

Η μέτρηση της εντροπίας εκτιμά τις διαταραχές του συνοδικού γονιδιακού splicing στον καρκίνο

William Ritchie¹, Samuel Granjeaud¹, Denis Puthier¹, Daniel Gautheret^{2*}
 PLoS Computational Biology 2008; 4 (3) | www.ploscompbiol.org

Ελεύθερη απόδοση στα ελληνικά: ΦΩΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΣ
 Πνευμονολόγος, Επιμελητής Α', ΚΑΑ-ΝΝΘΑ

Στη γενετική, το *splicing* είναι η τροποποίηση της γενετικής πληροφορίας μετά τη μεταγραφή, καθώς ορισμένα ιντρόνια από το θυγατρικό αγγελιοφόρο RNA (*pre-mRNA*) απομακρύνονται και έτσι ορισμένα από τα εξόνιά του ενώνονται. Εφόσον δεν υπάρχουν ιντρόνια στα προκαρυωτικά γονιδιώματα, το *splicing* συμβαίνει φυσιολογικά μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το *splicing* προετοιμάζει το *pre-mRNA* ώστε να παράγει το ώριμο αγγελιοφόρο RNA (*mRNA*), το οποίο στη συνέχεια υφίσταται μετάφραση σαν μέρος της σύνθεσης των πρωτεϊνών. Το *splicing* περιλαμβάνει μια σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από το *spliceosome*, ένα σύμπλοκο από μικρές ριβονουκλεοπρωτεΐνες του πυρήνα (*snRNPs*).

Εισαγωγή

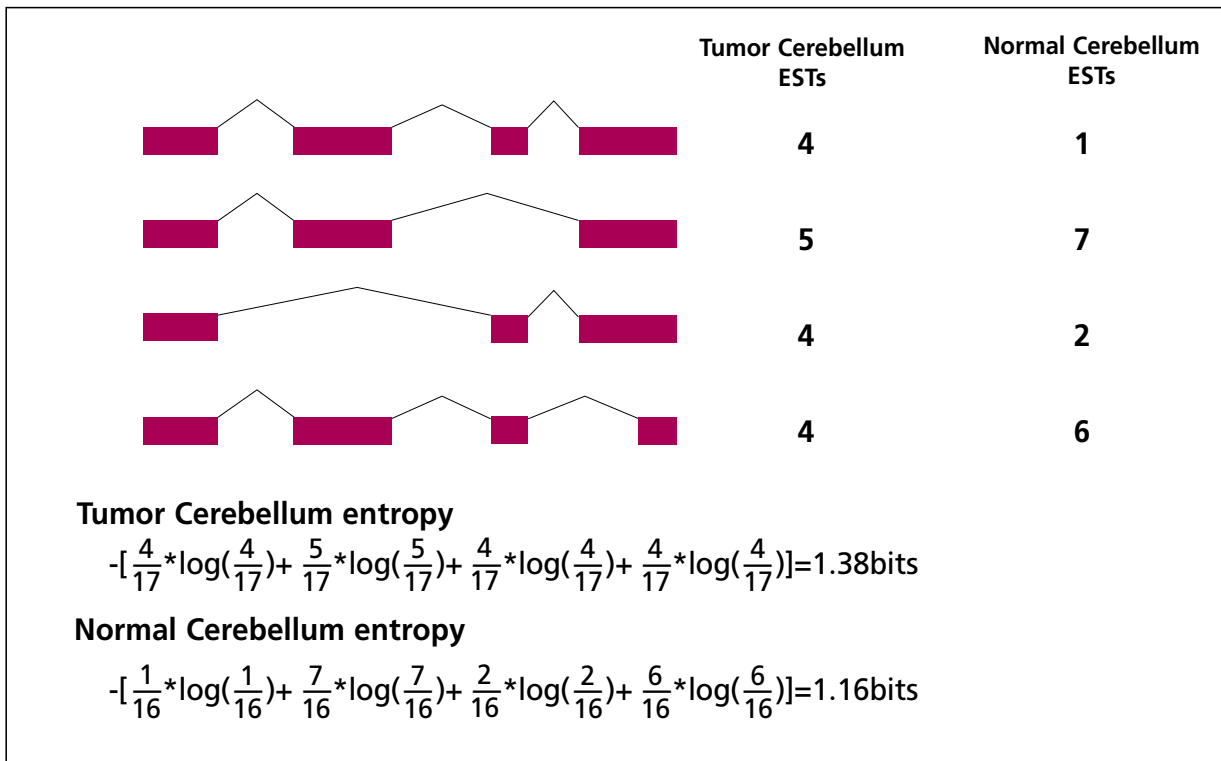
Τα περισσότερα γονίδια των θηλαστικών παράγουν εναλλακτικά αντίγραφα (*transcripts*) σαν μέρος του φυσιολογικού προγράμματος έκφρασης¹⁻⁴. Τα εναλλακτικά αντίγραφα περιλαμβάνουν *splicing*, πολυαδενυλίωση (*polyadenylation*) και γονίδια επαγωγής της μεταγραφής (*transcription initiation*), που μπορούν να εκφράζονται διαφορετικά σε διαφορετικούς ιστούς⁴⁻⁷ παρέχοντας έτσι όλο το εύρος έκφρασης των γονιδίων που απαιτείται για την κυτταρική διαφοροποίηση και τις εξειδικευμένες λειτουργίες των ιστών. Τυχόν διαταραχή στην ισορροπία των εναλλακτικών αντιγράφων, ιδιαίτερα στο επίπεδο του *splicing*, μπορεί να επηρεάσει την αγγειογένεση⁸, την κυτταρική διαφοροποίηση⁹ και τη διήθηση¹⁰. Ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων υποστηρίζουν τη σχέση μεταξύ διαταραχών στο εναλλακτικό *splicing* και στον καρκίνο, ούτως ώστε η ταυτοποίηση ισομορφών αντιγράφων (*transcript isoforms*) θεωρείται πλέον σαν μια σημαντική οδός για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου^{11,12}.

Η διαταραχή της έκφρασης των ισομορφών του *splicing* στον καρκίνο μπορεί να προκύπτει από διαφορετικές γενετικές διαδικασίες. Από τη μία, οι

μεταλλάξεις στις *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες οδηγούν σε ανώμαλη έκφραση ειδικών ισομορφών, όπως έχει παρατηρηθεί στο γονίδιο *BRCA1* στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών¹³. Μια άλλη τάξη γεγονότων που επηρεάζουν την έκφραση των ισομορφών του *splicing*, περιλαμβάνουν διαταραχές στους μηχανισμούς που αφορούν στο *mRNA* ή στην αντίστοιχη οδό μεταγωγής σήματος. Αυτές μπορεί να επηρεάζουν το *splicing* ειδικών γονιδίων, όπως το *CD44*¹⁴⁻¹⁶, αλλά μπορεί επίσης να προκαλούν ευρύτερες διαταραχές της έκφρασης των ισομορφών, καθώς μπορεί να επηρεάζεται εν σειρά η έκφραση πολλών γονιδίων¹⁷⁻²⁰. Στοιχεία ευρύτερων μεταβολών στην εναλλακτική αντιγραφή που συνδέονται με τον καρκίνο υπάρχουν, για παράδειγμα, στις βάσεις δεδομένων *EST*, όπου ένα μεγάλο μέρος από προϊόντα που προκύπτουν από *splicing* σχετίζονται με συγκεκριμένους όγκους²¹. Ωστόσο, ενώ οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στο *splicing* και στον καρκίνο επιχειρούν να απομονώσουν μια «υπογραφή» ενός συγκεκριμένου είδους *splicing* που να εμφανίζει σημαντική έκφραση στα παθολογικά κύτταρα, καμιά δημοσιευμένη μελέτη δεν εστίασε μέχρι σήμερα στο μέγεθος

των διαταραχών του *splicing* που εμφανίζονται όταν οι μηχανισμοί του *splicing* πάσχουν.

Ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η εκτίμηση του εύρους και των χαρακτηριστικών των μη ειδικών εναλλακτικών μεταγραφικών διαταραχών στον καρκίνο. Αντί να αναζητήσουμε «ενδιαφέρουσες» υπογραφές ισομορφών, αναλύσαμε την κατανομή όλων των ισομορφών από ένα μόνο γονίδιο σε έναν δεδομένο ιστό. Η υπόθεση εργασίας μας ήταν, ότι σε έναν ιστό όπου οι μηχανισμοί του *splicing* είναι διαταραγμένοι, η κατανομή των ισομορφών μπορεί να είναι περισσότερο ακανόνιστη σε σύγκριση με έναν ιστό-μάρτυρα. Για τη μέτρηση του επιπέδου της αταξίας σε *tag libraries* του πυρηνικού DNA, δανειστήκαμε την έννοια της εντροπίας από τη θεωρία της πληροφορίας. Εφαρμόσαμε αυτή τη μέθοδο και στις τρεις μορφές της εναλλακτικής μεταγραφής, συγκρίνοντας τις κατανομές των ισομορφών σε ζεύγη παθολογικών και υγιών ιστών. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ούτε η εναλλακτική πολυαδενυλίωση ούτε η εναλλακτική επαγωγή της μεταγραφής συσχετίζονται με διαταραγμένη έκφραση ισομορφών. Ωστόσο, στους μισούς από τους καρκίνους που μελετήθηκαν, το εναλλακτικό



Σχήμα 1. Παράδειγμα του υπολογισμού της εντροπίας κατά Shannon για ένα γονίδιο με τέσσερις ισομορφές splicing SP1...SP4. Οι μετρήσεις EST counts παρέχονται για κάθε μία ισομορφή σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό (1.38 έναντι 1.16 bits).

splicing εμφάνισε μια σημαντική αύξηση της εντροπίας συγκριτικά με τους υγιείς ιστούς. Αναλύουμε αυτή την αύξηση της εντροπίας και συζητούμε τις πιθανές αιτίες της.

Αποτελέσματα

Εντροπία των ισομορφών: Ορισμός

Δεδομένης μιας τυχαίας μεταβλητής X με $P(x_i)$ πιθανότητες για μία συγκεκριμένη σειρά συμβάντων x_1, \dots, x_k , η εντροπία κατά Shannon, γνωστή επίσης και σαν Εντροπία της Πληροφορίας, ορίζεται ως εξής :

$$H(X) = -\sum P(x_i) \log P(x_i)$$

Η Εντροπία, και άρα η αταξία, είναι μέγιστη όταν η πιθανότητα όλων των συμβάντων $P(x_i)$ είναι ίση και συνεπώς, η έκβαση είναι αβέβαιη στο μέγιστο βαθμό. Εδώ, η έννοια της εντροπίας κατά Shannon εφαρμόζεται στα πρότυπα έκφρασης διαφορετικών μεταγραφικών ισομορφών μέσα σε συγκεκριμένα πλαίσια. Στο παράδειγμα του σχήματος 1, το γονίδιο 1 έχει 4 εναλλακτικές μορφές που προκύπτουν από splicing (SP1...SP4) και μελετούμε την έκφρασή τους σε φυσιολογική παρεγκεφαλίδα και σε δείγματα από όγκους παρεγκεφαλίδας.

Για κάθε μορφή splice, μετρούμε τον αριθμό των μεταγραφικών αντιτύπων που παρατηρήθηκαν σε διαφορετικά είδη ιστών. Για παράδειγμα, οι μορφές splice του γονιδίου SP1 που αντιστοι-

χούν με matching ESTs/cDNAs, παρατηρούνται 4 φορές σε βιβλιοθήκες με όγκους της παρεγκεφαλίδας και μόνο μία φορά σε βιβλιοθήκες με φυσιολογικούς ιστούς. Για το γονίδιο αυτό, η ισομορφική εντροπία που αφορά στις 4 splice μορφές, είναι μεγαλύτερη σε δείγματα όγκων παρά στην φυσιολογική παρεγκεφαλίδα, γεγονός που αντανακλά μια περισσότερο ομοιογενή ιστική κατανομή των ισομορφών στις βιβλιοθήκες των καρκινικών ιστών.

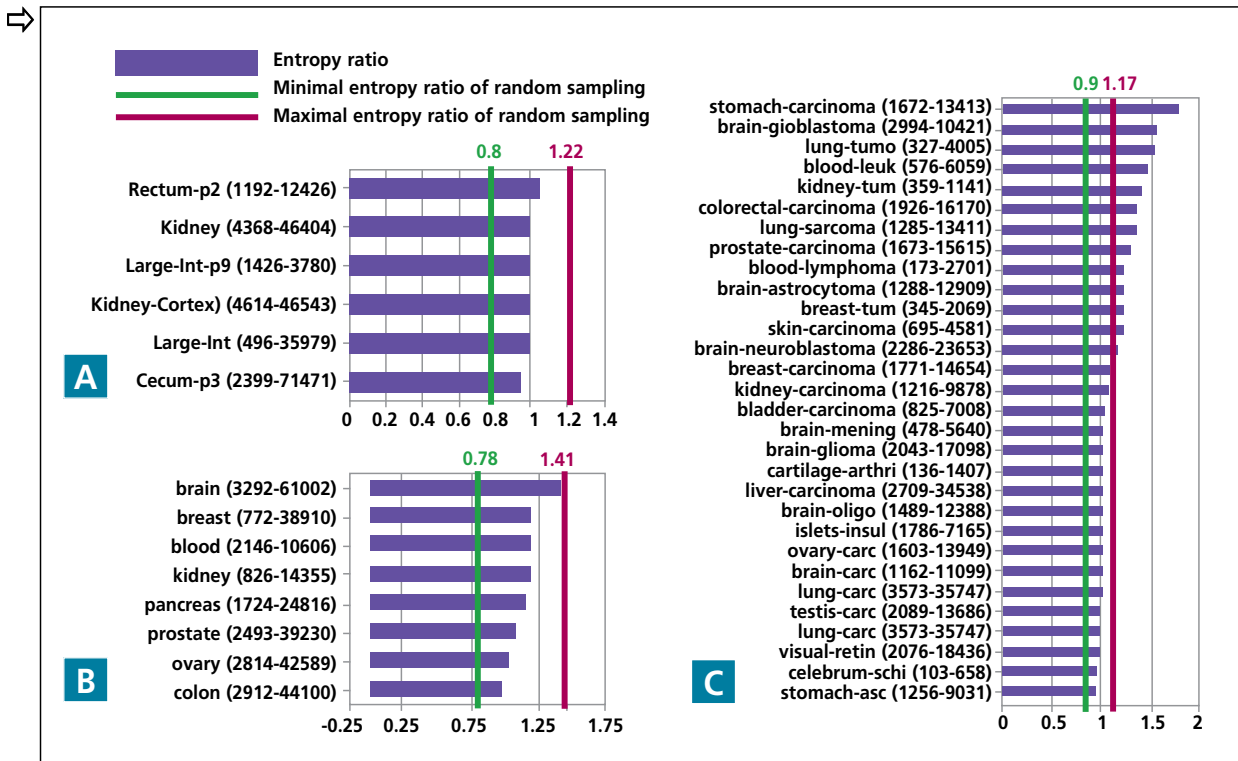
Οι καρκινικοί ιστοί εμφανίζουν μεγαλύτερη ισομορφική εντροπία

Υποθέσαμε ότι οι διαταραχές των μηχανισμών ελέγχου της μεταγραφής και της μετα-μεταγραφής στον καρκίνο ή σε άλλες παθήσεις προκαλούν την απώλεια της ειδικής για τους ιστούς έκφρασης ορισμένων μεταγραφικών ισομορφών. Αυτή η απώλεια μπορεί να μετρηθεί μέσω της αύξησης της εντροπίας στο πρότυπο έκφρασης των ισομορφών ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Μετρώντας τον μέσο όρο της αύξησης ή της μείωσης της εντροπίας σε ικανό αριθμό γονιδίων που εκφράζονται σε ζεύγος παθολογικού και φυσιολογικού ιστού, θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε μια σημαντική μεταβολή της εντροπίας εάν η έκφραση των ισομορφών διαταράσσεται στη δεδομένη νόσο.

Λάβαμε στοιχεία από τις βάσεις δεδομένων FANTOM3¹ και ATD database²².

Στη συνέχεια, συσχετίσαμε τις ισομορφές στο cDNA και χαρτογραφήσαμε κάθε cDNA στην αντίστοιχη πληροφορία του (ιστός/νόσος) χρησιμοποιώντας την EnoC ontology²³ για τα ESTs/cDNAs ή το άμεσο parsing των βάσεων δεδομένων CAGE/SAGE databases. Ένα γονίδιο εισήλθε στους υπολογισμούς εντροπίας μόνο εάν είχε τουλάχιστον δύο εναλλακτικές ισομορφές υποστηριζόμενες από τουλάχιστον 10 διαφορετικά αντίγραφα (transcripts) από 3 διαφορετικές βιβλιοθήκες, άρα συνολικά 20 αντίγραφα σχετικά με το δεδομένο γονίδιο. Για να μετρήσουμε τις μεταβολές της εντροπίας των ισομορφών σε ζεύγος υγιούς / παθολογικού ιστού, χρειαστήκαμε τουλάχιστον 50 γονίδια και 100 ισομορφές, τα οποία να εκφράζονται τόσο σε υγιείς όσο και σε παθολογικούς ιστούς. Μελετήσαμε αποκλειστικά τις ισομορφές που παρατηρούνται σε υγιείς και παθολογικές καταστάσεις και αποκλείσαμε ισομορφές που εμφανίζονται σε EST βιβλιοθήκες πολλών καρκίνων²⁴.

Καθορίσαμε το λόγο εντροπίας ενός γονιδίου, ως το λόγο της εντροπίας του γονιδίου στη νόσο προς την εντροπία του ίδιου γονιδίου σε φυσιολογική κατάσταση. Ο λόγος εντροπίας ενός ζεύγους παθολογικού / φυσιολογικού ιστού ορίστηκε ως ο μέσος όρος των λόγων εντροπίας όλων των διαθέσιμων γονιδίων στο συγκεκριμένο ζεύγος. Το σχήμα 2 παρουσιάζει τους λόγους εντροπίας για διαφορετικές παθή-



Σχήμα 2. Ο λόγος της μέσης ισομορφικής εντροπίας σε καρκινικούς έναντι φυσιολογικών ιστών. Η τιμή 1 υποδηλώνει ότι η μέση εντροπία ανά γονίδιο στους καρκινικούς ιστούς ισούται με τη μέση εντροπία ανά γονίδιο στους φυσιολογικούς ιστούς. Ο πρώτος αριθμός στις παρενθέσεις αντιστοιχεί στον αριθμό των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αύξησης της εντροπίας και ο δεύτερος αριθμός αντιστοιχεί στη συνολική κάλυψη στις βιβλιοθήκες ESTs/cDNAs/SAGEs για παθολογικούς και υγιείς ιστούς. Εμφανίζονται μόνο είδη ιστών για τους οποίους ήταν διαθέσιμα, για μέτρηση του λόγου εντροπίας, τουλάχιστον 50 γονίδια και 100 ισομορφές. (A) εναλλακτική επαγωγή. (B) εναλλακτική πολυαδενυλίωση. (C) εναλλακτικό splicing.

σεις, σε ό,τι αφορά στην εναλλακτική επαγωγή (A), την πολυαδενυλίωση (B) και το splicing (C). Ένας λόγος εντροπίας ίσος με τη μονάδα σημαίνει ότι η εντροπία των ισομορφών δε διαφέρει μεταξύ υγιούς και παθολογικής κατάστασης (παχιά γραμμή στο σχήμα 2). Για να υπολογίσουμε τα διαστήματα σημαντικότητας, πραγματοποιήσαμε τυχαίες δοκιμές, διαιρώντας τη μέση εντροπία 1000 τυχαία επιλεγμένων γονιδίων που αφορούσαν σε ζεύγη παθολογικών / φυσιολογικών ιστών με αυτήν άλλων 1000 τυχαία επιλεγμένων γονιδίων που αφορούσαν σε ζεύγη παθολογικών / φυσιολογικών ιστών και επαναλήψαμε την διαδικασία 10.000 φορές. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα σε τρία αρχεία που περιείχαν στοιχεία ισομορφών. Οι τιμές των υψηλότερων και των χαμηλότερων εκατοστιαίων αναλογιών εμφανίζονται στο σχήμα με κόκκινες και πράσινες κάθετες γραμμές, αντίστοιχα.

Οι λόγοι εντροπίας για την εναλλακτική επαγωγή και την πολυαδενυλίωση δεν έφθασαν στα όρια σημαντικότητας (σχήμα 2A και 2B) στα μελετηθέντα ζεύγη ιστών. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης και οι ισομορφές επαγωγής δεν εμφανίζουν σοβαρές διαταραχές στον καρκίνο. Το εναλλακτικό splicing, όμως, εμφάνισε διαφορετικό προφίλ στους 24 από τους 27 μελετηθέντες καρκινικούς ιστούς, καθώς βρέθηκε υψηλότερο επίπεδο εντροπίας σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (σχήμα 2C). Αυτή η αύξηση της εντροπίας ήταν ιδιαίτε-

ρα σημαντική σε 13 περιπτώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφραση των ισομορφών του splicing διαταράσσεται σοβαρά σε ορισμένους όγκους. Οι υγιείς ιστοί δεν εμφάνισαν σε καμία περίπτωση υψηλότερη εντροπία από τους καρκινικούς. Καμιά άλλη παθολογία, πλην του καρκίνου, από όσες μελετήθηκαν (αρθρίτις, ασκίτις, σχιζοφρένεια) δεν εμφάνισε αυξημένη εντροπία των παθολογικών ιστών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς.

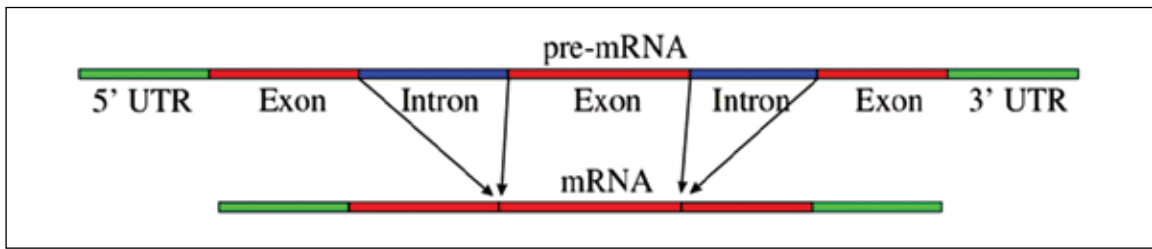
Η παρατηρηθείσα μεταβολή της εντροπίας δεν μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές της δειγματοληψίας μεταξύ των βιβλιοθηκών. Ο αριθμός των ESTs/cDNAs που χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογισθεί η εντροπία δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ υγιών και παθολογικών ιστών, κυρίως λόγω του ότι μελετήσαμε μόνο ισομορφές που εκφράζονται τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους παθολογικούς ιστούς. Τέλος, η αύξηση της εντροπίας που παρατηρήθηκε δεν μπορεί να αποδοθεί σε επίδραση του μεγέθους των μελετηθέντων EST βιβλιοθηκών.

Οι παράγοντες που σχετίζονται με το splicing υπερ-αντιπροσωπεύονται στα τροποποιημένα μέσω splicing γονίδια

Στους 10 περισσότερο αποδιοργανωμένους καρκινικούς ιστούς, η αύξηση της εντροπίας του splicing οφειλόταν σε διαταραχές 16 έως 258 γονιδίων, ή 30%-68% από την ομάδα των γονιδίων που ήταν διαθέσιμα για υπολογισμό εντροπίας σε αυτούς τους ιστούς. Αυτό υποδηλώνει

ότι οι διαταραχές του splicing προκαλούνται από παράγοντες που ρυθμίζουν ταυτόχρονα πολλαπλά γονίδια. Συνεπώς, σε ομάδες όπου διαταραγμένα μέσω splicing γονίδια από διαφορετικούς ιστούς εμφανίζουν μικρή επίπτωση, δεν μπορούμε να απομονώσουμε μια λίστα γονιδίων που να εμφανίζουν υψηλή τάση διαταραχών τύπου splicing. Ωστόσο, αναδεικνύεται μια καθαρή λειτουργική τάση όταν ιστοί με μεγάλη αύξηση της εντροπίας συνυπάρχουν. Στους 10 καρκινικούς ιστούς που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αύξηση στη σχετιζόμενη με το splicing εντροπία (από καρκίνο στομάχου/φυσιολογικό στόμαχο έως αστροκύτωμα/φυσιολογικό εγκέφαλο, σχήμα 2), αναλύσαμε όλα τα γονίδια που έδειξαν αύξηση της σχετιζόμενης με το splicing εντροπίας (414 γονίδια).

Σημειώσαμε ότι τα περισσότερα στοιχεία μεταξύ των διαταραγμένων, λόγω splicing, γονιδίων είτε περιέχουν "RNA splicing" είτε πρόκειται για μεγαλύτερα σύνολα που εμπεριέχουν RNA splicing. Η τάξη των "RNA splicing" περιέχει κατεξοχήν παράγοντες που σχετίζονται με το splicing. Αυτό υποδηλώνει ότι οι διαταραχές του splicing σε ορισμένους παράγοντες - κλειδιά μπορεί να εμπλέκεται στις πλέον εκτεταμένες διεργασίες splicing που παρατηρήθηκαν σε ιστούς, με μεγάλη αύξηση της σχετιζόμενης με το splicing εντροπίας. Αυτός ο εμπλουτισμός παρατηρείται μόνο μετά την απομόνωση των καρκινικών ιστών, γεγονός που σημαίνει ότι ο αριθμός των διαταραγμένων παρα-



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση των ιντρονίων και των εξονίων του αγγελιοφόρου RNA. Το ώριμο αγγελιοφόρο RNA αποτελείται από τα ενωμένα εξόνια, ενώ τα ιντρόνια έχουν απομακρυνθεί μέσω του *splicing*.

γόντων του *splicing* σε μια δεδομένη παθολογία είναι μικρός. Ένας συνολικός αριθμός 13 παραγόντων *splicing*, εμφανίζει σημαντική αύξηση στη σχετιζόμενη με το *splicing* εντροπία στους μελετηθέντες καρκινικούς ιστούς. Οι περισσότεροι είναι δομικοί παράγοντες του *splicing* και μόνο τρεις (TRA2B, U2AF1, SF3A2) εμπλέκονται στη ρύθμιση του εναλλακτικού *splicing*.

Οι παράγοντες αυτοί, υπόκεινται σε εναλλακτικό *splicing* σε υψηλότερους ρυθμούς συγκριτικά με το μέσο όρο των γονιδίων: 72% από τους 58 γνωστούς παράγοντες του *splicing* στην Gene Ontology²² έχουν τουλάχιστον μια εναλλακτική μορφή *splice* στη βάση δεδομένων ATD²⁵, με κατά μέσο όρο 5.4 ισομορφές ανά γονίδιο, σε σύγκριση με 62% εναλλακτικού *splicing* και 3.4 ισομορφές ανά γονίδιο στο σύνολο των γονιδίων της βάσης ATD. Η απορρύθμιση των παραγόντων του *splicing* είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ιστών όπου διαταράσσεται το συνολικό *splicing*. Αυτό, με τη σειρά του, υποδηλώνει ότι η λανθασμένη θέση των *splice* παραγόντων μπορεί να αποτελεί πιθανή αιτία γενικευμένης διαταραχής του *splicing* σε αυτούς τους ιστούς.

Η αύξηση της εντροπίας του *splicing* συσχετίζεται με την υπογραφή πολλαπλασιασμού (Proliferation Signature)

Αν και οι όγκοι είναι ποικίλοι και ετερογενείς, όλοι μοιράζονται την κομβική δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται σε μεγαλύτερους ρυθμούς σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς και αυτό, παρά τον στενό έλεγχο που ασκεί συνήθως ο οργανισμός στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για να μελετήσουμε δυνητικές σχέσεις μεταξύ διαταραγμένης έκφρασης ισομορφών και υψηλών επιπέδων πολλαπλασιασμού, κατατάξαμε τους τύπους καρκίνου που απορρυθμίζουν τους μηχανισμούς του *splicing* (σχήμα 2C) σε συνάρτηση με το μιτωτικό τους δυναμικό. Για να εκτιμήσουμε τις μτώσεις, απομονώσαμε τα 188 γονίδια από το πρότυπο του «κυτταρικού κύκλου» των Stuart et al.²⁶, μια ομάδα συνεκφραζόμενων γονιδίων, που έδειξαν να διαθέτουν

αυξημένα στοιχεία που υπερεκφράζονται σε εντόνως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και των οποίων η εκσεσημασμένη έκφραση είναι ένας δείκτης εισόδου στον κυτταρικό κύκλο²⁷. Από αυτά, τα 92 φάνηκαν να υπερεκφράζονται, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια μιας από τις μιτωτικές φάσεις και άλλα 17 εμφάνισαν σημαντικά στοιχεία υπέρ μιας πιθανής υπερέκφρασής τους στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα.

Συνεπώς, χρησιμοποιήσαμε τη μεγάλη έκφραση αυτών των δεικτών σαν έμμεση ένδειξη υψηλού μιτωτικού ρυθμού. Για να αποκτήσουμε ένα «δείκτη μίτωσης» των καρκινικών δειγμάτων, υπολογίσαμε το μέσο επίπεδο έκφρασης των 188 δεικτών σε κάθε ένα από τα 3.787 δημοσιοποιημένα πειράματα Affymetrix microarray, που έγιναν με καρκινικά δείγματα²⁸. Τα δείγματα κατατάχθηκαν, έτσι, σε πέντε κατηγορίες, από χαμηλή έως ταχεία μίτωση. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι κυτταρικές μτώσεις, όπως μετρήθηκαν από την έκφραση των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, συσχετίζονται σημαντικά με την αύξηση της σχετιζόμενης με το *splicing* εντροπίας. Αυτή η παρατήρηση μας οδήγησε στην ερώτηση σχετικά με τις πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της εντροπίας του *splicing* και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε πλαίσια μη παθολογικά.

Συγκρίναμε την ισομορφική εντροπία του *splicing* σε εμβρυϊκούς και ιστούς ενηλίκων, όπως συγκρίναμε παθολογικούς και υγιείς ιστούς. Ενώ οι εμβρυϊκοί ιστοί αναμένεται να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα μτώσεων σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ιστούς των ενηλίκων, δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε σημαντική αύξηση της εντροπίας στους εμβρυϊκούς ιστούς. Αυτό υποδηλώνει ότι η αύξηση της ισομορφικής εντροπίας που παρατηρείται στους καρκινικούς ιστούς με υψηλό μιτωτικό ρυθμό σχετίζεται μόνον έμμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Συζήτηση

Ενώ προηγούμενες μελέτες σχετικές με διαταραχές του *splicing* στον καρκίνο εστίασαν κυρίως στην ανακάλυψη «παθολογικών» παραγόντων, η

παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με μεταβολές στην ισορροπία των παραγόντων, έτσι όπως αυτά εκφράζονται σε υγιείς και παθολογικούς ιστούς. Αυτή η νέα προοπτική μας βοήθησε να χαρακτηρίσουμε ένα άλλο είδος διαταραχών του *splicing*, όπου η έκφραση των *splice* παραγόντων ισοπεδώνεται στους όγκους. Ενώ οι ισομορφές από το ίδιο γονίδιο εκφράζονται συνήθως διαφορετικά σε δεδομένο ιστό με καθαρές μείζονες και ελάσσονες μορφές, αυτές οι διαφορές στην έκφραση μειώνονται στον καρκίνο και αυτό οδηγεί σε αύξηση της ισομορφικής εντροπίας. Αν και ελεγχόμενα συμβάντα υπερ/υπο-έκφρασης μπορεί εξ ορισμού να ισοπεδώσουν τη γονιδιακή έκφραση, θεωρούμε απίθανο η γενικευμένη αύξηση της εντροπίας που παρατηρείται στον καρκίνο να οφείλεται σε συνδυασμό πολλαπλών ελεγχόμενων μεταβολών στην έκφραση των ισομορφών.

Η αύξηση αυτή της εντροπίας είναι μάλλον σημάδι μιας γενικής απώλειας ρύθμισης που αφορά σε ευρείες, μη ειδικές διαταραχές του εναλλακτικού *splicing*. Δεν παρατηρήσαμε παρόμοιες διαταραχές σχετιζόμενες με τον καρκίνο στην εναλλακτική μεταγραφική επαγωγή και στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση, τις δύο άλλες διαδικασίες που σχετίζονται με την έκφραση ισομορφών ειδικών της νόσου. Προηγούμενες προσπάθειες για να εξακριβωθούν ειδικές του καρκίνου ισομορφές *splice* μορφές, είτε μέσω ανάλυσης αρχείων EST ή μέσω πειραμάτων, αγνόησαν τις μη ειδικές διαταραχές μεγάλης κλίμακας.

Μια εξαίρεση είναι η μελέτη των Xu και Lee²⁹, η οποία αναζητήσε *splice* μορφές με στατιστικά σημαντικές μεταβολές έκφρασης μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών βιβλιοθηκών EST. Κατ' αυτή την έννοια, οι παραπάνω ερευνητές αναζητήσαν συμβάντα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια μείωση της εντροπίας και όχι μια αύξησή της. Ωστόσο, συζήτησαν επίσης την επίδραση μη ειδικών διαταραχών και ανέλιξαν πρότυπα έκφρασης που ενδέχεται να οδηγούν

⇒ σε ισομορφές ειδικές του καρκίνου. Το συχνότερο πρότυπο διαταραχών που οδηγεί σε καρκινογενετικές διαδικασίες είναι η απώλεια της φυσιολογικής ισομορφής S και η μεταβολή στην έκφραση μεταξύ φυσιολογικής (S) και ειδικής του καρκίνου (S') ισομορφής.

Μία γενικευμένη αύξηση της εντροπίας θα αντιστρατευόταν την εμφάνιση τέτοιων διαδικασιών, γεγονός που καθιστά αυτό το πρότυπο ακόμη περισσότερο ενδιαφέρον στα πλαίσια μιας αύξησης της εντροπίας. Αντίθετα, η κατηγορία «αύξηση του S'» συσχετίζεται άμεσα με αύξηση της εντροπίας (π.χ. η επαγωγή του «όγκου» έχει υψηλότερη εντροπία). Συνεπώς, σε ένα πλαίσιο γενικευμένης αύξησης της εντροπίας, συμβάνα όπως η κατηγορία «αύξηση της S'», ακόμη και αν είναι στατιστικά σημαντικά, δεν μπορούν να αντιπροσωπεύσουν την ευρύτερη απορρύθμιση του splicing και πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη. Οι Xu και Lee ορθά υπογραμμίζουν ότι αυτή η κατηγορία, η οποία παράγει μόνο ένα μικρό κλάσμα από μορφές splice ειδικές του καρκίνου, μπορεί να συσχετίζεται με απώλεια της ειδικότητας του splicing στον καρκίνο. Υπάρχουν πλέον επαρκή στοιχεία ότι οι μεταβολές στην έκφραση του παράγοντα splice, ένεκα, για παράδειγμα, της ενεργοποίησης των κινασών¹⁴, απορρυθμίζει το πρότυπο του splicing στους όγκους^{16,18-20,30,31}.

Οι απορρυθμίσεις του splicing που παρατηρήσαμε, επηρεάζουν κατά τα φαινόμενα, ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων και χαρακτηρίζονται από απώλεια της ρύθμισης των splice μορφών. Αν και αυτό το φαινόμενο μπορεί να συμβαίνει σαν υπο-παράγωγο των παραπάνω μηχανισμών, η συσχέτισή του με ελαττωματικό splicing των παραγόντων splice, μας οδηγεί στην υπόθεση μιας δεύτερης διαδικασίας, όπου το ελαττωματικό splicing λόγω διαταραχών των σχετικών παραγόντων αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου καταρράκτη γεγονότων που χαρακτηρίζεται από διαταραχές του splicing και αύξηση της εντροπίας. Μεταξύ των 13 παραγόντων splice που εμφανίζουν απορρύθμιση του splicing στη μελέτη μας, δύο ήταν ήδη γνωστοί σαν ρυθμιστές των ιδίων μηχανισμών του splicing: ο SFRS3 και ο TRA2-b^{15,28}. Σε κάθε περίπτωση, η υπερέκφραση των παραγόντων splice ενεργοποιούσε τη συμμετοχή εξονίων με ανασταλτικά codons (stop codon - containing exons)^{15,28} προκαλώντας έτσι, αντίγραφα

που υπόκεινται σε nonsense - mediated decay (NMD)^{32,33}. Αμφότερα τα γονίδια έχουν επιπρόσθετες ισομορφές που δεν είναι ευαίσθητες στην NMD και μπορεί να συνεισφέρουν σε ελαττωματικό splicing άλλων γονιδίων.

Μια πιθανή σχέση μεταξύ των δύο μονοπατιών θεωρείται λογική, εφόσον η μεταβολή στην έκφραση των παραγόντων splice (μονοπάτι A) θα μπορούσε να τροποποιήσει την ισορροπία των προϊόντων άλλων παραγόντων splice (μονοπάτι B). Αυτή η μετάβαση μπορεί να συμβαίνει επιλεκτικά σε όγκους με υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, όπου παρατηρούμε τη μεγαλύτερη απορρύθμιση του splicing.

Οι διαταραχές του splicing συσχετίζονται με τον κυτταρικό πολυπλασιασμό³¹,

Ενώ προηγούμενες μελέτες σχετικές με διαταραχές του splicing στον καρκίνο εστίασαν κυρίως στην ανακάλυψη «παθολογικών» παραγώγων, η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με μεταβολές στην ισορροπία των παραγώγων, έτσι όπως αυτά εκφράζονται σε υγιείς και παθολογικούς ιστούς.

ωστόσο, δεν έχει βρεθεί ακόμη αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των δύο φαινομένων. Ίσως, ο μηχανισμός του splicing αντιμετωπίζει κάποιο πρόβλημα στην προσπάθειά του να ανταποκριθεί στον επιταχυνόμενο κυτταρικό πολυπλασιασμό ή μια γενικευμένη διαταραχή στο splicing προκαλεί ανεπάρκεια στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ανεξάρτητα από κάθε μηχανιστική υπόθεση, η εντροπία του splicing αποτελεί μέτρο της γενικευμένης απορρύθμισης του splicing, η οποία χαρακτηρίζει τους περισσότερους καρκινικούς ιστούς. Σε αυτό το πλαίσιο της υψηλής εντροπίας του splicing, οι θεραπευτικοί ηλωφόροι που περιέχουν επαναπρογραμματισμό των ισομορφών του ελαττωματικού splicing³⁴ αναμένεται να έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα. Όπως υπογραμμίζεται από διάφορες μελέτες^{35,36}, οι παράγοντες splice ή οι ουσίες που συμμετέχουν στη ρύθμισή τους μπορεί να αποτελέσουν καλύτε-

ρους θεραπευτικούς στόχους.

Σημειώσεις του μεταφραστή

Εναλλακτική πολυαδενυλίωση: Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους τα ανθρώπινα κύτταρα παράγουν ποικιλία αντιγράφων ενός μοναδικού γονιδίου. Περισσότερα από τα μισά ανθρώπινα γονίδια έχουν πολυπληθείς θέσεις πολυαδενυλίωσης (poly (A) sites), γεγονός που ευθύνεται για τον μεγάλο αριθμό των παραγόμενων mRNA και των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

EST βιβλιοθήκη: Πρόκειται για αρχείο όπου καταγράφονται τα γονίδια που εκφράζονται σε δεδομένο ιστό, σε δεδομένο χρόνο και σαν ανταπόκριση σε δεδομένη θεραπεία. EST σημαίνει "expressed sequence tag", και οι βιβλιοθήκες που απαρτίζονται από αυτές τις αλληλουχίες τυπικά αντιπροσωπεύουν μικρά τμήματα (100-700 βάσεις) των γονιδίων που εκφράζονται. Κάθε βιβλιοθήκη αποτελεί ένα είδος φωτογραφικής απεικόνισης των γονιδίων, που εκφράζεται σε συνάρτηση με το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθεί το αρχικό RNA, με το χρόνο (αναπτυξιακό ή κινητικό) κατά τον οποίον ελήφθη ο ιστός και με τη θεραπεία που χορηγήθηκε στον οργανισμό ή στον ιστό κατά την περίοδο της λήψης.

Ισομορφές: Η ισομορφία μιας πρωτεΐνης είναι μια παραλλαγή της με μικρές διαφορές από μια άλλη ισομορφία της. Διαφορετικές μορφές μιας πρωτεΐνης μπορούν να παράγονται από διαφορετικά αλληλόσυσγενικά γονίδια ή μπορούν να προκύπτουν από το ίδιο γονίδιο μέσω του εναλλακτικού splicing. Ένας μεγάλος αριθμός ισομορφών προκύπτει από πολυμορφισμό, δηλαδή μικρή διαφορά μεταξύ των δύο αλληλίων του ίδιου γονιδίου.

Nonsense mediated decay (NMD): Πρόκειται για έναν κυτταρικό μηχανισμό επιτήρησης του mRNA, ώστε να εντοπισθούν μεταλλάξεις nonsense και να προληφθεί έτσι η παραγωγή ελαττωματικών πρωτεϊνών.

Βιβλιογραφία

1. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, et al. (2005). The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. Science 309: 1559-1563.
2. Tress ML, Martelli PL, Frankish A, Reeves GA, Wesselink JJ, et al. (2007). The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 5495-5500.
3. Zavalan M, Kondo S, Schonbach C, Adachi J, Hume DA, et al. (2003). Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. Genome Res 13: 1290-1300.

4. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan Z, Loerch PM, et al. (2003). Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. *Science* 302: 2141–2144.
5. Pan Q, Shai O, Misquitta C, Zhang W, Saltzman AL, et al. (2004). Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform. *Mol Cell* 16: 929–941.
6. Xu Q, Modrek B, Lee C (2002). Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucl Acids Res* 30: 3754–3766.
7. Zhang H, Lee J, Tian B (2005). Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biology* 6: R100.
8. Woolard J, Wang W-Y, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, et al. (2004). VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant: Mechanism of Action, In vivo Effect On Angiogenesis and Endogenous Protein Expression. *Cancer Res* 64: 7822–7835.
9. Sturla LM, Merrick AE, Burchill SA (2003). FGFR3III5: a novel soluble FGFR3 spliced variant that modulates growth is frequently expressed in tumour cells. *Br J Cancer* 89: 1276–1284.
10. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, et al. (2004). Rac1b, tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene* 23: 9369–9380.
11. Srebrow A, Kornbliht AR (2006). The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 119: 2635–2641.
12. Venables JP (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* 64: 7647–7654.
13. Mazoyer S, Puget N, Perrin-Vidoz L, Lynch HT, Serova-Sinilnikova OM, et al. (1998). A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *Am J Hum Genet* 62: 713–715.
14. Cheng C, Sharp PA (2006). Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol Cell Biol* 26: 362–370.
15. Stoilov P, Daoud R, Nayler O, Stamm S (2004). Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Hum Mol Genet* 13: 509–524.
16. Watermann DO, Tang Y, Zur Hausen A, Jager M, Stamm S, et al. (2006). Splicing factor Tra2-beta1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene. *Cancer Res* 66: 4774–4780.
17. Ghigna C, Giordano S, Shen H, Benvenuto F, Castiglioni F, et al. (2005). Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell* 20: 881–890.
18. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, et al. (2007). The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 14: 185–193.
19. Maeda T, Hiranuma H, Jikko A (1999). Differential expression of the splicing regulatory factor genes during two-step chemical transformation in a BALB/3T3-derived cell line, MT-5. *Carcinogenesis* 20: 2341–2344.
20. Zerbe LK, Pino I, Pio R, Cospier PF, Dwyer-Nield LD, et al. (2004). Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing. *Mol Carcinog* 41: 187–196.
21. Roy M, Xu Q, Lee C (2005). Evidence that public database records for many cancer-associated genes reflect a splice form found in tumors and lack normal splice forms. *Nucleic Acids Res* 33: 5026–5033.
22. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25–29.
23. Kelso J, Visagie J, Theiler G, Christoffels A, Bardien S, et al. (2003). eVOC: a controlled vocabulary for unifying gene expression data. *Genome Res* 13: 1222–1230.
24. Sorek R, Shamir R, Ast G (2004). How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet* 20: 68–71.
25. Le Texier V, Riethoven JJ, Kumanduri V, Gopalakrishnan C, Lopez F, et al. (2006). AltTrans: transcript pattern variants annotated for both alternative splicing and alternative polyadenylation. *BMC Bioinformatics* 7: 169.
26. Stuart JM, Segal E, Koller D, Kim SK (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science* 302: 249–255.
27. Puthier D, Joly F, Irla M, Saade M, Victorero G, et al. (2004). A general survey of thymocyte differentiation by transcriptional analysis of knockout mouse models. *J Immunol* 173: 6109–6118.
28. Jumaa H, Nielsen PJ (1997). The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *Embo J* 16: 5077–5085.
29. Xu Q, Lee C (2003). Discovery of novel splice forms and functional analysis of Cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res* 31: 5635–5643.
30. Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, et al. (2004). Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 11: 1085–1090.
31. Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berger SM (1999). Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 18: 3574–3582.
32. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE (2007). Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* 446: 926–929.
33. Ni JZ, Grate L, Donohue JP, Preston C, Nobida N, et al. (2007). Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* 21: 708–718.
34. Garcia-Blanco MA, Baraniak AP, Lasda EL (2004). Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* 22: 535–546.
35. Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ (2006). Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 66: 3819–3827.
36. Pilch B, Allemand E, Facompre M, Bailly C, Riou JF, et al. (2001). Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. *Cancer Res* 61: 6876–6884.
37. Tian B, Pan Z, Lee JY (2007). Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res* 17: 156–165.
38. Martin D, Brun C, Remy E, Mouren P, Thieffry D, et al. (2004). GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. *Genome Biol* 5: R101.