

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА *TP53* ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ВЗРОСЛЫХ

Виноградов А.В.^{1,2}, Резайкин А.В.², Литвинова Д.В.², Лобода А.Н.²,
Сазонов С.В.^{2,3}, Сергеев А.Г.²

¹ Министерство здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Цель исследования – оценка патогенетической значимости мутаций гена *TP53* у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ). Клиническое наблюдение проведено на 114 пациентах с ОМЛ на базе Свердловской областной клинической больницы № 1 (г. Екатеринбург), из них 56 – мужчины, 58 – женщины. Средний возраст обследованных составлял 53,3±2,8 лет.

Морфологически диагноз «ОМЛ» во всех случаях был предварительно верифицирован в специализированных лабораториях с использованием стандартных цитологических, цитохимических, иммунофенотипических, гистологических и иммуногистохимических методик. В исследование были включены следующие варианты ОМЛ: M0 – 5, M1 – 9, M2 – 47, M2базо – 3, M2эо – 2, M3 – 8, M4 – 25, M4эо – 3, M5 – 3, M6 – 4, M7 – 1, острый миелофиброз – 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль – 2. Исследовали пробы периферической крови и аспиратов костного мозга пациентов. Все образцы протестированы на наличие молекулярных повреждений экзонов 4–11 гена *TP53*. Кроме того, 81 проба, в том числе 22 – ОМЛ с нормальным кариотипом и 23 – с неуточненным, были обследованы на наличие мутаций гена *NPM1* молекулярно-генетическим и иммуногистохимическим методами. Секвенирование кДНК осуществлялось на автоматическом генетическом анализаторе по прямой и обратной последовательностям. Обработка результатов секвенирования осуществлялась с использованием программы MEGA X на основе статистической гипотезы, что они могут быть описаны биномиальным распределением. Проверка статистической гипотезы проведена с использованием точного критерия Фишера и χ^2 .

По результатам цитогенетического и ПЦР-исследований благоприятный прогноз определялся в 25 наблюдениях (21,9%), промежуточный – в 24 (21,1%), неблагоприятный – 33 случая (28,9%). В 32 пробах (28,1%) методами стандартной цитогенетики и ПЦР в реальном времени выявить генетические аномалии не удалось, соответственно, вариант прогноза у таких больных оказался не уточнен.

Миссенс-мутации *TP53* были представлены транзициями С292Т, А377Г, А659Г, С817Т (4 случая) и трансверсиями С569Г, G733Т, G841С (3 случая), также определялись синонимичные замены А639G (1,8%) и С891Т (0,9%) по третьей позиции кодона, не имевшие патогенетического значения. В одной пробе (0,9%) определялась делеция тимидина в позиции 645 кодирующей последовательности, приводящая к синтезу укороченного мутантного белка. Все вышеуказанные мутации локализовались в

Адрес для переписки:

Виноградов Александр Владимирович
Министерство здравоохранения Свердловской области
620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. Вайнера, 34б.
Тел.: 8 (919) 438-92-33.
E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

Address for correspondence:

Vinogradov Alexander V.
Sverdlovsk Regional Ministry of Health
620014, Russian Federation, Ekaterinburg, Weiner str., 34b.
Phone: 7 (919) 438-92-33.
E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

Образец цитирования:

А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, Д.В. Литвинова,
А.Н. Лобода, С.В. Сазонов, А.Г. Сергеев
«Патогенетическое значение точечных мутаций гена
TP53 при острых миелоидных лейкозах взрослых»
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,
№ 2. С. 195–202.
doi: 10.46235/1028-7221-264-PVO

© Виноградов А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Vinogradov, A.V. Rezaykin, D.V. Litvinova, A.N. Loboda,
S.V. Sazonov, A.G. Sergeev “Pathogenetic value of *TP53*
point mutations in adult acute myeloid leukemia patients”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 195–202.
doi: 10.46235/1028-7221-264-PVO

DOI: 10.46235/1028-7221-264-PVO

области ДНК-связывающего домена. Также в одном наблюдении (0,9%) выявлена тандемная дупликация протяженностью 19 оснований в 960 позиции кодирующей последовательности NLS-домена белка, располагающаяся на сайте ацетилирования. Несинонимичная трансверсия C215G, являвшаяся полиморфным вариантом гена, определялась в 94 пробах (82,5%). Клинически все *TP53*-позитивные ОМЛ характеризовались неблагоприятным прогнозом и первичной резистентностью опухоли к стандартной полихимиотерапии. Средний возраст таких больных составил $63,0 \pm 5,4$ лет, что достоверно выше, чем в среднем по выборке. Средняя длительность наблюдения равнялась $3,1 \pm 0,9$ месяца.

Ключевые слова: мутация, прогноз, острый миелоидный лейкоз, секвенирование, ген *TP53*

PATHOGENETIC VALUE OF *TP53* POINT MUTATIONS IN ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

Vinogradov A.V.^{a,b}, Rezaykin A.V.^b, Litvinova D.V.^b, Loboda A.N.^b, Sazonov S.V.^{b,c}, Sergeev A.G.^b

^a Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

^c Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to assess pathogenetic significance of *TP53* gene mutations in adult acute myeloid leukemia (AML) patients. Clinical observation was carried out on 114 AML patients at the Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1 (Ekaterinburg), including 56 males and 58 females. The average age of subjects was 53.3 ± 2.8 years.

Morphologically, AML was previously verified in all cases at specialized laboratories by using standard cytological, cytochemical, immunophenotypic, histological and immunohistochemical methods. The study included the following variants of AML: M0 – 5, M1 – 9, M2 – 47, M2baso – 3, M2eo – 2, M3 – 8, M4 – 25, M4eo – 3, M5 – 3, M6 – 4, M7 – 1, acute myelofibrosis – 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm – 2. Samples of peripheral blood and bone marrow aspirates from patients were examined. Exons 4-11 within the *TP53* gene were tested for molecular damage by using sequencing method. In addition, 81 samples, including 22 AML with normal and 23 with an unspecified karyotype were examined for gene mutations by using molecular genetic and immunohistochemical methods. cDNA sequencing was carried out on automatic genetic analyzer in forward and reverse sequences. The sequencing results were processed by using the MEGA X software and statistical hypothesis that they may be described by a binomial distribution. The statistical hypothesis was tested by using Fisher's exact test and χ^2 test.

According to the results of cytogenetic and PCR studies, a favorable prognosis was determined in 25 cases (21.9%), intermediate – 24 (21.1%) and unfavorable – in 33 (28.9%). No genetic abnormalities could be detected in 32 samples (28.1%) with standard cytogenetics and real-time PCR, and prognosis option for such patients was not specified.

TP53 missense mutations were revealed as C292T, A377G, A659G, C817T transitions (4 cases) and C569G, G733T, G841C transversions (3 cases); synonymous A639G substitutions were also determined (1.8%) and C891T (0.9%), in codon position 3, providing no pathogenetic significance. In one sample (0.9%), a deletion of thymidine at position 645 of the coding sequence was determined, leading to produced shortened mutant protein. All the above mutations were localized in the region of the DNA-binding domain. Also, in one case (0.9%), a tandem duplication of 19 nucleotides at position 960 of the coding sequence of the NLS domain protein located in acetylation site. Non-synonymous C215G transversion, which is a polymorphic gene variant, was determined in 94 samples (82.5%). Clinically, all *TP53*-positive AML were characterized by unfavorable prognosis and primary resistance to standard chemotherapy. The average age of such patients was 63.0 ± 5.4 years, with average follow-up reaching up to 3.1 ± 0.9 months.

Keywords: mutation, prognosis, acute myeloid leukemia, sequencing, *TP53* gene

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — это клональное опухолевое заболевание кроветворной ткани, связанное с мутацией в клетке-предшественнице гемопоэза, следствием которой становится блок дифференцировки и бесконтрольная пролиферация незрелых миелоидных клеток. В европейских клинических рекомендациях по лечению ОМЛ, помимо проведения стандартных анализов, для верификации диагноза предлагается также анализ аспирата костного мозга на наличие мутаций некоторых генов, таких как *TP53*, *ASXL1*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* и ряда других [7].

Ген *TP53*, расположенный на хромосоме 17p13.1, состоит из 11 экзонов, кодирует фосфопротеин p53, состоящий из 393 аминокислот, который функционирует как фактор транскрипции с жизненно важной функцией супрессора опухоли. Он содержит несколько важных функциональных доменов: N-концевой транскрипционный домен, который взаимодействует с отрицательным регулятором MDM2 (аминокислотные остатки (а.о.) 1-64); пролиновое домен, обеспечивающий активацию апоптоза, (а.о. 63-97); ДНК-связывающий домен (а.о. 94-292); сигнал ядерной локализации (NLS, а.о. 305-322); домен тетрамеризации (а.о. 319-359); C-концевой регуляторный домен (а.о. 360-393) [6,8,9,14].

Белок p53 экспрессируется во всех ядродержащих клетках организма. Его активация происходит при повреждениях генетического аппарата и приводит к изменению способности к связыванию с ДНК и активации транскрипции генов, содержащих специфическую нуклеотидную последовательность в регуляторной области (p53-response element). В результате активации, в зависимости от модальности стимула, происходит либо остановка клеточного цикла и репликации ДНК, либо запуск программируемой гибели клетки. Соответственно, при возникновении мутаций нарушаются следующие ключевые функции белка p53: связывание и образование устойчивых комплексов с ДНК, подавление спонтанной гомологичной рекомбинации, активация эксцизионной репарации, индуцирование транскрипции NER-генов, репликация двунитевых разрывов ДНК, препятствующая анеупloidии. Все это провоцирует снижение активности антигенпрезентирующих клеток, подавление провоспалительных цитокинов, дисбаланс в работе сигнальных путей FASL/FAS, TNFR1/TNF, Treg/Th17, RANKL/RANK/OPG, что значимо в онкогенезе злокачественных опухолей системы крови [6, 8, 9, 14].

Соматические мутации *TP53* встречаются в большинстве типов sporadic онкологических заболеваний человека (частота варьирует от

5,0 до 70,0% в зависимости от типа и стадии рака). При этом в 82,1% случаев в ДНК-связывающем домене обнаруживают миссенс-мутации, 30% из которых представляют собой замену гуанина на аденин. Чаще всего мутации наблюдаются в кодонах 175, 176, 220, 245, 248, 249, 273, 282, которые находятся в ДНК-связывающем домене. Мутации *TP53* могут также передаваться по наследству в семьях с предрасположенностью к множественному раку, например, при синдроме Ли-Фраумени. Примечательно, что при некоторых видах опухолей идентифицированы спектры мутаций *TP53*, специфичные для определенной опухоли, что актуально для генодиагностики и таргетного лечения. Соответственно, мутации *TP53* являются генетическим предиктором ответа опухоли на лечение и выживаемости пациента [6, 8, 9, 14].

Цель исследования — оценка патогенетической значимости мутаций гена *TP53* у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами.

Материалы и методы

Клиническое наблюдение проведено на 114 пациентах с ОМЛ на базе ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» (г. Екатеринбург), из них 56 человек — мужчины, 58 — женщины. Средний возраст обследованных составлял $53,3 \pm 2,8$ лет.

Морфологически диагноз «ОМЛ» во всех случаях был предварительно верифицирован в специализированных лабораториях на базе ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» и ГАУЗ СО «Свердловское областное патологоанатомическое бюро» с использованием стандартных цитологических, цитохимических, иммунофенотипических, гистологических и иммуногистохимических методик. В соответствии с этим, в исследование включены следующие варианты ОМЛ по классификации ВОЗ: M0 — 5, M1 — 9, M2 — 47, M2базо — 3, M2эо — 2, M3 — 8, M4 — 25, M4эо — 3, M5 — 3, M6 — 4, M7 — 1, острый миелофиброз — 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 2 [3, 5].

В исследуемой группе всем пациентам выполнено цитогенетическое (G-banding) и молекулярно-генетическое (методами ПЦР в режиме реального времени и прямого автоматического секвенирования) исследования. Протестированы на наличие молекулярных повреждений экзона 4-11 гена *TP53* в соответствии с ранее описанными методиками [1, 4]. Кроме того, 81 проба, в том числе 22 — ОМЛ с нормальным кариотипом и 23 — с неуточненным, были обследованы на наличие мутаций гена *NPM1* молекулярно-генетическим и иммуногистохимическим методами [5].

Исследовали пробы периферической крови и аспиратов костного мозга пациентов. Периферическая кровь отбиралась в исследование только при уровне бластемии не ниже 2000/мкл. Для предотвращения фрагментации и деградации РНК биообразцы сразу после отбора в вакуумные пробирки с ЭДТА и антикоагулянтом (BD Vacutainer K₂EDTA, Becton Dickinson, США) смешивались с реагентом для стабилизации РНК RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении: 1 объем биообразца и 2 объема стабилизирующего раствора. Далее, до выделения РНК, пробы хранились не более 72 часов при температуре +4 °С.

Выделение тотальной РНК с последующей обратной транскрипцией в кДНК осуществляли с использованием ревертазы М-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью. Участки кДНК, соответствующие экзонам 4-11 гена *TP53*, амплифицировали методом ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Секвенирование кДНК осуществлялось на автоматическом генетическом анализатор (секвенаторе) по прямой и обратной последовательностям [1, 4].

Обработка результатов секвенирования осуществлялась с использованием программы MEGA X [10] на основе статистической гипотезы, что они могут быть описаны биномиальным распределением. Проверка статистической гипотезы проведена с использованием точного критерия Фишера и критерия χ^2 .

Результаты

По результатам цитогенетического исследования в 31 случае (27,2%, при 95% ДИ от 19,9 до 36,0%) определялся нормальный, в 51 (44,7%, при 95% ДИ от 35,9 до 53,9%) – aberrантный кариотип опухоли. Среди aberrантных кариотипов преобладала псевдодиплоидия ($n = 24$, 47,1%, при 95% ДИ от 34,1 до 60,5%), в том числе специфические аномалии, ассоциированные с благоприятным прогнозом – 14 наблюдений (27,4%, при 95% ДИ от 17,1 до 41,0%), $t(8;21)(q22;q22) - 2$, $inv(16)(p13;q22) - 9$, $t(15;17)(q22;q21) - 3$, с неблагоприятным – 5 (9,8%, при 95% ДИ от 4,3 до 21,0%), $t(11;19)(q23;p13) - 1$, $t(9;22)(q34;q11) - 1$, $del(5q) - 1$, $t(3;3)(q21;q26) - 1$, $inv(9)(q12;p11) - 1$, прочие – 5 (9,8%, при 95% ДИ от 4,3 до 21,0%), $i(7) - 2$, $add(2)(q37) - 1$, $add(4)(p16) - 1$, $ins(7;2)(q11;p23-p25) - 1$. Анеуплоидия и комплексные аномалии кариотипа определялись в 9 (17,6%, при 95% ДИ от 9,6 до 30,3%) и 18 (35,3%, при 95% ДИ от 23,6 до 49,0%) случаях, соответственно. При дополнительном исследовании проб с

нормальным кариотипом методом ПЦР в реальном времени в двух случаях (6,5%, при 95% ДИ от 1,8 до 20,7%) при М3 определена криптическая $t(15;17)(q22;q21)$ с экспрессией химерного транскрипта PML-RARA L-типа, в одном (3,2%, при 95% ДИ от 0,6 до 16,2%), при М2 – $t(6;11)(q27;q23)$ с MLL-AF6 (KMT2A-AFDN). Кроме того, дополнительное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследование на мутации гена *NPM1* позволило выявить их в 9 образцах с диплоидией (40,9%, при 95% ДИ от 23,3 до 61,3%). Таким образом, по результатам иммуногистохимического и генетического исследований благоприятный прогноз ОМЛ определялся в 25 наблюдениях (21,9%, при 95% ДИ от 15,2 до 30,4%), промежуточный – в 24 (21,1%, при 95% ДИ от 14,6 до 29,4%), неблагоприятный – 33 случая (28,9%, при 95% ДИ от 21,4 до 37,9%). В 32 пробах (28,1%, при 95% ДИ от 20,7 до 36,9%) обнаружить генетические повреждения методами иммуногистохимии, молекулярной генетики и стандартного кариотипирования не удалось, соответственно, прогноз общей выживаемости больных не был стратифицирован [2].

В исследуемых экзонах гена *TP53* методом прямого секвенирования патогенетически значимые мутации определялись в 9 наблюдениях (7,9%, при 95% ДИ от 4,2 до 14,3%). В большинстве случаев они были представлены миссенс-мутациями (7 случаев, 6,1% при 95% ДИ от 3,0 до 12,1%), по одному случаю (0,9%, при 95% ДИ от 0,2 до 4,8%) – делеция и tandemная дупликация. Во всех наблюдениях, за исключением tandemной дупликации, отмечалось вовлечение ДНК-связывающего домена кодируемого мутантного белка. Кариотип *TP53*-позитивных лейкозов в 7 случаях характеризовался наличием комплексных хромосомных aberrаций, при этом среди них в трех случаях выявлялись структурные aberrации с вовлечением сегмента 17p – делеции ($n = 2$) и вставки ($n = 1$). В оставшихся пробах определялись диплоидия и неуточненный кариотип [2] – по одному наблюдению. Соответственно, после дополнительного исследования мутационного статуса *TP53* методом секвенирования прогноз во всех случаях стратифицировался как неблагоприятный. Морфологически варианты ОМЛ с выявленными мутациями *TP53* характеризовались как М2 ($n = 4$), М2эо ($n = 2$), М4 ($n = 1$) и М6 ($n = 2$). Клинически эти случаи характеризовались первичной резистентностью ($n = 8$) опухоли либо ранней летальностью ($n = 1$). Средний возраст *TP53*-позитивных больных ОМЛ составил $63,0 \pm 5,4$ лет, средняя длительность наблюдения – $3,1 \pm 0,9$ месяцев.

Среди выявленных патогенетически значимых миссенс-мутаций преобладали несинони-

мичные транзиции (4 случая, 3,5%, при 95% ДИ от 1,4 до 8,7%), при этом в одной из исследованных проб одновременно выявлялись сразу две из них (С292Т, С817Т). Наиболее часто встречалась транзиция С817Т (экзон 8), которая, соответственно определялась в двух пробах (1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%, изолированная и в сочетании с С292Т, экзон 4). По одному наблюдению определялись несинонимичные замены А377G (экзон 5) и А659G (экзон 6). Таким образом, случаи транзиций пуриновых и пиримидиновых оснований встречались в одинаковом числе исследованных проб (n = 2, 1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%).

Несинонимичные трансверсии определялись в 3 случаях (2,6%, при 95% ДИ от 0,1 до 7,4%) и были представлены, соответственно, заменами С569G (экзон 6), G733Т (экзон 7) и G841С (экзон 8), то есть во всех случаях было задействовано гуаниновое основание.

Наряду с функционально значимыми заменами, в двух пробах (1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%) определялись другие типы мутаций гена TP53, значимые для онкогенеза ОМЛ. В первом случае (0,9%, при 95% ДИ от 0,2 до 4,8%) при морфологическом варианте М2 с кариотипом 47, XY, del(3)(p12), del(5)(q31), add(17)(p13), -7, +21,+mar определялась фреймшифт-делеция тимидина в позиции 645 кодирующей последовательности экзона 6 гена TP53, приводящая к синтезу укороченного (до 245 аминокислотных остатков) мутантного белка. Во втором наблюдении, при ОМЛ М2 с неуточненным кариотипом, в позиции 960 кодирующей последовательности экзона 9 определялась тандемная дупликация (фреймшифт-инсерция), протяженностью 19 оснований нуклеотидов. В результате синтезировался нефункциональный полипептид, т.к. мутация располагалась в сайте ацетилирования и вовлекала NLS-домен tp53.

Несинонимичная трансверсия С215G (экзон 4), являющаяся полиморфным аллельным вариантом гена TP53 [6, 11], и обуславливавшая замену в кодируемом полипептиде аминокислотного остатка Р72R, определялась в 94 пробах (82,5%, при 95% ДИ от 74,5 до 88,4%). Кодирующая последовательность TP53 «дикого типа», соответствующая референсной NM_000546, обнаруживалась лишь в 13 наблюдениях (11,4%, при 95% ДИ от 6,8 до 18,5%).

Наряду с миссенс-мутациями, в 3 пробах (2,6%, при 95% ДИ от 0,9 до 7,5%) определялись также синонимичные транзиции по третьей позиции нуклеотида в кодоне, соответственно, не приводящие к замене кодируемой аминокислоты ввиду вырожденности генетического кода. В двух случаях (1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%) они

были представлены транзицией А639G, в одном (0,9%, при 95% ДИ от 0,3 до 9,6%) – С891Т. В двух случаях они определялись у больных с неуточненным кариотипом [2], по одному наблюдению – диплоидия и t(9;22)(q34;q11).

Обсуждение

По данным международных баз данных [11, 12, 13], в структуре точечных мутаций TP53 при ОМЛ преобладают несинонимичные замены (60,0%), среди которых подавляющее большинство составляют миссенс-мутации (91,7%). Среди прочих молекулярных повреждений в 15,0% случаев выявляются мутации сайтов сплайсинга, по 10% – фреймшифт-делеции и инсерции, 5% – синонимичные замены. При этом не обнаружено зависимости уровня экспрессии белка tp53 от типа мутации при сравнении укороченных мутантных белков с мутантными полноразмерными и нормальными (немутантными) [13]. Полученные в нашем исследовании результаты в целом соответствовали вышеописанной структуре: миссенс-мутации составили 58,3% наблюдений, фреймшифт-делеции и инсерции – по 8,3%, синонимичные замены – 25,0%. Мутации сайтов сплайсинга в нашем исследовании не определялись, т.к. секвенирование было ограничено кодирующими последовательностями экзонов 4-11 гена TP53.

Среди выявленных миссенс-мутаций особого внимания заслуживали трансверсия G733Т, обуславливавшая замену глицина на цистеин в позиции R245 белка, и транзиция С817Т, приводящая к замене аргинина на цистеин в остатке 273. Указанные аномалии входят в число самых распространенных соматических мутаций (так называемых «горячих точек») TP53 по данным IARC TP53 Database [12], причем доля последней достигает 17,0% в структуре изменений гена при ОМЛ. Это полностью соответствует полученным в нашем исследовании данным (16,6%). Среди прочих несинонимичных замен транзиция А659G и трансверсия G841С, обуславливающие, соответственно, мутации Y220С и D281Y в ДНК-связывающем домене белка, также описаны как онкогенные при лейкозах [11]. Мутация А659G, кроме того, описана как наследственная при синдроме Ли–Фраумени, при котором отмечается предрасположенность к развитию целого ряда онкологических заболеваний [12]. Более редкой является мутация С292Т, приводящая к изменению аминокислотной последовательности пролинового домена белка P98S. Данная перестройка при ОМЛ встречается нечасто и характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. В нашем исследовании она выявлялась в одной пробе одновременно с более типичной транзицией С817Т.

Замена цитозина на глутамин С569G, выявленная в одной пробе и способствующая нарушению белковой цепи с последующими необратимыми функциональными изменениями, также зарегистрирована при злокачественных миелоидных новообразованиях, но с небольшой частотой. При этом предполагается, что указанные изменения могут быть ранними, обуславливающими, в свою очередь, вторичные генетические аномалии вследствие развития генетической нестабильности, обусловленной активацией и супрессией целого ряда *TP53*-зависимых генов [11, 12, 13]. Это корреспондировало со структурой выявленных при *TP53*-позитивных ОМЛ хромосомных aberrаций, среди которых в нашем исследовании преобладали комплексные аномалии кариотипа (в 77,8% наблюдений).

В соответствии с гипотезой о синтетических леталях, экспрессия определенных онкогенов значимо активируется в *TP53*-позитивных злокачественных новообразованиях по сравнению с *TP53*-негативными опухолями и нормальными тканями. Соответственно, разработка и применение таргетных противоопухолевых препаратов, направленных на синтетические летали, является перспективным для лечения *TP53*-позитивных ОМЛ [13]. Среди них при *TP53*-позитивных ОМЛ рассматривают следующие гены, участвующие в процессах апоптоза, активации ГТФаз, связывания белков, микротрубочек, кинезина и протеинкиназ: AUNIP (aurora kinase A and ninein interacting protein), DDIAS (DNA damage induced apoptosis suppressor), DEPDC1 (DEP domain containing 1) и FAM83D (family with sequence similarity 83 member D). Наоборот, экспрессия некоторых других генов при мутациях *TP53* подавляется, соответственно, в исследовании иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методами не было выявлено мутаций и изменения клеточной экспрессии гена *NPM1* при *TP53*-позитивных ОМЛ.

Таким образом, сравнительный анализ полученных в исследовании результатов и международных баз данных подтверждает, что выявленные мутации *TP53* имеют онкогенное значение

для развития ОМЛ. При этом в большинстве проб определялись миссенс-мутации, расположенные в ДНК-связывающем домене, что соответствовало их наиболее типичной локализации в гене *TP53* [11, 12, 13].

Заключение

Исследование мутационного статуса гена *TP53* методом прямого автоматического секвенирования оказалось значимым для стратификации прогноза общей выживаемости больных ОМЛ. В исследуемой выборке было выявлено 8,1% образцов с патогенетически значимыми мутациями, все они были ассоциированы с крайне неблагоприятным прогнозом. Среди них наиболее часто встречались миссенс-мутации (6,1%), затрагивающие ДНК-связывающий домен (экзоны 5-8). Также определялись однонуклеотидная фрейм-шифт-делеция в экзоне 6 и tandemная дупликация (фрейм-шифт инсерция) в экзоне 9 (по одной пробе, 0,9%). Последняя располагалась вне области ДНК-связывающего домена, затрагивая сайт ацетилирования NLS-домена белка p53.

Клинически случаи ОМЛ с мутациями *TP53* характеризовались первичной резистентностью лейкозного клона к стандартной полихимиотерапии либо ранней летальностью, средняя продолжительность наблюдения составила $3,1 \pm 0,9$ месяцев. Средний возраст больных ОМЛ с мутациями *TP53* был выше, чем в целом по выборке — $63,0 \pm 5,4$ лет. При этом мутации *TP53* определялись у больных в возрасте 48-79 лет, медиана возраста выявления мутаций составила 61 год.

Заслуживает внимания также тот факт, что в исследуемой выборке не выявлено мутаций и изменения клеточной локализации экспрессии гена *NPM1* при *TP53*-позитивных ОМЛ иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методами, что свидетельствует в пользу отсутствия связи между этими молекулярными событиями в онкогенезе ОМЛ.

В целом спектр выявленных в исследовании мутаций гена *TP53* при ОМЛ соответствует описанному в международных базах данных [11, 12, 13].

Список литературы / References

1. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах // Российский онкологический журнал, 2013, № 4. С. 34-35. [Vinogradov A.V. Technology development of CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 gene mutations detection during acute myeloid leukemia. *Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal = Russian Journal of Oncology*, 2013, no. 4, pp. 34-35. (In Russ.)]
2. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Изотов Д.В., Сергеев А.Г. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2016. № 4. С. 38-51. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype

using direct sequencing technique. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2016, no. 4, pp. 38-51. (In Russ.)]

3. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Салахов Д.Р., Сергеев А.Г. Бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль: опыт диагностики и лечения в Свердловском областном онкогематологическом центре // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2. С. 110-114. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Salakhov D.R., Sergeev A.G. Blastic plazmatsitoids dendritocell tumour: experience of diagnostics and treatment in the Sverdlovsk regional oncohematological center. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2, pp. 110-114. (In Russ.)]

4. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15-45 лет // Гены и клетки, 2018. Т. 14, № 3. С. 70-74. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Clinical and pathological features DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patient aged 15-45 years old. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. 14, no. 3, pp. 70-74. (In Russ.)]

5. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р., Иощенко С.Е., Сергеев А.Г. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена NPM1 при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2013. № 4. С. 124-127. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R., Ioschenko S.E., Sergeev A.G. Comparative analysis of NPM1 gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2013, no. 4, pp. 124-127. (In Russ.)]

6. Hainaut P., Pfeifer G.P. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2016, Vol. 6, no. 11, pii: a026179. doi: 10.1101/cshperspect.a026179.

7. Herold T., Rothenberg-Thurley M., Grunwald V.V., Janke H., Goerlich D., Sauerland M.C., Konstantin N.P., Dufour A., Schneider S., Neusser M., Ksienzyk B., Greif P.A., Subklewe M., Faldum A., Bohlander S.K., Braess J., Wörmann B., Krug U., Berdel W.E., Hiddemann W., Spiekermann K., Metzeler K.H. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2020. doi: 10.1038/s41375-020-0806-0.

8. Huang R., Liao X., Li Q. Identification of key pathways and genes in TP53 mutation acute myeloid leukemia: evidence from bioinformatics analysis. *OncoTargets Ther.*, 2017, Vol. 11, pp. 163-173.

9. Hunter A.M., Sallman D.A. Current status and new treatment approaches in TP53 mutated AML. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2019, Vol. 32, no. 2, pp. 134-144.

10. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, Vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549.

11. Leroy B., Girard L., Hollestelle A., Minna J.D., Gazdar A.F., Soussi T. Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: a reassessment. *Hum. Mutat.*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 756-765.

12. Li V.D., Li K.H., Li J.T. TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2019, Vol. 145, no. 3, pp. 625-636.

13. Wang X., Sun Q. TP53 mutations, expression and interaction networks in human cancers. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 1, pp. 624-643.

14. Welch J.S. Patterns of mutations in TP53 mutated AML. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2018, Vol. 31, no. 4, pp. 379-383.

Авторы:

Виноградов А.В. — к.м.н., главный терапевт
Министерства здравоохранения Свердловской области;
врач-гематолог, соискатель ФГБОУ ВО «Уральский
государственный медицинский университет»
г. Екатеринбург, Россия

Резайкин А.В. — к.м.н., доцент кафедры медицинской
физики ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Vinogradov A.V., PhD (Medicine), Chief Therapist,
Hematologist, Sverdlovsk Regional Ministry of Health;
Hematologist, Postdoc Researcher of Ural State Medical
University, Ekaterinburg, Russian Federation

Rezaikin A.V., PhD (Medicine), Associate Professor,
Department of Medical Physics, Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russian Federation

Литвинова Д.В. — клинический ординатор ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

Litvinova D.V., Clinical Resident, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Лобода А.Н. — студент ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

Loboda A.N., Student, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Сазонов С.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»; заместитель директора по науке ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Sazonov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Histology, Ural State Medical University; Deputy Head, Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation

Сергеев А.Г. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

Sergeev A.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 02.06.2020
Принята к печати 01.07.2020

Received 02.06.2020
Accepted 01.07.2020