

УДК 611/612

Роль белков семейства Notch в жизнедеятельности клетки

1.Кутузова Лилиана Алексеевна

Доцент, кандидат медицинских наук. Медицинская Академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В.И. Вернадского. Россия, г. Симферополь

2.Меметова Алие Айдеровна

Студент 2 курса 1-ого медицинского факультета. Медицинская Академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В. И. Вернадского. Россия, г. Симферополь

3.Силиверст Ольга Николаевна

Студент 2 курса 1-ого медицинского факультета. Медицинская Академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В. И. Вернадского. Россия, г. Симферополь

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»; Российская Федерация, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7

В начале предыдущего столетия были открыты рецепторы-белки Notch, играющие одну из ведущих ролей в процессах эмбрионального развития живого организма. Данные высокомолекулярные органические соединения представлены у млекопитающих, в том числе и человека, четырьмя типами огромных молекул-димеров, способных при помощи уникального механизма запускать сигнал каскадных реакций, который влияет на выбор клеткой своего жизненного пути. Такое взаимодействие обеспечивается за счет наличия высокоспецифичных лигандов семейств Jagged, DLL и DSL, контакт с которыми инициирует протеолиз внутриклеточного домена рецептора, транслокацию его в ядро и активирует транскрипцию генов, ответственных за равновесие между пролиферацией, апоптозом и дифференцировкой. Помимо этого, белки Notch регулируют жизнедеятельность уже дифференцированных клеток, таким образом поддерживая постоянство некоторых характеристик уже сформированных, обособленных друг от друга тканей. Наиболее изучена роль белков Notch в процессах гемопоэза, сомато- и нейрогенеза. Различного рода нарушения, возникающие в ходе активации сигнального пути Notch, служат причиной разнородных дефектов осевых органов, в том числе принимают участие в течении канцерогенеза. Однако, будут ли белки Notch выступать в качестве опухолевого супрессора или же наоборот, стимулировать деление раковых клеток, зависит от микроокружения белков-рецепторов. Статья посвящена пристальному анализу данных о строении белков семейства Notch и их лигандов, канонической активации сигнального Notch-пути, воздействии такого биомеханизма на клетку, а также освещению факторов, влияние которых определяет конечный путь развития клетки, включая и те, которые способствуют её малигнизации. Данное направление является малоизученным, однако уже на столь ранних этапах исследований полученная информация позволила учёным развить такие направления, как противоопухолевая терапия, геновая инженерия и т.д. Это обстоятельство делает изучение Notch белков весьма перспективной направленностью в науке.

Ключевые слова. Notch белки, стволовые клетки, сигнальный путь, эмбриогенез, канцерогенез, микроокружение.

The role of proteins of the Notch family in cell activity

1.Kutuzova Liliana Alekseevna

Associate Professor, Candidate of Medical Sciences. Medical Academy named after SI Georgievsky FGAOU VO KFU them V.I. Vernadsky. Russia, Simferopol

2.Memetova Alie Aiderovna

Second year student of the 1st medical faculty. Medical Academy named after SI Georgievsky FGAOU VO KFU them V.I. Vernadsky. Russia, Simferopol

3. Siliverst Olga Nikolaevna

Second year student of the 1st medical faculty. Medical Academy named after SI Georgievsky
FGAOU VO KFU them V.I. Vernadsky. Russia, Simferopol

Notch receptor proteins which play a leading role in the embryonic development processes of a living organism were discovered at the beginning of the previous century. These high-molecular-weight organic compounds are represented in mammals, including humans, by four types of huge dimer molecules. They are capable of using a unique mechanism to trigger a cascade reaction signal that influences the choice of a cell of its life path. Such interaction is ensured by the presence of highly specific ligands of the Jagged families, DLL and DSL, contact with which initiates proteolysis of the intracellular domain of the receptor, its translocation into the nucleus and activates the transcription of genes responsible for the balance between proliferation, apoptosis and differentiation. In addition, Notch proteins regulate the vital activity of already differentiated cells, thus maintaining the constancy of some characteristics of already formed, isolated from each other tissues. The role of Notch proteins is the most studied in the processes of hematopoiesis, somato- and neurogenesis. Various kinds of disorders that occur during the activation of the Notch signaling pathway cause heterogeneous defects in the axial organs, including taking part in carcinogenesis. However, whether Notch proteins act as a tumor suppressor or, alternatively, stimulate the division of cancer cells, depends on the microenvironment of the receptor proteins. The article is devoted to a close analysis of data on the structure of the Notch family of proteins and their ligands, the canonical activation of the signal Notch-pathway, the effect of such a biomechanism on the cell, and the coverage of factors whose influence determines the final path of cell development, including those that contribute to its malignancy. Although this direction is little studied, the information obtained at such early stage of research allowed scientists to develop areas such as antitumor therapy, genetic engineering, etc. This circumstance makes the study of Notch proteins very promising direction in science.

Keywords: Notch proteins, stem cells, signaling pathway, embryogenesis, carcinogenesis, microenvironment.

Специалисты в области микробиологии, цитологии и эмбриологии давно задавались рядом вопросов: каким образом происходит выбор клеткой своего жизненного пути? Почему возникают организмы, пораженные конгенитальными патологиями? Что способствует отклонению развития от нормы? Каким образом эти процессы могут быть связаны с канцерогенезом? Ответы на данные задачи учёные получили в ходе детального исследования микроокружения клеток, а также механизмов межклеточного взаимодействия, среди которых особую роль играют трансмембранные рецепторы семейства Notch.

Белки семейства Notch — интегральные белки-рецепторы, у человека представленные четырьмя типами (Notch 1-4). Данные белки осуществляют контроль пролиферации, дифференцировки и развития клеток и тканей, а также активируют транскрипцию генов, участвующих в регуляции баланса между этими процессами [1].

В 1913 г. в ходе исследования дифференцировки эктодермы, проводимых на экспериментальной форме *Drosophila melanogaster*, американским биологом Томасом Хантом Морганом были открыты белки-факторы роста, играющую особую роль в созревании и функционировании клетки. Позднее были получены сведения о нарушениях развития *D. melanogaster* в случае повреждения участков гена NOTCH (Дж. С. Декстер, 1914 г.) и участии сигнального пути Notch в онтогенезе (Д. Полсон, 30-е гг. XX века) [2].

Строение рецепторов сигнального пути Notch удалось изучить лишь после клонирования и секвенирования гена. Было установлено, что данные белки представляют собой огромные

молекулы-димеры, имеющие молекулярную массу в пределах 300 кДа, содержащие специфические для данного семейства внутриклеточный и внеклеточный домены с множественными (от 26 до 29) EGF-подобными повторами, способными связывать лиганд [1, 2].

Активация сигнального пути Notch является уникальной. Она происходит при непосредственном физическом контакте данных белков с клетками, содержащими на своей поверхности лиганды к Notch-белкам. У млекопитающих описано 7 родственных друг другу лигандов (семейства Delta, Serrate и Lag-2 (DSL), Serrate-like ligands (Jagged1, Jagged2), Delta-like ligands (DLL1,-3,-4), каждый из которых является трансмембранной формой белков, обеспечивающих взаимодействие соседних клеток друг с другом. Связь между Notch-белками и данными лигандами была доказана в работе, проведенной на *Caenorhabditis elegans*, выявившей взаимосвязь интегрального белка γ -секретазы и сигнального каскада Notch. Это открытие позволило ученым предположить, что после контакта рецептора Notch со специфичным ему лигандом происходит отщепление внутриклеточного домена данного рецептора N-IC (Notch Intracellular Domain, NICD), транспорта домена в ядро, где начинается активация транскрипции генов семейств HES и HEY, ответственных за специализацию и жизненный цикл клетки [1].

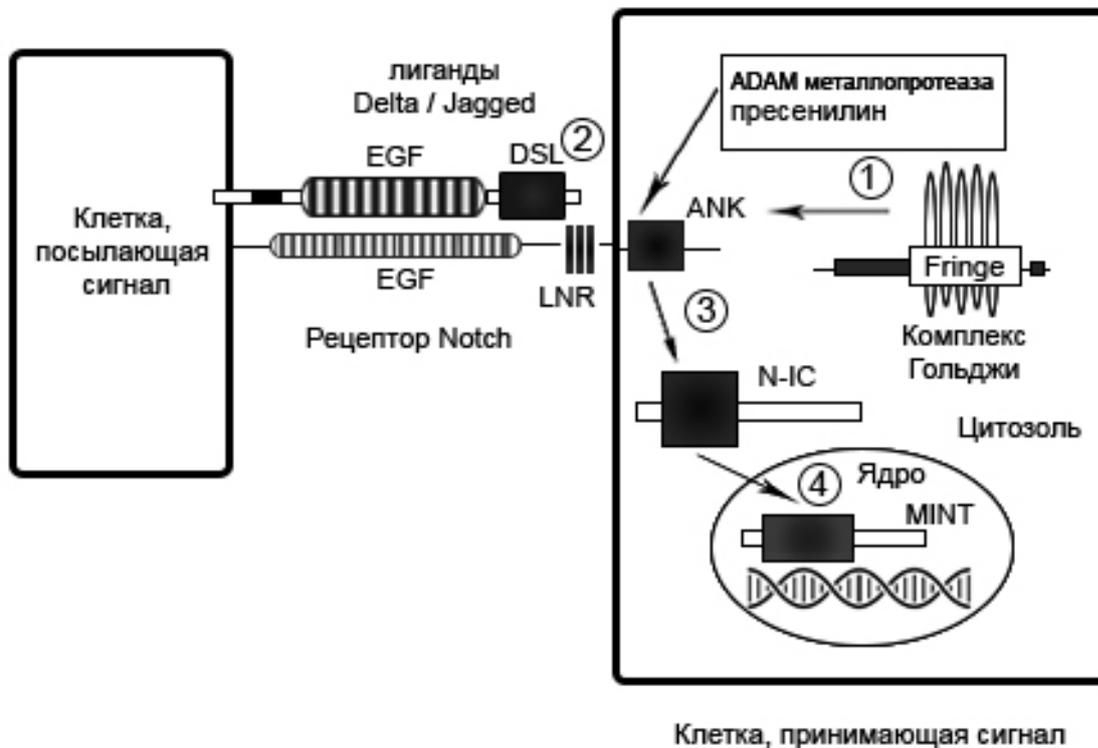


Рис. 1. Каноническая активация сигнального пути Notch. На схеме указаны основные участники и некоторые целевые гены. 1 — Рецептор Notch расщепляется фуриноподобной протеазой в комплексе Гольджи и переносится на клеточную поверхность в качестве

гетеродимера. Возможно его гликозилирование белками Fringe аппарата Гольджи. 2 — После экспрессии на поверхности клетки Notch взаимодействует с лигандами (DSL, Jagged1 и др.). 3 — После связывания лиганда с рецептором лиганд расщепляется металлопротеазой ADAM и γ -секретазой для освобождения N-IC. 4 — N-IC инициирует свои последующие эффекты путем миграции на ядро и связывания с его элементами.

Активация данного пути является сверхточным процессом. Это доказали исследования, проводимые на экспериментальных животных. Согласно полученным данным, выбор правильного клеточного пути во многом зависит от баланса между количеством рецепторов и лигандов к ним. К примеру, недостаточность Jagged1 вызывает пороки развития многих систем органов у людей [1].

Учёные выделяют две категории белков-регуляторов сигнального пути: активаторы и ингибиторы. К первым можно отнести ядерные белки Deltex и MINT: в зависимости от контекста они определяют, стоит ли экспрессировать тот или иной ген. Среди супрессоров транскрипционных механизмов наиболее изучены LNX, SEL-10, Numb и Itch [2].

Присоединение остатков сахаров к молекулам Notch-белков, а также их лигандам при помощи Fringe действует в роли критического регулятора активации сигнального пути. Посредством модификации EGF-подобных повторов происходит усиление Delta сигналов и подавление Serrate. Таким образом на клеточном уровне организации удаётся разграничить друг от друга несколько видов тканей и сохранить их специфичность. На данный момент установлено лишь три белка, относящихся к Fringe-комплексу. Это LFng, MFng и RFng. Посредством экспериментов на мышах было выявлено, что LFng особенно необходим для дифференцировки сомитов в области будущей грудной клетки и позвоночника [2, 7].

Процесс активации сигнального пути Notch в разных тканях неодинаков. Различия объясняются типом ткани, клеточного окружения, сигнала, лиганда и степенью содержания белков семейства Notch в данной клетке [8].

На данном этапе исследований остаётся неизвестным, усиливают ли гены-компоненты сигнального пути Notch потенциал к тканеспецифичной дифференцировке или ингибируют его. Опубликованы противоречивые данные, связанные со спектром действия белков Notch на дифференцировку клеток. Например, при контакте NICD человеческих мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) с лигандом семейства Jagged1, транскрибированного при участии экзогенного белка Jag1, ведёт к усилению межклеточного взаимодействия, т.е. активации остеогенного клеточного дифферона ММСК. Введение же активированного домена NICD в ММСК мыши *in vitro* приводит к подавлению дифференцировки остеогенных клеток, а *in vivo* — к снижению плотности массы костной ткани [2].

Важны Notch и для уже дифференцированных клеток. Доказано, что связывание DSL лигандов с активированными Notch-рецепторами обеспечивает такие процессы, как клеточная память и синаптическая пластичность нейронов. Кроме того, передача сигналов Notch регулирует дифференцировку клеток-составляющих нейроглии и арборизацию (т.е. ветвление наподобие дерева) нейронов [3].

Влияние типа активированного рецептора на Notch-эффект демонстрируется следующим образом: стимуляция Notch1 ингибирует процесс созревания зрелых остеокластов, в то время как активирование Notch2 приводит к усиленному остеокластогенезу [7].

Также при дифференцировке клеток имеет значение момент действия Notch-белка. Так, решающим регулятором судьбы развивающегося кардиомиоцита может стать своевременная активация доменов Notch1, -4, вырабатываемых эндотелиоцитами васкуляризирующих тканей. Через множественные взаимодействия будущего миокарда с нервным гребнем данные гены приводят к развитию внутренней сердечной оболочки и морфогенезу сердечных клапанов и камер. Notch также необходимы для дифференцировки коронарного сосуда. Однако, взаимодействие рецепторов Notch с лигандом HEY2 на более позднем этапе может повлечь недоразвитие сердечных клапанов и возникновение аритмии [5]. Учёные предполагают, что для запуска подобных каскадных реакций необходим своеобразный пороговый уровень сигнализации Notch пути. Превышение или недостаточная степень реагирования на лиганды приводят к инактивации сигналов определения жизненного пути клетки. Таким образом осуществляется регуляция стволовых свойств мультипотентных клеток или их дифференцировка на генетическом уровне [1].

Известно, что мутации доменов, входящих в сигнальный путь Notch, приводят к серьёзным заболеваниям опорно-двигательного аппарата (остеопения, остеосаркома, дизостоз, брахидактилия). Зачастую это происходит вследствие формирования искажённого набора соматических границ в эмбриогенезе. Причиной такого явления становится нарушение периодичности активации генов, участвующих в передаче Notch-сигналов (HES1, DLL1, -3) [7,8].

Выделяют ряд целевых генов Notch-белков, которые определяют направление сигнального пути Notch. Регуляторами клеточного цикла являются CyclinD1, NRARP, NF-κB, TP21, pre-Ta. Маркерами злокачественных новообразований служат C-MYC, IGF1-R, SURVIVIN, SLUG. Белки HES1 и HEY1 являются не только непосредственными мишенями для сигнального пути Notch, но также действуют как ингибитор транскрипционных процессов, тем самым регулируя клеточный цикл [2].

Семейство Notch осуществляет контроль над эмбриональным развитием не только в виде определения направления развития клетки, но также посредством пары механизмов. Первый

получил название латеральная спецификация. Она происходит, когда клетки одного типа одновременно задействованы как в экспрессии белков и лигандов, так и в принятии их сигналов на одной стадии активации Notch пути. Обычно данный процесс характеризуется выраженной асимметрией, поскольку клетка самостоятельно выбирает, какое соединение и в каком объеме ей необходимо секретировать. При этом клетка, проходящая этапы дифференцировки (например, в нейробласт), ингибирует аналогичные процессы у соседних клеток. В будущем это отразится следующим образом: 1) произойдет разделение специфических клеточных типов друг от друга; 2) будут сформированы границы между тканями. Второй способ — индуктивная передача сигналов — заключается в экспрессии белков и их лигандов клетками двух различных типов, т.е. удастся осуществить активацию Notch только в тех клетках, плазмалемма которых несет на своей поверхности Notch-рецепторы. [1, 2, 5].

Определенную роль белки Notch играют также и в коррекции процессов гемопоэза, который является собой баланс между самообновлением и дифференцировкой кроветворных стволовых клеток. Гемопоэтические ткани и органы обычно богаты данным типом белков. Здесь сигнальный путь Notch активируется в ходе взаимодействия его рецепторов с лигандами Jagged1, DLL 1 и 4, которые несут на себе клетки стромы красного костного мозга. Экспрессируются они и в тимусе, что говорит о важности данного сигнального каскада для формирующихся Т-клеток. Активация генов Notch1 и Notch2 была обнаружена в гранулоцитах [6].

В ходе экспериментов учеными было показано, что гиперактивация семейства Notch-белков способствует возникновению различных форм неоплазий, вызванных нарушениями в структуре генов, ответственных за апоптоз клетки [5].

Перспективным направлением является изучение сигнального пути Notch как маркера клеточных патологий, в частности, канцерогенеза, поскольку Notch-белки контролируют ключевые процессы жизнедеятельности клетки. Характерной особенностью Notch является влияние на пролиферацию опухолевых клеток или её подавление в зависимости от микроокружения в пределах одной и той же опухоли [4].

В 1991 г. L.W. Ellisen вместе с соавторами доказали вовлеченность сигнального пути Notch в стимуляцию опухолевых процессов во время изучения на экспериментальном животном Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ). В ряде случаев нарушение структуры доменов Notch приводило к образованию химерного белка Notch 1/ TCR β , имитирующего NICD. Позднее была обнаружена мутация гена Notch1, в 56% случаев приводящая к Т-ОЛЛ. В 31% мутации Notch1 обнаруживалась хроническая лимфоцитарная лейкемия (ХЛЛ). Предполагается, что для решения подобной проблемы может быть использована лиганд-

независимая активация Notch-рецепторов. Она приведёт к стабилизации N-IC внутри гена, однако неблагоприятный прогноз по-прежнему будет сохраняться [4].

В крупных опухолях сигнальный путь Notch был впервые обнаружен в вирусе мышинной опухоли молочной железы, причиной которого считается мутация гена Notch4, а также повышенный синтез Notch1 и взаимодействие его с лигандом Jagged1 [6].

В целом, считается, что сигнальный путь Notch оказывает в основном проонкогенное действие, вызывая такие патологии, как Т-ОЛЛ, ХЛЛ, аденокарцинома легкого, рак молочной и поджелудочной железы, меланома [2]. В качестве опухолевого супрессора белки Notch действуют при связывании с лигандами на поверхности клеток, вызывающими плоскоклеточный рак кожи и рак шейки матки [4]. Потеря пресенилина — каталитической субъединицы γ -секретазы — способствует потере активности данного белка и развитию болезни Альцгеймера. Notch-белки также способствуют выживанию опухолевых клеток и их устойчивостью к химиотерапии [2].

Подводя итоги, можно сказать, что белки семейства Notch и инициируемый ими сигнальный путь являются уникальными среди всех белков человеческого организма. В зависимости от клеточного контекста белки Notch регулируют разнообразные интрацеллюлярные процессы, а в ряде случаев становятся причиной серьёзных мутаций. Дальнейшие исследования сигнального пути Notch могут быть использованы для разработки методики противоопухолевой терапии, создания и поддержания специфичных свойств стволовых клеток, искусственной регуляции таких процессов, как ангиогенез, гемопоэз и др., что делает это направление весьма перспективным.

Список литературы:

1. М. А. Богданова, А. А. Костарева, А. Б. Малашичева. «Роль сигнального пути Notch в дифференцировке мезенхимных стволовых клеток жировой ткани человека», 2014. С. 2-3, 8-9–11.
2. М.В. Новикова, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, П.Б. Копнин. «Роль белков Notch в процессах канцерогенеза», 2015. С. 3-4, 6–12.
3. 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.
4. Capaccione K. M., Pine S. R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013;34(7):1420–30, 32.
5. Louvi A., Artavanis-Tsakonas S. Notch and disease: a growing field. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23(4):473–80.

6. 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, 74.
7. Zanotti S., Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease // *Eur. J. Endocrinol.* 2013. Vol. 168. P. 94-95–103.
8. Zhu F., Sweetwyne M., Hankenson K. PKC δ is required for Jagged-1 induction of human mesenchymalstem cell osteogenic differentiation // *Stem Cells.* 2013. Vol. 31. P. 1181–1192.