



<https://doi.org/10.5564/pib.v37i1.3141>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Splicing mutation of the *TP53* gene in hepatocellular carcinoma

Khurelsukh Buyanbat¹, Ariya Enkhtuya¹, Nomuun Oyunbat¹, Zolzaya Sandag¹, Tuul Boldbaatar¹,
Maral Davaanyam¹, Nomin Bold¹, Ankhbayar Enkhbaatar², Gan-Erdene Baatarjav², Taivan
Nanzaddorj², Oyunsuren Tsendsuren¹, Gantulga Davaakhuu¹

¹Laboratory of Molecular biology, Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences

²Department of General Surgery, Second State Central Hospital, Ulaanbaatar, Mongolia
Received .23 August 2021; received in revised: 19 September; accepted 26 October 2021

Abstract

The tumor suppressor gene *TP53* participates in the important regulations and activities of the cell such as cell cycle, apoptosis, repairing damage of DNA and gene expression and its mutation occurs at a higher rate in most tumor cases. When mutation of gene *TP53* occurs, protein p53 loses its function leading to increase in the probability of unregulated division of abnormal cells. We studied mutations of the *TP53* gene in operation samples of liver cells of patients diagnosed with hepatocellular carcinoma. In order to do this, total RNA molecules were isolated from liver tissue samples of the patients and exon 4 to exon 11 of *TP53* gene were amplified by using polymerase chain reaction. Interestingly, a mutation occurred in sample number T30 during synthesis of the *TP53* gene, where an intron 7 was not spliced. In the sample T30, intron 7 was not spliced due to deletion of sequence section responsible for recognition and binding at the 5' spliceosome. Therefore, a reading frame of the protein is altered and a stop codon is appeared at the intron resulting in disruption in the synthesis of the protein p53, which lead to protein deficiency and a weakness of regulation against the tumor in the cell that may have caused carcinoma.

Keywords: mRNA, *TP53*, mutation, tumor

Introduction

In 2018, the incidence of hepatocellular carcinoma was 93.7 per 100,000 in our population making it the country with the highest prevalence of hepatocellular carcinoma in the world [1]. Therefore, in order to reduce the prevalence of Hepatocellular carcinoma, it is critical to understand the molecular mechanisms of tumorigenesis by studying genetical and molecular causes. Among the tumor suppressor genes, the *TP53* gene has the highest mutation rate (> 30%) in most tumor cases [2]. This gene is located on chromosome 17 of human cells, with 9 transcripts and synthesized p53 with 393 amino acids and a molecular weight of 53 kDa. The tumor suppressor gene *TP53* participates in the important regulations and activities of cells such as cell cycle, apoptosis, repairing DNA damage and gene

expression and its mutation occurs in most cases of the tumor at a higher rate [3]. Phosphorylated p53 protein destroys the cells with extensive DNA damage via apoptosis. However, when gene *TP53* mutation occurs, protein p53 loses its function leading to increase in the probability of unregulated division of abnormal cells. Hotspot mutations occur in the DNA-binding domain, which is the functional domain of the *TP53* gene involved in the regulation of DNA replication and transcription [4]. However, splicing mutation has been reported to be very rare for hepatocellular carcinoma [5]. This study identified splicing mutations in the tumor suppressor *TP53* gene that occurs in hepatocellular carcinoma.

*Corresponding author:

E-mail address: khurelsukhb.mas.ac.mn

Materials and Methods

This study used a postoperative sample of human liver cancer. This study was conducted in accordance with the relevant Ethical Permit. Using the Qiagen RNasy minikit, total RNA was isolated from liver samples after operation later synthesized the cDNA according to the manufacturer's instructions. Subsequently, exons 4-11 of the *TP53* gene were amplified using PCR. Primers used: forward primer hTP53-F (AGGGCAGCTACGGTTTCCGTCT), reverse primer hTP53-R (TCAGTCTTGA GTCAGGCCCTTCTGTC). The reaction was performed using the Applied Biosystems 2720 thermal cycler machine. Results were visualized on a 1.5% agarose gel and the nucleotide sequence was determined by MacroGen Biotechnology, Korea.

Results

In our study, PCR was performed using the above primer molecules in samples of liver cancer and non-cancer (N30) cells. PCR produced 873 bp of non-cancerous tissue samples, whereas cancer sample 1210 bp DNA. Figure 1 shows the results of PCR. Mutations in the *TP53* gene of the T30 sample are shown in Figure 2 and compared to the wild type sequence of genes by exon and intron positions. Of these, in the sample T30, an intron 7 was not spliced due to deletion of sequence section (CAGGTCA) responsible for recognition and binding at the 5' spliceosome.

Therefore, a reading frame of the protein was altered and a stop codon has appeared (Figure 3).

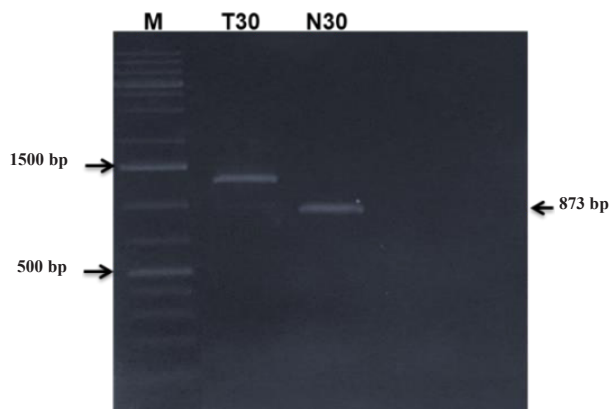


Figure 1. PCR electrophoregram of the *TP53* gene

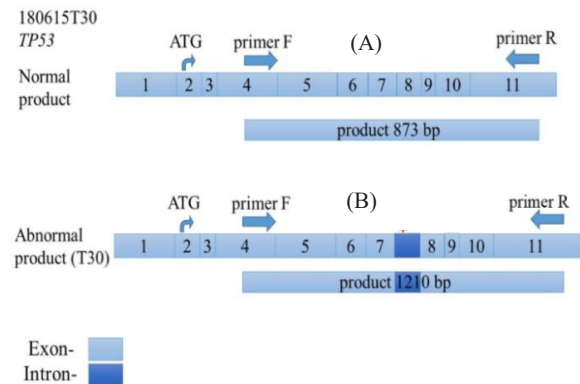


Figure 2. Mutation of the *TP53* gene in T30 samples. (A) wild type mRNA and PCR product of the *TP53* gene, and (B) mutations in the T30 sample, the intron 7 retention between exon 7 and exon 8, resulted no splicing and 1210 base pair of PCR product

This mutation might be occurred during synthesis of the *TP53* gene in sample T30 due to failure of the intron 7 containing 337 base pairs to splice. The intron 7 was not spliced because the sequence section to recognize and bind at the 5' spliceosome of this intron was deleted, therefore a reading frame of the protein was altered and consequently the stop codon appeared. Figure 4 shows APE program which was used to compare the nucleotide sequence of T30 sample with the wild type sequence of the *TP53*.

Discussion

Results of our study identified sequences and mutations of *TP53* gene for hepatocellular carcinoma, enabling further studies at the p53

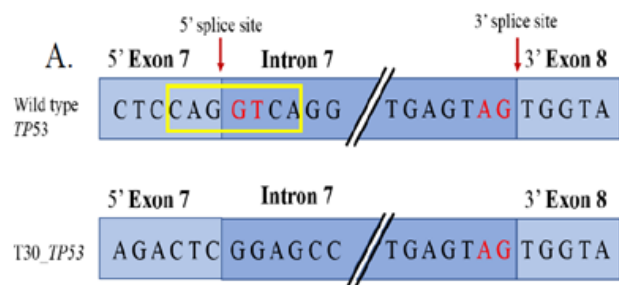


Figure 3. The nucleotide sequence of the T30 sample was compared with the wild type sequence of the *TP53* gene. The 7th Intron's 5' split site was included in the deletion

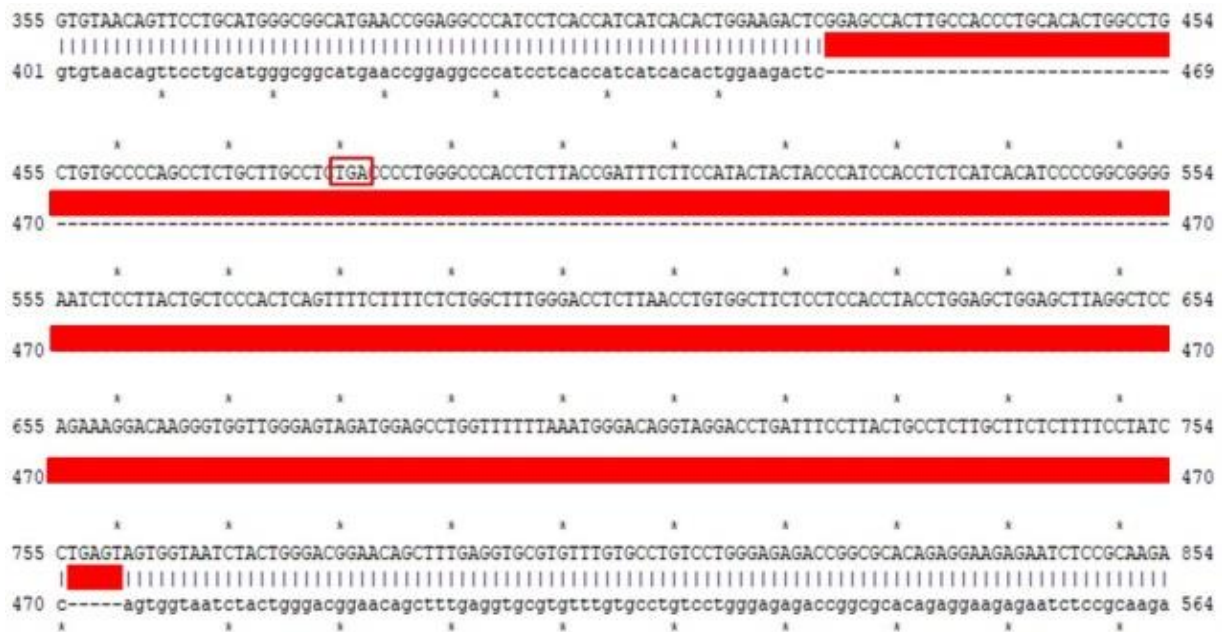


Figure 4. The Ape program was used to compare the nucleotide sequence of the 7th intron residue of the T30 sample with the mRNA of the TP53 gene. This line indicates that intron 7 does not match with the wild type sequence of the TP53 gene. The red square shows the stop codon

protein level. In the study by Ming-Yang Lai (1993), 45 samples of patients diagnosed with hepatocellular carcinoma in Taiwan had splicing mutation that remained in the intron of 3 samples of hepatitis B virus (HBV) infection. One of these cases corresponds to mutation in the detected HBV-related sample [5]. Of these, the detection and frequency of mutations in the human TP53 gene may be important for early detection, diagnosis, and treatment of liver cancer.

Conclusion

The mutation found in the T30 sample of human liver cancer cells prevented intron splicing because the 5' spliceosome of the intron 7 was recognized and included in the deletion. Therefore, a reading frame of the protein is altered and a stop codon has occurred in the intron, resulting to a disruption of p53 protein expression, which leads to protein deficiency and weakness of regulation against tumor in the cell, which can cause carcinoma. Furthermore, the above mutation did not occur, in non-cancerous tissue (N30), which could be further evidence that the tumor is caused by a splicing mutation.

For further research, it is necessary to increase the number of samples, identify the role and frequency of mutations in hepatocellular carcinoma, and to study at the protein level.

Reference

- [1] Эрүүл Мэнд Хөгжлийн төв, Үндэсний Статистикийн Хороо. Хавдрын өвчлөл, нас баралт, 2018.
- [2] Ding XX, Zhu QG, Zhang SM. *Precision medicine for hepatocellular carcinoma: driver mutations and targeted therapy*. Oncotarget, p3-16, 2017.
- [3] Maria LT, Luigi B, Fabiana T. *Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infection*. Elsevier, 102, p3-10, 2013.
- [4] Paek A, Liu JC, Loewer A. *Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing*. Cell, 165 p7-13, 2016.
- [5] Lai MY, Hua-Chen, Chang, Li HP. *Splicing Mutations of the p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma*. Cancer research, p5-3, 1993.



Элэгний хорт хавдрын эсэд үүссэн *TP53* генийн сплайсинг мутаци

Буянбатын Хүрэлсүх, Энхтуяагийн Арьяа, Сандагийн Золзаяа, Оюунбатын Номуун, Болдбаатарын Туул, Даваанямын Марал, Болдын Номин, Энхбаатарын Анхбаяр*, Баатаржавын Ган-Эрдэнэ*, Нанзаддоржын Тайван*, Цэндсүрэнгийн. Оюунсүрэн, Даваахүүгийн Гантулга

**Улсын Хоёрдугаар Төв Эмнэлэг, Ерөнхий мэс заслын тасаг*

Шинжлэх Ухааны Академийн, Биологийн хүрээлэн, Молекул биологийн лаборатори

Хүлээн авсан 2021.8.23; Хянан тохиолдуулсан 2021.9.19; Зөвшөөрсөн 2021.10.26

Хураангуй

Хавдар дарангуйлагч *TP53* ген нь эсийн мөчлөг, апоптоз, ДНХ-ийн гэмтлийг засах, генийн экспресс зэрэг эсийн чухал зохицуулгууд, үйл ажиллагаанд оролцдог бөгөөд уг генийн мутаци ихэнх хорт хавдрын үед өндөр давтамжтай тохиолддог. *TP53* генд мутаци үүсэх үед *p53* уураг нь үүргээ алдаж хэвийн бус эсүүд зохицуулагагүйгээр хуваагдах магадлал ихэснэ. Бид элэгний хорт хавдар оноштой хүний хавдрын эсэд *TP53* генийн мутацийн судалгаа хийв. Үүний тулд элэгний эдээс нийт РНХ молекул ялгаж улмаар *TP53* генийн 4-11-р экзоны хэсгийг полимеразын гинжин урвал (ПГУ)-аар олшруулан судалгаанд ашигласан. Судалгааны дүнд 1 дээжид (Т30 дугаартай) *TP53* генийн нийлэгжлийн явцад интрон 7 нь сплайсингид ороогүй мутаци илэрсэн. Тухайлбал, 7-р интроны 5'сплайсом таньж холбогдох дараалал бүхий хэсэг делецид орсон тул уг интроны сплайсинг явагдаагүй байна. Үүний улмаас уургийн уншигдах хүрээнд өөрчлөлт орж уг интроны хэсэгт зогс кодон илэрснээр *p53* уураг бүрэн нийлэгжээгүй тул уг уургийн хэмжээ багасч эсийн хавдрын эсрэг зохицуулга суларч хавдар үүссэн байж болзошгүй юм.

Түлхүүр үгс: мРНХ, *TP53*, мутаци, хавдар

Оршил

Манай хүн амын дунд элэгний хорт хавдар 2018 оны байдлаар 100,000 хүн тутамд 93,7 тохиолдсон тул дэлхийд элэгний хавдраар хамгийн өндөр тархалттай улсад тооцогдох болсон [1]. Иймээс нийгмийн тулгамдаж буй асуудлуудын нэг болох элэгний хорт хавдрын тархалтыг багасгахын тулд уг хавдар үүсэх генетик, молекул биологийн шалтгааныг судалж хавдрын молекул механизмыг ойлгох нь нэн шаардлагатай юм. Хавдар дарангуйлагч генүүдийн дотроос *TP53* ген нь ихэнх хавдруудад хамгийн өндөр мутацийн давтамжтай (>30%) байдаг [2]. Уг ген нь хүний эсийн 17-р хромосомд байрладаг,

9 транскрипттай бөгөөд 393 амин хүчил бүхий 53 кДа молекул жинтэй *p53* уургийг нийлэгжүүлдэг. *TP53* ген нь эсийн мөчлөг, апоптоз, ДНХ-ийн гэмтлийг засах, генийн экспресс зэрэг эсийн чухал зохицуулгууд, үйл ажиллагаанд оролцдог бөгөөд уг генийн мутаци ихэнх хавдрын үед өндөр давтамжтай тохиолддог [3]. *p53* уураг фосфоржиж улмаар ДНХ нь их хэмжээгээр гэмтэлд орсон эсийг апоптозын замаар хөнөөдөг. Гэвч *TP53* ген дээр мутаци үүсэх үед *p53* уураг нь үүргээ алдаж хэвийн бус эсүүд зохицуулагагүйгээр хуваагдах магадлал ихэснэ [4]. Цэгэн мутациуд нь ихэвчлэн *TP53* генийн үйл ажиллагаа хариуцсан домейн болох ДНХ-тэй холбогдох

**Холбоо барих зохиогч*

Цахим хаяг: khurelsukhb.mas.ac.mn

домейн дээр тохиолддог бөгөөд энэ домейн нь ДНХ-ийн засвар, транскрипцийн зохицуулагад оролцдог. Харин сплайсинг мутаци элэгний хорт хавдрын үед тун ховор тохиолддог талаар мэдээлсэн байдаг [5]. Бид энэхүү судалгаанд элэгний хорт хавдрын эсэд хавдар дарангуйлагч *TP53* генийн мутаци илрүүлж энэ нь сплайсинг мутаци болохыг тодорхойлсон.

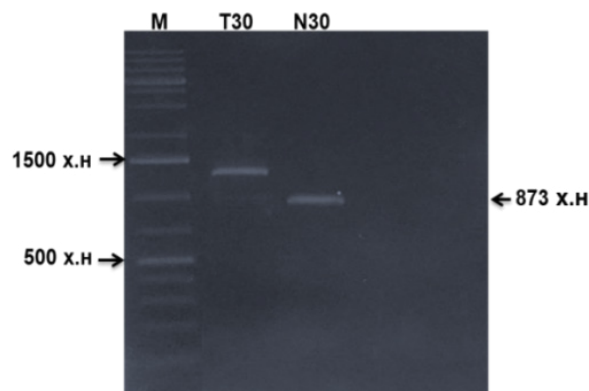
Судалгааны материал, арга зүй

Энэхүү судалгаанд хүний элэгний хорт хавдрын хагалгааны дараах дээж материалыг ашигласан. Судалгааг холбогдох ёсзүйн зөвшөөрөлийн дагуу хийж гүйцэтгэсэн болно. Элэгний дээжээс QIAGEN RNeasy mini kit ашиглан зааврын дагуу нийт РНХ-г ялгаж комплементар ДНХ-д хөрвүүлсэн. Улмаар *TP53* генийн 4-11-р экзоны хэсгийг дараах праймер ашиглан ПГУ-аар олшруулан 873 хос нуклеотид (хн) бүхий ДНХ-ийн бүтээгдэхүүнийг гарган авсан. Ашигласан праймерууд: шууд праймер hTP53-F (AGGGCAGCTACGGTTTCCGTCT), урвуу праймер hTP53-R (TCAGTCTTGAGTCAGGCCCTTCTGTC). Урвалыг Applied Biosystems 2720 Thermal cycler машин ашиглан явуулсан. Үр дүнг агарозын 1,5% гелд шалган нуклеотидийн дарааллыг Солонгос улсын Макрожен (Macrogen) Биотехнологийн компанид тогтоосон.

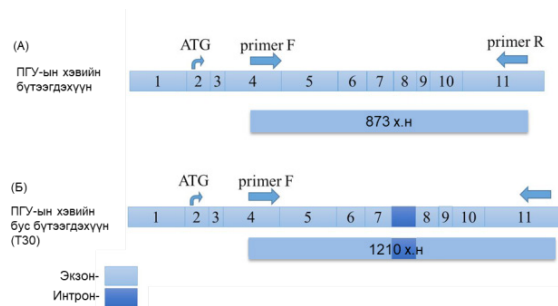
Судалгааны үр дүн

Бид судалгаанд нийт элэгний хавдрын, хавдрын бус буюу хяналтын нэг (N30) дээжид дээрх праймер молекулууд ашиглан ПГУ-ын явуулсан. Хавдрын бус эдийн (N30) дээжинд ПГУ-ын дүнд 873 хн бүтээгдэхүүн үүссэн бол хорт хавдрын 1 дээжид 1210 хн бүхий ДНХ-ийн бүтээгдэхүүн үүссэн. Т30 дугаартай хорт хавдрын дээж болон хавдрын бус дээжний ПГУ-ын үр дүнг 1-р зурагт харуулав. Дээрх Т30-р дээжний *TP53* генийн мутацийг экзон, интроны байрлалаар нь уг генийн хэвийн дараалалтай харьцуулан 2-р зурагт харуулав.

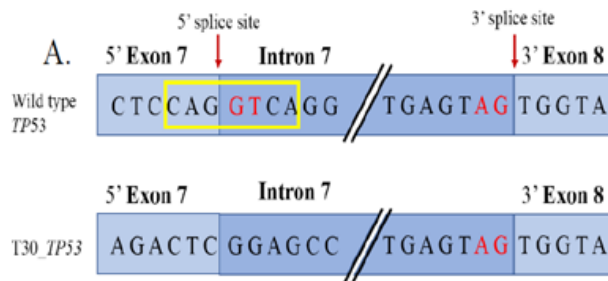
Эдгээрээс бид Т30-р дээжний 7-р интроны 5'сплайсом таньж холбогдох дараалал бүхий хэсэг (CAGGTCA) делецид орсон тул уг



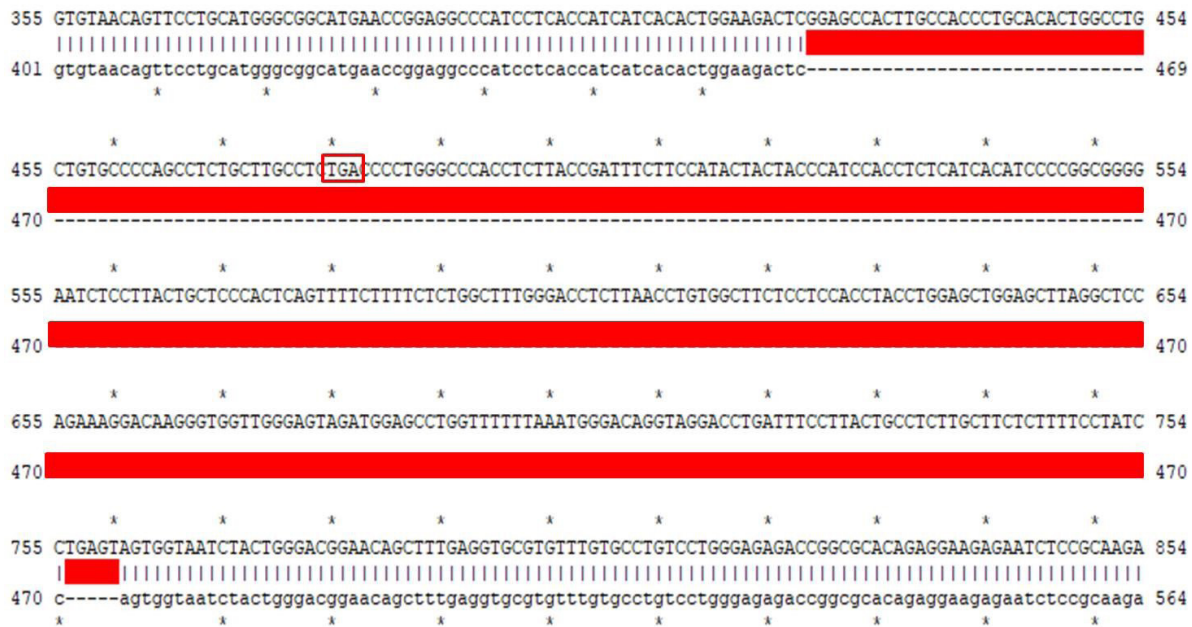
1-р зураг. *TP53* генийн ПГУ-ын электрофореграмм



2-р зураг. Т30-р дээжний *TP53* генийн мутаци. (А) *TP53* генийн мРНХ болон ПГУ-ын хэвийн бүтээгдэхүүний хэмжээ (873хн), (Б) Т30-р дээжний мутаци буюу 7-р экзон ба 8-р экзоны хооронд үлдсэн 7-р интроны улмаас сплайсинг явагдаагүй тул ПГУ-ын дүнд 1210 хн бүтээгдэхүүн үүссэн.



3-р зураг. *TP53* генийн хэвийн (Wild type) дарааллыг Т30-р дээжний уг генийн нуклеотидын дараалалтай харьцуулсан байдал. 7-р интроны 5'сплайсинг сайт (улаанаар) ба түүний мутаци



4-р зураг. АрЕ програмыг ашиглан TP53 генийн мРНХ дээр Т30-р дээжний 7-р интрон үлдсэн хэсгийн нуклеотидын дарааллыг харьцуулав. Шугамаар 7-р интроныг TP53 генийн хэвийн дараалалтай тохирохгүй байгааг харуулж байна. Дөрвөлжин улаанаар зогс кодоныг үзүүлэв.

интроны сплайсинг явагдаагүйгээс шалтгаалж генийн мутаци үүссэн ба дээрх мутацийн улмаас уургийн уншигдах хүрээнд өөрчлөлт орж уг интроны хэсэгт зогс кодон илэрсэн гэж үзсэн. Үүнийг 3-р зурагт харуулав.

Энэ нь Т30-р дээжний TP53 генийн экспрессийн явцад 337 хн бүхий интрон 7 сплайсингид ороогүйн улмаас үүссэн мутаци юм. Тухайлбал, Т30-р дээжний сплайсинг мутаци нь 7-р интроны 5'сплайсом таньж холбогдох дараалал бүхий хэсэг делецид орсон тул уг интроны сплайсинг явагдаагүйн (3-р зураг) улмаас уургийн уншигдах хүрээнд өөрчлөлт орж уг интроны хэсэгт зогс кодон үүссэн. Улмаар бид АрЕ программ ашиглан Т30-р дээжний нуклеотидын дарааллыг TP53 генийн хэвийн дараалалтай харьцуулан үзсэн байдлыг 4-р зурагт харуулав.

Хэлэлцүүлэг

Бидний судалгаа нь элэгний хорт хавдрын TP53 генийн дараалал болон мутацийг тодорхойлж байгаагаараа онцлог бөгөөд цаашид түүнийг р53 уургийн түвшинд судлах боломжтойг харуулав. Мин-Яан Лай (1993) нарын судалгаагаар Тайланд элэгний хорт хавдар

оноштой 45 өвчтөний дээжний хепатитийн В вирусийн (HBV) халдвартай 3 дээжид интроны хэсэг үлдсэн сплайсинг сайтын мутацийг илрүүлсэн бөгөөд тэдгээрийн нэг тохиолдол нь бидний илрүүлсэн HBV-ийн халдвартай Т30-р дээжний мутацитай дүйж байна [5]. Эдгээрээс хүний TP53 генийн мутацийг илрүүлэх, түүний давтамжийг тодорхойлох нь элэгний хорт хавдрыг эрт илрүүлэх, оношлох ач холбогдолтой байж болох бөгөөд эмчилгээний ач холбогдолтой гэж үзэж байна.

Дүгнэлт

Хүний элэгний хавдрын эсийн Т30-р дээжид илэрсэн мутацийн дүнд 7-р интроны 5'сплайсом таньж холбогдох дараалал бүхий хэсэг делецид орсон тул уг интроны сплайсинг явагдах боломжгүй болсон. Үүний улмаас уургийн уншигдах хүрээнд өөрчлөлт орж уг интроны хэсэгт зогс кодон үүссэн учир уургийн экспресс явагдахгүй тул эс дэх р53 уургийн хэмжээ багасаж эсийн хавдрын эсрэг зохицуулга бүрэн ажиллах чадваргүй болж эсэд хавдар үүссэн байж болзошгүй юм.

Мөн уг эдийн дээжний хавдаргүй эдийн хэсэгт (N30) дээрх мутаци илрээгүйг үндэслэн тус

хавдар нь генийн сплайсинг мутациас үүдэлтэй гэж үзэх нотолгоо болно.

Цаашид судалгааг үргэлжлүүлж дээжний тоог нэмэгдүүлэн элэгний хавдрын үе дэх мутацийн үүрэг, давтамжийг тогтоох, уургийн түвшинд судлах шаардлагатай байна.

Эшлэл авсан бүтээл

- [1] Эрүүл Мэнд Хөгжлийн төв, Үндэсний Статистикийн Хороо. *Хавдрын өвчлөл, нас баралт*, 2018.
- [2] Ding XX, Zhu QG, Zhang SM. *Precision medicine for hepatocellular carcinoma: driver mutations and targeted therapy*. Oncotarget, p3-16, 2017.
- [3] MariaLT, LuigiB, FabianaT. *Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infection*. Elsevier, 102, p3-10, 2013.
- [4] Paek A, Liu JC, Loewer A. *Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing*. Cell, 165 p7-13, 2016.
- [5] Lai MY, Hua-Chen, Chang, Li HP. *Splicing Mutations of the p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma*. Cancer research, p5-3, 1993.