

УДК 577.214.5

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

И. Н. ИЛЮШЁНОК<sup>1)</sup>, Л. И. ПОЛХОВСКИЙ<sup>1)</sup>, В. В. ГРИНЕВ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>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<sup>a</sup>, L. I. POLKHOVSKY<sup>a</sup>, V. V. GRINEV<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci 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:

Илюшёнко 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 Илюшёнко** – ассистент кафедры генетики биологического факультета.  
**Лев Иванович Полховский** – студент биологического факультета. Научный руководитель – И. Н. Илюшёнко.  
**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](mailto:nov.ilyushonok@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-5377-366X>  
**Lev I. Polkhovsky**, student at the faculty of biology.  
[lev\\_polkhovsky@mail.ru](mailto:lev_polkhovsky@mail.ru)  
**Vasily V. Grinev**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.  
[grinev\\_vv@bsu.by](mailto:grinev_vv@bsu.by)

Ранее в издании «Журнал Белорусского государственного университета. Биология» (2019, № 2) была опубликована статья «Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразии 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, перекрывается 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 транскрипте 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 микрогомологии длиной 15 нуклеотидов равно 8. Можно предположить, что наличие участков с высокой степенью микрогомологии 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 Taq-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 шпильчатые структуры в этой области разрушаются при температуре отжига праймеров +60 °С. Следовательно, хотя наша попытка верификации 12del с помощью ОТ-ПЦР оказалась неудачной, он не обладает признаками артефактов ПЦР или обратной транскрипции.

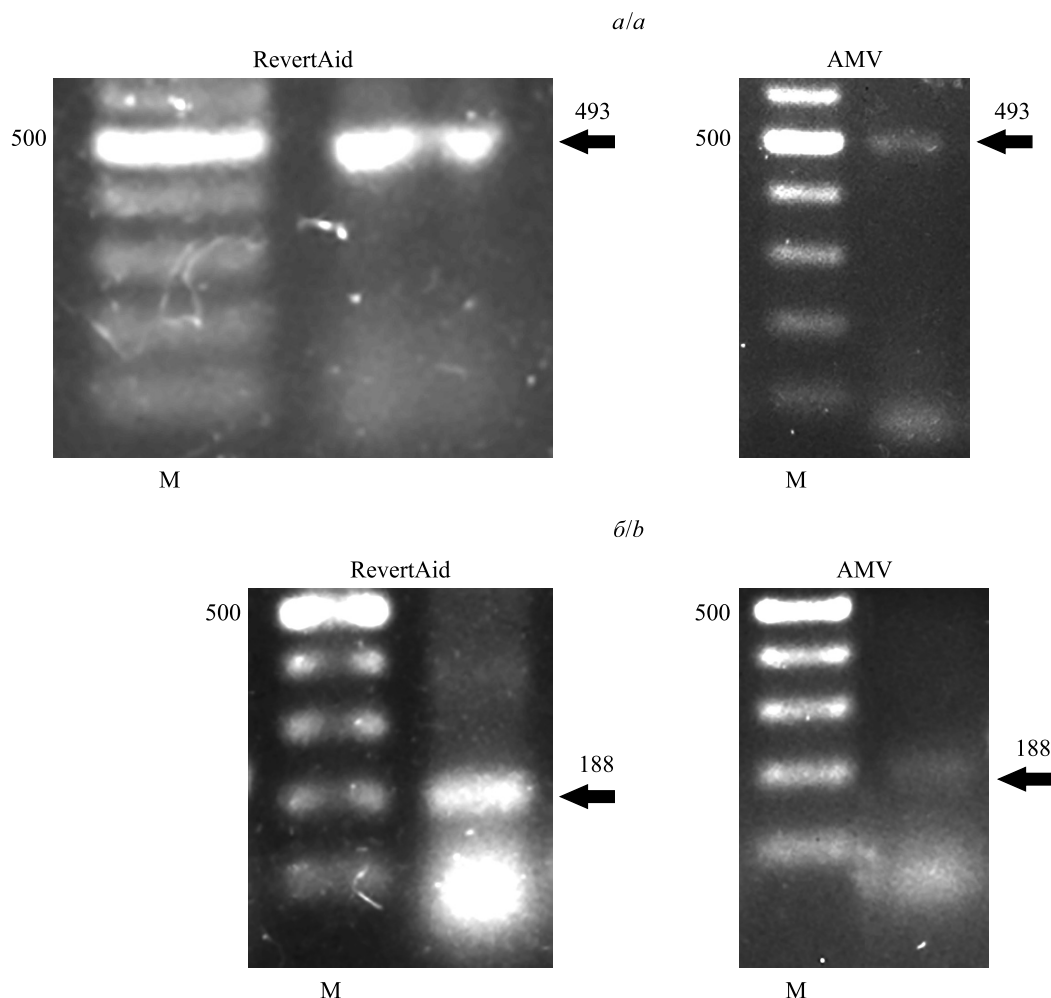


Рис. 1. Верификация экзон-экзонных стыков 17a17 (а) и PR07-4b (б) при помощи обратных транскриптаз различного происхождения. Целевые ампликоны выделены стрелками, размеры фрагментов ДНК указаны цифрами, дорожка с маркером молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США) обозначена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

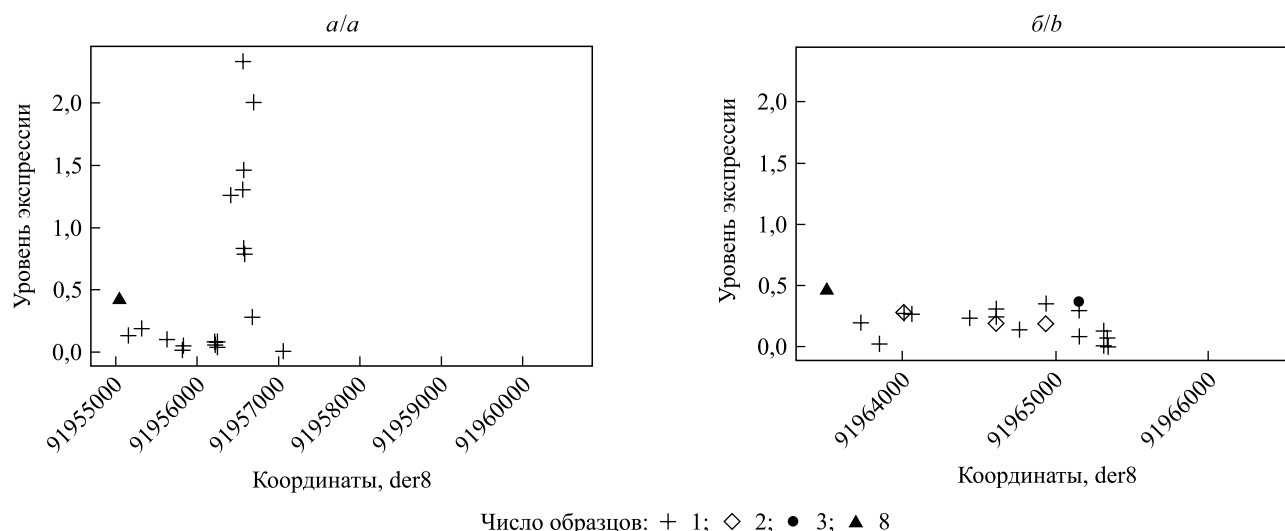


Рис. 2. Детекция сайтов альтернативного полиаденилирования экзонов 17 (а) и 17а (б) онкогена *RUNX1-RUNX1T1* в клетках t(8;21)-положительной формы острого миелоидного лейкоза при помощи *TAPAS*. Длина оси абсцисс соответствует длине экзона. Транскрипция происходит с минус-цепи, поэтому 3'-конец имеет 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 *RUNX1-RUNX1T1* 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 *RUNX1-RUNX1T1* 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. Ильюшёнко ИН, Мигас АА, Сухаревский АЮ, Шнайдер ОД, Гринев ВВ. Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* 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, Kalipcian 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.