

**Исследование применимости метода анализа кривых плавления с высоким разрешением для детекции мутации R882H в гене DNMT3A**

**Научный руководитель – Машкина Елена Владимировна**

**Музлаева Елизавета Сергеевна**

*Студент (бакалавр)*

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Иванковского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия

*E-mail: muzlaeva.dora@gmail.com*

По данным проекта «Атлас генома рака» [1] ген *DNMT3A* относится к 127 наиболее часто мутирующим генам, приводящим к развитию онкологических заболеваний. Мутации в данном гене особенно характерны для острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и обнаружены, по разным данным, у 20-22% пациентов с ОМЛ [2]. Замена аргинина на гистидин в положении 882 (*R882H*) происходит в 38% случаев мутации гена *DNMT3A* [3]. Во многих работах отмечается отрицательное влияние этой мутации на выживаемость и эффективность терапии [2,4].

Метод анализа кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ) может быть быстрым и экономичным методом обнаружения данной мутации. Он основан на различиях в кривых плавления в зависимости от изменений в нуклеотидной последовательности гена. Замена аргинина на гистидин в положении 882 обусловлена заменой *G>A* и приводит к понижению температуры плавления фрагмента ДНК.

Исследование посвящено установлению предела обнаружения (минимальный процент мутантной ДНК в образце для успешного обнаружения) мутации R882H в гене *DNMT3A* методом HRM-анализа, а также сравнению чувствительности данного метода с этим же показателем рестрикционного анализа.

Для стандартизации процесса HRM-анализа и рестрикции были использованы синтезированные одноцепочечные ДНК ("Евроген", Россия), соответствующие фрагменту гена *DNMT3A* без мутации и с мутационной заменой одного нуклеотида (*G>A*). Так как мутация влияет на сайт рестрикции «*GCCGC*» использовалась рестриктаза Fsp4HI (СибЭнзим, Россия).

Чувствительность методов тестировали путём разведений мутантных ДНК-матриц в матрицах дикого типа. Результат разведения представляет собой пробы содержащие 100, 50, 40, 30, 20, 10 и 5% мутантных ДНК-матриц.

Исследование показало, что предел обнаружения мутации *R882H* гена *DNMT3A* составляет 10% при рестрикционном анализе, в то время как HRM-анализ позволяет обнаружить однонуклеотидную замену даже при 5% концентрации мутантной матрицы в пробе. Это даёт возможность говорить об анализе кривых плавления с высоким разрешением как о высокочувствительном методе, который может применяться для выявления мутации R882H у пациентов с низким процентом мутантных аллелей при ОМЛ.

**Источники и литература**

- 1) <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Cancer-Genome-Atlas>
- 2) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010 Dec 16;363(25):2424-33

- 3) D. Narayanan, O. Pozdnyakova, Robert P. Hasserjian. Effect of DNMT3A variant allele frequency and double mutation on clinicopathologic features of patients with de novo AML; *Blood Adv* (2021) 5 (11): 2539-2549.
- 4) Shivarov V, Gueorguieva R, Stoimenov A, Tiu R. DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients. *Leuk Res*. 2013 Nov;37(11):1445-50. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23962568.