The core Notch signaling pathway taking into account that Notch1 and Notch2 have opposite roles in the progression of bladder cancer

плекс CBF1/RBP-JK/Suppressor of Hairless/LAG-1) и коактиватором MAML (mastermind-like protein). В отсутствие NICD CSL связывает консенсусную последовательность ДНК C/TGTGGGAA, функционируя как транскрипционный репрессор совместно с другими корепрессорами, препятствует экспрессии целевых генов сигнального пути Notch [12, 13] (рис. 1).

### Сигнальный путь Notch в онкоурологии

Данные нескольких работ доказывают непосредственную роль сигнального пути Notch в развитии аденокарциномы (рака коры надпочечника). В исследовании С. L. Ronchi и соавт. выявлена корреляция уровней экспрессии компонентов Notch-сигналинга, а также его генов-мишеней с прогрессированием аденокарциномы. Экспрессия некоторых таких генов была повышена в образцах карцином ( $n = 28$ ) по сравнению с аденомами ( $n = 24$ ) и нормальной тканью ( $n = 28$ ) (*JAG1* в 27, 15 и 10 % случаев; *NOTCH1* в 13, 8, 0 % случаев; *HEY2* в 66, 61, 33 % случаев соответственно). Высокий уровень экспрессии *JAG1* (продукт *Jagged1*, лиганд сигнального пути Notch) был ассоциирован с ранними стадиями опухолевой прогрессии, небольшим количеством метастазов и большей выживаемостью, в то время как гиперэкспрессия *HEY2* (Hes Related Family BHLH

Transcription Factor With YRPW Motif 2) была связана с более злокачественным фенотипом опухоли и тяжелым течением заболевания [14]. Более детальное изучение роли Jagged1 позволило выявить молекулярный механизм стимуляции пролиферации опухолевых клеток, что доказывает его онкогенную роль в прогрессировании аденокарциномы почки [15].

Сигнальный путь Notch может играть роль опухолевого супрессора при раке предстательной железы через негативную регуляцию транскрипции гена *PTEN*, кодирующего одноименную фосфатазу, которая является компонентом сигнального пути PI3K/PTEN/AKT, связанного с выживанием и клеточной пролиферацией клеток [16]. X.D. Wang и соавт. продемонстрировали, что активность Notch необходима для определения клеточной судьбы будущего эпителия и стромальных элементов при развитии предстательной железы [17]. Инактивация Notch1 приводит к нарушению спецификации базального и люминального эпителия и дегенерации гладких мышц [18, 19], в то время как гиперактивность Notch вызывает чрезмерную пролиферацию эпителия предстательной железы и мышечных волокон [19]. Результаты других работ также подтверждают, что гиперактивность сигнального пути Notch, как и гиперэкспрессия его компонентов (в частности, *JAG1*), ассоциированы с метастазированием и рецидивированием рака предстательной железы [20, 21].

Существуют различные типы злокачественных новообразований почки, однако подавляющее большинство составляют почечно-клеточные карциномы, 11–18 % которых относятся к папиллярному (хроматофильному) раку почки. Хроматофильный рак почки наименее распространенный и характеризуется наилучшим прогнозом среди остальных типов. Наиболее характерными мутациями, связанными с раком почки, являются изменения генов опухолевых супрессоров, в частности *VHL* (von Hippel–Lindau protein) и *TSC1/2* (tuberous sclerosis complex) [22–26]. Однако по результатам ДНК-микрочипирования также были обнаружены изменения экспрессии компонентов сигнального пути Notch, например повышенная экспрессия *NOTCH1* при хроматофильной почечно-клеточной карциноме [27]. Гиперэкспрессия *JAG1* ассоциирована со снижением показателей общей и безрецидивной выживаемости пациентов с раком почки. С учетом того, что взаимодействие сигнальных путей Notch и HIF/VHL [28], а также TSC [29], приводит к индукции пролиферации клеток тубулярного эпителия, вышеописанные статистические данные имеют под собой молекулярную основу [30]. Как было показано, сигнальный путь Notch конститутивно активен в клеточных линиях почечно-клеточной карциномы человека независимо от активности HIF/VHL [31]. Блокирование сигнального каскада Notch в данных

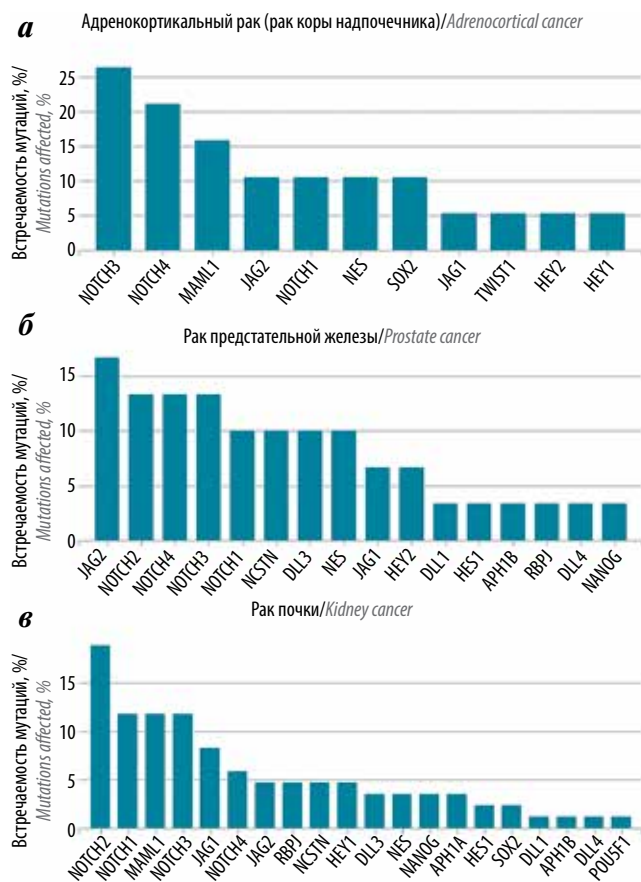
клеточных линиях приводит к снижению пролиферации в неадгезионных условиях; ксенографты, сформированные такими клеточными сублиниями, отличаются замедленными темпами роста. Однако трансгенная экспрессия *NICD1* в клетках тубулярного эпителия не индуцирует развитие рака почки *in vivo* [30], что свидетельствует о потенциальной роли Notch именно в прогрессировании рака почки, но не в инициации его развития. Анализ профиля экспрессии генов в клетках папиллярного рака почки выявил снижение активности Notch, а также его гена-мишени *HEY1*. При этом была отмечена повышенная экспрессия и внутриядерная локализация *KyoT3/FHL1B* (продукт сплайсинга, являющийся ингибитором канонического сигнального пути Notch) [32]. Кроме этого, делеция компонентов сигнального пути Notch (*NOTCH1*, -2 или *RBP*) приводит к развитию папиллярной микроаденомы *in vivo* [33], что дает основание полагать, что каскад Notch и его компоненты играют опухольсупрессирующую роль при папиллярном раке почки.

Наш анализ базы данных портала GDC (National cancer institute Genomic Data Commons Portal) по состоянию на 2018 г. подтвердил достаточно высокую частоту мутаций компонентов сигнального пути Notch и ассоциированных с ним генов при злокачественных новообразованиях мочеполовой системы (рис. 2) [34].

#### Опухольсупрессирующая роль компонентов Notch при раке мочевого пузыря

Результаты всего трех исследований действительно доказывают, что несколько компонентов Notch могут проявлять опухольсупрессирующие свойства при РМП [35–37]. В 2014 г. A. Greife и соавт. было показано, что экспрессия рецептора *NOTCH1* и соответствующего ему лиганда *DLL1* по данным гистохимического и ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) анализов в образцах тканей пациентов была снижена при любых степенях злокачественности опухоли и стадиях опухолевой прогрессии РМП. Полученные результаты согласуются с данными о снижении транскрипционной активности сигнального пути Notch в ряде клеточных линий РМП, особенно обладающих высокой способностью к инвазии [35]. Позднее T. Rampias и соавт. и A. Maraver и соавт. опубликовали данные, подтверждающие опухольсупрессирующую роль компонентов не только сигнального пути Notch1, но и NOTCH2, и NOTCH3 [36, 37].

Снижение активности сигнального пути Notch может быть связано с гиперфосфорилированием киназы ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1; другое название — MAPK3) и/или ERK2 (MAPK1), обнаруженном при анализе образцов тканей пациентов [37]. Экзогенная экспрессия *NICD1* в клетках линий РМП,



**Рис. 2.** Распределение наиболее часто мутированных генов-компонентов сигнального пути Notch и ассоциированных с ним генов при раке коры надпочечника (а), предстательной железы (б) и почки (в)  
 Fig. 2. Distribution of the most frequently mutated Notch and Notch-associated genes for adrenocortical (a), prostate (б) and kidney (в) cancers

как было показано, приводит к снижению фосфорилирования ERK1 и/или ERK2 и остановке клеточного цикла. Гиперэкспрессия *NICD1* или *NICD2* *in vitro* вызывает транскрипционную активность генов двуспецифичных фосфатаз DUSP (dual specificity phosphatases), в результате чего подавляется фосфорилирование ERK1 и/или ERK2, что приводит к снижению пролиферации клеток. В то время как блокирование сигнального пути Notch с помощью ингибитора  $\gamma$ -секретазы (gamma secretase inhibitor, GSI) имеет обратный эффект [38].

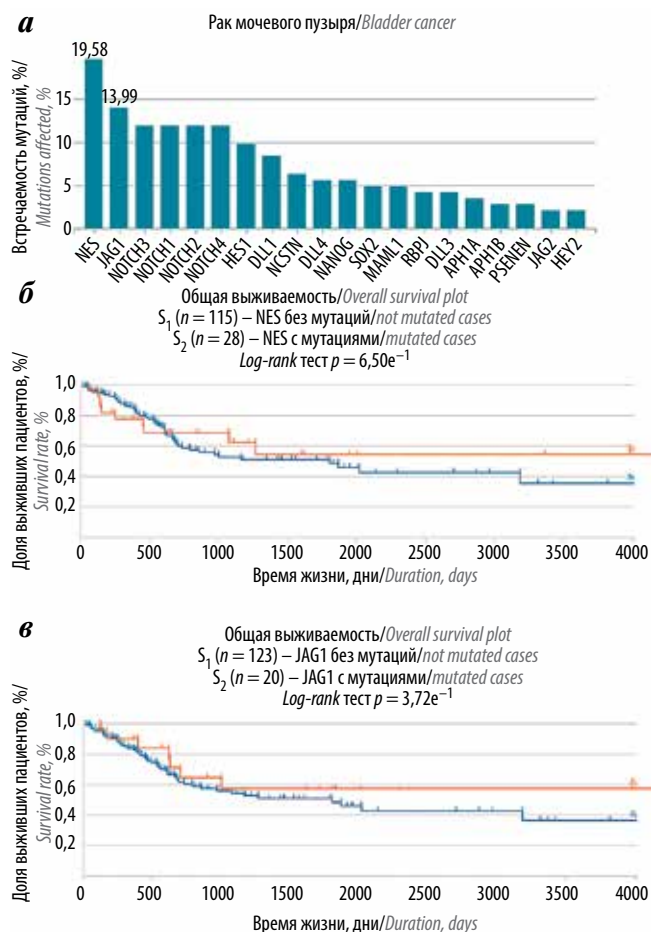
#### Мутации компонентов сигнального пути Notch при раке мочевого пузыря

Для статической оценки частоты встречаемости мутаций и дупликаций генов сигнального пути Notch при РМП были проведены ряд исследований с использованием клинического материала и анализ базы данных общедоступного ресурса The Cancer Genome Atlas (TCGA, Атлас ракового генома). Т. Rampias и соавт. показали, что потеря копии *NOTCH1* встречается

у 48 % пациентов с РМП как мышечно-инвазивного, так и метастатического типов ( $n = 72$ ) [37], при этом для РМП характерны делеции некоторых участков хромосом, в том числе длинного плеча хромосомы 9, на котором локализован *NOTCH1* [39]. Основываясь на данных TCGA, А. Goriki и соавт. обнаружили изменения количества копий всех 4 рецепторов семейства Notch при РМП ( $n = 390$  с полноэкзонным секвенированием): потеря копии *NOTCH1* – в 41,1 % случаев; дупликации *NOTCH2* – в 45,0 % и потеря копии – в 5,9 %; потеря копии *NOTCH3* – в 30,2 %. Несмотря на то, что потеря копии гена при злокачественных новообразованиях может свидетельствовать о его опухолюсупрессирующей функции, а дупликации, напротив, онкогенной активности, анализ данных TCGA выявил отсутствие корреляции числа копий с уровнями экспрессии генов [40], что свидетельствует о наличии других факторов, регулирующих активность сигнального пути Notch. Анализ изменений не только рецепторов сигнального пути Notch, но и других ассоциированных с ним генов выявил, что мутации *MAML1*, *NCSTN*, *PDEN1*, *APH1A*, *APH1B* и *PSENEN* встречаются у 43 % пациентов [37].

По клиническим данным мутации компонентов сигнального пути Notch, в частности потеря копии *NOTCH1*, ассоциированы с плохой выживаемостью [37]. Однако результаты исследований с использованием базы данных TCGA продемонстрировали, что присутствие мутаций в генах *NOTCH1–4* не влияет на выживаемость. Кроме этого, корреляции наличия мутаций генов *NOTCH* со стадиями опухолевой прогрессии РМП метастатического типа не выявлено [40]. К сожалению, статистические данные о процентных соотношениях мутаций в рецепторах семейства Notch у пациентов с РМП сильно разнятся при использовании различных баз данных и проведении исследований с анализом клинического материала. Гены рецепторов *NOTCH* являются очень длинными (*NOTCH1* – 51,35 Кб; *NOTCH2* – 161,91 Кб; *NOTCH3* – 41,35 Кб; *NOTCH4* – 29,23 Кб), поэтому причина возникновения мутаций на столь протяженных участках генома может носить стохастический характер, однако такие мутации могут быть признаны значимыми при определенных параметрах и настройках биоинформатических программ, используемых для анализа данных. Примечательно, что мутации *NOTCH*, выявленные при РМП, не локализованы в «горячих точках» полинуклеотидной цепи и могут быть отнесены к нерегулярным мутациям. Однако на основании анализа базы данных GDC нельзя не принять во внимание высокую частоту мутаций компонентов сигнального пути Notch и ассоциированных с ним генов при РМП. Подавляющее большинство мутаций наиболее часто мутированных генов *NES* (19,58 %) и *JAG1* (13,99 %) принадлежат к группе миссенс-мутаций, остальные –





**Рис. 3.** Анализ наиболее часто мутированных генов-компонентов сигнального пути Notch и ассоциированных с ним генов при раке мочевого пузыря: а – распределение генов (n = 143); выживаемость пациентов по методу Каплана–Мейера в зависимости от наличия мутаций NES (б) и JAG1 (в)

Fig. 3. Analysis of the most frequently mutated Notch and Notch-associated genes for bladder cancer: а – genes distribution (n = 143); Kaplan–Meier overall survival plots in patients depending on presence/absence of NES (б) и JAG1 (в) mutations

приобретение стоп-кодона и сдвиг рамки считывания (рис. 3) [34].

Таким образом, значимость мутаций *NOTCH* для клинической практики остается неоднозначной ввиду отсутствия достаточной выборки и данных о влиянии некоторых мутаций на функции белков.

### In vivo модели сниженной активности сигнального пути Notch

Исследования на моделях *in vivo* проводились на трансгенных мышах, у которых тканеспецифично отсутствовала экспрессия одного из компонентов комплекса  $\gamma$ -секретазы в результате использования специфического канцерогена N-бутил-N-(4-гидроксипентил) нитрозамина, имеющего высокую селективность к уротелию, или нокаута никастрина (компонент комплекса  $\gamma$ -секретазы), который, как было показано,

индуцирует развитие высокозлокачественного инвазивного уротелиального РМП [41]. Данные опухоли характеризуются фосфорилированными белками ERK1 и/или ERK2, а также экспрессией маркеров клеточной пролиферации (Ki-67 и циклин D1). Кроме этого, выявлена потеря ядерного NICD1 и повышенная экспрессия маркеров клеток базального слоя эпителия TP63 и цитокератина 5, что косвенно указывает на то, что опухоли могли происходить из клеток базального или промежуточного слоя уротелия [37].

Исследование А. Maraver и соавт. было проведено *in vivo* на мышах, нокаутных по генам *Psen* (пресенилин), который является одним из основных белков комплекса  $\gamma$ -секретазы, и *Rbpj* (recombination signal binding protein for immunoglobulin-к J region; транскрипционный регулятор сигнального пути Notch) [36]. Данная работа подтверждает опухольсупрессирующую роль компонентов сигнального пути Notch при РМП, однако использование этой модели не дает возможности изучения роли каждого из компонентов Notch индивидуально. Нокдаун одного из компонентов  $\gamma$ -секретазы влияет не только на Notch-сигналинг, но и на многие другие внутриклеточные сигнальные каскады, поэтому приписывание сигнальному пути Notch одной из ключевых ролей в прогрессировании РМП несколько преувеличено. Более того, комплекс CSL функционирует как транскрипционный репрессор в отсутствие NICD, поэтому их нокдаун может приводить к различным синергичным эффектам.

Инактивация сигнального пути Notch ассоциирована с частотой возникновения плоскоклеточного РМП. Кроме этого, гистологический анализ образцов опухолей, полученных от мышей, нокаутных по генам *Psen* и *Rbpj*, показал, что они являются плоскоклеточными, в то время как только 33 % канцерогениндуцированных опухолей были плоскоклеточными, а остальные – уротелиальными при проведении экспериментов на мышах дикого типа. В контрольных опухолях также была обнаружена экспрессия одного из генов-мишеней сигнального пути Notch – *HES1* (Hes Family BHLH Transcription Factor 1), связанного с индукцией эпителиально-мезенхимального перехода, однако в *Psen*- и *Rbpj*-нокаутных она была снижена [36].

Таким образом, результаты исследований *in vivo* и образцов тканей пациентов дают основание полагать, что *NOTCH1* может играть опухольсупрессирующую роль при РМП, а его потеря может индуцировать развитие плоскоклеточной карциномы и проявление мезенхимальных черт опухолевыми клетками при РМП.

### Онкогенная роль компонентов Notch при раке мочевого пузыря

Результаты ряда исследований продемонстрировали, что *NOTCH2* проявляет преимущественно

онкогенные свойства при РМП [42]. Следовательно, *NOTCH1* и *NOTCH2* обладают антагонистическим эффектом, аналогичное действие данных генов характерно также и для нескольких других видов солидных опухолей, в том числе для медуллобластомы [43] и протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [44, 45]. Анализ базы данных TCGA выявил, что высокий уровень экспрессии *NOTCH2* коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения заболевания и характерен преимущественно для базальных и мезенхимальных подтипов опухолей. Notch2 чаще детектируется в цитоплазме и ядре опухолевых клеток, что свидетельствует об активности данного сигнального пути, в то время как нормальные клетки уротелия демонстрируют мембранную окраску Notch2 [42].

Экспрессия *NOTCH2* также повышена по сравнению с *NOTCH1* и *NOTCH3* в ряде клеточных линий РМП с мезенхимальным фенотипом, а при анализе профилей экспрессии генов клеточных линий РМП с эпителиальным фенотипом наблюдается обратная ситуация. Исследования *in vitro* с применением методик сайленсинга и гиперэкспрессии *NOTCH2* позволили установить, что Notch2 стимулирует экспрессию генов плюрипотентности, клеточную пролиферацию и инвазию через индукцию эпителиально-мезенхимального перехода. Однако стоит отметить, что эффекты Notch2 являются дозозависимыми и присутствие NICD2 в супрафизиологических концентрациях не способно полностью воссоздать Notch-зависимые внутриклеточные процессы опухолевых клеток. Эксперименты на моделях *in vivo* по введению человеческих опухолевых клеток РМП в стенку мочевого пузыря мыши показали, что гиперэкспрессия NICD2 приводит к повышенной частоте метастазирования в регионарные лимфатические узлы [42]. Блокирование Notch2 с помощью специфического моноклонального антитела, практически не имеющего кросс-реактивности с другими рецепторами семейства Notch [46], приводит к подавлению роста опухоли, что свидетельствует о том, что Notch2 может быть подходящей мишенью в противоопухолевой терапии [42].

T. Rampias и соавт. проанализировали экспрессию генов-мишеней сигнального пути Notch2, в результате чего было показано, что повышенная экспрессия *HEY1* связана с транскрипционной активностью *NOTCH2 in vitro* [37]. При использовании базы данных TCGA установлено, что гиперэкспрессия *HEY1* не коррелирует с выживаемостью пациентов с РМП ( $n = 408$ ), однако ассоциирована с плохой выживаемостью пациентов с базальным РМП [37, 42].

Повышенный уровень экспрессии *NOTCH3*, как было продемонстрировано, стимулирует опухолевый рост и прогрессию *in vivo* и коррелирует с неблагоприятным прогнозом ( $n = 59$ ). Подавление экспрессии *NOTCH3* в клеточных линиях РМП, в том числе

линии, чувствительной к цисплатину, снижает скорость деления опухолевых клеток *in vitro* и темпы роста ксенографтов *in vivo* [47].

Данных литературы о роли Notch4 и лигандов сигнального пути Notch в опухолевой прогрессии РМП крайне мало. Анализ базы данных TCGA выявил наличие генетических альтераций *NOTCH4* у пациентов с РМП в 45,8 % случаев (увеличение числа копий — в 26,7 %, мутации — в 1,0 %) [40].

#### Компоненты сигнального пути Notch как мишень для противоопухолевой терапии

Последнее из трех протеолитических расщеплений в сайте S3 молекул рецепторов семейства Notch, которое необходимо для высвобождения фрагмента рецептора NICD, используемого при запуске сигнального пути Notch, обеспечивает  $\gamma$ -секретазу (см. рис. 1). Терапевтический подход к блокированию сигнального пути Notch в основном сфокусирован на применении молекул GSI [48]. Некоторые GSI успешно прошли I фазу клинических испытаний на нескольких видах солидных опухолей, но не на РМП [49]. Однако GSI имеют некоторые ограничения в применении, так как помимо влияния на активность сигнального пути Notch, они могут также нарушить CD44, ERBB4 и кадгеринзависимые сигнальные пути, что влечет за собой непредсказуемые последствия. Кроме этого, доказано, что применение GSI вызывает побочные эффекты, в частности желудочно-кишечную недостаточность, атипичный дерматит и рак кожи [49, 50].

Рецепторы семейства Notch синтезируются в виде предшественников, которые процессируются в активную форму фуринподобной конвертазой (расщепление в сайте S1) в аппарате Гольджи. Металлопротеиназа ADAM10/17 вносит разрыв в сайте S2 рецепторов Notch после их связывания с соответствующими лигандами на поверхности клетки (см. рис. 1). Данные ферменты также могут выступать в качестве мишени для противоопухолевой терапии, однако их блокирование может вызвать побочные эффекты, как при применении GSI [51].

С учетом того, что компоненты сигнального пути Notch могут проявлять как опухолюсупрессирующие, так и онкогенные свойства, использование GSI является не лучшим вариантом терапевтического воздействия при РМП. Глобальное ингибирование сигнального пути Notch может способствовать опухолевой прогрессии, в частности из-за снижения активности опухолевого супрессора Notch1, поэтому наиболее перспективным представляется направленное блокирование потенциально онкогенного Notch2-сигналинга. Корпорацией Genentech (США) уже разработаны не обладающие кросс-реактивностью моноклональные антитела к каждому из рецепторов семейства Notch, связывающие регуляторный участок

молекулы, что делает белок не способным подвергаться конформационным изменениям, необходимым для расщепления ADAM10/17 [46]. Данные вещества еще не участвовали в клинических испытаниях, но продемонстрировали высокую эффективность в доклинических исследованиях РМП [50]. Компания OncoMed Pharmaceuticals (США) протестировала антитело к Notch1 (бронтиксумаб) [52] и Notch2/3 (тарекстумаб) [53] на ранних стадиях клинических испытаний. Моноклональное и двуспецифичное антитела к DLL4 и DLL4/VEGF (vascular endothelial growth factor) соответственно на данный момент также проходят доклинические испытания [49, 54–57].

### Заключение

Сигнальный путь Notch и его компоненты могут играть роль как опухолевых супрессоров, так и онкогенов в зависимости от типа ткани и клеточного микроокружения. Результаты ряда исследований продемонстрировали, что Notch1 и Notch2 антагонистично влияют на рост, инвазию и метастазирование при РМП. Несмотря на то что между данными некоторых научно-исследовательских работ наблюдаются явные противоречия, изменения экспрессии на уровне ДНК, РНК и белков в образцах тканей пациентов, а также результаты доклинических

исследований, проведенных на клеточных линиях и моделях *in vivo*, подтверждают двойную роль Notch-сигналинга при РМП. На сегодняшний день основной терапевтической стратегией глобального ингибирования сигнального пути Notch при РМП является применение GSI, однако с учетом выявленных значительных различий во влиянии компонентов Notch на опухолевую прогрессию данный метод представляется уже не рациональным и требует пересмотра существующих подходов. Противоположные эффекты Notch1 и Notch2 доказывают необходимость изучения компонентов сигнального пути Notch отдельно, так как каждый из них может являться потенциальной мишенью при разработке новых стратегий таргетных терапий. К сожалению, накопившихся за последние годы данных недостаточно для полного представления молекулярных механизмов инициации и опухолевой прогрессии, ассоциированных с Notch, а существующие модели *in vitro* и *in vivo* не способны точно воссоздать и имитировать процессы, а также отследить динамику развития злокачественных новообразований. Однако с учетом полученных на сегодняшний день результатов дальнейшие исследования, разработка и дизайн новых терапевтических стратегий представляются крайне перспективными.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Antoni S., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017;71(1):96–108. DOI: 10.1016/j.eurur.o.2016.06.010. PMID: 27370177.
2. Malats N., Real F. X. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2015;29(2):177–89. DOI: 10.1016/j.hoc.2014.10.001. PMID: 25836927.
3. Rosenberg J.E., Hoffman-Censits J., Powles T. et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016;387(10031):1909–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4. PMID: 26952546.
4. Hussain M.H., Wood D.P., Bajorin D.F. et al. Bladder cancer: narrowing the gap between evidence and practice. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5680–4. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.6901. PMID: 19858384.
5. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507(7492):315–22. DOI: 10.1038/nature12965. PMID: 24476821.
6. Wilson A., Radtke F. Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett* 2006;580(12):2860–8. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.03.024. PMID: 16574107.
7. 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. DOI: 10.1126/science.1102160. PMID: 15472075.
8. Lin C., Zheng H., Wang C. et al. Mutations increased overexpression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Int* 2012;12:13. DOI: 10.1186/1475-2867-12-13. PMID: 22480166.
9. Clay M.R., Varma S., West R.B. MAST2 and NOTCH1 translocations in breast carcinoma and associated pre-invasive lesions. *Hum Pathol* 2013;44(12):2837–44. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.08.001. PMID: 24140425.
10. Tonon G., Modi S., Wu L. et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet* 2003;33(2):208–13. DOI: 10.1038/ng1083. PMID: 12539049.
11. Hori K., Sen A., Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 10):2135–40. DOI: 10.1242/jcs.127308. PMID: 23729744.
12. Hsieh J.J., Hayward S.D. Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 1995;268(5210):560–3. PMID: 7725102.
13. Dou S., Zeng X., Cortes P. et al. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1994;14(5):3310–9. PMID: 8164682.
14. Ronchi C.L., Sbiera S., Altieri B. et al. Notch1 pathway in adrenocortical carcinomas: correlations with clinical outcome. *Endocr Relat Cancer* 2015;22(4):531–43. DOI: 10.1530/ERC-15-0163. PMID: 25979380.
15. Simon D.P., Giordano T.J., Hammer G.D. Upregulated JAG1 enhances cell proliferation in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(9):2452–64. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2371. PMID: 22427350.
16. Toso A., Revandkar A., Di Mitri D. et al. Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* 2014;9(1):75–89. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.044. PMID: 25263564.

17. Wang X.D., Leow C.C., Zha J. et al. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 2006;290(1):66–80. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.11.009. PMID: 16360140.
18. Wu X., Xu K., Zhang L. et al. Differentiation of the ductal epithelium and smooth muscle in the prostate gland are regulated by the Notch/PTEN-dependent mechanism. *Dev Biol* 2011;356(2):337–49. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.05.659. PMID: 21624358.
19. LaTulippe E., Satagopan J., Smith A. et al. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res* 2002;62(15):4499–506. PMID: 12154061.
20. Santagata S., Demichelis F., Riva A. et al. JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res* 2004;64(19):6854–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2500. PMID: 15466172.
21. Zayzafoon M., Abdulkadir S.A., McDonald J.M. Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *J Biol Chem* 2004;279(5):3662–70. DOI: 10.1074/jbc.M308158200. PMID: 14602722.
22. Peruzzi B., Athauda G., Bottaro D.P. The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(39):14531–6. DOI: 10.1073/pnas.0606850103. PMID: 16983094.
23. Turcotte S., Chan D.A., Sutphin P.D. et al. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* 2008;14(1):90–102. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.06.004. PMID: 18598947.
24. Ding M., Cui S., Li C. et al. Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 2006;12(9):1081–7. DOI: 10.1038/nm1460. PMID: 16906157.
25. Patel U., Simpson E., Kingswood J.C., Saggat-Malik A.K. Tuberosc sclerosis complex: analysis of growth rates aids differentiation of renal cell carcinoma from atypical or minimal-fat-containing angiolipoma. *Clin Radiol* 2005;60(6):665–73. DOI: 10.1016/j.crad.2005.01.009. PMID: 16038693.
26. Walker C. Molecular genetics of renal carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 1998;26(1):113–20. DOI: 10.1177/019262339802600113. PMID: 9502393.
27. Aparicio L.M., Villamil V.M., Gallego G.A. et al. Expression of Notch1 to -4 and their ligands in renal cell carcinoma: a tissue microarray study. *Cancer Genomics Proteomics* 2011;8(2):93–101. PMID: 21471519.
28. Gustafsson M.V., Zheng X., Pereira T. et al. Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005;9(5):617–28. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.09.010. PMID: 16256737.
29. Karbowniczek M., Zitserman D., Khabibullin D. et al. The evolutionarily conserved TSC/Rheb pathway activates Notch in tuberous sclerosis complex and *Drosophila* external sensory organ development. *J Clin Invest* 2010;120(1):93–102. DOI: 10.1172/JCI40221. PMID: 20038815.
30. Bielez B., Sirin Y., Si H. et al. Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans. *J Clin Invest* 2010;120(11):4040–54. DOI: 10.1172/JCI43025. PMID: 20978353.
31. Sjolund J., Johansson M., Manna S. et al. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 2008;118(1):217–28. DOI: 10.1172/JCI32086. PMID: 18079963.
32. Liang L., Zhang H.W., Liang J. et al. KyoT3, an isoform of murine FHL1, associates with the transcription factor RBP-J and represses the RBP-J-mediated transactivation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779(12):805–10. DOI: 10.1016/j.bbagr.2008.08.001. PMID: 18760388.
33. Surendran K., Selassie M., Liapis H. et al. Reduced Notch signaling leads to renal cysts and papillary microadenomas. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(5):819–32. DOI: 10.1681/ASN.2009090925. PMID: 20378824.
34. <https://portal.gdc.cancer.gov/>.
35. Greife A., Jankowiak S., Steinbring J. et al. Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma. *BMC Cancer* 2014;14:628. DOI: 10.1186/1471-2407-14-628. PMID: 25167871.
36. Maraver A., Fernandez-Marcos P.J., Cash T.P. et al. NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression. *J Clin Invest* 2015;125(2):824–30. DOI: 10.1172/JCI78185. PMID: 25574842.
37. Rampias T., Vgenopoulou P., Avgeris M. et al. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat Med* 2014;20(10):1199–205. DOI: 10.1038/nm.3678. PMID: 25194568.
38. Xu T., Wu X., Chen Q. et al. The anti-apoptotic and cardioprotective effects of salvianolic acid A on rat cardiomyocytes following ischemia/reperfusion by DUSP-mediated regulation of the ERK1/2/JNK pathway. *PLoS One* 2015;9(7):e102292. DOI: 10.1371/journal.pone.0102292. PMID: 25019380.
39. Kimura F., Flori A.R., Seifert H.H. et al. Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 2001;85(12):1887–93. DOI: 10.1054/bjoc.2001.2154. PMID: 11747331.
40. Goriki A., Seiler R., Wyatt A.W. et al. Unravelling disparate roles of NOTCH in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2018;15(6):345–57. DOI: 10.1038/s41585-018-0005-1. PMID: 29643502.
41. Garcia-Cao I., Duran A., Collado M. et al. Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. *EMBO Rep* 2005;6(6):577–83. DOI: 10.1038/sj.embor.7400421. PMID: 15877079.
42. Hayashi T., Gust K.M., Wyatt A.W. et al. Not all NOTCH is created equal: the oncogenic role of NOTCH2 in bladder cancer and its implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):2981–92. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2360. PMID: 26769750.
43. Fan X., Mikolaenko I., Elhassan I. et al. Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 2004;64(21):7787–93. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1446. PMID: 15520184.
44. Mazur P.K., Einwächter H., Lee M. et al. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(30):13438–43. DOI: 10.1073/pnas.1002423107. PMID: 20624967.
45. Hanlon L., Avila J.L., Demarest R.M. et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2010;70(11):4280–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4645. PMID: 20484026.
46. Wu Y., Cain-Hom C., Choy L. et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010;464(7291):1052–7. DOI: 10.1038/nature08878. PMID: 20393564.
47. Zhang H., Liu L., Liu C. et al. Notch3 overexpression enhances progression and chemoresistance of urothelial carcinoma. *Oncotarget* 2017;8(21):34362–73. DOI: 10.18632/oncotarget.16156. PMID: 28416766.
48. Luistro L., He W., Smith M. et al. Preclinical profile of a potent  $\gamma$ -secretase inhibitor targeting notch signaling with *in vivo* efficacy and pharmacodynamic properties. *Cancer Res* 2009;69(19):7672–80. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1843. PMID: 19773430.
49. Yuan X., Wu H., Xu H. et al. Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett* 2015;369(1):20–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.048. PMID: 26341688.
50. Doody R.S., Raman R., Farlow M. et al. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013;369(4):341–50. DOI: 10.1056/NEJMoa1210951. PMID: 23883379.



51. Dobranowski P., Ban F., Contreras-Sanz A. et al. Perspectives on the discovery of NOTCH2-specific inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 2018;91(3):691–706. DOI: 10.1111/cbdd.13132. PMID: 29078041.
52. Ferrarotto R., Mitani Y., Diao L. et al. Activating NOTCH1 mutations define a distinct subgroup of patients with adenoid cystic carcinoma who have poor prognosis, propensity to bone and liver metastasis, and potential responsiveness to Notch1 inhibitors. *J Clin Oncol* 2017;35(3):352–60. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.5264. PMID: 27870570.
53. Yen W.C., Fischer M.M., Axelrod F. et al. Targeting notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (Tarextumab) inhibits tumor growth and decreases tumor-initiating cell frequency. *Clin Cancer Res* 2015;21(9):2084–95. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2808. PMID: 25934888.
54. Lee D., Kim D., Choi Y.B. et al. Simultaneous blockade of VEGF and DLL4 by HD105, a bispecific antibody, inhibits tumor progression and angiogenesis. *MAbs* 2016;8(5):892–904. DOI: 10.1080/19420862.2016.1171432. PMID: 27049350.
55. Andersson E.R., Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signaling – are we there yet? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(5):357–78. DOI: 10.1038/nrd4252. PMID: 24781550.
56. Espinoza I., Pochampally R., Xing F. et al. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther* 2013;6:1249–59. DOI: 10.2147/OTT.S36162. PMID: 24043949.
57. Kangsamaksin T., Murtomaki A., Kofler N.M. et al. NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discov* 2015;5(2):182–97. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0650. PMID: 25387766.

**Вклад авторов**

М.В. Новикова: написание текста рукописи;

Б.П. Копнин: анализ баз данных и обработка полученных результатов;

П.Б. Копнин: поиск и анализ публикаций по теме статьи, редактирование рукописи.

**Authors' contributions**

M.V. Novikova: article writing;

B.P. Kopnin: database analysis and processing of the results;

P.B. Kopnin: search and analysis of publications on the topic of the article, article editing.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

М.В. Новикова/M.V. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-1974-3790>

Б.П. Копнин/B.P. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0003-3100-2212>

П.Б. Копнин/P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 14-15-00467).

**Financing.** The study was performed with the support of Russian Science Foundation (agreement No. 14-15-00467).

**Статья поступила:** 26.09.2018. **Принята к публикации:** 06.11.2018.

**Article received:** 26.09.2018. **Accepted for publication:** 06.11.2018.