

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича  
Российской академии наук

*На правах рукописи*



Андрианова Мария Александровна

**Характеристики точечного мутагенеза в раковых клетках человека**

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН).

**Научный руководитель:** **Базыкин Георгий Александрович**  
доктор биологических наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук

**Официальные оппоненты:** **Имянитов Евгений Наумович**  
доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Раменский Василий Евгеньевич**  
кандидат физико-математических наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное Учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2019 года в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 002.077.04 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук по адресу: 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН), а также на сайте ИППИ РАН по адресу <http://iitp.ru/ru/dissertation/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Рожкова Г. И.

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы исследования.** Рак – это группа заболеваний, характеризующихся бесконтрольным ростом и делением клеток, которые могут проникать в близлежащие части организма и распространяться в другие органы. Раковые образования очень гетерогенны: даже в одном конкретном органе они отличаются между пациентами по фенотипам и генотипам, по скоростям развития и прогнозам. Считается, однако, что все они вызваны генетическими изменениями, приводящими к нарушению пролиферации и дифференцировки клеток.

Широкое разнообразие раковых опухолей, сложность их диагностики и лечения привели к тому, что в период активного развития технологий секвенирования были прочитаны геномные и экзомные последовательности огромного количества раковых образцов. Более того, объем таких данных продолжает увеличиваться с каждым годом. В настоящий момент молекулярная диагностика является неотъемлемой частью постановки диагноза для многих типов опухолей.

В результате секвенирования определяется нуклеотидная последовательность ДНК ракового образца. При сравнении ее с последовательностью здоровых клеток того же индивида можно определить мутации, характерные непосредственно для ракового образца. Полученные таким образом мутации можно исследовать с разных точек зрения. Например, можно изучать гены и функциональные участки ДНК, обогащенные мутациями в определенном типе рака, то есть заниматься поиском потенциальных генов и мутаций-драйверов развития опухоли данного типа. Это одна из необходимых прикладных задач молекулярной диагностики.

Известно, что большинство раковых образцов характеризуются достаточно высокими скоростями мутирования. Среди всех мутаций, наблюдаемых в раковом образце, в среднем лишь около 4 мутаций являются драйверами развития опухоли [1], то есть мутациями, которые находились под положительным отбором и привели к селективному преимуществу клетки – увеличению выживаемости и пролиферации. Остальные мутации являются «пассажирскими», и накапливались без прямого влияния положительного отбора [2]. Поскольку большинство из таких «пассажирских» мутаций не подвергались действию отбора, исследование их свойств является очень интересной задачей: они содержат информацию о мутационных процессах, происходивших в опухоли. Исследование спектров мутирования (то есть типов нуклеотидных замен и их контекстной зависимости), особенностей распределения мутаций вдоль генома и между цепями ДНК помогает лучше понять процесс возникновения и развития опухоли. Это дает представление о мутационных процессах, приводящих к повреждениям ДНК, а также о системах репарации, ответственных за исправление этих повреждений.

В данной работе проведен подробный анализ характеристик точечных мутаций в различных раковых образцах. Во второй главе диссертации с помощью анализа характеристик мутаций и их геномного распределения исследуются особенности молекулярных механизмов репликации и репарации в клетках человека, в том числе

и в здоровых. В третьей главе аналогичные данные используются для уточнения причин и особенностей развития раковых опухолей в двух конкретных случаях детских раков мозга. В четвертой главе анализ распределения и свойств мутаций помогает подробнее разобраться в особенностях возникновения и репарации повреждений в отдельном типе рака, а именно в базальноклеточной карциноме. В пятой главе показано, что подробное исследование мутаций раковых образцов помогает восстановить историю развития опухоли, а именно узнать, какие мутационные процессы действовали на разных этапах развития опухоли, как это влияет на мутационный профиль и распределение мутаций по геному.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы являлось подробное изучение характеристик точечного мутагенеза в образцах раковых опухолей человека: мутационных спектров, распределения мутаций вдоль генома и между цепями ДНК.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- 1) описать мутационные спектры и асимметрию точечных мутаций между цепями ДНК в раковых образцах с инактивированной системой репарации неправильно спаренных нуклеотидов и мутациями в экзонуклеазных доменах основных репликативных полимераз эпсилон и дельта;
- 2) описать мутационные спектры и асимметрию точечных мутаций в раковых образцах детской глиобластомы с ультрамутабельным фенотипом, а также проанализировать положительный отбор в этих образцах;
- 3) описать мутационные спектры и асимметрию точечных мутаций в раковых образцах самого частого рака кожи - базальноклеточной карциномы;
- 4) описать мутационные спектры, распределение мутаций вдоль генома, а также их асимметрию между цепями ДНК на разных этапах развития раковой опухоли.

**Научная новизна и практическая значимость.** В предыдущих работах было показано, что скорость накопления мутаций различается между лидирующей и отстающей цепями ДНК, в том числе и в раковых клетках человека. Это называется репликационной асимметрией. В частности, она была показана для раковых образцов с инактивированной системой репарации неправильно спаренных нуклеотидов [3]. Однако природа этой асимметрии оставалась неясной. В настоящей работе впервые показано, что данная асимметрия вызвана тем, что полимеразы дельта при репликации отстающей цепи вносят больше ошибок, чем полимеразы эпсилон при репликации лидирующей цепи. Также впервые показано, что система репарации неправильно спаренных нуклеотидов в клетках человека компенсирует неравномерность скоростей мутирования между лидирующей и отстающей цепями, удаляя больше неправильно спаренных нуклеотидов на отстающей цепи.

Благодаря использованию информации о репликационной асимметрии удалось показать, что ультрамутабельный фенотип в исследуемых образцах детских глиобластом с врожденной биаллельной инактивацией системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов вызван обилием мутаций на лидирующей цепи

ДНК ввиду инактивации экзонуклеазного домена полимеразы эпсилон и системы репарации. Подобные анализы могут быть использованы и для других раковых образцов с подозрением на инактивацию системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов или экзонуклеазных доменов репликативных полимераз для уточнения молекулярного механизма развития опухоли.

В работе впервые описаны особенности возникновения повреждений и их репарации в базальноклеточной карциноме, для чего использован подробный анализ спектров мутирования и транскрипционной асимметрии в данном типе рака, а также сравнение с другим хорошо изученным типом рака кожи – меланомой.

Более того, проанализированы спектры мутирования и распределение мутаций вдоль генома и между цепями ДНК для мутаций, возникших на разных стадиях развития раковой опухоли. Впервые показано, что изменение интенсивности мутационного процесса можно увидеть внутри одного конкретного ракового образца даже при секвенировании целого фрагмента опухоли. Также показано, что мутационный процесс, действующий в опухоли в конкретный момент времени, изменяет профиль мутаций и их распределение по геному согласно характерным особенностям этого мутационного процесса. Знания об изменении мутационного спектра и локальных скоростей мутирования в ходе развития раковой опухоли могут быть использованы для поиска субклональных драйверных мутаций.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Полимераза дельта, реплицирующая отстающую цепь ДНК, вносит больше ошибок при репликации, чем полимеразы эпсилон на лидирующей цепи. Система репарации неправильно спаренных нуклеотидов в клетках человека компенсирует неравномерность скоростей мутирования между лидирующей и отстающей цепями, удаляя больше неправильно спаренных нуклеотидов на отстающей цепи.
2. Врожденная биаллельная инактивация системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов и последующая соматическая мутация в экзонуклеазном домене полимеразы эпсилон приводят к ультрамутабельному фенотипу опухоли ввиду избытка повреждений на лидирующей цепи ДНК, внесенных полимеразой эпсилон и не исправленных системой репарации неправильно спаренных нуклеотидов.
3. Доля мутаций под положительным отбором в ультрамутабельных глиобластомах как минимум в 2 раза меньше, чем в других глиобластомах.
4. В базальноклеточной карциноме большая доля мутаций вызвана УФ, чем в меланоме. Эффективность репарации этих мутаций также выше в базальноклеточной карциноме. Мутации цитозина в аденин в базальноклеточной карциноме и в меланоме имеют разную природу: в базальноклеточной карциноме они преимущественно являются мутациями окисления гуанина, в то время как в меланоме – смесью мутаций окисления гуанина и мутаций цитозина под действием УФ.
5. В ходе развития отдельно взятой раковой опухоли наблюдается изменение в относительной активности разных мутационных процессов. Это приводит к

изменению мутационных спектров, а также распределения мутаций вдоль генома и между цепями ДНК во времени.

**Личный вклад автора в исследование.** Все результаты, включенные в диссертацию, получены лично соискателем или при его непосредственном участии, за исключением разделов 3.2.1-3.2.5, выполненных соавторами публикации. Обсуждение и интерпретация результатов осуществлялись автором совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

**Степень достоверности и апробация результатов.** По материалам диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены на Московской международной конференции по биоинформатике (Bioinformatics'16) и Московской международной конференции по вычислительной молекулярной биологии (Moscow Conference on Computational Molecular Biology – МССМВ'17), на международной встрече Abscam'17 “Геномные перестройки и мутационные подписи в развитии и раке” (Бостон, США), на международной встрече Human Genome Meeting 2017 “От геномики к терапии” (Барселона, Испания), на 7-й немецко-российской неделе молодых исследователей 2017 (Москва, Россия), на конференции Gen-Y 2017 (Сочи, Россия).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение в четырех главах, основные результаты и выводы. В конце приведён список литературы. Материал включает 37 рисунков и 9 таблиц в основном тексте, 9 рисунков и 7 таблиц в приложении, а также список литературы, содержащий 128 ссылок.

### **Содержание работы.**

**Во Введении** обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и аргументирована научная новизна исследований, показана практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту положения.

**В первой главе** приведен обзор литературы по теме диссертации, состоящий из семи разделов.

**В разделе 1.1** вводится понятие «мутационная подпись». Приводятся примеры и краткая характеристика мутационных процессов, оставляющих характерные мутационные подписи. Кратко говорится о том, что системы репарации клетки также влияют на наблюдаемые в раковых образцах наборы мутаций, то есть также оставляют мутационные подписи. В этом разделе также описан метод, с помощью которого были выделены основные распространенные в раковых образцах мутационные подписи, принимаемые сейчас в качестве «золотого стандарта» [4; 5]. Со списком и описанием этих подписей можно ознакомиться на сайте базы данных

COSMIC ([https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures\\_v2](https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures_v2)). Эта же классификация используется в данной работе.

**В разделе 1.2** рассказывается о процессе репликации как одном из источников мутаций. Описывается классическая модель вилки репликации эукариот [6], в которой процесс репликации лидирующей и отстающей цепей ДНК разделен между полимеразой эpsilon и дельта соответственно.

**В разделах 1.3 – 1.4** приводится более подробное описание процессов репарации с характерными мутационными подписями, об исследовании которых идет речь в диссертации, а именно – репарации неправильно спаренных нуклеотидов (MMR) и эксцизионной репарации нуклеотидов, ассоциированной с транскрипцией (TC-NER).

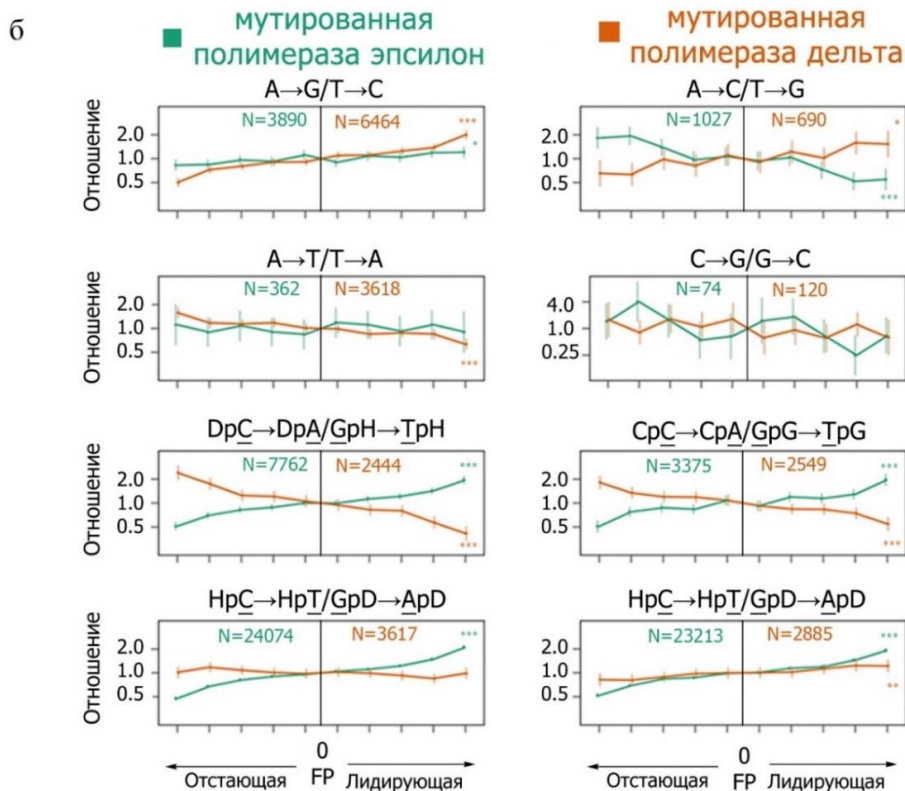
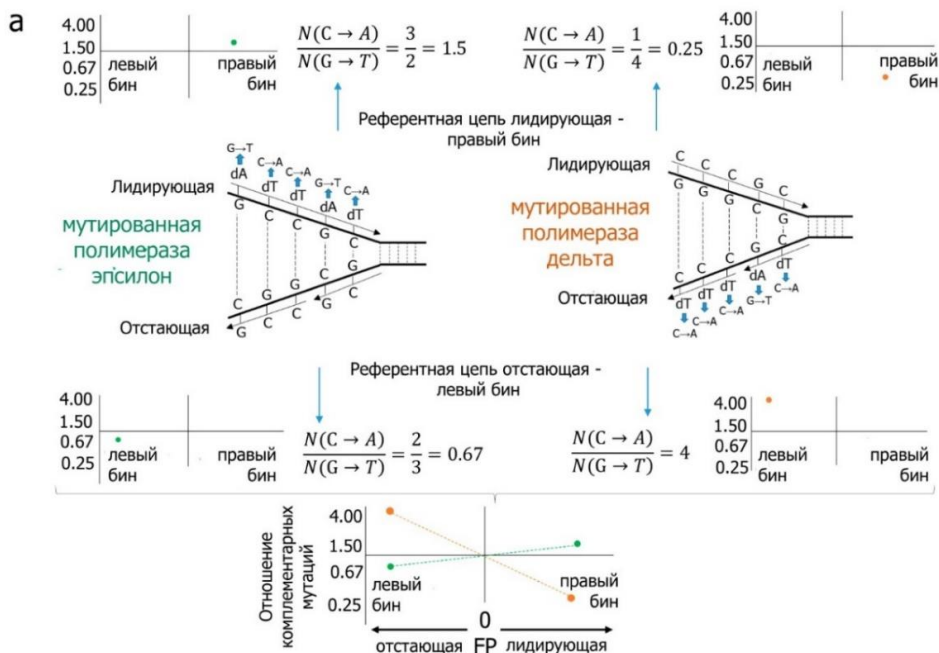
**Разделы 1.5 и 1.6** посвящены неравномерности распределения мутаций в геноме, а именно гетерогенности мутаций вдоль генома и их асимметрии между двумя цепями ДНК.

**В разделе 1.7** описан процесс изменения мутационных процессов и соответствующих мутационных подписей во времени в ходе развития раковой опухоли.

**Во второй главе** представлены результаты исследования асимметрии скоростей мутирования на лидирующей и отстающей цепях ДНК. Известно, что в раках с инактивированной MMR наблюдается репликационная асимметрия (различие в скоростях мутирования на лидирующей и отстающей цепях ДНК) [3]. Природа данной асимметрии до сих пор оставалась неизвестной. В данной главе описан метод, с помощью которого мы установили, что репликационная асимметрия в данном случае вызвана различиями в точности основных репликативных полимераз эpsilon и дельта, и что MMR компенсирует эти различия, эффективнее исправляя повреждения на отстающей цепи ДНК.

На первом шаге мы исследовали особенности точечного мутагенеза в раковых образцах с врожденной биаллельной поломкой систем репарации неправильно спаренных нуклеотидов (bMMRD) и мутацией в экзонуклеазном домене одной из основных репликативных полимераз - полимеразы эpsilon или дельта [7; 8]. Наличие такой мутации снижает точность полимеразы и приводит к увеличению скорости мутирования в десятки раз. Мы обнаружили, что мутационный спектр в таких раковых образцах отличается от спектра в образцах с репликативными полимеразами дикого типа. В частности, образцы с биаллельной инактивацией MMR и мутацией в экзонуклеазном домене полимеразы эpsilon сильно обогащены мутациями C→T, особенно в контексте GpCpG (подчеркнутый нуклеотид мутирует), а также мутациями C→A в контексте NpCpT→A (N = A/T/G/C). В ходе подробного анализа мутационных спектров нам также удалось установить этиологию одной из мутационных подписей и уточнить этиологию другой. Среди известных мутационных подписей только подпись 10 была приписана активности мутированной полимеразы эpsilon. Мы выявили, что на самом деле подпись 10 – это подпись полимеразы эpsilon с инактивированным экзонуклеазным доменом, скорректированная действием системы MMR, а подпись 14 является истинной

подписью полимеразы эpsilon с инактивированным экзонуклеазным доменом. Затем мы сравнили скорости комплементарных мутаций между лидирующей и отстающей цепями ДНК в раках с мутированной полимеразой эpsilon или мутированной полимеразой delta (рисунок 1а). Мы определили, в каких участках генома референтная цепь реплицируется преимущественно как лидирующая, а в каких – как отстающая. Для этого были использованы два независимых метода: первый – оценка с помощью производной времени репликации (fp – fork polarity) [9], второй – использование экспериментальных данных по секвенированию фрагментов Оказаки [10].

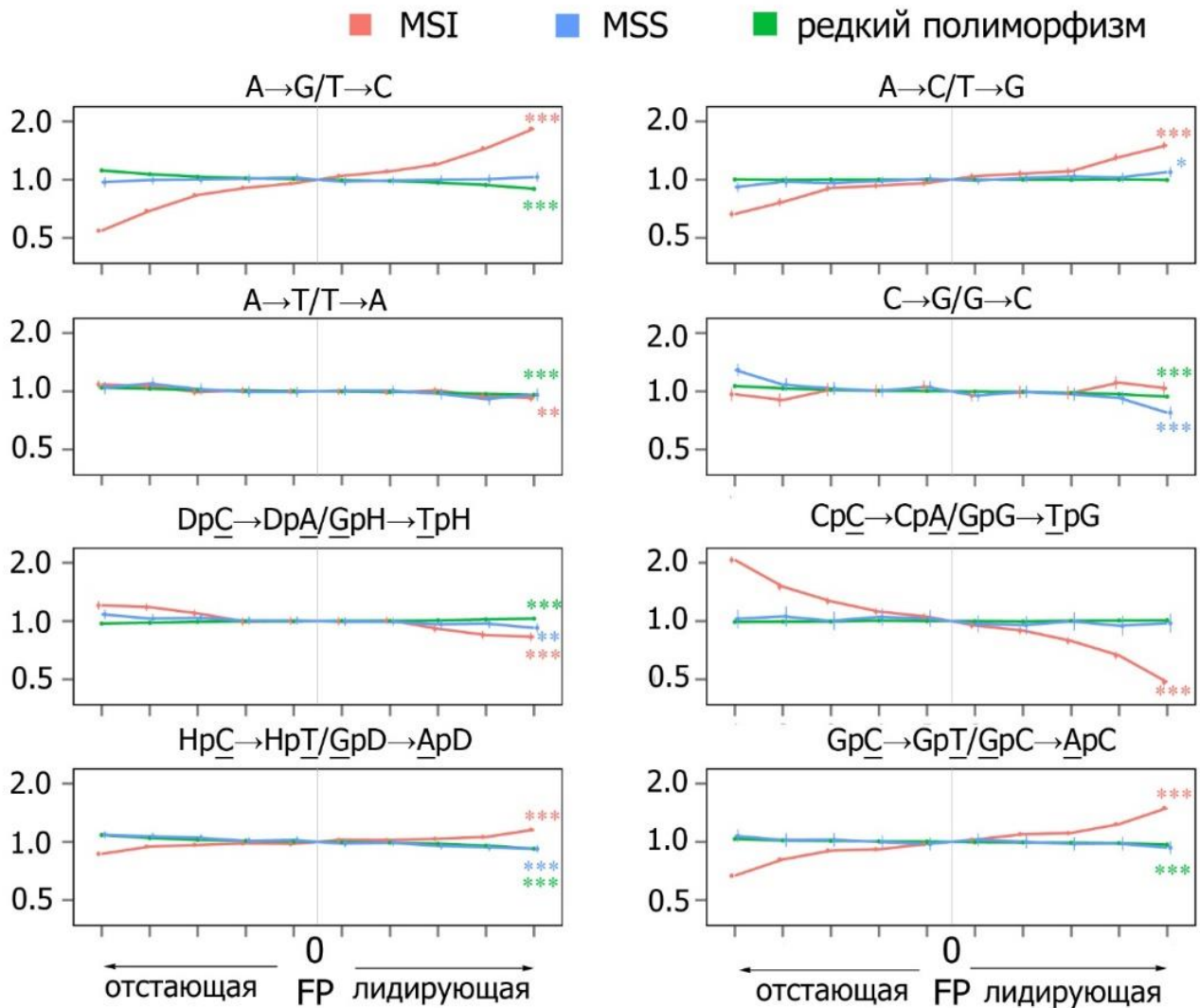




**Рисунок 1.** Репликационная асимметрия в bMMRD опухолях с мутациями в репликативных полимеразах. **а**, схематическое изображение метода оценки отношения скоростей мутирования для комплементарных мутаций. В изображенном примере частота неправильно спаренных оснований C-dT, приводящих к мутациям C→A, в 1.5 раза выше, чем скорость мутаций G→T, когда мутирована полимеразы эпсилон, и в 4 раза выше, когда мутирована полимеразы дельта. Самый левый и самый правый бины соответствуют 20% генома, в которых мы с максимальной достоверностью можем определить, что референтная цепь преимущественно реплицируется как лидирующая или отстающая соответственно. **б**, отношение скоростей комплементарных мутаций (вертикальная ось) как функция вероятности референтной цепи реплицироваться как лидирующая или отстающая цепь (горизонтальная ось). Бины оси x соответствуют квантилям производной времени репликации. Вертикальные линии соответствуют 95% доверительному интервалу. Звездочками отмечена значимость отклонения от 1 в самом правом (или левом) бине. (\*) P < 0.05; (\*\*) P < 0.01; (\*\*\*) P < 0.001. D соответствует нуклеотидам A, G или T. H соответствует нуклеотидам A, C или T. Вертикальная ось логарифмическая.

Основываясь на классической модели вилки репликации эукариот, мы обнаружили, что для данной пары комплементарных оснований каждая репликативная полимеразы вставляет неправильно спаренный нуклеотид для одного нуклеотида из пары чаще, чем для другого (Рисунок 1б). Этот эффект монотонно растет в зависимости от того, насколько достоверно мы можем оценить направление вилки репликации в данном участке генома. Самый большой эффект наблюдается в бинах с крайними значениями  $f_r$ , которые соответствуют геномным участкам, где мы можем определить направление вилки с самой большой достоверностью. Более того, для двух пар мутаций (C→A/G→T и T→G/A→C) отклонения, связанные с полимеразой эпсилон и полимеразой дельта, противоположны: полимеразы эпсилон чаще неправильно спаривает нуклеотиды, приводя к первой из мутаций в каждой из этих пар, на лидирующей цепи, в то время как полимеразы дельта делает это на отстающей цепи (рисунок 1б).

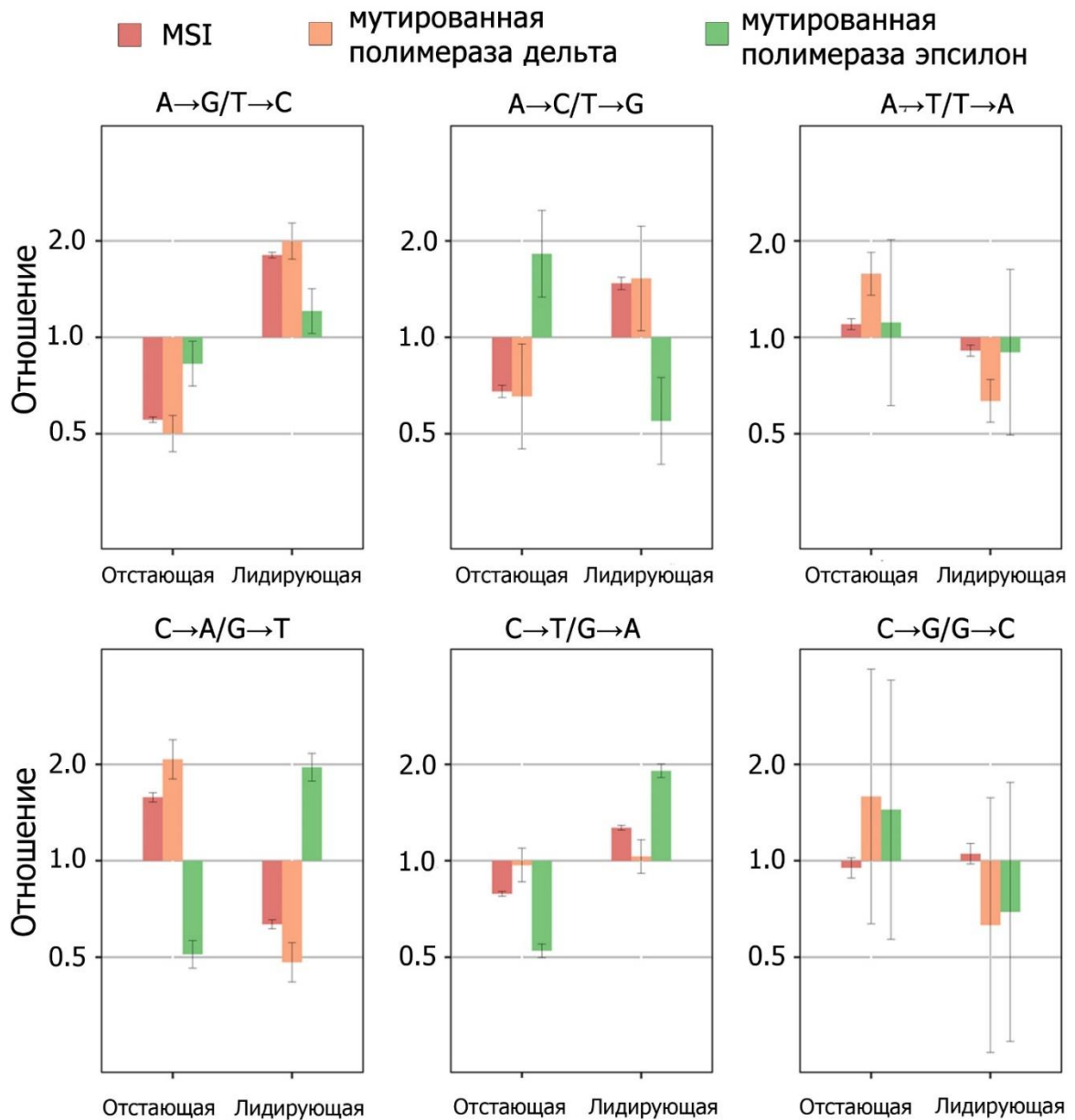
На втором шаге мы исследовали особенности точечного мутагенеза в раковых образцах с инактивированной MMR. MMR исправляет все типы мутаций во всех контекстах, но с особенно высокой эффективностью исправляет неправильно спаренные нуклеотиды, приводящие к следующим мутациям: C→T в контексте GpCpN (N = A/T/G/C), A→G во всех контекстах и C→A в контексте CpCpN (N = A/T/G/C), что согласуется с предыдущими исследованиями. По аналогии с анализом раковых образцов с мутированными полимеразы, мы сравнили скорости комплементарных мутаций между лидирующей и отстающей цепями для соматических мутаций в раках с инактивированной и активной MMR (рисунок 2 – красная и синяя линии соответственно). Также для сравнения мы провели аналогичный анализ для врожденных мутаций, оцененных из полиморфизма человека (рисунок 2 – зеленая линия).



**Рисунок 2.** Репликационная асимметрия мутаций. Панели показывают отношение скоростей мутирования комплементарных мутаций в 10 раковых образцах с инактивированной MMR (3 образца COAD и 7 образцов UCEC) и 22 раковых образцах с активной MMR (8 образцов COAD и 14 образцов UCEC), а также для редкого полиморфизма человека. Использованы полногеномные данные секвенирования. Оси и подписи аналогичны рисунку 1б.

В данных по редким полиморфным вариантам асимметрия между комплементарными мутациями была очень слабой. Небольшая асимметрия для некоторых типов мутаций скорее всего объясняется ошибками, не связанными с репликацией. В образцах с активной MMR асимметрия также отсутствует, либо очень слаба. Напротив, в раковых образцах с инактивированной MMR мы наблюдали сильную асимметрию комплементарных мутаций между лидирующей и отстающей цепями ДНК. Отсутствие асимметрии в клетках с активной MMR говорит о том, что там она компенсируется активностью MMR. Это означает, что MMR исправляет больше ошибок на одной из двух цепей, таким образом уравнивая скорости мутирования между цепями ДНК.

Чтобы лучше изучить баланс между мутационным и репарационным смещениями, мы сравнили направление асимметрии в категориях («бинах») с крайними значениями  $\mu$  в образцах с инактивированной MMR и в образцах с мутированными полимеразой дельта. Мы заметили, что асимметрия в раковых образцах с мутированной полимеразой дельта совпадает с асимметрией в образцах с инактивированной MMR и полимеразой дикого типа (рисунок 3), что показывает, что полимеразы дельта и эпсилон вносят больше мутаций при репликации.



**Рисунок 3.** Репликационная асимметрия мутаций в раковых образцах с инактивированной системой MMR (MSI) и в bMMRD образцах с мутированной полимеразой эпсилон или дельта. Асимметрия комплементарных мутаций по данным 20% генома, в которых направление вилки репликации было определено с высокой степенью достоверности (соответствует бинам 1 и 10 на рисунках 1 и 2). Вертикальные линии соответствуют 95% доверительным интервалам.

Более того, контексты мутаций в образцах с инактивированной MMR больше похожи на контексты мутаций в раковых образцах с мутированной полимеразой дельта, чем на контексты в раковых образцах с мутированной полимеразой эпсилон, что также указывает на то, что полимеразы дельта вносят больше ошибок при репликации в сравнении с полимеразой эпсилон.

Мы рассмотрели простейшую модель, используя асимметрии, наблюдаемые в раковых образцах с мутированной полимеразой эпсилон и в образцах с мутированной полимеразой дельта, чтобы оценить вклад этих полимераз в мутагенез. Мы посчитали отношения мутационных скоростей, используя следующую логику. Из рисунка 3 для каждого типа мутаций  $A \rightarrow B$  мы получили отношение скорости данной мутации  $r(A \rightarrow B)$  и скорости комплементарной мутации  $r(A' \rightarrow B')$  на лидирующей цепи. Тогда

$$\frac{x_{MMR}}{(1-x_{MMR})} = \frac{x_{\epsilon}\alpha + (1-x_{\delta})(1-\alpha)}{(1-x_{\epsilon})\alpha + x_{\delta}(1-\alpha)}, \quad (1)$$

где  $\alpha$  – это доля мутаций  $A \rightarrow B$  и  $A' \rightarrow B'$ , привносимых полимеразой эпсилон на лидирующей цепи;  $(1-\alpha)$  – это доля таких мутаций, привносимых полимеразой дельта на отстающей цепи;  $x_{\epsilon}$  и  $(1-x_{\epsilon})$  – это доли мутаций  $A \rightarrow B$  и  $A' \rightarrow B'$  соответственно, привносимые полимеразой эпсилон;  $x_{\delta}$  и  $(1-x_{\delta})$  – это доли мутаций  $A \rightarrow B$  и  $A' \rightarrow B'$  соответственно, привносимые полимеразой дельта;  $x_{MMR}$  и  $(1-x_{MMR})$  – это доли мутаций  $A \rightarrow B$  и  $A' \rightarrow B'$  соответственно на лидирующей цепи в раках с инактивированной MMR.

Мы применили эту модель к 3 типам мутаций, частота которых сильно повышена в спектре образцов с инактивированной MMR, то есть эффективно исправляемых системой MMR:  $A \rightarrow G$ ,  $C \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow T$ . Для этих типов мутаций мы обнаружили, что вклад полимеразы дельта в асимметрию, наблюдаемую в раках с инактивированной MMR, был в 1.9-4.4 раза выше, чем вклад полимеразы эпсилон (Таблица 1). С учетом вкладов соответствующих мутаций в общий мутационный спектр общий вклад полимеразы дельта в мутагенез примерно в 3 раза выше, чем полимеразы эпсилон (Таблица 1). Это означает, что основной двигатель асимметрии в раках с инактивированной MMR – это мутации, вносимые полимеразой дельта.

**Таблица 1.** Эффективность MMR на лидирующей и отстающей цепях ДНК. Результаты решения уравнения 1 и оценки суммарного вклада в асимметрию.

$A \rightarrow B$	$x_{\epsilon}$	$x_{\delta}$	$A' \rightarrow B'$	$1-x_{\epsilon}$	$1-x_{\delta}$	$x_{MMR}/(1-x_{MMR})$	$1-a/a$	Доля мутаций в образцах с инактивированной MMR	Вклад в общую асимметрию
$A \rightarrow G$	0.547	0.334	$T \rightarrow C$	0.453	0.666	1.81	4.27	0.33	1.41
$C \rightarrow A$	0.662	0.675	$G \rightarrow T$	0.338	0.325	0.63	4.39	0.12	0.53
$C \rightarrow T$	0.656	0.492	$G \rightarrow A$	0.344	0.508	1.27	1.89	0.38	0.72
<b>Общая асимметрия</b>									2.66

Асимметрия скоростей замен на лидирующей и отстающей цепях в клетках человека была показана и ранее, однако ее причина оставалась неизвестной. Это было отчасти связано с тем, что сложно различить мутации, возникшие из неправильно спаренных оснований на комплементарных цепях. Например, избыток мутаций С→А на отстающей цепи и избыток мутаций G→T на лидирующей цепи будет выглядеть в данных секвенирования одинаково. В нашей работе мы решили эту задачу, привязав наблюдаемую асимметрию к мутационным подписям полимераз. В частности, для мутации С→А/G→T мы показали, что обе главные репликативные полимеразы демонстрируют избыток неправильно спаренных нуклеотидов С-dT (приводящих к мутациям С→А) в сравнении с неправильно спаренными нуклеотидами G-dA (приводящими к мутациям G→T). Таким образом, наблюдаемая асимметрия скорее происходит из-за избытка мутаций С→А на отстающей цепи, чем мутаций G→T на лидирующей.

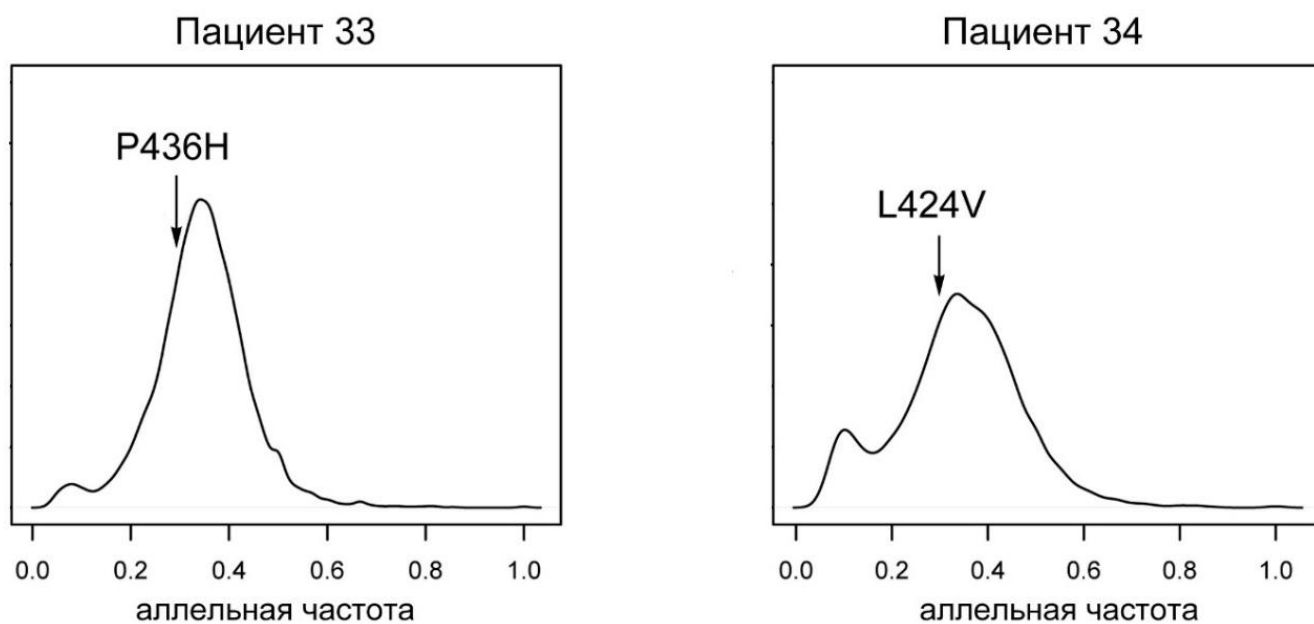
Поскольку MMR – это прежде всего ко-репликативный процесс [11; 12], большинство мутаций в раковых образцах с инактивированной MMR являются ошибками репликации. Таким образом, асимметрии, наблюдаемые в раках с инактивированной MMR, выявляют асимметрии соответствующих полимераз без смещающего фактора MMR. Мы показали, что асимметрия, связанная с инактивацией MMR, совпадает с асимметрией, наблюдаемой в раковых образцах с мутированным экзонуклеазным доменом полимеразы дельта для разных типов мутаций. Это показывает, что асимметрия в раках с инактивированной MMR скорее всего связана с более высокой долей мутаций, вызванных полимеразой дельта, когда она реплицирует отстающую цепь.

Поскольку асимметрия, наблюдаемая в клетках с активной системой MMR, очень слабая, любая асимметрия, вносимая полимеразой, должна компенсироваться MMR. Поскольку больше неправильно спаренных нуклеотидов вставляется на отстающей цепи ДНК, это также показывает, что и MMR исправляет больше ошибок на отстающей цепи. Это может иметь два объяснения. Первое заключается в том, что эффективность MMR отличается между двумя цепями, так что она исправляет неправильно спаренные нуклеотиды на отстающей цепи с большей вероятностью, чем на лидирующей. Второе объяснение предполагает, что MMR имеет одинаковую эффективность на обеих цепях, сохраняя асимметрии ко-репликативных ошибок, но радикально уменьшая число всех типов таких ошибок. Поскольку при этом увеличивается доля симметричных нерепликативных ошибок, общая мутационная асимметрия снижается. К сожалению, имеющихся данных недостаточно, чтобы строго различить эти две гипотезы. Однако доступные данные позволяют предположить, что MMR не только удаляет больше неправильно спаренных нуклеотидов на отстающей цепи, но и делает это более эффективно на отстающей цепи.

**В третьей главе** продолжается исследование репликативной асимметрии в раковых образцах с инактивированной MMR на примере двух случаев детской глиобластомы в большой индийской консангвиальной семье (пациенты 33 и 34). Образцы опухолей были получены и секвенированы коллегами в рамках данного

проекта. Исследуемые опухоли имели врожденную биаллельную мутацию, инактивирующую ген *PMS2* системы MMR (bMMRD – biallelic mismatch repair deficiency), а также последующую соматическую мутацию в экзонуклеазном домене полимеразы эpsilon. Мы выявили ультрамутабельный фенотип обеих опухолей, а именно обнаружили 11 902 и 6185 аутомных мутаций на экзом в опухолях пациентов 33 и 34 соответственно, и 297 793 мутации на геном (с маскированными повторами) опухоли пациента 34. Таким образом, частоты мутаций в экзомах изучаемых пациентов составляют 237/Мб и 123/Мб соответственно, а частота мутаций в геноме опухоли пациента 34 - 198/Мб. Опухоли обоих пациентов несут мутации в экзонуклеазном домене полимеразы эpsilon: NM\_006231.3:c.1307C>A:p.(Pro436His) в опухоли пациента 33 и c.1270C>G:p.(Leu424Val) в опухоли пациента 34. Анализ аллельных частот исследуемых мутаций в экзонуклеазных доменах показал, что в обоих пациентах мутации в полимеразе эpsilon возникли на ранних стадиях развития опухоли (рисунок 4).

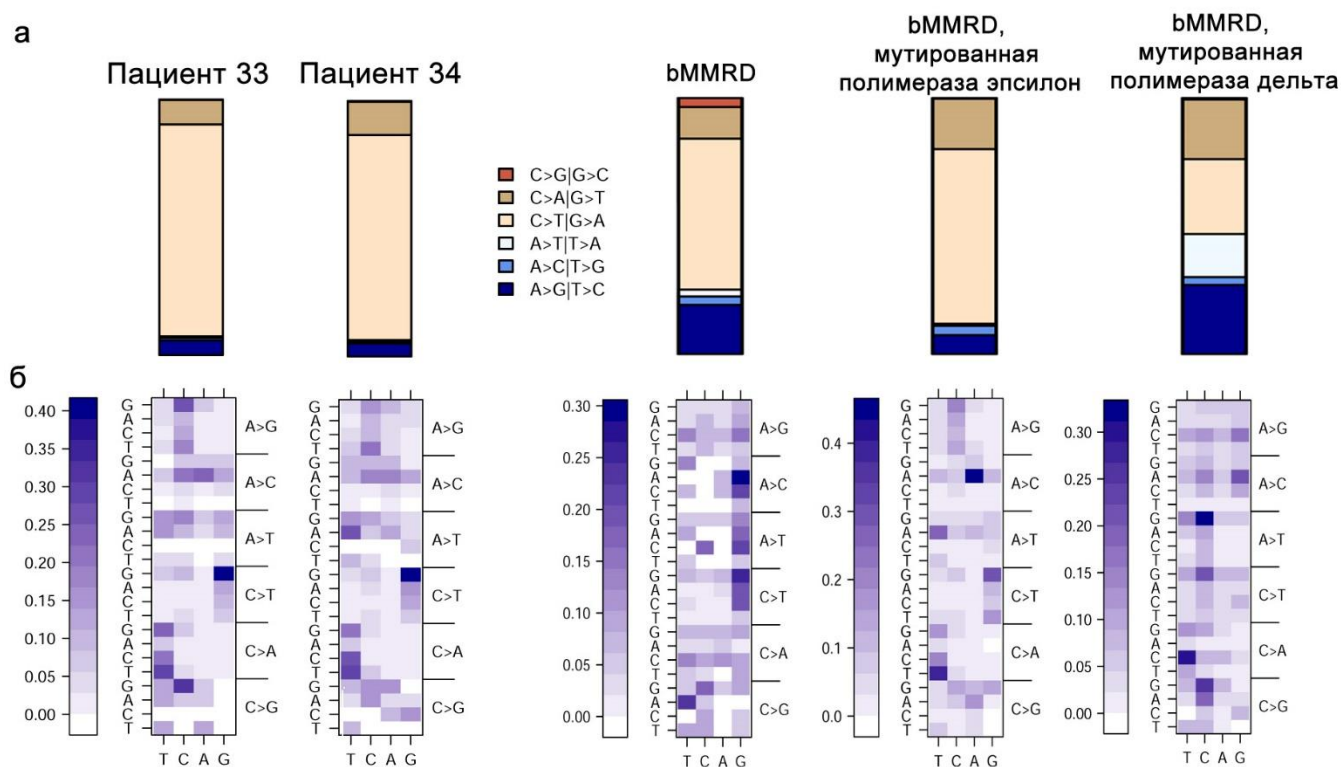
#### Распределение аллельных частот



**Рисунок 4.** Распределение аллельных частот всех экзомных мутаций в опухолях пациентов 33 и 34 (число чтений, несущих мутацию, по отношению к общему числу чтений, покрывающих позицию мутации). Стрелочками обозначены аллельные частоты мутаций, инактивирующих функции экзонуклеазного домена в гене полимеразы эpsilon.

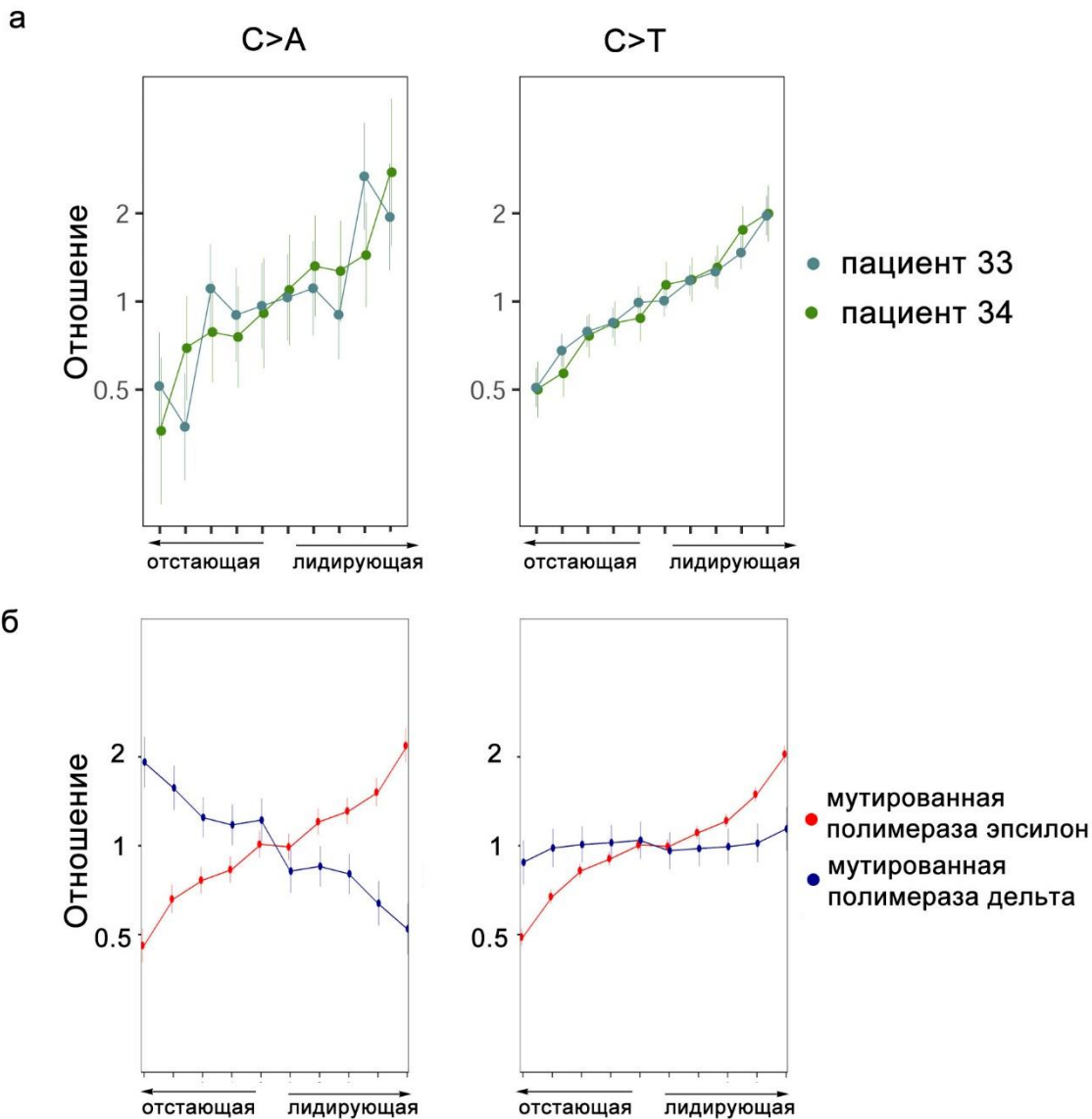
Мы проанализировали мутационные спектры в двух данных образцах и сравнили их с другими раковыми образцами с биаллельной инактивацией MMR и мутацией в экзонуклеазном домене полимераз эpsilon или дельта, также исследованных нами в первой главе. Спектр мутирования обоих образцов обогащен мутациями C→T (особенно в контексте GpCpG) и C→A (особенно в контексте NpCpT) (рисунок 5).

Такой же паттерн наблюдался в описанных ранее образцах с bMMRD и инактивацией экзонуклеазного домена полимеразы эpsilon (рисунок 5) [7].



**Рисунок 5.** Мутационные спектры bMMRD образцов. **а**, относительные частоты однонуклеотидных замен в образцах 33 и 34, а также в образцах bMMRD и bMMRD с мутированными полимеразами из ранее опубликованных данных независимо от цепи ДНК; **б**, контекст-зависимые частоты для каждого типа мутации в том же наборе образцов. Вертикальная ось - 5' контекст, горизонтальная - 3' контекст. Для каждого типа однонуклеотидной замены цвет одной из 16 клеток показывает частоту данной мутации в определенном контексте.

Мы сравнили репликационную асимметрию в образцах опухолей пациентов 33 и 34 с асимметрией в других bMMRD образцах с мутациями в экзонуклеазном домене полимеразы эpsilon или дельта (также исследованными нами в главе 2). Направление асимметрии в исследуемых образцах совпадает с тем, что наблюдается в других образцах, имеющих мутацию в экзонуклеазном домене полимеразы эpsilon, и противоположно тому, что наблюдается в образцах с мутацией в экзонуклеазном домене полимеразы дельта (рисунок 6).



**Рисунок 6.** Отношение скоростей комплементарных мутаций **а**, в исследуемых образцах и **б**, в опубликованных ранее данных по образцам с bMMRD и мутациями в экзонуклеазных доменах полимераз эпсилон и дельта. Горизонтальная ось: 10 бинов по вероятности вилки репликации реплицировать референтную цепь как отстающую или лидирующую. Вертикальная ось: отношение скоростей комплементарных мутаций данного типа. Вертикальные линии соответствуют 95% доверительному интервалу. Вертикальная ось логарифмическая.

Вследствие ультрамутабельного фенотипа обе опухоли накопили высокое число потенциально драйверных мутаций в генах, кодирующих фосфатидилинозитол-3-киназу, WNT и в других раковых путях. Эти события характеризуются высокой рекуррентностью (>50) и высокими аллельными частотами, что означает, что они могут быть потенциальными клональными драйверами. Однако эти аргументы являются недостаточными, поскольку большинство мутаций в этих опухолях является клональными; более того, ультрамутабельные опухоли могут накапливать большое число потенциально вредных мутаций в драйверных генах случайно.



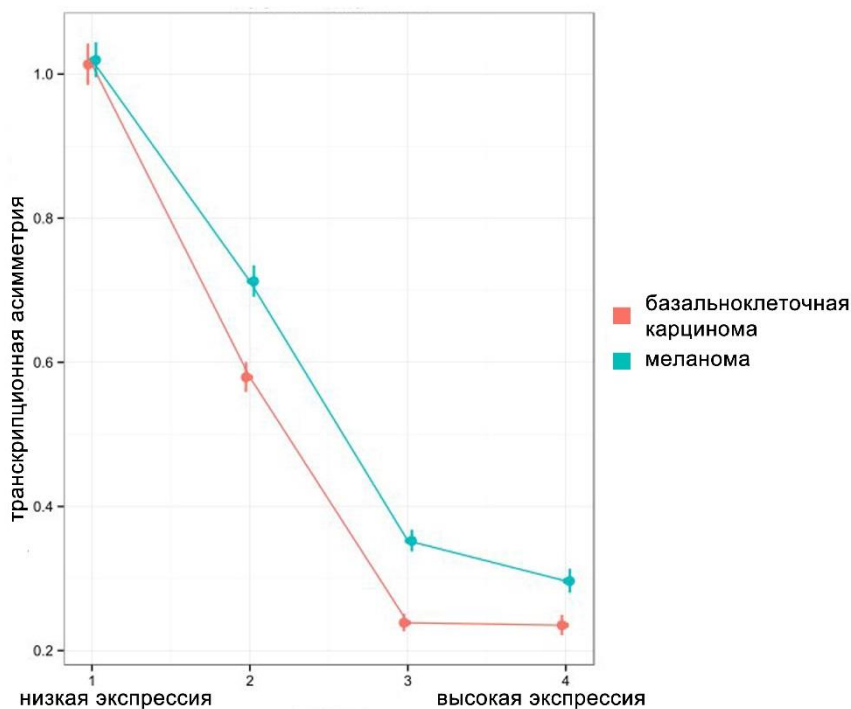
Чтобы определить наличие драйверов в опухолевых генах-супрессорах, мы разработали статистический тест, который оценивает долю мутаций, участвующих в образовании опухоли. Этот тест основан на сравнении ожидаемой и наблюдаемой доли вредных мутаций в генах-супрессорах. Коротко говоря, мы подсчитывали количество потенциально вредных мутаций, наблюдаемое в заданном наборе генов, а затем сравнивали его с количеством потенциально вредных мутаций в этом же наборе генов при условии, что мутации мы распределяем по генам случайно, сохраняя только общую скорость мутирования и учитывая общий спектр мутирования. Мы применили этот тест к раковым образцам пациентов 33 и 34, а также к доступным опубликованным данным ультрамутабельных и немутабельных глиобластом. В образцах опухолей пациентов 33 и 34 и в образцах других ультрамутабельных глиобластом мы не обнаружили значимого избытка потенциально вредных мутаций в потенциальных драйверах; однако обогащение было очень сильным в немутабельных образцах (46% потенциально вредных мутаций в возможных драйверах находятся под положительным отбором). Отсутствие эффекта в ультрамутабельных опухолях может быть связано со слабым эффектом и недостаточной мощностью нашего теста. Мы показали, что для наших ультрамутабельных образцов тест покажет значимое обогащение в потенциальных драйверах, только если доля мутаций под положительным отбором будет выше 23%. Это предполагает, что доля мутаций под положительным отбором в ультрамутабельных раках ниже этого значения, то есть как минимум в 2 раза меньше, чем это же значение для немутабельных глиобластом. Однако стоит заметить, что, хотя доля мутаций под положительным отбором в потенциальных драйверах в ультрамутабельных опухолях ниже, чем в немутабельных, абсолютные значения числа драйверных событий тем не менее могут быть выше в ультрамутабельных опухолях в связи с очень высокими скоростями мутирования.

**В четвертой главе** проведен подробный мутационный анализ базальноклеточной карциномы (ВСС) – самого частого типа рака кожи, который, однако, до этого был почти не исследован с точки зрения особенностей точечного мутагенеза. Чтобы лучше понять мутационные процессы, действующие в базальноклеточной карциноме, мы сравнили ее мутационный профиль с мутационным профилем меланомы. В частности, мы исследовали мутагенез, вызванный УФ и окислительным стрессом, а также эффективность действия TC-NER.

Было показано, что доля всех мутаций, вызванных УФ, в ВСС выше, чем в меланоме (90% против 85% мутаций,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ). Более того, в ВСС оба типа мутаций, специфичных для УФ, оказались более частыми в сравнении с меланомой: мутации C→T в контексте TrCpC происходили на 2% чаще, чем в меланоме ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ , тест  $\chi^2$ ), а мутации CC→TT – на 15% чаще ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ , тест  $\chi^2$ ).

Затем мы оценили эффективность работы TC-NER. Поскольку повреждения ДНК, вызванные УФ, эффективно исправляются с помощью TC-NER [13–15], то это приводит к понижению скорости мутирования на транскрибируемой цепи. Определить эффективность работы TC-NER можно, сравнив отношения скоростей мутирования на транскрибируемой и нетранскрибируемой цепях, то есть сравнив

значения транскрипционной асимметрии. Отношение скоростей мутирования на транскрибируемой и нетранскрибируемой цепях ДНК для мутации С→Т в контексте ТрСрС в базальноклеточной карциноме оказалось ниже, чем в меланоме (0.59 против 0.68,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ , тест  $\chi^2$ ), что показывает, что ТС-NER более эффективна в базальноклеточной карциноме. Это различие оказалось еще сильнее при рассмотрении только высокоэкспрессируемых генов (0.21 против 0.29,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ , тест  $\chi^2$ ) (рисунок 7).



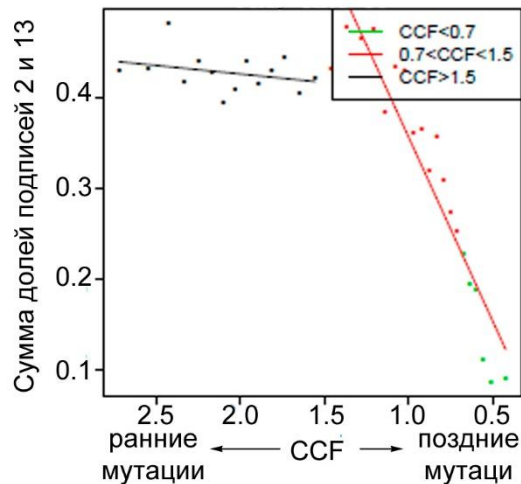
**Рисунок 7.** Транскрипционная асимметрия (отношение скоростей мутирования на транскрибируемой и нетранскрибируемой цепях ДНК) мутации ТрСрС→Т в базальноклеточной карциноме и меланоме в генах с разным уровнем экспрессии. Для анализа использовались значения экспрессии генов, полученные для соответствующего типа рака: ВСС в рамках этого исследования, меланома из ранее опубликованных данных. Для анализа взяты гены, имеющие ненулевую экспрессию в обоих типах рака. Гены сгруппированы в 5 равных бинов по уровню экспрессии. Вертикальными линиями обозначены 95% доверительные интервалы.

Затем мы подробно изучили мутации С→А, которые могут происходить в результате либо окислительного стресса [16], либо воздействия УФ [17]. Сначала мы рассмотрели мутации С→А в контексте RpСрR (R=A или G), который слабо подвержен воздействию УФ, то есть мутации С→А в нем могут быть обогащены в результате окисления гуанина. Доля таких мутаций была в два раза выше в базальноклеточной карциноме, чем в меланоме (21% в ВСС против 10% в меланоме). Мы обнаружили транскрипционную асимметрию для данного типа мутаций как в базальноклеточной карциноме, так и в меланоме (отношение скоростей мутирования на транскрибируемой и нетранскрибируемой цепях равно соответственно 1.26 и 1.27, в обоих типах рака  $p < 0.001$ , тест  $\chi^2$ ). Избыток мутаций С→А на транскрибируемой цепи указывает на то, что на самом деле мутация представляет собой повреждение

гуанина, то есть мы наблюдаем избыток мутаций G→T на нетранскрибируемой цепи вследствие действия TC-NER на транскрибируемой. Затем мы проанализировали транскрипционную асимметрию для мутации C→A в контексте CpC - контексте УФ мутагенеза. Доля таких мутаций была в 1.6 раз выше в меланоме, чем в ВСС (53% в меланоме против 35% в ВСС). В базальноклеточной карциноме мы не обнаружили статистически значимой транскрипционной асимметрии для этой мутации (1.09,  $p = 0.10$ , тест  $\chi^2$ ), в то время как в меланоме был значимый избыток мутаций C→A на нетранскрибируемой цепи (отношение скоростей мутирования на транскрибируемой и нетранскрибируемой цепях равно 0.89,  $p < 0.001$ , тест  $\chi^2$ ). Эти данные показывают, что механизм мутаций C→A отличается в базальноклеточной карциноме и в меланоме. По-видимому, в базальноклеточной карциноме мутации C→A в основном происходят в результате окисления гуанина, в то время как в меланоме вклад от мутирования цитозинов под действием УФ и окисления гуанинов примерно одинаков.

**В пятой главе** рассматривается изменение мутационных подписей и характеристик точечного мутагенеза во времени в ходе развития раковой опухоли. Мутации, накопленные в клетках-предшественниках рака и на ранних стадиях развития рака, присутствуют почти во всех клетках ракового образца и называются клональными мутациями. Мутации, появившиеся на поздних стадиях развития опухоли, присутствуют только в части раковых клеток и называются субклональными. Доля раковых клеток, содержащая мутацию (CCF, cancer cell fraction) отражает время появления мутации.

Мы проанализировали 825 раковых геномов с высоким покрытием из базы данных TCGA и использовали CCF для оценки времени появления мутаций. Исследование полных геномов, а не экзотов, в отличие от предыдущих исследований, дало нам возможность посмотреть на изменения мутационных паттернов внутри индивидуальных раковых образцов. Мы оценили интенсивность мутационных процессов с известными мутационными подписями, измерив доли мутаций, привнесенных этими подписями, среди клональных и среди субклональных мутаций. В качестве статистической оценки для каждой опухоли мы построили зависимость доли мутаций, привнесённых данной подписью, среди всех мутаций от CCF (рисунок 8). Интересный вывод состоит в том, что в исследованных образцах изменение доли подписи происходит плавно и непрерывно с изменением CCF; этого нельзя было утверждать ранее, без исследования индивидуальных раковых образцов.



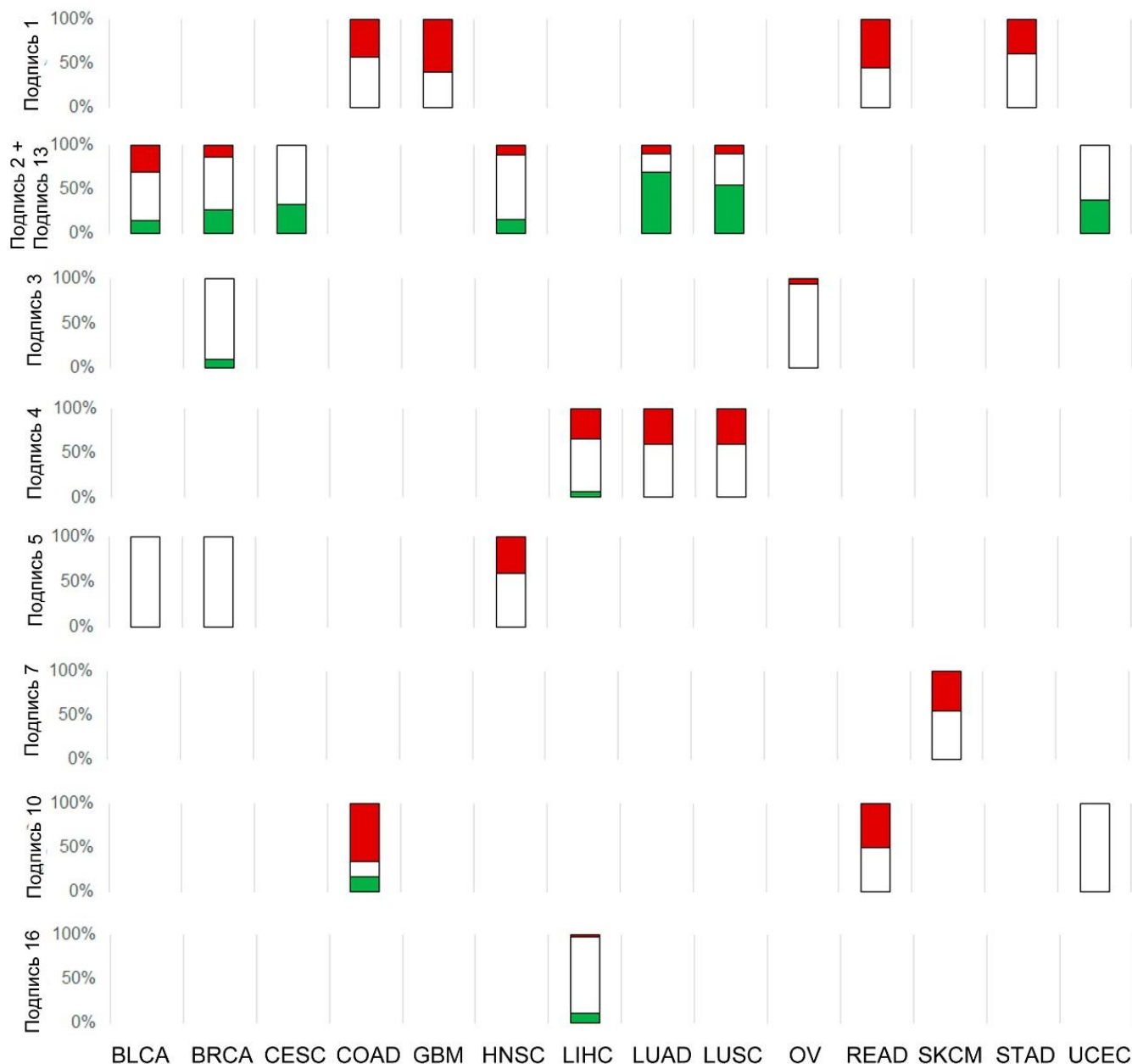
**Рисунок 8.** Пример зависимости доли подписи АРОВЕС (сумма долей подписей 2 и 13) от CCF для одного образца аденокарциномы легкого (идентификатор базы данных TCGA TCGA-49-6742). Черные точки соответствуют ранним клональным мутациям, красные – поздним, зеленые – субклональным мутациям. Черная линия соответствует линейной регрессии зависимости доли подписей от CCF для ранних клональных мутаций ( $p = 0.289$ ). Красная линия соответствует линейной регрессии зависимости доли подписей от CCF для поздних клональных и субклональных мутаций вместе ( $p = 2 \times 10^{-9}$ ).

Для каждой подписи мы сгруппировали образцы по типам рака и выявили преимущественное направление изменения интенсивности каждой подписи внутри каждого типа рака, где она присутствует, подсчитав число образцов, в которых доля подписи растет или падает в поздних мутациях по сравнению с ранними.

Мы обнаружили, что вклады подписи УФ (подпись 7) и табачного дыма (подпись 4) постепенно падают в ходе развития опухоли (рисунок 9), что согласуется с предыдущими исследованиями [18–20]. Этот результат, по-видимому, может иметь два объяснения: 1) меньшая подверженность опухоли соответствующим мутагенам на поздних стадиях развития рака уменьшает долю соответствующей мутационной подписи (большинство образцов меланомы были получены из метастазов, которые меньше подвержены воздействию солнца; большинство пациентов с раком легких бросают курить после постановки диагноза); 2) появление специфических мутагенных процессов на поздних стадиях развития опухоли уменьшает долю мутационных подписей, наблюдаемых на ранних стадиях (для рака легких падение доли мутаций, вызванных курением, хорошо коррелирует с ростом доли мутаций, вызванных действием белков семейства АРОВЕС).

Мутации, вызванные АРОВЕС (подпись 2 и подпись 13), показывают неоднозначность среди образцов, которая, по-видимому, специфична для типов рака. В плоскоклеточной карциноме шейки матки (CESC), карциноме эндометрия (UCEC) и раках легких (LUAD и LUSC) мутации, вызванные действием АРОВЕС, имеют тенденцию накапливаться на поздних стадиях развития опухоли, в то время как в раке мочевого пузыря (BLCA) они часто являются ранними событиями. В раке груди

(BRCA) и в раке головы и шеи (HNSC) направления изменения активности белка АРОВЕС разнятся между образцами.

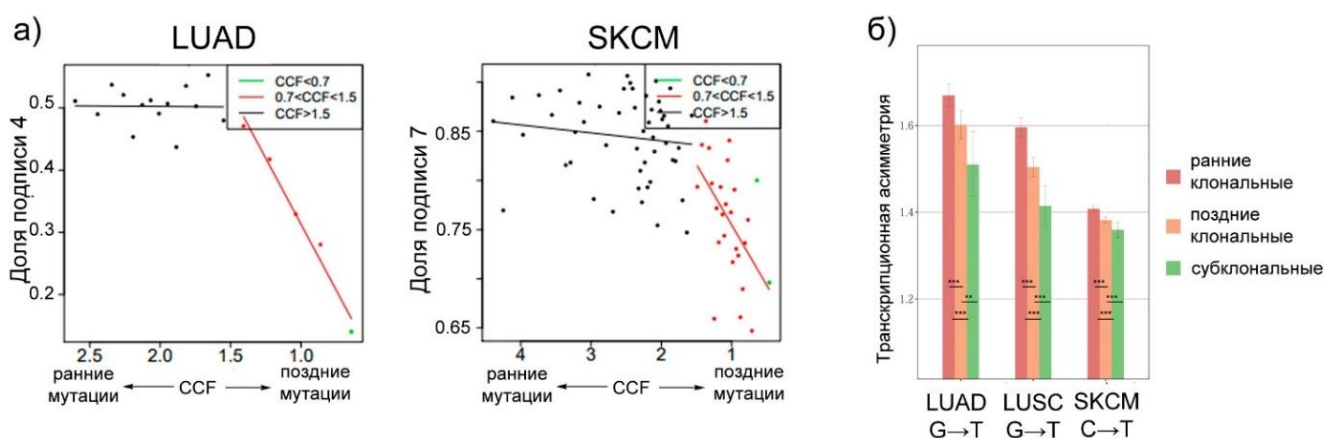


**Рисунок 9.** Изменение мутационных процессов в ходе развития раковых опухолей. По оси x – типы рака. BLCA – рак мочевого пузыря, BRCA – рак груди, CESC – плоскоклеточная карцинома шейки матки, COAD – аденокарцинома толстой кишки, GBM – глиобластома, HNSC – рак головы и шеи, LIHC – рак печени, LUAD – аденокарцинома легкого, LUSC – плоскоклеточный рак легкого, OV – рак яичников, READ – рак прямой кишки, SKCM – меланома, STAD – рак желудка, UCEC – карцинома эндометрия. По оси y - доля образцов со значимым возрастанием (зеленый) или убыванием (красный) доли мутаций, привнесенных данной мутационной подписью, в субклональных мутациях по сравнению с клональными. Белым обозначены образцы без значимой зависимости доли мутаций от CCF.

Подпись спонтанного деаминирования цитозина, связанная с возрастом пациента (подпись 1), была сильнее представлена в ранних мутациях. Эта подпись характерна для всех клеток, в том числе и здоровых. Наблюдаемая тенденция скорее всего объясняется тем, что поздние мутации обогащены мутациями, специфичными для раковых процессов, за счет чего уменьшается доля подписи, характерной для здоровых клеток. Подпись полимеразы эпсилон с мутацией в экзонуклеазном домене (подпись 10) также была чаще представлена среди клональных мутаций. Это показывает, что инактивация экзонуклеазного домена полимеразы эпсилон происходит в ходе развития опухоли достаточно рано, а поздние мутации обогащены дополнительными раковыми процессам, возникшими при развитии опухоли. Например, падение доли подписи 10 хорошо коррелирует с ростом доли подписи 28, происхождение которой неизвестно. Для остальных подписей мы не наблюдали стабильных изменений.

Мы предположили, что способность метода засечь изменения в доле той или иной подписи может зависеть от самой подписи, а именно – от ее мутационного спектра. Мы подкрепили это предположение численной моделью, показав, что чем более специфична подпись, тем точнее определяется ее доля среди всех мутаций.

Наблюдаемые изменения в составе мутационных процессов, действующих в ходе развития опухоли, приводят не только к изменению мутационного спектра, но и к изменению локальных скоростей мутирования вдоль генома. Так, известно, что повреждения, вызванные УФ и табачным дымом, эффективно исправляются TC-NER, что приводит к транскрипционной асимметрии. Мы наблюдали, что доля мутаций, вызванных этими мутагенами, выше среди ранних мутаций по сравнению с поздними. Мы увидели, что значения транскрипционной асимметрии (отношение скоростей мутирования на нетранскрибируемой и транскрибируемой цепях) для ранних мутаций также значимо выше, чем для поздних и в меланоме, и в раках легких (рисунок 10).

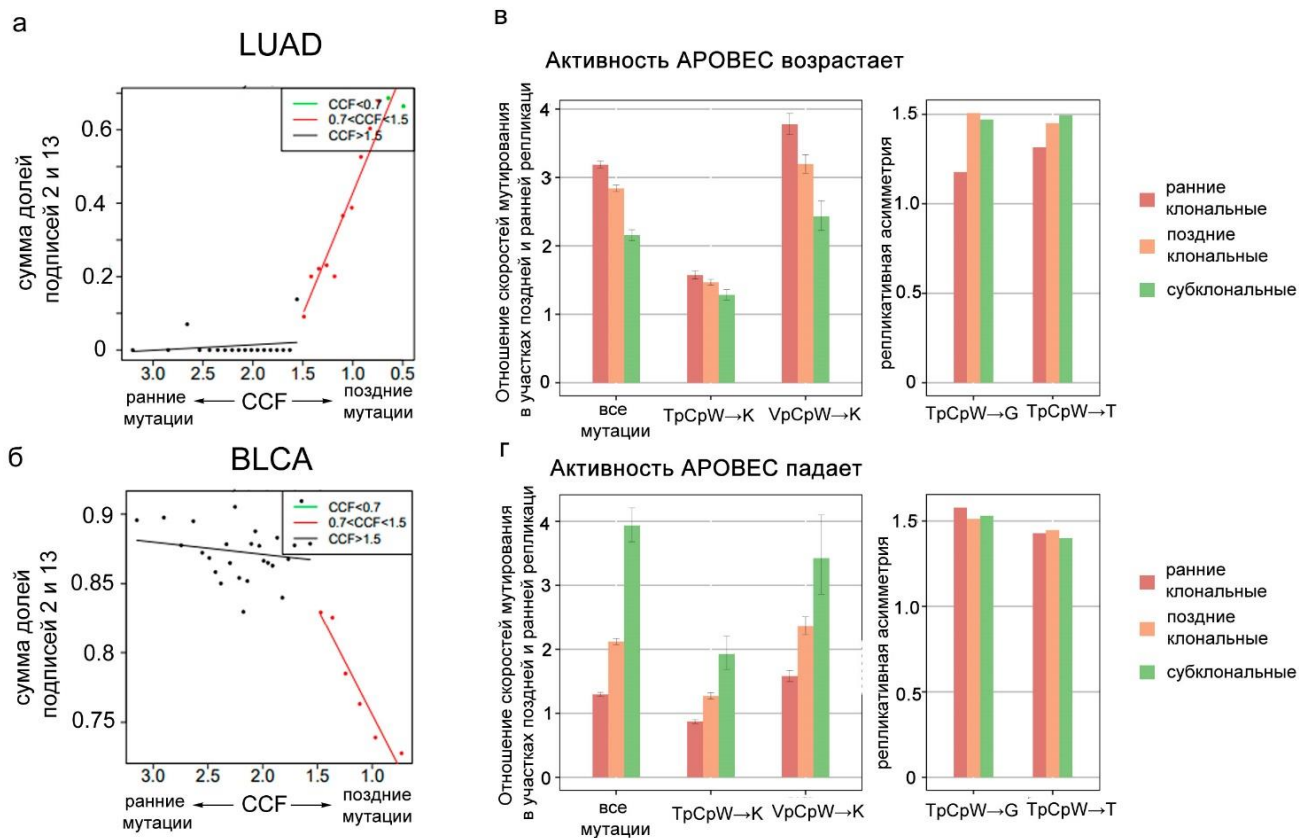


**Рисунок 10.** Изменения в спектре и распределении вдоль генома мутаций в ходе развития раковой опухоли. **а**, примеры изменения доли мутаций, характерных для действия табачного дыма и УФ, в образцах рака легких и меланомы соответственно; **б**, транскрипционная асимметрия (отношение скоростей мутирования на нетранскрибируемой и транскрибируемой цепях ДНК) ранних и поздних



клональных и субклональных мутаций в раках легких (мутация G→T в LUAD и LUSC) и меланоме (мутация C→T).

Мутации, вызванные АРОВЕС, практически не зависят от времени репликации, в отличие от мутаций, вызванных большинством других мутационных процессов [21]. Мутации, вызванные АРОВЕС, преобладают среди ранних или поздних мутаций в зависимости от ракового образца. В образцах рака с большой долей мутаций, вызванных АРОВЕС, среди ранних мутаций ранние мутации слабее зависят от времени репликации, чем поздние мутации (рисунок 11г). Ровно противоположный паттерн наблюдался для опухолей, где мутации, вызванные АРОВЕС, преобладают среди поздних мутаций: там поздние мутации слабее зависят от времени репликации (рисунок 11в). Интересным образом, оказалось, что активность АРОВЕС изменяет распределение вдоль генома не только мутаций, вызванных этим белком (TrCpW→K), но и каким-то образом также влияет на распределение остальных мутаций (VpCpW→K). Мы ожидали, что при изменении активности АРОВЕС изменяется и репликационная асимметрия, но это различие оказалось статистически незначимым (рисунок 11в).



**Рисунок 11.** Изменения в спектре и распределении вдоль генома мутаций в ходе развития раковой опухоли. **а-б**, примеры изменений доли мутаций, вызванных АРОВЕС, в образцах рака легких (**а**) и рака мочевого пузыря (**б**); **в-г**, отношение скоростей мутирования в участках поздней и ранней репликации и репликационная асимметрия (отношение скоростей мутирования на отстающей и лидирующей цепях) ранних и поздних клональных и субклональных мутаций в раке легких и раке мочевого пузыря соответственно. W = A/T, V = A/C/G, K = G/T.

## Основные результаты и выводы

1. Полимераза дельта вызывает большее число неправильно спаренных нуклеотидов при репликации отстающей цепи ДНК, чем полимеразы эпсилон при репликации лидирующей цепи. Это приводит к асимметрии в скоростях мутирования между лидирующей и отстающей цепями ДНК. Система репарации неправильно спаренных нуклеотидов компенсирует данную асимметрию за счет того, что удаляет примерно в 3 раза больше повреждений на отстающей цепи ДНК.
2. В двух исследованных случаях детских глиобластом ультрамутабельный фенотип опухолей объясняется: 1) накоплением большого числа повреждений на лидирующей цепи ДНК в связи с инактивацией экзонуклеазного домена полимеразы эпсилон соматической мутацией; 2) невозможностью репарации данных ошибок из-за инактивации системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов в связи с врожденной биаллельной мутацией в гене *PMS2*. Мутационный спектр и направление репликационной асимметрии в данных образцах совпадает с направлением в других изученных ранее образцах с *bMMRD* и инактивацией экзонуклеазного домена полимеразы эпсилон.
3. Доля мутаций под положительным отбором в ультрамутабельных глиобластомах как минимум в 2 раза ниже, чем в немутабельных глиобластомах.
4. Доля мутаций, характерных для УФ, в базальноклеточной карциноме выше, чем в меланоме. Эффективность репарации таких мутаций с помощью TC-NER также выше в базальноклеточной карциноме. Мутации C→A в базальноклеточной карциноме и в меланоме, по-видимому, имеют разную природу: в базальноклеточной карциноме они на самом деле являются мутациями окисления гуанина, в то время как в меланоме представляют собой смесь мутаций окисления гуанина и мутаций цитозина под действием УФ.
5. Доля мутаций, вызванных определённым мутационным процессом, может изменяться в ходе развития раковой опухоли. В исследованных случаях изменения происходят непрерывно и плавно. Направление изменения зависит от мутационного процесса, а также от типа рака. Изменение активности мутационных процессов влияет не только на особенности мутационного спектра, но и на распределение мутаций вдоль генома и между цепями ДНК.



## Список публикаций по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых международных научных журналах, входящих в основные библиометрические базы данных (PubMed, WoS и Scopus):

1. Bonilla X, Parmentier L, King B, Bezrukov F, Kaya G, Zoete V, Seplyarskiy VB, Sharpe HJ, McKee T, Letourneau A, Ribaux PG, Popadin K, Basset-Seguin N, Chaabene RB, **Andrianova MA**, Guipponi M, Garieri M, Verdan C, Grosdemange K, Sumara O, Eilers M, Aifantis I, Michielin O, de Sauvage FJ, Antonarakis SE, Nikolaev SI. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma // Nature Genetics. 2016. Vol 48, №4. P. 398-406.

2. **Andrianova MA**, Chetan GK, Sibin MK, Mckee T, Merkler D, Narasinga RK, Ribaux P, Blouin JL, Makrythanasis P, Seplyarskiy VB, Antonarakis SE, Nikolaev SI. Germline PMS2 and somatic POLE exonuclease mutations cause hypermutability of the leading DNA strand in biallelic mismatch repair deficiency syndrome brain tumours // Journal of Pathology. 2017. Vol 243, № 3. P. 331-341.

3. **Andrianova MA**, Bazykin GA, Nikolaev SI, Seplyarskiy VB. Human mismatch repair system balances mutation rates between strands by removing more mismatches from the lagging strand // Genome Research. 2017. Vol 27, №8. P. 1336-1343.

Кроме того, результаты работы опубликованы в сборниках тезисов международных конференций:

1. Andrianova MA, Bazykin GA, Bredikhin D, Seplyarskiy VB. Changes in mutational processes and mutations patterns during cancer development // Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'17), Moscow, Russia, July 27-30, 2017. <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/116.pdf>

2. Andrianova MA. Changes in mutational processes during cancer development // The Seventh German-Russian Week of the Young Researcher "Computational biology and biomedicine", Moscow, Russia, September 11-14, 2017. <https://www.dwih-moskau.org/files/2018/11/7-WdjW.pdf>

## Список литературы

1. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues / I. Martincorena [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – № 5. – P. 1029-1041.e21.
2. The cancer genome / M.R. Stratton, P.J. Campbell, P.A. Futreal // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – № 7239. – P. 719-724.
3. Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair / N.J. Haradhvala [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 164. – № 3. – P. 538-549.
4. Signatures of mutational processes in human cancer / L.B. Alexandrov [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 500. – № 7463. – P. 415-421.
5. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer / L.B. Alexandrov [et al.] // *Cell Reports*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 246-259.
6. Genome-wide model for the normal eukaryotic DNA replication fork. / A.A. Larrea [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – № 41. – P. 17674-17679.
7. Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermuted cancers. / A. Shlien [et al.] // *Nature genetics*. – 2015. – Vol. 47. – № 3. – P. 257-262.
8. Somatic *POLE* mutations cause an ultramutated giant cell high-grade glioma subtype with better prognosis / E.Z. Erson-Omay [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2015. – Vol. 17. – № 10. – P. 1356-1364.
9. APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication / V.B. Seplyarskiy [et al.] // *Genome Research*. – 2016. – Vol. 26. – № 2. – P. 174-182.
10. Replication landscape of the human genome / N. Petryk [et al.] // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 10208.
11. Mismatch repair, but not heteroduplex rejection, is temporally coupled to DNA replication / H. Hombauer [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2011. – Vol. 334. – № 6063. – P. 1713-1716.
12. Single-molecule motions and interactions in live cells reveal target search dynamics in mismatch repair / Y. Liao [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 50. – P. E6898-6906.
13. DNA Excision Repair / A. Sancar // *Annual Review of Biochemistry*. – 1996. – Vol. 65. – № 1. – P. 43-81.
14. Nucleotide excision repair / J.T. Reardon, A. Sancar // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 79. – P. 183-235.
15. Nucleotide excision repair in mammalian cells / R.D. Wood // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 38. – P. 23465-23468.
16. Riboflavin activated by ultraviolet A1 irradiation induces oxidative DNA damage-mediated mutations inhibited by vitamin C / A. Besaratinia [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 14. – P. 5953-5958.
17. UV signature mutations / D.E. Brash // *Photochemistry and Photobiology*. – 2015. – Vol. 91. – № 1. – P. 15-26.
18. Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution / N. McGranahan [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 7. – № 283. – P. 283ra54-283ra54.
19. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution / E.C. de Bruin [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346. – № 6206. – P. 251-256.
20. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing / J. Zhang [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346. – № 6206. – P. 256-259.
21. APOBEC-induced cancer mutations are uniquely enriched in early replicating, gene dense, and active chromatin regions / M.D. Kazanov [et al.] // *Cell reports*. – 2015. – Vol. 13. – № 6. – P. 1103-1109.