

ИЗМЕНЕНИЯ В НЕКОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ГЕНА *TP53* ПРИ ДИФфуЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ

Changes in non-coding sequences of the *TP53* gene in diffuse large B-cell lymphoma

Воропаева Е. Н.^{1,2}, Поспелова Т. И.¹, Воевода М. И.^{1,2}, Максимов В. Н.^{1,2}

Voropaeva E. N.^{1,2}, Pospelova T. I.², Voevoda M. I.^{1,2}, Maksimov V. N.^{1,2}

¹ НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Novosibirsk, Russia

РЕЗЮМЕ

Введение. В настоящее время углубленный анализ результатов секвенирования вне кодирующих последовательностей гена *TP53* отсутствует, количество и функциональные эффекты выявляемых в них aberrаций недооценены. **Целью** данного исследования было выявить изменения в некодирующих участках *TP53* в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) и провести прогнозирование возможных последствий этих изменений. **Материал и методы.** Геномную ДНК выделяли из парафиновых блоков биоптатов опухолевых лимфоузлов и экстранодальных очагов поражения 92 больных с ДВККЛ. Методом прямого капиллярного секвенирования по Сенгеру определена нуклеотидная последовательность кодирующей области *TP53* (экзоны 5—10) и примыкающих участков интронов, а также фрагмента 3'-нетранслируемой последовательности (НТП) гена, содержащего сигнал полиаденилирования. Теоретическое прогнозирование возможных последствий обнаруженных интронных мутаций проводилось с помощью программы NetGene2. **Результаты.** В опухолевом материале от 74 больных ДВККЛ выявлены 12 типов мутаций в интронных участках: g.7675266A>G, g.7675010C>A, g.7674988A>G, g.7674326C>G, g.7674153C>G, g.7673691G>T, g.7673681T>C, g.7673664T>C и g.7673523A>G. Му-

ABSTRACT

Background. Currently, in-depth analysis of the results of sequencing outside the coding sequences of the *TP53* gene is absent, the number and functional effects of aberrations detected in them are underestimated. **The purpose** of this study was to identify changes in non-coding regions of *TP53* in tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and to predict the possible consequences of these changes. **Material and methods.** Genomic DNA was isolated from paraffin blocks of biopsies of tumor lymph nodes and extranodal lesions of 92 patients with DLBCL. The nucleotide sequence of the coding region of *TP53* (exons 5—10) and adjacent introns, as well as the fragment of the 3'-UTR gene sequence containing the polyadenylation signal, was determined by direct capillary sequencing by Sanger method. Theoretical prediction of possible consequences of detected intron mutations was carried out using the program NetGene2. **Results.** In tumor material from 74 patients with DLBCL, 12 types of mutations in intron sites were identified: g.7675266A>G, g.7675010C>A, g.7674988A>G, g.7674326C>G, g.7674153C>G, g.7673691G>T, g.7673681T>C, g.7673664T>C and g.7673523A>G. The mutation I g.7674326C>G, which has proven biological significance from in vivo experiments, according to The Human Cancer Mutation Database refers to changes that affect splicing. According to

тация g.7674326C>G, имеющая доказанную биологическую значимость по данным экспериментов *in vitro*, согласно информации из базы данных «The Human Cancer Mutation Database» относится к изменениям, влияющим на сплайсинг. Согласно прогнозу программы NetGene2, из выявленных нами в группе больных ДВККЛ интронных замен замена g.7675010C>A приводит к образованию дополнительного акцепторного сайта сплайсинга, что может приводить к включению в последовательность мРНК части интрона 5. В 5 из 9 случаев выявления rs78378222 в образцах опухолевой ткани ДВККЛ определен гомозиготный минорный генотип C/C, свидетельствующий о потере гетерозиготности в данном локусе, что способствует значительному приросту злокачественного потенциала клеток. **Заключение.** Таким образом, полученные данные свидетельствуют о функциональной селекции на этапах опухолевой прогрессии ДВККЛ изменений не только в экзонах, но и в интронах и в 3'-НТП гена *TP53*.

Ключевые слова: ген *TP53*, секвенирование; rs78378222; сигнал полиаденилирования; интронные мутации; диффузная В-крупноклеточная лимфома; потеря гетерозиготности

Для цитирования: Воропаева Е. Н., Пospelova Т. И., Воевода М. И., Максимов В. Н. Изменения в некодирующих последовательностях гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(3):239–249
doi: 10.25837/HAT.2019.35.62.003

Для корреспонденции: Воропаева Елена Николаевна, д. м. н., ст. н. с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ИЦИГ СО РАН. Электронная почта: vena.81@mail.ru

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2018

Принята к печати 15.10.2018

the prognosis of NetGene2, from intron replacements revealed by us in the group of patients, g.7675010C>A leads to the formation of an additional acceptor site for splicing, which may result in the incorporation of a part of the intron 5 into the mRNA sequence. In 5/9 cases of detection of rs78378222 in samples of tumor tissue of DLBCL, a homozygous minor genotype C/C was determined, which indicated the loss of heterozygosity in this locus, which contributes to a significant increase in malignant cell potential. **Conclusions.** Thus, the data obtained by us testify to the functional selection at the stages of the tumor progression of DLBCL changes not only in the coding but also introns and 3'-UTR *TP53* gene.

Key words: *TP53* gene; sequencing; rs78378222; polyadenylation signal; intron mutations; diffuse B-large cell lymphoma; loss of heterozygosity

For citation: Voropaeva E. N., Pospelova T. I., Voevoda M. I., Maksimov V. N. Changes in non-coding sequences of the *TP53* gene in diffuse large B-cell lymphoma. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(3):239–249 (in Russian)
doi: 10.25837/HAT.2019.35.62.003

For correspondence: Voropaeva Elena N., PhD, Senior Researcher, Laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases of Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630086, Novosibirsk, 630089, Novosibirsk, Russia. E-mail: vena.81@mail.ru

Information about authors:

Voropaeva E. N., <http://orcid.org/0000-0001-7542-7285>

Pospelova T. I., <http://orcid.org/0000-0002-1261-5470>

Voevoda M. I., <http://orcid.org/0000-0001-9425-413X>

Maksimov V. N., <https://orcid.org/0000-0002-7165-4496>

Financial disclosure. The study had no sponsorship.

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

Received 13 Jun 2018

Accepted 15 Oct 2018

Введение

Известно, что кодирующая часть человеческого генома составляет менее 2%. Оставшиеся 98% последовательности ДНК не несут информации о структуре белков [1]. По этой причине до последнего времени большинство исследователей пренебрегали данными, скрытыми в этой «темной материи» генома. В Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) перечислены только абберации в кодирующих последовательностях генов [2].

Существенный прогресс в понимании генетических событий, связанных с возникновением онкологических заболеваний, показал, что изменения генома

опухоли намного сложнее, чем предполагалось ранее. Этот прогресс в значительной степени стал возможен благодаря внедрению высокопроизводительных методов NGS («next generation sequencing» — секвенирование нового поколения), которые позволяют быстро получать данные о последовательности целых геномов опухолевых и нормальных клеток [3]. Анализ и структурирование получаемой в ходе данных работ информации координируется крупными международными консорциумами, такими как Cancer Genome Atlas (TCGA), нацеленным на анализ молекулярных профилей различных видов злокачественных опухолей [4],

и International Cancer Genome Consortium (ICGC), координирующим широкомасштабные исследования биологии злокачественных опухолей на геномном, эпигеномном и транскриптомном уровнях [5]. Было показано, что изменения, приводящие к появлению злокачественных новообразований, могут возникать за пределами кодирующей области, а именно в энхансерах, сайленсерах, промоторах, а также в 5'- и 3'-НТП.

Несмотря на то что молекулярные механизмы многих из этих изменений неизвестны, их патологические или физиологические эффекты до конца не ясны, появляющиеся в последние годы данные подтверждают их важное значение в развитии опухолей. Новые биомаркеры, расположенные в некодирующей части генома, наряду с возможной терапевтической ценностью могут быть использованы для диагностики, прогнозирования исхода и предсказания ответа опухолей на лечение [6]. Необходимы большие усилия для всестороннего выяснения роли этих изменений в онкогенезе.

Ген *TP53* (OMIM No. 191117), расположенный на хромосоме 17 (локус 7p13.1), является одним из наиболее изученных генов-супрессоров опухолевого роста. Он играет ключевую роль в контроле клеточного цикла, репарации ДНК, запуска апоптоза, механизмов старения и аутофагии [7].

Мутации *TP53* выявляются примерно в половине всех случаев злокачественных новообразований [8]. Подавляющее большинство работ, изучающих изменения в нуклеотидной последовательности гена *TP53*, было сосредоточено на анализе экзонов гена 5–8, кодирующих ДНК-связывающий домен белка p53 [9]. Некодирующие последовательности, которые могут влиять не только на сплайсинг мРНК, но и на экспрессию гена, нарушая ауторегуляцию процессинга, нормальное прохождение посттранскрипционных модификаций мРНК и посттрансляционных изменений белка, оставались за пределами внимания исследователей [9, 10].

База данных «IARC *TP53* mutation database», которая до настоящего времени является самой авторитетной базой соматических мутаций и мутаций зародышевой линии *TP53*, также не содержит информации об изменениях вне кодирующей последовательности гена [11, 12].

В литературе описано наличие в гене *TP53* функционально значимых интронных мутаций, что было показано в экспериментах *in vitro* и у больных неходжкинскими лимфомами [13–15]. Известны интронные мутации, которые приводят к появлению в результате альтернативного сплайсинга изоформ белка p53, отсутствующих в норме. Для данных изоформ характерны не только утрата транскрипционной активности и канонических функций опухолевого супрессора, но и появление способности придавать

несущим их клеткам высокий метастатический потенциал [16, 17].

Описано патогенетическое значение при онкологических заболеваниях нарушения регуляции 3'-НТП гена *TP53* белками и микро-РНК в результате одонуклеотидных замен [18, 19], которые могут оказывать прямое биологическое действие на созревание В-лимфоцитов и активизировать лимфоогенез [9, 20].

Одна из одонуклеотидных замен в 3'-НТП гена *TP53* зарегистрирована в базе dbSNP под номером rs78378222 [21]. Данный маркер приводит к изменению последовательности ААТААА, которая является сигналом к полиаденилированию гена *TP53*, на ААТАСА, что ведет к нарушению процессинга 3'-конца мРНК.

В экспериментах показано, что редкий аллель С rs78378222 в сравнении с аллелем А обеспечивает значительно меньший уровень экспрессии *TP53*, что приводит к снижению уровня индукции апоптоза в клетках под действием генотоксических факторов [20, 21]. В работе Li et al. rs78378222 впервые был описан в опухолевой ткани больных ДВККЛ [20].

Требуются дальнейшие исследования для определения количества, полного спектра изменений в некодирующих последовательностях гена *TP53* и определения их функциональных эффектов при ДВККЛ.

Целью данного исследования было выявить изменения в некодирующих участках *TP53* в опухолевой ткани ДВККЛ и провести прогнозирование возможных последствий этих изменений.

Материал и методы

Обследованная группа больных

В группу ДВККЛ вошли 92 человека (45 мужчин и 47 женщин) в возрасте от 21 до 78 лет (средний возраст $51,8 \pm 14,6$ года), госпитализированных в Городской гематологический центр г. Новосибирска за период 2012–2015 гг. У большинства обследованных (83%) были диагностированы поздние (III и IV) стадии заболевания, у двух третей больных прогноз был неблагоприятным по Международному прогностическому индексу.

Проведение исследования одобрено местным этическим комитетом. Все больные подписали информированное согласие на включение в исследование.

Секвенирование последовательности гена *TP53*

Геномную ДНК выделяли из парафиновых блоков биоптатов опухолевых лимфоузлов и экстранодальных очагов поражения методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. Использовали срезы ткани, содержащие не менее 80–90% опухолевых клеток.

Методом прямого капиллярного секвенирования по Сенгеру определяли нуклеотидную последовательность кодирующей области гена *TP53* (экзоны 5–10) и

примыкающих участков интронов по протоколу IARC (обновление 2010 г.) [22].

Анализ результатов секвенирования и выравнивание фрагментов осуществляли с помощью программ Chromas, SeqScape v.2.7, Sequence Scanner. В качестве референсной использовалась последовательность гена *TP53* NG_017013.

Теоретическое прогнозирование возможных последствий обнаруженных интронных мутаций проводилось с помощью программы NetGene2, которая, согласно заявленным характеристикам, по точности анализа достоверно выше, чем подходы, ранее описанные в литературе [23].

Анализ сигнала полиаденилирования гена *TP53*

Генотипирование rs78378222 в 3'-НТП гена *TP53* проводили по методике, описанной ранее [24]. Для подтверждения наличия редкого аллеля С выполняли прямое секвенирование по Сенгеру фрагмента 3'-НТП гена *TP53*, содержащего rs78378222, с применением тех же праймеров, что и для генотипирования маркера.

Результаты исследования

Анализ интронных мутаций гена *TP53*

По методологическим причинам (сильная фрагментация и деградация ДНК под действием формалина) секвенирование кодирующей последовательности экзонов 5—10 и примыкающих участков интронов гена *TP53* было выполнено в 74 из 92 образцов.

В опухолевом материале от 74 больных ДВККЛ выявлены 33 мутации гена *TP53*: 21 в кодирующей области и 12 — в интронных участках. К нарушению сплайсинга мРНК и к сдвигу рамки считывания приводили по одной мутации (3%), 11 (33%) были интронными мутациями, 12 (37%) — миссенс-мутациями, шесть (18%) — синонимичными мутациями, две (6%) — нонсенс-мутациями. У четырех больных (6,8%) обнаружены множественные мутации.

Подробная характеристика мутаций, выявленных в кодирующей последовательности гена *TP53*, была приведена в наших предыдущих публикациях [25, 26]. В настоящей работе анализируются интронные изменения (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика интронных мутаций, выявленных в гене *TP53*
Table 1. Characteristic of intron *TP53* gene mutations

Позиция в геноме по NC_000017.11 <i>Position in genome, NC_000017.11</i>	Позиция в интроне <i>Position in intron</i>	ID мутации в базах данных <i>Mutation ID</i>	MAF	Эффект мутации <i>Mutation effect</i>	Сведения о мутациях по данным литературы <i>Literature data</i>	Ссылки Ref.
g.7675266A>G	IVS4-30T>C	—	—	—	—	—
g.7675010C>A	IVS5+43G>T	—	—	—	—	—
g.7674988A>G	IVS5-17T>C	—	—	—	—	—
g.7674326C>G	IVS6-36G>C	CS004882 в The Human Cancer Mutation Database; rs17880604 в dbSNP <i>CS004882 in the Human Cancer Mutation Database; rs17880604 in the dbSNP</i>	0,005	Влияние на сплайсинг <i>Splicing</i>	Мутация описана при семейных формах рака молочной железы, показана связь с риском рака предстательной железы и предрасположенностью к раку щитовидной железы <i>The mutation is described in familial breast cancer cases. An association with the risk of developing prostate cancer and a predisposition to thyroid cancer is shown</i>	[15, 21, 27, 33]
g.7674153C>G	IVS7+31 G>C	—	—	—	—	—
g.7673691 G>T	IVS8+10C>A	—	—	—	—	—
g.7673681 T>C	IVS8+20A>G	—	—	—	—	—
g.7673664 T>C	IVS8+37A>G	—	—	—	—	—
g.7673523A>G	IVS9+12T>C	rs1800899 в dbSNP <i>rs1800899 in the dbSNP</i>	0,016	Нет данных <i>No data</i>	Ассоциация с предрасположенностью к опухолям не доказана <i>Association with predisposition to tumors not proven</i>	[21]

MAF — частота редкого аллеля.
MAF — minor allele frequency.

Интронные мутации (рис. 1), выявленные в обследованной выборке больных ДВККЛ, были представлены как гомозиготными (g.7675266A>G, g.7675010C>A), так и гетерозиготными заменами (g.7674988A>G, g.7674326C>G, g.7674153C>G, g.7673691G>T, g.7673681T>C, g.7673664T>C и g.7673523A>G). Большинство их — 7 из 9 (77,8%) — представляло собой однонуклеотидные замены, отсутствующие в базах данных dbSNP и The Human Cancer Mutation Database. Исключение составили g.7674326C>G и g.7673523A>G. Кроме того, в базе данных dbSNP в позиции g.7675010 описана другая однонуклеотидная замена G>C (rs765032410, NC_000017.11:g.7675010C>G), однако ни популяционная частота редкого аллеля (minor allele frequency, MAF), ни клиническое значение rs765032410 не известны.

Частота редкого аллеля — однонуклеотидной замены g.7673523A>G (rs1800899 по базе данных dbSNP) в *TP53* составляет 0,016, поэтому она может быть отнесена к конституциональным полиморфизмам гена.

Единственная выявленная в обследованной выборке больных ДВККЛ интронная мутация, имеющая доказанную биологическую значимость по данным литературы, — это g.7674326C>G. Замена расположена в интроне 6 гена *TP53*. Согласно данным The Human Cancer Mutation Database, она относится к изменениям, влияющим на сплайсинг [27].

Для прогноза возможных последствий остальных интронных замен, выявленных в обследованной группе, потребовалось привлечение биоинформационного анализа. Использованный подход основан на распознавании трех участков будущей пре-мРНК:

5' сайта сплайсинга (AGGURAGU донорный сайт), сайта ветвления (CTRAYY) и 3' сайта сплайсинга (YYYYYYNCAAG акцепторный сайт).

Использованная в данном исследовании программа NetGene2 методом нейронных сетей осуществляет поиск переходных областей между интронами и экзонами для предсказания местоположения сайтов сплайсинга в пре-мРНК человека [23].

Согласно прогнозу NetGene2, из выявленных в группе больных ДВККЛ интронных замен g.7675010C>A приводит к образованию дополнительного акцепторного сайта сплайсинга, который отсутствует в норме, что может приводить к включению в последовательность м-РНК части интрона 5. Транскрипция и трансляция в норме и при мутации g.7675010C>A в гене *TP53* схематически показана на рис. 2.

Анализ rs78378222 3'-НТП гена *TP53*

При генотипировании 92 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани больных ДВККЛ, частота выявления rs78378222 составила 9 из 92 (9,8%).

У ряда больных обнаружили минорный аллель С в гомозиготном состоянии (рис. 3). Частый гомозиготный генотип А/А был выявлен у 83 обследованных (90,2%), гетерозиготный генотип А/С — у 4 (4,3%) и гомозиготный минорный генотип С/С — у 5 (5,5%) обследованных.

Чтобы подтвердить наличие редкого аллеля маркера, было выполнено прямое секвенирование по Сенгеру фрагмента 3'-НТП гена *TP53*, содержащего rs78378222, для 9 образцов ДНК из опухолевой ткани ДВККЛ. Результаты секвенирования приведены в табл. 2.

Рисунок 1. Результаты секвенирования:

А — g.7675266A>G, Б — g.7675010C>A, В — g.7674988A>G, Г — g.7674326C>G, Д — g.7674153C>G, Е — g.7673691G>T, Ж — g.7673681T>C, З — g.7673664T>C, И — g.7673523A>G.

Figure 1. Sequencing results: А — g.7675266A>G, В — g.7675010C>A, С — g.7674988A>G, Д — g.7674326C>G, Е — g.7674153C>G, F — g.7673691G>T, G — g.7673681T>C, H — g.7673664T>C, I — g.7673523A>G.

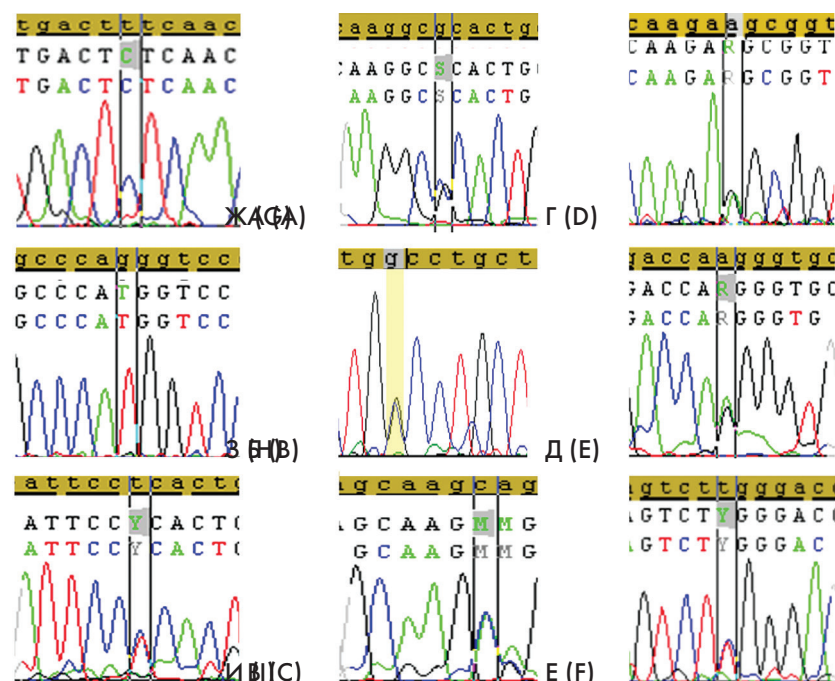




Рисунок 2. Транскрипция и трансляция в норме (А) и при мутации g.7675010C>A в гене TP53 (Б). В последовательности гена заглавные буквы — кодирующие участки, строчные — интрон 5, подчеркиванием отмечена часть интрона 5, включаемая в мРНК.

Figure 2. Transcription and translation are normal (A) and with the mutation g.7675010C>A in the TP53 gene (B). In the gene sequence, capital letters are the coding regions, lowercase letters are intron 5, underscore is marked included in mRNA part of intron 5.

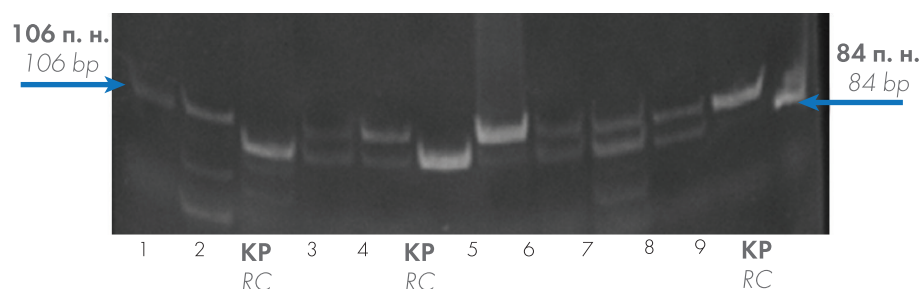


Рисунок 3. Результаты генотипирования rs78378222 методом ПЦР с анализом ПДРФ образцов опухолевой ткани больных ДВККЛ, имеющих редкий аллель C: 1–9 — номера случаев; KP — контроль рестрикции; 106 + 84 п. н. (генотип A/C); 84 п. н. (генотип A/A); 106 п. н. (генотип C/C).

Figure 3. The results of rs78378222 genotyping by PCR with the analysis of RFLP of tumor tissue samples of patients with DLBCL with rare allele C: 1–9 are the numbers of cases; RC — restriction control; 106 + 84 bp (genotype A/C); 84 bp (genotype A/A); 106 bp (genotype C/C).

На рис. 4 приведена полученная при секвенировании последовательность rs78378222 фрагмента 3'-НТП гена TP53, где указана нормальная сигнальная последовательность, необходимая для полиаденилирования гена TP53. Поскольку для секвенирования данного фрагмента не разрабатывались отдельные праймеры, а были использованы праймеры с дизайном для анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ),

все нарабатанные в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) ампликоны содержали замену с.*1175A>G, искусственно введенную в дизайн обратного праймера для создания сайта рестрикции эндонуклеазы Hind III.

При анализе электрофореграмм обращали на себя внимание разные «дозы» аллелей маркера rs78378222 в геле, нашедшие свое отражение в результатах секвенирования данных проб (рис. 3 и табл. 2).

Таблица 2. Результаты секвенирования фрагмента 3'-НТП гена *TP53*, содержащей rs78378222
Table 2. Sequencing results of the 3'-untranslated sequence of the *TP53* gene containing rs78378222

Проба Case	Генотип Genotype		Фрагмент последовательности гена <i>TP53</i> Sequence of the <i>TP53</i> gene
	По данным ПЦР с анализом ПДРФ PCR-RFLP method	По данным секвенирования по Сенгеру Sanger sequencing	
C1	C/C	C/C	
C2	C/C	C/C	
C3	A/C	A/C	
C4	A/C с преобладанием аллеля C A/C predominance of allele C	A/C с преобладанием аллеля C A/C predominance of allele C	
C5	A/C с преобладанием аллеля C A/C predominance of allele C	C/C	
C6	A/C	A/C	
C7	A/C	A/C	
C8	A/C	A/C	
C9	A/C с преобладанием аллеля C A/C predominance of allele C	C/C	

C1—C9 — случаи выявления редкого аллеля rs78378222.

C1—C9 — cases of the rare allele rs78378222. RFLP — Restriction fragment length polymorphism.

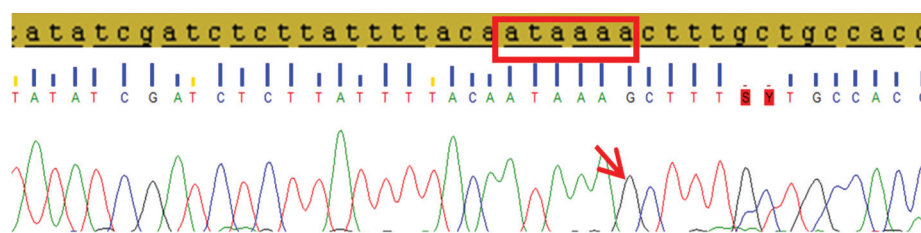


Рисунок 4. Секвенированный фрагмент 3'-НТП гена *TP53*, содержащий rs78378222: красным прямоугольником отмечена нормальная сигнальная последовательность сигнала полиадеилирования; стрелкой указана однонуклеотидная замена с.*1175A>G, являющаяся результатом введения сайта рестрикции в обратный праймер для ПДРФ-анализа.

Figure 4. A fragment of the 3'-untranslated sequence of the *TP53* gene containing rs78378222: the red rectangle indicates the normal signal sequence of the polyadenylation signal; the arrow indicates a single nucleotide substitution c.*1175A>G, which is the result of introducing a restriction site into the reverse primer for RFLP analysis.

Поскольку случаев обнаружения редкого гомозиготного генотипа С/С rs78378222 в крови больных ДВККЛ не было, а выделение ДНК из парафинизированных блоков проводилось из срезов с содержанием опухолевой ткани не менее 70—80%, полученные результаты свидетельствуют о потере гетерозиготности в данном локусе в опухолевой ткани ДВККЛ у больных 2, 4, 5 и 9. В перечисленных случаях имело место значимое преобладание редкого аллеля С на электрофореграммах, а пик, соответствующий ему на хроматограмме результатов секвенирования, по высоте не отличался от окружающих пиков. Аллель А в данных образцах обнаруживался в очень небольших количествах, и его источником могли быть клетки неопухового происхождения, находящиеся в срезе. По данным литературы, чувствительность обнаружения доли наименее представленного аллеля при секвенировании по Сенгеру составляет около 10% [28]. В лабораторной практике ввиду различного качества секвенирования нижняя граница обнаружения для наименее представленного аллеля методом секвенирования по Сенгеру может находиться в диапазоне 10—30% копий [29].

Обсуждение

На сегодняшний день описано около 20 000 типов миссенс-мутаций гена *TP53*, которые обеспечивают ту или иную степень подавления его функции и поэтому подвергаются селекции в клетках опухолей [30]. Поскольку некоторые мутации, возникающие в данном гене, связаны с развитием и прогрессированием ДВККЛ и могут быть обозначены как «драйверные», а некоторые не оказывают влияния на возникновение и рост опухоли, т. е. являются «мутациями-пассажирами» [9, 31], требовался анализ функциональной значимости каждой из выявленных в группе обследования aberrаций.

В настоящее время углубленный анализ результатов секвенирования вне кодирующих последовательностей гена *TP53* отсутствует, количество и функциональные эффекты выявляемых в них aberrаций

недооценены [1]. Для успешного решения данной задачи требуется разработка улучшенных методов анализа *in silico*.

Большинство потенциально значимых интронных замен расположены в непосредственной близости к границам экзон—интрон, где в норме находятся сайты сплайсинга, представляющие собой консервативные последовательности c/aAG|GURAGU у 5'-конца интрона и последовательность Py|lNYAG у 3'-конца интрона. Эффективное распознавание сайтов сплайсинга сплайсосомой зависит от сохранности его консервативной последовательности и последовательностей, которые его окружают, и является критически важным для правильного и упорядоченного удаления экзонов из пре-мРНК [32].

Описаны два типа мутаций в интронных последовательностях, влияющих на сплайсинг. Первый — это мутации в 5'- и 3'-сайтах сплайсинга, которые приводят к нарушению синтеза зрелой мРНК. Второй тип — мутации в интронах, приводящие к образованию нового криптоического сайта сплайсинга и синтезу неканонической мРНК [9]. Известны механизмы влияния на процессинг молекулы пре-мРНК изменений, расположенных в глубине интронных регионов. В частности, мутации в интронах способны создавать новые сайты сплайсинга, которые, конкурируя с исходными сайтами, нарушают процесс сплайсинга мРНК [9].

Анализ интронных мутаций и прогнозирование донорных и акцепторных сайтов в генах человека с помощью анализа *in silico* длительное время были затруднены [32]. В настоящее время разработаны усовершенствованные методы, которые позволяют надежно предсказать патогенные интронные мутации, влияющие на сплайсинг [9].

Согласно прогнозу программы NetGene2, из выявленных в настоящей работе у группы больных ДВККЛ интронных мутаций гена *TP53*, g.7675010C>A приводит к образованию дополнительного акцепторного сайта сплайсинга, который отсутствует в норме. Это в свою очередь ведет к включению в последовательность

мРНК части интрона 5, преждевременному образованию стоп-кодона в положении 189 и синтезу укороченного варианта белка p53, лишённого функциональной активности (рис. 2).

При анализе программой NetGene2 других интронных замен в гене *TP53*, выявленных в опухолевой ткани больных ДВККЛ, данных о патогенности получено не было.

В отношении еще одной выявленной в опухолевой ткани ДВККЛ мутации — g.7674326C>G — в эксперименте *in vitro* показано, что в отсутствие изменений в кодирующей последовательности гена она приводит к выживанию клеток в условиях химиотерапии и длительно ингибирует апоптоз [15].

Хотя замена g.7674326C>G расположена далеко от границы экзон—интрон, где в норме находится сайт сплайсинга, описаны другие механизмы влияния изменений нуклеотидной последовательности в некодирующих регионах на процессинг молекулы пре-мРНК. В частности, мутации в интронах способны создавать новые сайты сплайсинга, которые, конкурируя с исходными сайтами, нарушают сплайсинг канонической мРНК [9].

Согласно данным литературы [15, 27, 33], замена g.7674326C>G связана с семейными формами рака молочной железы, риском рака предстательной железы и предрасположенностью к раку щитовидной железы у детей.

Отдельно также следует отметить замену g.7675266A>G, поскольку в интроне 4 гена *TP53* расположен альтернативный промотор гена, участвующий в синтезе изоформы delta133 [34], которая в норме экспрессируется в лимфоидной ткани [35]. Однако на данный момент оценить ее влияние на транскрипцию гена не представляется возможным.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что интронные последовательности гена *TP53* при ДВККЛ также подвержены мутациям, способствующим опухолевому росту.

В работе Li et al. [20] на примере ДНК больных ДВККЛ впервые было показано, что мутации в 3'-НТП данного гена — распространенное явление в опухоли. По данным авторов, мутации в 3'-НТП гена *TP53* имели большинство больных ДВККЛ, почти все выявленные замены были расположены в подтвержденных ранее или предполагаемых по данным анализа *in silico* сайтах связывания микро-РНК.

В настоящей работе был исследован rs78378222 — маркер 3'-НТП гена *TP53*, приводящий к нарушению нормальной сигнальной последовательности для полиаденилирования гена.

Значимость данного маркера подтверждается строгим эволюционным закреплением сигнала полиаденилирования гена *TP53*, что показано при исследовании генома 63 видов млекопитающих, а также древней ДНК. Поскольку ни один из исследованных образцов

ДНК не имел изменений в локусе rs78378222, было доказано, что данный маркер находится под действием отрицательного естественного отбора [36]. Частота аллеля С rs78378222 гена *TP53* в европейской популяции составляет около 1% [37].

Многие годы в исследованиях «случай — контроль», целью которых являлось обнаружение полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием опухолей, изучались маркеры с частотой редкого аллеля 5% и более. Это было вызвано небольшими размерами анализируемых выборок и невозможностью достичь достаточной статистической мощности исследования при изучении менее распространенных вариантов.

Gorlov et al. проанализировали данные International HapMap Project, ENCODE и SeattleSNPs project, где накапливается информация о вариативности генома человека, и пришли к заключению, что не частые, а именно редкие полиморфизмы генов являются основными факторами, способствующими восприимчивости к распространенным заболеваниям, в том числе злокачественным новообразованиям [38]. Поскольку гены-онкосупрессоры и проонкогены играют важную роль в контроле клеточного цикла, апоптоза, ангиогенеза, дифференцировки клеток, функционально значимые изменения в них находятся под давлением «очищающего» отбора. Следовательно, ожидается, что полиморфизмы, способствующие опухолевому росту, будут встречаться в популяции с низкой частотой [38].

По данным полногеномного исследования ассоциаций (genome-wide association study), редкий аллель rs78378222 ассоциирован с различными видами опухолей: рак предстательной железы, глиома, рак пищевода и прямой кишки [20, 21, 39, 40]. Из миллионов полиморфизмов в геноме человека у rs78378222 наиболее сильная ассоциация с базальноклеточным раком [41].

Wang et al. провели первый метаанализ ассоциации редкого аллеля данного маркера с риском развития опухолей. В исследование были включены 34 работы с общей численностью 36 599 больных различными типами злокачественных опухолей и 91 272 относительно здоровых лиц контрольной выборки. Результаты показали, что аллель С rs78378222 является мощным фактором риска опухолей у человека [42].

В литературе имеются сообщения о колебаниях частоты выявления rs78378222 в различных исследованиях: от отсутствия данного маркера в общей популяции до обнаружения его с частотой 3—6% среди онкологических больных [24, 43].

Вместе с тем ни в одном из опубликованных в настоящее время исследований редкий аллель С rs78378222 в здоровой ткани не встречался в гомозиготном состоянии [21].

В исследованной в настоящей работе выборке больных ДВККЛ 5 из 9 образцов опухолевой ткани имели

гомозиготный минорный генотип C/C rs78378222, что свидетельствовало о потере гетерозиготности в данном локусе. Только в двух из этих случаев были выявлены дополнительные мутации гена, имеющие доказанный онкогенный потенциал (p.R196Q и g.7674326C>G). В трех случаях потеря гетерозиготности была единственной aberrацией в последовательности *TP53*.

Биологическая целесообразность потери гетерозиготности в гене *TP53* в опухолевой ткани ДВККЛ у лиц с редким аллелем C rs78378222 может заключаться в следующем. Замена rs78378222 представляет собой уникальный аллельный вариант *TP53*, приводящий к снижению функции p53 [20, 21], а утрата функции гена в случае потери нормального аллеля A способствует значительному приросту злокачественного потенциала клеток.

В клетках, несущих rs78378222, анализом посредством нозерн-блоттинга было подтверждено снижение уровня мРНК в сравнении с клетками без данного полиморфизма и наличием другого, рядом расположенного маркера rs114831472. В случае обнаружения редкого аллеля C данного маркера уровень клеточного апоптоза также был ниже в сравнении с клетками, несущими ген *TP53* дикого типа. Эти данные показывают, что полиморфизм rs78378222 в гене *TP53* нарушает экспрессию p53 и угнетает апоптоз [20].

Предполагается также, что rs78378222 может нарушать связывание miR-545 с 3'-НТП *TP53* [34]. Поскольку сайты связывания микро-РНК расположены преимущественно на 3'-НТП генов, наследуемые варианты 3'-НТП гена *TP53* могут значительно влиять на экспрессию гена путем отмены, ослабления или создания нового сайта связывания.

Wang et al. провели интегративный анализ данных Атласа генома рака (Cancer Genome Atlas, TCGA) для двух видов опухолей: глиобластомы и аденокарциномы легкого [44]. Используя данные секвенирования мРНК гена *TP53*, авторы установили, что транскрипты гена, несущие редкий аллель C rs78378222, приблизительно на 3 кб длиннее, чем транскрипты с аллелем A, что препятствовало синтезу полноценного белка p53.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о необходимости анализа всех выявленных в ходе секвенирования изменений, поскольку на этапах опухолевой прогрессии ДВККЛ может происходить функциональная селекция изменений не только в экзонах 5–8, но и в интронах и 3'-НТП гена *TP53*.

Информация об авторах

Воропаева Елена Николаевна (Voropaeva E. N.), доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ИЦИГ СО РАН г. Новосибирск, vena.81@mail.ru

Поспелова Татьяна Ивановна (Pospelova T. I.), доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ Новосибирского государственного медицинского университета, post_gem@mail.ru

Воевода Михаил Иванович (Voevoda M. I.), член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ИЦИГ СО РАН г. Новосибирск, office@iimed.ru

Максимов Владимир Николаевич (Maximov V. N.), доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов исследования терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ИЦИГ СО РАН г. Новосибирск, medik11@mail.ru

Литература

25. Воропаева ЕН, Поспелова ТИ, Воевода МИ, Максимов ВН. Сравнительный анализ мутаций в гене TP53 у больных ДВККЛ г. Новосибирска с данными, представленными в IARC TP53 mutation database. Медицинская генетика. 2016;15:17–20.

Остальные источники см. в References.

Reference

- Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W. Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. Nat Genet. 2014;46:1160–165.
- Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J et al. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Curr Prot Human Genet. 2008; Chapter 10, Unit 10.11.
- Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Dobson JR, Eldridge JV, Thomas JL et al. Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes. Nat Genet. 2015;47:106–14.
- Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KM, Ozenberger BA, Ellrott K et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer Analysis Project. Nat Genet. 2016;45:1113–20.
- International Cancer Genome Consortium. International network of cancer genome projects. Nature. 2010;464:993–8.
- Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, Snyder M, Gerstein MB. Annotating non-coding regions of the genome. Nat Rev Genet. 2010;11:559–71.
- Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, Orlowski RZ, Andreeff M, Bueso-Ramos CE et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. Blood. 2012;119:3668–3.
- Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, Monti P, Inga A, Fronza G et al. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. Nucl Acids Res. 2013;41:D962–D969.
- Diederichs S, Bartsch L, Berkman JC, Froese K, Heitmann J, Hoppe C et al. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. EMBO Mol Med. 2016;8:442–57.
- Enomoto Y, Kitaura J, Hatakeyama K, Watanuki J, Akasaka T, Kato N et al. Emu/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. Leukemia. 2011;25:1849–56.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and

tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007;28:622–9.

12. Edlund K, Larsson O, Ameer A, Bunikis I, Gyllenstein U, Leroy B et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:9551–6.

13. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI, Maksimov VN. Intronic polymorphisms of antionkogene TP53 in patients of the aged group with indolent variants of non-Hodgkin malignant lymphomas. *Advances in Gerontology.* 2013;2:61–5.

14. Voropaeva EN, Voevoda MI, Maksimov VN, Pospelova TI. Linkage disequilibrium and haplotypes of the rs1042522, rs1625895, and rs1787862 markers of TP53 in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Molecular Biology.* 2014;48:664–70.

15. Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, Bishop LR, Gumbs AA, Krishnan S et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Research.* 2000;60:1062–9.

16. Charbonneau B, Maurer MJ, Fredericksen ZS, Zent CS, Link BK, Novak AJ et al. Germline variation in complement genes and event-free survival in Follicular and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Hematol.* 2012;87:880–5.

17. Senturk S, Yao Z, Camiola M, Stiles B, Rathod T, Walsh AM et al. P53 Ψ is a transcriptionally inactive p53 isoform able to reprogram cells toward a metastatic-like state. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E3287–96.

18. Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell.* 2009;138:673–84.

19. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 2009;10:704–14.

20. Li Y, Gordon MW, Xu-Monette ZY, Visco C, Tzankov A, Zou D et al. Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood.* 2013;121:4529–40.

21. Stacey SN, Sulem P, Jonasdottir A, Masson G, Gudmundsson J, Gudbjartsson DF et al. A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nature Genetics.* 2011;43:1098–103.

22. <http://p53.iarc.fr/ProtocolsAndTools.aspx>

23. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *JMB.* 1991;220:49–65.

24. Zhou L, Yuan Q, Yang M. A functional germline variant in the P53 polyadenylation signal and risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Gene.* 2012;506:295–7.

25. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI, Maksimov VN. Comparative analysis of TP53 gene mutations in patients with DLBCL in Novosibirsk and the data represented in IARC TP53 mutation database. *Mesical genetics (Medicinskaya genetika).* 2016;15:17–20 (in Russian).

26. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI, Maksimov VN. Frequency, spectrum, and functional significance of TP53 mutations in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Molecular Biology.* 2017;51:53–60.

27. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>

28. Klutsch CF, Seppala EH, Uhlen M, Lohi H, Savolainen P. Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA

studied systematically in deep generation pedigrees. *Int J Legal Med.* 2011;125:527–35.

29. McCormick E, Place E, Falk M. Molecular genetic testing for mitochondrial disease: from one generation to the next. *Neurotherapeutics.* 2013;10:251–61.

30. Caminsky N, Mucaki EJ, Rogan PK. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Res.* 2014;3:282.

31. Adjiri A. DNA mutations may not be the cause of cancer. *Oncol Ther.* 2017;5:85–101.

32. Yabas M, Elliott H, Hoyne GF. The role of alternative splicing in the control of immune homeostasis and cellular differentiation. *Int J Mol Sci.* 2015;17:pii:E3.

33. Hillebrandt S, Streffer C, Demidchik EP, Biko J, Reiners C. Polymorphisms in the p53 gene in thyroid tumors and blood samples of children from areas in Belarus. *Mutat Res.* 1997;381:201–7.

34. Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ.* 2011;18:1815–24.

35. Chumakov PM. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc).* 2007;72:1399–421.

36. Macedo GS, Araujo Vieira I, Brandalize AP, Giacomazzi J, Inez Ramiro E, Volc S et al. Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3'UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics.* 2016;209:97–106.

37. Enciso-Mora V, Hosking FJ, Di Stefano AL, Zelenika D, Shete S, Broderick P et al. Low penetrance susceptibility to glioma is caused by the TP53 variant rs78378222. *Br J Cancer.* 2013;108:2178–85.

38. Gorlov IP, Gorlova OY, Sunyaev SR, Spitz MR, Amos CI. Shifting paradigm of association studies: value of rare single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2008;82:100–12.

39. Egan KM, Nabors LB, Olson JJ, Monteiro AN, Browning JE, Madden MH et al. Rare TP53 genetic variant associated with glioma risk and outcome. *J Med Genet.* 2012;49:420–1.

40. Zhou L, Yuan Q, Yang M. A functional germline variant in the P53 polyadenylation signal and risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Gene.* 2012;506:295–7.

41. Diskin SJ, Capasso M, Diamond M, Oldridge DA, Conkrite K, Bosse KR et al. Rare variants in TP53 and susceptibility to neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106:dju047.

42. Wang Y, Wu XS, He J, Ma T, Lei W, Shen ZY. A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancer susceptibility: Evidence from a meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7:32854–65.

43. Rao AK, Vinothkumar V, Revathidevi S, Arunkumar G, Manikandan M, Arun K et al. Absence of TP53 Poly-A signal sequence variant rs78378222 in oral, cervical and breast cancers of South India. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:9555–6.

44. Wang Z, Rajaraman P, Melin BS, Chung CC, Zhang W, McKean-Cowdin R et al. Confirmation of germline glioma risk variant rs78378222 in TP53 and its implication in tumor tissues via integrative analysis of TCGA data. *Hum Mutat.* 2015;36:684–8.