

ОСОБЕННОСТИ ПРОЕКТИРОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ПРОГНОЗА ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ НА ОСНОВЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРАХ.

КУЛАЕВА Е.Д.¹✉, ЛИПИЛКИН П.В.²

¹ Южный федеральный университет, НИИ биологии Южного федерального университета, научно-исследовательская лаборатория кафедры генетики «Биология развития и организации генома», Ростов-на-Дону, Россия

² Кафедра «Биология и общая патология» Донского государственного технического университета, Ростов-на-Дону, Россия

CHARACTERISTICS OF TEST SYSTEMS DESIGN FOR DIAGNOSTICS AND PROGNOSIS EVALUATION OF MYELODYSPLASTIC SYNDROME BASED ON SOMATIC MUTATIONS IN EPIGENETIC REGULATORS.

KULAEVA E.D.¹✉, LIPILKIN P.V.²

¹ Southern Federal University, Research Institute of Biology, Research Laboratory of Department of Genetics "Biology of Genome Development and Organization", Rostov-on-Don, Russia.

² Department "Biology and General Pathology" of the Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia

Ключевые слова: онкогенетика, эпигенетика, миелодиспластический синдром, DNMT3A, ASXL1.

Keywords: oncogenetics, epigenetics, myelodysplastic syndrome, DNMT3A, ASXL1.

Миелодиспластический синдром (МДС) — это гетерогенная группа клональных заболеваний системы крови, возникающих вследствие мутации гемопоэтической стволовой клетки и характеризующихся высоким риском трансформации в острый лейкоз. Минусом существующих тест-систем для диагностики МДС является отсутствие их явной клинической значимости. Мы сосредоточились на создании тест-системы на основе соматических мутаций в эпигенетических регуляторах ASXL1 и DNMT3A, для которых уже определена частота

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal diseases of the blood system arising from a hematopoietic stem cell mutation and characterized by a high risk of transformation into acute leukemia. The disadvantage of the existing test systems for diagnostics of MDDS is the absence of their apparent clinical significance. We focused on creating a test system based on somatic mutations in the epigenetic regulators ASXL1 and DNMT3A, for which the frequency of occurrence and prognostic importance have already been determined.

Цитирование: Кулаева Е.Д., Липилкин П.В. Особенности проектирования тест-систем для диагностики и оценки прогноза при миелодиспластическом синдроме на основе соматических мутаций в эпигенетических регуляторах. Russian Scientist. 2020. т.4 №1: 8-10

Citing: Kulaeva ED, Lipilkin PV. Characteristics of test systems design for diagnostics and prognosis evaluation of myelodysplastic syndrome based on somatic mutations in epigenetic regulators. Russian Scientist. 2020. v.4 №1: 8-10

✉ ked05685@gmail.com

Материал прошёл одностороннее слепое рецензирование.

The manuscript took a single-blind peer review.

встречаемости и прогностическая значимость.

ASXL1 — это белок группы Polycomb, регулирующий деубиквитинирование гистона H2A. Мутации в ASXL1 часто выявляются у пациентов с риском развития МДС и способствуют миелоидной трансформации. DNMT3A (ДНК-метилтрансфераза 3A), обеспечивает *de novo* метилирование. Соматические мутации в DNMT3A регистрируются в 20–30 % случаев МДС и могут быть фактором развития острого миелоидного лейкоза.

Конкретные мутации, которые были выбраны для тест-системы, это c.1934dupG в ASXL1 (частота встречаемости при МДС 14,11% [1] и c.2645G>A (R882H) в DNMT3A (частота встречаемости 12,2% [2]). Затем мы приступили к проверке существующих методик для идентификации обозначенных выше мутаций и разработке новых протоколов.

Мутация c.1934dupG располагается в 8G-участке ASXL1 и превращает его в 9G-участок. Yannakou et al. [1] разработали метод, основанный на ПЦР в реальном времени, основная идея которого заключается в оценке эффективности амплификации ДНК с помощью 9G- и 8G-праймеров и сравнении её с эффективностью амплификации с помощью эталонных праймеров, нацеленных на консервативную область экзона 12 ASXL1. Результаты представляют в виде разницы пороговых циклов (Ct) между эталонными праймерами и используемыми. Преимуществами такого подхода являются его доступность для клинических лабораторий и быстрая обработка по сравнению с секвенированием.

Но в процессе проверки этого метода на использование в тестовой системе мы выявили серьёзное ограничение: по этому методу невозможно определить, произошла ли мутация в

ASXL1 is a protein of the Polycomb group regulating deubiquitination of H2A histone. Mutations in ASXL1 are often detected in patients at risk for MDS and promote myeloid transformation. DNMT3A (DNA methyltransferase 3A), provides *de novo* methylation. Somatic mutations in DNMT3A are registered in 20-30% of cases of MDS and may be a factor in the development of acute myeloid leukemia.

Specific mutations that were selected for the test-system is c.1934dupG in ASXL1 (frequency of occurrence in MDS 14.11% [1] and c.2645G>A (R882H) in DNMT3A (frequency of occurrence 12.2% [2]). Then we started to check the existing methods to identify the above mutations and develop new protocols.

Mutation c.1934dupG is located in the 8G-region of ASXL1 and turns it into a 9G-region. Yannakou et. al [1] developed a qRT-PCR assay, the main idea of which is to evaluate the efficiency of DNA amplification using 9G and 8G primers and to compare it with amplification efficiency using reference primers targeting a separate region of ASXL1 exon 12. Results are obtained as a Ct difference between reference and target primers. The advantages of this approach are its accessibility to clinical laboratories and the quick processing compared to sequencing.

But during the process of checking this method for using in the test system, we have identified severe limitation: by this method it is impossible to determine whether the target mutation occurred: in one or both alleles in the ASXL1 gene. Moreover, it is now unknown how often the mutation occurs in both alleles of the ASXL1 gene and whether heterozygous and homozygous states differ in terms of disease severity.

Therefore, a test system requires a method that

одном или в обоих аллелях гена ASXL1. Более того, сейчас неизвестно, как часто мутация происходит в обоих аллелях гена ASXL1 и различаются ли гетерозиготные и гомозиготные состояния по мутации, по тяжести заболевания.

Поэтому для тест-системы необходим метод, который мог бы отличить гомозиготы от гетерозигот по мутации. Для этого мы разрабатываем протокол идентификации, основанный на HRM-анализе (анализ кривых плавления с высоким разрешением), который на основе разницы температур плавления транскрипта с мутацией и без неё (0,1°С) позволит определить не только наличие или отсутствие мутации, но и её зиготность.

Вторая обозначенная мутация (с.2645G>A (R882H) в гене DNMT3A) часто выявляется с помощью рестрикционного анализа. В работе Berenstein et al. [2] были указаны оптимальные праймеры для проведения ПЦР перед рестрикцией. Используя те же праймеры и условия реакции, мы получили низкие показатели специфичности их связывания, а также выделение неспецифичного продукта, критически важной для идентификации результатов рестрикции длины, что может привести к ложноположительному результату, поэтому сейчас мы работаем над повышением специфичности условий проведения ПЦР и оптимизируем праймеры.

Ожидаемым результатом работы будет создание точной и клинически значимой тест-системы для диагностики и оценки прогноза при МДС, а также, вероятно, уточнение частоты встречаемости указанных в работе мутаций.

Список источников:

- 1.Yannakou C. K. et al. ASXL1 c. 1934dup; p. Gly646Trpfs* 12—a true somatic alteration requiring a new approach // Blood cancer journal. – 2017. – Т. 7. – №. 12. – С. 1-4.
- 2.Berenstein R. et al. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2014. – Т. 33. №1.– С. 1-12.

could distinguish homozygotes from heterozygotes by mutation state. For this purpose, we are developing an identification protocol based on HRM-analysis (high resolution melting), which based on the melting temperature difference between the transcript with and without a mutation (0.1°С) will determine not only the presence or absence of a mutation, but also its zygosity.

The second identified mutation (с.2645G>A (R882H) in the DNMT3A gene) is often detected by restriction analysis. Berenstein et al. [2] indicated the optimal primers for conducting PCR before restriction. Using the same primers and reaction conditions, we obtained low specificity of their binding as well as the identification of a non-specific product critical for the identification of length restriction results, which may lead to a false positive result, so we are now working to improve the specificity of PCR conditions and optimize the primers.

The expected result of this work will be the creation of an accurate and clinically significant test system to diagnose and evaluate the MDS prognosis, and probably to clarify the frequency of mutations specified in the work.

List of references:

- 1.Yannakou C. K. et al. ASXL1 c. 1934dup; p. Gly646Trpfs* 12—a true somatic alteration requiring a new approach // Blood cancer journal. – 2017. – Т. 7. – №. 12. – С. 1-4.
- 2.Berenstein R. et al. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2014. – Т. 33. – №. 1. – С. 1-12.