

Оптимизация метода LOLA для детекции онкогенных перестроек $t(4;11)(q21;q23)$

Научный руководитель – Рубцов Михаил Александрович

Замалутдинов А.В.¹, Ломов Н.А.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия, *E-mail: n.zamal@yandex.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия, *E-mail: lomov13@gmail.com*

Хромосомные перестройки с участием гена лизинового гистонметилтрансферазы MLL (KMT2A) часто сопутствуют лейкозам. В результате транслокации KMT2A соединяется с одним из многочисленных генов-партнёров. В прогнозировании и выборе подхода к лечению большую роль играет тип перестройки. Проблема его определения заключается в многочисленности возможных точек разрыва, находящихся на протяжённом участке (кластере разрывов) гена, что осложняет детекцию перестройки простыми методами, например, ПЦР. Для решения этой проблемы в настоящее время применяется метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с двуцветными (dual color) пробами. Однако этот метод довольно дорог, сложен и процедура занимает несколько дней.

Метод лигирования запетленных участков (Loop Ligation Assay, LOLA) позволяет детектировать разные транслокации, отличающиеся локализацией точки разрыва на протяжении десятков тысяч пар нуклеотидов.

Основу метода составляют три стадии: отжиг в области транслокации в непосредственной близости друг к другу трёх олигонуклеотидов, их дальнейшее лигирование и детекция образовавшегося продукта. Боковые олигонуклеотиды состоят из некомплементарной хромосоме части, на которую происходит отжиг универсальных праймеров, и комплементарный хромосоме участок. Концы среднего олигонуклеотида комплементарны двум удаленным участкам слитой хромосомы, а его средняя часть представляет собой линкер, позволяющий сблизить участки химерного гена с образованием петли. Боковые олигонуклеотиды отжигаются вплотную к концам среднего олигонуклеотида и лигируются друг с другом, если перестройка присутствует в ДНК. Образовавшийся продукт лигирования детектируется методом ПЦР. Принцип проиллюстрирован на Рис. 1.

Мы детектировали транслокацию MLL-AF4, как одну из самых частых транслокаций гена MLL, наблюдаемых при острых лейкозах, особенно у детей первого года жизни. Для подбора условий реакции и для повышения специфичности мы применили стратегию вложенной ПЦР.

Затем для более быстрой детекции продукта лигирования был опробован метод ПЦР в реальном времени с Taq-Man пробой. Устойчивая детекция целевого продукта наблюдалась при использовании 250 нг ДНК для лигирования и при разбавлении смеси после лигирования в 50 раз для проведения ПЦР.

ДНК выделяли из образцов костного мозга пациентов, полученного в период развернутого течения заболевания. Образцы содержали по крайней мере 80% бластных клеток. Наличие транслокации $t(4;11)(q21;q23)$ /MLL-AF4 было доказано методами стандартного кариотипирования, FISH и ПЦР с обратной транскрипцией.

Метод является достаточно быстрым, дешевым и не требующим сохранности клеток в образцах и в перспективе может заменять FISH. Ограничением метода является качество анализируемой геномной ДНК.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-75-10056). Информированное согласие на диагностическое обследование было получено от законных представителей всех пациентов.

Иллюстрации

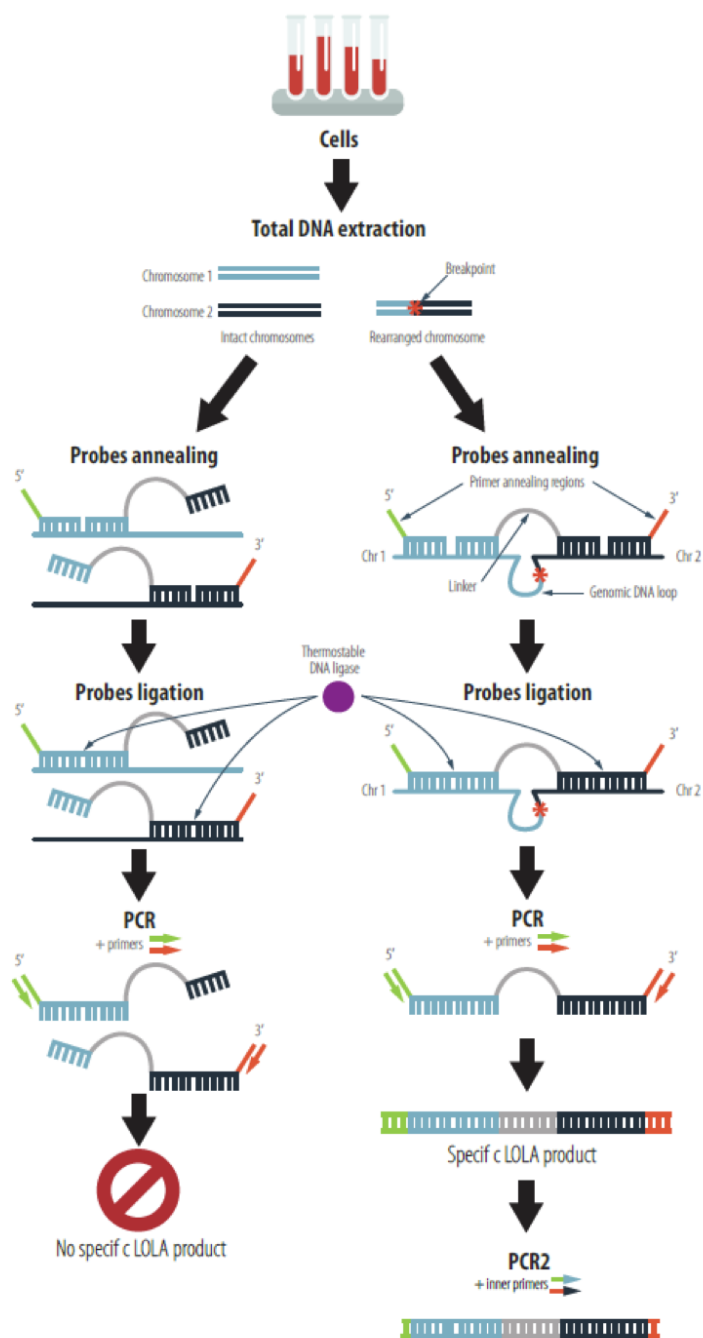


Рис. 1. Принцип метода LOLA