

Relación entre mutaciones en genes involucrados en el empalme del arn y la desregulación epigenética, en la leucemia mieloide aguda

Garrote-Santana H¹, Díaz-López A², Martín-Moreno AM², Freue JM², García-García JF²

¹Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba; ²MD Anderson Cáncer Center, Madrid, España.

Email: hgarrote@infomed.sld.cu

RESUMEN

Las alteraciones en las proteínas que conforma la maquinaria de empalme del ácido ribonucleico (ARN) pudieran proporcionar un defecto en dicho proceso, dado por retención de los intrones, alteración del sitio de reconocimiento para el empalme o empalmes alternativos defectuosos. La implicación de estas mutaciones y su papel en las neoplasias mieloides han sido recientemente reportadas; sin embargo se requiere de nuevas investigaciones para identificar alguna relación entre las mutaciones de los genes del empalme y otros genes involucrados en la transformación maligna. En nuestro estudio, analizamos el status mutacional de algunos de los genes que codifican para diferentes proteínas del empalmosoma como el SRSF2, el U2AF1 y el SF3B1, en varias líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA) por secuenciación Sanger. Se encontraron 4 mutaciones en 3 de las 6 líneas celulares: 2 de ellas en la línea celular MV-4 y una sola mutación en las líneas NOMO-1 y KG-1. Además se analizaron los niveles de ARN y proteína del gen TET2 por PCR cuantitativa y western blot respectivamente. El TET2 es un gen responsable de la hidroximetilación del ácido desorribonucleico (ADN) con un importante papel en la regulación transcripcional y la leucemogénesis. Nuestros resultados mostraron una expresión alterada del TET2 en aquellas líneas celulares de LMA con un perfil de mutaciones en los genes del empalme, lo que sugiere una posible relación entre dichas mutaciones y la desregulación epigenética en la LMA.

Palabras clave: LMA, mutaciones, *splicing*.

INTRODUCCIÓN

El ARN mensajero durante su maduración sufre un proceso llamado *splicing* (por su nombre en inglés) que consiste en el empalme de los exones para una traducción adecuada de la información genética.¹

El complejo que se encarga de ese proceso se denomina empalmosoma y consiste en una macromolécula compuesta por ácidos ribonucleicos (ARN) pequeños asociados a proteínas para formar unas ribonucleoproteínas (snRNP).¹

Más del 50 % de los pacientes con alteraciones mielodisplásicas en las células hematopoyéticas, presentan mutaciones somáticas en los genes que codifican para proteínas involucradas en el empalme.²

Las mutaciones del *splicing* se han descrito poco en las neoplasias mieloides infantiles, por lo que se infiere que su presencia está relacionada con el envejecimiento.³

La carga del alelo mutado se encuentra habitualmente entre el 40 % y el 50 %, indicativo de un clon dominante en la médula que es heterocigótico para la mutación. Los tres genes que con mayor frecuencia se encuentran mutados son: *serine/arginin-richsplicing factor 2* (SRSF2) *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1* (U2AF1) y *splicing factor 3b, subunit 1* (SF3B1) y la mayoría de las mutaciones descritas dan lugar a un cambio de aminoácido.⁴

La presencia de mutaciones a nivel de estos genes se ha relacionado con la posible transformación leucémica en aquellos pacientes con una mielodisplasia de base: el SF3B1 se ha asociado con buena supervivencia y bajo riesgo a la transformación leucémica, el SRSF2 con pobre supervivencia y rápida transformación leucémica y el U2AF1 con un alto riesgo de progresión maligna.⁴

Al estar mutado alguno de estos genes, el proceso de *splicing* se puede ver comprometido por retención de los intrones, alteración del sitio de reconocimiento para el empalme o empalmes alternativos defectuosos.⁵

Se describen varios genes específicos con un patrón de empalme alterado. Uno de estos genes es el TET2, que codifica para una proteína con un rol fundamental en los cambios dinámicos de la metilación para la diferenciación y transformación del *stemcell*.⁵

Nuevas investigaciones se hacen necesarias para identificar si hay alguna relación entre las mutaciones de los genes del *splicing* y una expresión y/o funcionamiento alterado del TET2 como parte del proceso de leucemogénesis en la leucemia mieloide aguda (LMA).

OBJETIVOS

1. Comprobar la presencia de mutaciones en los genes del *splicing*: SRSF2, U2AF1 y SF3B1 en líneas celulares de LMA.
2. Relacionar el nivel de expresión del ARN mensajero y el nivel de expresión de la proteína del TET2 en las líneas celulares con genes del *splicing* mutados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las líneas celulares MOLM-13, HL-60, KASUMI-1, KG-1, MV-4 y NOMO-1 fueron cultivadas con 80 % de RPMI y 20 % de FBS a 37 grados. Se realizó extracción simultánea de ARN, ADN y proteínas por el método de TRIzol® Reagent.

Posteriormente se estudió la presencia de sustituciones genómicas en diferentes puntos calientes (PC) o “*hotspots*” de la secuencia de los genes de empalme: *SRSF2*, *U2AF1* y *SF3B1*. El producto de cada gen amplificado por PCR, fue purificado y secuenciado por el método de Sanger.

También se analizaron los niveles de ARN y proteína del gen TET2 por PCR cuantitativa y western blot respectivamente.

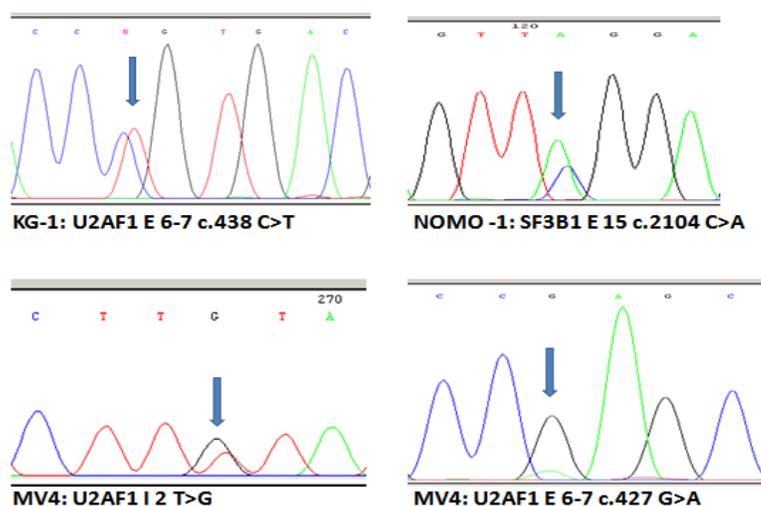
PRINCIPALES RESULTADOS

Cinco líneas mostraron un crecimiento en suspensión y una línea creció en forma semiadherente.

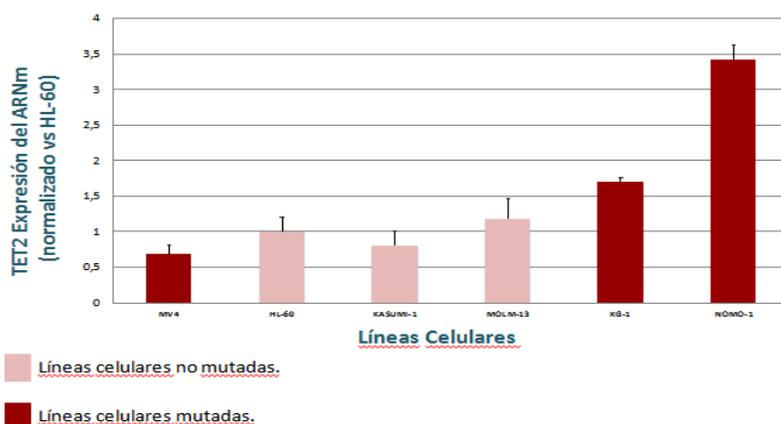


Se encontraron 4 mutaciones en 3 de las 6 líneas celulares: 2 de ellas en la línea celular MV-4 (U2AF1 intrón 2 T>G) (U2AF1 exón 6-7 c.427 G>A) y una sola mutación en las líneas NOMO-1 (SF3B1 exón 15 c.2104 C>A) y KG-1 (U2AF1 exón 6-7 c.438 C>T). (Figura A)

La expresión de TET2 estuvo sobrerregulada en 2 de las tres líneas celulares, con al menos una mutación en los genes del *splicing* explorados. (Figura B)



A



B

Fig. Mutaciones en genes involucrados en el empalme del ARN y la desregulación epigenética en la leucemia mieloide aguda. A: Cuatro mutaciones fueron encontradas en 6 líneas celulares. B: La expresión de TET2 se encontró sobrerregulada en dos líneas celulares con al menos una mutación en los genes del *splicing*

Los niveles de ARN mensajero no se correlacionaron con el nivel de expresión de proteína del TET2 en aquellas líneas celulares con perfil de *splicing* mutado.

CONCLUSIONES

Estos resultados mostraron una expresión alterada del TET2 en aquellas líneas celulares de LMA con un perfil de mutaciones en los genes del empalme, lo que sugiere una posible relación entre dichas mutaciones y la desregulación epigenética en la LMA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang L, Li X, Zhao R. Structural analyses of the pre-mRNA splicing machinery. *Protein Sci.* 2013 Jun; 22(6):677-92.
2. Thol F, Kade S, Schlarman C, Loffeld P, Morgan M, Krauter J, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012 Apr 12;119(15):3578-84.
3. Choi HW, Kim HR, Baek HJ, Kook H, Cho D, Shin JH, et al. Alteration of the SETBP1 gene and splicing pathway genes SF3B1, U2AF1, and SRSF2 in childhood acute myeloid leukemia. *Ann Lab Med.* 2015 Jan;35(1):118-22.
4. Pellagatti A, Boulwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2015 Jul;95(1):3-15.
5. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood.* 2012 Apr 5;119(14):3203-10.