

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА, NMD И АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТРАНСКРИПТОВ ГИБРИДНОГО ГЕНА RUNX1/RUNX1T1 В КЛЕТКАХ ОМЛ

А. В. Войтенкова, О. Д. Кирсанова

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное заболевание крови, характеризующееся экспансией трансформированных белых кровяных клеток. Было показано, что у 20 % пациентов малигнизированные клетки содержат транслокацию t(8;21)(q22;q22), результатом которой является образование гибридного гена RUNX1/RUNX1T1, играющего важную роль в развитии и прогрессии заболевания [5].

Данный ген образует необычно высокое количество альтернативных транскриптов (на сегодняшний день идентифицировано 118) [1; 2], подавляющее большинство которых могут образовывать белки, лишенные важных функциональных доменов [7]. Роль таких укороченных транскриптов в настоящее время не ясна [6], однако было показано, что некоторые являются индукторами злокачественной трансформации гемопоэтических клеток [3; 4].

Показанное разнообразие альтернативных транскриптов может быть связано с изменениями в работе системы альтернативного сплайсинга, а также систем, отвечающих за элиминацию нефункциональных транскриптов (например, система уничтожающая мРНК с преждевременными стоп-кодонами – NMD) [8]. Выявление закономерностей образования альтернативных транскриптов гибридного гена может прояснить механизм появления и развития лейкозов.

В связи с этим, целью данного исследования является выявление корреляций в экспрессии альтернативных транскриптов гена RUNX1/RUNX1T1, генов систем альтернативного сплайсинга и NMD.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из клеток линии Kasumi-1 с помощью набора TRIzol® (Invitrogen, США) была выделена тотальная клеточная РНК. На ее основе была синтезирована кДНК с использованием Oligo-dT и SuperScript III обратной транскриптазы. Уровень экспрессии определялся с помощью количественной ПЦР по отношению к уровню экспрессии гена TBP (TATA Binding Protein).

Результаты корреляционного анализа по Спирмену были использованы для построения теплокарты с помощью функции *Heatmap 2* из пакета *gplots v.2.13.0* для среды программирования *R*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения анализа были выбраны ключевые гены систем альтернативного сплайсинга и NMD, экспрессия которых в лейкозных клетках отличается от экспрессии в нормальных гемопоэтических клетках по данным микроэrray. Из генов системы альтернативного сплайсинга были выбраны следующие: *GSPT1*, *UPF3A*, *MAGOH*, *DCP2*, *DCP1B*, *SMG1*. Гены системы NMD: *PTBP1*, *RBFOX3*, *RBM25*, *SRPK2*, *SRSF6*, *TIA1*.

Альтернативные транскрипты могут возникать как результат использования различных сайтов инициации транскрипции, а также альтернативных сайтов терминации (экзоны 12а, 15а, 17а, 17 гена *RUNX1T1*). Для определения уровня экспрессии альтернативных транскриптов гена *RUNX1/RUNX1T1* использовались пары праймеров к экзонам *RUNX1T1*: 8а (прямой) + 8b (обратный), 11 (прямой) + 12а (обратный), 15а (прямой) + 15а (обратный), 15а (прямой) + 15 (обратный), 16 (прямой) + 17 (обратный), 16 (прямой) + 17а (обратный). Далее по тексту транскрипты обозначены в соответствии с использованными парами праймеров. Результаты количественного анализа экспрессии альтернативных транскриптов относительно гена *TBP* представлены в таблице. Следует отметить присутствие в клетках транскриптов 15а_15, несмотря на то, что они являются потенциальной мишенью для генов системы NMD.

Таблица 1

Относительная экспрессия альтернативных транскриптов гибридного гена *RUNX1/RUNX1T1*

Вариант транскрипта	Относительная экспрессия
8а_8b	0,12 ± 0,03
11_12а	0,38 ± 0,06
15а_15а	2,34 ± 0,44
15а_15	0,15 ± 0,03
16_17а	0,21 ± 0,04
16_17	3,69 ± 0,91

Данные, полученные с помощью количественной ПЦР, были использованы для проведения корреляционного анализа по Спирмену. Для визуализации результатов была построена теплокарта (рисунок). Используемый алгоритм позволил не только выявить попарные корреляции, но также выделить кластеры коэкспрессирующихся генов, что отображено на рисунке.

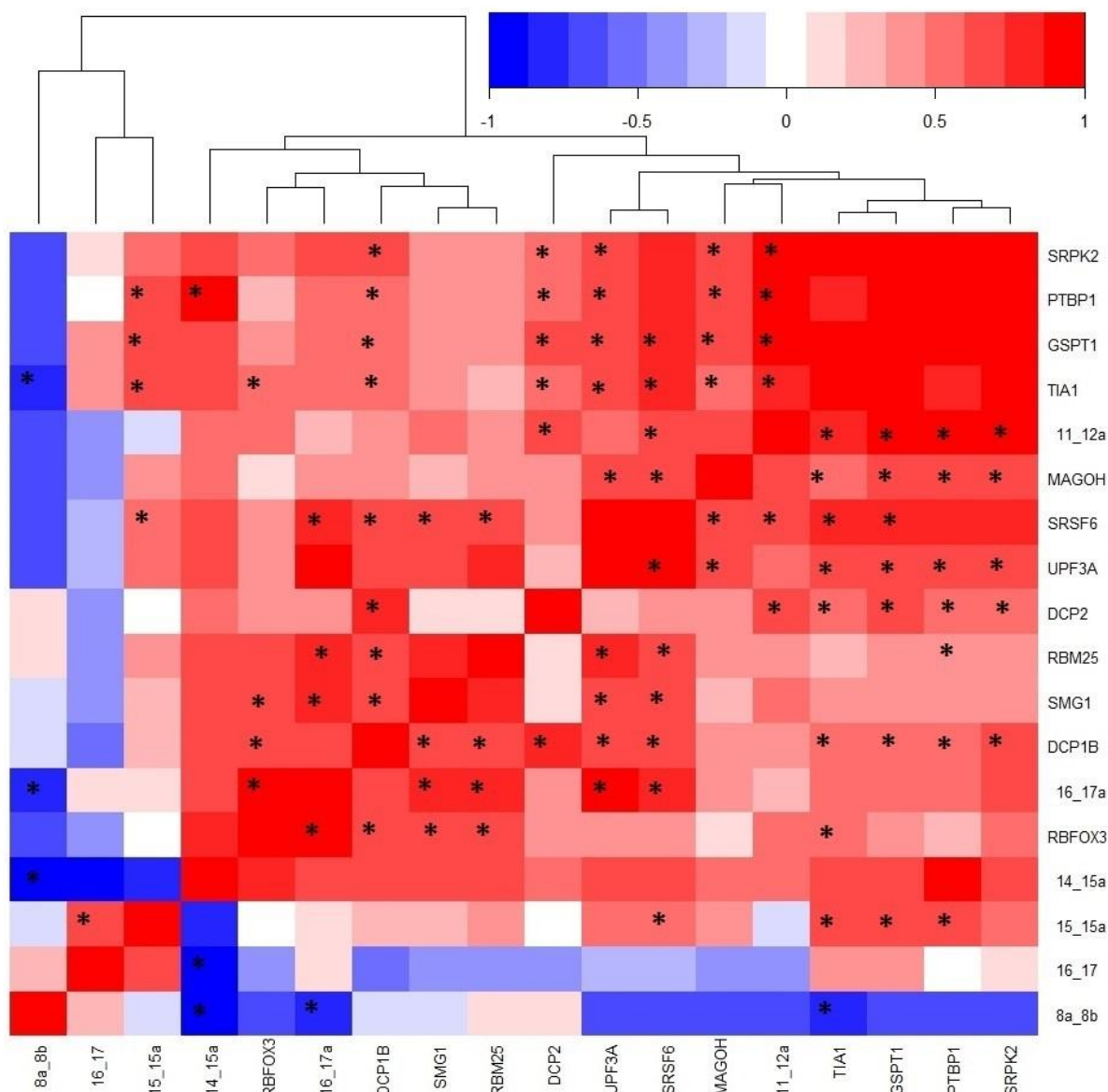


Рис. 1. Результаты корреляционного анализа по Спирмену

В верхней части рисунка показаны кластеры коэкспрессирующихся генов. «*» отмечены статистически достоверные корреляции, $p < 0.05$. Красный цвет соответствует положительной корреляции, синий цвет – отрицательной корреляции, белый цвет – отсутствию корреляции.

Было выявлено, что экспрессия транскрипта 11_12a достоверно коррелирует с экспрессией 6 генов, среди которых есть как гены системы альтернативного сплайсинга (GSPT1, DCP2), так и гены системы NMD (SRPK2, PTBP1, TIA1, SRSF6). Экспрессия 16_17a транскрипта достоверно коррелирует с экспрессией 5 генов систем альтернативного сплайсинга (UPF3A, SMG1) и NMD (SRSF6, RBM25, RBFOX3). Исходя из различного набора скоррелированных генов, можно предположить различия в регуляции экспрессии соответствующих альтернативных транскриптов.

Экспрессия транскрипта 15a_15 коррелирует с экспрессией 4 генов систем альтернативного сплайсинга (GSPT1) и NMD (PTBP1, TIA1,

SRSF6), корреляция с которыми была характерна и для транскрипта 11_12а, что, в свою очередь, говорит о возможной общей регуляции экспрессии соответствующих альтернативных транскриптов. В экспрессии 8а_8b транскрипта были выявлены в основном отрицательные корреляции с другими генами и транскриптами, 3 из которых являются достоверными (включая альтернативные транскрипты 14_15а, 16_17а и ген TIA1 системы NMD).

Таким образом, была доказана и измерена экспрессия альтернативных вариантов транскриптов гибридного гена RUNX1/RUNX1T1 в клетках линии Kasumi-1. Кроме того, были выявлены достоверные корреляции в экспрессии альтернативных транскриптов гена RUNX1/RUNX1T1, генов систем альтернативного сплайсинга и NMD.

В дальнейшем планируется изучить функциональную роль альтернативных транскриптов в развитии ОМЛ, а также роль генов систем альтернативного сплайсинга и NMD в регуляции экспрессии альтернативных транскриптов гибридного онкогена RUNX1/RUNX1T1.

Литература

1. *Kozu T. et. al.* MYND-Less Splice Variants of AML1-MTG8 (RUNX1-CBFA2T1) are Expressed in Leukemia with t(8;21) // *Genes, chromosomes and cancer*. 2005. №43. С. 45–53.
2. *LaFiura K. M. et. al.* Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group // *Oncogene*. 2008. №27. С. 4933–4942.
3. *Mannari D.* A novel exon in AML1-ETO negatively influences the clonogenic potential of the t(8;21) in acute myeloid leukemia // *Leukemia*. 2010. №24. С. 891–894.
4. *Ming Yan et. al.* A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis // *Nature medicine*. 2006. Том 12. №8.
5. *Miyoshi H. et. al.* The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML 1- MTG8 fusion transcript // *The EMBO Journal*. 1993. Том 12. №7. С. 2715–2721.
6. *Peterson L.F. et al.* Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts // *Blood*. 2007. Том 110. С. 799–805.
7. *Tighe J.E., Calabi F.* Alternative, out-of-frame runt/MTG8 transcripts are encoded by the derivative (8) chromosome in the t(8;21) of acute myeloid leukemia M2 // *Blood*. 1994. №84. С. 2115–2121.
8. *Trcek T. et. al.* Temporal and spatial characterization of nonsense-mediated mRNA // *Genes Dev*. 2013. №27. С. 541–551.