

骨髓增生异常综合征中 U2AF1 突变的研究进展

董孝杰 陆嘉惠 陶雨晨

摘要 骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一组起源于造血干细胞,以骨髓病态造血,高风险向急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)转化为特征的异质性髓系肿瘤。剪接体基因是 MDS 患者常见的突变靶点之一,这些突变在 50%~60% 的 MDS 患者中发生,其中 RNA 剪接体基因 U2AF1 能够影响 MDS 患者 mRNA 的异常剪接和造血系统。目前已有研究证明 U2AF1 突变是 MDS 的预后不良因素,故针对 U2AF1 突变的研究对于 MDS 患者具有较高的临床意义。文章总结了近年来 U2AF1 在 MDS 中的研究进展,就 U2AF1 突变所改变的剪切机制及其对 MDS 的影响做一综述。

关键词 剪接体基因 U2AF1 骨髓增生异常综合征 研究进展

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.05.005

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一种血液系统髓系恶性肿瘤,其特征是造血干细胞克隆性增殖、反复遗传异常、骨髓增生异常、造血功能低下、外周血细胞减少以及向急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)转化为特征的异质性髓系肿瘤性疾病^[1]。约 80% 的 MDS 患者可以检测出至少 1 种类型的基因突变,这些基因是 MDS 发病机制的核心,其主要包括 RNA 剪接基因、DNA 甲基化基因、转录调节基因、信号转导基因、DNA 修复基因、染色质修饰基因和黏蛋白复合物等^[2]。

剪接体基因是 MDS 患者常见的突变靶点之一,这些突变在 50%~60% 的 MDS 患者中发生,常见的突变基因有 U2AF1、SF3B1、SRSF2 和 ZRSR2 等^[2]。剪接机制被认为是产生成熟 mRNA 分子的必要条件,现也被广泛理解为一种共转录和转录后机制,除了能改变基因产物功能外,对基因的表达和调节也至关重要^[3]。U2AF1 突变即为剪接体突变中的一种,约 11% 的 MDS 病例中发现有 U2AF1 突变,且 U2AF1 突变常与预后不良相关^[4,5]。近年来有研究还表明,亚洲人 MDS 患者 U2AF1 的突变发生频率为 13.25% 左右,约为西方 MDS 发病人群的 2 倍^[6]。

U2AF1 即 U2 小核 RNA 辅助因子 1,是 U2AF 异二聚体的一个小亚单位,位于 21q22.3 处,它能够编码 U2 前体 mRNA 剪接复合物的辅助因子,该因子识别并结合内含子 3'端的 AG 二核苷酸并激活剪接复合物^[7]。U2AF1 突变导致 RNA 剪接过程的改变,并发生跳跃剪接,在 U2AF1 中已经报道了 11 种不同的突变体,包括 9 种错义突变体(导致 A26V、S34F/Y、R35L、R156H/Q、Q157P/R 或 G213A 替换)和两种移码突变体(影响密码子 Q157 或 E159),其中 S34 和 Q157 是最常见的突变残基^[7,8]。

一、MDS 中的 U2AF1 突变

U2AF1 突变会对 MDS 患者的造血功能产生影响,Fei 等^[9]将 U2AF1 S34F 突变通过 Cre 重组酶的作用组装在内源性 U2AF1 位点并建立基因工程小鼠模型,研究结果表明,通过激活这些小鼠的 Cre 重组酶产生 U2AF1 S34F 突变后,小鼠细胞的前体 mRNA 发生异常剪接,且 U2AF1 S34F 突变小鼠出现造血受损及多系细胞减少和发育不良,这与人类 MDS 的特征一致。Shirai 等^[10]的研究也证实了 U2AF1 S34F 突变转基因小鼠的造血细胞系会发生改变,小鼠的 B 淋巴细胞和单核细胞减少,且 U2AF1 S34F 突变表达影响 RNA 加工相关基因、翻译过程或核糖体基因和 MDS/AML 中反复突变的基因,这些结果都表明 U2AF1 S34F 突变诱导的选择性剪接通过改变下游基因亚型的表达改变 MDS 患者的造血,导致 MDS 患者造血异常。

二、U2AF1 突变的作用机制

1. 免疫途径激活和炎症反应发生:先天免疫途径在调节造血中起重要作用,先天免疫途径信号异常会

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81873286);上海市优秀学术带头人计划项目(20XD1403500);上海市卫生系统优秀人才培养计划项目(2018BR15);上海市科学技术委员会医学创新研究专项重大项目(21Y31920400);上海申康医院发展中心临床科技创新项目(SHDC12020128)

作者单位:200071 上海中医药大学附属市中医医院(董孝杰、陆嘉惠、陶雨晨);201203 上海中医药大学(董孝杰、陆嘉惠、陶雨晨)

通信作者:陆嘉惠,主任医师,教授,电子信箱:lujiahui73@163.com

导致 MDS 中的造血失调和发育不良,而炎症相关途径失调与 MDS 的克隆性造血及造血缺陷有关^[11]。U2AF1 突变会激活免疫途径和炎症反应的发生,最终导致 MDS 疾病进展。

(1)U2AF1 突变介导 IRAK4 - L 的表达:炎症和免疫基因的选择性剪接亚型常常与 MDS 中的致癌信号相关。白细胞介素 - 1 受体相关激酶 4(interleukin - 1 receptor - associated kinase 4, IRAK4)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,介导 Toll 样受体(TLR)超家族下游的信号转导,导致炎症的发生^[12]。近年来研究发现,IRAK4 是 MDS/AML 中占主导地位的选择性剪接亚型,对白血病细胞的功能至关重要,在 MDS/AML 中经历 RNA 亚型转换的炎症和免疫途径基因中,IRAK4 的亚型表达变化最为显著,而 IRAK4 的亚型能够编码一个较长的蛋白质,即 IRAK4 - L,突变型 U2AF1 剪接体能够直接介导 IRAK4 - L 的表达,IRAK4 - L 与 MyD88 结合后形成 myddosome 复合物,促使 NF - κ B 和 MAPK 的最大激活,最终导致免疫途径激活和炎症的发生^[13]。

(2)U2AF1 突变激活并上调 FOXO3a:叉头框蛋白 O3a(forkhead box protein O3a, FOXO3a)在恶性肿瘤进展中与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NOD - like receptor protein 3, NLRP3)炎症体介导的炎症反应密切相关^[14-16]。近年来研究表明,U2AF1 S34F 突变通过抑制 PI₃K/Akt 信号通路,并伴随细胞周期调节因子 p21^{Cip1}和 p27^{Kip1}的反式激活,从而上调 FOXO3a,促进 Bim 的转录活性以及降低 c - Myc 基因的表达,调控自噬通量并激活 NLRP3 炎症体,最终诱导 IL - 1 β 的释放和 caspase - 1 的产生促使细胞焦亡,导致 MDS 疾病进展^[5]。

2. 转录与翻译调控翻译:调控和核糖体生物的变化是髓系疾病的标志,而 R 环的增加与 MDS 的发生有直接关系,增强的 R 环与骨髓源性血祖细胞的增殖受损有关^[17,18]。U2AF1 突变则会导致 mRNA 翻译水平的升高以及 R 环的增加。

(1)U2AF1 突变导致 mRNA 翻译水平的净增加:在 MDS 患者中造血干细胞的 mRNA 翻译水平常升高^[18]。核磷蛋白 1(NPM1)是一种核酸结合蛋白,参与核糖体 RNA(rRNA)的加工和核质转运,是 U2AF1 S34F 突变的最高翻译上调靶点,并且是 U2AF1 S34F 突变介导致癌变化的下游效应器^[19]。研究表明,U2AF1 S34F 突变能够改变翻译起始因子的水平,导致参与翻译起始蛋白质信息编码的翻译效率产生变

化,其翻译起始机制的失调会导致 mRNA 翻译水平的净增加,而 U2AF1 S34F 突变细胞需要 NPM1 和 IPO7 等核糖体合成因子才能增殖,NPM1 的缺失会损害 U2AF1 S34F 突变细胞中的 rRNA 合成或加工,导致细胞增殖减缓并使其在 S 期积累,故表明 U2AF1 S34F 突变维持高度增殖状态依赖核糖体的合成,证明 U2AF1 S34F 突变对 NPM1 的体外“非癌基因依赖性”^[20]。

(2)U2AF1 突变诱导 R 环的积累:R 环是由 DNA:RNA 杂交和移位的单链 DNA(ssDNA)组成的转录中间产物,已知它们通过暴露单链 DNA 和阻断复制叉进程,导致复制应激和 DNA 损伤,从而导致基因组不稳定^[21]。MDS 相关的编码剪接体(如 SF3B1、U2AF1、SRSF2 等)突变会诱导 R 环的形成增加,这导致复制应激增加和 Rad3 相关蛋白(ataxia telangiectasia and rad3 - related, ATR)信号通路的相关激活,剪接体突变细胞依赖 ATR 的功能,以保持其基因组的完整性,而 ATR 的药理学抑制通过增加 DNA 损伤优先杀死剪接体突变细胞,进一步表明在 MDS 患者的剪接体突变细胞中,剪接调节剂能够抑制 ATR,并选择性地靶向作用于剪接体突变细胞,同时保留健康的非突变造血细胞^[22,23]。另一项研究也表明,U2AF1 S34F 突变体表达的 RNA 剪接扰乱会导致 R 环的积累,并引发 ATR 反应,ATR 通过抑制 DNA 损伤促使 U2AF1 S34F 突变表达细胞的存活,而使用 ATR 抑制剂(ATRi)会在表达 U2AF1 S34F 突变体的细胞中诱导 DNA 损伤,从而优先杀死表达 U2AF1 S34F 突变的细胞,此外,剪接调节剂能够增加 R 环水平,使它们对 ATRi 更加敏感,故单独使用剪接调节剂或 ATRi 相比,剪接调节剂和 ATRi 组合能够更有效地使 U2AF1 S34F 突变细胞的 DNA 损伤水平显著升高,细胞凋亡增加,这为剪接体突变所导致的癌症提供了一种治疗策略^[24]。

(3)U2AF1 突变细胞降低 NMD 的活性:无义介导的 RNA 衰变(nonsense - mediated mRNA decay, NMD)是一种 RNA 监督途径,其能靶向具有提前翻译终止密码子(prepare - stop codon, PTC)的异常 mRNA 并将其进行降解。NMD 的抑制常伴随着 DNA 复制障碍、DNA 损伤和染色体不稳定性升高等,近年来研究表明,剪接体基因 SF3B1 和 U2AF1 突变的细胞在总体上降低了 NMD 活性,且与野生型细胞比较,SF3B1 和 U2AF1 突变细胞对 NMD 抑制更为敏感,而剪接体突变细胞对 NMD 的抑制可以通过核糖核酸酶

H1(RNASEH1)的过度表达得以挽救,核糖核酸酶H1的作用是能够去除基因组中的R环^[25]。此研究的发现为治疗MDS和剪接体突变的癌症提出了一种新的合成致死策略。

3. 表观遗传学中的剪接体突变:U2AF1突变会导致H2AFY1.1亚型减少,进而使患者造血功能失调和B淋巴细胞计数减少,此外近年来研究还发现,U2AF1突变细胞需要野生型U2AF1等位基因才能存活,这可能成为一种新的治疗策略。

(1)U2AF1突变导致H2AFY1.1亚型减少:H2A组蛋白家族成员Y(recombinant H2A histone family, member Y, H2AFY)是一种组蛋白H2A变异基因。H2AFY和丝氨酸/苏氨酸激酶受体相关蛋白(STRAP)在人类造血过程中起着重要作用。H2AFY可编码两种剪接亚型,为H2AFY1.1和H2AFY1.2(分别称为macroH2A1.1和macroH2A1.2)。H2AFY和STRAP都是骨髓系细胞中U2AF1 S34F突变的关键下游靶基因,而异常剪接的H2AFY和STRAP都是红细胞生成受损的关键效应器,异常剪接的H2AFY也是异常粒单核细胞分化的关键效应器。U2AF1 S34F突变诱导STRAP的异常剪接,导致该基因仅在红系细胞中下调,并使红细胞生成受损;而异常剪接的H2AFY,导致红系和粒单核细胞来源集落中的H2AFY1.1亚型表达减少,当细胞在红系和粒单核细胞条件下培养时,shRNA介导的骨髓祖细胞中H2AFY1.1的表达减少导致细胞凋亡增加和分化减少^[26]。此外,MDS患者中常被发现有B淋巴细胞和前体B淋巴细胞减少^[27]。这可能也与H2AFY基因的表达有关,U2AF1 S34F突变表达诱导的选择性剪接会导致H2AFY1.1亚型的减少^[28]。而H2AFY1.1亚型的减少会降低早期B细胞因子1(EBF1)的表达,EBF1是B淋巴细胞发育所必需的主要转录因子,研究表明H2AFY存在于EBF1启动子以调节其表达及其下游靶点,其对正常B淋巴细胞发育至关重要,故H2AFY1.1的表达减少导致EBF1的表达降低是致使U2AF1 S34F突变型MDS患者B淋巴细胞减少的主要原因,且H2AFY的选择性剪接会促进U2AF1 S34F突变表达并诱导体内异常造血^[29]。

(2)U2AF1突变细胞的存活需要野生型U2AF1等位基因:U2AF1突变总是杂合的,而U2AF1已被认定为单倍体必需的癌基因,即具有U2AF1杂合子突变的癌细胞需要保持至少一个野生型U2AF1等位基因拷贝才能存活^[30]。有研究通过U2AF1小鼠模型

的建立,证明U2AF1突变的造血细胞需要野生型U2AF1才能存活,且通过改变野生型与突变型U2AF1表达的比率,可以改变小鼠体内的造血,这些结果皆表明在杂合子突变细胞中选择性地靶向(即减少或增加)野生型U2AF1等位基因可以诱导癌细胞死亡,这为携带U2AF1突变的患者提供了一种新的治疗思路^[31]。

三、U2AF1突变对MDS预后的影响

多项临床研究均表明,U2AF1与MDS不良预后相关,尤其是在总生存期方面。Wang等^[32]回顾性分析234例MDS患者的下一代序列基因突变检测及临床资料,进行多变量分析后证实变异等位基因频率(variant allele frequency, VAF) >40%的U2AF1是具有较短总体生存期(overall survival, OS)的MDS患者的独立影响因素。吴凌云等^[33]回顾性分析349例MDS患者,研究结果显示,U2AF1突变患者具有较高的转白率和较短的总生存时间,且+8核型的MDS患者中U2AF1突变组中位总生存时间明显短于非突变组。这些研究与另一项Meta分析的结果相似,即U2AF1突变是新发MDS患者OS和AML转化的一个独立且不利的危险因素^[34]。Zhu等^[5]研究也表明,与未携带U2AF1突变的患者比较,携带U2AF1突变的患者血红蛋白含量较低,且与较短的OS显著相关。

四、展望

MDS是一种血液系统髓系恶性肿瘤且可能向AML进展,故对此疾病越来越重视。在MDS患者中,剪接体突变发生率为50%~60%,而作为剪接体基因之一的U2AF1基因突变,常与不良预后相关且突变发生率高,现已有诸多研究聚焦于此。既往研究表明,其机制主要是U2AF1基因突变导致异常剪接进而影响炎症、免疫基因和R环积累,导致MDS疾病进展,而其具体调节机制仍不明确。目前已有研究表明,在杂合子突变细胞中选择性地靶向野生型等位基因可诱导癌细胞死亡,以及剪接调节剂在治疗存在U2AF1突变的血液肿瘤中也具有可行性,这是携带U2AF1突变的MDS患者可能的治疗策略,但其具体实施及其他治疗手段仍有待于深入研究。

参考文献

- 1 Cazzola M. Myelodysplastic syndromes[J]. N Engl J Med, 2020, 383(14): 1358-1374
- 2 肖志坚. 骨髓增生异常综合征的分子生物学研究: 现况与启示[J]. 白血病·淋巴瘤, 2014, 23(9): 513-514
- 3 Inoue D, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Spliceosomal gene muta-

- tions in myelodysplasia; molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(9): 989–1001
- 4 李冰, 王静雅, 刘晋琴, 等. 靶向测序检测 511 例骨髓增生异常综合征患者基因突变[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(12): 1012–1016
- 5 Zhu Y, Song D, Guo J, *et al.* U2AF1 mutation promotes tumorigenicity through facilitating autophagy flux mediated by FOXO3a activation in myelodysplastic syndromes[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 655
- 6 Jiang Y, Eveillard JR, Couturier MA, *et al.* Asian population is more prone to develop high-risk myelodysplastic syndrome, concordantly with their propensity to exhibit high-risk cytogenetic aberrations[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3): 481
- 7 Okeyo-Owuor T, White BS, Chatrikhi R, *et al.* U2AF1 mutations alter sequence specificity of pre-mRNA binding and splicing[J]. *Leukemia*, 2015, 29(4): 909–917
- 8 Przychodzen B, Jerez A, Guinta K, *et al.* Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms[J]. *Blood*, 2013, 122(6): 999–1006
- 9 Fei DL, Zhen T, Durham B, *et al.* Impaired hematopoiesis and leukemia development in mice with a conditional knock-in allele of a mutant splicing factor gene U2af1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(44): E10437–E10446
- 10 Shirai CL, Ley JN, White BS, *et al.* Mutant U2AF1 expression alters hematopoiesis and pre-mRNA splicing in vivo [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(5): 631–643
- 11 Wang C, Yang Y, Gao S, *et al.* Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 122: 123–132
- 12 Patra MC, Choi S. Recent progress in the molecular recognition and therapeutic importance of interleukin-1 receptor-associated kinase 4[J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1529
- 13 Smith MA, Choudhary GS, Pellagatti A, *et al.* U2AF1 mutations induce oncogenic IRAK4 isoforms and activate innate immune pathways in myeloid malignancies[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5): 640–650
- 14 Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, *et al.* AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias[J]. *Cell*, 2011, 146(5): 697–708
- 15 Zeng W, Dai H, Yan M, *et al.* Decitabine-induced changes in human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1 are mediated by FOXO3A activation[J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 4302320
- 16 Sallman DA, List A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes[J]. *Blood*, 2019, 133(10): 1039–1048
- 17 Chen L, Chen JY, Huang YJ, *et al.* The augmented R-loop is a unifying mechanism for myelodysplastic syndromes induced by high-risk splicing factor mutations[J]. *Mol Cell*, 2018, 69(3): 412–425, e6
- 18 Stevens BM, Khan N, D'Alessandro A, *et al.* Characterization and targeting of malignant stem cells in patients with advanced myelodysplastic syndromes[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3694
- 19 Palangat M, Anastasakis DG, Fei DL, *et al.* The splicing factor U2AF1 contributes to cancer progression through a noncanonical role in translation regulation[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(9–10): 482–497
- 20 Akef A, McGraw K, Cappell SD, *et al.* Ribosome biogenesis is a downstream effector of the oncogenic U2AF1-S34F mutation[J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(11): e3000920
- 21 Aguilera A, García-Muse T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability[J]. *Mol Cell*, 2012, 46(2): 115–24
- 22 Singh S, Ahmed D, Dolatshad H, *et al.* SF3B1 mutations induce R-loop accumulation and DNA damage in MDS and leukemia cells with therapeutic implications[J]. *Leukemia*, 2020, 34(9): 2525–2530
- 23 Flach J, Jann JC, Knaflic A, *et al.* Replication stress signaling is a therapeutic target in myelodysplastic syndromes with splicing factor mutations[J]. *Haematologica*, 2020, 106(11): 2906–2917
- 24 Nguyen HD, Leong WY, Li W, *et al.* Spliceosome mutations induce R-loop-associated sensitivity to ATR inhibition in myelodysplastic syndromes[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5363–5374
- 25 Cheruiyot A, Li S, Nonavinkere Srivatsan S, *et al.* Nonsense-mediated RNA decay is a unique vulnerability of cancer cells harboring SF3B1 or U2AF1 mutations [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(17): 4499–4513
- 26 Yip BH, Steeples V, Repapi E, *et al.* The U2AF1S34F mutation induces lineage-specific splicing alterations in myelodysplastic syndromes[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(6): 2206–2221
- 27 Liu T, Ahmed T, Krysiak K, *et al.* Haploinsufficiency of multiple del(5q) genes induce B cell abnormalities in mice [J]. *Leuk Res*, 2020, 96: 106428
- 28 Bereshchenko O, Lo Re O, Nikulenkov F, *et al.* Deficiency and haploinsufficiency of histone macroH2A1.1 in mice recapitulate hematopoietic defects of human myelodysplastic syndrome[J]. *Clin Epigenet*, 2019, 11(1): 121
- 29 Kim SP, Srivatsan SN, Chavez M, *et al.* Mutant U2AF1-induced alternative splicing of H2afy (macroH2A1) regulates B-lymphopoiesis in mice[J]. *Cell Rep*, 2021, 36(9): 109626
- 30 Bielski CM, Donoghue MTA, Gadiya M, *et al.* Widespread selection for oncogenic mutant allele imbalance in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(5): 852–862, e4
- 31 Wadugu BA, Nonavinkere Srivatsan S, Heard A, *et al.* U2af1 is a haplo-essential gene required for hematopoietic cancer cell survival in mice[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(21): e141401
- 32 Wang H, Guo Y, Dong Z, *et al.* Differential U2AF1 mutation sites, burden and co-mutation genes can predict prognosis in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18622
- 33 吴凌云, 祁岳坤, 许峰, 等. 349 例骨髓增生异常综合征患者 U2AF1 基因突变的临床研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(1): 68–70
- 34 Wang H, Zhang N, Wu X, *et al.* Prognostic value of U2AF1 mutant in patients with de novo myelodysplastic syndromes: a Meta-analysis [J]. *Ann Hematol*, 2019, 98(12): 2629–2639

(收稿日期: 2021-11-20)

(修回日期: 2021-11-25)