

# Сравнительный анализ мутаций в гене *TP53* у больных ДВККЛ г.Новосибирска с данными, представленными в IARC *TP53* mutation database

Воропаева Е.Н.<sup>1\*</sup>, Поспелова Т.И.<sup>2</sup>, Воевода М.И.<sup>1</sup>, Максимов В.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины»; \* vena.81@mail.ru

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Актуальность.** В текущей версии IARC *TP53* mutation database информация о частоте и спектре мутаций в гене *TP53* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) российской популяции не представлена. **Цель исследования:** сравнить частоту и спектр мутаций в гене *TP53* у больных ДВККЛ г.Новосибирска с данными, представленными в IARC *TP53* mutation database. **Материалы и методы.** Методом прямого секвенирования по Сэнгеру выполнен анализ кодирующей последовательности гена *TP53* (с 5 по 10 экзоны) в опухолевой ткани 74 пациентов с впервые установленным диагнозом ДВККЛ. **Результаты.** В группе исследования у 24,3% пациентов были выявлены мутации в кодирующей последовательности 5–8 экзона гена *TP53*. Множественные мутации имели 4% пациентов. Выявлены случаи потери гетерозиготности в гене *TP53* в опухолевой ткани ДВККЛ. Спектр однонуклеотидных замен в *TP53* в группе исследования значительно не отличается от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database, вместе с тем, наблюдались отличия по локализации «горячих точек» мутаций. В анализируемой выборке больных ДВККЛ «горячими точками» мутаций являлись кодоны 275, 155, 272 и 212. **Выводы.** При сравнительном анализе результатов секвенирования в гене *TP53* опухолевой ткани больных г.Новосибирска с данными, представленными в IARC *TP53* mutation database, выявлены различия в спектре мутаций. Частота мутаций в гене *TP53* опухолевой ткани в группе исследования согласуется с данными литературы.

**Ключевые слова:** ген *TP53*, IARC *TP53* mutation database, мутации, диффузная В-крупноклеточная лимфома

## Comparative analysis of *TP53* gene mutations in patients with DLBCL of Novosibirsk with data presented in IARC *TP53* mutation database

Voropaeva E.N.<sup>1\*</sup>, Pospelova T.I.<sup>2</sup>, Voivoda M.I.<sup>1</sup>, Maksimov V.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — Federal state budgetary scientific institution «Scientific Research Institute of Internal and Preventive medicine», Novosibirsk, Russia; \* vena.81@mail.ru

<sup>2</sup> — Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

**Relevance.** The information about the frequency and spectrum of *TP53* gene mutations in Russian patients with diffuse large cell lymphoma (DLBCL) is not represented in the current version of the IARC *TP53* mutation database. **Purpose of the study** was to compare the frequency and spectrum of *TP53* gene mutations in Novosibirsk patients with DLBCL with the data presented in IARC *TP53* mutation database. **Material and methods.** The *TP53* gene sequence from 5 to 10 exons of 74 tumor tissue samples of patients with newly diagnosed DLBCL was analyzed by Sanger direct sequencing. **Results.** In 24.3% of patients were identified a mutation in the coding sequence of exons 5–8 *TP53* gene. Multiple mutations had 4% of patients. The cases of loss of heterozygosity in the *TP53* gene in DLBCL tumor tissue were revealed. The spectrum of single-nucleotide substitutions in the *TP53* in the study group did not significantly differ from the data presented in IARC *TP53* mutation database, but we observed differences in localization of the «hot spot» mutations. In the analyzed group of patients with DLBCL «hot spots» mutations were in codons 275, 155, 272 and 212. **Conclusions.** Comparative analysis of the results of sequencing gene *TP53* in tumor tissue of patients with DLBCL in Novosibirsk with the data presented in IARC *TP53* mutation database is revealed differences in the spectrum of mutations. The frequency of mutations in the gene *TP53* in the study group are consistent with the literature dates.

**Keywords:** gene *TP53*, IARC *TP53* mutation database, mutations, Diffuse Large B-cell Lymphoma

### Актуальность

Частота мутаций в гене *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) колеблется от 17,6 до 23,2% [1]. Такие колебания могут быть связаны с ограничениями применяемых для обнаружения мутаций методов, неоднородностью анализируемых выборок по размеру и этнической принадлежности, различиями

в спектре мутаций в гене *TP53*, а также гетерогенностью самого заболевания [2].

В текущей версии базы данных IARC *TP53* mutation database 2012 (R17) содержится информация о более чем 120 типах мутаций, описанных при ДВККЛ. «Горячими точками» мутаций в гене *TP53* при ДВККЛ, согласно IARC *TP53* mutation database, являются кодоны 248, 273, 175, 245, 281, 244, 305, 249 и 297 [3].

Несмотря на большое прогностическое значение [2, 4, 5], анализ последовательности гена *TP53* на наличие мутаций не входит в стандарты ведения пациентов с ДВККЛ в нашей стране. Информации о российской популяции в текущей версии IARC *TP53* mutation database не представлена.

Целью настоящей работы было сравнить частоту и спектр мутаций в гене *TP53* у больных ДВККЛ г.Новосибирска с данными, представленными в IARC *TP53* mutation database.

### Материал и методы

Группу обследования составили 74 пациента с впервые установленным диагнозом ДВККЛ. Геномная ДНК была выделена из парафиновых блоков биоптатов опухолевой ткани методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. В работу брались срезы ткани, содержащие не менее 80–90% опухолевых клеток.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом (Протокол №47 от 10 сентября 2012 г.).

Все пациенты подписали информированное согласие до включения в исследование.

Анализ кодирующей последовательности гена *TP53* (с 5 по 10 экзоны) и примыкающих участков интронов проводился методом прямого секвенирования по Сэнгеру, согласно IARC protocol [6] при помощи наборов Big-Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Анализ результатов секвенирования, выравнивание и сопоставление с референсной последовательностью (NG\_017013) осуществляли с применением программ Chromas, SeqScape v.2.7, Sequence Scanner.

### Результаты исследования

В ходе анализа в группе обследования была выявлена 21 мутация в кодирующей и 12 — в интронных последовательностях гена *TP53*: 1 (3%) мутация, приводящая к нарушению сплайсинга молекулы РНК, 11 (33%) — интронных с неизвестным эффектом, 12 (37%) — миссенс, 6 (18%) — сеймсенс, 2 (6%) — нонсенс-мутации, и 1 (3%) — мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания в гене.

Ряд мутаций встречался неоднократно (в двух случаях каждая): в кодирующей последовательности — p.W146R, p.T155I, p.V272E, p.R213X, в интронных областях IVS7+31G>C, IVS9+12T>C и IVS8+10C>A (табл. 1).

Выявленные в исследуемой выборке больных ДВККЛ мутации в кодирующей последовательности были расположены в пределах 5–8 экзонов, несущих информацию о ДНК-связывающем домене *TP53*.

Три пациента (4%) обследованной выборки больных имели по несколько мутаций в кодирующей последовательности гена *TP53* (табл. 2). Обращает на себя внимание, что у двух из них все выявленные мутации были в гомозиготном состоянии. Еще у двух пациентов единичные мутации также выявлены в гомозиготном состоянии (табл. 2). Все они представляют собой случаи потери гетерозиготности в гене *TP53* в опухолевой ткани при ДВККЛ.

Все выявленные мутации, за исключением p.A189Pfs (96,9%), представляли собой однонуклеотидные замены, 5 (15,6%) из которых были мутациями типа GC>AT в CpG островках. Замены GC>AT составили 34,4%, GC>CG — 3,1%, GC>TA — 9,4%, AT>GC — 12,5%, AT>CG — 12,5%, AT>TA — 12,5%, что значительно не отличается от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database (табл. 1) [3].

В ходе исследования не выявлено мутаций в большей части кодонов (248, 273, 175, 245, 281, 305, 249 и

Таблица 1

Общая характеристика результатов секвенирования

Тип замены нуклеотида	Частота, %		p	Выявленные мутации					
	В выборке	В IARC <i>TP53</i> mutation database		Интронные		В кодирующей последовательности гена <i>TP53</i>			
				С неизвестным эффектом	Влияние на сплайсинг	Нонсенс	Сдвиг рамки считывания	Миссенс	Сеймсенс
GC>AT в CpG	15,6	26	>0,05	IVS4-30T>C IVS5+43G>T IVS5-17T>C IVS7+31G>C# IVS8+10C>A# IVS8+20A>G IVS8+37A>G IVS9+12T>C# (rs1800899)	IVS6-36G>C	p.R213X#	p.A189Pfs	p.L130F p.W146R# p.T155I# p.R156C p.R196Q p.G244S p.V272E# p.A276V p.G293R	p.V157V p.H179H p.L252L p.V272V p.G302G p.A307A
GC>AT	34,4	25							
GC>CG	3,1	8							
GC>TA	9,4	10							
AT>GC	12,5	13							
AT>CG	12,5	5							
AT>TA	12,5	8							

Примечание. # — мутации, встреченные в группе обследования дважды

297), за исключением 244-го кодона, для которых в IARC *TP53* mutation database описано наибольшее количество мутаций в гене *TP53* при ДВККЛ. В анализируемой выборке кодоны 275, 155, 272 и 212 являлись «горячими точками» мутаций.

### Обсуждение

В проведенной работе в группе исследования, состоящей из 74 больных ДВККЛ, у 18 пациентов (24,3%) были выявлены мутации в кодирующей последовательности гена *TP53*, что согласуется с частотой мутаций в *TP53*, наблюдаемой в других выборках [9].

Спектр выявленных нуклеотидных замен соответствовал, описанному в базе данных IARC *TP53* mutation database, тогда как локализация «горячих точек» мутаций различалась. Полученные результаты являются подтверждением данных литературы, свидетельствующих о том, что спектр мутаций в гене *TP53* при одном и том же типе онкологической патологии может значительно меняться в зависимости от исследуемой популяции [4, 9].

При анализе IARC *TP53* mutation database обращает на себя внимание, что в большинстве кодонов, в которых в группе исследования были верифицированы мутации, направление аминокислотных замен может быть разным, но все они приводят к развитию наследственных или спорадических форм злокачественных новообразований.

Обнаружены мутации в кодонах 196 и 213, которые являются «горячими точками» мутаций в гене *TP53* при различных злокачественных новообразованиях человека, а также в кодоне 244 — «горячей точке» мутаций при гемобластозах [6]. Так, в IARC *TP53* mutation database p.R213X зарегистрирована при более чем 300, а p.G244S — 70 случаях опухолей различного гистологического происхождения, в том числе у пациентов с гемобласто-

зами. В Мутации p.R213X, p.G244S и p.V272E ранее уже были описаны при ДВККЛ [7, 8].

Более того описаны случаи синдрома Ли-Фраумени, для которого характерно развитие первично-множественных злокачественных новообразований, вызванных герминогенными мутациями p.R213X, p.G244S, p.L130F и p.T155I [6].

Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о функциональной селекции при опухолевой прогрессии ДВККЛ мутаций в участках гена, кодирующих ДНК-связывающий домен, ответственный за выполнение белком p53 транскрипционно-зависимых функций.

### Информация о конфликте интересов:

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### Информация о спонсорстве:

*Исследование выполнено за счет гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (проект №НШ-10240.2016.7).*

### Список литературы

1. Young KH, Leroy K, Moller MB et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood*. 2008;112:3088-3098.
2. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, Tai YC et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2012;120(19):3986-96.
3. Edlund K, Larsson O, Ameer A et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and

Таблица 2

Случаи множественных мутаций и потери гетерозиготности в гене *TP53* в обследованной выборке пациентов с ДВККЛ

Номер случая	Мутация	Характер мутации	Тип мутации
1.	p.L130F	Миссенс	Гомозиготная
	p.R156C	Миссенс	Гомозиготная
2.	p.T155I	Миссенс	Гомозиготная
	p.A189Pfs	Сдвиг рамки считывания	Гомозиготная
	IVS5+43G>T	Интронная	Гомозиготная
3.	IVS4-30T>C	Интронная	Гомозиготная
	p.V157V	Синонимичная	Гомозиготная
	p.A307A	Синонимичная	Гетерозиготная
4.	IVS8+20A>G	Интронная	Гетерозиготная
	p.R196Q	Миссенс	Гомозиготная
5.	p.G293R	Миссенс	Гомозиготная

validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(24):9551-6.

4. Frebourg T, Barbier N, Kassel J. et al. A functional screen for germ line p53 mutations based on transcriptional activation. *Cancer research*. 1992;52:6976-6978.

5. Zhang Y, Hu Y, Fang JY et al. Gain-of-function miRNA signature by mutant p53 associates with poor cancer outcome. *Oncotarget*. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.7090. [Epub ahead of print]

6. <http://p53.fr>

7. Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res*. 2000;60(4):1062-1069.

8. Slingerland JM, Jenkins JR, Benchimol S. The transforming and suppressor functions of p53 alleles: effects of mutations that disrupt phosphorylation, oligomerization and nuclear translocation. *The EMBO Journal*. 1993;12(3):1029 — 1037.

9. Tennis M, Krishnan S, Bonner M et al. Method p53 mutation analysis in breast tumors by a DNA microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(1):80-85.