

ARTIKEL PENELITIAN

Akses Terbuka

Profil genetik leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang diinduksi oleh Retrovirus tikus Graffi

Veronique Voisin^{1,2}, Philippe Legault¹, Diana Paulina Salazar Ospina¹, Yaacov Ben-David², Eric Rassart^{1*}

Abstrak

Latar Belakang: Leukemia eritroblastik dan megakaryoblastik akut dikaitkan dengan prognosis yang sangat buruk dan mekanisme transformasi blastik belum cukup dipahami. Retrovirus leukemia Graffi murine menginduksi leukemia eritroblastik dan megakaryoblastik ketika diinokulasi ke tikus NFS dan merupakan model yang baik untuk mempelajari leukemia ini.

Metode: Untuk memperluas pemahaman kita tentang gen spesifik untuk leukemia ini, kami membandingkan profil ekspresi gen, yang diukur dengan microarray dan RT-PCR, dari semua jenis leukemia yang disebabkan oleh virus ini.

Hasil: Perubahan tingkat transkriptom, yang terdapat di antara berbagai jenis leukemia, mengarah pada identifikasi tanda-tanda kanker spesifik. Kami melaporkan banyak gen yang mungkin merupakan onkogen potensial, mungkin memiliki fungsi yang terkait dengan eritropoiesis atau megakaryopoiesis, atau memiliki peran fisiologis yang belum sepenuhnya dipahami. Pola ekspresi gen-gen ini telah diuji lebih lanjut dengan RT-PCR pada sampel yang berbeda, dalam model eritroleukemia Friend dan dalam lini sel leukemia manusia.

Kami juga melakukan skrining terhadap leukemia megakaryoblastik untuk integrasi virus dan mengidentifikasi gen yang menjadi target integrasi ini dan berpotensi terlibat dalam timbulnya penyakit tersebut.

Kesimpulan: Secara keseluruhan, data yang diperoleh dari eksperimen profil gen global ini telah memberikan karakterisasi rinci tentang leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang disebabkan oleh virus Graffi, dengan banyak gen yang dilaporkan spesifik untuk transkriptom leukemia ini untuk pertama kalinya.

Latar

Belakang Leukemia megakaryoblastik akut manusia (FAB-AML7, [1]) dan eritroleukemia (FAB-AML6, [2]) dianggap sebagai entitas leukemia myeloid akut yang relatif jarang tetapi dikaitkan dengan prognosis yang sangat buruk [3-7]. Hasil yang buruk terkait dengan 2 jenis leukemia ini berasal dari kombinasi kegagalan untuk mencapai remisi lengkap, tingkat kekambuhan yang tinggi dan toksitas terkait terapi, yang menyoroti kebutuhan akan terapi yang Selain itu, diagnosis AML6 atau AML7 menghadirkan tantangan yang lebih besar dibandingkan jenis leukemia myeloid akut (AML) lainnya dan diperlukan penanda tambahan [8]. Selain itu, blast pada pasien AML6 dan AML7 memiliki penanda yang sama [9] yang menunjukkan bahwa mereka

berasal dari garis keturunan hematopoietik yang berkerabat dekat yang diturunkan dari nenek moyang bipoten yang sama [10,11].

Kami baru-baru ini menunjukkan bahwa retrovirus murine Graffi mampu menginduksi spektrum luas leukemia ketika diinokulasi ke tikus baru lahir. Leukemia yang berkembang pada tikus ini berasal dari limfoid (sel T dan sel B) dan non-limfoid (mieloid, eritroid, dan megakaryoblastik). Insiden leukemia eritro- dan megakaryoblastik sangat tinggi pada tikus NFS atau FVB/n yang diinokulasi dengan leburan provirus p1.4 dari virus Graffi [12]. Aktivasi proto-onkogen yang ditargetkan atau penekanan gen penekan tumor merupakan peristiwa awal dalam perkembangan leukemia yang diinduksi oleh retrovirus leukemia murine (MuLV). Kemudian diikuti oleh deregulasi banyak gen tambahan yang menghasilkan sel, yang terhambat pada tahap yang sangat belum matang, yang membela secara agresif dan menghindari apoptosis. Untuk menganalisis tanda-tanda kanker ini, kami

* Korespondensi: rassart.eric@uqam.ca

Laboratoire de Biologie Moléculaire, Département Sains Biologiques, Center BioMed, Université du Québec à Montréal, Case Postale 8888 Succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C-3P8, Kanada

Penelitian ini membandingkan profil gen dari setiap jenis leukemia (sel-T, sel-B, mieloid, eritroid, megakaryoblastik) yang diinduksi oleh virus Graffi. Analisis ini menyoroti banyak gen yang berpotensi menjadi onkogen dan mungkin memiliki fungsi yang terkait dengan eritropoiesis atau megakaryopoiesis. Hasil penelitian mendukung pentingnya faktor transkripsi yang dikenal, yaitu Gata1, Fog1, Fli1, Scl, dan Lmo2, baik pada leukemia eritro- maupun megakaryoblastik, serta peran Runx1, Pbx1, Meis, Evi1, dan Evi3 pada leukemia megakaryoblastik. Selain itu, banyak gen yang dilaporkan untuk pertama kalinya dan beberapa gen ini merupakan kandidat onkogen: Fgf3, Nmyc, Fap, Myct1, Gucy1a3, Gulp1 dan Fkbp9 yang spesifik untuk leukemia megakaryoblastik dan Ssx2ip, Rab11a, Ncoa3, Snca, Ltbp2, Rabgef1 dan Btbd14a yang spesifik untuk eritroleukemia. Pemeriksaan integrasi virus dilakukan pada tumor tikus. Beberapa gen, di antaranya Kit, Gata2, Irf8 dan Itga1, diidentifikasi berpotensi terlibat dalam perkembangan awal leukemia megakaryoblastik.

Metode

Produksi virus dan stok virus

tikus GV-1.4 dibuat seperti yang dijelaskan sebelumnya [12]. Partikel virus GV-1.4 (0,1 ml dengan titer 1,106 PFU/ml) disuntikkan ke tikus NFS yang baru lahir berusia 1 hari. Tikus diperiksa secara rutin untuk mengetahui tanda-tanda klinis penyakit dan tikus yang sekarat dikorbankan. Dua puluh empat tikus yang sakit dan 36 tikus kontrol digunakan untuk percobaan microarray dan RT-PCR. Suspensi sel sumsum tulang disiapkan dengan membilas tulang paha dengan IMDM 2% serum janin sapi (FBS) dan suspensi sel limpa disiapkan dengan mencincang limpa dengan gunting dan menyedot potongan-potongan tersebut ke atas dan ke bawah melalui jarum suntik 1 cc dalam IMDM 2% FBS. Suspensi sel limpa dan sumsum tulang disaring melalui saringan sel 70 µm (Becton Dickinson, Mississauga, Kanada). Semua prosedur eksperimental sesuai dengan Deklarasi Helsinki dan telah disetujui oleh Komite Perawatan dan Penggunaan Hewan Universitas Québec di Montréal.

Analisis sitometri aliran dan pemisahan sel

Prosedur pewarnaan sitometri aliran dilakukan seperti yang dijelaskan sebelumnya [12]. Antibodi yang digunakan adalah sebagai berikut: CD4, CD8a, CD3, CD90, CD19, B220, CD11b, Gr1, CD71, Ter119, CD41, Kit dan Sca1 (BD Pharmin-gen, Mississauga, Kanada). Populasi leukemia diisolasi dari organ hematopoietik dengan seleksi positif menggunakan manik-manik magnetik dengan Kit EasySep (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) sesuai dengan protokol pabrikan. Tingkat kemurnian dan viabilitas sel yang dipisahkan ditetapkan sama dengan atau lebih besar dari 95%. Sel T leukemia dipisahkan dari timus tikus NFS leukemia, sel B dari

Pembesaran kelenjar getah bening serta sel leukemia eritro- dan megakaryoblastik diisolasi dari limpa yang terinfiltasi.

Sel kontrol diisolasi dari organ hematopoietik 12 tikus NFS yang tidak terinfeksi: sel T diperoleh dari timus, sel B dari limpa, dan eritroblas dari sumsum tulang.

Ekstraksi RNA dan pemrosesan microarray Total

RNA diekstraksi dari populasi sel yang telah disortir menggunakan reagen Trizol (Invitrogen, Burlington, Kanada) diikuti dengan pemurnian kolom menggunakan Kit Qiagen RNeasy (QIAGEN, Mississauga, Kanada) dan diproses untuk hibridasi ke Affymetrix GeneChip®.

Susunan genom tikus 430 2.0 (Pusat Inovasi Genom Quebec, Montreal, Kanada).

Analisis data

Normalisasi Kumpulan Data: Affymetrix MicroArray Suite versi 5.0 digunakan untuk memindai dan mengukur array.

Normalisasi data ekspresi gen dilakukan menggunakan implementasi Bioconductor dari RMA (Robust Multi Array, B. Bolstad, University of California, Berkeley) yang tersedia dari perangkat lunak Flexarray (1.2, R 2.7.2, [13]).

Pembelajaran tanpa pengawasan: Pengelompokan hierarkis (pengelompokan tautan lengkap, korelasi tidak terpusat, [14]) dan Peta Pengorganisasian Diri (SOM, parameter G 1-5, A 1-10, [15]) dibangun menggunakan perangkat lunak GeneCluster (M. Eisen). 3.000 transkrip dipilih untuk dimasukkan dalam analisis berdasarkan ekspresi diferensial dari rata-rata. Deviasi dari rata-rata dihitung dari nilai RMA dari 45.000 probeset dan data diurutkan dalam urutan menurun untuk mengekstrak 3.000 gen pertama. Hanya deviasi yang sama atau di atas 0,585 (perubahan 1,5 kali lipat) dan sama atau di bawah -0,585 (perubahan -1,5 kali lipat) yang dianggap signifikan.

Pembelajaran terawasi: Analisis Signifikansi microarray (SAM, [16]). Analisis SAM dilakukan menggunakan perangkat lunak Flexarray dengan menggunakan data yang dinormalisasi dari 45.000 probeset. Data dengan nilai p sama dengan atau di bawah 0,01 dan Tingkat Penemuan Palsu (Benjamini Hochberg) sama dengan atau di bawah 0,20 dimasukkan dalam analisis lebih lanjut. Data diurutkan dalam urutan menurun berdasarkan skor-d SAM untuk mendapatkan daftar gen yang diekspresikan secara berbeda.

Situs web NetAffx (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) digunakan untuk mengambil anotasi ontologi gen (GO), urutan probe, dan dimanfaatkan sebagai penghubung ke Unigene (NCBI) untuk studi fungsional lebih lanjut.

Dataset microarray tersebut telah disimpan di Gene Expression Omnibus dengan nomor akses [GSE12581].

Garis sel dan uji diferensiasi Garis sel eritroleukemia murine HB22.2 diperoleh dari eritroblas murine yang terinfeksi Friend.

Virus Leukemia Murine (F-MuLV) [17]. Garis sel ini dipelihara dalam medium esensial minimum alfa. (a-MEM) ditambah dengan 10% (FBS) (Invitrogen, Frederick, MD) ditambah koktail penisilin/streptomisin. Untuk menginduksi diferensiasi, sel HB22.2 diinkubasi dengan adanya hemin (Sigma-aldrich H5533) pada konsentrasi 100 μ M. Sel dipanen 24 jam dan 72 jam setelah penambahan hemin. K562 (ATCC, AS), HEL (ATCC, AS), Jurkat (ATCC, AS) dan sel Tk6 (ATCC, USA) ditumbuhkan dalam RPMI yang dilengkapi dengan 10% FBS ditambah penisilin/streptomisin Koktail. Sel MEG-01 (ATCC, AS), CMK (DSMZ, Jerman) dan LAMA84 (DSMZ, Jerman) digunakan. ditumbuhkan dalam RPMI yang ditambah dengan 20% FBS plus a Koktail penisilin/streptomisin dengan konsentrasi 105 sel/ml.

RT-PCR

Transkripsi balik yang dipicu oleh oligo d(T) dilakukan menggunakan Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Mississauga, Kanada) dalam volume reaksi 20 μ l (42°C, 1 jam) dengan mengambil jumlah RNA yang sama (100 ng) dari Sel-sel leukemia Graffi dan lini sel HB22.2 tikus. cDNA (4 μ l) diamplifikasi menggunakan Taq polimerase (QIA-GEN, Mississauga, Kanada) pada suhu 94°C selama 5 menit, 72°C selama 45 detik, 57°C selama 45 detik, 72°C selama 45 detik, 72°C selama 10 menit. 25 dan 28 siklus digunakan untuk sel leukemia Graffi. dan 27 siklus digunakan untuk lini sel HB22.2. 0,01 μ l cDNA dan 25 siklus digunakan untuk mengamplifikasi gen b-aktin dan Gapdh yang diekspresikan secara luas. cDNA dari Garis sel hematopoietik manusia diperbanyak menggunakan Sebanyak 500 ng total RNA dan reaksi PCR dilakukan menggunakan 4 μ l cDNA dan 30 siklus PCR. Gen GAPDH manusia yang diekspresikan secara luas diamplifikasi. menggunakan 0,01 μ l cDNA dan 25 siklus. Set primer tercantum dalam data tambahan (File tambahan 1). PCR Produk dianalisis pada gel agarosa 2% yang mengandung 0,5 μ g/ml etidium bromida. Gel tersebut dipindai. (Molecular Dynamics Phosphorimager) dan kepadatannya. Jumlah pita RT-PCR dinilai menggunakan Kuantitas. Satu perangkat lunak.

Amplifikasi situs integrasi retrovirus

Protokol ini diadaptasi dari A. Berns dan rekannya. [18]. DNA tumor dari limpa (10 μ g) dicerna dengan BamHI (New England Biolabs, Pickering, Kanada). A Adaptor splinkerette dihasilkan dengan menggabungkan 2 oligonukleotida (5'CATGGGCTAAAGAGGACTATAA- CAAGCGTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCA CAC-TAGTGG3', 5'GATCCCCTAGTGTCGACACCAGT-CTCTAATTTTTTTTC AAAA3', 95°C 5 min, (dinginkan hingga suhu ruangan). 1 μ g DNA yang telah dicerna diikatkan ke oligonukleotida splinkerette (rasio molar DNA/splinkerette 1:10) menggunakan ligase DNA T4 (Baru

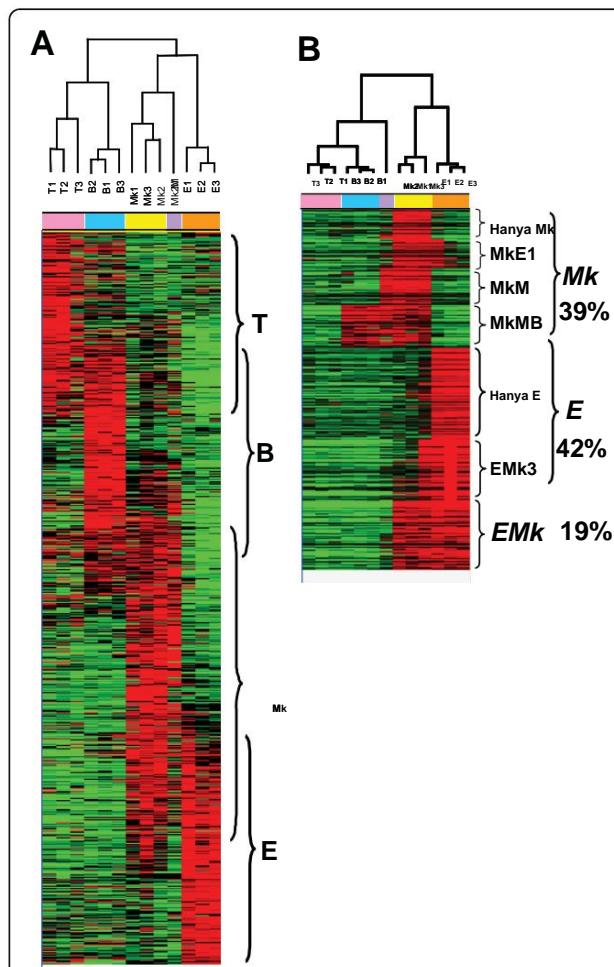
England Biolabs, Pickering, Kanada). Produk yang diligasi Kemudian dicerna dengan Clal (New England Biolabs, Pickering, Kanada). PCR diikuti oleh nested PCR (150 ng dari produk ligasi) dilakukan menggunakan primer. terletak pada sekvens U3 virus Graffi (5'GGTCTC-TTGAAA-CTGCTGAGGG 3' dan 5'GACCTTGATCT-GAACTT-CCCTATTG3') dan satu yang sesuai dengan Oligonukleotida splinkerette. Program PCR-nya adalah... Berikut ini: 94°C selama 1 menit, 68°C selama 30 detik (2 siklus), 94°C selama 15 detik, 58°C selama 30 detik, 72°C 3 menit (27 siklus), 72°C 10 menit. Produk PCR dikloning (Kit Kloning PCR, Qiagen, Mississauga, Kanada,) dan dikirim untuk pengurutan (Genome Pusat Inovasi Quebec, Montreal, Kanada). Urutan tersebut dianalisis menggunakan BLAST terhadap Basis data genom tikus yang dianotasi menggunakan Ensembl Genome Browser (riles 45).

Hasil

Leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang disebabkan oleh Retrovirus Graffi murine dan hibridisasi pada mikroarray Tikus baru lahir NFS diinokulasi dengan Graffi murine. Retrovirus menyebabkan rata-rata 20% kasus eritroleukemia. dan 20% leukemia megakaryoblastik dengan masa laten. sekitar 148 hari [12]. Tikus-tikus ini menderita parah Anemia dan hepatosplenomegalii. Eritroleukemia sel, Ter119+ CD71+, dan leukemia megakaryoblastik sel mic, CD41+ Kit+ atau CD41- Kit+, terutama ditemukan di sumsum tulang dan limpa tikus yang sakit [12]. Berbeda dengan leukemia limfoid Graffi, kehadiran Keberadaan sel blast jarang ditemukan pada apusana darah leukemia eritro- dan megakaryoblastik, sesuai dengan data klinis leukemia eritro akut pada manusia [8].

Untuk mendapatkan wawasan tentang ciri-ciri kanker pada Untuk mendeteksi berbagai leukemia yang diinduksi oleh Graffi MuLV, eksperimen microarray dirancang untuk membandingkan pola ekspresi gen dari setiap jenis leukemia. Sel-sel dari organ hematopoietik yang terinfiltasi tikus leukemia diisolasi (Lampiran 2) dan Dikenai analisis microarray. Pembelajaran tanpa pengawasan. metode, pengelompokan hierarkis, dan analisis SOM digunakan untuk mengungkap pola utama dalam data. (Gambar 1). Secara keseluruhan, empat kelompok gen berbeda yang mewakili sel T (T), sel B (B), sel megakaryoblastik/mieloid (Mk/M) dan sel eritroid (E) muncul dari pengelompokan (Gambar 1A).

Analisis SOM yang lebih rinci yang dilakukan pada gen eritroid dan megakaryoblastik selanjutnya mengklasifikasikan mereka menjadi 3 tanda utama: eritroid-megakaryoblastik EMk (19%), eritroid E (42%) dan megakaryoblastik Mk (39%) (Gambar 1B). E dan Mk mewakili gen diekspresikan secara berlebihan pada eritro- dan megakaryoblastik leukemia, masing-masing, dan EMk mewakili gen-gen tersebut. secara khusus diekspresikan secara berlebihan pada kedua tipe. MK-E1 menunjukkan gen yang diekspresikan secara berlebihan pada 3 megakaryoblastik



Gambar 1 Pengelompokan hierarkis dan sebaran data. (A) Peta panas dari pengelompokan hierarkis dan analisis SOM dari semua data. (B) Peta panas dari pengelompokan dan analisis SOM dari gen yang diekspresikan berlebih pada eritroid dan megakaryoblastik. Setiap kolom mewakili leukemia (sel T: T1, T2, T3; sel B: B1, B2, B3; mieloid: M; eritroid: E1, E2, E3; megakaryoblastik: Mk1, Mk2, Mk3) dan setiap baris ditugaskan ke transkip. Warna merah berarti peningkatan positif 0,595 ke atas dari rata-rata (ekspresi berlebih) dan warna hijau berarti peningkatan negatif -0,595 ke bawah dari rata-rata (ekspresi kurang). Warna hitam sesuai dengan nilai yang berada di antara 0,595 dan -0,595. Hasil pengelompokan pada array ditunjukkan sebagai dendrogram di bagian atas gambar. Simpul-simpul pada pohon tersebut menunjukkan tingkat kemiripan antara jenis-jenis leukemia.

leukemia (Mk1-Mk3) dan eritroleukemia E1.

Demikian pula, EMk3 sesuai dengan gen yang diekspresikan secara berlebih pada 3 eritroleukemia (E1-E3) dan leukemia megakaryoblastik Mk3. Hasil ini menunjukkan bahwa leukemia E1 dan Mk3 bersifat bifenotipik dan mengekspresikan penanda eritroid dan megakaryoblastik, yang sebelumnya diamati pada beberapa leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang diinduksi Graffi [12]. Tanda tangan MkMB mencakup gen yang diekspresikan secara berlebih pada leukemia megakaryoblastik (Mk1-Mk3), leukemia myeloid (M) dan sel B.

leukemia (B1-B3). Analisis rinci tanda tangan Mk, E dan EMk telah mengungkapkan bahwa banyak gen belum dilaporkan terkait dengan garis keturunan eritroid atau megakaryositik atau leukemia yang sesuai. Daftar lengkap gen yang merinci tanda tangan non-limfoid ini tersedia untuk umum di <http://www.biomed.uqam.ca/rassart/microarray.html>[19].

Ekspresi gen spesifik garis keturunan yang terlibat dalam biosintesis heme, reseptor fibrinogen megakaryositik, dan ekspresi faktor transkripsi yang sudah dikenal memvalidasi garis keturunan sebenarnya dari leukemia eritro- dan megakaryoblastik ini (Tabel 1).

Tanda tangan megakaryoblastik Gen spesifik megakaryoblastik yang diberi anotasi fungsional (istilah GO) dibagi menjadi kelas fungsional yang berbeda. Tabel 2 mencantumkan beberapa gen yang berpotensi terlibat dalam penyakit ini, tetapi data lengkapnya sudah tersedia [19]. Dalam daftar gen ini, onkogen Meis1 (Myeloid ecotropic viral integration site 1), Pbx1 (Pre B-cell leukaemia transcription factor 1), Evi1 (ecotropic viral integration site 1), Evi3 (Zfp521, zinc finger protein 521) dan ko-represor Cbfa2t3h (Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2, translocated to, 3 (human), Eto2) telah dikaitkan dengan leukemia megakaryoblastik atau garis keturunan megakaryositik [20-25].

Namun, beberapa gen lain, misalnya Nmyc (Neuroblastoma myc-related oncogene 1), Fgf3 (Fibro-blast growth factor 3) dan Fap (Fibroblast activation protein), yang juga dikenal sebagai onkogen [26-29], belum pernah dilaporkan terkait dengan leukemia megakaryoblastik.

Myct1 (target Myc 1) juga berpotensi terlibat dalam penyakit ini karena diatur secara positif oleh Myc dan memiliki sifat tumorigenik [30].

Di antara daftar gen yang diidentifikasi sebagai tanda MkMB, kami menemukan Jun (onkogen Jun), Fosl2 (antigen mirip Fos 2) dan Fes (onkogen sarkoma kucing) (Tabel 2, [31,32]). Ko-represor Ctbp2 (protein pengikat C-terminal 2), Sfpi1 (integrasi proviral SFFV 1, PU.1) dan Kit (onkogen Kit) juga merupakan elemen tanda MkMB.

Ctbp2 diketahui berinteraksi dengan Evi1 dan Fog [33]. Sfpi1 terbukti mengatur ekspresi integrin allb (Itga2B, CD41) dalam model Mpl-UT7 yang diinduksi TPO [34,35] dan dilaporkan sebagai target insersi Graffi MuLV [36].

Karena keterbatasan teknis, tidak ada kontrol megakaryoblastik yang disertakan dalam penelitian kami. Megakariosit normal dan oleh karena itu megakaryoblast merupakan populasi kecil pada tikus normal dan tidak mungkin untuk mendapatkan cukup sel murni dengan teknik yang digunakan untuk sampel lain. Oleh karena itu, kami membandingkan dataset kami dengan sebuah studi tentang pematangan megakaryosit tikus yang menunjukkan regulasi naik atau turun selama diferensiasi (dataset GSE6593, [37]).

Tabel 1 Gen spesifik untuk leukemia eritroid dan megakaryoblastik

| perangkat probe | gen | Hasil SAM * skor-d FDR | | | | T1 | T2 | T3 | Sampel leukemia** | | | | | | E2 | E3 | Mk1 | MK2 | Mk3 | | | | |
|---|--------------|------------------------|--------|------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | | B1 | B2 | B3 | M | | | | E1 | | E2 | | E3 | | | | | | | | | | |
| Reseptor fibrinogen dan gen terkait | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1417758_at | Itga2b | 10.58 | <0,001 | -2,7 | -1,6 | -2,6 | -2,9 | -2,6 | -2,7 | -1,6 | 3,8 | 0,8 | 1,1 | 3,6 | 3,6 | 3,8 | | | | | | | |
| 1421511_di | Itgb3 | - | >0,01 | -1,0 | -0,7 | -0,7 | -0,8 | -0,7 | -0,9 | -0,6 | 1,6 | -0,7 | -0,7 | -0,6 | 2,9 | 3,1 | | | | | | | |
| 1416066_di | Cd9 | 5,5 | 0,002 | 1,1 | -2,5 | 2,5 | -3,5 | -3,6 | -3,6 | 0,6 | 1,9 | -1,8 | -2,1 | 3,0 | 4,4 | 3,5 | | | | | | | |
| 1456085_x_di | Cd151 | 7,56 | <0,001 | -1,2 | -1,1 | -0,7 | -0,7 | -0,9 | -0,6 | -0,3 | 1,4 | -0,2 | -0,3 | 1,8 | 0,8 | 2,1 | | | | | | | |
| 1420558_di | Selp | 12,03 | <0,001 | -1,0 | -1,2 | -1,9 | -1,6 | -1,5 | -1,7 | -1,1 | -0,9 | -1,7 | -1,6 | 4,3 | 5,7 | 4,1 | | | | | | | |
| 1457782_di | Tln1 | 7,19 | <0,001 | -0,7 | -0,4 | -1,4 | -0,3 | -0,8 | -1,0 | 0,9 | 2,3 | -1,5 | -0,5 | 0,8 | 1,4 | 1,3 | | | | | | | |
| 1424595_at | F11r | 5,58 | 0,002 | -0,9 | -0,8 | -0,9 | -0,8 | -0,6 | -1,0 | -0,6 | 0,2 | -0,6 | -0,6 | 2,0 | 3,1 | 1,5 | | | | | | | |
| 1451097_at | Vasp | 5,24 | <0,001 | -0,8 | -1,3 | 0,1 | 0,3 | -0,3 | 0,3 | 0,7 | 0,0 | -0,6 | -1,0 | 0,8 | 1,2 | 0,7 | | | | | | | |
| 1418261_at | Syk | 16,04 | <0,001 | -2,4 | -2,8 | -2,8 | 2,9 | 2,5 | 2,8 | 1,4 | -1,5 | -2,0 | -3,1 | 1,5 | 1,6 | 1,8 | | | | | | | |
| 1455349_at | Rap1b | 4,63 | <0,001 | -0,7 | -0,8 | -1,1 | -0,6 | -1,2 | -1,0 | -0,2 | 2,1 | -0,3 | 0,9 | 0,7 | 0,9 | 1,4 | | | | | | | |
| Biosintesis heme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1451675_a_at | Alas2 | 8,85 | <0,001 | -3,4 | 0,3 | -0,9 | -2,5 | -3,8 | -3,2 | -1,3 | 4,9 | 4,9 | 4,8 | -2,8 | -0,5 | 3,5 | | | | | | | |
| 1424877_a_at | Alad | 8,91 | <0,001 | -1,2 | -0,4 | 0,0 | -1,3 | -1,6 | -0,7 | -1,6 | 2,2 | 2,2 | 2,0 | 0,4 | -0,9 | 1,2 | | | | | | | |
| 1426475_at | Hmbs | 13,44 | <0,001 | -1,2 | -1,0 | -0,4 | -1,5 | -1,1 | -1,1 | -1,1 | 2,6 | 3,4 | 2,7 | -0,8 | -0,9 | 0,5 | | | | | | | |
| 1423482_at | Uros | - | - | -0,6 | -0,3 | -0,2 | -0,3 | 0,1 | 0,2 | -0,9 | 0,7 | 1,5 | 0,2 | 0,0 | -0,5 | 0,0 | | | | | | | |
| 1417206_at | Urod | 10,87 | <0,001 | 0,0 | -0,4 | -0,3 | -1,2 | -0,9 | -1,0 | -0,3 | 1,8 | 1,6 | 1,4 | -0,6 | -0,5 | 0,3 | | | | | | | |
| 1422493_at | Cacar | 22,18 | <0,001 | -1,6 | -1,2 | -0,2 | -0,5 | -0,8 | -1,0 | -1,5 | 2,7 | 3,1 | 3,2 | -1,0 | -0,7 | -0,4 | | | | | | | |
| 1416618_at | Pox | 4,58 | 0,004 | -0,5 | -0,1 | -0,3 | 0,1 | -0,2 | -0,4 | 0,0 | 0,7 | 1,4 | 0,6 | -0,6 | -0,4 | -0,4 | | | | | | | |
| 1418699_s_at | Fech | 8,61 | <0,001 | -0,7 | -1,0 | -0,3 | -1,9 | -1,9 | -2,0 | -0,4 | 2,5 | 3,1 | 2,2 | -0,7 | 0,0 | 1,1 | | | | | | | |
| Faktor transkripsi eritroid dan megakaryoblastik | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EMK | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1450333_a_at | Gata2 | 7,4 | 0,01 | -1,9 | -1,6 | -1,9 | -1,7 | -1,8 | -1,9 | -1,1 | -0,6 | 2,2 | 0,6 | 3,4 | 3,4 | 2,8 | | | | | | | |
| 1423603_at | Zfpmp1(Fog1) | 5,4 | 0,02 | -1,2 | -1,7 | -1,4 | 0,1 | -0,6 | -0,2 | -3,9 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 1,3 | 0,8 | 0,9 | | | | | | | |
| 1449389_di | Sc1/Tal1 | 20,8 | <0,01 | -3,3 | -2,5 | -3,1 | -3,2 | -2,5 | -2,5 | -2,5 | 4,1 | 3,8 | 3,5 | 2,6 | 2,9 | 2,9 | | | | | | | |
| 1454086_a_di | Lmo2 | 4,5 | 0,03 | -5,1 | -3,8 | -4,6 | 0,7 | -1,3 | -0,9 | 0,7 | 2,8 | 3,0 | 2,9 | 1,3 | 2,5 | 1,8 | | | | | | | |
| 1452001_di | Nfe2 | 8,3 | 0,01 | -4,2 | -3,0 | -3,4 | -3,8 | -3,0 | -3,2 | 1,3 | 3,7 | 3,5 | 3,3 | 2,5 | 3,7 | 2,8 | | | | | | | |
| EMK3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1449232_at | Gata1 | 4,6 | 0,03 | -1,9 | -1,9 | -2,1 | -2,1 | -2,3 | -2,7 | -1,9 | 4,5 | 4,1 | 4,5 | 0,6 | -1,4 | 2,5 | | | | | | | |
| MkE1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1441584_at | Fli1 | 5,3 | 0,1 | -0,2 | -0,4 | -0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 2,6 | -4,8 | -4,9 | 1,8 | 2,4 | 1,6 | | | | | | | |
| Faktor transkripsi eritroid | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EMK3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1418600_at | Klf1 | 6,8 | 0,04 | -2,9 | -2,3 | -2,4 | -2,7 | -2,7 | -2,8 | -1,8 | 4,8 | 5,4 | 5,3 | 1,7 | -1,7 | 2,1 | | | | | | | |
| 1419311_at | Trim10 | 8,9 | 0,02 | -2,0 | -1,4 | -2,1 | -2,1 | -2,1 | -2,0 | -1,5 | 5,0 | 4,1 | 3,8 | -1,0 | -0,8 | 2,1 | | | | | | | |
| Faktor transkripsi megakaryoblastik | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MkE1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1421461_at | Mpl | 16,1 | <0,001 | 0,07 | -1,9 | -1,6 | -2,1 | -2,0 | -2,1 | -2,0 | -1,3 | 1,3 | -1,0 | -1,7 | 4,9 | 4,4 | | | | | | | |
| 1440878_at | Runx1 | 4,5 | 0,11 | 0,6 | -1,8 | -1,0 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | -0,5 | 0,9 | -0,8 | -0,1 | 0,7 | 0,8 | 0,3 | | | | | | | |

* Nilai p SAM kurang dari 0,001 untuk setiap sampel

** amplitudo penyimpangan dari nilai rata-rata yang dihitung dari nilai RMA

Menurut dataset megakaryositik GSE6593, Fgf3

Jun, Kit, Sfpi, Fes dan Brmyc mengalami penurunan regulasi setelah Diferensiasi megakaryositik (Tabel 2).

Ketika gen-gen dalam signature MkMB dibandingkan dengan anotasi GO, satu kelas gen menunjukkan representasi yang berlebihan. Banyak dari gen-gen ini adalah gen membran reseptor dan faktor ekstraseluler yang diketahui diekspresikan oleh sel penyaji antigen (APC) serta

terlibat dalam respons inflamasi [19]. Misalnya,

TLR2 (reseptor Toll-like 2), TLR4 (reseptor Toll-like 4), Syk (Tirosin kinase limpa) dan Ebi3 (virus Epstein-Barr) gen terinduksi 3) merupakan bagian dari jalur pensinyalan reseptor Toll-like untuk merespons rangsangan mikroba (LPS) dan memicu peradangan (Tabel 2). Mengkonfirmasi data kami, Tlr2, Tlr4 dan Syk sudah diketahui diekspresikan oleh garis keturunan megakaryosit [38,39].

Tabel 2 Gen yang diekspresikan secara berlebihan pada leukemia megakaryoblastik

| Perangkat pemeriksa | Gen | Hasil SAM | | | | | | | | | | | | Sampel leukemia * d-score | GSE 6593 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------|--|---------------------------------|--|---|-----|-----|-----|----------------------------|--------------------|--|--|-------------------------------|---------------------------|----------|-----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | p-value FDR T1 T2 T3 B1 B2 B3 M E1 E2 E3 Mk1 Mk2 Mk3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gen yang berpotensi terlibat dalam penyakit ini** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mk | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1443260_at | Meis1 | 12.0 | <0,001 | 0.1 | -1.5 -1.3 -1.7 -1.5 -1.3 -1.7 -1.4 -1.4 -1.3 -1.3 | | | | | | | | 4.5 | 5.9 | 4.0 | ND | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1428647_at | Pbx1 | 10.2 | <0,001 | 0,07 -1.6 -1.1 -1.1 -1.3 -1.3 -1.6 -1.2 -1.2 -1.1 -1.4 | | | | | | | | | 4.3 | 5.3 | 3.3 | ND | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1417155_at | Nmyc | 16.0 | <0,001 | 0,08 -2.0 -1.6 -1.9 -0.7 -0.6 -1.2 -1.6 -1.8 -1.5 -1.9 | | | | | | | | | 4.8 | 5.6 | 4.4 | NS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1451332_at | Evi3 | 13.0 | <0,001 | 0,08 -1.1 -1.3 -1.1 -1.1 | | | | | | | | | -1.0 -0.9 -0.7 -0.7 -0.6 -0.9 | 3.5 | 3.3 | 2.6 | NS | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1441350_at | Fgf3 | 5.4 | 0,002 | 0.12 -0.7 -0.7 -0.6 -0.6 -0.7 -0.8 -0.6 -0.4 -0.6 -0.5 | | | | | | | | | 1.3 | 2.9 | 1.9 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1417552_at | Masturbasi | 7.2 | <0,001 | 0,09 -1.7 -1.6 -1.7 -1.8 -1.7 -1.7 -1.5 -1.6 -1.4 | | | | | | | | | 5.9 | 7.0 | 3.6 | ND | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1438325_at | Evi1 | 4.5 | 0,005 | 0.16 -1.8 -0.9 -1.4 -1.7 -1.7 -1.4 -1.8 -1.1 -1.4 -1.5 | | | | | | | | | 7.3 | 2.4 | 4.8 | ND | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1440964_s_at Cbfa2t3h | | 11.0 | <0,001 | 0,08 -0.4 -0.7 -1.1 -0.3 -0.6 -0.3 -0.1 | | | | | | | | | 0.2 -0.6 -0.2 | 1.4 | 1.4 | 1.2 | NS | | | | | | | | | | | | | | | |
| MkE1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1452072_at | Myct1 | 7.2 | <0,001 | 0,07 -2.0 -1.7 -1.7 -1.6 -1.5 -1.6 -1.4 2,0 | | | | | | | | | -1.1 0.6 | 3.0 | 4.5 | 2.5 | NS | | | | | | | | | | | | | | | |
| MkMB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1437247_at | FosL2 | 10.3 | <0,001 | 0,01 -0.8 -0.5 -0.8 -0.7 -0.7 -0.8 | | | | | | | | | 1.8 -0.5 -0.5 -0.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | ND | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1417409_at | Juni | 5.1 | <0,001 | 0,03 -0.3 -1.4 -3,3 | 1 | 1.1 | 1.4 | 4.1 | -1.3 -1.5 -2.3 | | | | 0.8 | 0.8 | 0,91 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1434705_at | Ctbp2 | 15.3 | <0,001 | 0,01 -1.1 -1.0 -1.6 -0.9 -1.1 | | | | | -1.3 3.2 -1.2 -1.4 -1.9 | | | | 3.3 | 2.7 | 2.4 | NS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1452514_a_at | Kit | 10.5 | <0,001 | 0,01 -2.2 -2.1 -2.2 -2.2 -2.3 | | | | | 1.2 2.8 -1.7 -1.6 -2.2 | | | | 3.8 | 4.6 | 4.0 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1418747_at | Sfpi1 | 9.9 | <0,001 <0,01 -2.6 -1.7 -1.7 1,4 | | | | | 0,9 | 1.1 3.0 -1.7 -1.4 -1.8 | | | | 1.2 | 2.1 | 1.1 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1452410_a_at | Fes | 10.2 | <0,001 <0,01 -2.3 -1.7 -1.7 1,8 | | | | | 0,5 | 1.0 3.0 -1.4 -2.0 -1.9 | | | | 1.4 | 2.2 | 1.1 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1428669_at | Bmyc | 5.8 | <0,001 | 0,04 0.8 -0.9 0.9 -1.5 -1.2 -0.5 | | | | | | 1.3 -1.6 -1.2 -1.4 | | | | 1.7 | 2.2 | 1.4 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1420710_at | Rel | 5.8 | <0,001 | 0,02 -0.4 0.0 -0.8 0,4 | | | | | 1.0 0.9 1.0 -0.9 -1.3 -1.1 | | | | 0.6 -0.1 | 0.6 | ND | NS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gen yang berpotensi terlibat dalam respons peradangan | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MkMB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1449222_at | Ebi3 | 11.2 | <0,001 | 0,01 -1.4 -1.3 -1.2 -1.4 -1.2 -1.3 | | | | | 3.6 -0.7 -1.1 -1.6 | | | | 2.2 | 3.1 | 2.23 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1418262_at | Syk | 1.6 | <0,001 <0,01 -2.4 -2.5 -2.8 2,8 | | | | | 2.4 | 2.6 1.5 -1.6 -2.2 -2.8 | | | | 1.4 | 1.6 | 1,96 | NS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1419132_at | Tlr2 | 6.7 | <0,001 | 0,01 -0.8 -1.4 -1.6 0,6 | | | | 0.1 | 0.6 2.4 -0.9 -1.4 -1.5 | | | | 1 | 2 | 0,9 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1418163_at | Tlr4 | 6.3 | <0,001 | 0,01 -1.8 -1.6 -1.4 0.5 | | | | 1.8 | 2.2 2.5 -1.2 -0.8 -1.3 | | | | 0,4 | 0,7 | 0.0 | ND | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1456046_at | C1qr1 | 8.1 | <0,001 <0,01 -2.2 -3.7 -4,2 4,1 | | | | | 3.9 | 4.1 3.7 -2.3 -2.2 -4.1 | | | | 0,9 | 0,6 | 1.4 | ND | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gen yang dipilih untuk validasi RT-PCR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1434141_at Gucy1a3 | | 18.2 | <0,001 | 0,07 -1.2 -0.6 -1,0 -1.0 -1.1 | | | | | -1.2 -1.0 0,2 -1.1 -1.0 | | | | 3.0 | 3.2 | 2.7 | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1437687_x_at | Fkbp9 | 23.7 | <0,001 | 0,07 -1.4 -1.3 -1.6 -1.3 -1.3 -1.1 -1.0 -1.0 -1.1 | | | | | | | | | 4.1 | 4.6 | 3.9 | NS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1453771_at | Gulp1 | 14.2 | <0,001 | 0,07 -0.7 -0.7 -0.5 -0.6 -0.9 -0.9 -0.9 -0.9 -0.9 | | | | | | | | | 3.1 | 2.6 | 2.3 | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1448561_at | Ncf2 | 18.5 | <0,001 <0,01 -2.6 -2.4 -2,1 | | | | | 2.0 | 1.6 1.6 3.0 -2.1 -2.2 -2.4 | | | | 1.6 | 2.5 | 1.6 | NS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1450333_a_at Gata2 | | 7.4 | <0,001 | 0,01 -2.3 -2.0 -2.3 -2.1 | | | | | -2.4 -1.9 -1.6 0.2 2.4 1.1 | | | | 3.6 | 4.0 | 3.4 | ÿ | | | | | | | | | | | | | | | | |

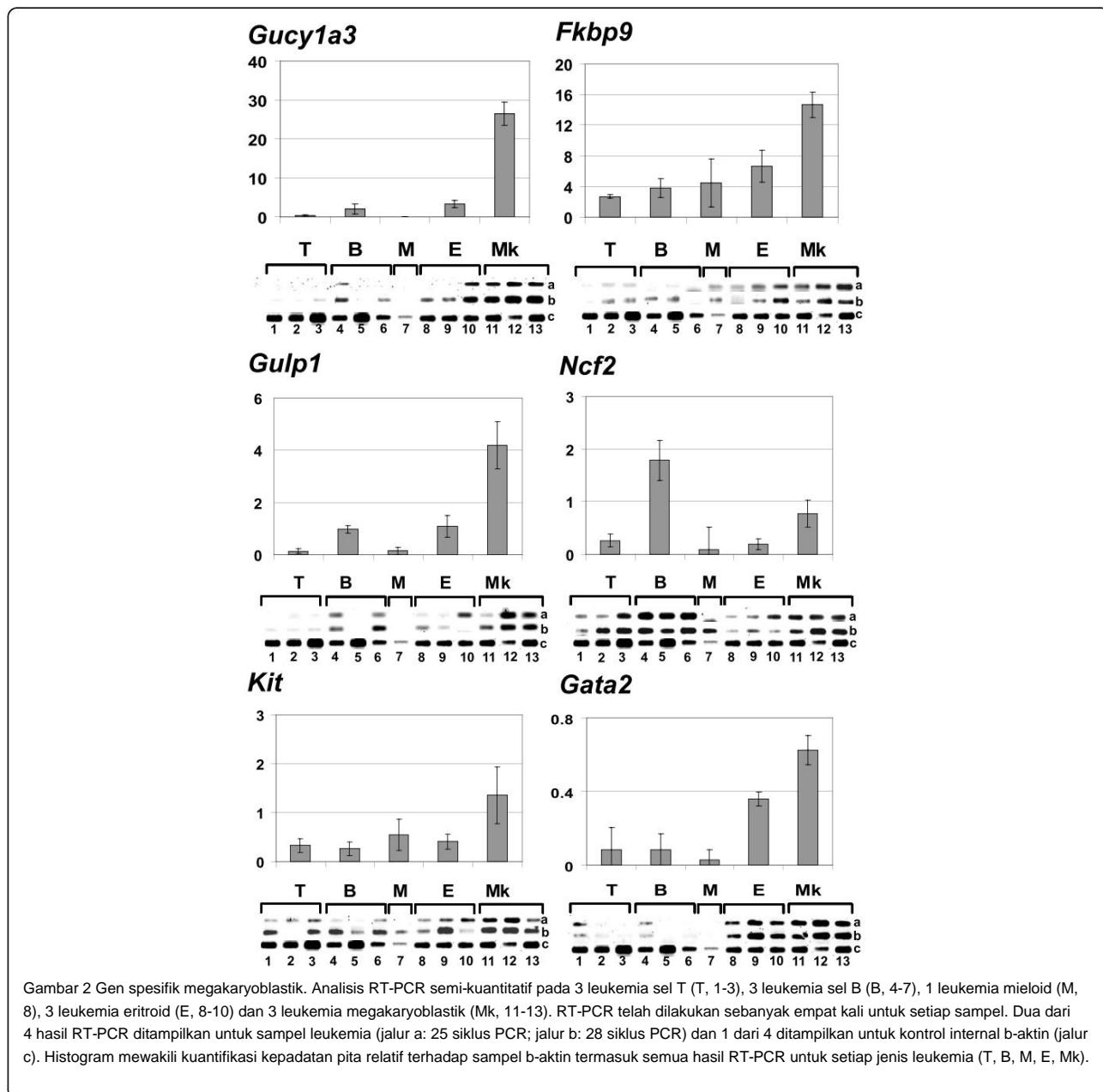
* amplitudo penyimpangan dari nilai rata-rata yang dihitung dari nilai RMA

** siklus sel/pertumbuhan sel/perkembangan/angiogenesis/perbaikan DNA/regulasi transkripsi

ND (tidak ditentukan), NS (tidak signifikan)

Untuk memvalidasi data microarray, ekspresi beberapa gen spesifik megakaryoblastik diuji dengan RT-PCR semi-kuantitatif pada sampel yang berbeda dari sampel yang digunakan. Analisis dalam eksperimen microarray (Tabel 2 dan Gambar 2). Di antara gen-gen ini, Kit dan Gata2 diuji. karena peran pentingnya dalam hematopoiesis. Gen-gen lain dipilih untuk eksperimen karena tidak memiliki hubungan sebelumnya dengan garis keturunan megakaryosit atau dengan leukemia yang terkait dan juga karena fungsi tersebut masih kurang dipelajari (Tabel 2, 'Gen dipilih untuk validasi RT-PCR'). Di dalam gen-gen ini, Gulp1 (Adaptor penelitian domain PTB yang mengandung 1)

dan Gucy1a3 (Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3) memberikan spesifikasi tertinggi dalam eksperimen RT-PCR dengan ekspresi kuat pada 3 leukemia megakaryoblastik (Gambar 2). Sebagian besar leukemia non-megakaryoblastik menunjukkan ekspresi gen-gen ini sangat rendah atau tidak ada sama sekali. Ncf2 (Faktor sitosilika neutrofil 2) diekspresikan secara tinggi pada leukemia sel B dan megakaryoblastik sesuai dengan dengan data microarray (Tabel 2). Fkbp9 (pengikatan FK506 protein 9) diekspresikan secara kuat pada megakaryoblastik leukemia dengan ekspresi yang lebih lemah namun berkelanjutan pada jenis leukemia lainnya. Gata2 diekspresikan secara kuat pada leukemia megakaryoblastik dan pada tingkat yang lebih rendah di



Gambar 2 Gen spesifik megakaryoblastik. Analisis RT-PCR semi-kuantitatif pada 3 leukemia sel T (T, 1-3), 3 leukemia sel B (B, 4-7), 1 leukemia mieloid (M, 8), 3 leukemia eritroid (E, 8-10) dan 3 leukemia megakaryoblastik (Mk, 11-13). RT-PCR telah dilakukan sebanyak empat kali untuk setiap sampel. Dua dari 4 hasil RT-PCR ditampilkan untuk sampel leukemia (jalur a: 25 siklus PCR; jalur b: 28 siklus PCR) dan 1 dari 4 ditampilkan untuk kontrol internal b-aktin (jalur c). Histogram mewakili kuantifikasi kepadatan pita relatif terhadap sampel b-aktin termasuk semua hasil RT-PCR untuk setiap jenis leukemia (T, B, M, E, Mk).

Ketiga eritroleukemia tersebut. Terakhir, Kit diamplifikasi di semua leukemia tetapi dengan ekspresi terkuat pada leukemia megakaryoblastik (Gambar 2).

Tanda tangan eritroid

Hasil tanda tangan eritroid dibandingkan dengan analisis transkriptom sel G1E selama diferensiasi yang diinduksi GATA1 (dataset GSE628, [40]). Hasil kami berkorelasi dengan rapi dengan dataset ini meskipun Affymetrix Genechip MG-U74A yang digunakan oleh Welch dan rekan-rekannya hanya berisi sepertiga probe dari MOE 430.2 yang digunakan dalam penelitian kami. Dalam penelitian kami, Gata2 menunjukkan peningkatan ekspresi selama diferensiasi eritroid.

Gen yang menunjukkan peningkatan ekspresi selama diferensiasi cenderung mengalami penurunan ekspresi pada eritroleukemia yang diinduksi Graffi dibandingkan dengan sampel kontrol dan sebaliknya. Hal ini menunjukkan bahwa eritroleukemia yang diinduksi Graffi terhambat pada tahap yang lebih awal daripada sampel kontrol yang diambil dari populasi eritroblas Ter119+ CD71+ di sumsum tulang. Tabel 3 memberikan contoh korelasi antara kedua penelitian ini. Misalkan, Car1 (Carbonic anhydrase 1) diekspresikan secara berlebihan pada leukemia dibandingkan dengan kontrol (nilai positif, kolom 'E-CE') dan ekspresinya menurun selama diferensiasi eritroid.

Tabel 3 Gen spesifik untuk leukemia eritroid

| Perangkat pemeriksa | Gen | Hasil SAM D-skor nilai p | Sampel leukemia* | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|--------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|---|
| | | | FDR | T1 | T2 | T3 | B1 | B2 | B3 | M | E1 | E2 | E3 | Mk1 | Mk2 | Mk3 | E-CE | G1E | | | |
| Korelasi dengan basis data G1E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1416193_at | Mobil 1 | 8.2 | <0,001 | 0,02 | -3,4 | -2,1 | -3,2 | -3,0 | -3,0 | -3,2 | -2,4 | 6,0 | 5,9 | 1,7 | | 1,4 | -2,1 | 3,0 | 1,2 | ÿ | |
| 1422316_at | Gp1ba | 12,7 | <0,001 | 0,01 | -2,5 | -2,1 | -1,9 | -1,9 | -2,0 | -2,4 | -1,9 | 4,3 | 3,3 | 1,7 | | 0,1 | -0,1 | 3,7 | 2,9 | ÿ | |
| 1422817_at | Gp5 | 7,5 | <0,001 | 0,03 | -3,6 | -2,3 | -3,0 | -3,0 | -2,9 | -2,8 | -1,9 | 4,5 | 3,6 | 1,7 | 2,4 | | 1,6 | 3,4 | 3,8 | ÿ | |
| 1424968_at | 2210023G05Rik | 12,3 | <0,001 | 0,01 | -2,4 | -2,3 | -2,1 | -2,2 | -1,9 | -1,9 | 4,4 | 5,5 | 5,1 | | | -0,2 | -1,1 | 1,4 | 1,3 | ÿ | |
| 1425677_a_at | Ank1 | 18,2 | 0,001 | 0,01 | -1,5 | -1,3 | -1,3 | -1,5 | -1,1 | | -0,9 | -1,0 | 3,1 | | 3,6 | 3,3 | -0,5 | -1,1 | 0,1 | -0,8 | ÿ |
| 1416464_at | Slc4a1 | 11,6 | <0,001 | 0,02 | -2,3 | -1,4 | -2,0 | -2,4 | -2,7 | -2,0 | -1,2 | 4,7 | 4,6 | 1,7 | -1,8 | | 0,2 | 3,2 | -2,4 | ÿ | |
| 1451675_a_at | Alas2 | 11,0 | <0,001 | 0,02 | -3,4 | 0,3 | -0,9 | -2,5 | -3,8 | -3,2 | -1,3 | 4,9 | 4,9 | 1,7 | -2,8 | | -0,5 | 3,5 | -1,1 | ÿ | |
| 1418699_s_at | Fech | 8,9 | <0,001 | 0,02 | -0,8 | -1,0 | -0,7 | -1,4 | -1,7 | -1,5 | -0,5 | 2,2 | 2,5 | 1,7 | -0,2 | | 0,0 | 1,3 | -2,4 | ÿ | |
| Gen yang berpotensi terlibat dalam penyakit tersebut *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1417514_at | Ssx2ip | 13,97 | <0,001 | 0,01 | -1,1 | -0,8 | -1,4 | -0,3 | -0,3 | -0,5 | 2,8 | 2,7 | 3,0 | -2,4 | | -1,4 | 0,3 | 1,1 | ÿ | | |
| 1460057_at | Gdf3 | 9,4 | <0,001 | 0,01 | -1,3 | -1,2 | -1,0 | -1,3 | -0,9 | -1,0 | | 2,0 | 2,2 | 2,4 | 2,8 | -1,3 | -1,3 | -0,1 | 2,9 NS | | |
| 1419665_a_at | Nupr1 | 8,7 | <0,001 | 0,01 | -1,5 | -1,5 | -1,3 | -1,3 | -1,3 | -1,7 | | 0,3 | 3,9 | 2,5 | 3,3 | -0,9 | -0,6 | 0,2 | 4,0 | - | |
| 1443969_at | Irs2 | 6,5 | <0,001 | 0,02 | 0,1 | | -0,1 | -1,5 | -0,2 | -0,4 | 0,4 | | -1,0 | 1,1 | | 2,1 | 1,4 | -1,2 | -0,5 | ÿ | |
| 1417165_at | Mbd2 | 17,38 | <0,001 | 0,01 | -0,7 | -0,1 | -0,4 | 0,0 | -0,1 | | -0,3 | -0,6 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | -0,6 | -0,7 | -0,2 | 0,9 | - | |
| 1449256_a_at | Rab11a | 10,59 | <0,001 | 0,01 | -1,0 | -0,3 | -1,2 | -0,6 | -0,6 | -0,3 | -0,4 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,3 | -0,3 | -0,1 | 0,2 | 1,7 | - | |
| 1417396_at | Podxl | 6,5 | <0,001 | 0,02 | -0,8 | -0,9 | -1,0 | -1,0 | -0,9 | -0,7 | -1,0 | 1,3 | 1,6 | 1,7 | | | 1,6 | 0,2 | -0,1 | 2,4 NS | |
| EMK3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1422737_at | Ncoa3 | 4,1 | 0,003 | 0,10 | -0,3 | -1,2 | -0,1 | -0,5 | -0,4 | 0,3 | | -0,3 | 1,5 | 0,4 | 0,8 | 0,0 | -0,7 | 0,6 | 2,2 NS | | |
| 1435458_at | Pim1 | 5,4 | <0,001 | 0,06 | -1,0 | -1,3 | -2,0 | -0,6 | -0,4 | -0,4 | -0,2 | 1,5 | 1,5 | 1,0 | | 0,1 | 0,9 | 0,9 | 0,6 | ÿ | |
| Gen yang dipilih untuk validasi RT-PCR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1449232_at | Gata1 | 4,58 | <0,001 | 0,03 | -1,9 | -1,9 | -2,1 | -2,1 | -2,3 | -2,7 | -1,9 | 4,5 | 4,1 | 4,5 | 0,6 | | -1,4 | 2,5 | 0,4 | ÿ | |
| 1425571_pada | Slamf1 | 9,9 | <0,001 | 0,02 | -1,3 | -1,6 | -1,7 | -1,2 | -1,6 | -1,5 | -2,0 | 4,1 | | | 3,0 | 1,7 | -0,3 | -1,2 | 1,9 | 4,8 | - |
| 1418493_a_pada | Snca | 10,2 | <0,001 | 0,02 | -3,3 | -0,2 | -1,0 | -2,5 | -3,2 | -1,8 | -1,5 | 4,6 | 4,2 | 1,7 | -1,0 | | -0,7 | 2,7 | -2,6 | ÿ | |
| 1418061_pada | Ltbp2 | 15 | <0,001 | 0,01 | -0,7 | -0,7 | -0,7 | -0,7 | -0,8 | -0,7 | -0,7 | -0,9 | 2,2 | 1,5 | 1,7 | -0,5 | -0,8 | 1,4 | 2,0 NS | | |
| 1419069_pada | Rabgef1 | 25,0 | <0,001 | 0,01 | -0,5 | -0,8 | -0,4 | -0,9 | -1,3 | -1,2 | -0,8 | 2,2 | 2,3 | 2,3 | -0,4 | | -0,4 | -0,1 | 4,8 | - | |
| 1427357_pada | Cda | 25,0 | <0,001 | 0,01 | -1,5 | -1,6 | -1,6 | -1,7 | -1,8 | -0,6 | -1,3 | 4,3 | 4,8 | 4,9 | -1,6 | | -1,7 | -0,7 | 6,0 | - | |
| 1417152_pada | Btbd14a | 9,5 | <0,001 | 0,02 | -0,6 | -0,9 | -0,9 | -0,9 | -0,8 | -0,9 | -0,5 | 2,3 | 1,5 | 1,7 | -0,4 | | 1,0 | 2,3 NS | | | |

* amplitudo penyimpangan dari nilai rata-rata yang dihitung dari nilai RMA

** rasio E-CE: rata-rata deviasi nilai kontrol E1, E2, dan E3/eritroid

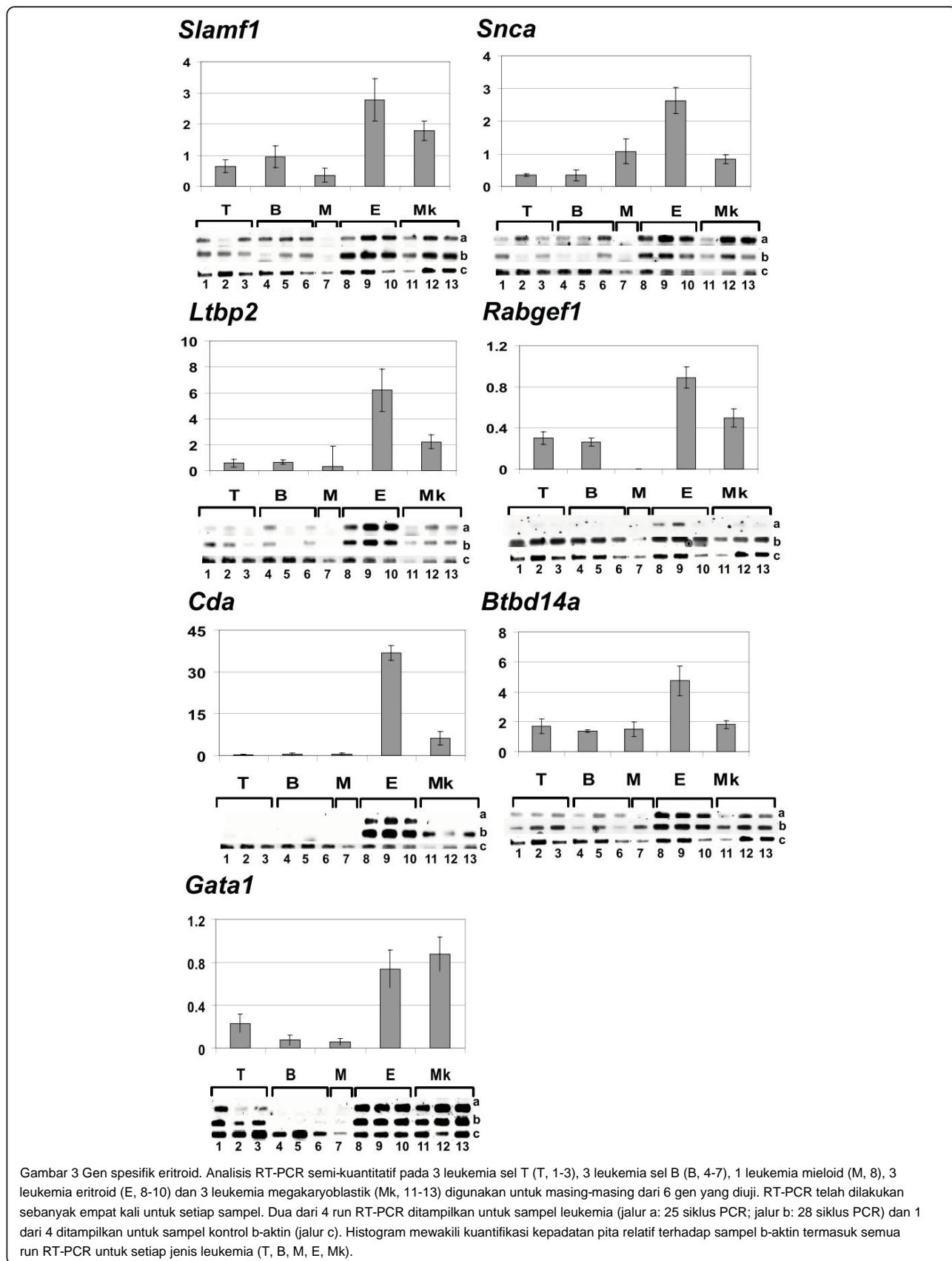
*** siklus sel/pertumbuhan sel/perkembangan/angiogenesis/perbaikan DNA/regulasi transkripsi

(panah menurun, kolom 'G1E'). Alas2 (Aminolevuli-nic acid synthase 1), terlibat dalam biosintesis heme, diekspresikan lebih rendah pada leukemia dibandingkan dengan kontrol dan ekspresinya meningkat selama eritroid diferensiasi.

Tabel 3 menyajikan ringkasan spesifik eritroid. Gen yang diekspresikan secara berlebihan dibandingkan dengan sampel kontrol dan berpotensi terlibat dalam penyakit tersebut tetapi secara lengkap data tersedia dengan mudah [19]. Di dalam gen-gen ini, Gdf3 (Faktor diferensiasi pertumbuhan 3), Podxl (Podocalyxin-like), Nupr1 (Protein nuklir 1), Pim1 (Situs integrasi provirus) 1) dan Irs2 (Substrat reseptor insulin 2) diketahui sebagai diatur oleh eritropoietin [41-43]. Onkogen Pim1 ditemukan tersusun ulang dalam Friend helper MuLV-induced eritroleukemia dan leukemia yang disebabkan oleh Graffi [36,44]. Ssx2ip (Synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein) itemukan diekspresikan secara berlebihan pada beberapa pasien AML faktor beta binding protein 2) menunjukkan nilai yang sangat tinggi dan

diekspresikan oleh sel eritroid K562 [45]. Rab11a (RAB11a, anggota keluarga onkogen RAS) dilaporkan mengatur daur ulang reseptor transferrin [46]. Ini protein berinteraksi dengan Evi5 [47] dan memiliki peran potensial dalam kanker [48]. Onkogen Ncoa3 (Nuclear receptor coactivator 3) diekspresikan secara berlebihan pada berbagai jenis kanker seperti kanker payudara, prostat, ovarium, lambung, pankreas dan kolorektal [49].

Banyak gen yang belum dilaporkan terkait dengan leukemia eritroid dan beberapa penyakit lainnya masih fungsi yang tidak diketahui dan beberapa di antaranya telah dipilih untuk validasi RT-PCR (Tabel 3 dan Gambar 3). Gata1 diuji karena perannya yang penting dalam hematopoiesis. (Gambar 3). Di antara 7 gen eritroid yang diuji (Tabel 3, 'Gen yang dipilih untuk validasi RT-PCR'), baik Cda (Cytidine deaminase) dan Ltbp2 (Pertumbuhan transformasi laten



Gambar 3 Gen spesifik eritroid. Analisis RT-PCR semi-kuantitatif pada 3 leukemia sel T (T, 1-3), 3 leukemia sel B (B, 4-7), 1 leukemia mieloid (M, 8), 3 leukemia eritroid (E, 8-10) dan 3 leukemia megakaryoblastik (Mk, 11-13) digunakan untuk masing-masing dari 6 gen yang diuji. RT-PCR telah dilakukan sebanyak empat kali untuk setiap sampel. Dua dari 4 run RT-PCR ditampilkan untuk sampel leukemia (jalur a: 25 siklus PCR; jalur b: 28 siklus PCR) dan 1 dari 4 ditampilkan untuk sampel kontrol b-aktin (jalur c). Histogram mewakili kuantifikasi kepadatan pita relatif terhadap sampel b-aktin termasuk semua run RT-PCR untuk setiap jenis leukemia (T, B, M, E, Mk).

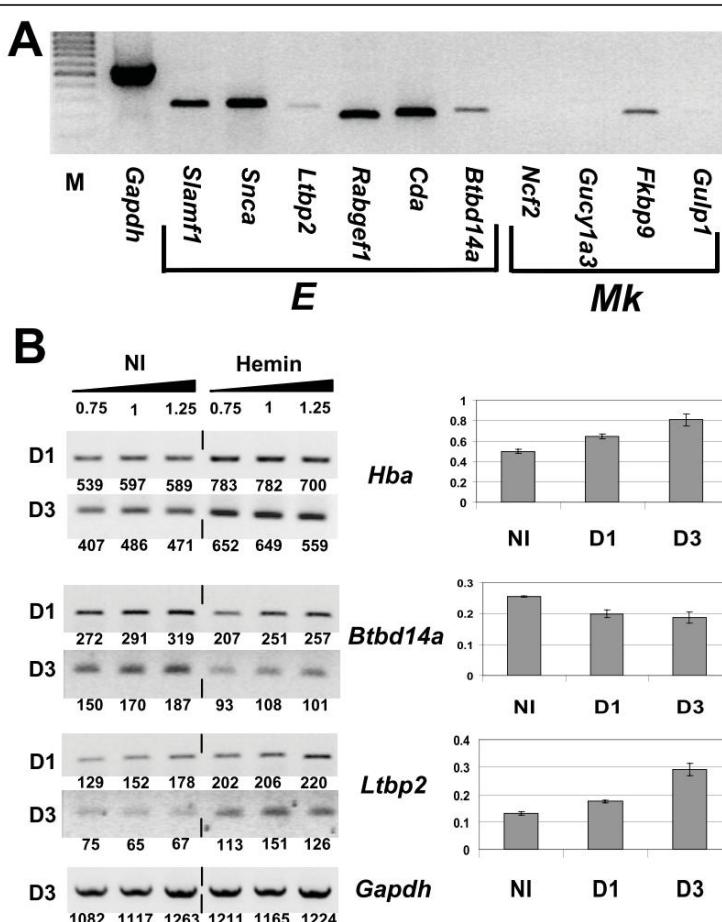
ekspresi spesifik pada 3 eritroleukemia (Gambar 3). *Slamf1* (Signaling lymphocytic activation molecule family member 1), *Snca* (Synuclein alpha) dan *Btbd14a* (BTB/POZ domain containing 14A) diekspresikan lebih tinggi pada eritroleukemia dan lebih rendah pada leukemia megakaryoblastik, tetapi juga diamplifikasi pada jenis leukemia lainnya. *Rabgef1* secara spesifik diekspresikan pada eritroleukemia pada 25 siklus PCR (jalur a) tetapi diamplifikasi pada semua sampel pada 28 siklus PCR (jalur b). *Gata1* diekspresikan sama tingginya pada leukemia eritroid dan megakaryoblastik (Gambar 3).

Validasi RT-PCR pada virus Friend tikus

garis sel eritroleukemia

Ekspresi transkrip spesifik eritroid dan megakaryoblastik divalidasi dengan RT-PCR (Gambar 2 dan

3) selanjutnya dinilai pada model eritroid yang berbeda (Gambar 4). Garis sel eritroleukemia HB22.2 telah diturunkan dari leukemia yang diinduksi oleh virus Leukemia Murine Friend (F-MuLV) dan menunjukkan fenotipe eritroid yang sangat imatur (Kit+ CD71+ Ter119-CD41-) ([17]). Keenam gen eritroid (*Slamf1*, *Snca*, *Ltbp2*, *Rabgef1*, *Cda* dan *Btbd14a*) diekspresikan dalam HB22.2 tetapi intensitas pita *Ltbp2* dan *Btbd14a* lebih lemah (Gambar 4A). Sesuai dengan harapan kami, gen megakaryoblastik, *Ncf2*, *Gucy1a3* dan *Gulp1*, tidak dapat diamplifikasi. *Fkbp9* adalah satu-satunya gen megakaryoblastik yang memberikan sinyal lemah pada garis sel eritroid ini. Memang, *Fkbp9* menunjukkan amplifikasi eritroid terkuat dalam percobaan validasi RT-PCR (Gambar 2). Dengan demikian, hasil ini menunjukkan bahwa, meskipun terdapat hubungan erat antara eritroid dan



Gambar 4 Ekspresi gen spesifik eritroid dan megakaryoblastik pada lini sel eritroleukemia murine HB22.2 selama diferensiasi yang diinduksi hemin. (A) Analisis RT-PCR semi-kuantitatif dari 6 gen spesifik eritroid (E) dan 4 gen spesifik megakaryoblastik (Mk). Lajur pertama (M) menunjukkan penanda DNA rentang rendah. (B) Uji diferensiasi yang diinduksi hemin pada sel HB22.2. Analisis RT-PCR semi-kuantitatif *Hba* sebagai kontrol diferensiasi, *Btbd14a* dan *Ltbp2* dilakukan pada sel yang tidak diinduksi (NI) dan diinduksi (Hemin) pada hari ke-1 (D1) dan hari ke-3 (D3) setelah penambahan hemin. Ekspresi GAPDH digunakan sebagai kontrol internal. Tiga reaksi RT-PCR independen dilakukan pada setiap sampel menggunakan jumlah reaksi RT yang meningkat (0,75 volume, 1 volume, 1,25 volume). Intensitas pita diukur dan ditunjukkan di bawah setiap pita. Di bagian kanan gambar, histogram menunjukkan hasil rata-rata intensitas pita relatif terhadap sampel kontrol Gapdh.

Dalam kasus leukemia megakaryoblastik, desain eksperimen ini memungkinkan kami untuk menemukan gen yang dapat membedakan kedua jenis leukemia tikus ini satu sama lain.

Kami kemudian menginduksi diferensiasi HB22.2 dengan hemin dan menguji ekspresi gen spesifik eritroid pada titik waktu yang berbeda (Gambar 4). Integrasi F-MuLV di hulu Fli-1 terbukti menghambat diferensiasi sel ini [17]. Namun, sel-sel ini mampu mengalami diferensiasi dengan induksi alfa globin yang terkait dengan hemin (Gambar 4B). Di antara 6 gen eritroid yang diuji, baik Btbd14a dan Ltbp2 menunjukkan perubahan yang dapat direproduksi dengan penurunan dan peningkatan masing-masing seiring dengan diferensiasi (Gambar 4B). Peningkatan ekspresi Ltbp2 menunjukkan bahwa kemungkinan berperan dalam sel eritroid matang sedangkan Btbd14a kemungkinan berperan dalam sel eritroid imatur dan ini berkorelasi baik dengan peran onkogenik yang diduga untuk gen ini.

Menyusun RIS yang diidentifikasi dalam berbagai model kanker tikus (ditaribawahi pada Tabel 4). Gen yang diidentifikasi dalam beberapa skrining memiliki probabilitas tinggi terlibat dalam transformasi onkogenik. Sebelas gen di dekat RIS ditemukan di RTCGD (ditaribawahi pada Tabel 4).

Beberapa gen ini, seperti Ccnd1 dan Myc, sebagian besar diketahui terlibat dalam leukemia. Foxf1 adalah faktor transkripsi yang diketahui mengatur integrin megakaryositik b3 (CD61) [51]. Menariknya, Kit dan Gata2 juga merupakan bagian dari RIS. Keberadaan RIS di dekat Kit pada Mk1 dan di dekat Gata2 pada Mk3 telah divalidasi dengan PCR pada populasi megakaryoblastik leukemia yang telah disortir (tidak ditunjukkan). Dua gen lain, Irf8 dan Itga1 yang ditargetkan oleh RIS (Tabel 4) juga menarik: Irf8 tidak termasuk dalam basis data RTCGD tetapi merupakan CIS yang dikenal [52] dan lokus ITGA1 ditekan oleh metilasi selama megakaryopoiesis pada manusia [53].

Validasi pada lini sel leukemia manusia

Protein yang dikodekan oleh gen spesifik eritroid dan megakaryoblastik ini memiliki homologi yang tinggi dengan protein manusia yang setara. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa protein manusia dan tikus ini memiliki peran fungsional yang sama. Ekspresi gen pertama kali diuji pada 2 lini sel mirip eritroid manusia, HEL dan K562, lini sel leukemia sel B manusia, TK6, dan lini sel leukemia sel T manusia, Jurkat (Gambar 5A). Karena HEL dan K562 diketahui memiliki fenotipe garis keturunan myeloid campuran, gen tersebut selanjutnya diuji pada 2 lini sel megakaryoblastik manusia, MEG-01 dan CMK, dan 1 lini sel eritroid LAMA-84 (Gambar 5B).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua gen spesifik eritroid dan megakaryoblastik yang diuji mengalami amplifikasi pada beberapa atau semua lini sel, yang mengkonfirmasi ekspresinya pada lini sel eritroid atau megakaryoblastik manusia. Selain itu, beberapa gen juga mengalami amplifikasi pada lini limfoid TK6 dan/atau Jurkat. RABGEF1 dan BTBD14A adalah gen yang paling umum dengan amplifikasi yang kuat pada lini sel limfoid dan non-limfoid. GULP1 dan SNCA adalah gen yang paling spesifik untuk garis keturunan non-limfoid tanpa ekspresi pada lini sel TK6 atau Jurkat.

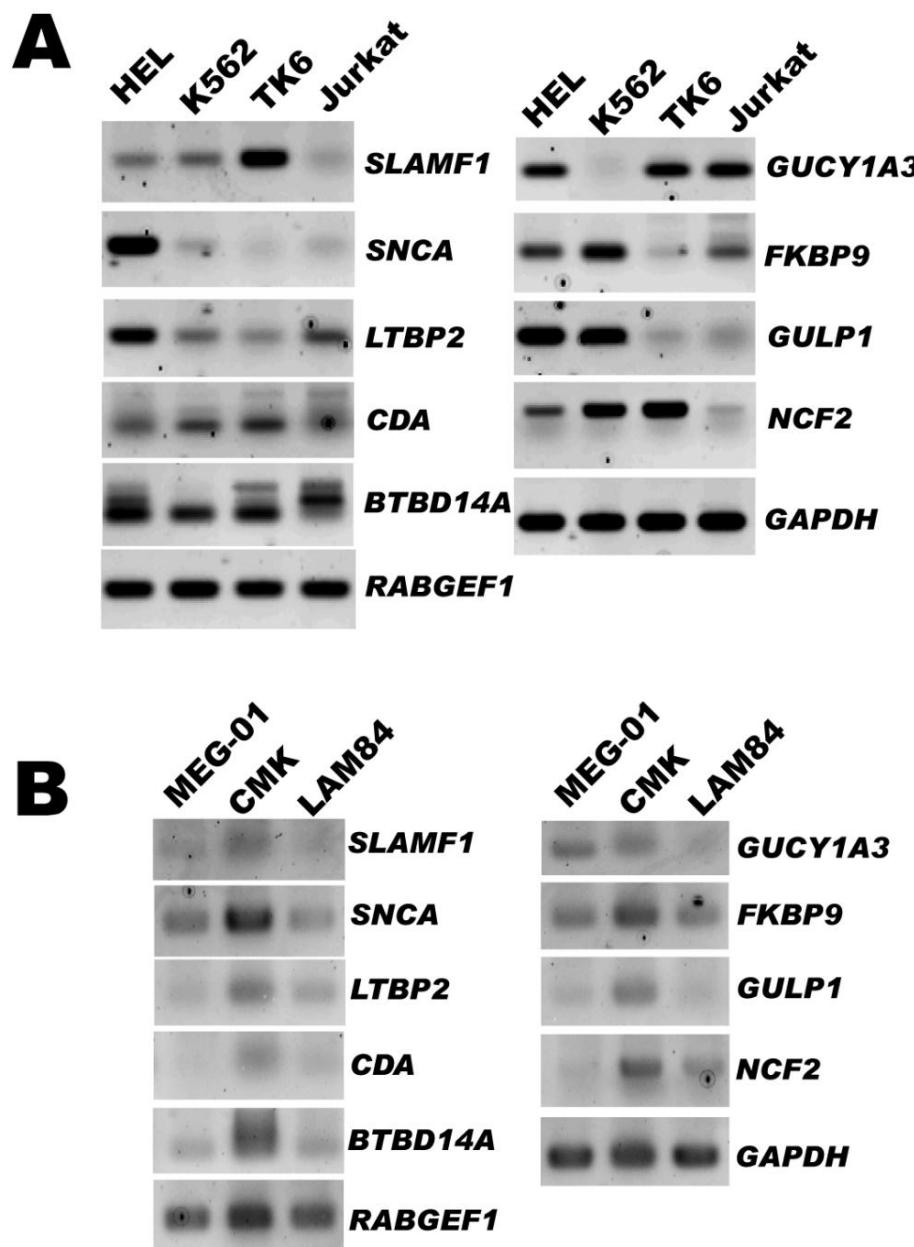
Integrasi virus pada leukemia megakaryoblastik. Kami juga mengidentifikasi situs integrasi retrovirus (RIS) pada 3 leukemia megakaryoblastik (Mk1-3) untuk mencari gen yang mungkin berkontribusi pada transformasi onkogenik. Beberapa RIS diamplifikasi, dikloning, dan diurutkan pada 3 tumor ini (11 pada Mk1, 5 pada Mk2, dan 10 pada Mk3) (Tabel 4). Tidak ditemukan situs integrasi umum (CIS) yang dapat secara jelas menunjukkan kontribusi terhadap peristiwa onkogenik.

Oleh karena itu, hasilnya dibandingkan dengan database gen kanker bertanda retrovirus (RTCGD, [50]) yang

Diskusi

Karakterisasi gen spesifik leukemia eritro- dan megakaryoblastik Studi survei pasien mengungkapkan bahwa eritroleukemia mewakili rata-rata 5% dari semua kasus leukemia myeloid akut [3-5] dan leukemia megakaryoblastik memiliki insiden sekitar 1% pada orang dewasa dan 5-10% pada anak-anak [6,7]. Namun, tingkat kelangsungan hidup secara keseluruhan sangat buruk dan berkisar antara 6% hingga 17% [3,7]. Anak-anak yang menderita Sindrom Down merupakan pengecualian karena mereka memiliki risiko lebih tinggi untuk mengembangkan leukemia megakaryoblastik tetapi merespons terapi dengan lebih baik [54]. Leukemia eritro- dan megakaryoblastik akut kurang dipelajari dibandingkan jenis leukemia yang lebih sering terjadi. Dengan demikian, gen yang terlibat dalam perkembangan leukemia ini masih belum cukup dipahami.

Desain eksperimental kami didasarkan pada perbandingan leukemia murine non-limfoid versus limfoid dan memberikan gambaran lengkap gen spesifik untuk kedua kelompok dan subkelompok ini. Perbandingan tunggal leukemia non-limfoid dan kontrolnya masing-masing tanpa menyertakan kelompok limfoid tidak akan memberikan kumpulan data seperti itu. Oleh karena itu, banyak gen yang belum dijelaskan sebelumnya atau belum dikarakterisasi muncul dari penelitian ini. Kami memperkirakan bahwa, dalam tanda gen yang diidentifikasi, terdapat onkogen yang secara langsung terlibat dalam penyakit dan juga gen yang terkait dengan komitmen normal sel terhadap garis keturunan eritro- atau megakaryoblastik. Untuk menentukan gen mana yang merupakan onkogen potensial, kami pertama-tama membandingkan eritroleukemia dengan sampel kontrol eritroid dan dengan penelitian Welch dan rekan-rekannya [40]. Perbandingan dengan penelitian Welch memungkinkan untuk menilai keadaan diferensiasi leukemia dan kontrol. Akibatnya, kita dapat berasumsi bahwa gen yang diekspresikan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol



Gambar 5 Validasi pada lini sel manusia. (A) Analisis RT-PCR pada lini sel manusia mirip eritroid K562 dan HEL, lini sel limfoblastik sel B TK6 dan lini sel leukemia sel T Jurkat. (B) Analisis RT-PCR pada lini sel megakaryoblastik manusia MEG-01 dan CMK dan lini sel eritroid manusia LAMA-84. Bagian kiri dan kanan setiap panel sesuai dengan gen yang diidentifikasi pada leukemia eritroblastik dan megakaryoblastik, masing-masing. GAPDH digunakan sebagai kontrol internal.

merupakan gen tahap akhir dan bahwa onkogen lebih mungkin berada di dalam gen yang diekspresikan secara berlebihan. Kami memvalidasi hipotesis ini dengan *Ltp2* dan *Btbd14a* dalam uji diferensiasi pada lini sel eritroid HB22.2. Kedua, untuk mendapatkan wawasan lebih lanjut tentang fungsi gen megakaryoblastik dan tanpa adanya sampel kontrol, kami membandingkan daftar gen kami dengan penelitian Shivadasani dan rekan-rekannya [37]. Perbandingan dengan penelitian Welch untuk leukemia eritroid [40] dan

Shivadasani [37] untuk leukemia megakaryoblastik memberikan informasi berharga tentang perilaku gen selama diferensiasi normal. Namun, chip microarray mereka masing-masing mengandung lebih sedikit probeset daripada milik kami dan kami tidak dapat melakukan perbandingan pada seluruh dataset. Oleh karena itu, eksperimen lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi peran yang belum diketahui yang dimainkan oleh gen-gen ini dalam leukemia eritro- dan megakaryoblastik.

Tabel 4 Lokasi integrasi virus Graffi pada leukemia megakaryoblastik

| Contoh Genom Kromosom | | | Gen hulu* | | | Integrasi di dalam sebuah gen | | Gen hilir* | | | |
|-----------------------|---------|----------------------------|-------------------|-----|-------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----|
| | | | gen 1 | kb | gen 2 | kb | | gen 1 | kb | gen 2 | kb |
| Mk1 | 1D | 93018002 | Gm817 | 17 | Lrrkip1 | 60 | <u>Ramp1**</u> | Ube2f | 95 | Scly | 130 |
| | 1G2 | 153451217 | Rnf2 | 188 | 1190005F20Rik 230 | | Niban | Edem3 | 92 | Q8K3Do | 199 |
| | 4B1 | 41816941 2310028H24Rik 133 | 1700066J25Rik 138 | | | | Dnaic1 | Cntfr | 29 | Dcnt3 | 86 |
| | 5E 1 | 75741720 | Pdgfra | 216 | Gsh2 | 382 | - | <u>Kit**</u> | 114 | Kdr | 472 |
| | 6F3 | 128801887 | Klrb1b | 10 | Clec2h | 159 | - | Clec21 | 50 | Klrb1f | 208 |
| | 6G1 | Nomor telepon 135264443 | Gsg1 | 61 | Hebp1) | 130 | - | Pbp2 | 10 | Dynlt1 | 50 |
| | 11B4 | 70471623 | <u>Pfn1**</u> | 0,8 | Rnf167 | 4 | - | Eno3 | 1.7 | Spag7 | 8.2 |
| | 11B5 | 80139013 | Rhot1 | 55 | Rnf135 | 123 | Rhbd13 | Zfp207 | 60 | Psmd11 | 105 |
| | 15D3 | 62283939 | Prajurit 1 | 211 | <u>Myc**</u> | 463 | - | - | - | Tmem16f | 36 |
| | 15F2 | 95582212 | DBX2 | 100 | Nel2 | 225 | - | - | - | - | - |
| Mk2 | 16B3 | 33700976 | Heg1 | 13 | Slc12a8 | 118 | - | Muc13 | 12 | <u>Itgb5 **</u> | 48 |
| | 1 E4 | Nomor telepon 132543823 | Pfkfb2 | 0,4 | C4bp | 54 | - | Yod1 | 0,8 | AA986890 | 1 |
| | 6A3 | 25759728 | Pot 1a | 14 | Grup 37 | 120 --- | - | - | - | - | - |
| | 8 E1 | Nomor telepon 123703449 | Irf8 | 81 | Cox4i1 | 149 | - | <u>Foxf1a**</u> 269 | - | Mthfsd | 280 |
| | 12C1 | 52786246 | Hectd1 | 120 | EG544864 | 35 | - | Heatr5a | 11 6530401NO4Rik 124 | | |
| Mk3 | 13D2.3 | Nomor telepon 116255725 | Pelo | 46 | Itga1 | 33 --- | - | - | - | - | - |
| | 1C5 | | Glrp1 | 146 | Spp2 | 230 | - | Arl14c | 161 | Sh3bp4 | 413 |
| | Lamel 1 | 139621937 | | | | | - | Ptprc | 257 | ATP6V1G3 | 466 |
| | 2H3 | 165618991 | <u>Prkcbp1**</u> | 43 | Eya2 | 156 | - | Ncoa3 | 65 | Sulf2 | 146 |
| | 5B1 | 43941 | Rheb | 23 | Menangis | 83 | - | <u>Prkag2**</u> | 20 1500035N22Rik 144 | | |
| | 6D2 | Nomor telepon 88086902 | Rpn1 | 16 | EG434064 | 115 | - | <u>Gata2**</u> | 72 | Dnajb8 | 100 |
| | 7B4 | 45356428 | Bax | 21 | Amidogen 1 | 28 | Dhdh | Nucb1 | 4 | Tulp2 | 25 |
| | 7F5 | Nomor telepon 144856850 | <u>Ccnd1**</u> | 107 | Oraov1 | 167 | - | Tpcn2) | 167 | Mrgprf | 253 |
| | 13A1 | 3830652 | Tenang13 | 27 | | | - | Tenang4 | 6 | Tenang5 | 22 |
| | 14C3 | 53491694 | Prmt5 | 20 | Rem2 | 57 | - | D14Ert500e 4 | | Jub | 31 |
| | 19A | 4301566 | Ankrd13d | 18 | Ssh3 | 32 | <u>Adrbk1**</u> | Fbxl13 | 15 | FBXL13 | 15 |

*2 gen terdekat yang terletak pada jarak maksimum 500kb di hulu (5') atau hilir (3') dari lokasi integrasi gen yang ada dalam basis data RTCGD

Gen eritroid dan megakaryoblastik

Garis keturunan eritroid dan megakaryoblastik, yang muncul dari nenek moyang bipoten yang sama, sangat terkait erat. [11] dan, sebagaimana dikonfirmasi oleh penelitian kami, beberapa faktor transkripsi umumnya diekspresikan. Hal ini memperkuat hipotesis bahwa penyesuaian yang sangat tepat dari faktor-faktor ini mempengaruhi komitmen terhadap eritroid atau garis keturunan megakaryositik.

Data microarray kami menunjukkan bahwa Gata1, Gata2, Fog1, Scl dan Lmo2 diekspresikan baik pada yang diinduksi Graffi leukemia eritro- dan megakaryoblastik (Tabel 1). Mereka dikenal bertindak atas nama promotor dari target mereka, sebagai kompleks multimerik. Studi kami menyoroti bahwa PU.1 (Sfpi1), Ctbp2, Cbfa2t3h (Eto2), Evi1 dan Runx1 memiliki pola megakaryoblastik yang kuat. PU.1 adalah yang dikenal penentu diferensiasi eritroid versus megakaryoblastik dan protein Gata2 bekerja pada PU.1 [55]. Protein Cbfa2t3h berikan dengan kompleks multimerik.

dibentuk oleh Gata1, Fog1, Scl dan Lmo2 dan diketahui menekan transkripsi gen target. Ko-represor Ctbp2 diketahui mengikat Evi1 dan Fog1 [56]. Runx1 bekerja sama dengan Gata1 selama megakaryositosis komitmen [22,23] dan protein fusi Runx1-Evi1 mengarah secara preferensial pada perkembangan leukemia megakaryoblastik pada tikus transgenik [57]. Dalam model Dalam diferensiasi in vitro, Evi1 sangat terinduksi dan dipertahankan setelah perlakuan trombopoietin pada sel CD34+. pola yang sangat mirip dengan Gata2 dan PU.1 tetapi hanya lemah setelah pengobatan eritropoietin [58]. Banyak bukti menunjukkan bahwa Evi1 adalah target pengaktifan langsung dari Gata2 [59]. Dengan demikian, penelitian kami memperkuat pentingnya dari gen-gen ini pada leukemia megakaryoblastik.

Gen megakaryoblastik divalidasi dengan RT-PCR

Ekspresi megakaryoblastik spesifik dari beberapa gen dengan peran fisiologis yang kurang jelas telah divalidasi oleh

RT-PCR. Studi kami melaporkan untuk pertama kalinya Gucy1a3, Gulp1 dan Fkbp9 spesifik untuk megakaryoblastik leukemia. Fungsi gen-gen ini, terkait dengan perkembangan normal atau transformasi megakaryosit. Fungsi sel, masih belum sepenuhnya dipahami. Wawasan tentang peran fisiologisnya dapat diperoleh dari fungsi-fungsi yang sudah diketahui. pada jenis sel lain. Gucy1a3 diketahui membentuk heterodimer. dengan Gucy1b3, yang gennya juga spesifik untuk leukemia megakaryoblastik yang diinduksi Graffi. Gucy1a3/b3 Kompleks ini menghasilkan cGMP setelah diaktifkan oleh oksida nitrat. (NO) itu sendiri diproduksi oleh NADPH oksidase dari reaktif spesies oksigen. Seperti yang diharapkan, Ncf2 dan komponen lainnya dari NADPH oksidase (Ncf1, Ncf4, Cybb) secara spesifik diekspresikan secara berlebihan pada megakaryoblastik yang diinduksi Graffi leukemia (Gambar 2 dan tidak ditampilkan). Pada kanker manusia pada lini sel glioma, diduga bahwa GUCY1a3/b3 mungkin bertanggung jawab atas ekspresi berlebihan VEGF yang mengakibatkan peningkatan jumlah NO [60]. NO juga diketahui memainkan peran peran dalam aktivasi trombosit [61]. Gulp1 dapat terlibat dalam lalu lintas vesikular intraseluler [62] yang tinggi. Fkbp9 memiliki peran penting dalam megakariosit untuk mengangkut molekul ke organel penyimpanan dan selama pembentukan proplatelet. Fkbp9 masih kurang dipelajari dan penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki peran onkogen potensial. melaporkan ekspresinya untuk pertama kalinya pada sel-sel yang berasal dari hematopoietik. Ekspresinya sangat kuat pada leukemia megakaryoblastik kami, pada leukemia non-limfoid manusia. HEL, K562, CMK, Meg-01 dan LAMA84, dan dalam jumlah yang lebih sedikit sejauh mana, pada leukemia eritroid tikus dan lini sel.

RT-PCR memvalidasi gen eritroid

Gen eritroid terpilih dengan peran fisiologis yang kurang dipahami adalah Slamf1, Snca, Ltbp2, Rabgef1, Cda. dan Btbd1a. Slamf1 diketahui diekspresikan oleh yang diaktifkan. limfosit tetapi belum diidentifikasi hubungannya dengan eritroid leukemia. Ekspresi Slamf1 pada lini sel eritroleukemia HB22.2 yang diinduksi virus Friend mengkonfirmasi Model Graffi. Gen tersebut baru-baru ini terungkap sebagai penanda. sel induk hematopoietik yang membedakan sel-sel ini dari nenek moyang yang lebih terdiferensiasi [63]. Snca memiliki sudah dilaporkan pada eritrosit [64,65]. Ekspresi berlebihnya pada sampel kontrol dan peningkatan ekspresinya selama diferensiasi eritroid (dataset G1E, Tabel 3) menunjukkan bahwa hal itu mungkin terlibat dalam eritroid normal fungsi sel. Kami tidak mengamati peningkatan yang signifikan. selama diferensiasi yang diinduksi HB22.2. Ltbp2 sangat kuat diekspresikan dalam eritroleukemia kami dan meningkat secara signifikan selama diferensiasi. Ini menunjukkan non-limfoid pola ekspresi pada lini sel manusia yang diuji dan adalah diidentifikasi dalam kaitannya dengan sel hematopoietik untuk pertama kalinya waktu. Beberapa penelitian menunjukkan peran Ltbp2 dalam adhesi sel dan migrasi sel [66]. Rabgef1 belum pernah dilaporkan berkaitan dengan garis keturunan eritroid atau leukemia dan protein yang dikodekan diketahui berinteraksi dengan Rab5, Rab21 atau Rab22 [67]. Rab22a memang secara khusus

diekspresikan secara berlebihan pada 3 eritroleukemia yang diuji (tidak ditunjukkan). Protein RAB terlibat dalam intraseluler. Pengaturan lalu lintas vesikular dan Rabgef1 diekspresikan dalam sel mast di mana ia bertindak pada internalisasi Kit [68]. Bahkan Meskipun pola ekspresi Rabgef1 lebih mirip eritroid, diperkuat pada semua leukemia yang disebabkan oleh Graffi lainnya dan pada semua lini sel manusia yang diuji, menunjukkan keberadaannya di mana-mana. ekspresi pada sel hematopoietik. Cda, bertanggung jawab atas Resistensi terhadap pengobatan kemoterapi, sangat diekspresikan. pada eritroleukemia kami, pada HB22.2, K562 dan HEL. Basis data GEO menunjukkan bahwa CDA mengalami peningkatan regulasi selama diferensiasi sel CD34+ manusia menuju eritroid garis keturunan (NCBI GEO, GSE4655). Hingga hari ini, Btbd14a belum pernah dipelajari. Ekspresinya sangat tinggi pada eritroleukemia yang diinduksi Graffi dan pada HB22.2. Akhirnya, Btbd14a tampak diekspresikan secara luas di sistem hematopoietik. Domain BTB/POZ dari Btbd14a terdapat di banyak onkogen yang terlibat dalam perkembangan leukemia dan sering ditemukan di ujung N dari faktor transkripsi. Oleh karena itu, gen ini sangat menarik. untuk studi lebih lanjut karena menunjukkan penurunan ekspresi selama HB22.2 menginduksi diferensiasi dan dapat mewakili onkogen potensial.

Tanda Tangan MkMB

Sejumlah gen umumnya diekspresikan secara berlebihan pada megakaryoblastik, leukemia myeloid dan/atau leukemia sel B. Gen-gen ini, dalam kebanyakan kasus, sudah ada. diketahui diekspresikan oleh sel-sel yang terlibat dalam kekebalan bawaan kekebalan. Fungsi trombosit terlalu sering dianggap terbatas pada pembekuan darah dan pembentukan trombosis. tetapi beberapa penelitian sekarang menekankan peran trombosis diremehkan dalam imunitas bawaan dan peradangan respons [39,69-72]. Setelah aktivasi, trombosit dapat melepaskan protein antimikroba, interleukin yang memicu respons peradangan umum dan kemokin yang merekrut sel imun seperti leukosit. Patogen seperti karena bakteri dan lentivirus dapat dicerna oleh trombosit. [73]. Tanda tangan MKMB tampaknya mencerminkan sebagian kompleksitas fungsi trombosit. Hanya sedikit contoh yang ditunjukkan pada Tabel 2 tetapi daftar lengkapnya tersedia dalam data tambahan [19]. Desain yang unik dari studi ekspresi gen ini yang membandingkan berbagai Berbagai jenis leukemia menyoroti ciri khas ini.

Integrasi retrovirus dan gen yang berpotensi terlibat dalam awal mula penyakit

Analisis integrasi retrovirus memungkinkan identifikasi gen yang mungkin bertanggung jawab atas keganasan. transformasi. Dalam penelitian ini, kami meneliti 3 leukemia megakaryoblastik untuk mencari lokasi integrasi virus sebagai Peristiwa transformasi onkogenik yang menyebabkan leukemia megakaryoblastik masih belum diketahui. Tidak ada CIS yang teridentifikasi, tetapi beberapa gen dalam RTGGD telah menarik perhatian kami.

Gen-gen ini mendapat perhatian karena fungsinya yang telah diketahui. Di antara gen-gen ini, Kit dan Gata2 sangat menarik karena bukti-bukti yang terkumpul menunjukkan peran mereka dalam megakariopesis dan leukemia megakarioblastik.

Gata2 baru-baru ini dilaporkan untuk pertama kalinya sebagai situs integrasi umum pada leukemia yang diinduksi oleh retrovirus MOL4070LTR pada tikus NHD13 [74]. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa ekspresi berlebihan Gata2 mengarahkan diferensiasi hematopoietik dari garis keturunan makrofag menuju garis keturunan eritroid atau megakariosit atau dari garis keturunan eritroid menuju garis keturunan megakariosit [55,75]. Pentingnya Gata2 pada megakariopesis juga ditunjukkan dalam studi diferensiasi di mana gen ini sangat terinduksi dan dipertahankan setelah pengobatan trombopoietin pada sel CD34+ tetapi hanya terinduksi lemah setelah pengobatan eritropoietin [58]. Para penulis membuat hipotesis menarik bahwa GATA2 mungkin menekan ekspresi penanda eritroid pada sel megakariosit yang matang karena aktivitasnya menghambat diferensiasi eritroid dalam beberapa sistem.

Kit terlibat dalam banyak kanker dan diatur oleh kompleks SCL (Gata1/2, SCL, Lmo2) dalam sel hematopoietik [76]. Bukti lebih lanjut mulai muncul mengenai perannya dalam tahap awal megakaryopesis [77,78] dan dalam leukemia megakaryoblastik [79,80]. Bourquin dkk. melaporkan peningkatan kadar KIT, GATA2 dan MYC pada sel DS AMKL yang mengandung mutasi GATA1 dibandingkan dengan sel non-DS AMKL. Mereka berhipotesis bahwa GATA1 yang bermutasi pada sel DS AMKL gagal menekan ekspresi ketiga gen ini [79].

Ketiga leukemia megakaryoblastik tersebut mengekspresikan kadar Kit dan Gata2 yang sangat tinggi. Kami berhipotesis bahwa integrasi virus dapat memblokir represi gen-gen ini dengan terus menerus mengaktifkan transkripsi atau menghambat pengikatan molekul represor. Kadar Kit dan Gata2 biasanya menurun selama diferensiasi megakaryositik (Tabel 2 'GSE6593'). Kedua gen ini, yang dipengaruhi oleh integrasi retrovirus, akan mengirimkan sinyal proliferasi dan kelangsungan hidup secara terus menerus ke sel. Analisis sampel leukemia megakaryoblastik yang diinduksi Graffi yang lebih besar diperlukan untuk membuktikan secara lebih efisien keterlibatan Gata2 dan Kit dalam jenis leukemia tertentu ini.

Kesimpulan

Dalam laporan ini, kami membandingkan profil gen leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang diinduksi oleh virus Graffi. Studi kami mengidentifikasi gen yang diekspresikan secara tinggi pada leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang diinduksi Graffi. Kumpulan data lengkap studi ini tersedia (GSE12581 dan [19]). Dalam data tersebut, banyak gen yang belum diberi fungsi yang diketahui dan beberapa di antaranya dapat digunakan sebagai penanda untuk jenis leukemia tertentu dan bahkan target terapi baru. Kami memilih dan RT-PCR

Gen-gen yang telah divalidasi dan berfungsi dalam sel normal masih kurang dipahami. Sebagian besar ekspresinya dalam garis keturunan ini ditunjukkan untuk pertama kalinya, dan karakterisasi fungsional lebih lanjut pasti akan melengkapi pengetahuan tentang garis keturunan eritroid dan megakaryositik.

Berkas tambahan 1: Oligonukleotida yang digunakan dalam percobaan RT-PCR. Urutan primer maju dan mundur yang digunakan dalam percobaan RT-PCR.
[Klik di sini untuk berkas](#)
[\[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-3-2-S1.DOC \]](http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-3-2-S1.DOC)

Berkas tambahan 2: Imunofenotipe sampel leukemia yang dipilih untuk eksperimen mikroarray. Tabel ini mencantumkan leukemia yang termasuk dalam eksperimen mikroarray, termasuk nama sampel, jenis leukemia, imunofenotipe, antibodi yang digunakan untuk penyortiran, dan asal tumor.

[Klik di sini untuk file](#)
[\[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-3-2-S2.DOC \]](http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-3-2-S2.DOC)

Ucapan Terima Kasih

Kami berterima kasih kepada André Ponton, Michał Blazejczyk, dan Mathieu Miron dari Universitas McGill dan Pusat Inovasi Genome Quebec (Montreal, Kanada) atas bantuan mereka dalam desain dan analisis eksperimen microarray. Pekerjaan ini didukung oleh hibah Canadian Institutes of Health Research MOP-37994 (ER) dan MOP-84460 (YBD).

Detail penulis

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire, Département des Sciences Biologiques, Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, Case Postale 8888 Succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C-3P8, Kanada. ²Sunnybrook Health Sciences Center, 2075 Bayview Ave. S223B, Toronto, ON, M4N 3M5, Kanada.

Kontribusi Penulis: VV

merancang dan melakukan eksperimen microarray, RT-PCR, uji diferensiasi, dan kloning situs insersi virus, menganalisis dan menafsirkan data, serta menulis manuskrip. PL melakukan eksperimen RT-PCR pada lini sel hematopoietik manusia. DPSO mengoptimalkan protokol untuk kloning situs integrasi virus. YBD menyediakan lini sel HB22.2, K562, dan HEL serta merevisi manuskrip secara kritis. ER membimbing proyek dan menulis manuskrip. Semua penulis membaca dan menyetujui manuskrip akhir.

Konflik kepentingan Para

penulis menyatakan bahwa mereka tidak memiliki konflik kepentingan.

Diterima: 17 Agustus 2009

Diterima: 26 Januari 2010 Diterbitkan: 26 Januari 2010

Referensi 1.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Kriteria untuk diagnosis leukemia akut garis keturunan megakariosit (M7). Laporan dari Kelompok Kerja Sama Prancis-Amerika-Inggris. Ann Intern Med 1985, 103(3):460-462.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Usulan untuk klasifikasi leukemia akut. Kelompok kerja sama Prancis-Amerika-Inggris (FAB). Jurnal hematologi Inggris 1976, 33(4):451-458.
3. Colita A, Belhabri A, Chelghoum Y, Charrin C, Fiore D, Thomas X : Faktor prognostik dan efek pengobatan terhadap kelangsungan hidup pada leukemia myeloid akut subtipo M6: Studi retrospektif 54 kasus. Annals of Oncology 2001, 12:451-455.
4. Wells AW, Bown N, Reid MM, Hamilton PJ, Jackson GH, Taylor PR: Eritroleukemia di Inggris bagian utara: sebuah studi berbasis populasi. Jurnal Patologi Klinis 2001, 54:608-612.

5. Domingo-Claras A, Larriba I, Rozman M, Irrigubile D, Vallespi T, Aventin A, Ayats R, Milla F, Sole F, Florensa L, dkk : Proliferasi neoplastik eritroid akut. Sebuah studi biologis berdasarkan 62 pasien. *Hematologi* 2002, 87(2):148-153.
6. Rogelio Paredes-Aguilera LR-GNL-SRAT: Biologi, gambaran klinis, dan hematologi leukemia megakaryoblastik akut pada anak-anak. *American Journal of Hematology* 2003, 73:71-80.
7. Garderet L, Labopin M, Gorin NC, Polge E, Baruchel A, Meloni G, Ortega J, Vossen J, Bunjes D, Leverger G, et al : Transplantasi sel induk hematopoietik untuk leukemia megakaryositik akut de novo dalam remisi lengkap pertama: studi retrospektif dari Kelompok Eropa untuk Transplantasi Darah dan Sumsum (EBMT). *Blood* 2005, 105(1):405-409.
8. Park S, Picard F, Dreyfus F: Eritroleukemia: kebutuhan akan definisi baru. *Leukemia* 2002, 16(8):1399-1401.
9. Linari S, Vannucchi AM, Ciolfi S, Leoni F, Caporale R, Grossi A, Pagliai G, Santini V, Paoletti F, Ferrini PR: Koekspresi gen eritroid dan megakaryositik pada leukemia eritroblastik akut (FAB M6) dan megakaryoblastik (FAB M7). *Jurnal Hematologi Inggris* 1998, 102(5):1335-1337.
10. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W: Karakterisasi progenitor eritro-megakaryosit bipoten pada sumsum tulang manusia. *Blood* 1996, 88(4):1284-1296.
11. Nakorn TN, Miyamoto T, Weissman IL: Karakterisasi tikus Progenitor megakaryosit klonogenik. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 2003, 100(1):205-210.
12. Voisin V, Barat C, Hoang T, Rassart E: Wawasan baru tentang patogenesis retrovirus leukemia murine Graffi. *J Virol* 2006, 80(8):4026-4037.
13. Blazejczyk M, Miron M, Nadon R: FlexArray: Analisis data statistik Perangkat lunak untuk microarray ekspresi gen. *Genome Quebec*, Montreal, Kanada, URL <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>. 2007.
14. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Analisis klaster dan tampilan pola ekspresi genomik. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 1998, 95(25):14863-14868.
15. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR: Menginterpretasikan pola ekspresi gen dengan peta pengorganisasian diri: metode dan aplikasi pada diferensiasi hematopoietik. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 1999, 96(6):2907-2912.
16. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Analisis signifikansi microarray diterapkan pada respons radiasi pengion. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 2001, 98(9):5116-5121.
17. Wong KS, Li YJ, Howard J, Ben-David Y: Hilangnya p53 pada leukemia eritrosit yang diinduksi F-MuLV mempercepat perolehan peristiwa mutasi yang memberikan keabadian dan independensi faktor pertumbuhan. *Onkogen* 1999, 18(40):5525-5534.
18. Mikkers H, Allen J, Knipscheer P, Romeijn L, Hart A, Vink E, Berns A: Penandaan retroviral throughput tinggi untuk mengidentifikasi komponen jalur pensinyalan spesifik pada kanker. *Genetika alam* 2002, 32(1):153-159.
19. Voisin V, Rassart E: Leukemia eritroid dan megakaryoblastik yang diinduksi oleh retrovirus murine Graffi Profiling ekspresi gen MOE 430.2 GEO: GSE12581 Analisis tambahan dan file excel yang dapat diunduh URL: <http://www.biomed.uqam.ca/rassart/microarray.html>. 2009.
20. Hao X, Shin MS, Zhou JX, Lee CH, Qi CF, Naghashfar Z, Hartley JW, Fredrickson TN, Ward JM, Morse HC : Karakterisasi histologis dan molekuler leukemia megakaryositik pada tikus. *Leuk Res* 2006, 30(4):397-406, Epub 2005 Okt 2010.
21. Hamlett I, Draper J, Strouboulis J, Iborra F, Porcher C, Vyas P: Karakterisasi protein yang berinteraksi dengan GATA1 pada megakaryosit: korepresor ETO2 dan GATA1 berinteraksi untuk mengatur pemotongan megakaryosit terminal. *Blood* 2008, 112(7):2738-2749.
22. Nucifora G, Laricchia-Robbio L, Senyuk V: EVI1 dan gangguan hematopoietik: sejarah dan perspektif. *Gene* 2006, 368:1-11.
23. Kilbey A, Alzuherri H, McColl J, Cales C, Frampton J, Bartholomew C : Proto-onkopeptin Evi1 memblokir endomitosis pada megakaryosit dengan menghambat aktivitas katalitik kinase 2 dependen siklin yang berkelanjutan. *Jurnal Hematologi Inggris* 2005, 130(6):902-911.
24. Bond HM, Mesuraca M, Carboni E, Bonelli P, Agosti V, Amodio N, De Rosa G, Di Nicola M, Gianni AM, Moore MA, et al : Protein jari seng hematopoietik awal (EHZF), homolog manusia dari Evi3 tikus, diekspresikan secara tinggi dalam sel hematopoietik primitif manusia. *Blood* 2004, 103(6):2062-2070.
25. Hentges KE, Weiser KC, Schountz T, Woodward LS, Morse HC, Justice MJ: Evi3, protein jari-seng yang terkait dengan EBFAZ, mengatur aktivitas EBF pada leukemia sel B. *Onkogen* 2005, 24(7):1220-1230.
26. Hu L, Sham JS, Xie D, Wen JM, Wang WS, Wang Y, Guan XY: Peningkatan regulasi faktor pertumbuhan fibroblast 3 dikaitkan dengan metastasis dan kekambuhan tumor pada karsinoma hepatoseluler manusia. *Cancer Lett* 2007, 252(1):36-42.
27. van Lohuizen M, Breuer M, Berns A: N-myc sering diaktifkan oleh penyisipan provirus pada limfoma sel T yang diinduksi MuLV. *Embo J* 1989, 8(1):133-136.
28. Yancopoulos GD, Nisen PD, Tesfaye A, Kohl NE, Goldfarb MP, Alt FW: N-myc dapat bekerja sama dengan ras untuk mentransformasi sel normal dalam kultur. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82(16):5455-5459.
29. Cheng JD, Valianou M, Canutescu AA, Jaffe EK, Lee HO, Wang H, Lai JH, Bachovchin WW, Weiner LM: Penghapusan aktivitas enzim protein aktivasi fibroblas melemahkan pertumbuhan tumor. *Mol Cancer Ther* 2005, 4(3):351-360.
30. Rogulski KR, Cohen DE, Corcoran DL, Benos PV, Prochownik EV: Deregulasi gen umum oleh c-Myc dan target langsungnya, MT-MC1. *Prosiding Akademi Ilmu Pengetahuan Nasional Amerika Serikat* 2005, 102(52):18968-18973.
31. Yates KE, Gasson JC: Peran c-Fes dalam hematopoiesis normal dan neoplastik. Sel punca (Dayton, Ohio) 1996, 14(1):117-123.
32. Emilia G, Donelli A, Ferrari S, Torelli U, Selleri L, Zucchini P, Moretti L, Venturelli D, Ceccherelli G, Torelli G: Tingkat seluler mRNA dari gen onkogen c-myc, c-myb dan c-fes pada prekursor mieloid dan eritroid normal sumsum tulang manusia: studi hibridasi in situ. *Jurnal Hematologi Inggris* 1986, 62(2):287-292.
33. Fox AH, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J, Crossley M: Kofaktor transkripsi keluarga FOG berinteraksi dengan protein GATA melalui beberapa jari seng. *Jurnal EMBO* 1999, 18(10):2812-2822.
34. Hromas R, Orazi A, Neiman RS, Maki R, Van Beveren C, Moore J, Klemz M: Ekspresi terbatas garis keturunan dan stadium hematopoietik dari anggota keluarga onkogen ETS PU.1. *Blood* 1993, 82(10):2998-3004.
35. Doubeikovski A, Uzan G, Doubeikovski Z, Prandini MH, Porteu F, Gisselbrecht S, Dusante-Fourt I: Ekspresi gen glikoprotein IIb yang diinduksi trombopoietin melibatkan faktor transkripsi PU.1/Spi-1 pada sel UT7-Mpl. *Jurnal kimia biologi* 1997, 272(39):24300-24307.
36. Denicourt C, Edouard E, Rassart E: Aktivasi onkogen pada mieloid leukemia akibat integrasi provirus virus leukemia murine Graffi. *J Virol* 1999, 73(5):4439-4442.
37. Chen Z, Hu M, Shivedasani RA: Analisis ekspresi pada tikus primer Diferensiasi megakaryosit dan aplikasinya dalam mengidentifikasi penanda molekuler spesifik tahap dan target transkripsi baru dari NF-E2. *Darah* 2007, 109(4):1451-1459.
38. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P: Trombosit mengekspresikan reseptor Toll-like-4 fungsional. *Blood* 2005, 106(7):2417-2423.
39. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O: Bukti adanya molekul reseptor Toll-like pada trombosit manusia. *Imunologi dan biologi sel* 2005, 83(2):196-198.
40. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, Blobel GA, Chodosh LA, Weiss MJ: Regulasi global ekspresi gen eritroid oleh faktor transkripsi GATA-1. *Blood* 2004, 104(10):3136-3147.
41. Fang J, Menon M, Kapelle W, Bogacheva O, Bogachev O, Houde E, Browne S, Sathyarayana P, Wojchowski DM: Modulasi EPO terhadap gen pengatur siklus sel, dan pembelahan sel, pada eritroblas sumsum tulang primer . *Blood* 2007, 110(7):2361-2370.
42. Sathyarayana P, Menon MP, Bogacheva O, Bogachev O, Niss K, Kapelle WS, Houde E, Fang J, Wojchowski DM: Modulasi eritropoietin terhadap podocalyxin dan ceruk eritroblas yang diusulkan. *Blood* 2007, 110(2):509-518.
43. Sathyarayana P, Dev A, Fang J, Houde E, Bogacheva O, Bogachev O, Menon M, Browne S, Pradeep A, Emerson C, dkk: Sirkuit reseptor EPO untuk kelangsungan hidup eritroblas primer. *Blood* 2008, 111(11):5390-5399.
44. Dreyfus F, Sola B, Fichelton S, Varlet P, Charon M, Tambourin P, Wendling F, Gisselbrecht S: Penataan ulang gen Pim-1, c-myc, dan p53 pada eritroleukemia tikus yang diinduksi virus Friend helper. *Leukemia* 1990, 4(8):590-594.

45. Breslin A, Dennis FA, Guinn BA: SSX2IP: peran yang muncul dalam kanker. Komunikasi penelitian biokimia dan biofisika 2007, 363(3):462-465.
46. Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD: Hidrolisis GTP pada rab11 diperlukan untuk pengiriman langsung transferrin dari kompartemen daur ulang perisentriolar ke permukaan sel tetapi tidak dari endosom sortasi. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 1998, 95(11):6187-6192.
47. Westlake CJ, Junutula JR, Simon GC, Pilli M, Prekeris R, Scheller RH, Jackson PK, Eldridge AG: Identifikasi Rab11 sebagai protein pengikat GTPase kecil untuk onkogen Evi5. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 2007, 104(4):1236-1241.
48. Palmieri D, Bouadis A, Ronchetti R, Merino MJ, Steeg PS: Rab11a memodulasi secara berbeda proliferasi dan motilitas yang diinduksi faktor pertumbuhan epidermal pada sel payudara abadi. Penelitian dan pengobatan kanker payudara 2006, 100(2):127-137.
49. Yan J, Tsai SY, Tsai MJ: SRC-3/AIB1: koaktivator transkripsi dalam onkogenesis. Acta pharmacologica Sinica 2006, 27(4):387-394.
50. Akagi K, Suzuki T, Stephens RM, Jenkins NA, Copeland NG: RTCGD: Basis data gen kanker bertanda retrovirus. Penelitian asam nukleat 2004, , 32 Basis data: D523-527.
51. Malin D, Kim IM, Boetticher E, Kalin TV, Ramakrishna S, Meliton L, Ustiyan V, Zhu X, Kalinichenko VV: Forkhead box F1 sangat penting untuk migrasi sel mesenkim dan secara langsung menginduksi ekspresi integrin-beta3. Biologi molekuler dan seluler 2007, 27(7):2486-2498.
52. Ma SL, Sorensen AB, Kunder S, Sorensen KD, Quintanilla-Martinez L, Morris DW, Schmidt J, Pedersen FS: Lokus lcsbp adalah situs insersi proviral umum pada limfoma/plasmacytoma sel B matang yang diinduksi oleh virus leukemia murine eksogen. Virologi 2006, 352(2):306-318.
53. Cheli Y, Kanaji S, Jacquelin B, Chang M, Nugent DJ, Kunicki TJ: Regulasi transkripsional dan epigenetik dari lokus reseptör kolagen integrin ITGA1-PELO-ITGA2. Biochimica et biophysica acta 2007, 1769(9-10):546-558.
54. Hitzler JK, Zipursky A: Asal mula leukemia pada anak-anak dengan sindrom Down. Nat Rev Cancer 2005, 5(1):11-20.
55. Kitajima K, Tanaka M, Zheng J, Yen H, Sato A, Sugiyama D, Umehara H, Sakai E, Nakano T: Mengarahkan diferensiasi nenek moyang hematopoietik dengan faktor transkripsi, GATA-2. Darah 2006, 107(5):1857-1863.
56. Chinnadurai G: CtBP, sebuah korepresor transkripsional yang tidak konvensional dalam perkembangan dan onkogenesis. Sel Molekuler 2002, 9(2):213-224.
57. Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, Mitani K : Hematopoiesis definitif displastik pada embrio knock-in AML1/EV1. Blood 2005, 106(6):2147-2155.
58. Terui K, Takahashi Y, Kitazawa J, Toki T, Yokoyama M, Ito E: Ekspresi faktor transkripsi selama diferensiasi megakariositik sel CD34+ dari darah tali pusat manusia yang diinduksi oleh trombopoietin. Jurnal Kedokteran Eksperimental Tohoku 2000, 192(4):259-273.
59. Yuasa H, Oike Y, Iwama A, Nishikata I, Sugiyama D, Perkins A, Mucenski ML, Suda T, Morishita K: Faktor transkripsi onkogenik Evi1 mengatur proliferasi sel induk hematopoietik melalui ekspresi GATA-2. Jurnal EMBO 2005, 24(11):1976-1987.
60. Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, Murakami Y : Penghambatan Angiogenesis pada lini sel glioma manusia oleh RNA antisens dari gen guanylate cyclase terlarut, GUCY1A3 dan GUCY1B3. Laporan Onkologi 2004, 12(1):47-52.
61. Battinelli E, Willoughby SR, Foxall T, Valeri CR, Loscalzo J: Induksi pembentukan trombosit dari sel megakaryositoid oleh oksida nitrat. Prosiding Akademi Ilmu Pengetahuan Nasional Amerika Serikat 2001, 98(25):14458-14463.
62. Ciuman RS, Ma Z, Nakada-Tsukui K, Brugnera E, Vassiliou G, McBride HM, Ravichandran KS, Marcel YL: Protein adaptor lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) GULP memediasi pengangkutan ligan LRP prosaposin, yang menyebabkan akumulasi sfingolipid dan kolesterol bebas di endosom akhir dan gangguan pengeluaran. Jurnal Kimia Biologi 2006, 281(17):12081-12092.
63. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ : Reseptor keluarga SLAM membedakan sel induk dan progenitor hematopoietik dan mengungkapkan ceruk endotel untuk sel induk. Cell 2005, 121(7):1109-1121.
64. Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, Ohtaka-Maruyama C, Okado H, Hashimoto M: Ekspresi alfa-sinuklein, sebuah Protein presinaptik yang terlibat dalam penyakit Parkinson, dalam garis keturunan eritropoietik. Komunikasi penelitian biokimia dan biofisika 2007, 358(1):104-110.
65. Scherzer CR, Grass JA, Liao Z, Pepivani I, Zheng B, Eklund AC, Ney PA, Ng J, McGoldrick M, Mollenhauer B, et al: Faktor transkripsi GATA secara langsung mengatur gen alfa-sinuklein yang terkait dengan penyakit Parkinson. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 2008, 105(31):10907-10912.
66. Vehvilainen P, Hytytainen M, Keski-Oja J: Pertumbuhan Transformasi Laten Protein Pengikat Faktor-b 2 adalah Protein Adhesi untuk Sel Melanoma. Jurnal Kimia Biokimia 2003, 278:24705-24713.
67. Mattera R, Tsai YC, Weissman AM, Bonifacino JS: Rab5 guanine Faktor pertukaran nukleotida Rabex-5 mengikat ubiquitin (Ub) dan berfungsi sebagai ligase Ub melalui motif interaksi Ub atipikal dan domain jari seng. Jurnal kimia biologi 2006, 281(10):6874-6883.
68. Kalesnikoff J, Rios EJ, Chen CC, Nakae S, Zabel BA, Butcher EC, Tsai M, Tam SY, Galli SJ: RabGEF1 mengatur peristiwa pensinyalan yang dimediasi oleh faktor sel induk/c-Kit dan respons biologis pada sel mast. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 2006, 103:2659-2664.
69. Weyrich AS, Zimmerman GA: Trombosit: sel pemberi sinyal dalam kontinum imun . Tren dalam imunologi 2004, 25(9):489-495.
70. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL: Peran baru trombosit dalam imunitas adaptif. Imunologi seluler 2005, 238(1):1-9.
71. Sprague DL, Sowa JM, Elzey BD, Ratliff TL: Peran CD154 trombosit dalam modulasi imunitas adaptif. Penelitian imunologi 2007, 39(1-3):185-193.
72. von Hundelshausen P, Weber C: Trombosit sebagai sel imun: menjembatani peradangan dan penyakit kardiovaskular. Penelitian sirkulasi 2007, 100(1):27-40.
73. Tanaka M, Aze Y, Fujita T: Pengaruh molekul adhesi LFA-1/ICAM-1 terhadap emperipolesis megakaryositik yang diinduksi LPS pada sumsum tulang tikus. Patologi Veteriner 1997, 34(5):463-466.
74. Slape C, Hartung H, Lin YW, Bies J, Wolff L, Aplan PD: Mutagenesis insersional retroviral mengidentifikasi gen yang berkolaborasi dengan NUP98-HOXD13 selama transformasi leukemik. Penelitian kanker 2007, 67(11):5148-5155.
75. Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT: Ekspresi berlebihan GATA-2 menghambat diferensiasi eritroid dan mendorong diferensiasi megakaryosit. Hematologi eksperimental 2000, 28(12):1423-1431.
76. Leucy E, Hoang T: SCL: dari asal mula hematopoiesis hingga sel punca dan leukemia. Hematologi eksperimental 2004, 32(1):11-24.
77. Antonchuk J, Hyland CD, Hilton DJ, Alexander WS: Efek sinergis pada eritropoiesis, trombopoiesis, dan daya saing sel induk pada tikus yang kekurangan reseptor trombopoietin dan faktor baja. Blood 2004, 104(5):1306-1313.
78. Zeuner A, Signore M, Martinetti D, Bartucci M, Peschle C, De Maria R: Trombositopenia yang diinduksi kemoterapi berasal dari kematian selektif progenitor megakaryosit dan dapat diselamatkan oleh faktor sel induk. Penelitian kanker 2007, 67(10):4767-4773.
79. Bourquin JP, Subramanian A, Langebrake C, Reinhardt D, Bernard O, Ballerini P, Baruchel A, Cave H, Dastugue N, Hasle H, et al: Identifikasi fenotipe molekuler yang berbeda pada leukemia megakaryoblastik akut melalui profil ekspresi gen. Prosiding Akademi Sains Nasional Amerika Serikat 2006, 103(9):3339-3344.
80. Toki T, Kanezaki R, Adachi S, Fujino H, Xu G, Sato T, Suzuki K, Tauchi H, Endo M, Ito E: Peran kunci pensinyalan faktor sel induk/KIT dalam proliferasi sel blast dari leukemia terkait sindrom Down. Leukemia 2009, 23(1):95-103.
- Riwayat pra-publikasi
Riwayat pra- publikasi untuk makalah ini dapat diakses di sini: http://www.biomedcentral.com/1755-8794/3/2/prepub

doi:10.1186/1755-8794-3-2

Kutip artikel ini sebagai: Voisin dkk.: Profiling gen leukemia eritro- dan megakaryoblastik yang diinduksi oleh retrovirus murine Graffi. BMC Medical Genomics 2010 3:2.