

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-263

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ РЕПАРАЦИИ ДНК, ВОВЛЕЧЕННЫХ
В ОБРАЗОВАНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ *AML1-ETO******INVESTIGATION OF DNA REPAIR PATHWAYS INVOLVED IN FORMATION
OF *AML1-ETO* CHROMOSOMAL TRANSLOCATION**

Н. А. Николаев, В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

N. A. Nikolaev, V. S. Viushkov, N. A. Lomov

Lomonosov Moscow State University

✉ nnikolaev@fbb.msu.ru

Аннотация

С помощью NGS и клеточной линии с индуцируемой системой CRISPR/Cas, нацеленной на гены *AML1* и *ETO*, мы изучили репарацию двуцепочечных разрывов ДНК в норме и при образовании хромосомных транслокаций *AML1-ETO* и *ETO-AML1*. Мы сравнили встречаемость следов NHEJ и MMEJ. Транслокации сопровождаются в среднем более длинными делециями. Использование микрогомологий разнится от локуса к локусу, предположительно, по причине различных репертуаров микрогомологий.

Abstract

Using NGS and a cell line with inducible CRISPR/Cas system targeting *AML1* and *ETO* genes, we have studied DNA double-strand break repair in normal end joining and formation of chromosomal translocations *AML1-ETO* and *ETO-AML1*. We have compared the occurrence of NHEJ and MMEJ features. On average, translocations are characterized by longer deletions. Microhomology usage varies across loci. We suspect this to be due to differing repertoires of microhomologies.

Хромосомные транслокации часто выступают драйверными событиями онкогенеза [1, 2]. Чаще всего хромосомные транслокации возникают при ошибках репарации двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) путем негомологического соединения концов (NHEJ) или репарации, опосредованной микрогомологией (MMEJ) [3].

Соединение концов путем NHEJ происходит либо без инделей (инсерций или делеций), либо с небольшими инделями. Для репарации путем MMEJ необходимы два участка микрогомологии (идентичной последовательности) по разные стороны от ДЦР. В результате MMEJ происходит делеция одного из двух участков и последовательности ДНК между ними [3]. Большая часть транслокаций в клетках человека несет следы NHEJ [3], однако NHEJ — сам по себе доминирующий путь репарации ДЦР у позвоночных [4], поэтому вопрос о склонности NHEJ и MMEJ к ошибочному соединению концов ДНК и образованию транслокаций остается открытым. Существуют данные, указывающие на то, что MMEJ чаще вовлечен в ошибочное соединение концов ДНК и образование хромосомных транслокаций (транс-репарацию), чем в правильное соединение (цис-репарацию) [5]. Эти результаты были получены на генно-инженерных репортерных конструкциях и требуют проверки применительно к клинически значимым перестройкам.

Ранее в нашей лаборатории на основе лимфобластоидной клеточной линии LCL была получена линия iAML-ETO, моделирующая транслокацию 8-й и 21-й хромосом с образованием химерного гена *AML1-ETO* [6]. Такая транслокация является нежелательным побочным эффектом противораковой терапии генотоксическими агентами, так как может запускать развитие крайне агрессивного индуцированного терапией лейкоза [2, 6]. Клетки линии iAML-ETO несут гены гидовых РНК к локусам генов *AML1* и *ETO* и ген нуклеазы Cas9 под контролем промотора системы Tet-ON. Наличие этой системы в геноме позволяет индуцировать ДЦР в целевых локусах в большинстве клеток в культуре и получать множество транслокаций, несмотря на то что перестройки сами по себе очень редки. С помощью данной линии мы оценили число событий NHEJ и MMEJ при цис- и транс-репарации.

Мы индуцировали в клетках экспрессию Cas9, через 72 ч выделили геномную ДНК и с помощью ПЦР амплифицировали как исходные локусы, в которые вносили разрывы, так и химерные последовательности ДНК, образованные в результате транс-репарации. Из ампликонов приготовили NGS-библиотеки, секвенировали их и выявили следы событий репарации в чтениях.

* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 24-24-20019).

© Н. А. Николаев, В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов, 2024

Мы установили, что в ходе транс-репарации соединяемые концы ДНК теряют в среднем больше нуклеотидов (т. е. испытывают более интенсивную резекцию), чем в ходе цис-репарации. Это может объясняться тем, что перед ошибочным соединением концы ДНК на продолжительное время оказываются «потеряны» в клеточном ядре. Более интенсивная резекция концов должна способствовать их репарации путем ММЕJ. С этим согласуется наше наблюдение, что, при рассмотрении последовательностей, несущих индели, транс-репарация чаще происходит с утратой участков микромомологии (длиной 3–6 нуклеотидов), чем цис-репарация в локусе *AML1*. В случае гена *ETO* ситуация оказалась обратной: микромомологии чаще утрачивались при цис-репарации, чем при транс-репарации. Мы связываем это с тем, что локус *ETO* гораздо богаче микромомологичными участками, чем локус *AML1* или последовательности ДНК, образующиеся при транс-репарации.

Наши данные говорят о том, что механизм ММЕJ в общем случае играет большую роль в транс-репарации, чем в цис-репарации, однако эта тенденция зависит от последовательности локуса, в котором возникают ДЦР. Полученные результаты важны для понимания механизмов репарации ДНК в клетке, в частности механизмов образования хромосомных транслокаций.

Литература

1. Wang J. H. Mechanisms and Impacts of Chromosomal Translocations in Cancers // *Front. Med.* 2012. Vol. 6 (3). P. 263–74.
2. Swerdlow S. H, Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017. 585 p.
3. Bunting S. F., Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. Vol. 13 (7). P. 443–54.
4. Chang H. Y., Pannunzio N. R., Adachi N., Lieber M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18 (8). P. 495–506.
5. Weinstock D. M., Elliott B., Jasin M. A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair // *Blood.* 2006. Vol. 107 (2). P. 777–780.
6. Shmakova A., Lomov N., Viushkov V. et al. Cell models with inducible oncogenic translocations allow to evaluate the potential of drugs to favor secondary translocations // *Cancer Commun.* 2023. Vol. 43 (1). P. 154–158.