



REVUE

L'épissage alternatif : un générateur de diversité fonctionnelle dans les cancers

Alternative splicing as a generator of functional diversity in cancer

Panagiotis Prinos¹, Roscoe Klinck^{1,2}, Julian P. Venables¹, Jean-Pierre Perreault³,
Raymund J. Wellinger², Sherif Abou Elela^{1,2}, Benoît Chabot^{1,2}

¹Laboratoire de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke

²Département de microbiologie et d'infectiologie

³Département de biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Pavillon de Recherche Appliquée sur le Cancer (PRAC)

Correspondance :

Benoît Chabot
Département de Microbiologie et d'Infectiologie
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
Université de Sherbrooke
Pavillon de Recherche Appliquée sur le
Cancer (PRAC)
3201, rue Jean-Mignault
Sherbrooke, Québec, J1E 4K8
Canada
☎ 819 821-8000, poste 75321
✉ benoit.chabot@usherbrooke.ca



Article reçu le : 23 avril 2012
Article accepté le : 21 septembre 2012



Résumé

L'épissage alternatif multiplie la capacité codante du génome humain et permet aux gènes d'être produits en plusieurs variétés fonctionnelles. Grâce à notre plateforme technologique à haut débit et l'utilisation de la technique de RT-PCR, nous avons découvert des centaines de différences d'épissage alternatif entre les cancers du sein et de l'ovaire et les tissus normaux correspondants. Une importante part des différences est expliquée par une baisse d'expression de RBFOX2, une protéine qui contrôle la sélection des sites d'épissage. En plus de constituer des marqueurs moléculaires utiles pour le diagnostic, certaines de ces différences ont un impact fonctionnel important. En effet, le variant du gène *Syk* retrouvé dans les cancers change la localisation et l'activité de la protéine SYK, aide la progression du cycle cellulaire et favorise la croissance libre d'ancrage et la survie cellulaire. L'épissage alternatif de *Syk* vers la forme associée au cancer survient lorsque les cellules sont traitées au facteur de croissance EGF. Ainsi, ces études ont non seulement conduit à la découverte d'une multitude de nouveaux marqueurs et cibles, mais elles ont également permis de mieux comprendre la nature des réseaux contribuant au processus cancéreux.

Summary

*Alternative splicing drastically increases the coding and functional capacity of the human genome. Using a unique high-throughput RT-PCR platform, we have investigated the alternative splicing profiles in ovarian and breast cancers, and found hundreds of splicing events that are altered in cancer tissues. Many of these events are controlled by a single splicing factor, the RNA binding protein RBFOX2. The cancer-associated alternative splicing altered the activity and localization of SYK to encourage cell-cycle progression, anchorage-independent growth and cell survival. Exposure of cancer cells to EGF modulates the splicing of *Syk* to favor expression of the cancer-associated pro-survival variant. Our comprehensive study of cancer-associated alternative splicing events therefore revealed novel markers and drug targets, and provided new insights into signaling pathways that contribute to cancer.*



L'épissage alternatif

L'épissage alternatif permet d'inclure sélectivement des exons ou des portions d'exons afin de produire plusieurs variants d'ARN messagers (ARNm) à partir d'un seul gène. Chez les humains, presque chaque gène subit l'épissage alternatif, conduisant à la production d'isoformes protéiques aux activités biologiques parfois différentes, voire même opposées [1, 2, 3]. En plus de moduler l'inclusion de séquences codant pour des portions protéiques, l'épissage alternatif peut également introduire ou prévenir l'inclusion d'éléments qui influenceront la traduction, la localisation et la dégradation des ARNm [4]. Malgré son importance biologique, l'annotation histo-spécifique des profils d'épissage alternatif n'en est encore qu'à ses débuts. De même, la diversité fonctionnelle des variants d'épissage n'est que très peu documentée. Comme l'épissage alternatif participe activement à la diversification de la fonction des protéines, il est souvent contrôlé de façon co- ou post-transcriptionnelle [5, 6] *via* des protéines qui stimuleront

ou réprimeront la reconnaissance et l'utilisation des sites d'épissage. Outre les deux familles principales de protéines associées à ce type de contrôle, soit les protéines hnRNP et SR, la liste des protéines régulatrices d'épissage ne cesse de s'allonger [7].

On estime que les mutations présentes directement au niveau des sites d'épissage ou dans des éléments régulateurs à proximité, sont responsables de plus de 70 % des mutations ponctuelles causant des maladies [8, 9]. Des dérèglements dans la production de variants d'épissage ont souvent été rapportés, indiquant leurs rôles présomptifs dans la maladie, mais aussi leur potentiel comme marqueurs diagnostiques ou pronostiques [10, 11]. Parmi les premières découvertes, l'épissage alternatif de l'urokinase et des récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes a permis d'identifier ces marqueurs comme indicateurs pronostiques du cancer du sein [12, 13]. D'autres variants d'épissage, comme ceux de *TSG101*, ont été associés à des tumeurs de grade histopathologique élevé



[14]. Plus récemment, une étude réalisée par notre groupe a révélé plusieurs événements d'épissage étroitement associés au grade des tumeurs de cancers du sein et de l'ovaire [15, 16]. Ces découvertes amènent à la question suivante : ces différences d'épissage alternatif sont-elles les causes ou les conséquences du cancer ? L'exploration approfondie des impacts phénotypiques causés par une modification de l'expression de ces variants dans des systèmes

Validation à grande échelle des événements d'épissage alternatif associés au cancer

Tous les mécanismes cellulaires contribuant à la carcinogenèse [18] sont régis par des gènes épissés de façon alternative et dont les profils d'épissage sont souvent bouleversés lors du cancer. Ainsi, des gènes impliqués dans la croissance cellulaire (tels *p53*, *FGFR2*, *BRCA1*), l'adhésion et la migration (tels *CD44* et *Ron*), l'angiogenèse (tel *VGEF*), l'immortalité répliquative (tel *h-TERT*) et l'apoptose (tels *Fas* et *Bcl-x*) voient leurs profils d'épissage altérés durant le cancer [19-22]. Il en est de même pour les gènes dictant le métabolisme particulier des tumeurs néoplasiques (tel *PKM*), ou ceux pro-

modèles permettra d'y répondre. Nos résultats récents montrent un lien significatif entre l'expression de certains variants et la survie cellulaire. Ainsi, nous avons découvert qu'une fonction importante des événements d'épissage alternatif associés aux cancers du sein et de l'ovaire converge vers la régulation du réseau MAPK/JNK, en modifiant la localisation cellulaire de protéines cruciales à cette voie de signalisation [17].

diguant aux cellules cancéreuses une capacité à résister aux attaques du système immunitaire (tel *MHC-I*), et aux médicaments utilisés en chimiothérapie (tel *MRP-1*) [23-25].

Il y a quelques années, au moment où plusieurs groupes utilisaient la technologie des micro-puces à ADN pour identifier des différences d'épissage alternatif dans des tissus cancéreux [26-30], nous construisions une plateforme automatisée de criblage de RT-PCR permettant d'identifier et de valider des événements d'épissage associés aux cancers de l'ovaire et du sein [15, 16]. Le laboratoire de génomique fonctionnelle



de l'Université de Sherbrooke (LGFUS) s'est donc dédié à la découverte, la validation et l'analyse fonctionnelle de l'épissage alternatif. Cette plateforme possède également un volet informatique intégré permettant la conception d'amorces, l'interprétation automatique des résultats et la représentation graphique de ceux-ci (voir <http://palace.lgfus.ca/pcrreactiongroup/list/193>). L'avantage principal de la plateforme de RT-PCR par rapport aux technologies de micro-puces ou de séquençage à haut débit est de fournir rapidement une information validée. Bien que la couverture de transcrits ne soit pas aussi importante que celle offerte par les technologies de micro-puces et de séquençage, la plateforme de RT-PCR permet néanmoins de réaliser à moindre coût une étude sur plusieurs échantillons représentant, par exemple, des tissus de patients ou des lignées cellulaires traitées selon différents protocoles.

Pour chaque gène étudié, une carte transcriptionnelle est préalablement produite et présente tous les transcrits qui y sont associés. Suite à la conception d'amorces et sur réception

des oligonucléotides, l'analyse robotique par RT-PCR est effectuée. Les amplifications sont analysées par électrophorèse capillaire automatisée. Les données sur la taille et l'abondance relative des amplicons sont ensuite transférées dans la base de données de la plateforme pour intégration et appréciation statistique. Ce processus conduit alors à l'identification de différences significatives d'épissage entre tissus normaux et cancéreux.

Grâce à cette plateforme, nous avons pu comparer dans un premier temps les profils d'épissage alternatif de 600 gènes pertinents au cancer dans des ovaires normaux et des cancers ovariens de nature épithéliale [16]. Une étude semblable a également été conduite pour le cancer du sein [15]. Ces études ont respectivement identifié 45 événements d'épissage associés au cancer de l'ovaire et 41 événements associés au cancer du sein. Le chevauchement d'environ 30 % d'identité des cibles entre ces deux types de cancer suggère que leurs voies de régulation de l'épissage alternatif pourraient être communes [15].



L'intérêt de ces résultats a justifié la mise en place d'une étude plus exhaustive, couvrant l'ensemble des événements d'épissage alternatif simples (exons cassettes, sites d'épissage 5' ou 3' alternatif) connus et catalogués dans la base de données RefSeq [31]. L'analyse de plus de 3000 événements sur 46 échantillons a permis d'identifier des centaines d'événements d'épissage associés aux cancers de l'ovaire et du sein. Ce résultat confirme le chevauchement important identifié entre les événements associés aux deux types de cancer. La première interrogation découlant de cette compilation a porté sur les mécanismes régulateurs responsables de ces changements. Ainsi, une approche bioinformatique a révélé l'existence d'un motif de 6 nucléotides (U/AGCAUG), situé à proximité du tiers des exons alternatifs dont l'épissage alternatif

Évaluation de la fonction des variants d'épissage par l'utilisation de siRNAs et d'oligonucléotides

Un des défis actuels de la génomique fonctionnelle consiste à attribuer des fonctions à la multitude de variants produits par épissage alternatif. Puisque plusieurs d'entre eux pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques, un second défi

était altéré dans le cancer. Ce site correspond à la séquence de liaison du facteur d'épissage RBFOX2, une protéine dont l'expression est altérée dans le cancer du sein et réprimée dans celui de l'ovaire [31]. Nous avons également remarqué une représentation significativement plus élevée d'événements d'épissage alternatif associés à des gènes impliqués dans le maintien du cytosquelette, particulièrement à la périphérie des cellules mobiles (Figure 1). Cette donnée suggère fortement un rôle pour l'épissage alternatif dans la migration cellulaire et les métastases. Des études récentes confirment cette conclusion. En effet, de multiples changements d'épissage ont désormais été répertoriés dans les cellules métastatiques et dans la transition épithelio-mésenchymale (EMT) qui distingue ce type de cellules [32].

consiste à développer des outils capables de moduler les choix d'épissage. Une première stratégie qui permet de faire progresser ces deux aspects de façon simultanée consiste à induire la dégradation sélective d'un variant, tel que celui associé à l'état

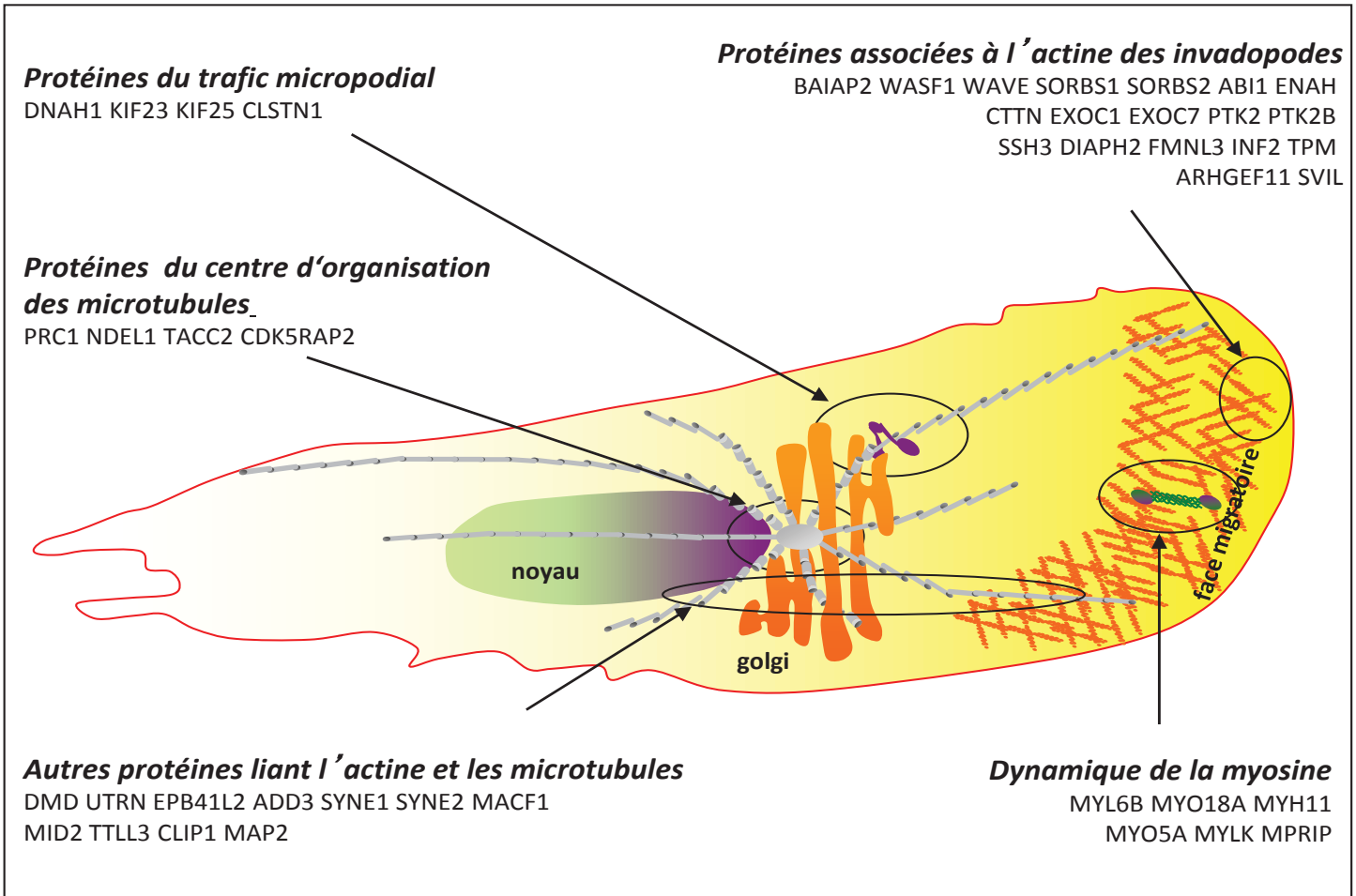


Figure 1. Les variants d'épissage associés au cancer de l'ovaire appartiennent à des gènes souvent impliqués dans la dynamique du cytosquelette

Les événements d'épissage alternatif associés au cancer de l'ovaire sont préférentiellement retrouvés dans les gènes qui codent pour des protéines liant les microtubules et l'actine, celles-ci se retrouvant à la surface cellulaire impliquée dans la migration. Les sous-catégories fonctionnelles et les gènes dont l'épissage alternatif est contrôlé par Rbfox2 sont indiqués.

cancéreux. Dans ce cas précis, un siRNA ciblant spécifiquement ce variant permettra de le dégrader sélectivement *via* le mécanisme d'interférence à l'ARN (Figure 2).

Une stratégie différente consiste à reprogrammer l'épissage alternatif par l'utilisation

d'un oligonucléotide d'ARN s'hybridant au site d'épissage que l'on souhaite inhiber.

Des modifications chimiques induisant une meilleure résistance aux nucléases vont accentuer l'effet de cet oligonucléotide en augmentant son temps d'action dans la cellule.

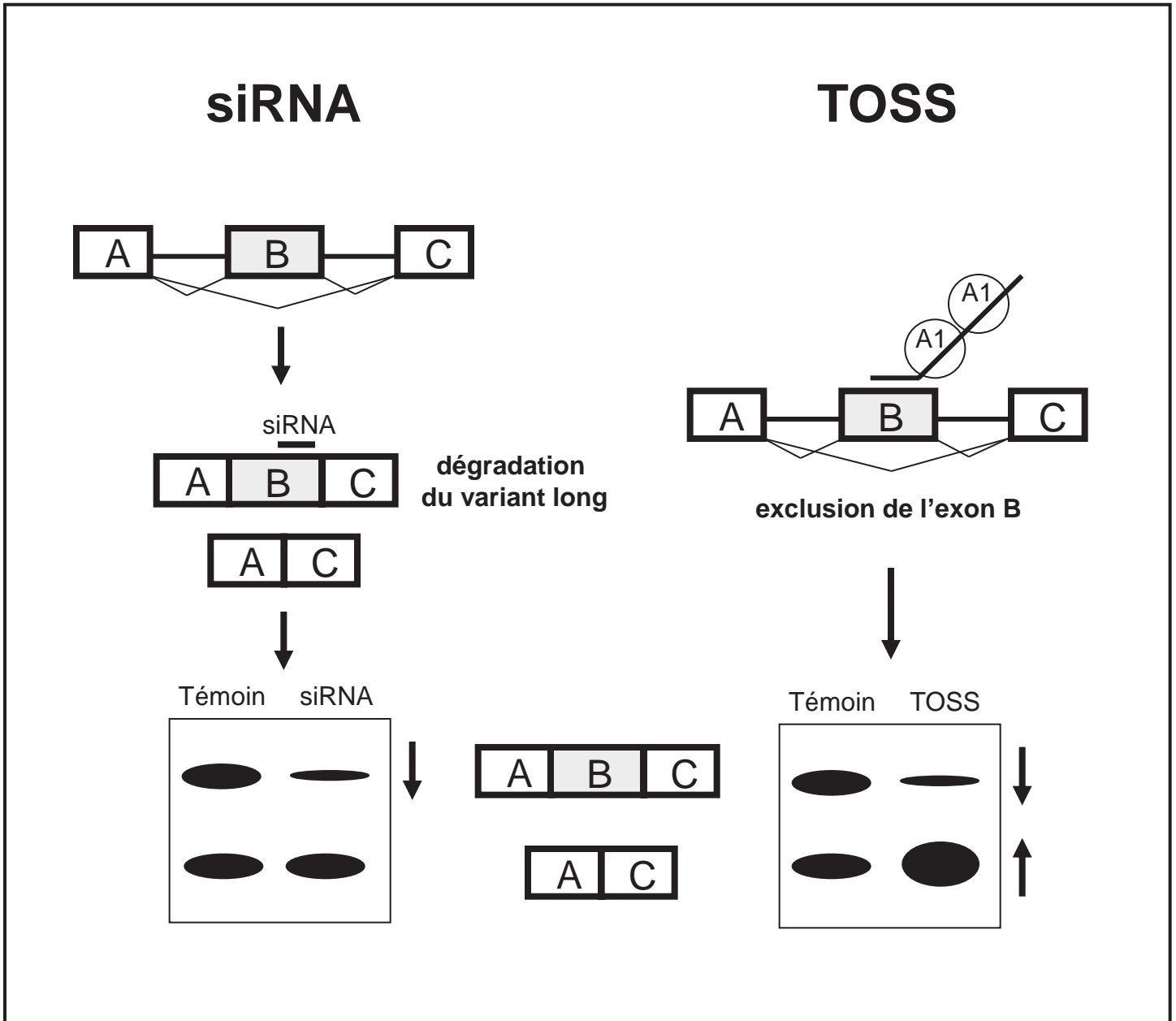


Figure 2. Inhibition spécifique de variants d'épissage par le siRNA et l'approche TOSS

Un siRNA spécifique à l'isoforme longue d'épissage est utilisé pour réduire l'abondance de ce transcrit par interférence à l'ARN. Dans l'approche TOSS, un oligonucléotide bifonctionnel (portion hybridante et portion non hybridante portant un ou plusieurs sites de liaison pour la protéine hnRNP A1) est utilisé pour reprogrammer l'utilisation des sites d'épissage, aboutissant à une diminution de l'isoforme longue et une augmentation de l'isoforme courte, sans réduction de l'expression globale du gène.



(Figure 2). Une variante de cette dernière approche consiste à utiliser un oligonucléotide TOSS (*Targeted Oligonucleotide for Silencing of Splicing*) qui s'hybridera à proximité du site d'épissage visé et qui possède dans sa portion non hybridante un site de liaison pour un facteur nucléaire, tel que la protéine hnRNP A1 (Figure 2). Le positionnement de la portion interférante à proximité du site d'épissage ciblé semble améliorer l'efficacité de l'inhibition. En effet, grâce à cette approche, une quantité moindre d'oligonucléotide est requise [33].

Les premières utilisations d'oligonucléotides aux fins de reprogrammation d'épissage visaient le transcrite du régulateur de l'apoptose *Bcl-x*, un gène exprimant un variant anti-apoptotique (*Bcl-xL*) et un variant pro-apoptotique (*Bcl-xS*). Les cellules cancéreuses en culture expriment préférentiellement la forme anti-apoptotique, contribuant à leur résistance à l'apoptose. Le déplacement de l'épissage alternatif de *Bcl-x* vers la forme pro-apoptotique (*Bcl-xS*) sensibilise les cellules aux agents chimiothérapeutiques ou induit l'apoptose [34, 35]. L'approche de reprogrammation par oligo-

nucléotide est intéressante puisqu'elle permet de reprogrammer l'expression d'une isoforme vers une autre, préservant ainsi la quantité totale constante (Figure 2). En effet, lorsque qu'un siRNA est utilisé pour réduire l'expression d'une isoforme, l'effet phénotypique observé pourrait être causé par une baisse globale d'expression plutôt que par la réduction d'un seul variant.

Nous avons utilisé ces stratégies pour évaluer l'impact fonctionnel des changements d'épissage observés dans les tissus cancéreux. Ainsi, les conséquences de l'introduction de siRNAs et d'oligonucléotides TOSS dans des cellules cancéreuses en culture sur l'abondance des ARNm, les niveaux protéiques, et sur le phénotype cellulaire sont déterminées [17]. Ces essais sont réalisés par une plateforme robotisée, avec l'utilisation notamment d'un microscope confocal, mesurant la viabilité et la croissance cellulaire, les étapes du cycle cellulaire, l'apoptose ainsi que l'activation des points de contrôle induits par les dommages à l'ADN. Cette approche permet donc d'associer la fonction d'un variant d'épissage à un ou plusieurs paramètres cellulaires. Notre



plateforme permet également de mesurer des changements d'adhésion, de migration et d'invasion cellulaire, processus biologiques pertinents à la progression tumorale et à la cancérogenèse. Par ailleurs, l'utilisation simultanée d'un siRNA réduisant l'abondance d'une isoforme, et d'un oligonucléotide TOSS stimulant la production de l'autre isoforme, constitue une approche puissante. En effet, cette technique permet d'évaluer avec une grande précision la

fonction des isoformes d'épissage, puisqu'elle offre la possibilité de distinguer l'impact d'une modulation d'épissage d'un effet causé par un changement global dans l'expression du gène. Ces approches demeurent également davantage robustes, rapides et informatives que l'introduction d'un variant spécifique par transfection, la surexpression d'une protéine pouvant causer des effets toxiques souvent non spécifiques [40].

Conséquences fonctionnelles de l'épissage alternatif dans le cancer

Afin d'évaluer l'impact fonctionnel de 71 événements d'épissage alternatif associés au cancer du sein et de l'ovaire, un premier criblage a été effectué à l'aide des deux approches complémentaires décrites ci-dessus [17]. Une analyse rigoureuse a permis d'identifier trois événements d'épissage alternatif provoquant des changements de survie cellulaire. Ainsi, dans le cas du transcrite encodant la tyrosine kinase SYK, un déplacement de l'épissage vers la forme courte (SYK-S) ainsi que la dégradation spécifique de la forme longue (SYK-L) associée au cancer, provoquent l'apoptose. Ce phénotype

est spécifique aux variants puisqu'une réduction simultanée des deux isoformes n'a pas d'effet. Ce résultat indique que pour certains gènes, alors qu'une réduction globale de l'expression n'a aucun effet, l'impact sur la survie cellulaire n'est révélé qu'après destruction spécifique de l'une des isoformes. Nous avons également observé que la mitose était altérée dans les cellules ayant subi une déplétion de SYK-L, indiquant l'implication de ce variant d'épissage dans la progression mitotique [17]. D'autres études récentes corroborent l'importance de l'épissage alternatif comme contributeur à la régulation du



cycle cellulaire et de l'apoptose [36]. Puisque la kinase SYK est une cible thérapeutique potentiellement associée à plusieurs types de cancers, des approches thérapeutiques ciblant spécifiquement son isoforme longue ou visant à reprogrammer l'épissage alternatif semblent intéressantes. Nous avons également observé que l'isoforme d'épissage longue de *Mcl1* était essentielle pour la survie des cellules cancéreuses. La protéine MCL1 est elle-même régulée

Voies de signalisation et contrôle de l'épissage alternatif

Des cellules déplétées en SYK-L induisent la réponse apoptotique par la voie de signalisation JUN. En effet, son inhibition prévient l'apoptose induite par la déplétion de SYK-L [17] (Figure 3). Puisque JUN peut avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques dépendamment du contexte cellulaire [39], les effets de SYK-L sur cette voie apparaissent vraisemblablement spécifique au système cellulaire étudié. Une analyse des variants pour deux types de MAPK kinases, soit MAP3K7 and MINK1, montre un changement de profil associé au cancer ovarien, ainsi qu'un rôle de ces deux kinases dans la survie cellu-

par SYK dans les leucémies, et elle fait partie du réseau de survie mis en place dans les cellules cancéreuses (Figure 3). L'épissage alternatif de SYK et de MCL1 influence la localisation des protéines correspondantes puisque l'exon alternatif de SYK encode un signal de localisation nucléaire, tandis que l'exon alternatif de MCL1 confère à la protéine la capacité de s'insérer dans la membrane mitochondriale.

laire [17]. Des résultats préliminaires indiquent que la destruction de ces isoformes compromet la migration cellulaire. Ces études suggèrent que plusieurs événements d'épissage alternatif dans l'axe MAPK/JNK produisent des variants qui influencent les capacités de survie et la migration des cellules cancéreuses (Figure 3).

La régulation de l'épissage alternatif est elle-même contrôlée par des voies de signalisation [37, 38]. Le facteur de croissance EGF induit l'expression de SYK-L, plus précisément du variant associé à la survie cellulaire requis pour la progression en mitose [17].

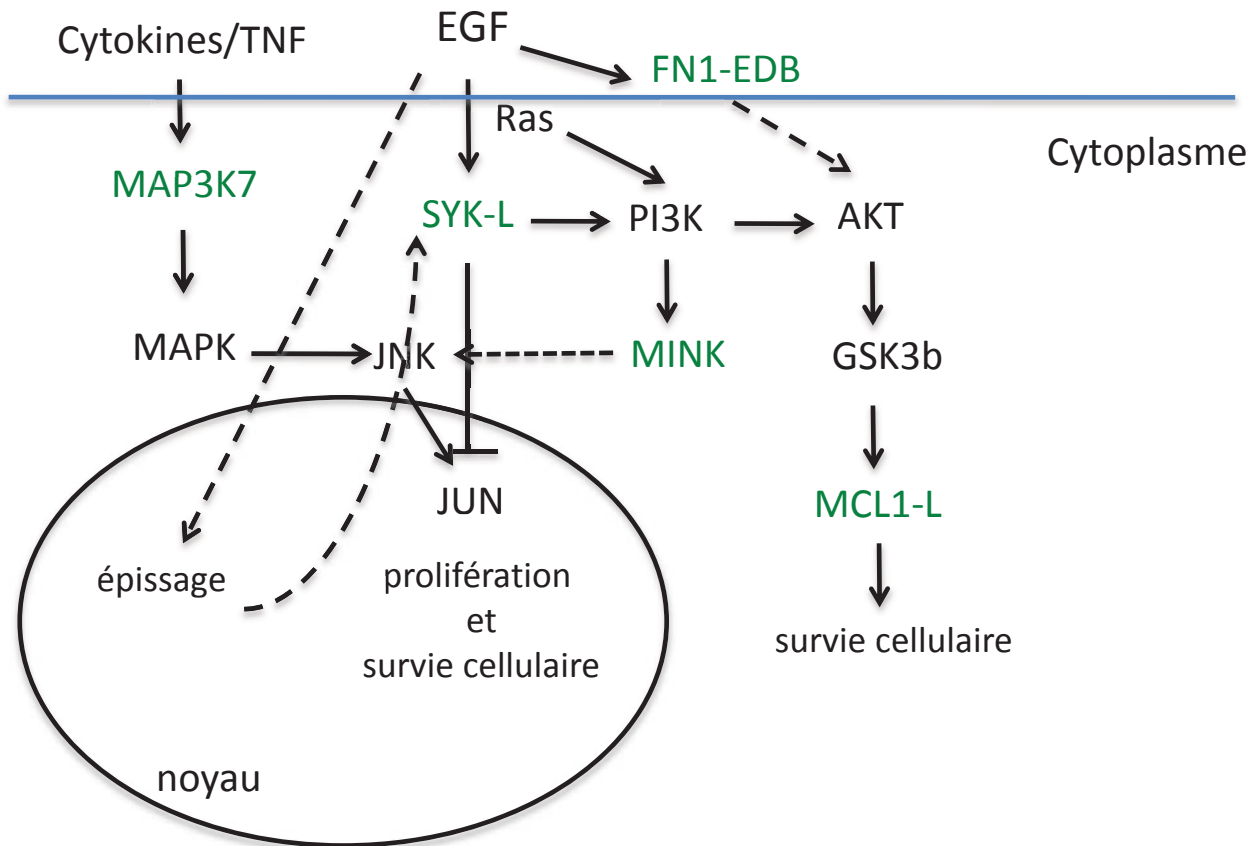


Figure 3. Voies de signalisation affectant et affectées par l'épissage alternatif dans le cancer ovarien

Modèle montrant comment la voie de signalisation EGF provoque une diversification du répertoire des variants d'épissage. EGF contrôle l'épissage alternatif de SYK, possiblement en altérant la fonction de certains régulateurs nucléaires. Les gènes dont les isoformes d'épissage sont requises pour la viabilité cellulaire (FN1, SYK, MCL-1, MAP3K7 and MINK) sont indiqués en vert.

Cette observation soutient la pertinence de la régulation de l'épissage alternatif dans le cancer, et montre que les décisions d'épissage ne sont pas statiques, mais dépendent des voies de signalisation mitogéniques associées à la prolifération tumorale. Un déplacement

marqué de l'épissage vers la forme proliférative de SYK est observé dans les cancers ovariens à grade élevé. L'épissage alternatif de SYK semble donc être étroitement associé au potentiel malin de la tumeur. En accord avec cette suggestion, la croissance libre d'ancrage



et la mitose sont inhibées par la destruction de SYK-L dans des cellules de cancer ovarien en culture. Cet effet est probablement indépendant de la voie JUN puisque SYK peut lier les centrosomes et phosphoryler directement la

Conclusion

L'importance fonctionnelle de l'épissage alternatif dans la transformation cellulaire et la progression cancéreuse est de plus en plus évidente. On peut anticiper qu'une étroite régulation de ce mécanisme sera associée à chacune des étapes de la carcinogenèse. La mise en opération de plateformes technologiques dédiées à la découverte et à l'analyse fonctionnelle des variants d'épissage permettra sans doute de multiplier les liens entre l'épissage alternatif et le cancer. Ces progrès offriront, à leur tour, une nouvelle façon d'entrevoir les interventions anti-cancer. Chaque événement d'épissage alternatif pouvant en principe représenter une cible spécifique, l'utilisation des technologies d'interférence à l'ARN et d'oligonucléotides capables de reprogrammer les décisions

tubuline [41], affectant ainsi la mitose [42]. Ces observations soulignent l'importance de l'épissage alternatif dans les processus dictant la prolifération des cellules cancéreuses.

d'épissage, pourra être adaptée au traitement du cancer chez l'humain. Dans ce contexte, le LFGUS souhaite maintenir son plateau technologique, assurant l'attribution de nouvelles fonctions créées par l'épissage alternatif et le développement d'approches innovantes pour les moduler. Ces technologies permettront également d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans le cancer et d'en dégager des stratégies d'intervention originales. Bien qu'elles constituent des outils performants lorsqu'appliquées aux cancers, elles demeurent toutes aussi pertinentes aux études axées sur les autres maladies pour lesquelles le rôle des variants d'épissage reste encore à être évalué de façon systématique.



Références

1. Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, Wen Y, Shen M, Falaleeva M, Stamm S.. Function of alternative splicing. *Gene*. 2012. [Epub ahead of print]
2. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 2008; 40 : 1413-5.
3. Wang ET, Sandberg R, Luo S, *et al*. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008; 456 : 470-6.
4. Fisette JF, Michelle L, Revil T, Chabot B. [Guiding and integrating to control and diversify splicing]. *Med Sci (Paris)* 2009; 25 : 175-80.
5. Pandya-Jones A, Black DL. Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons. *RNA* 2009.
6. Vargas DY, Shah K, Batish M, *et al*. Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell* 2011; 147 : 1054-65.
7. Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation : insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10 : 741-54.
8. Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigo R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett* 2005; 579 : 1900-3.
9. Lopez-Bigas N, Ouzounis CA. Genome-wide identification of genes likely to be involved in human genetic disease. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 : 3108-14.
10. Garcia-Blanco MA, Baraniak AP, Lasda EL. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* 2004; 22 : 535-46.
11. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, *et al*. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007; 447 : 1087-93.
12. Luqmani YA, Mortimer C, Yiangou C, *et al*. Expression of 2 variant forms of fibroblast growth factor receptor 1 in human breast. *Int J Cancer* 1995; 64 : 274-9.
13. Luther T, Kotsch M, Meye A, *et al*. Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost* 2003; 89 : 705-17.
14. Turpin E, Dalle B, de Roquancourt A, *et al*. Stress-induced aberrant splicing of TSG101 : association to high tumor grade and p53 status in breast cancers. *Oncogene* 1999; 18 : 7834-7.
15. Venables JP, Klinck R, Bramard A, *et al*. Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68 : 9525-31.
16. Klinck R, Bramard A, Inkel L, *et al*. Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. *Cancer Res* 2008; 68 : 657-63.
17. Prinós P, Garneau D, Lucier JF, *et al*. Alternative splicing of SYK regulates mitosis and cell survival. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18 : 673-9.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer : the next generation *Cell* 2011; 144(5) :646-74.
19. Revil T, Shkreta L, Chabot B. [Pre-mRNA alternative splicing in cancer : functional impact, molecular mechanisms and therapeutic perspectives]. *Bull Cancer* 2006; 93 : 909-19.
20. Krams M, Claviez A, Heidorn K, *et al*. Regulation of telomerase activity by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas. *Am J Pathol* 2001; 159 : 1925-32.
21. Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing : an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007; 8 : 349-57.
22. Venables JP. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays* 2006; 28 : 378-86.
23. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, *et al*. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452 : 230-3.



24. Rodriguez-Cruz TG, Liu S, Khalili JS, *et al.* Natural splice variant of MHC class I cytoplasmic tail enhances dendritic cell-induced CD8+ T-cell responses and boosts anti-tumor immunity. *PLoS one* 2011; 6 : e22939.
25. He X, Ee PL, Coon JS, Beck WT. Alternative splicing of the multidrug resistance protein 1/ATP binding cassette transporter subfamily gene in ovarian cancer creates functional splice variants and is associated with increased expression of the splicing factors PTB and SRp20. *Clin Cancer Res* 2004; 10 : 4652-60.
26. Relogio A, Ben-Dov C, Baum M, *et al.* Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280 : 4779-84.
27. Milani L, Fredriksson M, Syvanen AC. Detection of alternatively spliced transcripts in leukemia cell lines by minisequencing on microarrays. *Clin Chem* 2006; 52 : 202-11.
28. French PJ, Peeters J, Horsman S, *et al.* Identification of differentially regulated splice variants and novel exons in glial brain tumors using exon expression arrays. *Cancer Res* 2007; 67 : 5635-42.
29. Gardina PJ, Clark TA, Shimada B, *et al.* Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC Genomics* 2006; 7 : 325.
30. Li C, Kato M, Shiue L, Shively JE, Ares M, Jr., Lin RJ. Cell type and culture condition-dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays. *Cancer Res* 2006; 66 : 1990-9.
31. Venables JP, Klinck R, Koh C, *et al.* Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16 : 670-6.
32. Biamonti G, Bonomi S, Gallo S, Ghigna C. Making alternative splicing decisions during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Cell Mol Life Sci* 2012.
33. Villemaire J, Dion I, Elela SA, Chabot B. Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 2003; 278 : 50031-9.
34. Mercatante DR, Bortner CD, Cidlowski JA, Kole R. Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *J Biol Chem* 2001; 276 : 16411-7.
35. Mercatante DR, Mohler JL, Kole R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem* 2002; 277 : 49374-82.
36. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 2010; 142 : 625-36.
37. Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A. Signals, pathways and splicing regulation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007; 39 : 2031-48.
38. Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, *et al.* The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Mol Cell* 2012; 47 : 1-12.
39. Shaulian, E. AP-1—the Jun proteins : oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell. Signal.* 2010; 22 : 894-899.
40. Fukunaga Y, Svoboda RA, Cerny RL, Johnson KR, Wheelock MJ. Expression artifact with retroviral vectors based on pBMN. *Anal Biochem.* 2009; 395(1) : 49-53.
41. Faruki, S., Geahlen, R.L. & Asai, D.J. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J. Cell Sci.* 2000; 113 : 2557-2565.
42. Zyss, D. *et al.* The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res.* 2005; 65 : 10872-10880.