

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-72-81



# Механизмы нарушения экспрессии генов р53-респонсивных микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Е.Н. Воропаева<sup>1,2</sup>, Т.И. Поспелова<sup>2</sup>, М.И. Чуркина<sup>2</sup>, А.А. Гуражева<sup>1</sup>, О.В. Березина<sup>2</sup>, В.Н. Максимов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630089 Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52

**Контакты:** Елена Николаевна Воропаева [vena.81@mail.ru](mailto:vena.81@mail.ru)

**Введение.** Большое значение для понимания механизмов формирования и прогрессии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), а также ее чувствительности к лечению имеет более глубокое представление о молекулярных событиях, нарушающих функционирование сигнального пути р53. Белок р53 проявляет свою онкосупрессорную функцию и опосредует противоопухолевые эффекты лекарственных препаратов посредством регуляции транскрипции и/или созревания широкого спектра генов-мишеней, в том числе *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*. В опухолевой ткани лимфом по сравнению с нормальной лимфоидной тканью показано снижение уровня кодируемых данными генами микроРНК.

**Цель исследования** – комплексный анализ метилирования генов р53-респонсивных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также мутаций в ДНК-связывающем домене и разрушения последовательности сигнала к полиаденилированию гена *TP53* при ДВККЛ.

**Материалы и методы.** Проанализированы 136 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, и 11 образцов ДНК, полученной из лимфатических узлов с реактивной В-клеточной фолликулярной гиперплазией. Определение статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* осуществляли методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции, генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* – методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения. В опухолевых образцах методом полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов выполнено генотипирование варианта нуклеотидной последовательности rs78378222, приводящего к разрушению сигнала полиаденилирования, с помощью капиллярного прямого секвенирования по Сэнгеру определена нуклеотидная последовательность района гена *TP53*, кодирующего ДНК-связывающий домен.

**Результаты.** Выявляемое в лимфатической ткани метилирование носило опухолеспецифичный характер. Частота анализируемых aberrаций в гене *TP53* и метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* составила 21, 23, 55, 65 и 66 % соответственно. При этом метилирование анализируемых генов р53-респонсивных микроРНК и aberrаций в гене *TP53* в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ являлись независимыми событиями с тенденцией к взаимному исключению. Вместе с тем показано, что в подавляющем большинстве образцов лимфомы метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* носило сочетанный характер.

**Заключение.** Наряду с aberrациями в *TP53*, метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* может являться частой причиной снижения экспрессии miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203 при ДВККЛ. Сочетанное метилирование генов *MIR-203*, *MIR-129-2* и *MIR-34B/C*, а также пары *MIR-34B/C* и *MIR-34A* потенциально имеет более выраженный проопухолевый эффект за счет наличия у кодируемых ими микроРНК общих мишеней.

**Ключевые слова:** ген *TP53*, мутации, rs78378222, микроРНК, метилирование, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129, miR-203, лимфома

**Для цитирования:** Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И. и др. Механизмы нарушения экспрессии генов р53-респонсивных микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3): 72–81. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-72-81

## Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNA genes in diffuse B-large cell lymphoma

E.N. Voropaeva<sup>1,2</sup>, T.I. Pospelova<sup>2</sup>, M.I. Churkina<sup>2</sup>, A.A. Gurazheva<sup>1</sup>, O.V. Berezina<sup>2</sup>, V.N. Maksimov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Therapy and Preventive Medicine – branch of the Institute of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; 175/1 Boris Bogatkov St., Novosibirsk 630089, Russia;

<sup>2</sup>Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 52 Red Prospect, Novosibirsk 630091, Russia

**Contacts:** Elena Nikolaevna Voropaeva [vena.81@mail.ru](mailto:vena.81@mail.ru)

**Introduction.** A more in-depth description of molecular events that disrupt the functioning of the p53 signaling pathway is important for understanding the mechanisms of formation and progression of diffuse B-large cell lymphoma (DLCL), as well as its sensitivity to treatment. The p53 protein exhibits its oncosuppressive function and mediates the antitumor effects of drugs by regulating transcription and/or maturation of a wide range of target genes, including *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203*. In the tumor tissue of lymphomas, in comparison with normal lymphoid tissue, a decrease in the level of microRNAs encoded by these genes is shown.

**Aim.** The aim of this study was to conduct a comprehensive analysis of the methylation of the genes of the p53-responsive microRNAs *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* and *MIR-129-2*, as well as mutations in the DNA-binding domain and destruction of the polyadenylation signal of the *TP53* gene in DLBCL.

**Materials and methods.** 136 DNA samples isolated from tumor tissue of patients with DLBCL and 11 DNA samples obtained from lymph nodes with reactive B-cell follicular hyperplasia were analyzed. The methylation status of *MIR-203* and *MIR-129-2* genes was determined by the method of methyl-specific polymerase chain reaction, *MIR-34A* and *MIR-34B/C* genes by the method of methyl-sensitive analysis of high-resolution melting curves. In tumor samples, rs78378222 genotyping was performed by polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism, resulting in the destruction of the polyadenylation signal, and the nucleotide sequence of the region of the *TP53* gene encoding the DNA-binding domain was determined by capillary direct sequencing by Sanger.

**Results.** The methylation detected in lymphoma tissue was tumor-specific. The frequency of analyzed aberrations in the *TP53* gene and methylation of *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203* was 21, 23, 55, 65 and 66 %, respectively. At the same time, methylation of the analyzed genes of p53-responsive microRNAs and aberrations in the *TP53* gene in the tumor tissue of patients with DLBCL were independent events with a tendency to mutual exclusion. At the same time, it was shown that in the vast majority of lymphoma samples, the methylation of the *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203* genes was combined.

**Conclusion.** Along with aberrations in *TP53*, methylation of *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203* genes may be an important cause of decreased expression of miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 and miR-203 in DLBCL. The combined methylation of the *MIR-203*, *MIR-129-2* and *MIR-34B/C* genes, as well as the *MIR-34B/C* and *MIR-34A* pairs, potentially has a more pronounced pro-tumor effect due to the presence of common targets in the microRNAs encoded by them.

**Keywords:** *TP53* gene, mutations, rs78378222, microRNA, methylation, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129, miR-203, lymphoma

**For citation:** Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I. et al. Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNA genes in diffuse B-large cell lymphoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Uspekhi Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):72–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-72-81

## ВВЕДЕНИЕ

Важным этапом развития многих злокачественных новообразований является нарушение функционирования гена *TP53*, которое может возникать на ранних стадиях формирования опухоли или при ее прогрессии [1]. Помимо онкосупрессорной функции путем контроля клеточного цикла и апоптоза, регуляции дифференцировки, репарации ДНК, антиоксидантной защиты и метаболизма, модулирования активности сигнальных путей цитокиновых рецепторов и экспрессии на поверхности клеток молекул, необходимых для презентации эндогенных антигенов и иммунного распознавания, кодируемый данным геном белок p53 опосредует эффект противоопухолевых агентов различной молекулярной направленности [1, 2]. Именно поэтому оценка функционального статуса *TP53* широко используется для стратификации онкологических пациентов на прогностические группы [3].

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является биологически гетерогенным, наиболее частым типом агрессивных неходжкинских

лимфом. Около 40 % пациентов с данной патологией имеют рефрактерно-рецидивирующее течение заболевания при применении стандартной терапии 1-й линии – ритуксимаба в комбинации с протоколом СНОР (циклофосфан, доксорубицин, винкристин, преднизолон) [4]. Таким образом, отбор больных лимфомой с высоким риском неэффективности лечения и разработка новых подходов терапии, которые будут эффективны у данной когорты пациентов с ДВККЛ, имеют большую актуальность.

Наиболее активно изучаемым при ДВККЛ аспектом aberrаций в гене *TP53* является его мутационный статус [5]. Вместе с тем в настоящее время не предложены терапевтические подходы, преодолевающие неблагоприятное прогностическое значение мутаций в данном гене при лимфоме. Дальнейшего изучения требуют и механизмы устойчивости опухолевых клеток к стандартной терапии в случаях ДВККЛ с отсутствием мутаций в *TP53* [4].

Белок p53 является транскрипционным фактором и большинство своих эффектов реализует через

регуляцию экспрессии мишеней главным образом путем прямого связывания со специфическими последовательностями ДНК, называемыми р53-чувствительными элементами и расположенными в промоторах респонсивных генов. Накапливается все больше свидетельств того, что данный белок проявляет свою онкосупрессорную функцию и опосредует противоопухолевые эффекты лекарственных препаратов посредством регуляции транскрипции и/или созревания широкого спектра микроРНК, в том числе микроРНК-34а, -34б, -34с, -129 и -203 [6–9]. Известно также, что экспрессия перечисленных онкосупрессорных микроРНК снижена при лимфомах [8, 9].

Мутантный статус *TP53* может быть одним из потенциальных, но не единственным механизмом нарушения экспрессии р53-респонсивных молекул. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что в опухолевых клетках с мутациями в данном гене не происходит общее снижение уровня всех регулируемых им мишеней, при этом экспрессия одних из них нарушается в гораздо большей степени, чем других [1].

Изменения в 3'-нетранслируемой последовательности гена *TP53* также могут иметь прямое биологическое действие на функцию р53 [10]. Так, вариант нуклеотидной последовательности rs78378222 в 3'-нетранслируемой последовательности гена приводит к изменению сигнала к полиаденилированию ААТААА на ААТАСА, нарушению процессинга 3'-конца матричной РНК и формированию функционального дефицита *TP53*.

Гены *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* расположены в CpG-богатых регионах, и aberrантное метилирование также может иметь большое значение в нарушении их экспрессии при опухолях [8, 9]. Однако, в отличие от злокачественных новообразований эпителиального происхождения и сарком, эпигенетические нарушения в данных генах при лимфомах мало изучены.

Таким образом, более глубокое представление о лежащих в основе развития ДВККЛ молекулярных событиях, затрагивающих сигнальный путь р53, имеет большое значение для понимания механизмов формирования и прогрессии опухоли, а также ее чувствительности к лечению.

**Цель исследования** – комплексный анализ метилирования генов р53-респонсивных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также мутаций в ДНК-связывающем домене и разрушения последовательности сигнала полиаденилирования гена *TP53* при ДВККЛ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association) 2000 г. и протоколом к Конвенции о правах человека и биомедицине (Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine) 1999 г.

Проанализированы 136 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ (с содержанием опухолевых клеток не менее 50 %), и 11 образцов ДНК, полученной из лимфатических узлов с реактивной В-клеточной фолликулярной гиперплазией. С FFPE-блоков брались срезы толщиной 10–12 мкм. Выделение ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. Оценку и контроль качества выделенных нуклеиновых кислот выполняли на BioTek Epoch (BioSPX, Бельгия).

Бисульфитную конверсию выделенной ДНК проводили с применением наборов EZ DNA Methylation-Gold Kit. Для контроля полноты конверсии применяли набор Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (рис. 1). Определение статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* осуществляли методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* – методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения (табл. 1).

В опухолевых образцах описанным ранее методом ПЦР с полиморфизмом длин рестриционных фрагментов выполнено генотипирование rs78378222, приводящего к разрушению сигнала полиаденилирования [7].

Методом капиллярного прямого секвенирования по Сэнгеру определена нуклеотидная последовательность *TP53* (экзоны 5–10) в соответствии с протоколом Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC). Анализ осуществляли методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Результаты секвенирования анализировали с помощью программ SeqScape и Chromas. В качестве референсной использовалась последовательность гена *TP53* NG\_017013.

Количественный анализ сочетанного выявления метилирования изученных генов и aberrаций в *TP53* проводили путем вычисления двоичного логарифма отношений шансов ( $\log_2$  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 [14] получена картина сочетанного выявления изучаемых молекулярно-генетических нарушений. Мутационный спектр гена *TP53* был визуализирован в формате графика «леденец на палочке» с помощью программы Lollipop [15].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке мутационного профиля гена *TP53* и rs78378222 в 3'-нетранслируемой последовательности показано, что в целом частота анализируемых aberrаций в группе исследования составила 21 % (29/136). У 10/из 136 (7,4 %) человек выявлены множественные нарушения.

Распределение aberrаций по типам было следующим: разрушение сигнала полиаденилирования –

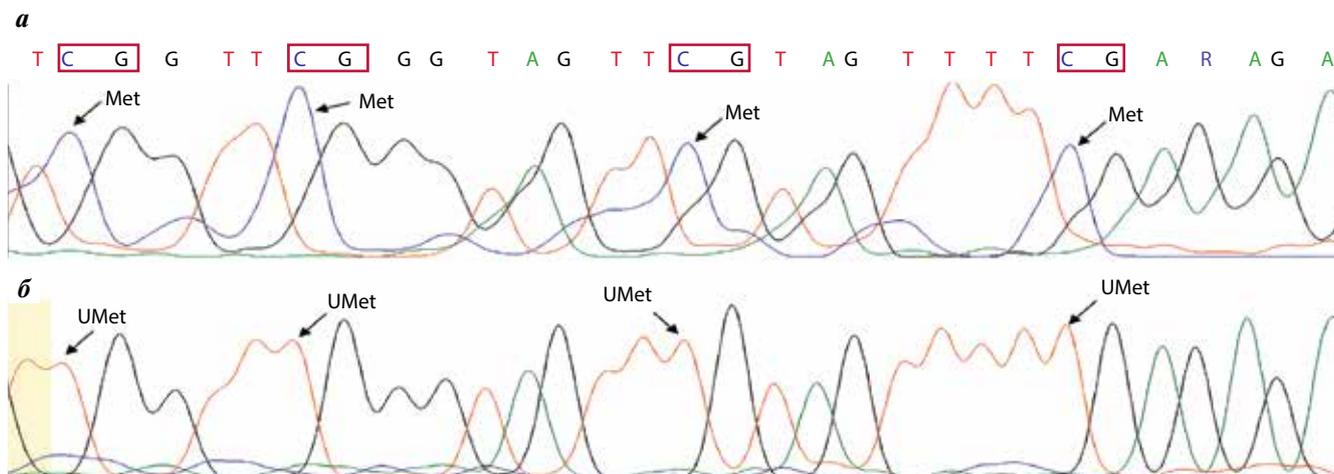
Таблица 1. Последовательности праймеров для MS-ПЦР и MS-HRM и длины ампликонов анализируемых генов микроРНК

Table 1. Primers sequences for MS-PCR and MS-HRM and lengths of amplicons of analyzed microRNA genes

Метод Method	Ген Gene	Последовательность праймеров Primers sequences	Длина ампликона (п. н.) Amplicon length (b. p.)	Температура отжига праймеров, °С Primer annealing temperature, °C	Источник Reference
MS-HRM	MIR-34A	F 5'-tttttttttagtggaggagatg-3' R 5'-ccaacaacaaccsaacaaca-3'	155	64	[11]
	MIR-34B/C	F 5'-ttgtattataaataaggtatagatatta-3' R 5'-cgcttcaaacatcttctct-3'	99	56	
МС-ПЦР MS-PCR	MIR-203	MF 5'-gagtatttcggttagacgagac-3' MR 5'-cctttatacagcgaaccg-3' UMF 5'-tttgagtattttggttagatgagat-3' UMR 5'-aacacctttatacaacaacca-3'	287	60	[12]
	MIR-129-2	MF 5'-gagttgggggatcgccgac-3' MR 5'-atataccgactctctcgattcggc-3'	189	62	[13]
		UMF 5'-gagttgggggattgtggat-3' UMR 5'-aatataccaactcttcaattacca-3'	188	60	

**Примечание.** MS-HRM – methyl-sensitive high-resolution melting curves analysis, метил-чувствительный анализ кривых плавления высококого разрешения, MS-ПЦР – метил-специфичная полимеразная цепная реакция, п. н. – пар нуклеотидов.

**Note.** MS-HRM – methyl-sensitive high-resolution melting curves analysis; MS-PCR – methyl-specific polymerase chain reaction, b. p. – base pairs.



**Рис. 1.** Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена MIR-129-2: а – метилированная ДНК; б – неметилированная ДНК. Met – цитозин в метилированном состоянии; UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии. Красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды

**Fig. 1.** A fragment of the CpG island bisulfite sequence chromatogram of the MIR-129-2 gene: а – methylated DNA; б – unmethylated DNA. Met – cytosine in the methylated state; UMet – thymine in place of cytosine in the unmethylated state, CpG dinucleotides are highlighted in red frame

17,0 % (9/53); интронные мутации с неизвестным эффектом – 22,6 % (12/53); миссенс-замены – 39,6 % (21/53); сеймсенс – 13,2 % (7/53) и нонсенс-замены – 3,8 % (2/53); мутации, приводящие к нарушению сплайсинга молекулы РНК, – 1,9 % (1/53); – мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания в гене TP53, – 1,9 % (1/53) (табл. 2).

Все мутации, за исключением A189Pfs (98,1 %), представляли собой однонуклеотидные замены. Неоднократно в группе исследования отмечены миссенс-замены p.W146R, p.T155I и p.V273C, а также нонсенс-замены p.R213X\* и с.1175T>G, приводящие к нарушению полиаденилирования.

Расположение мутаций по последовательности TP53 представлено на рис. 2. Биоинформационный анализ с применением программы Polyphen2 показал, что 2/3 (14 из 18; 77,8 %) миссенс-замен являлись возможно патогенными и ранее были описаны при злокачественных новообразованиях (табл. 3 и 4).

В ходе анализа статуса метилирования генов MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A и MIR-34B/C отрицательный и положительный контроли из набора Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (Zymo Research, США) показали ожидаемые результаты. Ни один образец ДНК, выделенной из ткани лимфатических узлов с реактивной гиперплазией, не имел

Таблица 2. Общая характеристика результатов секвенирования гена TP53

Table 2. General characteristics of the TP53 gene sequencing results

3/НТО 3/-UTR	Расположение мутаций Mutations localization					
	Интроны Introns		Кодирующая последовательность Coding sequence			
	С неизвестным эффектом With the unknown effect	Влияние на сплайсинг Impact on splicing	Нонсенс Nonsense	Сдвиг рамки Frame shift	Миссенс Missense	Синонимичные Synonymous
c.1175T>G#	IVS4–30T>C*	IVS6–36G>C	p.SR213X*	p.SA189Pfs	p.SL130F	p.V157V
	IVS5+43G>T				p.SW146R*	
	IVS5–17T>C				p.ST155I*	
	IVS7+31G>C*				p.SR156C	p.SS166S
	IVS8+10C>A*				p.SM160V	
	IVS8+20A>G				p.SV173L	
	IVS8+37A>G				p.SH178D	p.H179H
	IVS9+12T>C*				p.R196Q	
					p.SR197G	
					p.ST211S	p.SL252L
					p.SV218A	
					p.SG244S	
					p.SR249S	p.V272V
					p.SV272E	
					p.SV273C*	
p.SA276V		p.SG302G				
p.SE285Q	p.A307A					
p.SG293R						

\*Мутации, встречающиеся в группе исследования 2 раза. #Мутация, встречающаяся в группе исследования 9 раз.

Примечание. НТО – нетранслируемая область.

\*Mutations encountered 2 times in the study group. #Mutation that occurs 9 times in the study group.

Note. UTR – untranslated region.

метиляции изучаемых генов микроРНК. Частота метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в опухолевой ткани ДВККЛ составила 23, 55, 66 и 65 % соответственно.

Совместное выявление метилирования генов микроРНК и мутаций в *TP53* для каждого из образцов группы исследования представлено на рис. 3. Согласно полученным данным отсутствие метилирования хотя бы одного из изученных генов наблюдалось лишь в 11,0 % (15/136) случаев лимфомы, в подавляющем же большинстве образцов метилирование носило сочетанный характер. Так, в 24,3 % (33/136) случаев имело место метилирование 2, в 44,1 % (60/136) – 3 и в 11,1 % (15/136) – всех 4 проанализированных генов.

Вместе с тем метилирование анализируемых генов p53-респонсивных микроРНК и абберации в гене *TP53* в опухолевой ткани больных ДВККЛ, напротив, носили независимый характер с тенденцией к взаимному исключению (табл. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Участие микроРНК в лимфогенезе подтверждено в ходе моделирования новообразований на животных. Абберантная их экспрессия не только инициирует развитие, но и способствует увеличению темпов опухолевой прогрессии злокачественных лимфом [9]. При этом увеличивается число исследований, показывающих важную роль микроРНК в функционировании сигнального пути белка p53 [16].

**Таблица 3.** Анализ патогенности выявленных миссенс-мутаций в гене *TP53* с помощью онлайн-программы Polyphen2

Table 3. Analysis of the identified *TP53* gene missense mutations pathogenicity using the Polyphen2 online program

Мутация Mutation	Прогноз Prognosis	Уровень патогенности Pathogenicity level
p.SL130F	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SW146R	Непатогенная Non-pathogenic	0,01
p.ST155I	Патогенная Pathogenic	0,99
p.SR156C	Непатогенная Non-pathogenic	0,02
p.SM160V	Вероятно патогенная Probably pathogenic	0,41
p.SV173L	Патогенная Pathogenic	0,98
p.SH178D	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SR196Q	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SV197G	Патогенная Pathogenic	1,00
p.ST211S	Непатогенная Non-pathogenic	0,17
p.SV218A	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SG244S	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SR249S	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SV272E	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SR273C	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SA276V	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SE285Q	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SG293R	Непатогенная Non-pathogenic	0,02

Ранее нами проводился анализ мутационного профиля *TP53* и статуса метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в небольшой группе ( $n = 73$ ) образцов ДВККЛ [17]. Было показано, что метилирование анализируемых генов р53-репсонсивных микроРНК и мутации *TP53* в опухолевой ткани

ДВККЛ у большей части пациентов имели тенденцию к взаимному исключению.

Настоящее исследование позволило уточнить частоты анализируемых ранее молекулярно-генетических нарушений и расширить их спектр. На выборке из 136 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, выполнен комплексный анализ механизмов, нарушающих экспрессию микроРНК-34а, -4б, -34с, -129 и -203, а именно: метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также мутационного статуса и разрушения сигнала полиаденилирования гена *TP53*.

Показано, что метилирование анализируемых генов микроРНК является распространенным событием при ДВККЛ. Отсутствие метилирования хотя бы одного из изученных генов имело место лишь в каждом 10-м случае лимфомы. Частота метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в опухолевой ткани лимфомы составила 23, 55, 66 и 65 % соответственно, что согласуется с полученными ранее данными [17].

В подавляющем большинстве опухолевых образцов метилирование носило сочетанный характер. Установлено, что даже с учетом поправки на множественность сравнений метилирование *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также *MIR-34B/C* и *MIR-34A* при лимфоме достоверно коррелирует друг с другом.

Можно предположить, что сочетанное метилирование данных генов при ДВККЛ является механизмом, который потенциально дерегулирует несколько функционально связанных генов, вовлеченных в отдельный путь патогенеза опухоли, и/или затрагивает сразу несколько путей лимфогенеза, а следовательно, имеет более выраженный проопухолевый эффект. Это подтверждается функциональной ассоциацией микроРНК семейства miR-34, микроРНК-129 и микроРНК-203 за счет наличия у них общих мишеней [8, 9, 17]. В данной работе показано, что абберации, приводящие к функциональному дефициту *TP53*, обнаруживаются в каждом 5-м образце ДВККЛ. При этом разрушение сигнала полиаденилирования составило 17,0 % данных аббераций.

Поскольку большая часть выявленных в анализируемой выборке образцов лимфомы мутаций приходится на ДНК-связывающий домен, обеспечивающий регуляцию генов-мишеней белка р53, они могут вызывать нарушение экспрессии микроРНК-129 и микроРНК семейства miR-34.

В отличие от последних, экспрессия микроРНК-203 регулируется белком р53 на посттранскрипционном уровне путем ускорения процессинга ее в ядре. В этой связи интересны данные о том, что транскрипционно неактивные мутантные варианты р53, например, выявленная в группе исследования мутация в «горячем» кодоне гена *TP53* p.SR273, могут препятствовать функциональной сборке белкового комплекса в составе с Drosha [18].

Таблица 4. Связь мутаций, выявленных в кодирующей части гена *TP53*, со злокачественными опухолямиTable 4. Association of mutations detected in the coding part of the *TP53* gene with malignant tumors

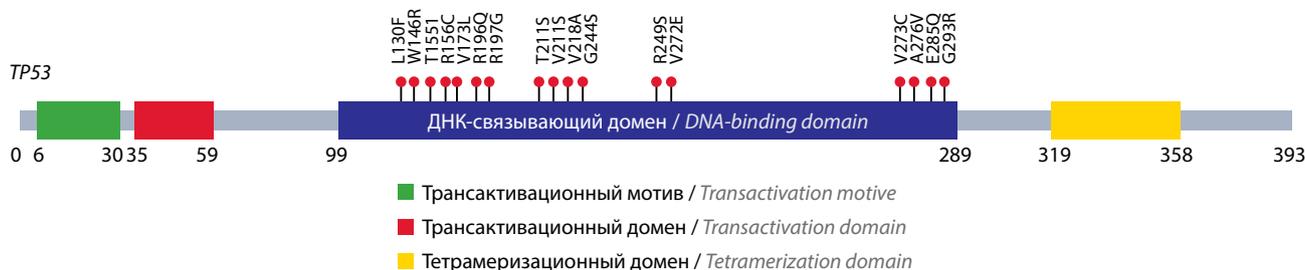
Мутация Mutation	Экзон Exon	Злокачественное новообразование Malignant neoplasm
p.SL130F	5	Опухоли эпителиальных тканей и центральной нервной системы Tumors of epithelial tissues and central nervous system
p.SW146R	5	Диффузная В-крупноклеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma
p.ST155I	5	Хронический лимфолейкоз, НК/Т-клеточная лимфома Chronic lymphocytic leukemia, NK/T-cell lymphoma
p.SR156C	5	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia
p.SM160V	5	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SV173L	5	Хронический лимфолейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома Chronic lymphocytic leukemia, diffuse large B-cell lymphoma
p.SH178D	5	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SR196Q	6	Острый миелоидный лейкоз, аденокарцинома прямой кишки, меланома радужки, плоскоклеточная карцинома тимуса Acute myeloid leukemia, rectal adenocarcinoma, iris melanoma, thymic squamous cell carcinoma
p.SV197G	6	Т-клеточная лимфома, плоскоклеточная карцинома легких, карцинома почки T-cell lymphoma, squamous cell carcinoma of the lung, carcinoma of the kidney
p.ST211S	6	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SV218A	6	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SG244S	7	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SR249S	7	Хронический лимфолейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома толстой кишки Chronic lymphocytic leukemia, hepatocellular carcinoma, colon adenocarcinoma
p.SV272E	8	Диффузная В-крупноклеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma
p.SR273C	8	Опухоли центральной нервной системы, хронический лимфолейкоз, мантийноклеточная лимфома, диффузная В-крупноклеточная лимфома Central nervous system tumors, chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma
p.SA276V	8	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SE285Q	8	Опухоли эпителиальных тканей, тератома яичника Tumors of epithelial tissues, ovarian teratoma
p.SG293R	8	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues

В целом было показано, что в ряде случаев метилирование *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34B/C* и *MIR-34A* и аберрации гена *TP53* в опухолевой ткани ДВККЛ сочетаются. Однако в большинстве образцов они не только являются независимыми событиями, но и имеют склонность к взаимному исключению.

Вероятно, как аберраций *TP53* (мутаций или разрушения сигнала полиаденилирования), так и метилирования генов изучаемых микроРНК может быть доста-

точно для нарушения регуляторной сети белка p53 при лимфоме (рис. 4). Данное предположение подкрепляется наличием положительных обратных связей между p53 и активируемыми им молекулами. Например, микроРНК-34a участвует в стабилизации белка путем нацеливания на деацетилазу SIRT1 [9].

Наконец, высокая частота выявления опухолеспецифичного метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34B/C* и *MIR-34A* при ДВККЛ указывает



**Рис. 2.** Распределение миссенс-мутаций в гене TP53, выявленных в группе исследования  
**Fig. 2.** Distribution of missense mutations in the TP53 gene identified in the study group



**Рис. 3.** Метилирование генов MIR-203, MIR-129–2, MIR-34A и MIR-34B/C и aberrации (разрушение сигнала полиадеилирования и мутации) в гене TP53 в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Случаи с метилированием и aberrациями выделены розовым цветом  
**Fig. 3.** MIR-203, MIR-129–2, MIR-34A and MIR-34B/C genes methylation and aberrations (destruction of polyadenylation and mutation signal) in the TP53 gene in the tumor tissue of diffuse B-large cell lymphoma patients. Cases with methylation and aberrations are highlighted in pink

**Таблица 5.** Анализ сочетанного выявления aberrаций в гене TP53 и метилирования генов изучаемых p53-респонсивных микроРНК  
**Table 5.** Analysis of combined detection of TP53 gene aberrations and studied p53-responsive miRNAs genes methylation

Ген 1 Gene 1	Ген 2 Gene 2	Частота сочетанного выявления, абс. Frequency of combined detection, abs.	Log2 Odds Ratio	p-value	q-value	Связь Tendency
MIR-34A	MIR-34B/C	26	2,571	<0,001	0,001	Сочетание Co-occurrence
MIR-129-2	MIR-203	68	1,880	<0,001	0,002	Сочетание Co-occurrence
MIR-34B/C	MIR-129-2	58	1,723	0,001	0,002	Сочетание Co-occurrence
MIR-34B/C	MIR-203	57	1,426	0,006	0,009	Сочетание Co-occurrence
MIR-34A	MIR-203	22	0,411	0,339	0,407	Сочетание Co-occurrence
MIR-34A	MIR-129-2	21	0,192	0,468	0,468	Сочетание Co-occurrence
MIR-34A	TP53	5	-0,624	0,297	0,424	Взаимное исключение Mutual exclusivity
MIR-129-2	TP53	18	-0,269	0,412	0,458	Взаимное исключение Mutual exclusivity
MIR-34B/C	TP53	14	-0,507	0,264	0,424	Взаимное исключение Mutual exclusivity
MIR-203	TP53	17	-0,600	0,225	0,424	Взаимное исключение Mutual exclusivity

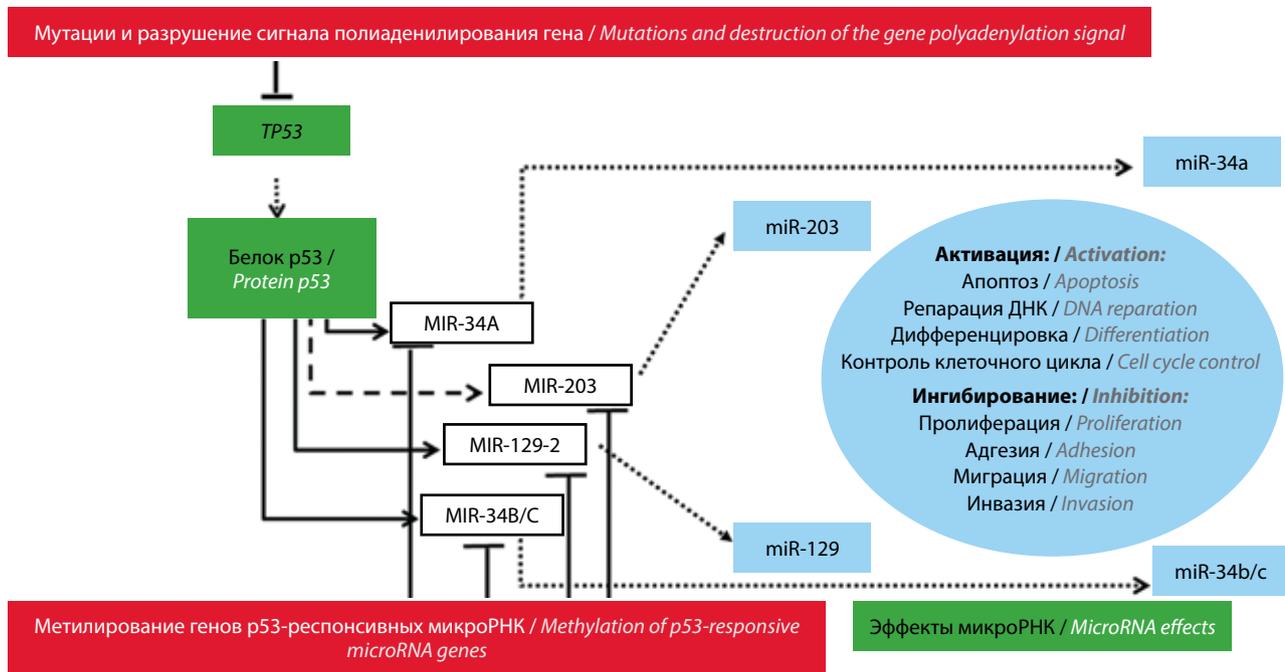


Рис. 4. Механизмы нарушения экспрессии p53-респонсивных микроРНК  
Fig. 4. Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNAs

на необходимость их дальнейшего изучения в качестве потенциальных мишеней для таргетной терапии данной опухоли. Возможными направлениями могут быть использование ингибиторов метилирования ДНК, таких как производные 5-азациитидина, которые уже одобрены для лечения отдельных злокачественных новообразований крови, и синтетические аналоги микроРНК. Последние после попадания в клетку включаются в эффекторный комплекс, функционально замещают дерегулированные эндогенные микроРНК и восстанавливают сигнальные пути, функционирующие в норме [9, 19].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метилирование генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* является биомаркером для дифференциальной диагностики ДВККЛ и реактивных изменений в лимфатических узлах. Наряду с aberrациями в гене *TP53* aberrантное метилирование может быть частой независимой причиной снижения экспрессии микроРНК семейства miR-34, микроРНК-129 и микроРНК-203 при ДВККЛ, что указывает на необходимость дальнейшего изучения таргетных подходов лечения данной патологии, основанных на эпигенетических механизмах.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Donehower L.A., Soussi T., Korkut A. et al. Integrated analysis of *TP53* gene and pathway alterations in the cancer genome atlas. *Cell Rep* 2019;28(5):1370–84. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.001
2. Cortez M.A., Ivan C., Valdecanas D. et al. PDL1 regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(1):djv303. DOI: 10.1093/jnci/djv303
3. Robles A.I., Harris C.C. Clinical outcomes and correlates of *TP53* mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(3):a001016. DOI: 10.1101/cshperspect.a001016
4. Lu T.X., Young K.H., Xu W., Li J.Y. *TP53* dysfunction in diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;97:47–55. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.006
5. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Результаты комплексного анализа статуса гена *TP53* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Гематология и трансфузиология* 2016; 61(3):138–43. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143
6. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. The results of comprehensive analysis of *TP53* gene status in patients with diffuse large cell lymphoma. *Gematologiya i transfusiologiya = Hematology and Transfusiology* 2016;61(3):138–43. (In Russ.). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143
7. 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. DOI: 10.1038/modpathol.2012.220
8. 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. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3907
9. Воропаева Е.Н., Березина О.В., Чуркина М.И. и др. Аберрантная экспрессия и метилирование генов отдельных микроРНК при лимфопролиферативных заболеваниях: обзор литературы. *J of Siberian Medical Sciences* 2021;4:108–33. DOI: 10.31549/2542-1174-2021-4-108-133

- Voropaeva E.N., Berezina O.V., Churkina M.I. et al. Aberrant expression and methylation of individual microRNAs genes in lymphoproliferative diseases: a literature review. *Journal of Siberian Medical Sciences* 2021;4:108–33. (In Russ.). DOI: 10.31549/2542-1174-2021-4-108-133
9. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Березина О.В. и др. Метилирование генов p53-респонзивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах. *Сибирский онкологический журнал* 2022;21(2):130–42. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Berezina O.V. et al. Methylation of p53-responsive oncosuppressive microRNA genes in hemoblastosis. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2022;21(2):130–42. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142
10. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. и др. Обнаружение полиморфизма rs78378222 гена *TP53* в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Сибирский научный медицинский журнал* 2016;36(5):20–7. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I. et al. Detection of the rs78378222 polymorphism of the *TP53* gene in the tumor tissue of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal* 2016;36(5):20–7. (In Russ.).
11. Asmar F., Hother C., Kulosman G. et al. Diffuse large B-cell lymphoma with combined *TP53* mutation and *MIR34A* methylation: another “double hit” lymphoma with very poor outcome? *Oncotarget* 2014;5:1912–25. DOI: 10.18632/oncotarget.1877
12. Chim C.S., Wong K.Y. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med* 2011;15(12):2760–7. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01274.x
13. Wong K.Y., Kim R.L.H., Wong Y.L. et al. Epigenetic inactivation of the *MIR129-2* in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2013;6:16. DOI: 10.1186/1756-8722-6-16
14. 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):pl1. DOI: 10.1126/scisignal.2004088
15. Jay J.J., Brouwer C. Lollipops in the clinic: information dense mutation plots for precision medicine. *PLoS One* 2016;11(8):e0160519. DOI: 10.1371/journal.pone.0160519
16. 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. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.03.003
17. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И. и др. Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. *Медицинская генетика* 2022;21(11):62–6. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I. et al. Complex analysis of p53-responsive microRNA genes methylation and *TP53* gene mutations in diffuse large B-cell Lymphoma. *Medicinskaya genetika = Medical Genetics* 2022;21(11):62–6. (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66
18. Solé C., Larrea E., Di P.G. et al. miRNAs in B-cell lymphoma: molecular mechanisms and biomarker potential. *Cancer Lett* 2017;405:79–89. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.07.020
19. Ивкин Д.Ю., Лисицкий Д.С., Захаров Е.А. и др. МикроРНК как перспективные диагностические и фармакологические агенты. *Астраханский медицинский журнал* 2015;4:8–25. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66
- Ivkin D.Yu., Lisitsky D.S., Zakharov E.A. et al. MicroRNAs as promising diagnostic and pharmacological agents. *Astrahanskij medicinskij zhurnal = Astrakhan Medical Journal* 2015;4:8–25. (In Russ.).

#### Вклад авторов

Е.Н. Воропаева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, написание чернового варианта статьи, редактирование;  
Т.И. Поспелова, В.Н. Максимов: участие в разработке концепции, дизайна исследования, научное редактирование, редактирование;  
О.Б. Березина, М.И. Чуркина, А.А. Гуражева: сбор и обработка материала, выполнение лабораторных исследований, написание текста статьи, редактирование.

#### Authors' contribution

E.N. Voropaeva: development of the concept and design of research, collection and processing of material, writing a draft version of the article, editing;  
T.I. Pospelova, V.N. Maksimov: participation in the development of the concept, design of research, scientific editing, editing;  
O.B. Berezina, M.I. Churkina, A.A. Gurazheva: collection and processing of the material, performing laboratory tests, article writing, editing.

#### ORCID авторов / ORCID authors

Е.Н. Воропаева / E.N. Voropaeva: <https://orcid.org/0000-0001-7542-7285>  
Т.И. Поспелова / T.I. Pospelova: <https://orcid.org/0000-0002-1261-5470>  
М.И. Чуркина / M.I. Churkina: <https://orcid.org/0000-0002-1301-5944>  
А.А. Гуражева / A.A. Gurazheva: <https://orcid.org/0000-0003-1547-624X>  
О.В. Березина / O.V. Berezina: <https://orcid.org/0000-0003-4584-658X>  
В.Н. Максимов / V.N. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-7165-4496>

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

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00222).

**Funding.** The research was supported by the Russian Science Found (grant No. 22-25-00222).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 129 от 30 ноября 2020 г.).

**Compliance with the rights and principles of bioethics.** The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia (protocol No. 129, November 30, 2020).

All patients signed an informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 01.03.2023. **Принята к публикации:** 21.07.2023.

**Article submitted:** 01.03.2023. **Accepted for publication:** 21.07.2023.