

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.11.62-66>

Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена TP53 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Воропаева Е.Н.¹, Поспелова Т.И.², Чуркина М.И.², Гуражева А.А.¹, Воевода М.И.¹, Максимов В.Н.¹

1 – Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» 630089, г. Новосибирск, Россия, ул. Б. Богаткова, 175/1

2 – ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России 630091, г. Новосибирск, Россия, Красный проспект, 52

Актуальность. Сравнение экспрессии микроРНК в опухолевой ткани лимфом и нормальной лимфоидной ткани выявило снижение уровня экспрессии ряда p53-индуцируемых онкосупрессорных молекул, таких как микроРНК-34а, микроРНК-34b/c, микроРНК-129 и микроРНК-203, которое помимо мутаций в гене TP53 может быть вызвано aberrациями в участках генома, кодирующих сами микроРНК.

Цель. Провести комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК MIR-34A, MIR-34B/C, MIR-203 и MIR-129-2 и мутаций гена TP53 при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ).

Методы. Проанализировано 73 образца ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ. Методом капиллярного прямого секвенирования по Сэнгеру определена нуклеотидная последовательность ДНК-связывающего домена гена TP53. Определение статуса метилирования осуществляли методами метил-специфичной ПЦР (для MIR-203 и MIR-129-2) и метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения (для MIR-34A и MIR-34B/C) с применением ДНК, подвергшейся обработке бисульфитом натрия.

Результаты. Частота метилирования генов MIR-34A, MIR-34B/C, MIR-203 и MIR-129-2 и мутации в гене TP53 составила 27%, 62%, 66%, 67% и 25%, соответственно. Метилирование анализируемых генов p53-респонзивных микроРНК и мутации в гене TP53 в опухолевой ткани ДВККЛ у большей части пациентов имели тенденцию к взаимному исключению. Показана значимая ассоциация ($p < 0,05$) между метилированием генов MIR-203, MIR-129-2 и MIR-34B/C, а также парой MIR-34B/C и MIR-34A. В 14% случаев имело место метилирование всех 4, а в 47% – 3 проанализированных генов.

Выводы. Наряду с мутациями в гене TP53, aberrантное метилирование может являться самостоятельной причиной снижения экспрессии микроРНК-34а, микроРНК-34b/c, микроРНК-129 и микроРНК-203. Метилирование генов MIR-34A, MIR-34B/C, MIR-203 и MIR-129-2 в опухолевой ткани ДВККЛ в большинстве случаев носит сочетанный характер.

Ключевые слова: ген TP53, микроРНК, метилирование, микроРНК-34а, микроРНК-34b/c, микроРНК-129, микроРНК-203, лимфома.

Для цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И., Гуражева А.А., Воевода М.И., Максимов В.Н. Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена TP53 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. *Медицинская генетика* 2022; 21(11): 62-66.

Автор для корреспонденции: Воропаева Е.Н.; e-mail: vena.81@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00222.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.10.2022

Complex analysis of p53-responsive microRNA genes methylation and TP53 gene mutations in Diffuse Large B-cell Lymphoma

Voropaeva E.N.¹, Pospelova T.I.², Churkina M.I.², Gurazheva A.A.¹, Voevoda M.I.¹, Maximov V.N.¹

1 – Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the «Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences» 175/1, B. Bogatkova st., Novosibirsk, 630089, Russian Federation

2 – Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Relevance. Comparison of microRNA expression in lymphoma and normal lymphoid tissue revealed a decrease in the expression level of a number of p53-induced oncosuppressive molecules, such as miR-34a, miR-34b/c, miR-129 and miR-203, which, in addition to mutations in the TP53 gene, can be caused by aberrations in the genome regions encoding the microRNAs themselves.

Purpose. To carry out a comprehensive analysis of the p53-responsive microRNAs genes MIR-34A, MIR-34B/C, MIR-203 and MIR-129-2 methylation and mutations of the TP53 gene in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

Methods. 73 samples of DNA isolated from tumor tissue of patients with DLBCL were analyzed. The nucleotide sequence of the *TP53* gene DNA-binding domain was determined by capillary direct Sanger sequencing. The methylation status was determined by methyl-specific PCR (for *MIR-203* and *MIR-129-2*) and methyl-sensitive analysis of high-resolution melting curves (for *MIR-34A* and *MIR-34B/C*) using DNA treated with sodium bisulfite.

Results. The frequency of *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* and *MIR-129-2* genes methylation and *TP53* gene mutations was 27%, 62%, 66%, 67% and 25%, respectively. Methylation of the analyzed genes of p53-responsive microRNAs and mutations in the *TP53* gene in the tumor tissue of DLBCL in the most patients tended to mutual exclusion. A significant association ($p < 0.05$) was shown between the methylation of the *MIR-203*, *MIR-129-2* and *MIR-34B/C* genes, as well as the *MIR-34B/C* and *MIR-34A* pair. In 14% and 47% of DLBCL cases all four genes and three of the analyzed genes were methylated, respectively.

Conclusions. Along with mutations in the *TP53* gene aberrant methylation may be an independent cause of decreased miR-34a, miR-34b/c, miR-129 and miR-203 expression. Methylation of the *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* and *MIR-129-2* genes in the tumor tissue of DLBCL in most cases is of a combined nature.

Keywords: *TP53* gene, microRNA, methylation, miR-34a, miR-34b/c, miR-129, miR-203, лимфомаю

For citation: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I., Gurazheva A.A., Voevoda M.I., Maximov V.N. Complex analysis of p53-responsive microRNA genes methylation and *TP53* gene mutations in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(11): 62-66. (In Russ.)

Corresponding author: Voropaeva E.N., e-mail: vena.81@mail.ru

Funding. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 22-25-00222.

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

Accepted: 20.10.2022

Введение

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является наиболее распространенным типом агрессивных неходжкинских злокачественных лимфом, молекулярно-генетические механизмы формирования и опухолевой прогрессии которых активно изучаются.

Сравнение экспрессии микроРНК в опухолевой ткани лимфом и нормальной лимфоидной ткани выявило снижение уровня экспрессии ряда p53-индуцируемых онкосупрессорных микроРНК, таких как микроРНК-34a, микроРНК-34b/c, микроРНК-129 и микроРНК-203 [1, 2]. В кодирующих их генах расположены p53-респонзивные элементы, связываясь с которыми белок индуцирует их транскрипцию [3, 4]. В регуляции экспрессии микроРНК-203 p53 участвует путем ускорения процессинга [4].

Мутации в гене *TP53*, ответственном за синтез белка p53, при злокачественных новообразованиях человека в 95-98% случаев находятся в ДНК-связывающем домене (экзоны с 5 по 8), который контактирует с ДНК и позволяет активировать гены-мишени. Недавно появились данные о том, что транскрипционно неактивные мутантные варианты p53 препятствуют функциональной сборке комплекса с Drosha, играющего основную роль в инициации процессинга микроРНК в ядре. В частности, мутации в «горячих» точках p.R175H и p.R273H коррелируют с крайне низкой активностью Drosha [5].

Большинство генов микро-РНК обнаружено в CpG-богатых регионах, и aberrантное метилирование может иметь важное значение в нарушении их экспрес-

сии при опухолях [3, 4]. Знания об участии микроРНК в лимфомогенезе накапливаются быстрыми темпами, однако данные по частоте и спектру метилирования кодирующих их генов при лимфомах весьма скудные.

Цель: провести комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* и мутаций гена *TP53* при ДВККЛ.

Методы

Проанализировано 73 образца ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ. Среди пациентов было 36 мужчин и 37 женщин, средний возраст составил $53,7 \pm 15,2$ лет. Методом капиллярного прямого секвенирования по Сэнгеру на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer определена нуклеотидная последовательность *TP53* (экзоны 5–10). Бисульфитную конверсию выделенной ДНК проводили с применением наборов EZ DNA Methylation-Gold Kit. Определение статуса метилирования гена осуществляли методами метил-специфичной ПЦР (*MIR-203* и *MIR-129-2*) и метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения (*MIR-34A* и *MIR-34B/C*). Для контроля полноты конверсии применялся набор Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (рис. 1).

Количественный анализ сочетанного выявления метилирования изученных генов и мутационного статуса *TP53* проводился путем вычисления Log2 Odds

Ratio и одностороннего точного критерия Фишера (p-value) с поправкой на множественность сравнений с помощью процедуры Бенджамини – Хохберга (q-value). С помощью онлайн-сервиса OncoPrinter [6] была получена картина сочетанного выявления изучаемых aberrаций.

Результаты

Частота метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в опухолевой ткани ДВККЛ составила 27%, 62%, 66% и 67%, соответственно. Мутации в исследованной кодирующей части гена *TP53* имели четверть (25%) больных: 8 случаев в 5-м, по 4 – в 6-м и 8-м и 2 – в 7-м экзонах.

Совместное выявление метилирования генов микроРНК и мутаций *TP53* для каждого из исследованных образцов представлено на **рис. 2**.

Анализ сочетанности изучаемых aberrаций показал наличие значимой ассоциации между метилированием ряда изученных генов, а именно *MIR-203*, *MIR-129-2* и *MIR-34B/C*, а также парой *MIR-34B/C* и *MIR-34A*. В 10/73 (14%) случаев имело место метилирование всех 4, а в 34/73 (47%) – 3 из проанализированных генов (**таблица**).

Вместе с тем, метилирование анализируемых генов p53-респонзивных микроРНК и мутации в гене *TP53* в опухолевой ткани ДВККЛ у большей части пациентов, напротив, имели тенденцию к взаимному исключению (**таблица**).

Обсуждение

Растущее количество исследований показывает важность взаимодействия между генами микроРНК и транскрипционными факторами, участвующими в определе-

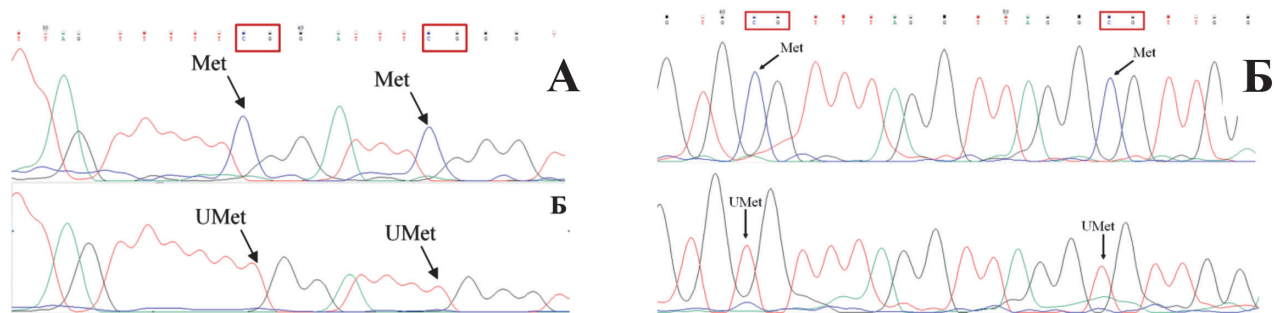


Рис. 1. Фрагменты хроматограмм бисульфитного сиквенса CpG-островков генов *MIR-34A* (А) и *MIR-203* (Б): Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды.

Fig. 1. Chromatogram fragments of the bisulfite sequence of the CpG islands of the *MIR-34A* (A) and *MIR-203* (B) genes: Met is cytosine in the methylated state, UMet is thymine in place of cytosine in the unmethylated state, CpG dinucleotides are highlighted in red.

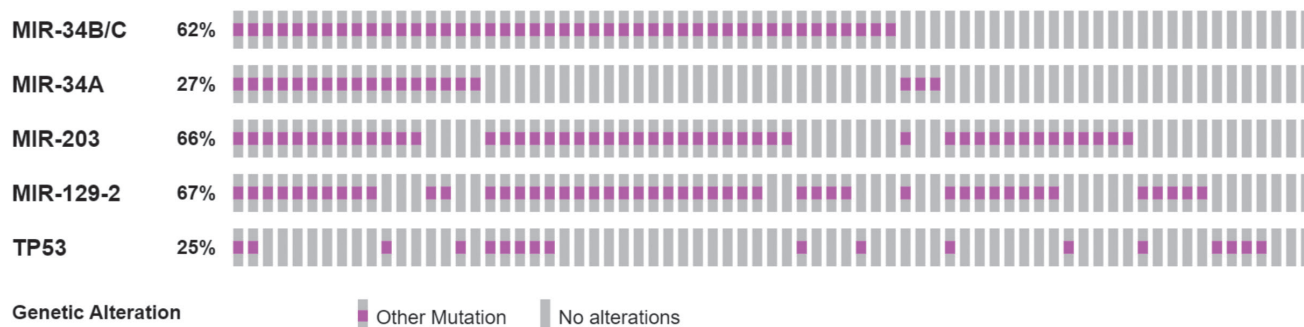


Рис. 2. Совместное выявление метилирования генов микроРНК и мутаций гена *TP53* в группе исследования.

Fig. 2. Joint detection of miRNA gene methylation and *TP53* gene mutations in the study group.

нии судьбы клетки, включая хорошо известный «храни- тель генома» белок p53 [7]. Известно, что индуцируемые белком p53 онкосупрессорные микроРНК имеют важную роль в работе иммунной системы, начиная от поддержа- ния пула стволовых кроветворных клеток и заканчивая созреванием и функционированием в ходе нормального иммунного ответа Т- и В-лимфоцитов [8].

Изменение уровня микроРНК в клетках может быть вызвано различными механизмами. В случае p53-индуцируемых микроРНК помимо мутаций в гене TP53 снижение их экспрессии могут вызывать му- тации в предшественниках и ключевых последователь- ностях зрелых молекул, а также делеция участка хромо- сомы или aberrантное метилирование ДНК.

В данной работе на выборке образцов ДНК, выде- ленной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, вы- полнен комплексный анализ метилирования генов ми- кроРНК-34а, микроРНК-34b/c, микроРНК-129 и ми- кроРНК-203 и мутационного статуса гена TP53. Было показано, что хотя в ряде случаев метилирование MIR-203, MIR-129-2, MIR-34B/C и MIR-34A и мутационный статус TP53 в опухолевой ткани ДВККЛ сочетаются, aberrантное метилирование может являться самостоя- тельной причиной снижения экспрессии микроРНК-34а, микроРНК-34b/c, микроРНК-129 и микроРНК-203.

Было показано, что aberrантное метилирование ге- нов MIR-34A, MIR-34B/C, MIR-203 и MIR-129-2 явля- ется частым и комплексным процессом при ДВККЛ, что может быть причиной снижения экспрессии в опу- холевой ткани лимфомы сразу нескольких микроРНК.

Можно предположить, что сочетанное метилиро- вание MIR-203, MIR-129-2 и MIR-34B/C, а также пары MIR-34B/C и MIR-34A потенциально имеет более выра- женный про-опухолевый эффект за счет наличия у ко- дируемых ими микроРНК общих мишеней [3, 4]. На- пример, на мРНК циклинкиназ CDK4 и CDK6 и ан- тиапоптотических белков BCL2 и MCL1 нацелены как микроРНК семейства miR-34, так и микроРНК-129 и микроРНК-203 (рис. 3).

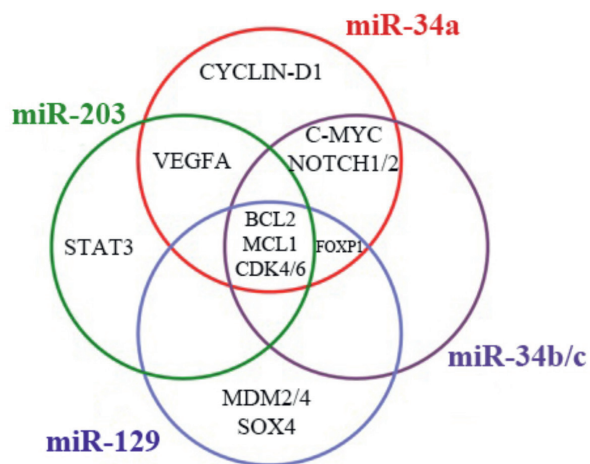


Рис. 3. Общие мишени p53-респонзивных микроРНК микроРНК-34а, микроРНК-34b/c, микроРНК-129 и микроРНК-203.

Fig. 3. Common targets of p53-responsive miRNAs miRNA-34a, miRNA-34b/c, miRNA-129 and miRNA-203.

Связь между метилированием генов p53-респонзивных микроРНК и мутациями гена TP53

Relationship between p53-responsive miRNA genes methylation and mutations in the TP53 gene

Ген 1	Ген 2	p-value	q-value	Характер связи
Метилирование пар генов микроРНК				
MIR-203	MIR-129-2	0.003	0.018	Сочетанность
MIR-34B/C	MIR-34A	0.010	0.029	Сочетанность
MIR-34B/C	MIR-129-2	0.014	0.029	Сочетанность
MIR-34B/C	MIR-203	0.024	0.036	Сочетанность
MIR-34A	MIR-203	0.207	0.345	Сочетанность
MIR-34A	MIR-129-2	0.422	0.545	Взаимная исключаемость
Метилирование генов микроРНК и мутации TP53				
MIR-34A	TP53	0.406	0.536	Взаимная исключаемость
MIR-34B/C	TP53	0.585	0.585	Взаимная исключаемость
MIR-203	TP53	0.221	0.368	Взаимная исключаемость
MIR-129-2	TP53	0.180	0.359	Взаимная исключаемость

Высокая частота выявления aberrантного метилирования p53-респонзивных микро-РНК при ДВККЛ указывает на необходимость их дальнейшего изучения с точки зрения разработки таргетного лечения. Возможными направлениями могут быть как использование ингибиторов метилирования ДНК, таких как производные 5-азациитидина, которые уже одобрены для лечения отдельных злокачественных новообразований крови, так и микроРНК миметиков [4].

Литература

1. Arribas A.J., Gómez-Abad C., Sánchez-Beato M. et al. Splenic marginal zone lymphoma: comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling. *Mod Pathol.* 2013;26(7):889-901.
2. Craig V.J., Cogliatti S.B., Rehrauer H. et al. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res.* 2011;71(10):3616-24.
3. Воропаева Е.Н., Березина О.В., Чуркина М.И. и др. Aberrантная экспрессия и метилирование генов отдельных микроРНК при лимфопролиферативных заболеваниях: обзор литературы. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2021; 4:108-133.
4. Воропаева Е.Н., Пospelova Т.И., Березина О.В. и др. Метилирование генов p53-респонзивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах. *Сибирский онкологический журнал.* 2022;21(2):130-142.
5. Solé C., Larrea E., Di PG. et al. miRNAs in B-cell lymphoma: Molecular mechanisms and biomarker potential. *Cancer Lett.* 2017; 405: 79-89.
6. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U. et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
7. Piovon C., Palmieri D., Di Leva G. et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol.* 2012;6(4):458-72.
8. Larrabeiti-Etxebarria A., Lopez-Santillan M., Santos-Zorroza B. et al. A Systematic Review of the Potential of MicroRNAs in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(2):144.

References

1. Arribas A.J., Gómez-Abad C., Sánchez-Beato M. et al. Splenic marginal zone lymphoma: comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling. *Mod Pathol.* 2013;26(7):889-901.
2. Craig V.J., Cogliatti S.B., Rehrauer H. et al. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res.* 2011;71(10):3616-24.
3. Voropaeva E.N., Berezina O.V., Churkina M.I., Pospelova T.I., Lyzlova A.A., Maksimov V.N. Aberrant expression and methylation of individual microRNAs genes in lymphoproliferative diseases: a literature review. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2021;(4):108-133. <https://doi.org/10.31549/2542-1174-2021-4-108-133>
4. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Berezina O.V., Churkina M.I., Gurazheva A.A., Maksimov V.N. Metilirovaniye genov r53-responzivnykh onkosupressornykh mikroRNK pri gemoblastozakh [Methylation of p53-responsive oncosuppressive microRNA genes in hemoblastosis]. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal [Siberian journal of oncology].* 2022;21(2):130-142. (In Russ.) <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142>.
5. Solé C., Larrea E., Di PG. et al. miRNAs in B-cell lymphoma: Molecular mechanisms and biomarker potential. *Cancer Lett.* 2017; 405: 79-89.
6. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U. et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
7. Piovon C., Palmieri D., Di Leva G. et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol.* 2012;6(4):458-72.
8. Larrabeiti-Etxebarria A., Lopez-Santillan M., Santos-Zorroza B. et al. A Systematic Review of the Potential of MicroRNAs in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(2):144.