

СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО ВСТАВКУ СЕГМЕНТА ВНУТРЕННЕГО ПРОМОТОРА ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА *RUNX1/RUNX1T1*

А. А. Саврицкая

ВВЕДЕНИЕ

Негомологичная сбалансированная транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, возникающая между хромосомами 8 и 21, представляет собой одну из наиболее часто встречающихся генетических аномалий при лейкозах у человека. В результате транслокации образуются 2 гибридных гена. Экспрессируется только ген *RUNX1/RUNX1T1*, кодирующий гибридный белок со свойствами транскрипционного репрессора. Считается, что он обладает лейкозогенной активностью и играет ключевую роль в процессах индукции и поддержания острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [4].

Согласно классическим представлениям, транскрипция гибридного гена контролируется двумя каноническими промоторными регионами локуса *RUNX1* [5]. Однако результаты транскриптомного анализа свидетельствуют о том, что количество точек начала транскрипции у интактного гена *RUNX1* превышает две. Одно из возможных объяснений – наличие у этого гена неаннотированных промоторных регионов.

Нашей лабораторией была выполнена работа по созданию описательной биоинформационной модели аннотированных и предсказанных промоторных регионов гена *RUNX1/RUNX1T1*. В результате были получены координаты 16 промоторных регионов для гена *RUNX1* и 8 – для *RUNX1T1*.

Следующий этап работы заключается в верификации активности промоторных регионов на геномном уровне. Для этого была разработана репортёрная векторная система на основе лентивирусного вектора рHR-SINcPPT-SIEW. Активность промоторного региона оценивается по экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка, клонированного под контролем исследуемого региона, в клетках модельной клеточной линии ОМЛ Kasumi-1 [1].

Первоочередная задача при разработке системы – создание положительного контроля. Одной из подходящих областей является 8-й промоторный регион гена *RUNX1*, который совпадает со 2-м каноническим промотором этого гена. По данным литературы, он обладает наибольшей транскрипционной активностью в клетках Kasumi-1 [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ПЦР ставили по общепринятой методике. Были использованы 2 типа ДНК-полимераз: DreamTaq и Phusion High Fidelity (HF) производства Thermo Scientific. Для каждой ДНК-полимеразы использовались соответствующие буферы. Матрицей служила геномная ДНК, выделенная из клеток Kasumi-1 методом высаливания [7]. Использовались следующие праймеры: прямой – АСТТСТТСТGGCGTCCCTAG, обратный – CGGGCTGCGTACAGTAGC. Исходные параметры амплификации: первичная денатурация – 98°C 30 с, вторичная денатурация – 98°C 10 с, отжиг праймеров – 62°C 30 с, элонгация – 72°C 30 с.

Фрагмент ДНК после амплификации разгоняли в 1 %-ом агарозном геле путем электрофореза и выделяли с использованием набора реагентов «Gel Purification Kit» (Thermo Scientific), полностью следуя рекомендациям фирмы-производителя.

Аденилирование концов фрагмента проводили с помощью DreamTaq-полимеразы по методике, предложенной производителем.

Лигирование и трансформацию проводили с помощью набора реагентов «Transform Aid Bacterial Transformation Kit» (Thermo Scientific), полностью следуя рекомендациям фирмы-производителя. Для клонирования полученного вектора использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue из коллекции биологического факультета БГУ.

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реагентов «Plasmid DNA Purification Kit» (Thermo Scientific), полностью следуя рекомендациям фирмы-производителя.

Секвенирование проводилось на базе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Полученные сиквенсы выравнивались по референс-последовательности гена *RUNX1* с помощью инструмента Align Sequences Nucleotide BLAST. Наличие нуклеотидных замен и их достоверность проверялась с помощью программы Sequencing Analysis 5.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Размер предсказанной области составляет 2828 п.н. Сложность клонирования данного промоторного региона заключается в том, что он входит в состав одного из самых крупных ГЦ-богатых островков в геноме человека [6]. Ранее было предпринято несколько попыток его полноразмерной ПЦР-амплификации с использованием различных протоколов, однако они были неудачными. Изучение литературных источников позволило выяснить координаты сегмента этого региона, обладающего промоторной активностью и при этом имеющего меньший размер [2].

Его координаты относительно точки начала транскрипции (-190 +111). Исходя из этого, мы сконструировали ПЦР-праймеры для амплификации данной области. Длина продукта – 328 п.н.

На первом этапе было необходимо оптимизировать условия для амплификации целевого фрагмента. Вначале определили оптимальный состав реакционной смеси. Эффективность амплификации оценивалась по выходу целевого продукта и количеству неспецифических продуктов.

Были использованы 2 типа полимераз: DreamTaq и Phusion High Fidelity (HF). Кроме того, для HF-полимеразы помимо обычного буфера использовался специальный буфер для амплификации ГЦ-богатых матриц. Также в реакцию дополнительно вводился диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации от 1 до 5%. Максимальный выход продукта наблюдался при использовании HF-полимеразы в сочетании с буфером для амплификации ГЦ-богатых последовательностей (рис. 1).

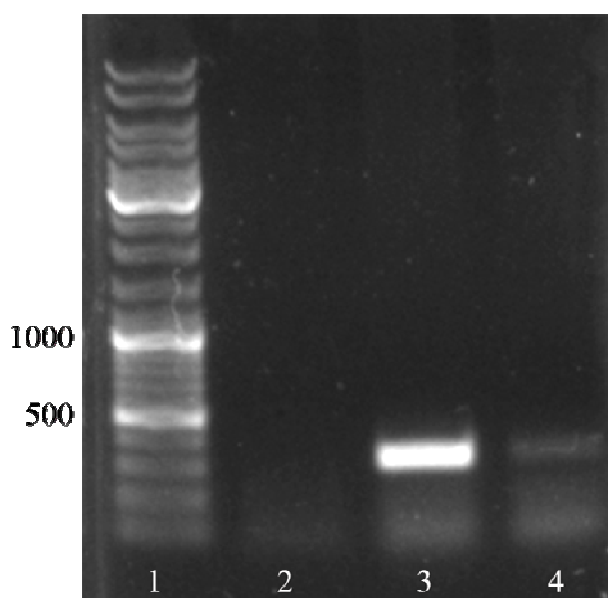


Рис. 1 Электрофореграмма результатов ПЦР-амплификации сегмента 8-го промоторного региона гена *RUNX1* в отличающихся по составу реакциях: дорожка 1 – GeneRuler Mix (Thermo Scientific), 2 – стандартная амплификация с DreamTaq-полимеразой, 3 – амплификация с HF-полимеразой в буфере для амплификации ГЦ-богатых последовательностей, 4 – амплификация с DreamTaq-полимеразой с добавлением 3 % ДМСО

Потом подбирались оптимальные условия проведения реакции. В данном случае, большое внимание уделялось такому критерию, как воспроизводимость реакции. В результате оптимальным оказался следующий протокол амплификации: продолжительность первичной денатурации – 1 мин, отжига праймеров – 10 с, элонгации – 10 с. При этом пол-

ностью избавиться от неспецифических продуктов не удалось. В связи с этим был введен дополнительный этап выделения целевого фрагмента из агарозного геля

Далее с помощью DreamTaq полимеразы на концы фрагмента навешивались непарные А. Это было необходимо для клонирования фрагмента в промежуточный Т-вектор, рTZ57R/T, несущий неспаренные тимидины на концах.

ПЦР-скрининг клонов, полученных после трансформации промежуточным вектором, проводился с применением специфических к вставке праймеров. Из обнаруженных таким образом клонов выделялась плазмидная ДНК. После секвенирования вставки выполнялось выравнивание полученного сиквенса по референс-последовательности гена *RUNX1*, определялось наличие нуклеотидных замен. Оказалось, что половина из секвенированных клонов содержит фрагмент 10-й хромосомы размером 324 п.н. Остальные же содержат сегмент 8-го промоторного региона гена *RUNX1*, не имеющий ошибок и полностью идентичный целевым областям геномной ДНК.

Дальнейшая работа заключается в выделении вставки из промежуточного вектора с помощью рестриктаз и клонировании фрагмента в лентивирусный вектор доставки.

Литература

1. Ильюшёнков И. Н., Мигас А. А., Гринёв В. В. Идентификация новых промоторных регионов гибридного гена *RUNX1/RUNX1T1* // Фундаментальные науки и современная медицина: материалы междунар. науч.-практ. конф. Минск, 2012. С. 121–124.
2. *Ghozi M.C.* Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93, № 5 P. 1935–1940.
3. *Grinev V.V.* Decoding of exon splicing patterns in the human *RUNX1-RUNX1T1* fusion gene // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2015. Vol. 68. P. 48–58.
4. *Lam K., Zhang D. E.* *RUNX1* and *RUNX1-ETO*: roles in hematopoiesis and leukemogenesis // *Frontiers in bioscience* □: a journal and virtual library. 2012. Vol. 17. P. 1120–1139.
5. *Levanon D.* Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor *RUNX1/AML1* // *Gene*. 2001. Vol. 262, № 1. P. 23–33.
6. *Peterson L.F.* The 8;21 translocation in leukemogenesis // *Oncogene*. 2004. Vol. 23, № 24. P. 4255–4262.
7. *Sambrook J.* Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA // *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, 2001. Vol. 1. P. 524–580.