

УДК 577.29:616-006.446.8

СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО СЕГМЕНТ GC-БОГАТОЙ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА *RUNX1-RUNX1T1*

А. А. САВРИЦКАЯ¹⁾, И. Н. ИЛЮШЁНОК¹⁾, В. В. ГРИНЕВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Отмечено, что молекулярное клонирование GC-богатых областей генома с помощью полимеразной цепной реакции, равно как и создание на их основе векторных конструкций, может быть нетривиальной задачей. В ходе настоящего исследования осуществлена оптимизация условий амплификации сегмента внутренней промоторной области гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Сконструирован многоцелевой лентивирусный вектор второго поколения, несущий вставку данной области. Проанализированы возникшие при работе с целевой последовательностью проблемы и пути их разрешения, на основании чего сформулированы методологические рекомендации по клонированию GC-богатых областей генома.

Ключевые слова: гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*; молекулярное клонирование; GC-богатая область; полимеразная цепная реакция.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность Александру Александровичу Мигасу (научный отдел РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, г. Минск, Беларусь) за помощь в проведении секвенирования по Сэнгеру.

Авторы А. А. Саврицкая, И. Н. Ильюшёнков внесли равный вклад в работу.

DEVELOPMENT OF THE LENTIVIRAL VECTOR WITH GC-RICH SEGMENT OF THE PROMOTER REGION OF FUSION ONCOGENE *RUNX1-RUNX1T1*

H. A. SAURYTSKAYA^a, I. M. ILYUSHONAK^a, V. V. GRINEV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: I. M. Ilyushonak (nov.ilyushonok@gmail.com)

As is known, a PCR-cloning of GC-rich regions and development the vectors with such sequences can be non trivial. In this work we performed an optimization of PCR-amplification protocol for segment of internal promoter region of fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* and developed of multipurpose lentiviral vector with insertion of this sequence. We generalize our experience of dealing with GC-rich sequences in some methodological recommendations.

Образец цитирования:

Саврицкая А. А., Ильюшёнков И. Н., Гринев В. В. Создание лентивирусного вектора, несущего сегмент GC-богатой промоторной области гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 38–44.

For citation:

Saurytskaya H. A., Ilyushonak I. M., Grinev V. V. Development of the lentiviral vector with GC-rich segment of the promoter region of fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 38–44 (in Russ.).

Авторы:

Анна Андреевна Саврицкая – студентка биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Гринев.

Илья Николаевич Ильюшёнков – ассистент кафедры генетики биологического факультета.

Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Hanna A. Saurytskaya, student at the faculty of biology.
anna.kassy.s@gmail.com

Ilya M. Ilyushonak, assistant at the department of genetics, faculty of biology.
nov.ilyushonok@gmail.com

Vasily V. Grinev, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
grinev_vv@bsu.by

Key words: fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*; molecular cloning; GC-rich region; polymerase chain reaction.

Acknowledgements. Authors are sincerely grateful to Alexandr Migas (Department of Research, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus) for assistance in Sanger sequencing.

Authors H. A. Sauryskaya, I. M. Ilyushonak contribution is equal.

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – группа неопластических заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом популяции незрелых и аномально дифференцированных лейкоцитов, проникающих в костный мозг, кровяное русло, образующих инфильтраты в других органах и тканях [1]. Наиболее часто встречающаяся цитогенетическая аномалия, ассоциированная с ОМЛ, – транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, которая фиксируется в 4–12 % случаев *de novo* ОМЛ у взрослых и 12–30 % случаев *de novo* ОМЛ у детей [2], а также в образцах здоровых доноров [3; 4]. Результат этой аномалии – образование гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, являющегося одним из драйверов малигнизации клеток крови при ОМЛ; тем не менее механизмы, вовлекающие его в лейкозогенез, остаются дискуссионными. Экспрессия этого онкогена находится под контролем двух канонических промоторов гена *RUNX1*. Оба промотора остаются активными в лейкозных бластах, причем большая часть мРНК транскрибируется в области внутреннего промотора [5]. Показано, что эти промоторы важны для нормального функционирования *RUNX1* в ходе эмбриогенеза, однако неизвестно, играют ли они какую-либо роль в процессах малигнизации клетки, ассоциированных с гибридным онкогеном. Существуют также свидетельства наличия у гибридного онкогена неаннотированных промоторных областей [6].

Удобным инструментом, позволяющим пролить свет на указанные выше неясности, являются генно-инженерные манипуляции с малигнизированными клетками. В частности, при помощи системы CRISPR возможно осуществить избирательное подавление транскрипции с интересующего нас промотора. Активность предсказанной промоторной области можно верифицировать, клонировав ее в состав вектора в качестве промотора для репортерного гена. Экспрессию гибридного онкогена (или его отдельных изоформ) можно подавить с помощью РНК-интерференции.

Однако практически в любых генно-инженерных экспериментах нам потребуется положительный контроль – векторная конструкция, несущая экспрессионную кассету с промотором, активным в лейкозных клетках. Хороший кандидат на роль такого промотора – внутренний промотор гибридного онкогена; помимо выполнения функции положительного контроля он также может быть полезен для оценки эффективности блокирования транскрипции с помощью системы CRISPR. Удобным целевым вектором для клонирования такой системы является векторная система на основе лентивируса. Исследовательский опыт, накопленный авторами, свидетельствует о том, что подобные системы способны с высокой эффективностью осуществлять трансгенез лейкозных клеток. Стоит, однако, заметить, что создание указанного вектора не является тривиальной задачей, поскольку внутренний промотор *RUNX1-RUNX1T1* локализован в одной из самых крупных GC-богатых областей человеческого генома.

Материалы и методы исследований

Работа с клеточными культурами. Клетки модельной клеточной линии острого миелоидного лейкоза Kasumi-1 культивировались в полноценной среде RPMI-1640 (Lonza, Швейцария), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, при температуре 37 °C и 5 % концентрации CO₂ в атмосфере. Культура бактерий *E. coli* XL-1 Blue выращивалась на плотной питательной среде LB по стандартной методике.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Выделение геномной ДНК из клеток Kasumi-1 осуществлялось методом высаливания [7], в последующем 200 нг этой ДНК использовались в качестве матрицы при постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* осуществлялось стандартным методом щелочного лизиса. Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля выполнялась при помощи набора GeneJET Gel Extraction Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Литва).

Полимеразная цепная реакция. Для каждой из использованных нами полимераз готовился двукратный премикс, содержащий, кроме самого фермента, специфический буфер и дезоксирибонуклеотидтрифосфаты в концентрациях, указанных производителем (*Thermo Fisher Scientific*, Литва). Праймеры использовались в конечной концентрации 300 нмоль/л. Более детально схемы различных ПЦР рассмотрены в разделе «Результаты исследований и их обсуждение».

Молекулярное клонирование. Для аденилирования 3'-концов продукта ПЦР готовились 10 мкл реакционной смеси, содержащей 200 нг ДНК, 0,2 ммоль/л дезоксиаденилтрифосфата и 1 ед. ДНК-полимеразы

DreamTaq (*Thermo Fisher Scientific*, Литва) в соответствующем буфере, после чего данная смесь прогревалась при 72 °С в течение 20 мин. Далее, фрагмент лигировался в промежуточный Т-вектор pTZ57R/T в буфере DreamTaq-полимеразы с добавлением аденозинтрифосфата (АТФ). Рестрикция и лигирование в лентивирусный вектор осуществлялись в соответствии с рекомендациями производителя реагентов (*Thermo Fisher Scientific*, Литва). Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL-1 Blue проводилась с помощью Transform Aid Bacterial Transformation Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Литва).

ПЦР-скрининг бактериальных трансформантов. Изолированные колонии трансформантов рассеивались на плотную агаризованную питательную среду методом истощающего штриха и проращивались в течение ночи при 37 °С. Далее, изолированную бактериальную колонию переносили в 10 мкл охлажденной на ледяной бане деионизированной воды и прогревали при 98 °С в течение 10 мин. В дальнейшем 1 мкл указанной смеси использовался в качестве матрицы при постановке ПЦР.

Результаты исследований и их обсуждение

Определение границ полноразмерной промоторной области и попытка ее клонирования. На первом этапе работы нами были установлены предполагаемые границы интересующего нас промоторного региона гибридного онкогена. Термином «промоторный регион» здесь и далее обозначается сегмент ДНК, обладающий промоторной активностью и включающий области кор-промотора с классическими регуляторными элементами, такими как ТАТА-бокс, а также смежные области, несущие сайты посадки транскрипционных факторов и *цис*-регуляторные элементы (энхансеры и сайленсеры) при их наличии.

С помощью базы данных промоторов млекопитающих MPromDB [8] нами получены координаты границ предсказанной промоторной области. Она была локализована в координатах chr21:34886843-34889690 (сборка генома человека GRCh38) и имела размер 2848 п. о. Данная область перекрывается с одной из крупнейших GC-богатых областей в геноме человека [9]. Для ее клонирования нами были опробованы несколько вариантов ПЦР-амплификации: 1) амплификация со «стандартными» (фланкирующими последовательность) праймерами; 2) амплификация с длинными (70 п. о.) мегапраймерами, фланкирующими последовательность; 3) тагдаун ПЦР (понижение температуры отжига с 63 до 58 °С с 2 циклами амплификации на каждый градус и 20 циклами амплификации при 58 °С) со «стандартными» праймерами. Для повышения специфичности также использовался диметилсульфоксид (ДМСО) в различных концентрациях. Однако указанная стратегия клонирования не принесла ожидаемых результатов.

Поиск минимального сегмента, обладающего промоторной активностью, и подбор условий для его амплификации. Поскольку попытка клонирования крупной GC-богатой области оказалась безуспешной, было решено клонировать ее сегмент меньшего размера, сохраняющий при этом промоторную активность. Согласно литературным данным [10] таким сегментом выступает область с координатами [–190, +111] по отношению к 1 нуклеотиду экзона 4а; она имеет хромосомные координаты chr21:34888583-34888883. Несмотря на то что последовательность также является GC-богатой (более 70 % GC-оснований), ее размер значительно меньше исходной области, что облегчает задачу клонирования. Нами были сконструированы праймеры для амплификации данного сегмента ДНК: прямой (5'-CGGGCTGCGTACAGTAGC-3') и обратный (5'-ACTTCSTTCTGGCGTCCCTAG-3'). Длина ампликона составила 328 п. о.

Проведенная нами комплексная оптимизация условий амплификации включала как варьирование параметров ПЦР-программы, так и испытание различных параметров реакционной смеси. Эффективность амплификации оценивалась по воспроизводимости, выходу целевого продукта и наличию неспецифических продуктов.

В исследовании использовались два типа полимераз: DreamTaq и Phusion High Fidelity (HF) (*Thermo Fisher Scientific*, Литва), и для HF-полимеразы, помимо обычного буфера, применялся специальный буфер для амплификации GC-богатых матриц. Также в реакцию с DreamTaq-полимеразой дополнительно вводился ДМСО в концентрации от 1 до 5 %. Как выяснилось, амплификация в стандартных буферах с DreamTaq- и HF-полимеразой не позволяет получить целевой фрагмент. Использование диметилсульфоксида при амплификации с DreamTaq дает возможность получить детектируемый целевой продукт, однако его выход и воспроизводимость реакции низкие. Максимальный выход продукта наблюдался при использовании HF-полимеразы в сочетании с буфером для амплификации GC-богатых последовательностей (рис. 1, а).

Кроме того, использование HF-полимеразы в специальном буфере позволяет добиться максимальной воспроизводимости реакции. Указанные выше результаты достигаются при следующих условиях реакции: первичная денатурация составляет 98 °С в течение 1 мин, денатурация равна 98 °С в течение 10 с, отжиг праймеров осуществляется при 62 °С в течение 10 с, элонгация – при 72 °С в течение 10 с.

В данном протоколе время денатурации и отжига праймеров было сильно сокращено в сравнении со стандартными условиями амплификации. Это обеспечило защиту ДНК от депуринизации, происходящей при высоких температурах, и снижение количества неспецифических продуктов за счет сокращения времени отжига.

Клонирование целевого фрагмента в промежуточный вектор и секвенирование. В качестве промежуточного вектора для клонирования и секвенирования целевого фрагмента был избран вектор для ТА-клонирования рTZ57R/T, являющийся частью специализированного набора InsTAclone PCR Cloning Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Литва). С учетом того что HF-полимераза не оставляет на 3'-концах ПЦР-продукта непарных адениновых нуклеотидов, по которым осуществляется клонирование в вектор, выделенный из агарозного геля целевой фрагмент подвергался обработке DreamTaq-полимеразой в присутствии АТФ. ПЦР-скрининг клонов на наличие вставки проводился с применением специфических для вставки праймеров и HF-полимеразы, поскольку амплифицировать фрагмент с помощью DreamTaq, даже используя целевой ПЦР-продукт в качестве ДНК-матрицы, нам не удалось.

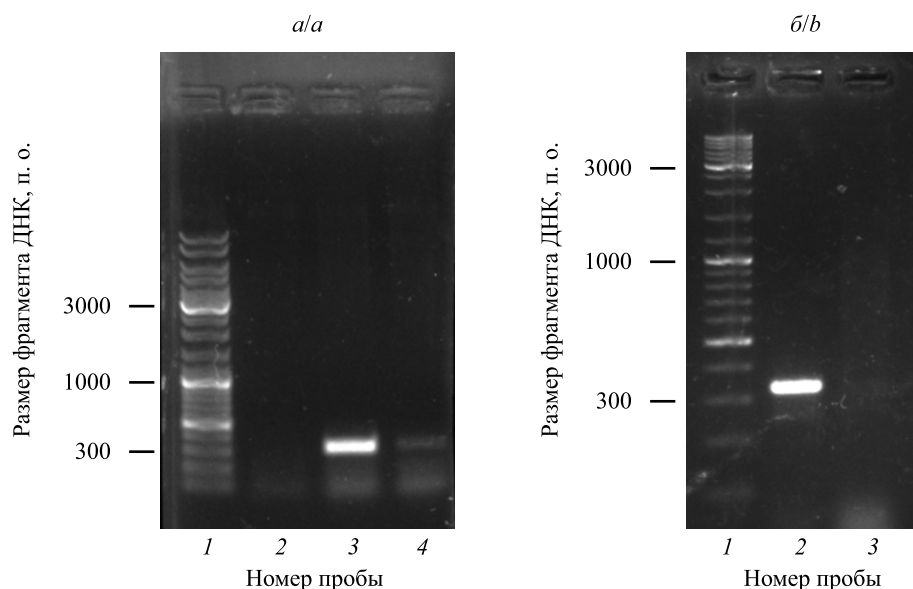


Рис. 1. Оптимизация условий ПЦР-амплификации:

a – подбор оптимального состава ПЦР-смеси для амплификации целевой области. Дорожка 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва), дорожка 2 – стандартная амплификация с DreamTaq-полимеразой, дорожка 3 – амплификация с HF-полимеразой в буфере для амплификации GC-богатых последовательностей, дорожка 4 – амплификация с DreamTaq-полимеразой с добавлением 3 % ДМСО;

б – оптимизация протокола ПЦР-скрининга бактериальных трансформантов. Дорожка 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва), дорожка 2 – амплификация на лизате бактерий, приготовленном в заранее прогретом амплификаторе, дорожка 3 – амплификация на лизате бактерий, приготовленном в амплификаторе без предварительного нагрева

Fig. 1. Optimization of PCR conditions:

a – optimisation of PCR mixture composition. Lane 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Lithuania), lane 2 – standard PCR with DreamTaq polymerase, lane 3 – PCR with Phusion High Fidelity polymerase in GC-buffer, lane 4 – PCR with DreamTaq polymerase and 3 % DMSO;

b – optimization of PCR protocol for screening of bacterial transformants. Lane 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Lithuania), lane 2 – preparation of bacterial lysate with amplification preheat, lane 3 – preparation of bacterial lysate without amplification preheat

Скрининг рекомбинантных плазмид проводился с бактериальными лизатами, полученными путем прогревания клеточных суспензий при 98 °С. Как мы установили, «узким» местом данной методики является момент переноса клеточной суспензии с ледяной бани в амплификатор или горячую водяную баню – их необходимо прогреть до рабочей температуры заранее, так как даже кратковременное пребывание образца при комнатной температуре приводит к значительному снижению выхода целевого продукта, что отражено на рис. 1, б.

Из обнаруженных таким образом клонов выделяли плазмидную ДНК, после чего проводили секвенирование вставки методом Сэнгера. Результаты секвенирования подтвердили образование неспецифических продуктов в ходе реакции: как оказалось, половина из секвенированных клонов содержит близкую к целевому ампликону по размеру вставку постороннего фрагмента ДНК, несмотря на геле-электрофорезную очистку. Тем не менее нам удалось обнаружить вектор, несущий целевой фрагмент без нуклеотидных замен.

Клонирование целевого фрагмента в лентивирусный вектор доставки. В качестве основы для создания целевого вектора использовался лентивирусный вектор второго поколения рHR-SINcPPT-SIEW. Он является частью трехкомпонентной системы, в которую также входят вектор рMD2.G, кодирующий белковую часть гликопротеина VSV-G вируса везикулярного стоматита, и пакующий вектор рCMV_dR8.91, кодирующий полипептид gag-pol [11]. Его запаковываемая в вирусные частицы область фланкирована немодифицированными длинными концевыми повторами (5'-LTR и 3'-LTR) с делегированной U3-областью (рис. 2). Она содержит: Ψ-последовательность – сигнал упаковки, перекрывающийся с первыми 350 нуклеотидами гена *gag*, рамка считывания которого закрыта синтетическим стоп-кодоном (GaG SL4, на рис. 2 обозначена как Ψ-область); RRE – элемент, ответственный за связывание с белком rev; cPPT – центральный полипуриновый тракт; P_{SFFV} – маркерный ген, кодирующий зеленый флуоресцирующий белок и находящийся под контролем конститутивного промотора PSFFV вируса Френд.

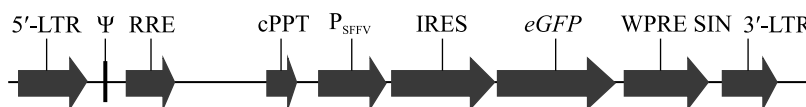


Рис. 2. Схема пакующей области вектора рHR-SINcPPT-SIEW

Fig. 2. The scheme of packed region of рHR-SINcPPT-SIEW vector

Согласно дизайну эксперимента промотор PSFFV целевого вектора удаляется с помощью рестриктазы EcoRI и заменяется исследуемым сегментом ДНК, под контролем которого оказывается ген, кодирующий белок eGFP, отделенный от промоторного региона областью IRES. Наличие IRES позволяет сохранять открытую рамку считывания маркерного гена *eGFP* неизменной и поддерживать его функциональность: даже если бы в составе промоторного региона нами был клонирован стартовый кодон (что весьма вероятно при клонировании крупной области, предсказанной биоинформатически), трансляция мРНК *eGFP* все равно начнется с IRES, следовательно, белок не получит добавочных аминокислот с N'-конца.

Скелет вектора, полученный после обработки рHR-SINcPPT-SIEW EcoRI, имел размер 9683 п. о. Он лигировался с фрагментом длиной 352 п. о., полученным после обработки промежуточного вектора рестриктазами XbaI и SalI. Трансформация клеток *E. coli* и приготовление бактериальных лизатов для скрининга на этом этапе осуществлялись, как описано выше. Для ПЦР-скрининга были использованы обратный праймер к последовательности IRES и один из праймеров, направленных на вставку, что дало возможность не только обнаружить целевую вставку, но и определить ее ориентацию. Ампликон в таком случае частично включает в свой состав последовательность IRES и имеет размер порядка 500 п. о. (рис. 3).

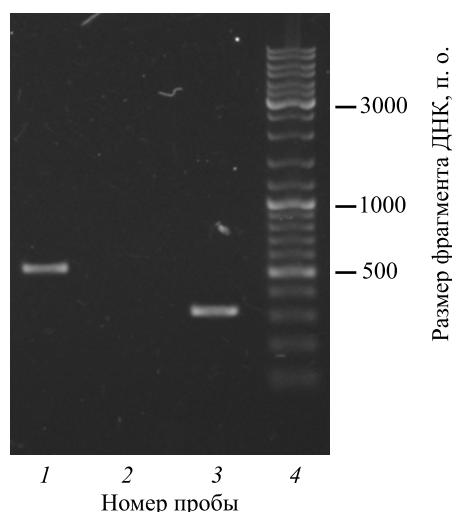


Рис. 3. Скрининг трансформантов, несущих целевой вектор со вставкой в нужной ориентации: дорожка 1 – проверка клона на наличие вставки с прямой ориентацией; дорожка 2 – проверка клона на наличие вставки с обратной ориентацией; дорожка 3 – положительный контроль, амплификация на матрице промежуточного вектора с праймерами ко вставке; дорожка 4 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва)

Fig. 3. PCR screening of bacterial clones with target vector:
lane 1 – PCR detection of target fragment in direct orientation; lane 2 – PCR detection of target fragment in reverse orientation;
lane 3 – a positive control with the intermediate vector, containing the target sequence;
lane 4 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Lithuania)

Заключение

Поставленная задача по созданию многоцелевого вектора, несущего вставку GC-богатой области промотора гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, была нами успешно реализована. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что молекулярное клонирование GC-богатых фрагментов ДНК может представлять серьезные трудности, связанные, по-видимому, с неспецифической посадкой праймеров, образованием вторичных структур, препятствующих продвижению полимеразы, а также с депуринизацией матрицы под действием высоких температур.

Решить указанные проблемы достаточно трудно, однако использование ряда методических приемов позволяет достичь необходимого результата даже при работе с последовательностями высокой сложности. Среди таких приемов – максимальное снижение длины ампликона, сокращение продолжительности этапов денатурации, отжига и элонгации (вплоть до 10–15 с), использование специализированных буферных систем и добавок, таких как ДМСО. Праймеры, предназначенные для ПЦР-амплификации целевой области, должны иметь сайты посадки в областях с минимальным количеством GC-нуклеотидов. При отсутствии сайтов посадки подходящего размера следует разместить в областях со сниженным содержанием GC-праймеров хотя бы 3'-концы праймеров. Полезным, несмотря на отсутствие эффекта в нашем случае, может быть тагдаун ПЦР.

Тем не менее даже строгое следование указанным рекомендациям не гарантирует подбора максимально эффективного протокола амплификации и тем более успешной его адаптации для другого типа полимеразы. В последнем случае будет невозможно осуществить высокоточный синтез целевого фрагмента (если протокол оптимизирован для обычной Taq-полимеразы) либо потребуются проводить промежуточные ПЦР-скрининги, используя более дорогой фермент (при оптимизации для высокоточной ДНК-полимеразы).

На основании вышеизложенного уже во время разработки общего плана исследования этапу клонирования GC-богатой области необходимо уделить пристальное внимание – заранее определить возможные проблемы, пути оптимизации условий амплификации, подготовить необходимые для этого реагенты и выделить достаточно времени. Это поможет добиться необходимого результата в сжатые сроки, не выходящие за рамки запланированных в исследовательском проекте.

Библиографический список

1. Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D. Acute Myeloid Leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2015. Vol. 373, № 12. P. 1136–1152.
2. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 44. P. 5759–5773.
3. Basecke J., Cepek L., Mannhalter C., et al. Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia // *Blood*. 2002. Vol. 100, № 6. P. 2267–2268.
4. Mori H., Colman S. M., Xiao Z., et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, № 12. P. 8242–8247.
5. Markova E. N., Kantidze O. L., Razin S. V. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line // *Gene*. 2012. Vol. 510, № 2. P. 142–146.
6. Migas A. A., Mishkova O. A., Ramanouskaya T. V., et al. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells // *Leuk. Res.* 2014. Vol. 38, № 9. P. 1102–1110.
7. Sambrook J., Russel W. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA // *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 1. P. 524–580.
8. Gupta R., Wikramasinghe P., Bhattacharyya A., et al. Annotation of gene promoters by integrative data-mining of ChIP-seq Pol-II enrichment data // *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (Suppl. 1): S65.
9. Levanon D., Glusman G., Bangsow T., et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1 // *Gene*. 2001. Vol. 262. P. 23–33.
10. Ghazi M. C., Bernstein Y., Negreanu V., et al. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. Vol. 93, № 5. P. 1935–1940.
11. Гринеv В. В., Радишевская А. А., Хейденрайх О. Эффективный перенос трансгена в лейкозные клетки человека с помощью лентивирусного вектора второго поколения // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География*. 2008. № 3. С. 82–86.

References

1. Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015. Vol. 373, No. 12. P. 1136–1152.
2. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene*. 2008. Vol. 27, No. 44. P. 5759–5773.
3. Basecke J., Cepek L., Mannhalter C., et al. Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2002. Vol. 100, No. 6. P. 2267–2268.

4. Mori H., Colman S. M., Xiao Z., et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, No. 12. P. 8242–8247.
5. Markova E. N., Kantidze O. L., Razin S. V. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line. *Gene*. 2012. Vol. 510, No. 2. P. 142–146.
6. Migas A. A., Mishkova O. A., Ramanouskaya T. V., et al. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 2014. Vol. 38, No. 9. P. 1102–1110.
7. Sambrook J., Russel W. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 1. P. 524–580.
8. Gupta R., Wikramasinghe P., Bhattacharyya A., et al. Annotation of gene promoters by integrative data-mining of ChIP-seq Pol-II enrichment data. *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (Suppl. 1): S65. DOI: 10.1186/1471-2105-11-S1-S65.
9. Levanon D., Glusman G., Bangsow T., et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene*. 2001. Vol. 262. P. 23–33.
10. Ghazi M. C., Bernstein Y., Negreanu V., et al. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. Vol. 93, No. 5. P. 1935–1940.
11. Grinev V. V., Radzishchanskaya A. A., Heidenreich O. Effective transgene transfer to human leukemic cells with the second generation lentiviral vector. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2008. No. 3. P. 82–86 (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.