

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики**

САВРИЦКАЯ
Анна Андреевна

**СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО ОБЛАСТЬ
КАНОНИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА
RUNX1/RUNX1T1**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент В.В. Гринев

Минск 2018

РЕФЕРАТ

Дыпломная праца ўключае: старонак – 73, малюнка – 23, табліц – 7, прыкладанняў – 3, крыніц – 72.

Ключавыя словы: ВОСТРЫ МІЯЛОЇДНЫ ЛЕЙКОЗ, ГІБРЫДНЫ АНКАГЕН *RUNX1-RUNX1T1*, МАЛЕКУЛЯРНАЕ КЛАНАВАННЕ, ПЛР, РЕПАРТЁРНАЯ ВЕКТАРНАЯ СІСТЭМА, ЛЕНТІВІРУСНАЯ ТРАНСДУКЦЫЯ.

Аб'ект даследавання: прамотарныя рэгіёны гібрыднага гена *RUNX1-RUNX1T1*.

Мэта: стварэнне лентівіруснага вектара дастаўкі, які нясе прамотарныя вобласці анкагена *RUNX1-RUNX1T1* і распрацоўка пратакола выкарыстання репартёрнай вектарнай сістэмы.

Метады: малекулярнае кланаванне, палімеразная ланцуговая рэакцыя, лентівірусная трансдукцыя, праточная цытафлюарыметрыя

Транслакацыя t(8; 21)(q22; q22) сустракаецца ў 40% выпадкаў вострага міялоіднага лейкозу падтыпу M2. У выніку транслакацыі утворацца гібрыдны ген *RUNX1-RUNX1T1*. Лічыцца, што ён гуляе ключавую ролю у працэсах узнікнення і падтрымання вострага міялоіднага лейкозу. Мноства ізаформ транскрыптаў дадзенага гена узнікае ў тым ліку дзякуючы выкарыстанню альтэрнатыўных прамотараў: двух кананічных і 24 прадказаных метадамі біяінфарматыкі. Верыфікацыю неанатаваных прамотарных рэгіёнаў на геномным узроўні праводзяць з дапамогай репартёрнай сістэмы на аснове лентівірусных вектараў 2-га пакалення. Аднак малекулярнае кланаванне ГЦ-багатых абласцей геному, да якіх часта ставяцца прамотарныя рэгіёны, з дапамогай палімеразнай ланцуговай рэакцыі, роўна як і стварэнне на іх аснове вектарных канструкцый, можа быць нетрывіяльнай задачай.

У ходзе гэтага даследавання былі аптымізаваны умовы ампліфікацыі сямента прамотарнага рэгіёну гена *RUNX1-RUNX1T1*, які знаходзіцца у складанай ГЦ-багатай вобласці. Сканструяваны шматмэтавы лентівірусны вектар другога пакалення, які нясе устаўку дадзенага рэгіёну. Акрамя таго, распрацаван палепшаны пратакол выкарыстання репартёрнай вектарнай сістэмы. Таксама праведзена першасная ацэнка актыўнасці прадказанага прамотарнага рэгіёну *RUNX1T1/PR06* гібрыднага анкагена, вынікі якой дазваляюць выказаць здагадку, што ён сапраўды валодае прамотарнай актыўнасцю, да таго ж, у абодвух напрамках.

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 73, рисунка – 23, таблиц – 7, приложений – 3, источников – 72.

Ключевые слова: ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГИБРИДНЫЙ ОНКОГЕН *RUNX1-RUNX1T1*, МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ПЦР, РЕПОРТЕРНАЯ ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА, ЛЕНТИВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ.

Объект исследования: промоторные регионы гибридного гена *RUNX1-RUNX1T1*.

Цель: создание лентивирусного вектора доставки, несущего промоторные области онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, и разработка протокола использования репортерной векторной системы.

Методы: молекулярное клонирование, ПЦР, лентивирусная трансдукция, проточная цитофлуориметрия.

Транслокация t(8;21)(q22;q22) встречается в 40% случаев острого миелоидного лейкоза подтипа M2. В результате транслокации образуется гибридный ген *RUNX1-RUNX1T1*. Считается, что он играет ключевую роль в процессах возникновения и поддержания острого миелоидного лейкоза. Множество изоформ транскриптов данного гена возникает в том числе благодаря использованию альтернативных промоторов: двух канонических и, возможно, предсказанных методами биоинформатики. Верификацию неаннотированных промоторных регионов на геномном уровне проводят с помощью репортерной векторной системы. Однако молекулярное клонирование ГЦ-богатых областей генома, к которым часто относятся промоторные регионы, с помощью полимеразной цепной реакции, равно как и создание на их основе векторных конструкций, может быть нетривиальной задачей.

В ходе настоящего исследования были оптимизированы условия амплификации сегмента канонического промоторного региона гена *RUNX1-RUNX1T1*, находящегося в сложной ГЦ-богатой области. Сконструирован многоцелевой лентивирусный вектор второго поколения, несущий вставку данной области. Кроме того, разработан улучшенный протокол использования репортерной векторной системы. Также проведена первичная оценка активности предсказанного промоторного региона *RUNX1T1/PR06* гибридного онкогена, результаты которой позволяют предположить, что он действительно обладает промоторной активностью, причём в обоих направлениях.

ABSTRACT

The graduation project includes: pages – 73, figure – 23, tables – 7, applications – 3, sources – 72.

Key words: ACUTE MYELOID LEUKEMIA, FUSION ONCOGENE *RUNX1-RUNX1T1*, MOLECULAR CLONING, PCR, REPORTER VECTOR SYSTEM, LENTIVIRAL TRANSDUCTION.

Object of investigation: promoter regions of the fusion gene *RUNX1-RUNX1T1*.

The aim was a creation of a lentiviral vector of delivery carrying the promoter regions of *RUNX1-RUNX1T1* oncogene and a development of a protocol for the use of a reporter vector system.

Methods: molecular cloning, polymerase chain reaction, lentiviral transduction, flow cytometry.

The translocation t(8;21)(q22;q22) occurs in 40% of acute myeloid leukemia subtype M2. In a result of translocation, the fusion gene *RUNX1-RUNX1T1* is formed. It is believed that it plays a key role in formation and maintenance of acute myeloid leukemia. Variety of transcripts of this gene also arise due to the use of alternative promoters: two canonical and 24 predicted by bioinformatics methods. Verification of non-advertised promoter regions at the genomic level is carried out using a reporter system based on second generation lentiviral vectors. However, a molecular cloning with the polymerase chain reaction of GC-rich regions, which are often promoter regions, as well as a development of vectors based on them, can be a non-trivial task.

In the course of this study, we optimized the amplification conditions for the promoter region segment of the *RUNX1-RUNX1T1* gene located in a complex GC-rich region and constructed a second-generation multipurpose lentiviral vector carrying an insert of this region. In addition, an improved protocol for the use of a reporter vector system has been developed. We also obtained results of the primary analysis of activity of *RUNX1T1*. A primary evaluation of the activity of *RUNX1T1/PR06* predicted promoter region of the fusion oncogene was also conducted. These results suggest that it actually has a promoter activity, at that, in both directions.