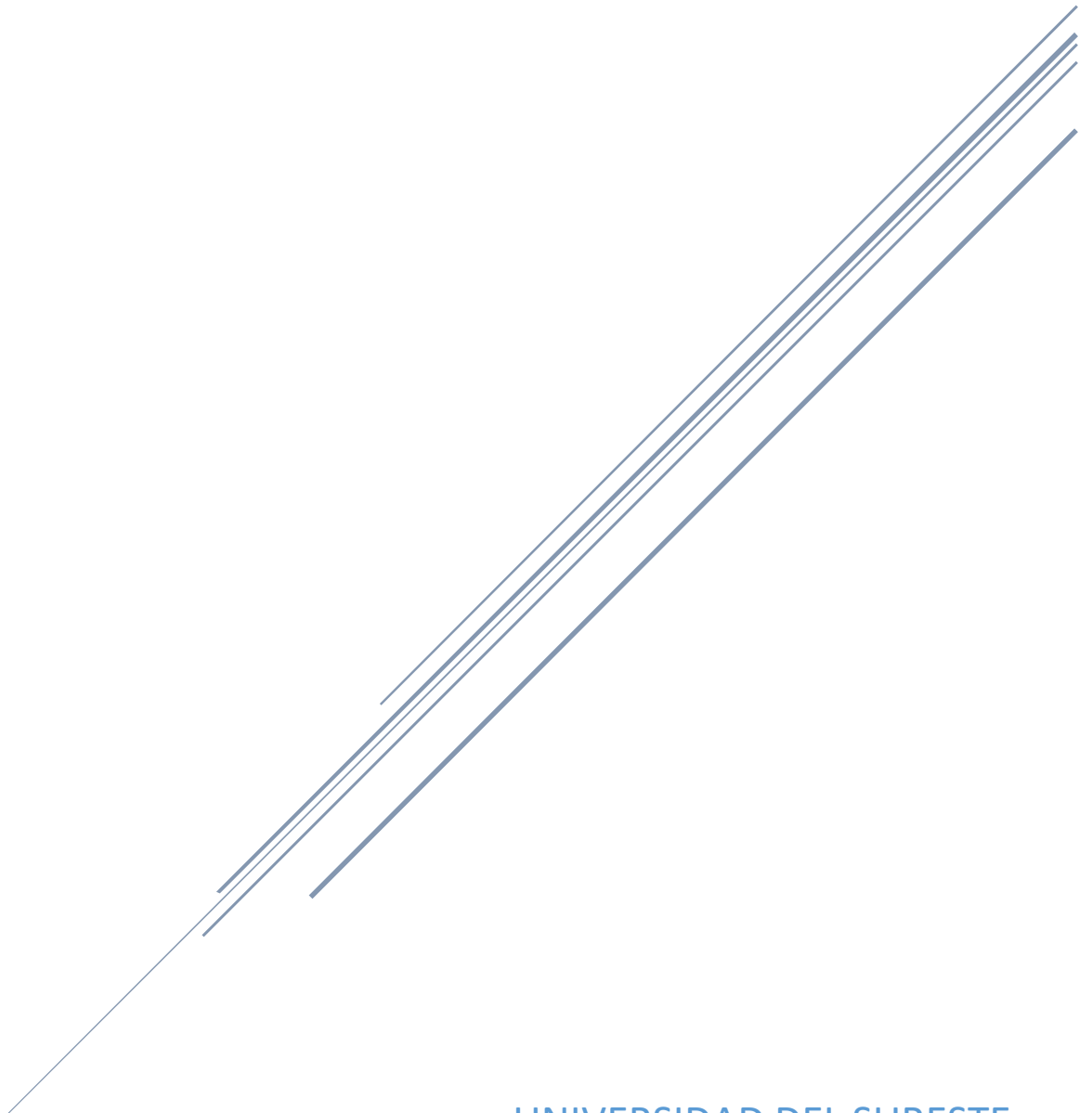


BIOLOGIA MOLECULAR

RESMEN



UNIVERSIDAD DEL SURESTE
ITZEL JAQUELINE RAMO MATAMBU

El transcriptoma y la genómica del cáncer

El cáncer se origina a partir alteraciones genéticas que interfieren con mecanismos esenciales para el ciclo vital de las células, como son la reparación del ADN, el control de la duplicación y la activación de la muerte celular o apoptosis . Las nuevas técnicas de secuenciación han facilitado la detección de alteraciones en el genoma de múltiples tumores y han puesto de manifiesto la variabilidad genética del tumor entre diferentes individuos y dentro de cada individuo. Dichos estudios también han permitido identificar aquellas alteraciones más probablemente relevantes, llamadas *drivers*, que dirigirían las transformaciones del tumor, y diferenciarlas de mutaciones secundarias, llamadas *passengers*. La información genética, antes de dar lugar a proteínas, genera moléculas de ARN mediante la transcripción y el *splicing*. El *splicing* es el mecanismo por el cual la información codificada en exones a lo largo del genoma, e interrumpida por los llamados intrones, elimina dichos intrones para dar lugar a las moléculas de ARN maduro. La mayoría de los genes dan lugar a múltiples moléculas de ARN mediante el proceso del *splicing* alternativo, y por tanto pueden producir a partir de un único gen diferentes proteínas con funciones potencialmente muy diversas, o moléculas de ARN no codificantes. El conjunto de moléculas de ARN en la célula se denomina transcriptoma, y el *splicing* es esencial para definir y entender el transcriptoma. El *splicing* está controlado por múltiples complejos moleculares, compuestos principalmente por un gran número de proteínas, entre las que destacan aquellas que interaccionan con los ARNs (RBPs – *RNA binding proteins*). Dichos complejos se unen al ARN en distintos lugares, o motivos de unión a ARN, para mediar su procesamiento. La molécula de ARN resultante es el producto de un equilibrio entre las concentraciones y las eficiencias de los diferentes complejos actuando sobre el ARN.

El *splicing* y la terapia en cáncer

A lo largo de los últimos años, múltiples trabajos científicos han relacionado las alteraciones del *splicing* alternativo con el cáncer, y recientemente se han descubierto que dichas alteraciones son también relevantes desde un punto de vista clínico. Este es el caso de un cambio de *splicing* detectado en el gen *MET* en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Dicho cambio consiste en la omisión de exón en el ARN maduro y da lugar a la eliminación de una región de la proteína que actúa como represora de la actividad catalítica (Ma et al. 2003). Sorprendentemente, los tumores que muestran dicha omisión del exón en *MET*, sin ninguna otra alteración en el gen *MET*, responden a las terapias dirigidas

contra *MET*, originalmente desarrolladas para actuar contra mutaciones que afectan a la proteína (Paik et al. 2015, Frampton et al 2015). Este resultado sugiere que las alteraciones del *splicing* pueden ser consideradas como posibles dianas de terapia en cáncer. El transcriptoma no sólo permite la identificación de posibles estrategias terapéuticas nuevas. Recientemente se ha observado que las alteraciones en el *splicing* alternativo también son esenciales para entender la resistencia a fármacos. Este es el caso de la terapia dirigida contra el gen *BRAF*, que aparece mutado en varios tumores, y especialmente en melanoma. Aunque existe un tratamiento específico dirigido a tumores con mutaciones en *BRAF*, se ha observado que un número de pacientes con dichas mutaciones *BRAF* no responden a tratamiento. Un análisis del transcriptoma de dichos pacientes ha descubierto que en pacientes resistentes a la terapia, el ARN de *BRAF* carece de varios exones (Poulikakos et al. 2011). Aunque estos exones no se expresan en el ARN, su secuencia genómica está aún presente en las células del tumor, por lo que se trata de un caso de *splicing* alternativo, que además ha sido asociado a mutaciones en un intrón del gen *BRAF* (Salton et al. 2015). La determinación del transcriptoma en tumores se convierte por tanto en un recurso esencial para entender las propiedades del tumor y las posibles estrategias para tratarlo. Esto adquiere especial relevancia en tumores que carecen de dianas terapéuticas conocidas o mutaciones en *drivers* conocidos que permitan establecer una estrategia terapéutica concreta. Dichos tumores son denominados *pan-negativos*, y los pacientes en estos casos no pueden beneficiarse de las terapias disponibles. Las alteraciones en el *splicing* alternativo podrían jugar un papel fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la supervivencia de los pacientes pan-negativos.

Tras los mecanismos de *splicing* alternativo en cáncer

Las alteraciones en el *splicing* que confieren ventaja selectiva a las células tumorales pueden ser causadas por mutaciones en las secuencias reguladoras del *splicing* o por alteraciones en la actividad de los factores involucrados en dicha regulación. Los cambios en la expresión de los factores de *splicing* también pueden desencadenar procesos tumorales, y diversos factores se han definido como oncogénicos (Karni et al. 2007) o supresores (Wang et al. 2014) de tumor, dependiendo de su efecto. Tanto las mutaciones como los cambios de expresión pueden dar lugar a cambios de *splicing* en genes, los cuales a su vez pueden recapitular sustancialmente

fenotipos asociados con el cáncer. Por lo tanto, los cambios del *splicing* que caracterizan y contribuyen a la fisiopatología del cáncer vienen determinados por las alteraciones de una red compleja de proteínas de unión a ARN. Esta red de regulación está aún por determinar y muchos de los cambios de *splicing* con relevancia funcional en cáncer están por describir. La mayoría de las RBPs presentan cambios de expresión en algún tipo de tumor comparado con muestras normales y muchos de estos cambios están asociados a duplicaciones de las regiones genómicas del gen. En contraste, las RBPs están poco mutadas, y en general menos frecuentemente que las que ya se han observado anteriormente en otros tumores. Con el fin de estudiar el impacto de las alteraciones en estas RBPs en el transcriptoma, medimos los cambios de *splicing* potencialmente debidos a las mutaciones o los cambios de expresión de las RBPs. Este análisis mostró que tienen lugar muchos más cambios en el *splicing*, posiblemente debidos a los cambios de expresión para determinar el impacto funcional asociado al cambio de *splicing* de *NUMA1*, diseñamos oligonucleótidos antisentido (AONs) que se unen a la secuencia del exón variable del gen *NUMA1* y bloquean su reconocimiento por la maquinaria de *splicing*. Con estos AONs logramos por tanto inducir en células normales la forma de *splicing* observada en tumores. Células con este cambio inducido presentaron un incremento en la capacidad proliferativa, indicando que sólo el cambio de *splicing* puede cambiar las propiedades celulares.

Ya que la función del gen *NUMA1* está relacionada con la formación de estructuras celulares esenciales para la separación de los cromosomas durante la división celular, en colaboración con el grupo de Miguel Angel Pujana (ICO, Barcelona) llevamos a cabo un ensayo funcional para medir el impacto del cambio de *splicing* en *NUMA1* sobre dichas estructuras. Observamos un incremento de la inestabilidad genómica asociada a la duplicación de centriolos en células con el cambio de *splicing* tumoral de *NUMA1* en comparación con células de control en las que *NUMA1* no tiene ese cambio. Es importante remarcar que en este trabajo también mostramos que los efectos observados no estaban ligados a un cambio de expresión del gen *NUMA1*. Es decir, el impacto funcional es específico del cambio

de *splicing*, independientemente de la expresión total del gen. Tampoco observamos que ninguna de las muestras analizadas contenía mutación alguna que pudiera explicar los cambios de *splicing* en *NUMA1*. Por lo tanto, el cambio de *splicing* de *NUMA1* representa un nuevo caso de alteración del transcriptoma que contribuye a la transformación oncogénica y que sin embargo no son visibles a muchos de los análisis que se llevan a cabo actualmente con datos genómicos de cáncer. Nuestro análisis también describe un nuevo rol en cáncer para muchas RBPs, y en particular para MBNL1,

Desafíos actuales en el estudio del *splicing* alternativo en cáncer

las alteraciones del *splicing* detectadas en tumores no son de gran magnitud, y aquellas para las que se ha mostrado su relevancia, no tienen lugar en un gran número de pacientes, tal y como ocurre con las alteraciones genéticas. Una complejidad añadida consiste en la discrepancia que suelen mostrar las distintas herramientas computacionales dedicadas al estudio del *splicing* alternativo, principalmente para genes que presentan baja expresión, por lo que es difícil definir un consenso sobre cuáles son los cambios relevantes y reproducibles sólo a partir del análisis de los datos de secuenciación. Todo esto hace que la identificación de las variaciones del transcriptoma asociadas a enfermedad sean aún una cuestión por resolver. las tecnologías de secuenciación están mejorando a gran velocidad y permiten medir el transcriptoma cada vez a mayor profundidad, e incluso en una sola célula, por lo que la precisión en la caracterización del *splicing* irá mejorando con el tiempo. También existen nuevas tecnologías capaces de secuenciar moléculas de ARN completas. Aunque dichas técnicas son aún caras y están limitadas a moléculas abundantes y de menor tamaño, pueden servir para determinar el transcriptoma en diferentes células tumorales. Nuevas técnicas computacionales también permiten identificar de forma efectiva las asociaciones entre las variaciones del transcriptoma y las variaciones de la secuencia genómica en regiones no codificantes por proteína, lo cual permitirá descubrir nuevos mecanismos que contribuyan al cáncer, y en especial en tumores *pan-negativos*