

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-273

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ
НОВОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК CHOL, АССОЦИИРОВАННОЙ С ХОЛАНГИОКАРЦИНОМОЙ****IDENTIFICATION AND COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT ISOFORMS
OF A NOVEL NON-CODING RNA CHOL ASSOCIATED WITH CHOLANGIOCARCINOMA**

А. Д. Смыслов¹, Р. К. Макаrenchенко², В. А. Родин², Н. Л. Лазаревич^{2,3},
М. Э. Зверева², М. П. Рубцова², О. А. Донцова^{1,2}, О. Ю. Буренина^{1,2}

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

³Институт канцерогенеза, Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

A. D. Smyslov¹, R. K. Makarchenko², V. A. Rodin², N. L. Lazarevich^{2,3},
M. E. Zvereva², M. P. Rubtsova², O. A. Dontsova^{1,2}, O. Yu. Burenina^{1,2}

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

²Lomonosov Moscow State University

³Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow

✉ akim.infinity@gmail.com

Аннотация

CHOL — недавно обнаруженная нами некодирующая РНК, активно экспрессирующийся в холангиокарциноме и неоднозначно аннотированная в геноме человека. В ходе экспериментального исследования мы обнаружили целый спектр транскриптов — продуктов альтернативного сплайсинга, содержащих разнообразные варианты первого экзона. Мы предполагаем, что по крайней мере часть изоформ ассоциированы с прогрессирующей стадией рака печени.

Abstract

CHOL is a recently discovered non-coding RNA that is highly expressed in cholangiocarcinoma and is ambiguously annotated in the human genome. During the experimental study, we discovered a whole range of transcripts — products of alternative splicing, containing numerous variants of the first exon. We suggest that at least some isoforms are associated with advanced liver cancer.

Холангиокарцинома (ХЦР) — второй по распространенности тип рака печени, протекающий бессимптомно на ранних стадиях заболевания. На сегодняшний день не существует диагностических биомаркеров, специфических для ХЦР и/или дифференцирующих ХЦР от гепатоцеллюлярной карциномы в случае неоднозначной гистологии опухоли. Одним из перспективных направлений является поиск некодирующих РНК (нкРНК), ассоциированных с определенным типом опухолей, так как их можно выделять непосредственно из биологических жидкостей или биоптата и оценивать уровень экспрессии с помощью ОТ-кПЦР.

Недавно в нашей научной группе была идентифицирована нкРНК CHOL, активно экспрессирующаяся при ХЦР. Для гена CHOL был аннотирован 1 транскрипт длиной 235 н. о. из 3 экзонов, что мы подтвердили экспериментально как на раковых клеточных линиях гепатоцитов (HepG2, Huh7), так и на образцах рака печени. Сравнительный количественный анализ экспрессии экзонов выявил несоответствия, что говорило о наличии нескольких изоформ CHOL разного состава. Кроме того, в обновленной версии ENCODE реаннотация транскриптов привела к объединению гена CHOL и 18 транскриптов соседнего гена, причем часть транскриптов имела экстремально протяженные интроны (20–30000 н. о.) и общая длина гена составляла 70 000 п. н.

Таким образом, целью данного исследования стало установление конкретных транскриптов CHOL РНК. В качестве модельного объекта выбрали клеточную линию HepG2 с максимальной экспрессией CHOL. Для определения экзонного состава транскриптов использовали метод быстрой амплификации концов кДНК (RACE), проходивший в три раунда со «сходящимися» праймерами, комплементарным экзонам CHOL и вариантам предполагаемых транскриптов. На первом этапе удалось установить точные 5'- и 3'-концы только у нескольких основных транскриптов. Последовательность первого экзона отличалась от ожидаемой и была длиннее, а при секве-

нировании выделенных ДНК-фрагментов по Сэнгеру наблюдали смешанный сигнал. В связи с этим была применена технология нанопорового секвенирования (MinION). В результате удалось установить, что все изоформы CHOL РНК содержат экзоны 2 и 3, тогда как для первого экзона существует 2 альтернативных варианта (1a и 1b). При этом каждый из «первых» экзонов в результате неточного сплайсинга существовал в виде несколько вариантов, различающихся на 10–20 н. о. с 3'-конца, что и обуславливало невозможность их точной идентификации «классическим» способом.

Все установленные изоформы не содержали с 5'-конца экзонов, общих с основными 14 транскриптами соседнего гена, однако с 3'-конца были идентифицированы 3 экзона (9, 10, 9.5), общие с 4 другими транскриптами этого гена. Итого общая длина основных транскриптов CHOL составляла от 800 до 1200 н. о., и только несколько минорных транскриптов имели длину 230–250 н. о. При этом все варианты содержали в себе универсальный участок (экзоны 2+3). Отметим, что экзоны 1b и 9.5 не были аннотированы ранее. На основе полученных данных был сделан вывод, что ген CHOL неверно аннотирован в базах данных, то есть среди заявленных 19 транскриптов 5 относятся к самой CHOL, а 14 других — к соседнему гену.

Известно, что у HerG2 трисомия второй хромосомы, содержащей ген CHOL. Чтобы исключить вероятность гетерогенности транскриптов в результате специфических мутаций HerG2, эксперименты повторили на образцах печени пациентов. Данные подтвердили результаты для HerG2 — мы по-прежнему наблюдали экспрессию всего спектра транскриптов CHOL со всевозможными вариантами экзона 1. В образцах здоровой печени были детектированы в основном длинные изоформы CHOL (800–1200 н. о.). Короткие изоформы (230–250 н. о.), преимущественно содержащие экзон 1b, были наиболее представлены в образцах ХЦР (IV стадия), более того, нам удалось идентифицировать несколько дополнительных вариантов этого экзона.

Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что при ХЦР происходит не только активация транскрипции основных изоформ CHOL, но и «включение» дополнительного промотора, дающего начало транскриптам с экзоном 1b. Наблюдается крайней неточный сплайсинг прекурсора CHOL, что приводит к существованию спектра транскриптов с разницей 20–100 н. о. При этом функциональную роль играют только «универсальные» экзоны 2 и 3, а переменные 3'- и 5'-«плечи» нужны для поддержания структуры и стабильности РНК. Данная гипотеза требует дальнейшего экспериментального подтверждения, однако с точки зрения потенциальной диагностики мы предполагаем, что активация транскрипции коротких изоформ CHOL 1b-2-3 может иметь место на последних стадиях канцерогенеза при ХЦР.