

Получение клеточной модели хромосомной транслокации *MLL-AF6*, ассоциированной с острым лейкозом

Научный руководитель – Ломов Николай Андреевич

Иванова В.О.¹, Ломов Н.А.², Вьюшков В.С.³

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия, *E-mail: ivanova.viktoria.bio@gmail.com*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия, *E-mail: lomov13@gmail.com*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия, *E-mail: oxygenium22@mail.ru*

Хромосомные перестройки — одна из причин возникновения опухолей. Транслокации, в которых участвует ген *MLL* (mixed lineage leukemia), встречаются в большинстве случаев острых форм лейкозов у младенцев. Хромосомные транслокации с участием *MLL* могут возникать и вторично, при химиотерапии опухолей ингибиторами топоизомераз. Второе название гена — *KMT2A* (lysine (K)-specific methyltransferase 2A) — отражает функцию его белка: метилирование четвертого лизина гистона H3 (H3K4) для регуляции транскрипции при гемопоэзе. Нарушение структуры белка *KMT2A* приводит к aberrантной экспрессии генов, инициирующей развитие опухоли [1].

Ген *MLL* расположен на 11 хромосоме. Известно более 135 генов-партнеров по транслокации, одним из которых является ген *AF6* на 6 хромосоме. *AF6* уникален среди множества партнеров *MLL* тем, что он контролирует уровень малой ГТФазы RAS в цитоплазме клеток костного мозга. При экспрессии слитого гена *MLL-AF6* образуется белок с N-концевой частью белка *MLL* и C-концевой частью *AF6*, локализующийся в ядре. Предположительно, образование *MLL-AF6* нарушает регуляцию клеточного цикла и приводит к развитию опухоли.

Наша работа нацелена на получение клеточной модели транслокации *MLL-AF6*. Основной проблемой создания подобной клеточной линии является низкая частота транслокации и отсутствие селектирующего маркера в клетках с перестройкой. Мы разработали протокол, позволяющий наиболее эффективно получать клеточные модели хромосомных перестроек. Клетки лимфобластоидной культуры LCL трансфицировали плазмидой, кодирующей элементы системы CRISPR/Cas для внесения разрывов в *MLL* и *AF6* и флуоресцентный белок. Чтобы обогатить популяцию клетками, в которые попала плазида, использовали клеточный сортер. Так как перестройка, предположительно, происходит примерно в 1 клетке на 1000, клетки после клеточного сортера разбивали на субпопуляции по 500 клеток. Скрининг субпопуляций проводили с помощью прямой ПЦР — без предварительного выделения ДНК. Субпопуляции с выявленной перестройкой разбивали на субпопуляции уже по 20 клеток, которые также скринировали с помощью прямой ПЦР. Далее субпопуляции с перестройкой клонировали до одиночных клеток, после чего моноклоны вновь скринировали. Полученные моноклоны с перестройкой кариотипировали и подтверждали перестройку методом FISH.

Для дальнейшей работы выбрали клеточную линию с подтвержденной перестройкой и кариотипом, наиболее близким к кариотипу исходной линии (за исключением транслокации *MLL-AF6*). С помощью ПЦР с обратной транскрипцией подтвердили экспрессию химерного гена *MLL-AF6*. Образцы подготовили для анализа транскриптома с целью изучения влияния перестройки *MLL-AF6* на профили экспрессии генов. Таким образом,

полученная клеточная модель может быть использована при изучении механизмов онкогенеза.

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект 24-15-00093

Источники и литература

- 1) 1. Meyer, C., Larghero, P., Almeida Lopes, B. et al. The KMT2A recombino~~m~~e of acute leukemias in 2023. *Leukemia* 37, 988–1005 (2023).