

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Ломов Николай Андреевич**

Изучение механизмов образования транслокаций,  
ассоциированных со вторичными лейкозами, вызванными  
терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз II

Специальность 1.5.3. — «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Научный руководитель:**

Рубцов Михаил Александрович, кандидат биологических наук.

**Официальные оппоненты:**

Яровая Ольга Владимировна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории структурно-функциональной организации хромосом ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук.

Судариков Андрей Борисович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, доцент, директор Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Защита диссертации состоится 23 марта 2023 года в 17:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, аудитория 389.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: [istina.msu.ru/dissertations/528134949/](http://istina.msu.ru/dissertations/528134949/)

Автореферат разослан «\_\_» февраля 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Т.В.Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Ингибиторы ДНК-топоизомераз II получили широкое распространение в химиотерапии опухолей. Их эффективность связана с важной ролью ДНК-топоизомеразы II в делящихся клетках — с помощью этих ферментов клетка разделяет хромосомы после репликации для распределения по дочерним клеткам. Разделение топологически сцепленных между собой хромосом невозможно без образования двуцепочечных разрывов ДНК, через которые должны проходить фрагменты другой хромосомы. ДНК-топоизомеразы II (топо2) контролирует этот процесс — она вносит временный двуцепочечный разрыв в один фрагмент хромосомы, пропускает через него другой фрагмент, после чего сшивает разрыв обратно. Ингибиторы, нарушающие возможность топо2 религировать разрыв ДНК, называются топоизомеразными ядами. В результате действия топо2-ядов в делящихся клетках накапливаются двуцепочечные разрывы (ДЦР), которые приводят к апоптозу таких клеток. Наиболее чувствительны к этим ядам именно опухолевые клетки, и поэтому топоизомеразные яды, например, этопозид, эффективно применяют при лечении практически всех типов опухолей.

Однако терапия с применением топоизомеразных ядов имеет побочный эффект: у 1–6 % пациентов, прошедших такую терапию, в течение 1–3 лет развивается так называемый вторичный лейкоз. Этот лейкоз характеризуется острым течением заболевания, а также крайне неблагоприятным прогнозом. Цитогенетической особенностью при вторичном лейкозе являются определенные хромосомные перестройки, которые встречаются от пациента к пациенту. Считается, что к этим рекуррентным перестройкам приводят ошибки репарации ДЦР, возникающих под действием топо2-ядов в гемопоэтических клетках. Набор этих транслокаций ограничен — перестраивается либо ген *AML1 (RUNX1)*, либо ген

*MLL* (*KMT2A*), каждый с одним из нескольких генов-партнеров. В норме гены *AML1* и *MLL* регулируют транскрипцию ключевых для пролиферации генов в гемопоэтических клетках. Образующиеся в результате транслокации слитые *AML1*- и *MLL*-белки приводят к нарушению баланса активирующего и репрессирующего действий *AML1* и *MLL*. Это приводит к изменению эпигенетического паттерна хроматина у делящихся клеток с перестройкой, и среди них может возникнуть опухолевый клон.

Следует отметить, что для других опухолей характерен гораздо более широкий набор хромосомных aberrаций, чем для лейкозов, ассоциированных с терапией топо2-ингибиторами. На данный момент не известно, какие факторы приводят к распространению именно таких транслокаций у пациентов с этими лейкозами.

Изучение механизмов образования транслокаций поначалу привело к выявлению двух основных факторов, определяющих результат перестройки. Первый фактор — колокализация перестраивающихся генов еще до момента образования в них разрыва. Методами высокопроизводительного секвенирования была показана прямая корреляция между частотой формирования транслокаций и пространственной близостью перестраивающихся локусов. Второй фактор — повышенная подвижность генов, в которых возник разрыв. Было показано, что разрывы имеют свойство кластеризоваться в пространстве ядра. Далее было выявлено, что к факторам, определяющим формирование перестройки, относятся также способ и вероятность образования разрывов в локусах перестройки.

Однако было неясно, какие факторы вносят определяющий вклад в формирование транслокаций при терапии топоизомеразными ядами. Ранее в нашей лаборатории уже было показано, что для гена *MLL* характерна повышенная подвижность после обработки клеток этопозидом: в них ген *MLL* оказывался вне хромосомной территории чаще, чем в необработанных клетках. Поэтому в рамках данной диссертационной работы было изучено, как

обработка этопозидом влияет уже на ген *AML1* и его локализацию относительно хромосомной территории. Также был проведен анализ пространственных контактов генов *MLL* и *AML1* со всеми участками генома (4C-анализ) в клетках до и после обработки этопозидом.

Изучение механизмов, задействованных в образовании хромосомных транслокаций, ассоциированных с терапией топо2-ядами, затруднено по нескольким причинам. Во-первых, формирование транслокаций — крайне редкое событие, и обнаружение транслокации у пациентов возможно, только когда клетки с транслокацией уже много раз поделились, и сформировался лейкозный клон. Во-вторых, точки разрывов, вызванных ингибированием топо2, могут находиться в довольно широких областях внутри перестраивающихся генов, что ограничивает набор методов, которыми эти транслокации могут быть детектированы. Чаще всего методом обнаружения таких транслокаций выступает флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), требующая трудоемкого приготовления препаратов с использованием специализированных флуоресцентных зондов и конфокальной микроскопии с последующим анализом изображений. Сложность изучения механизмов образования транслокаций как на животных, так и на клетках, подвергнутых воздействию этопозида, делает необходимым моделирование транслокаций, характерных для вторичных лейкозов.

Стоит отметить, что культуры клеток, содержащие изучаемые транслокации, уже существуют. Это либо клетки, полученные от пациентов, либо клеточные линии, искусственно созданные с помощью технологий редактирования генома. Однако такие клеточные модели позволяют изучать последствия уже сформировавшейся транслокации, но не процесс ее образования.

Моделью для изучения процесса образования транслокаций может выступать клеточная культура, где исследуемые транслокации формировались бы только после воздействия на клетки определенным стимулом, например

добавлением определенного индуктора в среду. Чтобы детектировать полученные транслокации наиболее простым методом — ПЦР — каждая транслокация должна происходить между локусами хромосом, заданными с точностью до нуклеотида. Это достигается с помощью программируемых нуклеаз, эктопически экспрессируемых в клетках. Гены нуклеаз должны быть интегрированы в геном под контролируемым промотором, чтобы их экспрессия запускалась только в момент начала эксперимента. Определяя число транслокаций количественной ПЦР, на такой модели можно изучать влияние различных условий на вероятность образования заданной транслокации. Ингибируя белки репарации разрывов ДНК, с помощью модели можно исследовать механизмы репарации ДНК. С другой стороны, на модели можно испытывать препараты, используемые в химиотерапии, на предмет возникновения транслокаций под их воздействием. Наконец, такая клеточная модель является тест-системой для поиска веществ, способных снизить вероятность развития вторичного лейкоза после терапии с применением ингибиторов ДНК-топоизомераз II.

## **Цель и задачи диссертационного исследования**

Цель работы — выявить факторы, определяющие набор рекуррентных хромосомных транслокаций, ассоциированных с вторичными лейкозами, вызванными терапией топоизомеразными ядами.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Подтвердить, что обработка клеток этопозидом влияет на целостность гена *AML1*. Сравнить по этому параметру обработку клеток этопозидом с действием ионизирующего излучения.
2. Изучить распределение аллелей *AML1* относительно границ их хромосомных территорий при действии этопозида.
3. Получить профили пространственных контактов генов *AML1* и *MLL* с остальными участками генома в клетках, обработанных этопозидом, и в необработанных клетках.
4. Создать клеточную культуру, позволяющую изучать механизмы образования индуцируемой перестройки *AML1-ETO*.
5. С помощью полученной клеточной культуры изучить влияние ингибирования некоторых белков системы репарации на образование транслокации *AML1-ETO*.
6. С помощью полученной клеточной культуры iAML-ETO провести анализ химиотерапевтических препаратов, используемых в комбинации с ингибиторами ДНК-топоизомеразы II, на предмет их влияния на образование транслокации *AML1-ETO*.

## **Научная новизна и практическая значимость результатов работы**

Работа посвящена актуальной теме — изучению механизмов возникновения хромосомных транслокаций, ассоциированных с лейкозами. В работе показано, что набор транслокаций, повторяющихся для лейкозов, вызванных терапией топоизомеразными ядами, во многом обусловлен особенностью двуцепочечных разрывов ДНК, которые формируются при ингибировании ДНК-топоизомеразы II. Предложен способ изучения механизмов образования онкогенных перестроек, заключающийся в создании специальной клеточной культуры, где транслокации индуцируются путем запуска экспрессии интегрированного гена нуклеазы Cas9, нацеленной на перестраиваемые локусы. При этом число транслокаций оценивается количественной ПЦР, что позволяет сравнивать частоту образования хромосомных перестроек в разных условиях. С помощью такой клеточной культуры iAML-ETO, моделирующей образование транслокации *AML1-ETO*, показано, что NU7026 — ингибитор белка репарации DNA-PKcs, а также метотрексат — использующийся в химиотерапии ингибитор дигидрофолатредуктазы — повышают число транслокаций. Клеточная культура iAML-ETO может быть использована как для дальнейшего изучения механизмов образования транслокаций, так и для поиска веществ, способных снизить вероятность развития вторичного лейкоза при совместной терапии с применением ингибиторов ДНК-топоизомераз II. В процессе создания клеточной модели был разработан метод проверки инструментов редактирования генома — Direct ENIT (Direct PCR-detectable engineered nuclease-induced translocations).



## Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением современных молекулярно-биологических методов и методов работы с культурами клеток эукариот. Изучение образования разрывов гена *AML1* и его расположения относительно хромосомной территории проводилось на клетках культуры Jurkat методом 3D FISH (трехмерная флуоресцентная *in situ* гибридизация) с последующим анализом изображений компьютерными программами. Анализ контактов генов-партнеров по транслокациям проводился с помощью метода 4C (chromosome conformation capture followed by sequencing), включающего приготовление 4C-библиотек, массовое параллельное секвенирование и бионформатический анализ данных. Созданная клеточная культура iAML-ETO содержит в геноме элементы системы CRISPR/Cas под контролем системы Tet-ON, которые были интегрированы с помощью технологии редактирования генома на основе нуклеаз TALEN. Эффективность гидовых РНК, направляющих нуклеазу Cas9 на локусы *AML1* и *ETO*, проверялась методом Direct ENIT. Сборка плазмидных конструкций осуществлялась методами молекулярного клонирования, в том числе бесшовного. Для оценки числа транслокаций была отработана система количественной ПЦР с TaqMan-зондом.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Обработка клеток Jurkat этопозидом приводит к возникновению двуцепочечных разрывов ДНК внутри гена *AML1* и расхождению концов разрыва, детектируемому с помощью конфокальной микроскопии.
2. Под действием этопозида аллели *AML1* локализуются снаружи границ своей хромосомной территории чаще, чем в необработанных клетках Jurkat.
3. Гены-партнеры по транслокациям, рекуррентным для лейкозов, вызванных топоизомеразными ядами, не демонстрируют пространственной близости по сравнению с другими генами ни в необработанных клетках Jurkat, ни после их обработки этопозидом.
4. Интегрированная в геном клеток индуцируемая система CRISPR/Cas позволяет воспроизводимо моделировать образование хромосомных транслокаций в культуре клеток и количественно детектировать их методом ПЦР.
5. С помощью полученной клеточной культуры iAML-ETO возможен поиск веществ, влияющих на возникновение транслокаций.

## **Личный вклад соискателя**

Вклад соискателя в постановке задач, планировании и выполнении экспериментов, обработке данных, интерпретации результатов был решающим, за исключением разработки программы анализа конфокальных изображений, процедуры секвенирования 4С-библиотек и первичного анализа данных секвенирования. Соискатель писал текст всех статей, в которых указан первым автором, и занимался их подачей в журналы. Также соискатель непосредственно участвовал в организации работы лаборатории.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты работы были получены с использованием современных методик и на современном оборудовании. Результаты статистически достоверны и воспроизводимы. Основные положения и выводы исследования изложены в 7 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, а также в патенте РФ. Основные результаты работы были представлены на конференциях «Объединенный VI конгресс гематологов России», 2022, «26th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus», Франция, 2019, «VI Съезд биохимиков России», 2019, «25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus», Россия, 2017 и других.

## **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа изложена на 142 страницах, содержит 36 рисунков и 5 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка публикаций по теме работы и списка цитированной литературы, включающего 391 источник.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### Изучение влияния этопозида на аллели *AML1* методом 3D FISH

Мы изучали, как обработка этопозидом влияет на гены, рекуррентно перестраивающиеся при лейкозах, вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомеразы II (таблица 1). В качестве удобной модели для исследований использовались клетки культуры Jurkat.

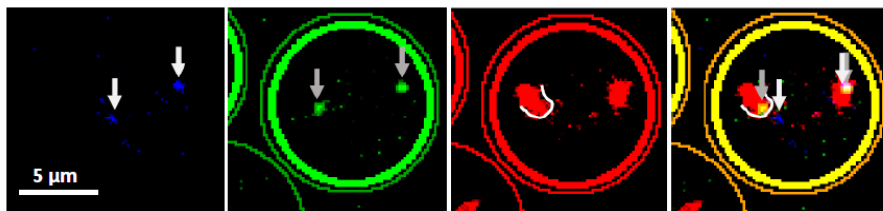
**Таблица 1.** Транслокации, рекуррентные (повторяющиеся) для вторичных лейкозов, вызванных терапией топо2-ядами. В скобках указаны альтернативные названия генов, жирным шрифтом выделены названия, соответствующие современной классификации генов человека.

Ген	Транслокация	Ген-партнер
<i>AML1</i> ( <b><i>RUNX1</i></b> )	t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO</i> ( <i>RUNX1T1</i> )
	t(3;21)(q26.2;q22)	<i>MDS1-EV11</i> ( <b><i>MECOM</i></b> , <i>PRDM3</i> )
	t(1;21)(p36;q21)	<i>PRDM16</i>
<i>MLL</i> ( <b><i>KMT2A</i></b> )	t(9;11)(p22;q23)	<i>AF9</i> ( <b><i>MLLT3</i></b> )
	t(4;11)(q21q23)	<i>AF4</i> ( <b><i>AFF1</i></b> , <i>MLLT2</i> )
	t(19;11)(q13q23)	<i>ELL</i>
	t(11;19)(q23;p13.3)	<i>ENL</i> ( <b><i>MLLT1</i></b> )
	t(11;16)(q23;p13)	<i>CREBBP</i>

Сначала мы проверили, вызывает ли этопозид разрывы гена *AML1*, и повышается ли мобильность разорванных генов. Для выполнения этой задачи клетки обрабатывали этопозидом, фиксировали, и проводили гибридизацию с использованием двуцветного FISH-зонда к гену *AML1*, а также зонда третьего цвета на территорию 21 хромосомы, в которой находится ген *AML1*.

Двухцветный зонд визуализировал разными флуорофорами начало и конец гена, и при разрыве гена флуоресцентные сигналы оказывались удалены друг от друга. Кроме обработанных клеток, FISH проводили с контрольными необработанными клетками, а также с клетками, подвергнутыми воздействию высокой дозы  $\gamma$ -излучения (7 Гр).

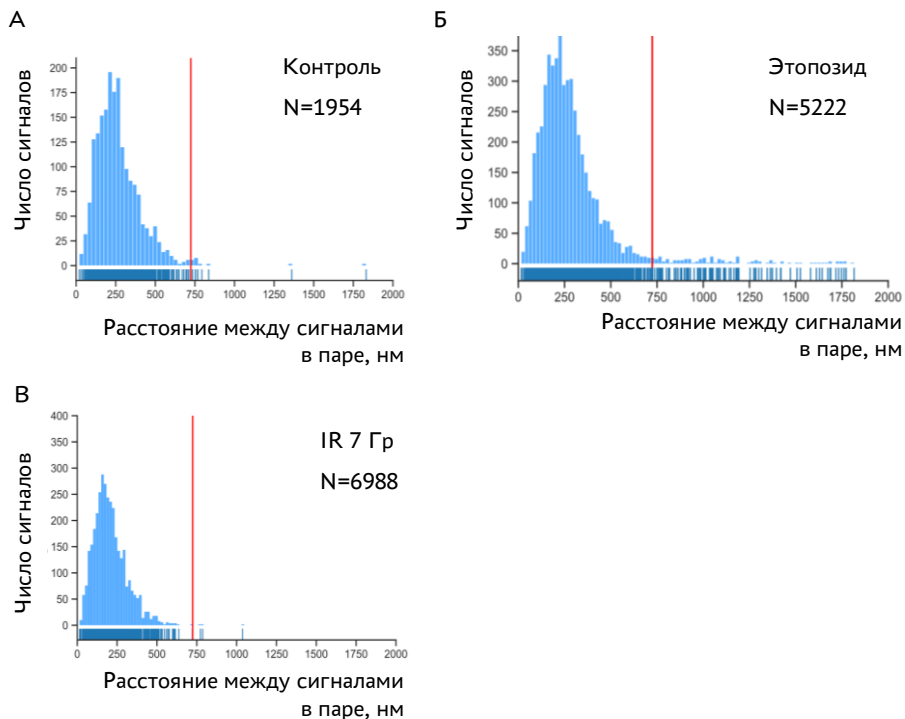
Препараты ядер изучали с помощью конфокальной микроскопии. Полученные стопки конфокальных изображений с помощью специально разработанной программы реконструировались в трехмерные изображения и анализировались. Алгоритм детектировал границы ядер, хромосомных территорий и сигналов двух цветов (рисунок 1), разбивал сигналы на пары, соответствующие началу и концу одного аллеля, и определял расстояния между центрами сигналов и границей ближайшей хромосомной территории.



**Рисунок 1.** Пример детекции программой ядер (внешний круг), сигналов (зонды 1 и 2, отмечены стрелками), хромосомных территорий (красный зонд, граница отмечена белой линией) на микроскопических снимках. Изображения получены в трех каналах, последнее — объединенное из трех.

По результатам анализа изображений были построены гистограммы распределения расстояний между центрами сигналов, принадлежащих началу и концу одной копии гена AML1. По распределению в контрольных экспериментах с нормальными клетками была определена квантиль 99% (99-й процентиль), значение которой было принято как расстояние, выше которого сигналы считаются разошедшимися вследствие разрыва гена. Для клеток, обработанных этопозидом, гистограмма распределения таких расстояний давала 4% таких разорванных сигналов. Для клеток, подвергнутых

$\gamma$ -излучению, увеличения доли таких разорванных аллелей *AML1* не наблюдалось (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Гистограммы распределения расстояния между сигналами, визуализирующими концы одного аллеля *AML1* (за координаты сигнала считали координаты его центра тяжести). А — контроль, Б — клетки, обработанные этопозидом, В — клетки, подвергнутые ионизирующему излучению. N — общее число сигналов на гистограмме. Вертикальная линия отсекает значение, равное 99 перцентилю в контроле.

Таким образом, этопозид приводит не просто к возникновению ДЦР внутри гена *AML1*, а к частому расхождению концов разрывов в пространстве ядра на расстояние, детектируемое в световой микроскоп, чего не наблюдается при действии  $\gamma$ -излучения. Это подчеркивает особенность разрывов, вызванных топо2-ядами — их концы часто не удерживаются вместе, что

связано со сложностью их репарации. Такие «потерявшиеся» концы разрывов существенно более склонны к образованию хромосомной перестройки.

Далее на основе полученных данных были построены двумерные графики, где для каждого сигнала (точка на графике) координата X означала расстояние до парного ему сигнала (вторая часть того же аллеля), а по координате Y откладывалось расстояние до границы его хромосомной территории (рисунок 3).



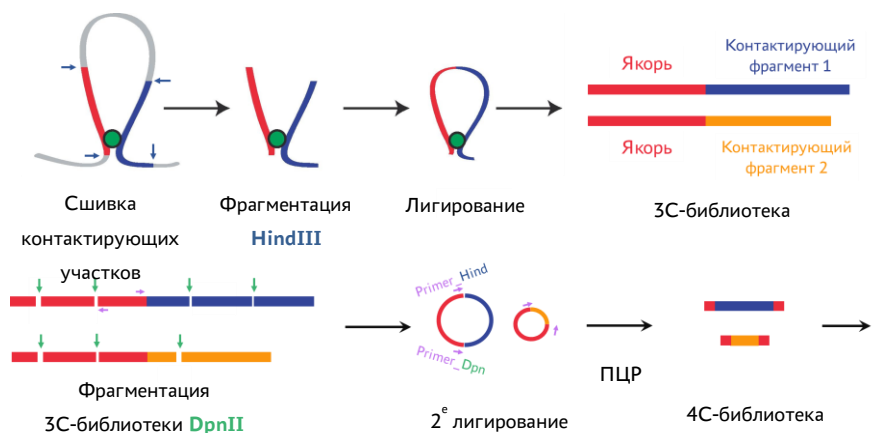
**Рисунок 3.** Графики, отражающие расстояние между сигналом и его парой, то есть между началом (красный) и концом (зеленый) гена (ось X), и расстояние между сигналом и границей его хромосомной территории (Ось Y). Отрицательные значения Y принадлежат сигналам, находящимся внутри хромосомной территории. Вертикальная линия отсекает значения расстояний, принятые за разрыв.

Было обнаружено, что доля аллелей *AML1*, находящихся вне хромосомной территории, у клеток после обработки этопозидом была выше, чем в контрольных клетках (более чем в 2 раза,  $p < 0,05$  по критерию хи-квадрат). Причем вне хромосомной территории чаще локализовались разорванные аллели. Так, у обработанных этопозидом клеток вне хромосомной территории находилось 2,4% разорванных аллелей, а среди «неразорванных» — 0,8% ( $p < 0,05$  по критерию хи-квадрат). Однако мы не можем считать все «неразорванные» аллели интактными, так как клетки все же подвергались действию этопозиды, а часть разрывов скорее всего не детектируется с помощью микроскопии. Поэтому мы сравнили разорванные аллели из эксперимента с аллелями из контрольных клеток. В этом случае разница была более заметна (в 5,8 раз,  $p < 0,001$  по критерию хи-квадрат). Другими словами, разорванные под действием этопозиды аллели *AML1* чаще оказываются вне хромосомной территории по сравнению с интактными. Отсюда следует, что разошедшиеся концы разрывов, вызванных обработкой этопозидом, имеют повышенную подвижность в пространстве ядра по сравнению с интактными аллелями. Это повышает вероятность образования транслокации с партнером из другой хромосомы.

#### **4С-анализ контактов *MLL* и *AML1***

Чтобы определить, существует ли пространственная близость между генами-партнерами по изучаемым транслокациям, и возникает ли она при обработке этопозидом, был проведен анализ пространственных контактов генов *MLL* и *AML1* со всеми участками генома (4С-анализ, рисунок 4). В процессе работы были получены и отсеквенированы 4С-библиотеки для генов *MLL* и *AML1*, как для клеток, обработанных этопозидом, так и для клеток в нормальных условиях.





Секвенирование 4С-библиотеки: подготовка образцов и секвенирование Illumina → 4С-seq анализ: обработка данных, картирование на геном

**Рисунок 4.** 4С-анализ. Клетки после фиксации и пермеабиллизации обрабатывали эндонуклеазой рестрикции HindIII, реакцию смесь разбавляли и проводили лигирование. Фрагменты полученной 3С-библиотеки циркуляризовали за счет обработки второй эндонуклеазой DpnII, сайты которой располагаются более часто в геноме, и последующего лигирования. Циклические молекулы ДНК использовали в качестве матрицы для обратной ПЦР с праймерами, подобранными к участку гена-мишени (якорю). Полученную 4С-библиотеку секвенировали на платформе Illumina.

Анализ данных секвенирования 4С-библиотек показал, что в клетках Jurkat контакты *AML1* и *MLL1* с генами-партнерами по изучаемым транслокациям (таблица 1) не происходят чаще контактов с любыми другими генами — пространственной предрасположенности этих генов к перестройкам между собой не обнаруживается. Такие же результаты были получены и для клеток, обработанных этопозидом. Увеличения числа контактов между генами-партнерами после обработки этопозидом по сравнению с контролем также не было обнаружено. Можно предположить, что если бы концы разрывов в генах-партнерах сосредотачивались в некоторых ядерных компартментах, например, кластеризовались в «фабрики репарации», то это отразилось бы на

4С-профилях. Скорее всего, такого направленного движения генов-партнеров друг к другу или в один компартмент нет.

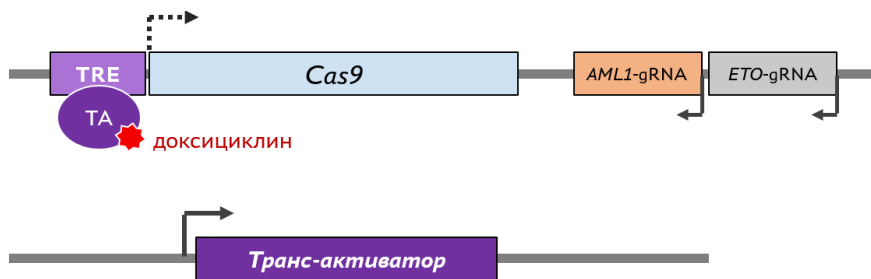
### **Создание клеточной модели для изучения образования транслокаций**

Более детальное изучение механизмов репарации, задействованных при формировании транслокаций, а также поиск с помощью метода FISH веществ, способных влиять на образование перестроек, малоэффективно. Сложность заключается в трудоемкости и низкой производительности подходов, основанных на микроскопировании отдельных клеток, а для статистически значимых результатов необходимо проанализировать очень большое число клеток. При этом индукция разрывов в изучаемых генах путем ингибирования топо2 не позволяет использовать для детекции образуемых транслокаций метод ПЦР — такие разрывы случаются в совершенно различных участках генома, что делает невозможным подбор праймеров. Поэтому для изучения механизмов, задействованных при образовании транслокаций, был разработан подход, основанный на использовании специально созданной клеточной модели.

Для моделирования транслокаций в геном клеток линии LCL были встроены элементы системы CRISPR/Cas, которые вносили разрывы в локусы, между которыми моделируется перестройка. Ген Cas9 находился под индуцируемым доксициклином промотором. Гидовые РНК подбирали под целевые локусы сначала биоинформатически, а затем кандидаты проверяли разработанным нами методом проверки работоспособности гидов ENIT (engineered nuclease-induced translocations). Данный метод основан на детекции методом ПЦР транслокации, вызываемой разрывами, внесенными с помощью проверяемого гида и уже проверенной ранее нуклеазы.

Для интеграции элементов индуцируемой системы CRISPR/Cas в геном линии клеток LCL были получены 2 трансферные плазмиды, содержащие

кассету из генов РНК-гидов и нуклеазы Cas9 либо ген белка-активатора системы Tet-ON для индуцируемой экспрессии. В кассеты также входили гены-селективные маркеры и фланкирующие всю кассету плечи гомологии к локусу AAVS1 на 19 хромосоме. Клетки LCL трансфицировали полученными трансферными плазмидами, а также плазмидами, кодирующими нуклеазы TALEN, вносящими разрыв в локус интеграции. Репарация этих разрывов, направляемая гомологией к плечам трансферных плазмид, приводила к интеграции кассеты в обе хромосомы 19 (рисунок 5), и такие клетки селектировали по устойчивости к обоим селектирующим антибиотикам. В результате были получены культуры клеток, в которых при индукции доксициклином запускалась экспрессия Cas9 и начинали формироваться транслокации между целевыми локусами, что было подтверждено методами ПЦР с обратной транскрипцией и вложенной ПЦР. Было показано, что экспрессия Cas9 выходит на максимум через сутки после добавления доксициклина в культуру, а транслокации детектируются вложенной ПЦР через 1,5–2 суток. По описанному принципу было создано несколько клеточных моделей для изучения различных транслокаций, в частности, транслокации *AML1-ETO*.



**Рисунок 5.** Схема конструкций, интегрированных в геном клеток культуры iAML-ETO в локус AAVS1 на 19 хромосоме (гены устойчивости к антибиотикам не показаны). TA — транс-активатор, активирующий экспрессию с TRE-промотора в ответ на наличие доксициклина.

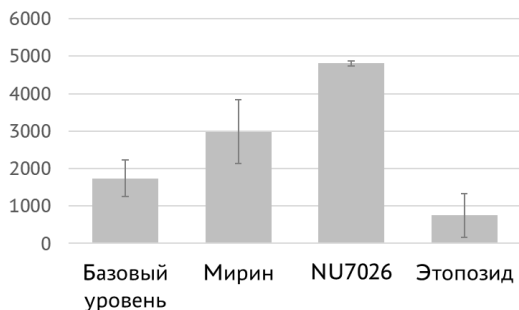
В целях изучения механизмов образования перестройки *AML1-ETO* в полученной клеточной культуре была отработана процедура постановки количественной ПЦР на целевую транслокацию. Были подобраны праймеры и TaqMan-зонд, определены оптимальные условия ПЦР, а также создана плазмидная конструкция, содержащая участок транслокации, для положительного контроля ПЦР и построения калибровочных прямых. Число транслокаций, определенное в ПЦР, нормировалось на число клеток, чья ДНК попала в реакцию, с помощью флуориметрического измерения концентрации ДНК или с помощью внутреннего контроля — количественной ПЦР на интактный участок *AML1*. Была изучена кинетика накопления транслокаций в клетках после индукции доксициклином и оптимизирована методика постановки экспериментов на этой клеточной модели. Так, было определено, что число транслокаций варьирует в зависимости от условий культивирования клеток — при низких концентрациях клеток в суспензии число транслокаций меньше. В плотной культуре клеток (0,7–1 млн/мл) число транслокаций на 3–4 сутки после индукции доксициклином достигает 10–12 транслокаций на 1000 клеток. Это можно объяснить бóльшим вкладом гомологической рекомбинации в репарацию двуцепочечных разрывов ДНК. Для делящихся клеток характерно переключение путей репарации с негомологического соединения концов разрыва (NHEJ) на направляемую гомологией репарацию. Считается, что именно NHEJ приводит к транслокации, тогда как гомологическая рекомбинация защищена от таких ошибок. В плотной культуре доля делящихся клеток снижается, и в среднем по популяции более предпочтительным становится путь репарации NHEJ, связанный с образованием перестроек.

С помощью FISH с двуцветным зондом к генам *AML1* или *ETO* и конфокальной микроскопии с последующим компьютерным анализом данных были исследованы клетки iAML-ETO, в которых была индуцирована экспрессия Cas9. Однако разрывов генов *AML1* или *ETO*, как в случае обработки

этопозидом, обнаружено не было. Вероятно, разрывы, вызванные нуклеазой Cas9, сшиваются быстрее, чем индуцированные этопозидом, и их концы не успевают разойтись.

### **Изучение влияния ингибиторов белков репарации и веществ, применяющихся в химиотерапии, на число транслокаций**

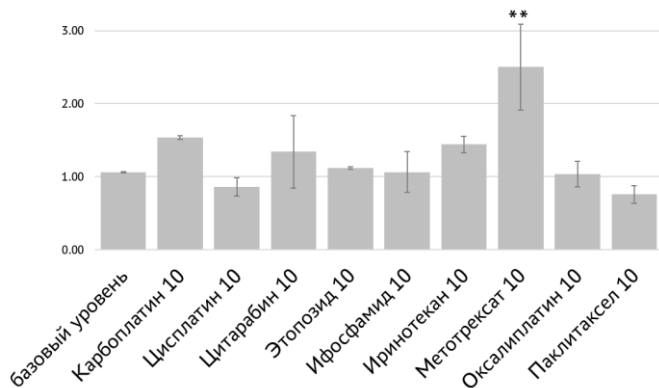
На клетках культуры iAML-ETO были поставлены эксперименты с индукцией целевой перестройки и одновременной обработкой клеток различными ингибиторами белков репарации: NU7026, ингибитором белка репарации DNA-РKcs, и мирином — ингибитором комплекса репарации MRN. Данные вещества показали незначительное увеличение частоты транслокаций в системе относительно параллельного контрольного эксперимента с индукцией транслокаций без дополнительной обработки клеток какими-либо ингибиторами. Аналогичный эксперимент на культуре iAML-ETO был поставлен с этопозидом. В этом случае частота детектируемой ПЦР транслокации *AML-ETO* было несколько ниже, чем в контроле — в клетках, обработанных только доксициклином (рисунок 6).



**Рисунок 6.** Число транслокаций (на миллион клеток), образующихся при ко-обработке клеток культуры iAML-ETO доксициклином и ингибиторами белков репарации — NU7026 и мирина, а также ко-обработке этопозидом (одна из повторностей). Базовый уровень — эксперимент с индукцией доксициклином без добавления каких-либо ингибиторов.

Результаты ингибирования белков репарации NHEJ объясняются тем, что комплекс белков с участием DNA-ПКcs удерживает концы разрыва вместе перед тем, как они будут лигированы. При ингибировании этого белка вырастает шанс «потерять» концы одного разрыва, а значит, повышается шанс в дальнейшем лигироваться концам разных разрывов с образованием транслокаций. Это можно сравнить с репарацией разрывов, вызванных ингибированием ДНК-топоизомераз: они не могут быть сразу репарированы из-за ковалентно связанного с ДНК фермента и тоже часто «теряют» концы. Аналогично может быть объяснено влияние мирина — ингибирование комплекса MRN, задействованного в начальных этапах репарации разрывов, также повышает шансы «потерять» концы разрыва. Таким образом, результаты по ингибированию DNA-ПКcs и MRN подтверждают, что сложность процессинга концов и их потеря повышает шансы на формирование хромосомных перестроек. А некоторое снижение числа транслокаций *AML-ETO* в экспериментах с линией *iAML-ETO* и этопозидом может объясняться тем, что у разрывов, индуцированных нуклеазой, появляется больше других вариантов для репарации — разрывов в других локусах, индуцированных этопозидом.

Также с помощью полученной клеточной культуры iAML-ЕТО был проведен скрининг веществ, применяющихся в химиотерапии опухолей совместно с ингибиторами ДНК-топоизомеразы II. Были протестированы следующие препараты: антиметаболиты (цитарабин, метотрексат), препараты на основе платины (карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин), алкилирующий агент (ифосфамид), ингибитор ДНК-топоизомеразы I (иринотекан), ингибитор сборки микротрубочек (паклитаксел). Препараты добавляли к клеткам одновременно с доксициклином в нелетальных концентрациях  $\approx$  IC10. В результате было показано, что метотрексат приводит к повышению частоты индуцированных транслокаций *AML1-ETO* относительно базового уровня, соответствующего частоте транслокаций в клетках, обработанных только доксициклином (рисунок 7). Эти данные согласуются с описанными в литературе случаями развития АМЛ с транслокациями t(8;21) и t(3;21) у пациентов с ревматоидным артритом, которых лечили низкими дозами метотрексата.



**Рисунок 7.** Результаты скринингов с помощью клеток культуры iAML-ЕТО веществ, применяющихся в химиотерапии опухолей совместно с ингибиторами ДНК-топоизомеразы II, на предмет числа формируемых транслокаций. Количество транслокаций в каждом эксперименте нормировано на базовый уровень — эксперимент с индукцией доксициклином без добавления каких-либо препаратов.

## Заключение

Химиотерапия опухолей с применением ингибиторов ДНК-топоизомераз II типа широко распространена, однако может приводить к развитию вторичных лейкозов, характеризующихся определенными хромосомными транслокациями. На основании данных литературы и результатов нашего исследования, можно выделить три основных фактора, определяющих набор этих транслокаций. Во-первых, транслокации определяются локусами, которые подвержены действию таких ядов вследствие активности на этих участках ДНК-топоизомераз. Во-вторых, при обработке клеток этопозидом характерна «потеря» концов разрывов, что приводит к их расхождению и диффузии по ядру. Сложность репарации таких разрывов способствует этому расхождению и нивелирует фактор пространственной близости перестраивающихся локусов. В-третьих, среди образующихся транслокаций только некоторые дают клеткам пролиферативное преимущество, и поэтому набор перестроек, наблюдаемых при лейкозах, ограничен.

Во время проведения исследования были разработаны методики, значимые для работ, связанных с редактированием генома — метод проверки эффективности инструментов редактирования генома Direct ENIT, методики получения клеточной линии для моделирования образования транслокации. Полученная клеточная культура может применяться как тест-система для анализа используемых в терапии соединений на предмет риска возникновения лейкозогенных транслокаций. Также эта клеточная модель может стать тест-системой для обнаружения веществ, способных снизить вероятность развития вторичного лейкоза при терапии с применением ингибиторов ДНК-топоизомераз II.



## ВЫВОДЫ

1. Обработка клеток культуры Jurkat этопозидом приводит к возникновению двуцепочечных разрывов ДНК внутри гена *AML1* и расхождению образовавшихся концов ДНК в пространстве ядра.
2. Воздействие высоких доз  $\gamma$ -излучения не приводит к увеличению числа разошедшихся концов разрывов гена *AML1*.
3. Под действием этопозиды аллели *AML1* чаще, чем в необработанных клетках, локализуются вне хромосомной территории.
4. Ни в контрольных клетках, ни в клетках, обработанных этопозидом, не выявлено повышенного числа контактов генов *AML1* и *MLL* с их генами-партнерами по транслокациям по сравнению с другими генами.
5. Создана клеточная культура iAML-ETO, содержащая в геноме индуцируемую доксициклином систему CRISPR/Cas, которая формирует транслокацию *AML1-ETO*, количественно определяемую методом ПЦР.
6. С помощью полученной клеточной культуры iAML-ETO показано, что присутствие метотрексата или ингибитора DNA-РКс NU7026 приводит к повышению частоты формирования транслокаций *AML1-ETO*.

## Список опубликованных работ по теме диссертации

### Публикации в журналах

1. \*Shmakova A. and \*Lomov N., Viushkov V., Tsfasman T., Kozhevnikova Y., Sokolova D., Pokrovsky V., Syrkina M., Germini D., Rubtsov M., Vassetzky Y. Cell models with inducible oncogenic translocations allow to evaluate the potential of drugs to favor secondary translocations // *Cancer communications*. — 2023. — 154-158. — 43(1). IF = 10,4 (Web of Science).

\*авторы внесли равный вклад

2. Lomov N.A., Viushkov V.S., Ulianov S.V., Gavrilov A.A., Alexeyevsky D.A., Artemov A.A., Razin S.V., Rubtsov M.A. Recurrent Translocations in Topoisomerase Inhibitor-Related Leukemia Are Determined by the Features of DNA Breaks Rather Than by the Proximity of the Translocating Genes // *Int J Mol Sci*. — 2022, — 23(17). — 9824. IF = 5,9 (Web of Science).

3. Lomov N., Zerkalenkova E., Lebedeva S., Viushkov V., Rubtsov M. Cytogenetic and molecular genetic methods of chromosomal translocation detection with reference to the *KMT2A/MLL* gene // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. — 2021. — 180-206. — 58(3). IF = 8,5 (Web of Science).

4. Lomov N.A., Viushkov V.S., Zamalutdinov A.V., Sboeva M.D., Rubtsov M.A. Direct ENIT: An easy and reliable tool for gRNA efficacy verification by tracking induced chromosomal translocation // *METHODS X*. — 2020. — Vol. 7. — P. 101–104. IF 2020 = 2,2 (Web of Science).

5. Lomov N.A., Viushkov V.S., Petrenko A.P., Syrkina M.S., Rubtsov M.A. Methods for the evaluation of efficiency of CRISPR/Cas genome editing // *Molecular Biology*. — 2019. — Vol. 53, no. 6. — P. 982–997. IF = 1,4 (Web of Science). Статья доступна на русском языке в журнале Молекулярная биология. — 2019. — Т. 53, № 6. — С. 982–997.

6. Germini D., Bou Saada Y., Tsfasman T., Osina K., Robin C., **Lomov N.**, Rubtsov M., Sjakste N., Lipinski M., Vassetzky Y. A one-step PCR-based assay to evaluate the efficiency and precision of genomic DNA-editing tools // *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. — 2017. — Vol. 5. — P. 43–50.

IF = 6,7 (Web of Science).

7. **Lomov N.A.**, Borunova V.V., Rubtsov M.A. CRISPR/Cas9 technology for targeted genome editing // *Biopolymers and Cell*. — 2015. — Vol. 31, no. 4. — P. 243–248.

IF = 0,34 (Scopus).

### **Патент**

**Ломов Н.А.**, Вьюшков В.С., Васецкий Е.С., Рубцов М.А. Тест-система для поиска препаратов, снижающих риск возникновения вторичных лейкозов // Патент номер #2018132409 от 30 апреля 2020.

Отпечатано на Биологическом факультете

МГУ имени М.В.Ломоносова

Тираж 60 экземпляров