

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *HOX* В ЛЕЙКОЗНЫХ ЛИНИЯХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ОНКОГЕН *E2A-PBX1*

Е.А. Шестакова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Анатольевна Шестакова elenaanshestakova@mail.ru

Введение. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) диагностируется в основном у детей и подростков (2/3 заболевших), что делает его одним из самых распространенных детских онкологических заболеваний. В развитии ОЛЛ участвуют онкогены, в частности продукт транслокации хромосом 1 и 19 онкоген *E2A-PBX1*, кодирующий химерный белок *E2A-PBX1*, являющийся сильным транскрипционным активатором, а также онкогены семейства *HOX*, в основном кластеры генов *HOXA* и *HOXB*. Химерный белок *E2A-PBX1* и белки *HOXA*, относящиеся к семейству белков, содержащих гомеодомен, образуют *in vivo* комплексы с факторами, эпигенетически регулирующими экспрессию генов и включающими в себя модифицирующие и ремоделирующие хроматин ферменты, что в значительной мере обуславливает их онкогенные свойства. В предыдущих исследованиях нами были получены данные о генетических взаимодействиях генов *E2A-PBX1* и *HOX*, участвующих в развитии лейкозов.

Цель исследования — подтвердить роль онкогена *E2A-PBX1* в активации экспрессии кластера генов *HOXA*, белковые продукты которых также обладают высоким онкогенным потенциалом.

Материалы и методы. В работе были использованы 4 лейкозные линии предшественников В-клеток (пре-В) человека: *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 и *NALM-6*. Для идентификации продукта транслокации хромосом 1 и 19 онкогена *E2A-PBX1* и его экспрессии использовали метод стандартной полимеразной цепной реакции. Для определения экспрессии 11 генов *HOX* кластера А (генов *HOXA*) применяли метод обратной транскрипции, сопряженной с количественной полимеразной цепной реакцией в реальном времени.

Результаты. Продemonстрировано, что онкоген *E2A-PBX1* содержится и экспрессируется в 3 исследованных лейкозных линиях пре-В-клеток человека (*RCH-ACV*, *KASUMI-2* и 697) и отсутствует в линии клеток *NALM-6*. Показано, что в клеточных линиях *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697, которые содержат в своем геноме онкоген *E2A-PBX1*, 7 из 11 генов кластера *HOXA* экспрессируются на высоком уровне. В отличие от этих 3 клеточных линий, экспрессирующих большинство генов кластера *HOXA*, в линии клеток *NALM-6*, не экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1*, используемой в качестве контроля, экспрессия генов *HOXA* не наблюдается, за исключением малой экспрессии 2 генов этого кластера.

Выводы. В данном исследовании продемонстрировано, что лейкозные линии пре-В-клеток человека *RCH-ACV*, *KASUMI-2* и 697, содержащие и экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, экспрессируют также большинство (7 из 11) генов *HOXA* на высоком уровне, в отличие от контрольной клеточной линии *NALM-6*, не содержащей онкогена *E2A-PBX1* и почти не экспрессирующей гены *HOXA*. Таким образом, полученные результаты предполагают участие сильного транскрипционного активатора — химерного белка *E2A-PBX1*, ассоциированного с факторами, модифицирующими и ремоделирующими хроматин, в активации экспрессии кластера генов *HOXA*, также имеющих высокий онкогенный потенциал.

Ключевые слова: онкоген *E2A-PBX1*, кластер генов *HOXA*, лейкозные клеточные линии *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 и *NALM-6*, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени, ассоциированная с обратной транскрипцией

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-89-95



HOX GENE EXPRESSION IN HUMAN B-CELL PROGENITOR LEUKEMIA CELL LINES EXPRESSING *E2A-PBX1* ONCOGENE

E.A. Shestakova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is diagnosed mainly in children (2/3 of diseases) making this type of leukemia one of the most common oncological diseases among children. Oncogenes are involved in the development of ALL, in particular the product of chromosomes 1 and 19 translocation, the oncogene *E2A-PBX1* that codes for *E2A-PBX1* chimeric oncoprotein with strong transcription activation properties as well as oncogenes of *HOX* family, mainly *HOXA* and *HOXB* cluster genes. *E2A-PBX1* chimeric oncoprotein and *HOXA* proteins are associated *in vivo* with factors participating in epigenetic regulation of gene expression such as chromatin modifying and remodeling enzymes that partially determines their oncogenic properties. In previous studies we obtained data indicating genetic interactions of *E2A-PBX1* and *HOX* genes participating in leukemia development.

The aim of this research was to confirm the role of *E2A – PBX1* oncogene in the activation of the expression of *HOXA* cluster genes coding for the proteins with high oncogenic potential.

Materials and methods. The objects of the study were four B cell progenitor (pre-B) leukemia cell lines: *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 and *NALM-6*. Standard polymerase chain reaction (PCR) was used for the identification of chromosome 1 and 19 translocation product, *E2A-PBX1* oncogene and its expression. Method of reverse transcription coupled with quantitative polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) was used for the analysis of 11 *HOXA* cluster genes expression.

Results. It is demonstrated that *E2A-PBX1* oncogene is present and expressed in three studied human pre-B leukemia cell lines, *RCH-ACV*, *KASUMI-2* and 697, while its expression is absent in *NALM-6* cell line. High expression of 7 from 11 *HOXA* cluster genes is revealed in *RCH-ACV*, *KASUMI-2* and 697 cell lines expressing *E2A-PBX1* oncogene, whereas *NALM-6* cell line, that does not express *E2A-PBX1* oncogene, also does not express *HOXA* genes except low expression of two genes from this cluster.

Conclusions. The data obtained in this study demonstrate that *RCH-ACV*, *KASUMI-2* and 697 human leukemia pre-B cell lines, containing and expressing *E2A-PBX1* oncogene, also express most of *HOXA* genes (7 genes of 11 genes) at high level in contrast to control *NALM-6* cell line that does not comprise *E2A-PBX1* oncogene and almost does not express *HOXA* genes. Therefore, the results of this study suggest the participation of strong transcriptional activator, chimeric oncoprotein *E2A-PBX1*, associated with chromatin modifying and remodeling enzymes, in the expression activation of *HOXA* cluster genes that also possess high oncogenic potential.

Key words: *E2A-PBX1* oncogene, *HOXA* gene cluster, *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 and *NALM-6* leukemia cell lines, reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction

Введение

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) диагностируется в основном у детей и подростков (2/3 заболевших), что делает его одним из самых распространенных детских онкологических заболеваний. ОЛЛ характеризуется накоплением раковых предшественников лимфоидных клеток В- и Т-линий в костном мозге и крови. Генетические изменения в этих незрелых лимфоидных клетках нарушают их способность к самовозобновлению и вызывают остановку в дифференциации, что приводит к их злокачественной трансформации. В развитии ОЛЛ участвуют онкогены, являющиеся продуктами транслокации хромосом, в частности продукт транслокации хромосом 1 и 19 (t (1;19)) *E2A-PBX1*, кодирующий химерный белок *E2A-PBX1*, а также *BCR-ABL*, *TEL-AML1* [1, 2]. Большую роль в развитии ОЛЛ играют и онкогены семейства *HOX*, в основном кластеры генов *HOXA*, *HOXB*, и в меньшей степени – *HOXC* и *HOXD* [3, 4], сверхэкспрессия которых приводит к нарушению регуляции экспрессии генов, участвующих в гематопоезе, и в результате – к развитию лейкозов.

Транслокация между хромосомами 1 и 19 приводит к образованию онкогена *E2A-PBX1*. Это сильный онкоген, обуславливающий 25 % детских пре-В-клеточных ОЛЛ [2]. Следует отметить, что помимо индукции лейкозов химерный белок *E2A-PBX1* имеет свойство трансформировать несколько видов клеток, среди которых – фибробласты, лимфоидные и миелоидные клетки. На N-конце химерного белка *E2A-PBX1* находятся 2 домена активации (activation domain, AD), происходящие из фактора транскрипции *E2A*, а на C-конце – кооперативный домен *HOX* (Hox cooperative domain, HCD) и ДНК-связывающий гомеодомен фактора транскрипции *PBX* [2]. Свойства сильного конститутивного транскрипционного ак-

тиватора *E2A-PBX1* обусловлены наличием в его составе этих 3 доменов, и в особенности AD, взаимодействующего с гистонацетилтрансферазами *SAGA* и *CBP/p300* [5, 6].

Белки *HOX* играют важную роль в эмбриональном развитии, а во взрослом организме – в кроветворении. Белки *HOX* кодируются 39 *HOX*-генами, представленными 4 кластерами генов-паралогов: *HOXA*, *HOXB*, *HOXC*, *HOXD*. Белки *HOX* – это факторы транскрипции, гомеодомен которых связывается с ДНК. Экспрессия генов *HOX* эпигенетически регулируется комплексами группы Polycomb и лейкоза смешанных линий (Mixed Lineage Leukemia (MLL)). С использованием клеток костного мозга в культуре и мышинных моделей было показано, что гены *HOXA* (кроме *HOXA2* и *HOXA5*) способны трансформировать клетки и индуцировать лейкоз соответственно [3, 4]. Гены *HOXA* также имеют свойство активировать ряд протоонкогенов, включая *Erg*, *Flt3*, *Lmo2*, *Myb* и *Sox4* [7]. Таким образом, в приведенных исследованиях было подтверждено, что гены *HOXA* имеют онкогенный потенциал.

В предыдущих исследованиях с использованием мышинных моделей мы получили данные о генетических взаимодействиях онкогенов *E2A-PBX1* и *HOX*, участвующих в развитии В- и Т-клеточных лейкозов [8–13]. Химерные мыши, экспрессирующие в крови 2 онкогена *E2A-PBX1* и *HOXA9*, развивали лейкоз в 2 раза быстрее по сравнению с мышами, экспрессирующими только онкоген *E2A-PBX1* [9–12]. В продолжение данных исследований с использованием метода тандемной аффинной очистки мы получили из клеток HeLa и 697 нативные комплексы, содержащие, соответственно, *HOXA9* или *E2A-PBX1* с ковалентно связанными FLAG/HA-пептидами, и показали присутствие в каждом из выделенных комплексов ряда взаимодействующих белков, многие из которых также

обладали онкогенным потенциалом [12, 14]. В обоих комплексах содержались факторы, участвующие в эпигенетической регуляции экспрессии генов. В частности, комплекс HOXA9 содержал ферменты, эпигенетически модифицирующие хроматин: аргинин-N-метилтрансферазу-5 (Protein R methyl-transferase 5, PRMT5), E3-убиквитинлигазу (UBR5), а комплекс E2A-PBX1 — несколько факторов ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF (SMARCA4 и SMARCC2). Интересно отметить, что, с одной стороны, в комплексе, содержащем HOXA9, не был идентифицирован E2A-PBX1, с другой стороны, в комплексе, содержащем E2A-PBX1, не был идентифицирован HOXA9. Эти данные свидетельствуют о том, что HOXA9 и E2A-PBX1 взаимодействуют с большей вероятностью не на уровне белок — белковых взаимодействий, а на уровне белок — ген. Идентификация факторов ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF, SMARCA4 и SMARCC2, в комплексе, содержащем E2A-PBX1, в дополнение к уже известной ассоциации с E2A-PBX1 гистонацетилтрансферазы CBP/p300, еще раз указывает на то, что химерный белок E2A-PBX1 является сильным транскрипционным активатором и, скорее всего, участвует в активации экспрессии гена *HOXA9*. Для подтверждения этой гипотезы мы изучили экспрессию всех генов кластера *HOXA* в 4 лейкозных линиях предшественников В-клеток (пре-В) человека: RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6. Оказалось, что 3 лейкозные клеточные линии — RCH-ACV, KASUMI-2 и 697, содержащие и экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, экспрессируют 7 из 11 генов *HOXA* на высоком уровне, в отличие от контрольной клеточной линии NALM-6, не содержащей гена *E2A-PBX1* и не экспрессирующей генов *HOXA*.

Цель исследования — подтверждение роли онкогена *E2A-PBX1* в активации экспрессии кластера генов *HOXA*, белковые продукты которых также обладают высоким онкогенным потенциалом.

Материалы и методы

Культуры клеток

В работе были использованы 4 лейкозные линии пре-В-клеток человека: RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6 [15–17].

Культивирование линии лейкозных пре-В-клеток человека 697 проводили в среде Opti-MEM (Gibco, США), содержащей 10 нг/мл интерлейкина-7, 10 % эмбриональной сыворотки телят (которая была протестирована для использования в среде для В-клеток, Stem Cell Technologies, Канада), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола, L-глутамин и пенициллин/стрептомицин.

Линии лейкозных пре-В-клеток человека RCH-ACV и KASUMI-2 культивировали в среде RPMI, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (тести-

рованной для В-клеток), L-глутамин, пенициллин/стрептомицин.

Линию лейкозных пре-В-клеток человека NALM-6 культивировали в среде RPMI, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки телят (тестированной для В-клеток), L-глутамин, пенициллин/стрептомицин.

Метод стандартной полимеразной цепной реакции

Стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) использовали для анализа наличия/отсутствия в исследуемых клеточных линиях (RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6) транслокации хромосом 1 и 19, приводящей к образованию онкогена *E2A-PBX1*, а также для анализа экспрессии указанного онкогена.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием комплементарной ДНК (кДНК), полученной реакцией обратной транскрипции (ОТ) с РНК, выделенной из 4 исследуемых линий с использованием реагента Trizol (Invitrogen). Для выделения РНК с помощью Trizol использовали в среднем 3×10^6 – 10^7 клеток каждой из 4 линий.

Для синтеза кДНК использовали следующие реагенты и условия.

4 мкг РНК обрабатывали ДНКазой I в течение 15 мин при комнатной температуре в реакционной смеси общего объема 10 мкл, содержащей 8 мкл раствора РНК, 1 мкл 10-кратного буфера для ДНКазы I, 1 мкл ДНКазы I. Далее добавляли 1 мкл 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и инактивировали ДНКазу I при высокой температуре (65 °С) в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали при 4 °С, перемешивали на вортексе и добавляли 10 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции, содержащей 4 мкл 5-кратного буфера для 1-й нити ДНК (First-Strand-Buffer), 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл смеси праймеров (в концентрации 200 мМ), 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, deoxynucleotide triphosphates, dNTP) в концентрации 10 мМ, 1 мкл обратной транскриптазы мышиного вируса лейкоза Малонея (Mouse Maloney Leukemia Virus reverse transcriptase, M-MLV RT). Далее реакционную смесь общим объемом 20 мкл нагревали при 37 °С в течение 90 мин, затем при 70 °С в течение 15 мин и охлаждали при 4 °С. кДНК, полученную в результате реакции ОТ, хранили при –80 °С до использования для ПЦР.

Далее для ПЦР использовали олигонуклеотиды-праймеры E2A-PBX1 прямой: GCACAACCACGCGGCCC и E2A-PBX1 обратный: CCACGCCTTCGCTAA. Реакционная смесь в общем объеме 50 мкл содержала 5 мкл 10-кратного буфера для полимеразы Taq (Taq polymerase), 3 мкл 25 мМ раствора $MgCl_2$ (конечная концентрация в реакционной смеси 1,5 мМ), 0,4 мкл смеси 4 дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), каждый в концентрации 25 мМ (конечная концентрация каждого из нуклеотидов

в реакционной смеси 200 мкМ), 1 мкл раствора кДНК, 2 мкл прямого и 2 мкл обратного праймера, 0,5 мкл полимеразы Taq (Sigma) и 36,1 мкл H₂O.

Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: 1 цикл при 94 °С в течение 1 мин, 30 циклов при 94 °С в течение 30 с, далее при 60 °С в течение 30 с и затем при 72 °С в течение 1 мин 30 с; 1 цикл при 72 °С в течение 10 мин и охлаждали при 4 °С.

Продукты стандартной ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле, который окрашивали бромидом этидия. В результате ПЦР синтезировался фрагмент размером 161 пара оснований, соответствующий области транслокации хромосом 1 и 19 и онкогену *E2A-PBX1*, а также мРНК *E2A-PBX1*. В качестве маркеров длин фрагментов ДНК использовали рКС.

Метод обратной транскрипции, сопряженной с количественной полимеразной цепной реакцией в реальном времени

РНК выделяли из культивируемых клеток с использованием реагента Trizol (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Для синтеза кДНК с РНК использовали те же реагенты и условия, которые описаны в предыдущей части статьи.

В качестве праймеров для количественной ПЦР в реальном времени использовали следующие олигонуклеотиды:

HOXA1 прямой: ACAGAACTTCAGTGC GCC; HOXA1 обратный: GGGAGCGACAGGCTTCTT; HOXA2 прямой: CACAAGAATCCCTGGAA; HOXA2 обратный: AAATGAAATCTTTTCCCA; HOXA3 прямой: CCTGGATGAAAGAGTCTC; HOXA3 обратный: GCCAGCGCAGCTTTCG; HOXA4 прямой: TGGTGTA-CCCCTGGATGA; HOXA4 обратный: CTTAGGC-TCCCCTCCGTT; HOXA5 прямой: TCCCATCGCTTCC-CTACC; HOXA5 обратный: GCTTTGGAACAGCCTACA; HOXA6 прямой: AGTACACGAGCCCGGTTT; HOXA6 обратный: CCCATGGCTCCCATACAC; HOXA7 прямой: AGCTTGGAATTTCTGCTC; HOXA7 обратный: TCTGATGTCATGGCCAAA; HOXA9 прямой: GCCG-GCCTTATGGCATTA; HOXA9 обратный: CAGGGA-CAAAGTGTGAGT; HOXA10 прямой: AAAGCCTCGCCG-GAGAA; HOXA10 обратный: CTCCAGTGTCTGGTGCTT; HOXA11 прямой: TTGAGCATGCGGGACAGT; HOXA11 обратный: GTACCAGATCCGAGAGCT; HOXA13 прямой: TGCCCAACGGCTGGAA; HOXA13 обратный: TAAGGCACGCGCTTCTTT.

В качестве контрольных олигонуклеотидов использовали праймеры к актину и к глицеральдегид-фосфатдегидрогеназе (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase).

Реакцию количественной ПЦР в реальном времени проводили в объеме 15 мкл. Реакционная смесь содержала 7,5 мкл буферного раствора с Syber Green; 1 мкл кДНК; 5,5 мкл H₂O и 1 мкл смеси прямого

и обратного праймеров в концентрации 15 мкМ (конечная концентрация в 15 мкл — 1 мкМ).

Для реакции количественной ПЦР в реальном времени использовали прибор Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System и следующие условия реакции: 1 цикл при 50 °С в течение 2 мин; 1 цикл при 95 °С в течение 10 мин (денатурация); 40 циклов при 95 °С в течение 15 с и затем при 60 °С в течение 1 мин (полимеризация); 1 цикл при 95 °С в течение 15 с, при 60 °С в течение 20 с, при 95 °С в течение 15 с, при 60 °С в течение 15 с (диссоциация).

Для анализа результатов количественной ПЦР в реальном времени использовали программу SDS (Applied Biosystems Real-Time PCR system SDS software).

Результаты

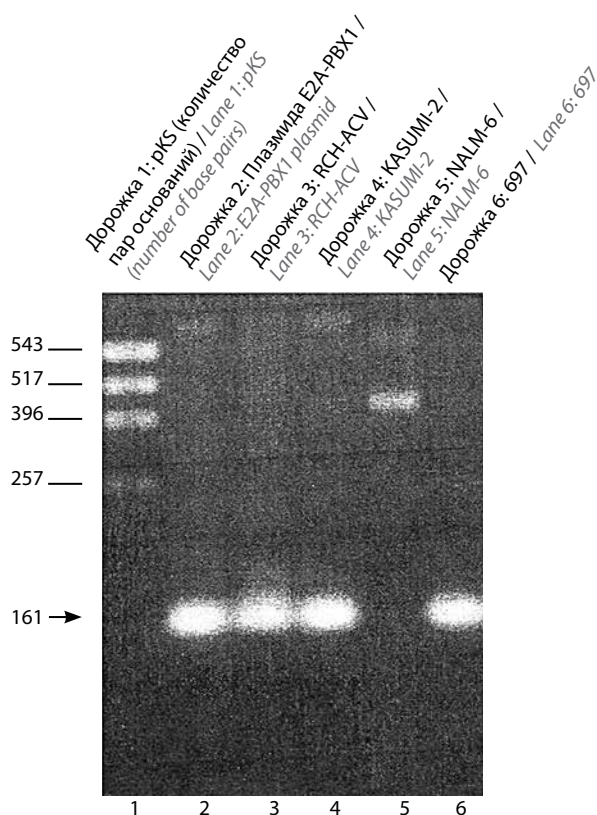
Присутствие и экспрессия онкогена *E2A-PBX1* в линиях клеток RCH-ACV, KASUMI-2 и 697 и отсутствие в линии клеток NALM-6

В начале представленного исследования мы проанализировали 4 лейкозные линии пре-В-клеток человека (RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6) на наличие в них транслокации хромосом 1 и 19 и, следовательно, онкогена *E2A-PBX1*. В этой части исследования мы использовали стандартную ПЦР с праймерами *E2A-PBX1* прямой и *E2A-PBX1* обратный, приводящими к синтезу фрагмента ДНК размером 161 пара оснований, соответствующего области транслокации хромосом 1 и 19 и, следовательно, онкогену *E2A-PBX1*, а также мРНК *E2A-PBX1*.

На рисунке представлены результаты стандартной ПЦР, проведенной с использованием праймеров *E2A-PBX1* и кДНК, синтезированной с РНК, выделенной из 4 лейкозных линий пре-В-клеток человека: RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6. Показано, что после выделения РНК из клеточных линий RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и последующего синтеза кДНК размер фрагмента ДНК составляет 161 пару оснований. Такой же фрагмент синтезируется с плазмиды, содержащей онкоген *E2A-PBX1*. В отличие от результатов ПЦР, полученных с линиями клеток RCH-ACV, KASUMI-2 и 697, с кДНК, полученной из РНК, выделенной из клеточной линии NALM-6, не наблюдается синтеза фрагмента ДНК размером 161 пара оснований. Таким образом, в 3 линиях клеток RCH-ACV, KASUMI-2 и 697 имеется и экспрессируется онкоген *E2A-PBX1*, в то время как в линии клеток NALM-6 этот онкоген не присутствует.

Высокая экспрессия генов *HOXA* в лейкозных линиях пре-В-клеток человека RCH-ACV, KASUMI-2, 697, экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1*

С учетом определения статуса онкогена *E2A-PBX1* в 4 лейкозных линиях пре-В-клеток человека RCH-ACV,



Онкоген *E2A-PBX1* содержится в геноме и экспрессируется в лейкозных пре-В-клеточных линиях человека RCH-ACV, KASUMI-2 и 697 и отсутствует в линии клеток NALM-6. 2 % агарозный гель, окрашенный бромидом этидия, с фрагментами ДНК, полученными в результате стандартной ПЦР. Фрагмент ДНК размером 161 пара оснований, полученный в результате ПЦР, соответствует онкогену *E2A-PBX1*.

E2A-PBX1 oncogene is contained in the genome and is expressed in pre-B cell leukemia lines RCH-ACV, KASUMI-2 and 697 and is absent in NALM-6 cell line. 2 % agarose gel stained with ethidium bromide and containing DNA fragments obtained in standard PCR is presented on the figure. 161 bp fragment obtained in PCR corresponds to *E2A-PBX1* oncogene.

KASUMI-2, 697 и NALM-6 был проведен анализ экспрессии всех 11 генов *HOXA* в 3 лейкозных линиях пре-В-клеток человека, содержащих и экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1* (*E2A-PBX1*⁺) (RCH-ACV, KASUMI-2 и 697), и в контрольной линии (NALM-6), в которой отсутствует онкоген *E2A-PBX1* (*E2A-PBX1*⁻). Для анализа экспрессии генов *HOXA* был применен метод количественной ПЦР в реальном времени с использованием в качестве I стадии обратной транскрипции (см. таблицу). Все линии, экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, также экспрессировали большинство генов *HOXA*, но уровни экспрессии индивидуальных генов были очень различными. Самый высокий уровень экспрессии наблюдался у гена *HOXA7* (20 897 транскриптов на 50 нг РНК). Экспрессия этого гена наблюдалась на самом высоком уровне в клеточных линиях KASUMI-2 и 697, а также, хотя и в немного меньших количествах, в клеточной линии RCH-ACV. Следующим по уровню высокой экс-

Экспрессия генов *HOXA* в лейкозных линиях пре-В клеток человека
HOXA gene expression in human pre-B leukemia cell lines

Гены <i>HOXA</i> <i>HOXA</i> genes	Линии клеток <i>E2A-PBX1</i> ⁺ <i>E2A-PBX1</i> ⁺ cell lines			Линия клеток <i>E2A-PBX1</i> ⁻ <i>E2A-PBX1</i> ⁻ cell line
	RCH-ACV	KASUMI-2	697	NALM-6
<i>HOXA1</i>	20	20	20	20
<i>HOXA2</i>	72	20	20	20
<i>HOXA3</i>	232	461	136	20
<i>HOXA4</i>	20	20	20	20
<i>HOXA5</i>	34	53	20	20
<i>HOXA6</i>	1059	1844	203	20
<i>HOXA7</i>	7404	14224	20897	4804
<i>HOXA9</i>	20	20	20	20
<i>HOXA10</i>	20	20	20	20
<i>HOXA11</i>	20	28	37	33
<i>HOXA13</i>	20	20	216	23

Примечание. Цифрами представлены количества транскриптов соответствующих генов *HOXA* на 50 нг РНК.
Note: Numbers indicate *HOXA* gene transcript quantities per 50 ng of RNA

Низкая —————> Высокая экспрессия генов (копии)
Low —————> High gene expression (copies)

прессии в 3 исследованных лейкозных линиях клеток *E2A-PBX1*⁺ был идентифицирован ген *HOXA6* (1844 транскрипта на 50 нг РНК). Ген *HOXA3* также экспрессировался на высоком уровне в этих 3 линиях клеток (461 транскрипт на 50 нг РНК), хотя и в немного меньшей степени, чем гены *HOXA7* и *HOXA6*.

Другие гены *HOX* кластера А не экспрессировались в этих клеточных линиях или экспрессировались в отдельных клеточных линиях на низком уровне. Так, ген *HOXA2* немного экспрессировался в клеточной линии RCH-ACV и не экспрессировался в клеточных линиях KASUMI-2 и 697. Напротив, гены *HOXA11* и *HOXA13* экспрессировались в небольшом количестве в клеточной линии 697 и не экспрессировались в клеточных линиях RCH-ACV и KASUMI-2. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что 3 лейкозные линии пре-В-клеток человека, содержащие онкоген *E2A-PBX1* (RCH-ACV, KASUMI-2 и 697), экспрессируют 7 из 11 генов *HOXA*, т. е. большинство генов кластера *HOXA*.

Экспрессия генов *HOXA* в контрольной линии NALM-6, в которых отсутствовал онкоген *E2A-PBX1* (*E2A-PBX1*⁻), не наблюдалась или была на низком уровне. В этой линии клеток была отмечена экспрессия

гена *HOXA7*, а также очень небольшая экспрессия гена *HOXA11* (см. таблицу).

Интересно отметить, что в мышиных моделях наибольший онкогенный потенциал наблюдался в химерных мышах, трансплантированных В-клетками, экспрессирующими онкогены *E2A-PBX1* и *Hoxa9* [9–12]. Ни в одной из исследованных нами лейкозных линий пре-В-клеток человека, содержащих и экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1* (RCH-ACV, KASUMI-2 и 697), не наблюдалось экспрессии онкогена *HOXA9*. Полученные результаты можно объяснить различиями В-клеточных лейкозов у мышей и у человека, а также возможными изменениями экспрессии генов при переводе первичных опухолевых клеток в культивируемые клеточные линии [18].

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что химерный онкобелок E2A-PBX1 в комплексе с гистонацетилтрансферазой CBP/p300 и факторами ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF (SMARCA4 и SMARCC2) играет роль силь-

ного транскрипционного активатора, участвующего в повышении экспрессии генов *HOXA*, белковые продукты которых обладают мощными канцерогенными свойствами.

Выводы

В данном исследовании продемонстрировано, что 3 лейкозные клеточные линии RCH-ACV, KASUMI-2 и 697, содержащие и экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, экспрессируют большинство (7 из 11) генов *HOXA* на высоком уровне, в отличие от контрольной клеточной линии NALM-6, не содержащей онкогена *E2A-PBX1* и почти не экспрессирующей гены *HOXA*. Таким образом, полученные результаты предполагают участие сильного транскрипционного активатора, химерного белка E2A-PBX1, ассоциированного с факторами, модифицирующими и ремоделирующими хроматин, в повышении экспрессии кластера генов *HOXA*, также имеющих высокий онкогенный потенциал, что в целом усиливает развитие лейкоза.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Korsmeyer S.J. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol* 1992;10:785–807. DOI: 10.1146/annurev.ij.10.040192.004033.
- Aspland S.E., Bendall H.H., Murre C. The role of *E2A-PBX1* in leukemogenesis. *Oncogene* 2001;20(40):5708–17. DOI: 10.1038/sj.onc.1204592.
- Bach C., Buhl S., Mueller D. et al. Leukemogenic transformation by *HOXA* cluster genes. *Blood* 2010;115(14):2910–8. DOI: 10.1182/blood-2009-04-216606.
- Kroon E., Kros J., Thorsteinsdottir U. et al. *HOXA9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *EMBO J* 1998;17(13):3714–25. DOI: 10.1093/emboj/17.13.3714.
- Massari M.E., Grant P.A., Pray-Grant M.G. et al. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell* 1999;4(1):63–73. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80188-4.
- Bayly R., Chuen L., Currie R.A. et al. *E2A-PBX1* interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2004;279(53):55362–71. DOI: 10.1074/jbc.M408654200.
- Huang Y., Sitwala K., Bronstein J. et al. Identification and characterization of *Hoxa9* binding sites in hematopoietic cells. *Blood* 2012;119(2):388–98. DOI: 10.1182/blood-2011-03-341081.
- Bijl J., Sauvageau M., Thompson A. et al. High incidence of proviral integrations in the *HOXA* locus in a new model of *E2A-PBX1*-induced B-cell leukemia. *Genes Dev* 2005;19(2):224–33. DOI: 10.1101/gad.1268505.
- Hassawi M., Shestakova E.A., Fournier M. et al. *Hoxa9* collaborates with *E2A-PBX1* in mouse B cell leukemia in association with *Flt3* activation and decrease of B cell gene expression. *Dev Dyn* 2014;243(1):145–58. DOI: 10.1002/dvdy.24056.
- Shestakova E.A., Hassawi M., Fournier M. et al. Analysis of *E2A-PBX1* and *HOXA* collaboration in leukemia. 17th Annual Research Conference of HMR Research Center of the University of Montreal. 2010. Montreal, Canada. Abstract book. P. 28. Abstract 28.
- Shestakova E., Hassawi M., Fournier M. et al. Analysis of *E2A-PBX1* and *HOXA* collaboration in leukemia using *ex vivo* B cell culture and mouse models. 18th Annual Research Conference of HMR Research Center of the University of Montreal. 2011. Montreal, Canada. Abstract book. P. 55. Abstract 55.
- Shestakova E.A., Hassawi M., Fournier M. et al. Identification of new *E2A-PBX1* interacting proteins and analysis of *E2A-PBX1* and *HOXA* collaboration in leukemia. 5th Annual Canadian Cancer Immune Therapy Symposium. 2012. Montreal, Canada. Abstract book. P. 6. Abstract 6.
- Bijl J., Kros J., Lebert-Ghali C.E. et al. Evidence for *HOX* and *E2A-PBX1* collaboration in mouse T-cell leukemia. *Oncogene* 2008;27(49):6356–64. DOI: 10.1038/onc.2008.233.
- Шестакова Е.А., Boutin M., Bourassa S. и др. Идентификация белков, ассоциированных с факторами транскрипции *HOXA9* и *E2A-PBX1*, методом тандемной аффинной очистки. *Молекулярная биология* 2017;51(3):490–501. DOI: 10.7868/S0026898417030132. [Shestakova E.A., Boutin M., Bourassa S. et al. Identification of proteins associated with transcription factors *HOXA9* and *E2A-PBX1* by tandem affinity purification. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2017;51(3):432–44. (In English)].
- Kim D.H., Moldwin R.L., Vignon C. et al. *TEL-AML1* translocations with *TEL* and *CDKN2* inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 1996;88(3):785–94.
- Findley H.W.Jr., Cooper M.D., Kim T.H. et al. Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood* 1982;60(6):1305–9.
- Hurwitz R., Hozier J., LeBien T. et al. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 1979;23(2):174–80. DOI: 10.1002/ijc.2910230206.

18. Богуш Т.А., Калюжный С.А.,
Четыркина М.Р. и др. Экспрессия
виментина в культурах клеток
эпителиальных опухолей человека.

Успехи молекулярной онкологии
2018;5(2):24–30. DOI: 10.17650/2313-
805X-2018-5-2-24-30. [Bogush T.A.,
Kaliuzhny S.A., Chetyrkina M.R. et al.

Vimentin expression in human cell lines
of epithelial tumors. Uspehi Molekulâr-
noj Onkologii = Advances in Molecular
Oncology 2018;5(2):24–30. (In Russ.)].

Благодарность. Автор выражает благодарность профессору Жаннетте Байл за финансирование и общее руководство данным исследованием, выполненным в Научно-исследовательском центре Университета Монреаля (Монреаль, Канада).

Acknowledgment. The author is very grateful to Professor Jannetta J. Bijl for financial support and general guidance during this study performed at the Research Center of Montreal University (Montreal, Canada).

ORCID автора/ORCID of author

Е.А. Шестакова/E.A. Shestakova: <https://orcid.org/0000-0002-0158-4605>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Представленное исследование поддержано грантом Канадского общества исследований в области лейкозов и лимфом и грантом № 20399 Национального онкологического общества Канады, выданными профессору Жаннетте Байл.

Financing. This study was supported by grants from Leukemia and Lymphoma Society of Canada and National Cancer Institute of Canada (grant №20399) issued to Professor Jannetta J. Bijl.

Статья поступила: 16.10.2018. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 16.10.2018. Accepted for publication: 19.12.2019.