Секция «Молекулярная биология»

Клеточные модели ассоциированных с лейкозами хромосомных транслокаций

Научный руководитель – Рубцов Михаил Александрович

Въюшков В.С.[1], *Ломов Н.А.*[1]

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

Развитие вторичных лейкозов — один из известных побочных эффектов химиотерапии злокачественных опухолей. Заболевания, вызванные применением противоопухолевого препарата этопозида, зачастую обуславливаются транслокациями с участием генов *AML1 (RUNX1)* и *MLL1* (*KMT2A*) [1]. Частыми партнерами по транслокациям для этих генов являются гены *ETO* и *AF9*, соответственно [2,3]. Подобные транслокации хотя и ведут к преимуществу при делении клеток, но сами по себе, являются крайне редким событием и возникают в единичных клетках популяции. Для изучения механизма возникновения данных транслокаций необходимы клеточные модели, в которых они будут возникать в значительной доле клеток в популяции с измеряемой частотой. Удобным способом индукции транслокаций представляется внесение двух направленных двуцепочечных разрывов в ДНК посредством CRISPR/Cas9. Репарация по пути негомологичного соединения концов должна, с определенной вероятностью, приводить к образованию искомых транслокаций между локусами, в которые вносятся разрывы [4,5].

Имея целью создание клеточных моделей транслокаций *AML1-ETO* и *MLL1-AF9,* мы проверили работоспособность системы: собрали плазмиды, содержащие гены РНК-гидов или Cas9. После чего провели транзиентную трансфекцию клеток линии HeLa плазмидами с генами двух гидовых РНК и геном Cas9 и показали возникновение перестроек между таргетируемыми локусами с помощью ПЦР. Затем мы собрали плазмиду, содержащую гены РНК-гидов, таргетирующих гены *AML1* и *ETO,* и ген Cas9 с системой индукции транскрипции Тет-ON. Эту конструкцию мы интегрировали в геном клеток лимфобластоидной культуры RPMI 8866. В полученной стабильной клеточной линии мы подтвердили экспрессию Cas9 при активации доксициклином с помощью ПЦР с обратной транскрипцией.

Результаты экспериментов подтверждают, что данный подход позволяет индуцировать хромосомные перестройки в культуре клеток, а создаваемые клеточные модели могут быть использованы для скрининга препаратов, снижающих потенциальный риск возникновения хромосомных транслокаций в ходе химиотерапии, и, как следствие, частоту развития вторичных лейкозов.

Данная работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-54-16007_НЦНИЛ_а).

Источники и литература

1) Azarova A.M. и др. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. № 104(26). С. 11014–11019.

2) Ichikawa M. и др. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia // Int. J. Hematol. 2013. № 97(6). С. 726–734.

3) Meyer C. и др. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013 // Leukemia. 2013. №27(11). С. 2165–2176.

4) Maddalo D. и др. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system // Nature. 2014. № 516(7531). С. 423-428.

5) Bunting S.F., Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer // Nat Rev Cancer. 2013. №13(7). С. 443-454.