РОЛЬ ГЕНА *NOTCH1* В ФОРМИРОВАНИИ АНЕВРИЗМЫ АОРТЫ

Иртюга О. Б.¹, Фрейлихман О. А.¹, Кривоносов Д. С.¹, Малашичева А. Б.^{1,2}, Тарновская С. И.^{1,3}, Успенский В. Е.¹, Гордеев М. Л.¹, Ротарь О. П.¹, Костарева А. А.¹, Моисеева О. М.¹

Цель. Оценить вклад генетической составляющей в развитии аневризмы грудного отдела аорты у пациентов с трикуспидальным (ТАК) и бicuspidальным аортальным клапаном (БАК) на основании анализа и поиска мутаций в гене *NOTCH1*.

Материал и методы. В исследование включено 60 пациентов с дилатацией грудного отдела аорты более 40 мм и 200 пациентов без патологии аорты, составившие группу сравнения. Всем пациентам проводилось эхокардиографическое исследование на аппарате Vivid 7 (GE, США) по стандартному протоколу. Для молекулярно-генетического исследования мы применили стратегию целевого скрининга мутаций, включая анализ 10 из 34 экзонов гена *NOTCH1*, выполненного путем прямого секвенирования.

Результаты. Пациенты с БАК были моложе, чем пациенты без ВПС. Артериальная гипертензия верифицирована только у каждого второго пациента с БАК. Кроме того, максимальные цифры артериального давления (АД) были значимо ниже у пациентов с врожденным пороком сердца (ВПС) ($p < 0,02$). В результате генетического анализа в исследуемой группе у 9 пациентов с ВПС и 2 пациентов с ТАК выявлено 10 вариантов аминокислотных замен в 6 из 10 анализируемых экзонах, из них 5 замен — синонимичные и мутация S2449R выявлена впервые. Мутации P1227S, E1305K, R1279H и D1267N найдены в сайте связывания белка Notch1 с DLL4, три из них являются высоко патогенными, что могло повлиять на белок-белковые взаимодействия Notch1 с DLL4 и привело к формированию аневризмы.

Заключение. Мутации P1227S D1267, E1305K в гене *NOTCH1*, являясь высоко патогенными, могут приводить к изменению функций белка, вызывая нарушения Notch сигналинга, более характерного для больных с БАК.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(7):53–59
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-7-53-59>

Ключевые слова: аневризма грудного отдела аорты, бicuspidальный аортальный клапан, Notch1, DLL4.

Конфликт интересов: работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-01318).

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

Иртюга О. Б.* — к.м.н., в.н.с. НИЛ кардиомиопатий, ORCID: 0000-0002-8656-3191, Фрейлихман О. А. — к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной кардиологии, ORCID: 0000-0002-2850-728X, Кривоносов Д. С. — к.м.н., н.с. НИЛ неврологии и нейрореабилитации, ORCID: 0000-0001-7541-0360, Малашичева А. Б. — к.б.н., зав. НИЛ молекулярной кардиологии, доцент кафедры эмбриологии биологического факультета, ORCID: 0000-0002-0820-2913, Тарновская С. И. — к.б.н., н.с. лаборатории биоинформатики центра RASA, м.н.с. группы клеточной биологии, ORCID: 0000-0002-6777-0785, Успенский В. Е. — к.м.н., с.н.с. НИЛ хирургии пороков и ишемической болезни сердца, доцент кафедры сердечно-сосудистой хирургии, ORCID: 0000-0002-7929-0594, Гордеев М. Л. — профессор, д.м.н., заслуженный врач РФ, зав. научно-исследовательским отделом кардиоторакальной хирургии, зав. кафедрой сердечно-сосудистой хирургии, ORCID: 0000-0002-8199-0313, Ротарь О. П. — д.м.н., зав. НИЛ эпидемиологии неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0002-5530-9772, Костарева А. А. — к.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, ORCID: 0000-0002-9349-6257, Моисеева О. М. — д.м.н., директор Института сердца и сосудов, зав. НИО некоронарогенных заболеваний сердца, ORCID: 0000-0002-7917-3847.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): olgir@yandex.ru

АД — артериальное давление, АК — аортальный клапан, БАК — бicuspidальный аортальный клапан, ВПС — врожденный порок сердца, ТАК — трикуспидальный аортальный клапан.

Рукопись получена 02.07.2017

Рецензия получена 05.09.2017

Принята к публикации 04.11.2017

ROLE OF THE *NOTCH1* GENE IN FORMATION OF AORTIC ANEURYSM

Irtuga O. V.¹, Freilichman O. A.¹, Krivonov D. S.¹, Malashicheva A. B.^{1,2}, Tarnovskaya S. I.^{1,3}, Uspenskiy V. E.¹, Gordeev M. L.¹, Rotar O. P.¹, Kostareva A. A.¹, Moiseeva O. M.¹

Aim. To evaluate the impact of genetics in development of thoracic aneurysm in patients with tricuspid valve (TAV) and bicuspid aortic valve (BAV) based on the analysis and search for mutations in *NOTCH1*.

Material and methods. In the study, 60 patients included with the dilation of thoracic aorta more than 40 mm and 200 patients with no aortic pathology, included in the comparison group. All patients underwent echocardiographic assessment on Vivid 7 (GE, USA) equipment, by standard protocol. For molecular genetics we utilized the strategy of targeted mutation screening, including the analysis of 10 of 34 exons of the gene *NOTCH1*, performed with the direct sequencing.

Results. Patients with BAV were younger than those with no inborn defect. Arterial hypertension was verified only in every second BAV patient. Also, maximal rates of blood pressure were significantly lower in patients with inborn defects ($p < 0,02$). As a result of genetic analysis in the studied group, in 9 patients with inborn defect and 2 patients with TAV there were 10 variants found of aminoacid replacement in 6 among 10 analyzed exons, of those 5 replacements — synonimic, and the mutation S2449R was found first time. Mutations P1227S, E1305K, R1279H and D1267N were found at the site of Notch1 protein binding with DLL4, of those 3 are highly pathogenic, that could influence the protein-protein interactions Notch1 with DLL4 leading to formation on aneurysm.

Conclusion. Mutations P1227S D1267, E1305K in the gene *NOTCH1*, being highly pathogenic, may lead to the changes of protein functioning via Notch signalling disorder, that is more characteristic for BAV patients.

Russ J Cardiol. 2018;23(7):53–59

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-7-53-59>

Key words: thoracic aorta aneurysm, bicuspid aortic valve, Notch1, DLL4.

Conflicts of Interest: financial support from the Russian Foundation of Fundamental Research (project 17-04-01318).

¹Federal Almazov North-West Medical Research Centre of the Ministry of Health, Saint-Petersburg; ²Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg; ³Saint-Petersburg Polytechnic University of the Peter the Great, Saint-Petersburg, Russia.

Irtuga O. V. ORCID: 0000-0002-8656-3191, Freilichman O. A. ORCID: 0000-0002-2850-728X, Krivonov D. S. ORCID: 0000-0001-7541-0360, Malashicheva A. B. ORCID: 0000-0002-0820-2913, Tarnovskaya S. I. ORCID: 0000-0002-6777-0785, Uspenskiy V. E. ORCID: 0000-0002-7929-0594, Gordeev M. L. ORCID: 0000-0002-8199-0313, Rotar O. P. ORCID: 0000-0002-5530-9772, Kostareva A. A. ORCID: 0000-0002-9349-6257, Moiseeva O. M. ORCID: 0000-0002-7917-3847.

В настоящее время вклад генетических факторов в формирование аневризмы восходящего отдела аорты у пациентов с врожденными пороками сердца (ВПС) доказан. Известно, что некоторые варианты гена *NOTCH1* способны приводить к дефектам развития с вовлечением различных органов и систем, в том числе сердечно-сосудистой. Роль данного гена в развитии патологии выходного тракта левого желудочка впервые продемонстрирована в 2005г Garg V, et al. у пациентов с ВПС: бикуспидальным аортальным клапаном (БАК) и кальцинозом аортального клапана (АК) [1]. Уже на тот момент обращал на себя внимание факт, что у большинства пациентов, не имеющих БАК или кальциноза АК, диагностировалось расширение аорты, что предполагало наличие общих патогенетических механизмов развития [2].

Вместе с тем, роль Notch сигналинга в патогенезе аневризмы восходящего отдела аорты у пациентов с трикуспидальным аортальным клапаном до сих пор остается дискуссионной. Кроме того, в работе Koenig SN, et al. на модели экспериментальных животных показано, что не во всех случаях у мышей с БАК формирование аневризмы аорты происходит с участием

Notch сигналинга [3]. На основании анализа и поиска мутаций в гене *NOTCH1* в рамках настоящей работы мы попытались оценить вклад генетической составляющей в развитие аневризмы аорты у пациентов с БАК и трикуспидальным АК (ТАК).

Материал и методы

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», и письменное информированное согласие получено от всех пациентов. В период с 2010 по 2011гг в исследование включено 60 пациентов с дилатацией восходящего отдела аорты.

Все пациенты с дилатацией аорты разделены на 2 группы: пациенты с ВПС, БАК и пациенты с ТАК. Клинико-демографическая характеристика групп приведена в таблице 1. Критерием включения было расширение аорты в восходящем отделе или в области синусов Вальсальвы более 40мм, верифицированное по данным трансторакального эхокардиографического исследования на аппарате Vivid 7 (GE, США) по стандартному протоколу, результаты которого представлены в таблице 2.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов

	Основная группа* (n=60)	БАК (n=42)	ТАК (n=18)	Контроль (n=200)	P — * vs контроль	P — ТАК vs БАК
Средний возраст, лет. Ме (Q1-Q3)	56 (50;61,5)	53 (49;59)	60 (56;67)	46,7±0,6	<0,01	0,01
Мужчины, n (%)	45 (75)	35 (83)	10 (56)	98 (49)	0,5	0,02
Индекс массы тела, кг/м ² Ме (Q1-Q3)	27 (25;29)	27 (24;28)	29 (26;31)	29,1±0,3	<0,01	0,09
Артериальная гипертензия, n (%)	42 (70)	26 (62)	16 (89)	60 (30)	<0,01	0,02
САД макс, мм рт.ст., Ме (Q1-Q3)	160 (130;180)	150 (130;180)	170 (160;180)	-	-	0,03
ДАД макс, мм рт.ст., Ме (Q1-Q3)	90 (80;100)	88 (80;100)	100 (90;100)	-	-	0,02
Офисные цифры САД, мм рт.ст., Ме (Q1-Q3)	127 (120;140)	120 (110;140)	130 (120;140)	141±1,3	<0,01	0,09
Офисные цифры ДАД, мм рт.ст., Ме (Q1-Q3)	80 (70;80)	80 (70;80)	80 (70;80)	92±0,9	<0,01	0,40
Аортальный стеноз, n (%)	41 (68)	30 (71)	11 (61)	-	-	0,4
Сахарный диабет, n (%)	5 (8)	3 (7)	2 (11)	3 (1,5)	0,3	0,6
ХОБЛ, n (%)	9 (15)	6 (14)	3 (17)	10 (10)	0,6	0,8
Курение, n (%)	15 (25)	11 (26)	4 (22)	102 (51)	<0,01	0,1
ОХС, ммоль/л, M±m	5,0±0,15	5,1±0,2	4,7±0,3	5,8±0,1	<0,01	0,12
ХС-ЛПВП, ммоль/л, M±m	1,40±0,14	1,4±0,2	1,32±0,2	1,40±0,3	0,71	0,52
ХС-ЛПНП, ммоль/л, M±m	3,08±0,19	3,2±0,2	2,88±0,4	3,66±0,08	0,02	0,42
ТГ, ммоль/л, M±m	1,70±0,24	1,7±0,3	1,8±0,3	1,67±0,1	0,86	0,86
Медикаментозная терапия, n (%)	37 (62)	26 (62)	11 (61)	47 (24%)	<0,01	0,94
иАПФ/АРА, n (%)	23 (38)	17 (40)	6 (33)	47 (24)	0,02	0,61
Бета-адреноблокаторы, n (%)	37 (62)	25 (60)	12 (67)	0	-	0,60
Блокаторы кальциевых каналов, n (%)	3 (5%)	2 (5)	1 (6)	0	-	0,95
Статины, n (%)	21 (35)	15 (36)	6 (33)	0	-	0,9

Примечание: * — относится к основной группе.

Сокращения: АРА — антагонист рецепторов ангиотензина, ДАД — диастолическое артериальное давление, иАПФ — ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, ЛПВП — липопротеиды высокой плотности, ЛПНП — липопротеиды низкой плотности, ОХС — общий холестерол, САД — систолическое артериальное давление, ТГ — триглицериды, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, Ме — медиана, Q1 — квартиль 1, Q3 — квартиль 3.

Таблица 2

Эхокардиографические показатели пациентов

Параметр	Подгруппа БАК Me (Q1-Q3)	Подгруппа ТАК Me (Q1-Q3)	p
Диаметр аорты на уровне синусов Вальсальвы, мм	40 (35;42)	40 (36;40)	0,8
Диаметр на уровне восходящего отдела аорты, мм	46 (41;53)	47 (42;52)	0,8
АО индекс, (АО макс/ППТ)	24 (22;27)	24 (22;29)	0,9
Максимальный градиент на АК, мм рт.ст.	74 (62;96)	79 (22;101)	0,9
ФВ _{Симпсон} , %	63 (54;69)	62 (58;65)	0,9
ИММЛЖ, г/м ²	157 (128;196)	163 (116;189)	0,7
ОТС, мм	0,45 (0,38;0,54)	0,49 (0,44;0,60)	0,2

Сокращения: ИММЛЖ — индекс массы миокарда левого желудочка, ОТС — относительная толщина стенок, ППТ — площадь поверхности тела, ФВ — фракция выброса, Me — медиана, Q1 — 25 перцентиль, Q3 — 75 перцентиль.

Всем пациентам выполнено молекулярно-генетическое исследование. В контрольную группу для генетического исследования вошли 200 человек, участников клинического исследования NICA, не имеющих структурных внутрисердечных аномалий по данным эхокардиографического исследования, в том числе дилатации аорты [4].

Мы применили стратегию целевого скрининга мутаций, обследовав 10 из 34 экзонов гена *NOTCH1*, ранее выявленных у пациентов с ВПС аневризмой аорты и аортальным стенозом [1, 5].

Геномная ДНК выделена из периферической крови с использованием набора реагентов FlexiGene DNA purification Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Амплификация экзонов 10, 11, 12, 13, 20, 23, 24, 29, 30 и 34 проводилась с использованием праймеров, которые были выбраны на основе ранее опубликованных отчетов о причастности гена *NOTCH1* к развитию ВПС, в том числе БАК, аневризмы аорты, аортального стеноза [5, 6].

Скрининг мутаций в исследуемой и контрольной группах проведен путем прямого секвенирования амплифицированных фрагментов на капиллярном секвенаторе ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) с использованием BigDye Terminator v3.1 mix (Applied Biosystems). Полученные последовательности проанализированы и приведены в соответствие с помощью программного обеспечения BioEdit и Geneious. Для сравнительного анализа ДНК использовали эталонные последовательности *NOTCH1* из соответствующей базы данных секвенированных геномов (GeneBank Accession Количество NM_017617.3 из NCBI). Оценка патогенности несинонимических однонуклеотидных вариантов в человеческом гене *NOTCH1* выполнена с использованием базы данных dbNSFP. Для аннотации мы использовали параметр MetaSVM_pred, основанный на расчетах 10 отдельных методов: SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP++, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, LRT, SiPhy и PhyloP.

Статистическая обработка данных проведена с использованием прикладных статистических программ Statistica for Windows v. 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Для показателей, имеющих приблизительно нормальное распределение, результаты представлены в виде среднего арифметического значения (M), средней арифметической ошибки (m) и количества признаков в группе (n). Данные, не соответствующие нормальному закону распределения, представляли в виде медианы Me и интерквартильного размаха (в виде 25 и 75 перцентилей, Q1-Q3). Критерий значимости устанавливался на уровне $p < 0,05$. Для выявления независимого влияния на количественные показатели качественных факторов использована процедура однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для показателей, имеющих распределение, отличное от нормального, применены непараметрические критерии: медианный и Краскела-Уоллиса. Для выявления различий между подгруппами по одиночным показателям использовались разные варианты дисперсионного анализа: параметрические (ANOVA) и непараметрические (U-тест по методу Манна и Уитни, H-тест по Краскелу и Уоллису).

Результаты

Пациенты с дилатацией аорты значительно старше, с более низкими индексом массы тела, офисным артериальным давлением (АД), общим холестерином и холестерином липопротеидов низкой плотности. Вероятно, это связано с тем, что в исследование NICA включались пациенты с метаболическим синдромом, без адекватной гипотензивной и гиполипидемической терапии (табл. 1). Пациенты с БАК моложе пациентов с ТАК. Артериальная гипертензия верифицирована только у каждого второго пациента с БАК, поэтому максимальные цифры АД были значительно ниже у пациентов с ВПС (табл. 1). При этом данные эхокардиографического исследования у пациентов с расширением восходящего отдела аорты в двух группах не различались (табл. 2).

Таблица 3

Характеристика нуклеотидных замен в кодирующих последовательностях гена *NOTCH1* в группе пациентов

Позиция нуклеотидной замены в последовательности ДНК гена <i>NOTCH1</i> (NG_007458.1)	Позиция нуклеотидной замены в гене <i>NOTCH1</i> с учетом экзон-интронной структуры	Наличие описаний нуклеотидной замены в опубликованных исследованиях	Позиция аминокислотной замены в белке NP_060087.3	Классификация нуклеотидных замен по NCBI RS	Классификация нуклеотидных замен по ExAC allele frequency (Nature doi: 10.1038/nature19057)	Контроль (n=100)	Пациенты
C/T g.34787	Экзон 10	-	Y550Y	rs371634784	0,0006171	0/200	1/60
G/A g.34802	Экзон 10	-	T555T	rs148331061	0,01737	1/200	1/60
G/A g.36150	Экзон 13	McBride et al., 2008	E694K	rs79782048	0,0009074	0/200	1/60
G/A g.36119	Экзон 13	-	A683A	rs61751553	0,001726	1/200	1/60
G/A g.42428	Экзон 20	-	S1066S	rs199892488	0,0004402	0/200	1/60
C/T g.43849	Экзон 23	-	P1227S	rs777652834	-	0/200	1/60
G/A g.44006	Экзон 23	McBride et al., 2008	R1279H	rs61751543	0,02893	5/200	2/60
G/A g.43969	Экзон 23	Irtyuga et al., 2017	D1267N	новая	-	0/200	2/60
G/A g.44159	Экзон 24	Irtyuga et al., 2017	E1305K	rs775602958	0,00000831	0/200	1/60
C/A g.54395	Экзон 34	-	S2449R	новая	-	0/200	4/60
G/A g.53696	Экзон 34	Irtyuga et al., 2017	P2097P	rs3812596	0,01103	0/200	1/60

Рис. 1. Локализация миссенс-мутаций в гене *NOTCH1*. Референсные последовательности.

В результате генетического анализа в исследуемой группе у 11 пациентов выявлено 10 вариантов аминокислотных замен в 6 из 10 анализируемых экзонов, из них 5 замен — синонимичные (табл. 3). Из всех миссенс вариантов в контрольной группе диагностировался только один ранее неоднократно описанный вариант R1279H. Этот вариант встречался у одного пациента с аневризмой аорты и у одного пациента с дилатацией, причем у обоих пациентов помимо патологии аорты диагностирован тяжелый аортальный стеноз. Все остальные несинонимичные замены регистрировались только в анализируемой группе

пациентов. Помимо вышеупомянутого варианта в контрольной группе встречались синонимичные T555T и A683A. Напротив, в основной группе впервые выявлена мутация S2449R. Хроматограммы последовательностей ДНК в норме и при некоторых заменах гена *NOTCH1*, выявленных в настоящем исследовании, представлены на рисунке 1.

Клинические данные пациентов с миссенс вариантами в гене *NOTCH1* приведены в таблице 4, из которой следует, что у всех мужчин с миссенс-мутациями подтверждено наличие БАК, в то время как у двух женщин из 11 человек с миссенс-вариан-

Таблица 4

Клиническая характеристика пациентов с миссенс-вариантами в гене *NOTCH1*

Номер пациента	Пол	Возраст	БАК (да/нет)	АС да/нет (макс. градиент на АК, мм рт.ст.)	Максимальный диаметр аорты, мм	Мутация
1	м	49	да	нет	56	E694K
2	м	70	да	Да (109)	55	P1227S
3	м	68	да	Да (45)	55	R1279H
4	ж	56	да	Да (64)	41	R1279H
5	м	41	да	нет	58	S2449R
6	м	53	да	нет	48	S2449R
7	м	59	да	нет	54	S2449R
8	ж	74	нет	Да (100)	67	S2449R
9	м	66	да	Да (103)	41	D1267N
10	ж	62	нет	Да (62)	40	D1267N
11	м	52	да	Да (67)	40	E1305K

Примечание: ж — женщина, м — мужчина.

Таблица 5

Аннотация миссенс-вариантов в гене *NOTCH1*

Мутация	SIFT ⁹	Polyphen2 ⁷	LRT ¹	Mutation Taster ¹¹	Mutation Assessor ¹⁰	FATHMM ¹²	PROVEAN ²	CADD ⁶ (>15)	GERP++ ⁴ (>4,4)	PhyloP ³ (>1,6)	SiPhy ⁵ (>12,17)	dbNSFP ⁸
R1279H	T	T	D	D	N	T	T	23,5	4,03	0,85	13,63	T
E694K	T	T	T	T	N	D	T	11	2,59	0,06	6,36	T
P1227S	D	D	D	D	N	D	D	24,1	5,23	0,9	17,8	D
S2449R	T	T	T	D	L	D	T	8,6	2,31	0,13	10,96	T
E1305K	D	T	D	D	M	D	D	29,0	4,64	0,84	16,49	D
D1267N	D	D	D	D	L	T	D	28,5	5,23	0,85	17,78	T

Примечание: D — повреждающий, H — высокий, L — низкий, M — средний, N — нейтральный, T — толерантный.

Рис. 2 (А, Б). А. Схема организации доменов в белке человека Notch1. Б. Трехмерная структура EGF домена внеклеточного участка белка Notch, связанного с белком DLL4.

Сокращения: EGF — домен эпидермального фактора роста, ANK — анкириновый домен, NL, NOD и NODP — домены, найденные в белке Notch.

тами врожденная аномалия клапана, в том числе по результатам гистологического исследования, выявлена не была. Аннотация миссенс-вариантов в гене *NOTCH1* продемонстрировала, что мутации P1227S, E1305K, D1267N являются высоко патогенными и могут приводить к изменению функций белка. Мутации S2449R, R1279H и E694K являются непатогенными. Однако, некоторые методы предсказывают их отрицательный эффект (табл. 5). Замены P1227S и R1279H находятся в высоко консервативных сайтах, их значения в GERP++ и SiPhy выше порогового значения (табл. 5). Мутации E694K, P1227S, R1279H, E1305K и D1267N находятся во внеклеточных кальций-связывающих доменах белка Notch1. В базе данных Protein Data Bank мы нашли трехмерную структуру этого участка, связанного с белком-лигандом Delta-like 4 (DLL4), PDB ID 4XLW (рис. 2).

Обсуждение

Аневризма грудного отдела аорты — гетерогенное, с точки зрения генетики заболевание. К возможным механизмам формирования аневризмы аорты относятся мутации, приводящие к запуску патологических сигналов, одним из которых является Notch сигналинг, который вносит существенный вклад в формирование этого порока развития.

Прорывом в изучении сигнального пути Notch стало секвенирование Notch локуса [8]. В дальнейшем при анализе молекулярных механизмов, вовлеченных в запуск Notch сигналинга, установлена связь между его нарушениями и развитием ряда заболеваний человека. Ранее опубликованные исследования уже продемонстрировали роль Notch сигналинга в морфогенезе сердца, в формировании атриовентрикулярного канала, клапанов сердца, выносящего тракта левого желудочка и коронарных сосудов [9, 10]. В частности, в наших исследованиях показано, что у пациентов с БАК и аневризмой аорты возникают нарушения Notch сигналинга [11]. Запуск каскада Notch происходит по юкстакринному механизму, т.е. передача сигнала осуществляется только при непосредственном физическом контакте двух клеток, одна из которых несет лиганд, а другая — соответствующий рецептор. Рецепторы Notch представляют собой трансмембранные белки I типа [12] и представлены 4 паралогами (Notch1-4). У пациентов с аневризмой аорты и БАК уже выявлялись различные мутации в гене *NOTCH1* [1,5]. Именно поэтому ген *NOTCH1* выбран для поиска причинных мутаций в настоящей работе.

В результате проведенного исследования выявлены мутации в гене *NOTCH1* не только у пациентов с БАК, но и у пациентов без ВПС, имеющих как изолированную аневризму восходящего отдела аорты, так и аневризму аорты в сочетании с аортальным сте-

нозом различной степени тяжести. Различные миссенс-варианты диагностированы у 11 пациентов с расширением восходящего отдела аорты. Кроме того, у 5 пациентов выявлены несинонимичные варианты. Таким образом, у каждого четвертого включенного в исследование пациента выявлены различные варианты в гене *NOTCH1*, что подтверждает гипотезу об участии Notch-сигналинга в патогенезе аневризмы аорты.

Лиганды Notch семейств Delta и Serrate представлены трансмембранными белками I типа: 3 белками семейства Delta (Dll1, Dll3, Dll4) и 2 белками семейства Serrate (Jagged1, Jagged2) [12]. Активация сигнального пути Notch начинается с взаимодействия лиганда и рецептора, после чего запускается каскад реакций, приводящих в итоге к ряду патологических состояний. В частности, выявленные в настоящем исследовании мутации P1227S, E1305K, R1279H и D1267N найдены в сайте связывания белка Notch1 с DLL4, что могло повлиять на их белок-белковые взаимодействия и привело к формированию аневризмы. Кроме того, новая мутация S2449R, выявленная у четырех пациентов, находится в гибком участке белка, то есть, участке, не имеющем определенной вторичной структуры (intrinsically disordered regions), но именно эти участки часто являются функционально значимыми и участвуют в связывании с лигандами.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлена новая миссенс-мутация S2449R в гене *NOTCH1*, диагностированная у трех мужчин, имеющих БАК и аневризму аорты. В то время как у женщины с этой же заменой по данным интраоперационной биопсии верифицирован ТАК и дилатация аорты, которые, в отличие от таковых у мужчин, сочетались с тяжелым аортальным стенозом. Кроме того, все миссенс варианты, диагностированные у мужчин, встречались у пациентов с ВПС и БАК, тогда как у двух из трех женщин, имеющих мутации в гене *NOTCH1*, расширение аорты сопровождалось тяжелым аортальным стенозом ТАК. Выявленные особенности не позволяют исключить связь миссенс вариантов гена *NOTCH1* как с врожденной аномалией АК, так и с процессом его кальцификации, приводящей к развитию аортального стеноза.

Ранее нами уже опубликованы результаты анализа гена *NOTCH1* у пациентов с тяжелым аортальным стенозом [15]. Однако при проведении дополнительного анализа установлено, что не все миссенс-варианты ассоциированы с наличием ВПС, БАК. Возможно, что ассоциации миссенс вариантов гена *NOTCH1* с БАК и аортальным стенозом, выявленные в настоящем исследовании, могут быть следствием ограниченности выборки, в которой проводился генетический анализ. Для того чтобы подтвердить или опровергнуть связь миссенс вариантов гена

NOTCH1 с развитием аневризмы аорты, необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациентов.

Заключение

Таким образом, в рамках настоящего исследования показано, что из всех выявленных вариантов гена *NOTCH1* три мутации: P1227S, D1267, E1305K, —

являются высокопатогенными и могут приводить к изменению функций белка, а также к нарушению Notch сигналинга, что более характерно для больных с БАК.

Конфликт интересов. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-01318).

Литература

- Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437:270-74.
- Verma S, Siu SC. Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *N Engl J Med*. 2014;370:1920-29. doi:10.1056/NEJMra1207059.
- Koenig SN, Bosse KM, Nadorlik HA, et al. Evidence of Aortopathy in Mice with Haploinsufficiency of Notch1 in Nos3-Null Background. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2015;2(1):17-30. doi:10.3390/jcdd2010017.
- Konradi AO, Rotar OP, Korostovtseva LS, et al. Prevalence of Metabolic Syndrome Components in a Population of Bank Employees from St. Petersburg, Russia. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011;9:337-43.
- McBride KL, Riley MF, Zender GA, et al. *NOTCH1* mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Hum Mol Genet*. 2008;17:18:2886-93. doi:10.1093/hmg/ddn187.
- McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, et al. Novel *NOTCH1* mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134:290-96.
- Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum Mutat*. 2016;37(3):235-41. doi:10.1002/humu.22932.
- Kidd S, Kelley MR, Young MW, 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.
- High FA, Epstein JA. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet*. 2008;9(1):49-61.
- Luxán G, D'Amato G, MacGrogan D, de la Pompa JL. Endocardial Notch signaling in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2016;118:e1-e18. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305350.
- Kostina AS, Uspensky VE, Irtyuga OB, et al. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016;1862(4):733-40. doi:10.1016/j.bbdis.2016.02.006.
- Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009;137(2):216-33. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045.
- Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(3):197-208. doi:10.1038/nrm1589.
- van der Lee R, Buljan M, Lang B, et al. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev*. 2014;114(13):6589-631. doi:10.1021/cr400525m.
- Irtyuga OB, Malashicheva AB, Zhiduleva EV, et al. *NOTCH1* mutations in aortic stenosis association with osteoprotegerin/RANK/RANKL. *BioMed Res Int*. 2017. doi:10.1155/2017/6917907.