

ГЕНЕТИКА / GENETICS

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.25.3>

ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ПРИ ПАРААНГЛИОМАХ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Научная статья

Снежкина А.В.^{1,*}, Калинин Д.В.², Федорова М.С.³, Павлов В.С.⁴, Ланцова М.С.⁵, Головюк А.Л.⁶, Аюпова А.Ф.⁷,
Кудрявцева А.В.⁸¹ ORCID : 0000-0002-4421-4364;² ORCID : 0000-0001-6247-9481;³ ORCID : 0000-0002-6893-4673;^{1, 3, 4, 5, 7, 8} Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Москва, Российская Федерация^{2, 6} Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (leftger[at]rambler.ru)

Аннотация

Геномы опухолевых клеток имеют большое число генетических вариантов, которые включают как мутации-драйверы, так и нейтральные мутации-пассажиры. Идентификация драйверных нарушений является важным этапом на пути к пониманию механизмов злокачественной трансформации клеток и лечению опухолей. Параанглиомы головы и шеи (ПГШ) относятся к редким новообразованиям с высоким уровнем наследственной генетической предрасположенности (около 40%). На сегодняшний день описано не менее 30 генов, мутации в которых могут быть вовлечены в развитие ПГШ однако опухоль-ассоциированные изменения в некодирующих областях генома ранее не исследовались. В данной работе проведен анализ экзома 152 опухолевых тканей ПГШ с целью поиска вариантов в генах длинных некодирующих РНК (днкРНК). В исследуемой выборке, выявлены однонуклеотидные варианты в четырех генах днкРНК: *H3F3AP4*, *HIF1A-AS1*, *HIF1A-AS3* и *TET2-AS1*. Функция днкРНК *H3F3AP4* и *TET2-AS1* малоизучена; *HIF1A-AS1* и *HIF1A-AS3* участвуют в регуляции апоптоза и ответа на гипоксию, соответственно. Идентифицированные варианты в генах днкРНК могут оказать влияние на их функцию и способствовать дерегуляции важных клеточных путей и онкогенезу.

Ключевые слова: параанглиома головы и шеи, длинные некодирующие РНК, генетические варианты, экзом, высокопроизводительное секвенирование.

VARIANTS IN LONG NON-CODING RNA GENES IN HEAD AND NECK PARANGLIOMAS

Research article

Snezhkina A.V.^{1,*}, Kalinin D.V.², Fedorova M.S.³, Pavlov V.S.⁴, Lantsova M.S.⁵, Golovyuk A.L.⁶, Ayupova A.F.⁷,
Kudryavtseva A.V.⁸¹ ORCID : 0000-0002-4421-4364;² ORCID : 0000-0001-6247-9481;³ ORCID : 0000-0002-6893-4673;^{1, 3, 4, 5, 7, 8} Institute of Molecular Biology named after V.A. Engelhardt, Moscow, Russian Federation^{2, 6} National Medical Research Center of Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (leftger[at]rambler.ru)

Abstract

The genomes of tumour cells have numerous genetic variants that include both driver mutations and neutral passenger mutations. Identification of driver abnormalities is an important step towards understanding the mechanisms of malignant cell transformation and tumour treatment. Head and neck paragangliomas (HNPs) are among the rare neoplasms with a high level of inherited genetic predisposition (about 40%). To date, at least 30 genes have been described, mutations in which may be involved in the development of HNPs, but tumour-associated changes in non-coding regions of the genome have not been previously studied. In this paper, the exome of 152 tumour tissues of HNP was analysed to search for variants in long non-coding RNA (dncRNA) genes. In the study sample, single nucleotide variants in four dncRNA genes were identified: *H3F3AP4*, *HIF1A-AS1*, *HIF1A-AS3* and *TET2-AS1*. The function of the dncRNAs *H3F3AP4* and *TET2-AS1* is understudied; *HIF1A-AS1* and *HIF1A-AS3* are involved in the regulation of apoptosis and the response to hypoxia, respectively. Identified variants in dncRNA genes may affect their function and contribute to the deregulation of important cellular pathways and oncogenesis.

Keywords: head and neck paraganglioma, long non-coding RNAs, genetic variants, exome, high-throughput sequencing.

Введение

Длинные некодирующие РНК (днкРНК) – это транскрипты длиной более 200 нуклеотидов, которые не кодируют белок, но могут взаимодействовать с другими биологическими молекулами (нуклеиновыми кислотами и белками) через определенные последовательности или структурные элементы [1]. ДнкРНК широко вовлечены в молекулярные процессы, регулирующие онкогенез, и могут модулировать как онкогенные, так и супрессирующие опухоль эффекты посредством усиления или подавления экспрессии генов [2]. ДнкРНК – это важные, но малоизученные компоненты многочисленных клеточных сетей, поэтому понимание их клинической и теоретической значимости является

актуальной научной задачей. Особый интерес к днкРНК вызвало появление ингибиторов *in vivo* в форме антисмысловых олигонуклеотидов, что открывает многообещающие перспективы для использования днкРНК в качестве терапевтических мишеней при раке [3], [4]. Кроме того, днкРНК могут служить диагностическими и прогностическими биомаркерами опухолей [5].

Гены днкРНК, также, как и белок-кодирующие гены, имеют склонность к мутациям в опухолях [6]. Масштабное исследование однонуклеотидных полиморфизмов набора данных «Панракового анализа целых геномов» (PCAWG) позволило выявить 17 драйверных днкРНК, включая 9 днкРНК, для которых ранее была показана связь с онкогенезом [7]. Авторы также показали, что экспрессия днкРНК *LOLI1* (RP11-572M11.1, ENSG00000241219), мутированной по нескольким однонуклеотидным полиморфизмам, повышает жизнеспособность трансформированных и нормальных гепатоцитов человека. Введение полиморфизмов в днкРНК *NEAT1* приводило к значительному увеличению количества и размера субъядерных параспекл, которые удерживают разнообразные регуляторные белки и РНК, влияя на паттерны экспрессии генов и белков в клетке [7]. При этом параспеклы обнаруживаются в опухолевых клетках и могут быть ассоциированы с плохим прогнозом [8]. Таким образом, варианты в генах днкРНК могут нарушать функцию кодируемых транскриптов, способствовать пролиферации и росту клеток, а также иметь онкогенное значение.

Параганглиомы головы и шеи (ПГШ) относятся к редким типам опухолей и встречаются с частотой 0,3-1 на 100 000 случаев [9]. ПГШ объединяют группу опухолей, которые возникают из парасимпатических параганглиев, с наиболее частой локализацией в месте бифуркации сонной артерии, вдоль блуждающего нерва и области среднего уха [10]. Из-за анатомического расположения, вялотекущего течения заболевания и слабой симптоматики эти опухоли сложно диагностировать и лечить. Между тем, ПГШ могут метастазировать и характеризоваться мультифокальным ростом, часто имеют наследственную генетическую предрасположенность и ассоциированы с опухолевыми синдромами [11]. Однако большинство ПГШ развиваются спорадически вследствие соматических нарушений, которые до сих пор малоизучены.

Данное исследование посвящено анализу генетических вариантов в генах днкРНК при ПГШ с использованием собственных экзомных данных, полученных для репрезентативной выборки этих опухолей. ПГШ не представлены в публичных геномных базах данных (за исключением единичных случаев, встречающихся в выборке феохромоцитом), таких как «Атлас ракового генома» (TCGA) или PCAWG, поэтому исследование вариантов в днкРНК для этих опухолей ранее не проводилось. Этот пилотный анализ поможет выявить мутированные днкРНК, которые могут быть вовлечены в развитие ПГШ.

Материалы и методы

Источником для анализа генов днкРНК были собственные данные секвенирования экзомов 152 архивных опухолевых тканей ПГШ, заключенные в парафиновые блоки (FFPE), и 57 доступных нормальных тканей от тех же самых пациентов (кровь или лимфатический узел). Выборка опухолевых тканей включала: 70% (106/152) каротидных параганглиом, 22% (34/152) вагальных параганглиом и 8% (12/152) параганглиом среднего уха. Образцы собраны в 2006-2024 гг. и охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России (ИХВ). Исследование одобрено этическим комитетом ИХВ и проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (1964).

ДНК из тканей была выделена с помощью набора FFPE DNA Isolation Kit (Roche, Швейцария). Концентрация ДНК на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Для подготовки экзомных библиотеки использовали набор фирмы Illumina – TruSeq Exome Library Prep Kit (США). Секвенирование проводили на приборе Illumina NextSeq500 System (США) в режиме парных прочтений длиной 75 x 2 нуклеотидов. Все процедуры выполнены согласно протоколам производителей.

Анализ экзома выполнен согласно ранее описанному алгоритму [12]. Программу FastQC (версия 0.11.9) применяли для оценки качества прочтений. Далее проводили обрезку последовательностей, удаление адаптеров и фильтрацию по качеству с использованием Trimmomatic (версия 0.39). Полученные чтения были сопоставлены с референсным геномом человека GRCh37/hg19 (Ensembl, версия 75) с использованием bowtie2 (версия 2.4.1). Файлы BAM процессировали с помощью samtools (версия 1.10) и picard-tools (версия 2.21.3). Для определения генетических вариантов применяли GATK HaplotypeCaller (версия 4.1.4.0). Статистическая обработка выполнена согласно внутренним алгоритмам используемых программ. Для аннотации вариантов использовали программу ANNOVAR (после обновления 2022Aug02).

Фильтрация генетических вариантов в генах днкРНК проводилась с учетом максимальной частоты аллеля в популяции $\leq 1\%$ по базам данных gnomAD, 1000 Genomes, ExAC и Kaviar и покрытием альтернативной аллели ≥ 10 . Варианты со статусом «доброкачественный» или «вероятно доброкачественный» по базе данных ClinVar были исключены из анализа.

Результаты и обсуждение

В результате анализа экзомных данных ПГШ выявлено 88 вариантов в генах днкРНК, из которых заданные фильтры прошли 5 однонуклеотидных замены в четырех генах днкРНК – *H3F3AP4*, *HIF1A-AS1*, *HIF1A-AS3* и *TET2-AS1* (Таблица 1).

Таблица 1 - Генетические варианты в генах днкРНК при ПГШ

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.25.3.1>

Ген днкРНК	Позиция	Однонуклеотидная замена	Номер базы данных N	Номер и тип опухоли	Частота альтернативного	Наличие варианта в	Встречаемость варианта

			CBI SNP		варианта (VAF)	нормальной ткани	в выборке и разных типах опухолей, %
<i>H3F3AP4</i>	Xp1:226252185	T > TA	-	169tj (СУПГ)	0,54	Нет данных	0,66 (1/152 ПГШ) 8 (1/12 СУПГ)
<i>HIF1A-AS1</i>	Xp14:62162430	C > T	rs1033057322	102tc (КПГ)	0,69	+	0,66 (1/152 ПГШ) 0,9 (1/106 КПГ)
<i>HIF1A-AS3</i>	Xp14:62188638	G > A	rs186950290	180tj (СУПГ)	0,57	Нет данных	0,66 (1/152 ПГШ) 8 (1/12 СУПГ)
<i>HIF1A-AS3</i>	Xp14:62211390	C > G	-	119tv (ВПГ)	0,86	Нет данных	0,66 (1/152 ПГШ) 3 (1/34 ВПГ)
<i>TET2-AS1</i>	Xp4:106163909	G > A	rs143358649	018tv (ВПГ)	0,61	+	2 (3/152 ПГШ)
				055tc (КПГ)	0,60	Нет данных	1,9 (2/106 КПГ)
				062tc (КПГ)	0,59	+	3 (1/34 ВПГ)

Примечание: Xp – хромосома, КПГ – каротидная парагангиома, ВПГ – вагальная парагангиома, СУПГ – парагангиома среднего уха, ПГШ – парагангиома головы и шеи

Практически все варианты, за исключением *HIF1A-AS1*: C>T (14:62162430), располагались в области интронов. Большинство вариантов ранее были аннотированы в базе данных NCBI SNP, однако их клиническая значимость не установлена. Варианты *HIF1A-AS1*: C>T (14:62162430) и *TET2-AS1*: G>A (4:106163909) обнаружены в опухолевой и нормальной тканях нескольких пациентов, что свидетельствует об их герминальном статусе. Более того, значение частоты альтернативного варианта около 0,5 в опухолях без доступной нормальной ткани (169tj, 180tj и 055tc) также указывает на их вероятную наследственную природу. Как отмечалось выше, риск развития ПГШ часто обусловлен наследственной предрасположенностью, поэтому герминальные варианты в генах днкРНК могут быть одним из компонентов наследственного генетического профиля, способствующего развитию этих опухолей. Среди различных типов опухолей, наибольшая частота мутаций в генах днкРНК наблюдалась при парагангиомах среднего уха (8% для вариантов в *H3F3AP4* и *HIF1A-AS3*), следом при вагальных парагангиомах (3% для *HIF1A-AS3* и *TET2-AS1*) и каротидных парагангиомах (0,9% и 2% для *TET2-AS1* и *HIF1A-AS1*, соответственно). Более высокая частота вариантов при парагангиомах среднего уха может быть обусловлена небольшим размером выборки этих опухолей (12 образцов).

Каждый из вариантов в генах днкРНК *H3F3AP4*, *HIF1A-AS1*, *HIF1A-AS3* и *HIF1A-AS3* встречался только в одном из 152 исследованных образцов опухолей (~0,66%), в то время как вариант в *TET2-AS1* обнаружен в трех случаях (~2%). Более высокая частота варианта в гене днкРНК *TET2-AS1* при ПГШ с одновременно низкой популяционной частотой в доступных референсных базах данных (0,5% по gnomAD и др.) может свидетельствовать о его патогенном эффекте. С другой стороны, это также может указывать и на нейтральное действие варианта.

ДнкРНК *H3F3AP* и *TET2-AS1* мало описаны в литературе и их роль в онкогенезе остается неясной. ДнкРНК *HIF1A-AS1* и *HIF1A-AS3* являются антисмысловыми транскриптами гена *HIF1a*. Показано, что *HIF1A-AS1* участвует в регуляции апоптоза и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов и звездчатых клеток печени человека [13], [14]. Также сообщалось о повышении экспрессии *HIF1A-AS1* при колоректальном раке [15], гепатоцеллюлярной карциноме [16] и раке поджелудочной железы [17]. Дерегуляция экспрессии этой днкРНК может способствовать как прогрессированию опухолей, так и оказывать онкосупрессорный эффект через активацию апоптоза [18]. Еще одна из трех *HIF1a*-ассоциированных днкРНК *HIF1A-AS3* исследована менее обширно, показано, что она способствует прогрессии состояния гипоксии при раке яичников [19]. Одним из механизмов развития ПГШ считают состояние псевдогипоксии, возможно, днкРНК *HIF1A-AS3* также вовлечена в этот онкогенный процесс.

Данное исследование лимитировано набором доступных генетических данных – экзомы охватывают преимущественно белок-кодирующие регионы ДНК, в то время как гены днкРНК часто располагаются в межгенных областях, интронах и энхансерах. Для всестороннего профилирования вариантов в генах днкРНК необходимо полногеномное секвенирование. Для проверки онкогенного эффекта выявленных вариантов в генах днкРНК необходимо проведение экспериментальных исследований с использованием клеточных линий и модельных организмов.

Заключение

Полноэкзомный анализ ПГШ выявил однонуклеотидные замены в четырех генах днкРНК: *H3F3AP4*, *HIF1A-AS1*, *HIF1A-AS3* и *TET2-AS1*. ДнкРНК *H3F3AP4* и *TET2-AS1* мало описаны в литературе и их функция не изучена. Для двух днкРНК, *HIF1A-AS1* и *HIF1A-AS3*, ранее была показана вовлеченность в онкогенез посредством участия в регуляции апоптоза и ответа на гипоксию, соответственно. В гене днкРНК *TET2-AS1* идентифицирован генетический вариант G>A (4:106163909), который встречался в 2% исследуемых опухолей, что может указывать на его патогенное действие и вовлеченность в развитие ПГШ. Возможно, идентифицированные варианты могут оказывать влияние на функцию днкРНК и способствовать дерегуляции важных онко-ассоциированных молекулярных путей при ПГШ.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 24-14-00439, <https://rscf.ru/project/24-14-00439/>.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The research was financially supported by Russian Science Foundation grant No. 24-14-00439, <https://rscf.ru/project/24-14-00439/>.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы на английском языке / References in English

- Guttman M. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs / M. Guttman, J.L. Rinn // *Nature*. — 2012. — № 482(7385). — P. 339-346.
- Slack F.J. The Role of Non-coding RNAs in Oncology / F.J. Slack, A.M. Chinnaiyan // *Cell*. — 2019. — № 179(5). — P. 1033-1055.
- Dias N. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms / N. Dias, C.A. Stein // *Molecular Cancer Therapeutics*. — 2002. — № 1(5). — P. 347-355.
- Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression / C. Wahlestedt // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2013. — № 12(6). — P. 433-446.
- Lee G.L. Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test / G.L. Lee, A. Dobi, Sh. Srivastava // *Nature Reviews Urology*. — 2011. — № 8(3). — P. 123-124.
- Lanzós A. Discovery of Cancer Driver Long Noncoding RNAs across 1112 Tumour Genomes: New Candidates and Distinguishing Features / A. Lanzós, J. Carlevaro-Fita, L. Mularoni [et al.] // *Scientific Reports*. — 2017. — № 7. — P. 41544.
- Esposito R. Tumour mutations in long noncoding RNAs enhance cell fitness / R. Esposito, A. Lanzós, T. Uroda [et al.] // *Nature Communications*. — 2023. — № 14(1). — P. 3342.
- Li X. Oncogenic Properties of NEAT1 in Prostate Cancer Cells Depend on the CDC5L-AGRN Transcriptional Regulation Circuit / X. Li, X. Wang, W. Song [et al.] // *Cancer Reserch*. — 2018. — № 78(15). — P. 4138-4149.
- Sandow L. Paraganglioma of the Head and Neck: A Review / L. Sandow, R. Thawani, M.S. Kim [et al.] // *Endocrine Practice*. — 2023. — № 29(2). — P. 141-147.
- El-Naggar A.K. WHO classification of head and neck tumours, 4th Edition / A.K. El-Naggar, J.K.C. Chan, J.R. Grandis [et al.] // *International Agency for Research on Cancer*. — 2017. — № 9.
- Snezhkina A. Kudryavtseva A. Potential Biomarkers of Metastasizing Paragangliomas and Pheochromocytomas / A. Snezhkina, V. Pavlov, A. Dmitriev [et al.] // *Life (Basel)*. — 2021. — № 11(11). — P. 1179.
- Savvateeva M. Somatic Mutation Profiling in Head and Neck Paragangliomas / M. Savvateeva, A. Kudryavtseva, E. Lukyanova [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2022. — № 107(7). — P. 1833-1842.
- He Q. Long noncoding RNA HIF1A-AS1A reduces apoptosis of vascular smooth muscle cells: implications for the pathogenesis of thoracoabdominal aorta aneurysm / Q. He, J. Tan, B. Yu [et al.] // *Pharmazie*. — 2015. — № 70(5). — P. 310-315.
- Zhang Q-Q. TET3 mediates the activation of human hepatic stellate cells via modulating the expression of long non-coding RNA HIF1A-AS1 / Q-Q. Zhang, M-Y. Xu, Y. Qu [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. — 2014. — № 7(11). — P. 7744-7751.
- Gong W. Elevated serum level of lncRNA-HIF1A-AS1 as a novel diagnostic predictor for worse prognosis in colorectal carcinoma / W. Gong, M. Tian, H. Qiu [et al.] // *Cancer Biomark*. — 2017. — № 20(4). — P. 417-424.
- Hong F. Inhibition of HIF1A-AS1 promoted starvation-induced hepatocellular carcinoma cell apoptosis by reducing HIF-1 α /mTOR-mediated autophagy / F. Hong, Y. Gao, Y. Li [et al.] // *World Journal of Surgical Oncology*. — 2020. — № 18(1). — P. 113.

17. Vasaikar S. Proteogenomic Analysis of Human Colon Cancer Reveals New Therapeutic Opportunities / S. Vasaikar, C. Huang, X. Wang [et al.] // *Cell*. — 2019. — № 177(4). — P. 1035-1049.
18. Zhang J. Deciphering the molecular mechanism of long non-coding RNA HIF1A-AS1 regulating pancreatic cancer cells / J. Zhang, Y. Sun, J. Ma [et al.] // *Annals of Medicine and Surgery*. — 2024. — № 86(6). — P. 3367-3377.
19. Xie W. A novel hypoxia-stimulated lncRNA HIF1A-AS3 binds with YBX1 to promote ovarian cancer tumorigenesis by suppressing p21 and AJAP1 transcription / W. Xie, W. Wang, S. Meng [et al.] // *Molecular Carcinogenesis*. — 2023. — № 62(12). — P. 1860-1876.