

КОММЕНТАРИЙ АВТОРОВ К ПУБЛИКАЦИИ «ВКЛАД РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ГЕНЕРАЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТРАНСКРИПТОВ В РАЗНООБРАЗИЕ мРНК ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА RUNX1-RUNX1T1 ЧЕЛОВЕКА»

И. Н. ИЛЬЮШЁНОК¹⁾, Л. И. ПОЛХОВСКИЙ¹⁾, В. В. ГРИНЕВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Критически рассматриваются недостатки, обнаруженные в оригинальной статье «Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена RUNX1-RUNX1T1 человека», которая была опубликована в издании «Журнал Белорусского государственного университета. Биология» (2019, № 2). Также авторы представляют новые данные по теме исследования, полученные с момента публикации.

Ключевые слова: гибридный онкоген RUNX1-RUNX1T1; альтернативный сплайсинг РНК; высокопроизводительное секвенирование; биологический шум.

Благодарность. Работа выполнена в рамках подпрограммы «Объединение» государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.08.03 (№ 469/54)).

COMMENT OF THE AUTHORS ON THE ARTICLE «THE CONTRIBUTION OF VARIOUS MECHANISMS TO mRNA DIVERSITY OF HUMAN FUSION ONCOGENE RUNX1-RUNX1T1»

I. M. ILYUSHONAK^a, L. I. POLKHOVSKY^a, V. V. GRINEV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaležnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: I. M. Ilyushonak (nov.ilyushonok@gmail.com)

The main topic of this brief communication is the critical review of flaws, found in the original article «The contribution of various mechanisms to mRNA diversity of human fusion oncogene RUNX1-RUNX1T1», which was published in «Journal of the Belarusian State University. Biology» (2019, No. 2). Also authors provide new results obtained since publication.

Keywords: fusion oncogene RUNX1-RUNX1T1; alternative RNA splicing; high throughput sequencing; biological noise.

Acknowledgements. This work is a part of sub-programme «Union» of the State Program on Scientific Research «Convergence-2020» (grant 3.08.03 (No. 469/54)).

Образец цитирования:

Ильюшёнок ИН, Полховский ЛИ, Гринев ВВ. Комментарий авторов к публикации «Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена RUNX1-RUNX1T1 человека». Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020;2:90–94.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-2-90-94>

For citation:

Ilyushonak IM, Polkhovsky LI, Grinev VV. Comment of the authors on the article «The contribution of various mechanisms to mRNA diversity of human fusion oncogene RUNX1-RUNX1T1». Journal of the Belarusian State University. Biology. 2020;2:90–94. Russian.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-2-90-94>

Авторы:

Илья Николаевич Ильюшёнок – ассистент кафедры генетики биологического факультета.

Лев Иванович Полховский – студент биологического факультета. Научный руководитель – И. Н. Ильюшёнок.

Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Ilya M. Ilyushonak, assistant at the department of genetics, faculty of biology.

nov.ilyushonok@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5377-366X>

Lev I. Polkhovsky, student at the faculty of biology.

lev_polkhovsky@mail.ru

Vasily V. Grinev, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

grinev_vv@bsu.by

Ранее в издании «Журнал Белорусского государственного университета. Биология» (2019, № 2) была опубликована статья «Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* человека» [1]. За время, прошедшее с момента публикации, авторами накоплен новый материал, который может представлять интерес для научной общественности. Вместе с тем в оригинальном исследовании были обнаружены недостатки, которые потребовали проведения дополнительных проверок. В настоящем сообщении мы хотели бы обозначить эти недостатки и проанализировать их возможное влияние на выводы, сформулированные в оригинальной публикации, опираясь на дополнительные данные.

В первую очередь ошибочным оказалось утверждение о неспособности обратной транскриптазы RevertAid (*Thermo Fisher Scientific*, США) генерировать артефакты, которые можно принять за результат альтернативного сплайсинга (см. [1], разделы «Оценка технического шума в экспериментальных данных» и «Идентификация основных мод альтернативного сплайсинга пре-мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*»). К сожалению, более тщательное изучение публикаций по данной теме показало, что этот фермент все же способен порождать такого рода ложноположительные результаты [2]. Это побудило нас провести дополнительные проверки экзонных стыков 17a17 и PR07-4b.

Мы воспользовались подходом, предложенным в работе [3], который предусматривает применение обратной транскриптазы из другого биологического источника, например вируса миелобластоза птиц (*avian myeloblastosis virus*, AMV). Пул артефактов, порождаемых двумя неродственными транскриптазами на идентичной матрице, перекрывает лишь частично. Это значит, что воспроизведение экзон-экзонного стыка в образцах кДНК, полученных двумя разными ферментами, может подтвердить реальность его существования. Мы синтезировали кДНК на матрице РНК клеток линии Kasumi-1 при помощи обратной транскриптазы AMV (*New England Biolabs*, Великобритания) и успешно амплифицировали как экзонный стык 17a17, так и PR07-4b. Результаты верификации представлены на рис. 1.

Также мы секвенировали ампликоны, полученные на RevertAid-кДНК, по методу Сэнгера. Результаты секвенирования подтвердили специфичность нашей амплификации; они были приняты для депонирования в GenBank под номерами MT331609 и MT331610. В совокупности эти данные доказывают реальное присутствие экзонных стыков 17a17 и PR07-4b в транскриптоме лейкозных клеток.

Второй недостаток оригинальной статьи связан с ОТ-ПЦР-валидацией экзонного стыка 12del. Напомним, что этот сплайсинговый вариант образуется за счет удаления экзитрона из центральной части экзона 12 и соединения его концевых участков. Первоначально он был идентифицирован при анализе полнотранскриптомных данных RNA-Seq. В ходе дополнительной проверки выяснилось, что обратный праймер для ОТ-ПЦР-валидации 12del способен отжигаться на полноразмерной кДНК-матрице лишь за счет нуклеотидов 3'-конца. При этом образуется ложноположительный ампликон целевой длины. Проверку мы осуществили, клонировав полноразмерный, лишенный делеции ампликон экзона 12 в плазмидный вектор и проведя ПЦР на нем.

Эти данные требуют признать нашу ОТ-ПЦР-верификацию 12del неудачной, а результаты количественной ПЦР по его экспрессии – недостоверными. Тем не менее мы считаем, что сам по себе указанный экзонный стык не является артефактом. В пользу этого свидетельствуют следующие соображения. Как правило, «прыжок» обратной транскриптазы, результатом которого является пропуск фрагмента кДНК, происходит по прямым повторам. Так, в статье [4] описывается артефакт обратной транскрипции, представляющий собой делецию в 1851 нуклеотид. Делетированный участок фланкирован двумя почти идентичными (расстояние Левенштейна равно 2) прямыми повторами длиной 13 нуклеотидов. О необходимости прямых повторов для возникновения внутри- и межмолекулярных артефактов обратной транскрипции сообщается и в других работах [3; 5]. Таких повторов в области делеции 12del не наблюдается: расстояние Левенштейна между потенциальными сайтами микрогоомологии длиной 15 нуклеотидов равно 8. Можно предположить, что наличие участков с высокой степенью микрогоомологии не является обязательным условием для образования артефактов. Однако даже в таком случае участок делеции должен укладываться в устойчивую вторичную структуру, которая максимально сближает сайты для «прыжка». Тем не менее профиль распределения свободной энергии вдоль мРНК гибридного онкогена (см. [1], рис. 3) не относит экзон 12 к областям со сниженным значением энергии Гиббса. Генерация же 12del за счет Таq-полимеразы, а не обратной транскриптазы представляется крайне маловероятной. Такие артефакты описаны в литературе, однако, как и в случае с обратной транскрипцией, для «перепрыгивания» участка матрицы ферментом необходимы устойчивые вторичные структуры [6]. Анализ последовательности экзона 12 при помощи приложения *Two-state folding* веб-сервера *DINAMelt* [7] свидетельствует, что все шпилечные структуры в этой области разрушаются при температуре отжига праймеров +60 °C. Следовательно, хотя наша попытка верификации 12del с помощью ОТ-ПЦР оказалась неудачной, он не обладает признаками артефактов ПЦР или обратной транскрипции.

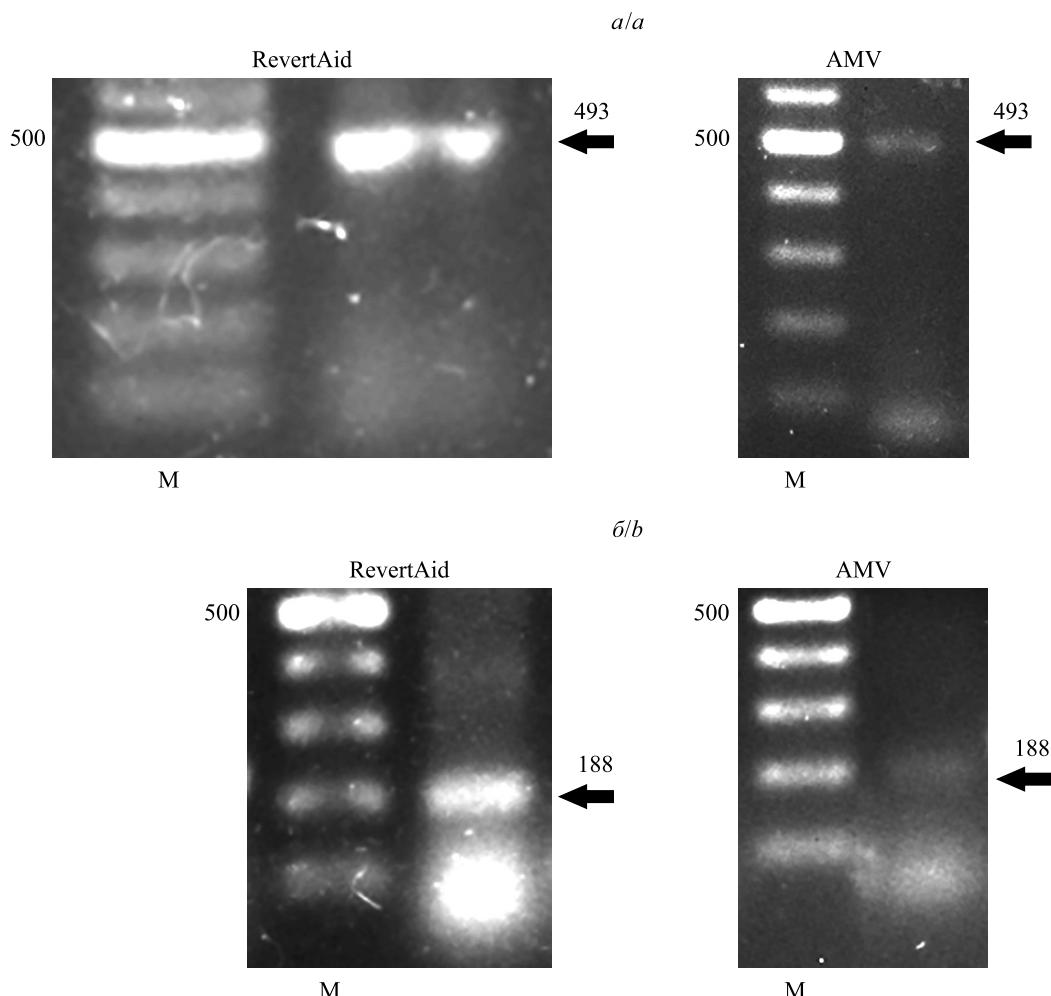


Рис. 1. Верификация экзон-экзонных стыков 17a17 (а) и PR07-4b (б) при помощи обратных транскриптаз различного происхождения. Целевые ампликоны выделены стрелками, размеры фрагментов ДНК указаны цифрами, дорожка с маркером молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США) обозначена буквой М

Fig. 1. Verification of exon-exon junctions 17a17 (a) and PR07-4b (b) by reverse transcriptases of various origin. Target amplicons marked by arrows, sizes of DNA fragments are indicated by numbers, lane with GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) marked by M

Также мы дополнительно верифицировали выводы, касающиеся альтернативного полиаденилирования мРНК гибридного онкогена. В оригинальной работе при помощи программы *KLEAT-2.0* [8] были проанализированы данные 3'-RACE, однако на полнотранскриптомных данных этот подход реализовать не удалось из-за отсутствия вычислительных мощностей. Чтобы обойти это ограничение, мы использовали менее ресурсоемкий программный инструмент *TAPAS* [9], работающий в альтернативной парадигме: он анализирует плотность покрытия чтениями 3'-концевых экзонов референсных мРНК, чтобы обнаружить его перепады на внутренних сайтах полиаденилирования. Помимо использованных в оригинальной работе трех библиотек RNA-Seq, созданных на основе транскриптома интактных клеток Kasumi-1, мы проанализировали пять независимых библиотек, сгенерированных на основе биологического материала пациентов с t(8;21)-положительной формой острого миелоидного лейкоза (GEO Accessions GSM1521606, GSM1521607, GSM1521608, GSM1521609, GSM1521610). Таким образом, всего было проанализировано восемь библиотек чтений RNA-Seq. Результаты нашего анализа представлены на рис. 2.

Сайты полиаденилирования, которые фиксирует *TAPAS*, хорошо согласуются с предсказаниями сборщика транскриптома *Cufflinks* (см. [1], раздел «Вклад альтернативных промоторов и сайтов полиаденилирования в разнообразие альтернативных транскриптов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*»). Так, сайты с координатами der8:91955045 и der8:91963506 для экзонов 17 и 17а соответственно фиксируются во всех образцах и в точности совпадают с концами длинных 3'-нетранслируемых областей (НТО), собранных *Cufflinks*. Для экзона 17 наблюдается сгущение уникальных (встречающихся лишь в одном

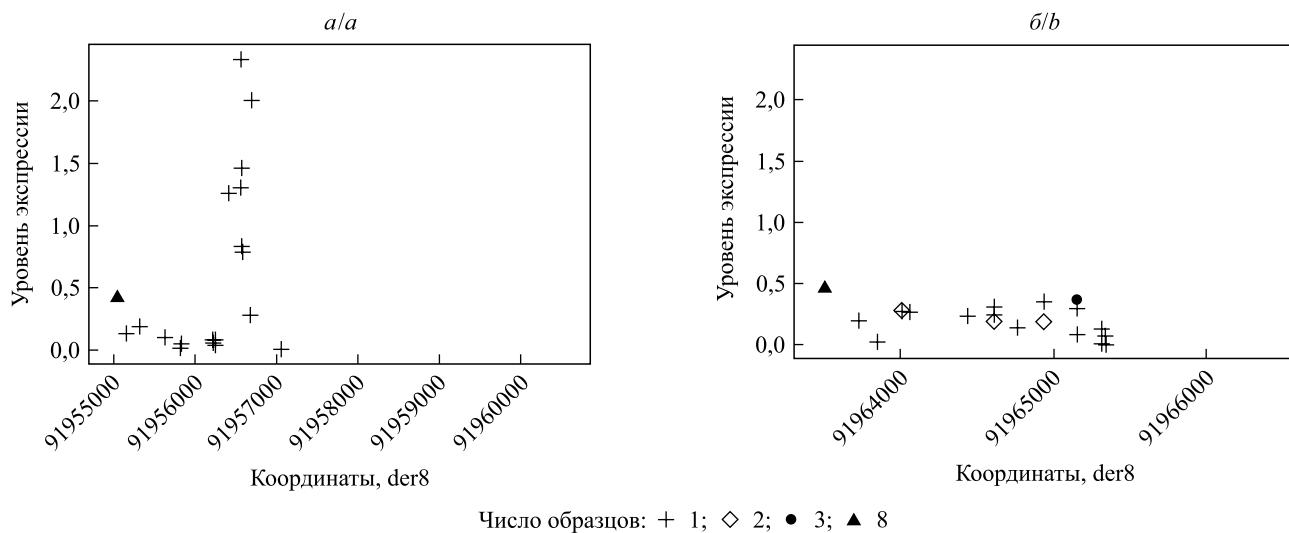


Рис. 2. Детекция сайтов альтернативного полиаденилирования экзонов 17 (а) и 17а (б) онкогена *RUNXI-RUNXIT1* в клетках t(8;21)-положительной формы острого миелоидного лейкоза при помощи *TAPAS*. Длина оси абсцисс соответствует длине экзона. Транскрипция происходит с минус-цепи, поэтому 3'-конец имеет меньшую координату. Легенда отображает количество образцов, в которых зафиксирован тот или иной сайт

Fig. 2. Detection of alternative polyadenylation sites in 17 (a) and 17a (b) exons of *RUNXI-RUNXIT1* oncogene in t(8;21)-positive leukemic cells by *TAPAS*. Horizontal axis length corresponds to exon length. Gene is transcribed from minus strand, so 3'-end has a smaller coordinate. The legend displays a number of samples that contains particular site of polyadenylation

образце) сайтов полиаденилирования в области der8:91956000–91957000, где локализованы 3'-концы предсказанных *Cufflinks* укороченных вариантов экзона 17. Для экзона 17а *TAPAS* также идентифицирует укороченную 3'-НТО с координатой сайта полиаденилирования der8:91965153. В целом эти результаты дополнительно подтверждают наличие у гибридного онкогена транскриптов как с длинными, так и с укороченными 3'-НТО различной длины и подкрепляют результаты, полученные при помощи *Cufflinks*. Тем не менее самые короткие 3'-концевые экзоны, обнаруженные *Cufflinks* и 3'-RACE, *TAPAS* не фиксирует. Это свидетельствует о том, что исчерпывающая каталогизация сайтов альтернативного полиаденилирования онкогена *RUNXI-RUNXIT1* пока остается нерешенной задачей и требует дополнительных усилий.

Подводя итог, можно заключить, что обнаруженные в оригинальном исследовании недостатки не оказывают существенного влияния на его выводы. Тем не менее правила научной этики требуют сообщить о них научной общественности. Авторы благодарят редакцию издания «Журнал Белорусского государственного университета. Биология» за такую возможность.

Библиографические ссылки

1. Ильюшёнок ИН, Мигас АА, Сухаревский АЮ, Шнайдер ОД, Гринев ВВ. Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена *RUNXI-RUNXIT1* человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;2:45–59. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-2-45-59.
2. Ishqi HM, Husain MA, Rehman SU, Sarwar T, Tabish M. Identification and expression of alternatively spliced novel isoforms of cancer associated MYD88 lacking death domain in mouse. *Molecular Biology Reports*. 2018;45(5):699–711. DOI: 10.1007/s11033-018-4209-5.
3. Houseley J, Tollervey D. Apparent non-canonical trans-splicing is generated by reverse transcriptase *in vitro*. *PLOS ONE* [Internet]. 2010 [cited 2020 April 20];5(8):e12271. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012271>. DOI: 10.1371/journal.pone.0012271.
4. Mader RM, Schmidt WM, Sedivy R, Rizovski B, Braun J, Kalipciyan M, et al. Reverse transcriptase template switching during reverse transcriptase – polymerase chain reaction: artificial generation of deletions in ribonucleotide reductase mRNA. *Translational Research. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2001;137(6):422–428. DOI: 10.1067/mlc.2001.115452.
5. Delviks KA, Pathak VK. Effect of distance between homologous sequences and 3' homology on the frequency of retroviral reverse transcriptase template switching. *Journal of Virology*. 1999;73(10):7923–7932. DOI: 10.1128/JVI.73.10.7923-7932.1999.
6. Cariello NF, Thilly WG, Swenberg JA, Skopek TR. Deletion mutagenesis during polymerase chain reaction: dependence on DNA polymerase. *Gene*. 1991;99(1):105–108. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90040-I.
7. Markham NR, Zuker M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(suppl_2): W577–W581. DOI: 10.1093/nar/gki591.

8. Birol I, Raymond A, Chiu R, Nip KM, Jackman SD, Kreitzman M, et al. KLEAT: cleavage site analysis of transcriptomes. In: Altman RB, Dunker AK, Hunter L, Ritchie MD, Murray T, Klein TE, editors. *Pacific symposium on biocomputing 2015; 4–8 January 2015; Kohala Coast, Hawaii, USA*. New Jersey: World Scientific; 2015. p. 347–358.
9. Arefeen A, Liu J, Xiao X, Jiang T. TAPAS: tool for alternative polyadenylation site analysis. *Bioinformatics*. 2018;34(15): 2521–2529. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty110.

References

1. Ilyushonak IM, Migas AA, Sukhareuski AY, Schneider AD, Grinev VV. The contribution of various mechanisms to mRNA diversity of human fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;2:45–59. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-2-45-59.
2. Ishqi HM, Husain MA, Rehman SU, Sarwar T, Tabish M. Identification and expression of alternatively spliced novel isoforms of cancer associated MYD88 lacking death domain in mouse. *Molecular Biology Reports*. 2018;45(5):699–711. DOI: 10.1007/s11033-018-4209-5.
3. Houseley J, Tollervey D. Apparent non-canonical trans-splicing is generated by reverse transcriptase *in vitro*. *PLOS ONE* [Internet]. 2010 [cited 2020 April 20];5(8):e12271. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012271>. DOI: 10.1371/journal.pone.0012271.
4. Mader RM, Schmidt WM, Sedivy R, Rizovski B, Braun J, Kalipciyan M, et al. Reverse transcriptase template switching during reverse transcriptase – polymerase chain reaction: artificial generation of deletions in ribonucleotide reductase mRNA. *Translational Research. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2001;137(6):422–428. DOI: 10.1067/mlc.2001.115452.
5. Delviks KA, Pathak VK. Effect of distance between homologous sequences and 3' homology on the frequency of retroviral reverse transcriptase template switching. *Journal of Virology*. 1999;73(10):7923–7932. DOI: 10.1128/JVI.73.10.7923-7932.1999.
6. Cariello NF, Thilly WG, Swenberg JA, Skopek TR. Deletion mutagenesis during polymerase chain reaction: dependence on DNA polymerase. *Gene*. 1991;99(1):105–108. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90040-I.
7. Markham NR, Zuker M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(suppl_2): W577–W581. DOI: 10.1093/nar/gki591.
8. Birol I, Raymond A, Chiu R, Nip KM, Jackman SD, Kreitzman M, et al. KLEAT: cleavage site analysis of transcriptomes. In: Altman RB, Dunker AK, Hunter L, Ritchie MD, Murray T, Klein TE, editors. *Pacific symposium on biocomputing 2015; 4–8 January 2015; Kohala Coast, Hawaii, USA*. New Jersey: World Scientific; 2015. p. 347–358.
9. Arefeen A, Liu J, Xiao X, Jiang T. TAPAS: tool for alternative polyadenylation site analysis. *Bioinformatics*. 2018;34(15): 2521–2529. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty110.

Статья поступила в редакцию 21.05.2020.
Received by editorial board 21.05.2020.