

# 人類基因跳動式剪接機制

蔡國旺<sup>1</sup>、林文昌<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中央研究院生物醫學科學研究所，台北，台灣

## 摘要

接近一半的人類基因有選擇性剪接 (alternative splicing) 的現象。選擇性剪接是人類基因體增加複雜度的一項重要分子機制，而某些人類基因亦由不同的選擇性剪接產生特定的轉錄 (transcript) 產物及蛋白。這些人類基因選擇性剪接常有組織或發育期的轉錄控制。因此選擇性剪接在結構基因體及功能基因體有重要的地位。我們實驗室在研究單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 時，發現一類特殊的蛋白質氨基酸 (amino acid) 變異。我們就單一氨基酸分子增加或剔除的變異蛋白質加以深入分析後，發現它們的形成原因竟然不是直接的DNA序列數目增減，而是由於一種在信使RNA (messenger RNA; mRNA) 上罕見的小範圍內選擇性剪接所造成，我們命名為跳動式剪接 (wobble splicing)。我們發現在某些基因的內含子 (intron) 序列中，在接近剪接點位置 (splicing site) (外顯子 (exon) /內含子交界處) 若出現AGNAG或GTNGT的重複序列時，會造成選擇性地使用不同的AG剪接選擇點或GT剪接選擇點，因此造成三個核苷酸 (nucleotide) 序列的差異，進而導致一個氨基酸分子的改變。我們實驗室在深入研究人類基因體後，發現在部份的基因，AGNAG或GTNGT的序列可以由SNP的影響而造成不同的跳動式剪接mRNA分子。我們更藉由微基因 (miniGene) 的分子表現載體，分析不同內含子序列片段對跳動式剪接的調控。經由大規模的序列分析，我們證實，在剪接點位置附近的60個核苷酸內含子區段對跳動式剪接具有重要的影響，其中包含分支點 (branch point)、嘧啶軌跡 (pyrimidine track) 及AGNAG三大要素。因此，此區域若發生SNP，則會影響跳動式剪接機制，並造成蛋白質層面的微小變異。目前已有文獻報導，一些疾病的成因可能和影響跳動式剪接的SNP有某些程度的關聯，值得更深入探討。(生醫 2008;1(3):249-257)

關鍵字：選擇性剪接 (alternative splicing)、單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP)、跳動式剪接 (wobble splicing)、重複剪接點位置 (tandem splicing site)

## 剪接機制 (splicing mechanism)

內含子 (intron) 與外顯子 (exon) 交互穿插組成基因，其中內含子並不表現，外顯子則表現成信使RNA (messenger RNA; mRNA) 之後再

進一步轉譯 (translate) 成蛋白質。一開始基因從DNA轉錄 (transcript) 成mRNA的先導物—pre-mRNA時，會同時含有內含子及外顯子，必須經過剪接過程將內含子移除後，方能成為成熟的mRNA<sup>1,2</sup>。在高等真核生物 (eukaryote) 中，剪接

通訊作者：林文昌博士

電話：886-2-26523967

傳真：886-2-27827654

地址：115台北市研究院路二段128號中央研究院生物醫學科學研究所

電子郵件：wenlin@ibms.sinica.edu.tw

2008年7月9日來稿；2008年9月17日修改；2008年9月23日同意刊登

過程需要有順式元件 (*cis*-element) 及反式元件 (*trans*-element) 共同進行調控，在內含子5'端 (5' terminal) 的剪接點位置 (splicing site) 為GT，3'端為AG，在靠近3'端的內含子區域還包括了分支點序列 (branch point sequence) 以及多嘧啶軌跡 (polypyrimidine tract; PPT)。Cartegni等人分析了1683個真核生物基因的內含子與外顯子交界處核苷酸 (nucleotide) 序列發現，其順式元件有相當高的相似度，而這些區域在不同的基因中均具有高度的保留性 (conservation) (圖一)<sup>3,4</sup>。

剪接過程主要包括兩大步驟 (圖二)，兩個步驟均需要在RNA核苷酸間進行交酯化反應 (transesterification)。在步驟一分支點會先攻擊5'端剪接點位置GT，釋放出5'端的外顯子以及剪接過渡時期產物。在步驟二，被釋放的5'端外顯子會攻擊3'端的AG，與3'端的外顯子黏合，並釋放內含子套索 (lariat intron) 產物而完成整個剪接的過程<sup>5-7</sup>。這兩個步驟均在剪接體 (spliceosome) 中完成。剪接體是由五種小分子胞核核糖核蛋白 (small nuclear RNAs) —U1、U2、U4/U6與U5，以及超過150個蛋白質共同組合而成，而剪接點位置的辨認必須由順式元件及反式元件共同參與，U1主要是辨認5'端GT的位置，U2辨認分支點，緊接著吸引U4/U6以及U5與其他剪接體分子和pre-mRNA結合，最後由U5將兩個外顯子黏接起來完成剪接過程<sup>8</sup>。

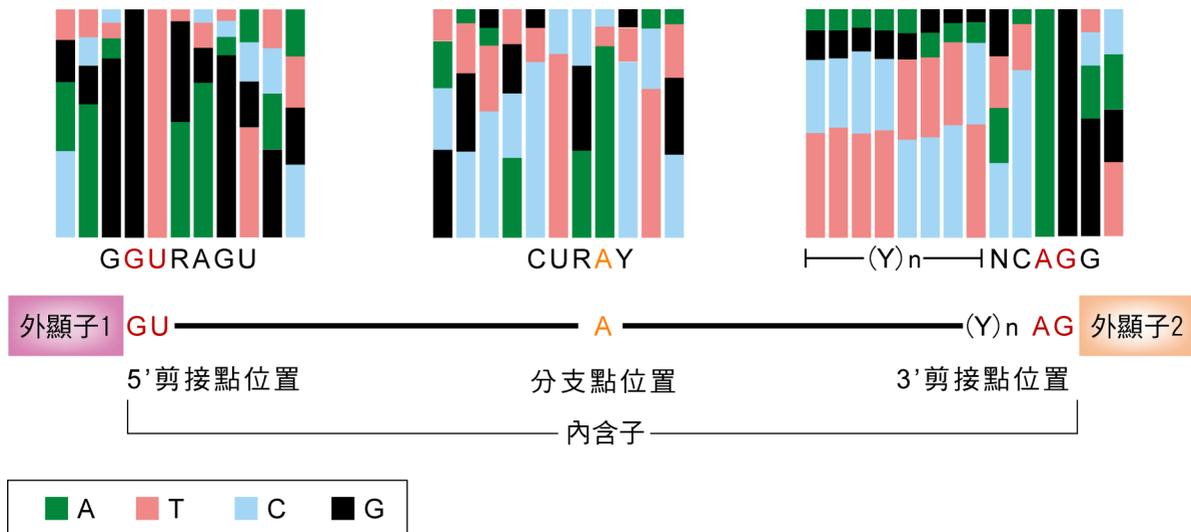
## 選擇性剪接 (alternative splicing)

高等生物的蛋白編碼區 (coding region) 通常有許多外顯子，可經由選擇性剪接結合不同的外顯子，使得一個基因產生多種異形體 (isoforms) 的mRNA，最後再轉譯出功能相異的蛋白分子。這種剪接機制大幅地增加了高等生物基因體的複雜度<sup>9</sup>。選擇性剪接可能有計劃的發生在不同的細

胞、組織或不同的發育時期，使特定的蛋白產物能適時適地的產生並發揮其功能。另外，當細胞接受到外在環境的刺激時，mRNA的剪接也可能受到影響，細胞藉由此種轉錄後之調控可決定本身的生理活性及功能、分化之程度，甚至生存及死亡。

目前已知許多遺傳疾病以及癌細胞的產生與轉移 (metastasis)，都與mRNA的剪接有密切的關係<sup>10-13</sup>。當基因的突變發生在剪接複合體辨認的位置時，極易導致錯誤的mRNA剪接，因而產生失去正常功能或是對細胞有害的蛋白分子。最近的研究顯示<sup>14,15</sup>，不論在內含子或在蛋白編碼區上，均密佈著控制剪接的微調開關，因此由基因的單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 所產生的變異，對剪接的效率和正確性會有或多或少的影響，使剪接完成後，不同異形體的mRNA在細胞或個體間有不同程度的質量差異，進而影響到不同個體在疾病的嚴重性、進程，甚至對藥物的感受性和副作用上都有不同的結果。

在真核細胞中，約有40-60%的基因會藉由選擇性剪接來製造出不同功能性的蛋白質<sup>9</sup>，而常見的選擇性剪接約可歸類為五種 (圖三)，分別是：(1) 外顯子跳躍/包含 (exon skipping/inclusion)；(2) 外顯子相互排擠 (mutually exclusive exons) 以及 (3) 內含子保留 (intron retention)；(4) 選擇性的5'端或 (5) 3'端剪接位置 (alternative 5/3 splice sites) 等幾種形式的選擇性剪接，而其中最常見的是選擇性的5'端或3'端剪接位置<sup>3</sup>。Zavolan等人<sup>16</sup>利用生物資訊 (bioinformatics) 的方式研究發現，在「選擇性的5'端或3'端剪接位置」這類的選擇性剪接中，有很多是涉及極少數核苷酸的差異<sup>17,18</sup>，而這些差異足以改變其蛋白質結構及功能。近期發表在期刊—「RNA」的一篇文章亦發現，很多選擇性的5'端或3'端剪接位置都發生在很靠近原本剪接位置的區域，因此5'端及3'端非常容易發生微小片段差異的選擇性剪接。



圖一、內含子 (intron) 與外顯子 (exon) 交界處附近具有高度保留 (conserved) 的核苷酸 (nucleotide) 序列。

Cartegni等人分析1683個真核生物 (eukaryote) 基因的內含子與外顯子交界處核苷酸序列發現，其順式元件 (cis-element) 有相當高的相似度，在5'端剪接點位置 (5' terminal splicing site) 為GT，3'端為AG，分支點 (branch point) 為A，而分支點與3'端的AG之間則是多嘧啶軌跡 (polypyrimidine tract; PPT)。每個位置上不同顏色的長條形區域代表不同的核苷酸，區塊越長表示保留度越高或是發生機率越大<sup>3,4</sup>。(彩圖詳見本刊網頁)

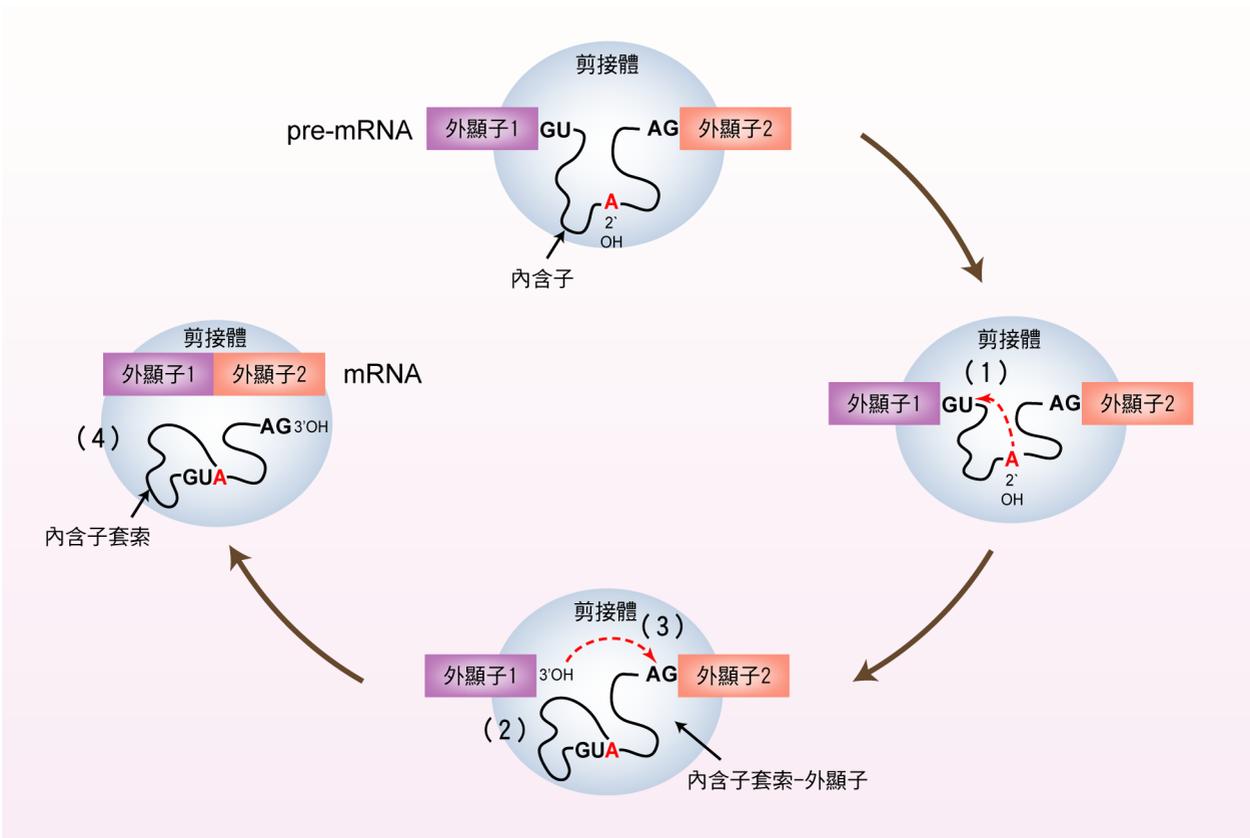
## 跳動式剪接 (wobble splicing)

過去幾年很多的實驗室利用生物資訊的方式來研究選擇性剪接<sup>18-21</sup>，而本實驗室在研究SNP時意外發現一類特殊的蛋白質氨基酸 (amino acid) 變異。經過深入研究分析後發現，此種變異是發生在RNA上罕見的小範圍選擇性剪接所造成，我們將此類的選擇性剪接命名為跳動式剪接<sup>22-24</sup>，並且在5'或3'端都能觀察到此一現象。進一步分析發現，當基因的5'端以及3'端的剪接點位置若出現AGNAG或GTNGT時，就有機會造成剪接過程出現使用不同AG剪接點或是GT剪接點 (圖四)，而其中又以3'端的跳動式剪接最為常見，且廣泛的存在於許多的基因當中，如此一來會造成pre-mRNA出現兩種不同的異形體，而此兩種異形體間只有三個核苷酸的差異，而這種僅差三個核苷酸的pre-mRNA可以逃過RNA的衰敗過程 (nonsense-mediated decay)<sup>25,26</sup>，又稱為NMD機制，並且轉譯為蛋白質，而產生的蛋白質依其情

況不同可能造成一或兩個氨基酸的變異。更有極少數的基因經由跳動式剪接後所產生的異形體，會有終止密碼子 (stop codon) 提早出現的情況，此類終止密碼子提早出現的異形體會被NMD機制移除。而一般跳動式剪接最常影響到的氨基酸為穀氨酸 (glutamate)、穀氨醯胺 (glutamine)、賴氨酸 (lysine)、丙氨酸 (alanine)、甘氨酸 (glycine)、纈氨酸 (valine)、精氨酸 (arginine)、半胱氨酸 (cysteine)、蘇氨酸 (threonine) 以及絲氨酸 (serine)<sup>27,28</sup>。

## 跳動式剪接增加蛋白質多樣性

近幾年德國的研究團隊對於基因的跳動式剪接有許多研究報導<sup>27-29</sup>，跳動式剪接廣泛的存在於各種生物體中，甚至最近有研究發現植物中也存在此一機制，而跳動式剪接雖然在5'端和3'端均會發生，但是統計研究發現以3'端的跳動式剪接最為常見。Hiller等人<sup>28</sup>研究發現，約有30%左右的



圖二、真核生物體的剪接機制 (splicing mechanism)。

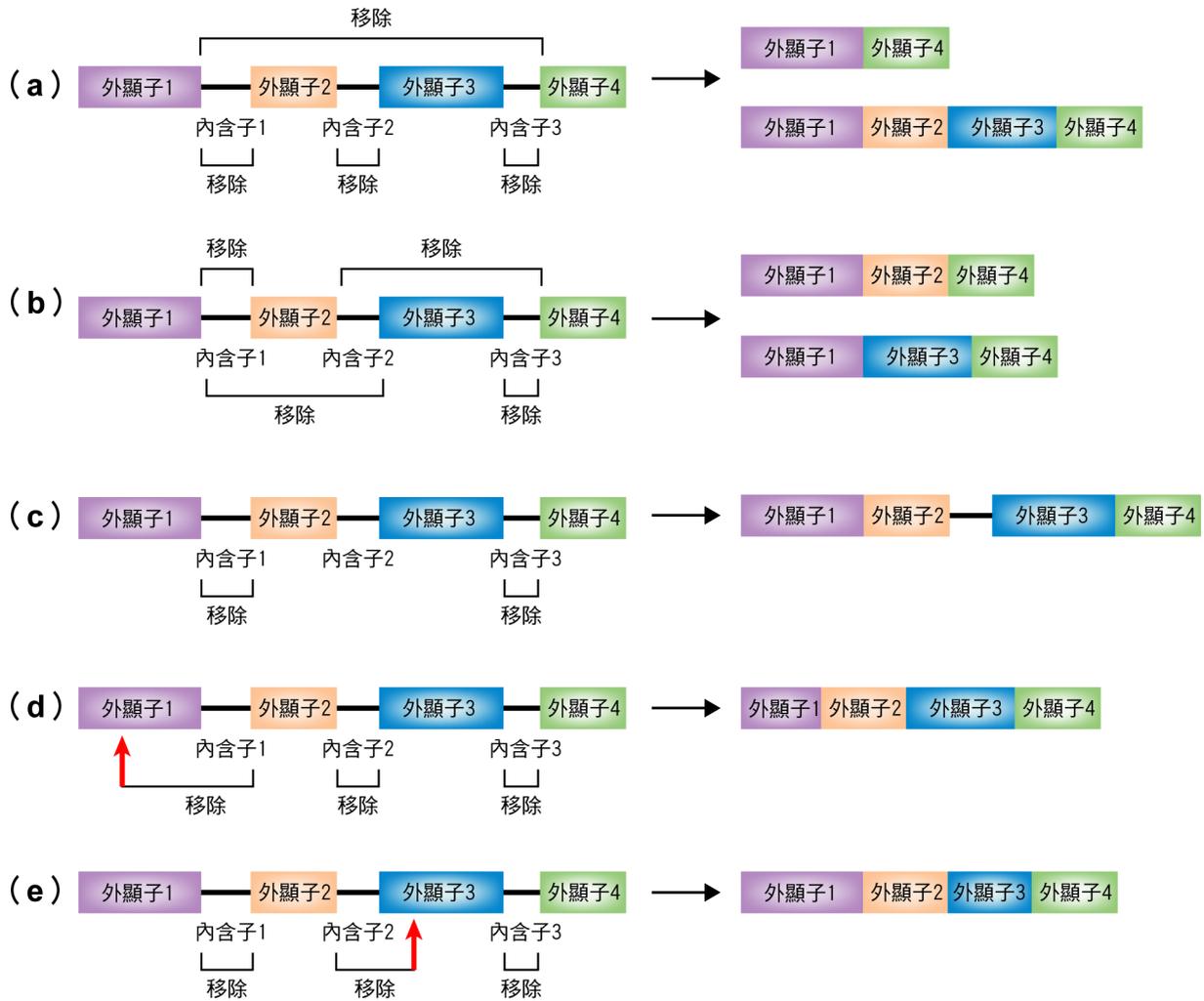
DNA轉錄 (transcript) 成信使RNA (messenger RNA; mRNA) 的先導物—pre-mRNA後，必須在剪接體 (spliceosome) 中完成剪接過程，將內含子移除，方能成為成熟的mRNA。剪接過程包含兩大步驟：在步驟一中，分支點會先攻擊5'端剪接點位置GT (1)，釋放5'端的外顯子及剪接過渡時期產物 (2)；步驟二再由5'端外顯子攻擊3'端的AG，與3'端的外顯子黏合 (3)，並釋放內含子套索 (lariat intron) 產物而完成整個剪接的過程 (4)。(彩圖詳見本刊網頁)

基因在其3'端的剪接點位置上存在重複剪接點位置 (tandem splice site)，而有5.7%的重複剪接位置處於活化狀態。雖然跳動式剪接廣泛的存在於許多基因中<sup>28</sup>，但是因為僅改變1-2個氨基酸，所以相較於傳統的選擇性剪接而言，目前為止我們認為跳動式剪接屬於隨機式的選擇，並不受到其他因子調控。研究發現，絕大部分的跳動式剪接似乎都沒有組織特異性，因此一般認為跳動式剪接最大的存在意義在於增加蛋白質的多樣性，藉由跳動式剪接可以達到微調蛋白質功能。目前為止有許多研究指出，跳動式剪接在某些蛋白質會造成其功能上的改變，如PAX3及PAX7會發生3'端的跳動式剪接，而所產生的跳動式剪接異形

體 (wobble splicing isoforms) 會降低其與啟動子 (promoter) 的結合能力，更有其他文獻指出，有些跳動式剪接會增加疾病的發生率，如斯特格病 (Stargardt's disease)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (dentatorubral pallidoluysian atrophy; DRPLA)、類肉瘤病 (sarcoidosis) 等<sup>30-36</sup>。

## 重複剪接點位置附近的DNA序列決定跳動式剪接的發生

跳動式剪接機制是最近幾年才被發現的一種特殊的剪接現象，但是到目前為止對於其調控機



### 圖三、選擇性剪接 (alternative splicing) 的種類。

基因表現過程可藉由選擇性剪接機制產生更多樣性的蛋白質產物，而常見的選擇性剪接有以下幾種<sup>33</sup>：(a) 外顯子跳躍/包含 (exon skipping/inclusion)；(b) 外顯子相互排擠 (mutually exclusive exons)；(c) 內含子保留 (intron retention)；以及選擇性的 (d) 5'端或 (e) 3'端的剪接位置 (alternative 5/3 splice sites) 幾種。(彩圖詳見本刊網頁)

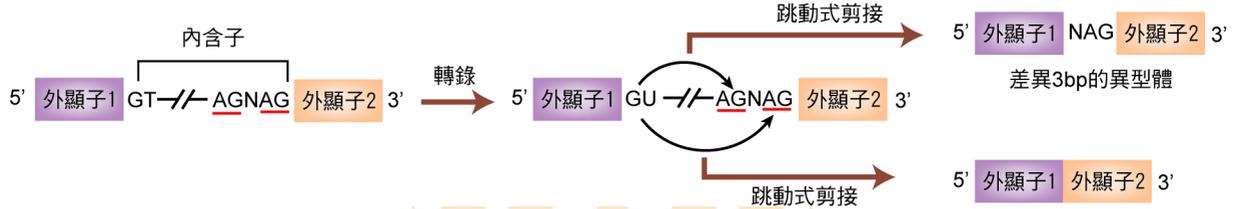
制並不瞭解，僅知道要發生此類的跳動式剪接必須要有重複剪接點位置的存在，而其中又以 CAGCAG 最為常見。利用生物資訊的方式分析此重複剪接點位置發現，第一個位置剪接點種類出現機率分別為 CAG>TAG>AAG>GAG，而第二個位置剪接點種類出現機率為 CAG>AAG>TAG>GAG，其中 GAG 是一個很弱的剪接點位置，因此無論是第一個或是第二個剪接點為 GAG 時，此種重複剪

接點位置均較傾向不活化狀態。此外，同樣的重複剪接點位置型態在不同的基因中，其剪接點的選擇亦會隨之改變。因此重複剪接點位置雖是產生跳動式剪接的必要條件，但是其最終的選擇還是會受到其他因子所影響<sup>24</sup>。根據我們之前的研究指出，大部分的 3'端跳動式剪接均沒有組織特異性<sup>23</sup>，但是許多基因的跳動式剪接在不同物種之間卻有明顯的表現差異。利用生物資訊的方式

(a) 重複GTNgt捐贈者



(b) 重複agNAG接受者



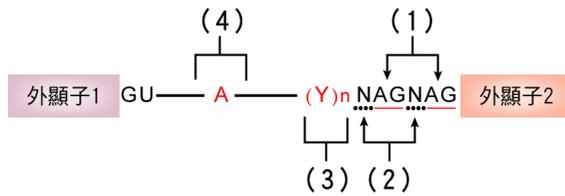
圖四、5'端及3'端之跳動式剪接 (wobble splicing) 機制。

若基因內含子的5'端或是3'端存在GTNGT/AGNAG的重複剪接點，在其執行剪接機制時，會隨機使用第一或是第二個剪接點，因此產生三個核苷酸差異的跳動剪接異形體 (isoform)，而在蛋白質層次產生一個氨基酸 (amino acid) 的微小差異。(彩圖詳見本刊網頁)

分析這些在物種之間表現差異較大的3'端跳動式剪接發現，若是它們之中在人與鼠間差異較明顯的，其分支點到重複剪接點位置間的序列差異也較大；若是跳動剪接異形體在人與鼠很接近的，其分支點到重複剪接點位置的序列有很高的相似度。以上的結果顯示，3'端的跳動式剪接機制極有可能是剪接過程中，因為同時存在兩個很強的剪接點位置，而且位置又相當接近，因此導致剪接過程不精確所造成的現象。真核生物的剪接過程原本就會產生很多錯誤的剪接現象，但是這些錯誤的剪接隨後會被RNA衰敗機制所降解，因此雖然有很多的剪接錯誤，但並不會造成生物體的損害，而3'端重複剪接點位置所產生的跳動式剪接，因為恰好涉及三個核苷酸，因此最終在蛋白質的層面上，僅會影響到一或兩個氨基酸的變異，且不會啟動RNA衰敗機制，因此藉由3'端的跳動式剪接機制，很多基因可以產生微小差異的兩種蛋白質產物，而達到微調蛋白質功能的效果。

SNP影響跳動式剪接機制

在人體中，SNP的發生率大約是0.1%，也就是每1,200-15,000個鹼基對 (base pair) 中，就可能有一個SNP。目前科學界已發現約400萬個SNPs。平均而言，每1 kb長的DNA中，就有一個SNP存在。當SNP落在編碼區時會直接改變蛋白質序列；當SNP落在剪接點位置或調控區域上時，則會改變剪接方式而影響最後的蛋白質產物。因此一旦SNP落在擁有跳動式剪接基因的重複剪接點位置，或是分支點到重複剪接點位置的序列中，則極有可能會改變跳動式剪接機制。雖然此種影響僅僅是一、二個氨基酸的改變，卻可能涉及疾病的發生，例如斯特格病就是因為2588G→C的SNP恰好落在TAGGAG的重複剪接點位置上，使得不活化的TAGGAG變成活化的TAGCAG，而造成蛋白質由原本的-Pro-Gly-Asp-改變成-Pro-Ala-Asp-，以及一個跳動式剪接異形體-Pro-Asp-兩種



**圖五、單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 改變跳動式剪接機制。**

SNP對跳動式剪接的影響依其發生的位置不同可分為四種：(1) 發生在重複剪接點位置 (tandem splicing site) 的AG上；(2) 發生在重複剪接點位置的一號以及四號位置的核苷酸 (N)；(3) 發生在多嘔啶軌跡；以及 (4) 發生在分支點序列 (BPS)。(彩圖詳見本刊網頁)

蛋白質型態，而此一SNP所造成跳動式剪接改變與斯特格病有高度的相關性<sup>33</sup>。因此我們從SNP的資料庫中找尋可能改變跳動式剪接的SNP。根據之前的研究指出，影響跳動式剪接機制因子有：(1) 必須存在重複剪接點位置；(2) 重複剪接點前一個核苷酸 (NAGNAG)；(3) 分支點到重複剪接點位置的序列 (PPT)；(4) 分支點序列 (圖五)。因此根據這四個重要區域去搜尋SNP的資料庫，一共找到127個基因，其跳動式剪接的控制區域中有160個SNP的記載，而這些SNP極有可能會改變跳動式剪接。同時我們藉由實驗的方式證實，當SNP落在重複剪接點位置上時，會直接破壞剪接機制，但是若是落在分支點序列或是分支點到重複剪接點位置的序列時，則會改變跳動式剪接的型態。由於SNP造成跳動式剪接機制的改變所影響的RNA或蛋白質層面都非常細微，因此常被研究者所忽略，但是這種細微的改變卻與蛋白質功能多樣性或疾病有密切的關係，故研究者應該更重視此現象的重要性，以解開更多跳動式剪接機制在生物體中所扮演的角色。

## 結論

目前已知許多遺傳疾病及癌細胞的產生與轉

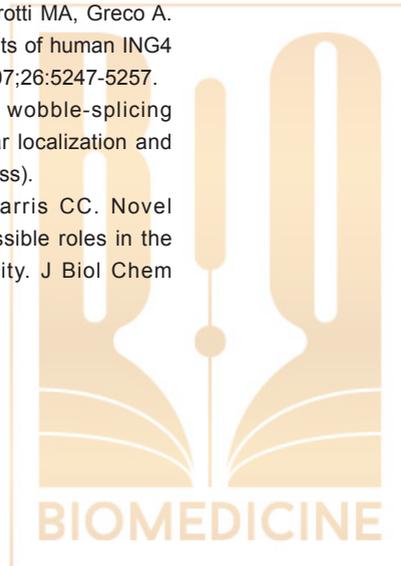
移都與mRNA的剪接有密切的關係，當基因的突變發生在剪接複合體辨認的位置時，極易導致錯誤的mRNA剪接，因而產生失去正常功能或是對細胞有害的蛋白分子。最近的研究顯示<sup>37-39</sup>，大部分的跳動式剪接可以針對蛋白質功能進行微調，但也有例子指出有些基因經過跳動剪接後會明顯改變其功能性，以ING4抑癌基因 (tumor suppressor gene) 為例，ING4主要功能是抑制癌細胞生長以及轉移，最近研究發現在其第四到五的外顯子交界處擁有五端〔GC(N)7GT〕以及三端 (TAGAAG) 的重複剪接點位置，經由跳動剪接後可產生四種跳動式剪接異形體 (ING4\_V1、V2、V3以及V4)，而其中ING4\_V4這個蛋白質產物被發現完全喪失其抑制癌細胞生長以及轉移的能力。因此SNP發生在此位置時，可能啟動或破壞跳動式剪接機制，使得剪接完成後，不同異形體的mRNA在細胞或個體間有不同程度的質量差異，進而影響到不同的個體在疾病上的嚴重性。故深入瞭解mRNA跳動式剪接、調控是目前相當重要的研究課題，特別是在生物基因的解碼陸續完成後，我們對基因功能的瞭解逐漸邁入一個數位資訊的時代，這種衝擊不僅提供我們新的視野去探討mRNA的剪接，同時也為二十一世紀的生物醫學研究帶來更多元的面貌。

## 引用文獻

1. Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: a wash in a sea of proteins. *Mol Cell* 2003;12:5-14.
2. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 2002;12:1231-1245.
3. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3:285-298.
4. Brow DA. Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 2002;36:333-360.
5. Fox-Walsh KL, Dou Y, Lam BJ, Hung SP, Baldi PF, Hertel KJ. The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16176-16181.
6. Reed R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:340-345.

7. Rio DC. Splicing of pre-mRNA: mechanism, regulation and role in development. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:574-584.
8. Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2003;2:830-840.
9. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003;72:291-336.
10. Kole R, Vacek M, Williams T. Modification of alternative splicing by antisense therapeutics. *Oligonucleotides* 2004;14:65-74.
11. Li H, Wang J, Mor G, Sklar J. A neoplastic gene fusion mimics trans-splicing of RNAs in normal human cells. *Science* 2008;321:1357-1361.
12. Mercatante DR, Kole R. Control of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy: effects on gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:126-132.
13. Pettigrew CA, Brown MA. Pre-mRNA splicing aberrations and cancer. *Front Biosci* 2008;13:1090-1105.
14. Carlini DB, Genut JE. Synonymous SNPs provide evidence for selective constraint on human exonic splicing enhancers. *J Mol Evol* 2006;62:89-98.
15. ElSharawy A, Manaster C, Teuber M, Rosenstiel P, Kwiatkowski R, Huse K, Platzer M, Becker A, Nurnberg P, Schreiber S, Hampe J. SNPSplicer: systematic analysis of SNP-dependent splicing in genotyped cDNAs. *Hum Mutat* 2006;27:1129-1134.
16. Zavolan M, Kondo S, Schonbach C, Adachi J, Hume DA, Hayashizaki Y, Gaasterland T. Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. *Genome Res* 2003;13:1290-1300.
17. Stetefeld J, Ruegg MA. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* 2005;30:515-521.
18. Wen F, Li F, Xia H, Lu X, Zhang X, Li Y. The impact of very short alternative splicing on protein structures and functions in the human genome. *Trends Genet* 2004;20:232-236.
19. Black DL. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 2000;103:367-370.
20. Brett D, Hanke J, Lehmann G, Haase S, Delbruck S, Krueger S, Reich J, Bork P. EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms. *FEBS Lett* 2000;474:83-86.
21. Lee C, Wang Q. Bioinformatics analysis of alternative splicing. *Brief Bioinform* 2005;6:23-33.
22. Lai CH, Hu LY, Lin WC. Single amino-acid InDel variants generated by alternative tandem splice-donor and -acceptor selection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:197-205.
23. Tsai KW, Lin WC. Quantitative analysis of wobble splicing indicates that it is not tissue specific. *Genomics* 2006;88:855-864.
24. Tsai KW, Tarn WY, Lin WC. Wobble splicing reveals the role of the branch point sequence-to-NAGNAG region in 3' tandem splice site selection. *Mol Cell Biol* 2007;27:5835-5848.
25. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:89-99.
26. Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:273-282.
27. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Jahn N, Hampe J, Schreiber S, Backofen R, Platzer M. Single-Nucleotide Polymorphisms in NAGNAG Acceptors Are Highly Predictive for Variations of Alternative Splicing. *Am J Hum Genet* 2006;78:291-302.
28. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Jahn N, Hampe J, Schreiber S, Backofen R, Platzer M. Widespread occurrence of alternative splicing at NAGNAG acceptors contributes to proteome plasticity. *Nat Genet* 2004;36:1255-1257.
29. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Rosenstiel P, Schreiber S, Backofen R, Platzer M. Phylogenetically widespread alternative splicing at unusual GYNGYN donors. *Genome Biol* 2006;7:R65.
30. Condorelli G, Bueno R, Smith RJ. Two alternatively spliced forms of the human insulin-like growth factor I receptor have distinct biological activities and internalization kinetics. *J Biol Chem* 1994;269:8510-8516.
31. Vogan KJ, Underhill DA, Gros P. An alternative splicing event in the Pax-3 paired domain identifies the linker region as a key determinant of paired domain DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 1996;16:6677-6686.
32. Kay PH, Ziman MR. Alternate Pax7 paired box transcripts which include a trinucleotide or a hexanucleotide are generated by use of alternate 3' intronic splice sites which are not utilized in the ancestral homologue. *Gene* 1999;230:55-60.
33. Maugeri A, van Driel MA, van de Pol DJ, Klevering BJ, van Haren FJ, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Dahl N, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP. The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 1999;64:1024-1035.
34. Tadokoro K, Yamazaki-Inoue M, Tachibana M, Fujishiro M, Nagao K, Toyoda M, Ozaki M, Ono M, Miki N, Miyashita T, Yamada M. Frequent occurrence of protein isoforms with or without a single amino acid residue by subtle alternative splicing: the case of Gln in DRPLA

- affects subcellular localization of the products. *J Hum Genet* 2005;50:382-394.
35. Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell RM, Isselbacher KJ, Haber DA. Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11960-11964.
36. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Muller-Quernheim J, Schurmann M, Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 2005;37:357-364.
37. Raho G, Miranda C, Tamborini E, Pierotti MA, Greco A. Detection of novel mRNA splice variants of human ING4 tumor suppressor gene. *Oncogene* 2007;26:5247-5257.
38. Tsai KW, Tseng HC, Lin WC. Two wobble-splicing events affect ING4 protein subnuclear localization and degradation. *Exp Cell Res* 2008 (in press).
39. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC. Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 2006;281:34677-34686.



# 生物醫學

BIOMEDICINE JOURNAL

## 人類基因跳動式剪接機制

莊樹諄（中央研究院基因體研究中心副研究員）

選擇性剪接（alternative splicing，也有人譯為多樣性切割），對增加一個基因在蛋白質體的功能複雜度上，扮演著非常重要的角色。先前已有許多研究顯示，超過一半以上的人類基因，都有選擇性剪接的現象<sup>1-5</sup>。而這個現象，也普遍存在於其他的哺乳類動物。選擇性剪接對疾病、個體間或物種間的差異，往往極具關鍵，事實上還有許多基因的選擇性剪接是未知的，因此選擇性剪接一直都是極受重視的一個研究議題。

「人類基因跳動式剪接機制」一文，對選擇性剪接作了相當詳盡且深入的介紹，特別是近兩三年來被研究很多的跳動式剪接（wobble splicing）：包括單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism; SNP）與重複剪接點位置（tandem splicing site）附近的DNA序列對跳動式剪接影響。這篇文章不僅可以讓初學者很容易對選擇性剪接入門，更可以讓許多正在鑽研選擇性剪接這個議題的人得到許多啟發，令讀者獲益良多。今筆者就選擇性剪接在演化上的相關研究做一點介紹，也許可以提供有興趣的讀者一些延伸性資料。

在過去的研究中，對於會發生選擇性剪接的外顯子（alternatively spliced exon; ASE）以及未發生選擇性剪接的外顯子（constitutively spliced exon; CSE）兩種外顯子，誰的演化速率比較快的這個議題，各有許多學者提出不同的結論。支持ASE演化速率比較快的學者認為，選擇性剪接這樣的機制可以在不增加基因數目的前提下，增加基因功能的複雜度，因此ASE在演化過程中應該會受到相對較輕的演化壓力，以容許產生新的功能，所以ASE應該演化較快<sup>4,6-15</sup>。另一派的學者則持相反意見，他們認為應該是ASE的演化速率比較慢，

因為由人和老鼠相互保留（conserved）的序列來看，發現人和老鼠間保留的ASEs的序列相似度高於人和老鼠間保留的CSEs，推斷ASE有時會表現產生功能，有時又不會，所以應該受到強大的演化壓力<sup>16-21</sup>。這兩種相反的推測各自有許多證據被提出。為了釐清這個問題，我們實驗室檢視超過5,000對人和小鼠（mouse）序列保留的外顯子，計算它們的同義（synonymous）（ $K_S$ ）和非同義（nonsynonymous）（ $K_A$ ）替換比率值。其中 $K_S$ 是指兩物種間核苷酸（nucleotide）的改變「不會」造成氨基酸（amino acid）改變的比率，而 $K_A$ 值則是指兩物種間核苷酸的改變「會」造成氨基酸改變的比率。我們的結果顯示，ASEs的 $K_A$ 值與 $K_A/K_S$ 比值都比CSEs的來得高，這表示ASEs在氨基酸的層次上（或者說在蛋白質的層次上）的演化速率比CSEs快。另一方面，我們也發現ASEs的 $K_S$ 值比CSEs的低，參照在人與小鼠序列保留的內含子（intron）上的替換比率值（ $K_I$ ），我們發現ASEs的 $K_S$ 值比較接近 $K_I$ ，所以其演化速率比較接近中性的（neutral），而 $K_S$ 值在CSEs則是被加速的。我們也發現， $K_S$ 值在CSEs被加速的原因跟序列中GC出現比率的高低及蛋白質區域是否為低複雜度無關。整體上，ASEs比CSEs具有較高的 $K_A$ 值與較低的 $K_S$ 值的這個趨勢，也同樣出現在人和大鼠（rat）以及大鼠和小鼠之間的比較。因此，我們觀察到的現象，即使在具不同的分子生物時鐘距離的哺乳類上，也同樣具有普遍性。以上的研究結果解釋了ASE和CSE的演化速率快慢的問題，也部分解釋為何先前的研究會對這個問題產生不同推論的原因<sup>22</sup>。另外我們也發現一些因素，如外顯子的長度、外顯子中包含一些調控序列的比率、ASE在基因所有選擇性剪接型式中出現的比率等等相互加乘的結果，往往影響ASE的演化速率甚劇<sup>23</sup>。此外，具不同型態選擇性剪接的外顯子，其

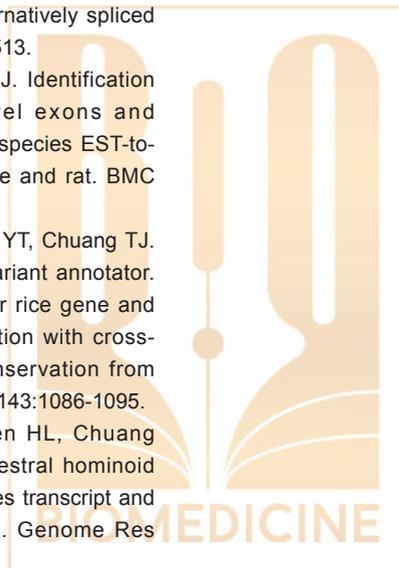
演化速率往往也很不同，甚至有相反的趨勢<sup>24,25</sup>。

近年來許多哺乳類動物的基因體序列相繼被定序發表，研究發現哺乳類之間的基因個數都很接近，而且同源基因（orthologous genes）間也往往有相當高的相似度。因此，研究造成物種間在型態、行為、功能與對疾病的敏感度等等的差異，便不能侷限於基因個數上的探討。在許多可能的研究議題中，選擇性剪接是造成種間差異或者物種專一性（lineage-specific）的一個重要因素<sup>26-30</sup>，所以研究人之所以為人，選擇性剪接是一個不錯的切入點。誠如「人類基因跳動式剪接機制」文中所言，以不同角度去探討在信使RNA（messenger RNA; mRNA）剪接，將可以為未來生物醫學研究提供更多元的線索，以及更多元的面向。

## 引用文獻

1. Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS. Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res* 1999;9:1288-1293.
2. Kan Z, Rouchka EC, Gish WR, States DJ. Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res* 2001;11:889-900.
3. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2850-2859.
4. Kan Z, States D, Gish W. Selecting for functional alternative splices in ESTs. *Genome Res* 2002;12:1837-1845.
5. Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, Tammana H, Gingeras TR. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res* 2004;14:331-342.
6. Boue S, Letunic I, Bork P. Alternative splicing and evolution. *Bioessays* 2003;25:1031-1034.
7. Xing Y, Lee CJ. Negative selection pressure against premature protein truncation is reduced by alternative splicing and ploidy. *Trends Genet* 2004;20:472-475.
8. Modrek B, Lee CJ. Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet* 2003;34:177-180.
9. Nurtdinov RN, Artamonova, II, Mironov AA, Gelfand MS. Low conservation of alternative splicing patterns in the human and mouse genomes. *Hum Mol Genet* 2003;12:1313-1320.
10. Kriventseva EV, Koch I, Apweiler R, Vingron M, Bork P, Gelfand MS, Sunyaev S. Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends Genet* 2003;19:124-128.
11. Iida K, Akashi H. A test of translational selection at 'silent' sites in the human genome: base composition comparisons in alternatively spliced genes. *Gene* 2000;261:93-105.
12. Hurst LD, Pal C. Evidence for purifying selection acting on silent sites in BRCA1. *Trends Genet* 2001;17:62-65.
13. Filip LC, Mundy NI. Rapid evolution by positive Darwinian selection in the extracellular domain of the abundant lymphocyte protein CD45 in primates. *Mol Biol Evol* 2004;21:1504-1511.
14. Xing Y, Lee C. Assessing the application of Ka/Ks ratio test to alternatively spliced exons. *Bioinformatics* 2005;21:3701-3703.
15. Xing Y, Lee C. Evidence of functional selection pressure for alternative splicing events that accelerate evolution of protein subsequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13526-13531.
16. Sorek R, Ast G. Intronic sequences flanking alternatively spliced exons are conserved between human and mouse. *Genome Res* 2003;13:1631-1637.
17. Sorek R, Shemesh R, Cohen Y, Basechess O, Ast G, Shamir R. A non-EST-based method for exon-skipping prediction. *Genome Res* 2004;14:1617-1623.
18. Sugnet CW, Kent WJ, Ares M, Jr, Haussler D. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput* 2004:66-77.
19. Resch A, Xing Y, Alekseyenko A, Modrek B, Lee C. Evidence for a subpopulation of conserved alternative splicing events under selection pressure for protein reading frame preservation. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1261-1269.
20. Yeo GW, Van Nostrand E, Holste D, Poggio T, Burge CB. Identification and analysis of alternative splicing events conserved in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2850-2855.
21. Philipps DL, Park JW, Graveley BR. A computational and experimental approach toward a priori identification of alternatively spliced exons. *RNA* 2004;10:1838-1844.
22. Chen FC, Wang SS, Chen CJ, Li WH, Chuang TJ. Alternatively and constitutively spliced exons are subject to different evolutionary forces. *Mol Biol Evol* 2006;23:675-682.
23. Chen FC, Chuang TJ. The effects of multiple features of alternatively spliced exons on the Ka/Ks ratio test. *BMC Bioinformatics* 2006;7:259.

24. Chen FC, Chaw SM, Tzeng YH, Wang SS, Chuang TJ. Opposite evolutionary effects between different alternative splicing patterns. *Mol Biol Evol* 2007;24:1443-1446.
25. Chen FC, Chuang TJ. Different alternative splicing patterns are subject to opposite selection pressure for protein reading frame preservation. *BMC Evolutionary Biology* 2007;7:179.
26. Chuang TJ, Chen FC, Chou MY. A comparative method for identification of gene structures and alternatively spliced variants. *Bioinformatics* 2004;20:3064-3079.
27. Chen FC, Chuang TJ. ESTviewer: a web interface for visualizing mouse, rat, cattle, pig and chicken conserved ESTs in human genes and human alternatively spliced variants. *Bioinformatics* 2005;21:2510-2513.
28. Chen FC, Chen CJ, Ho JY, Chuang TJ. Identification and evolutionary analysis of novel exons and alternative splicing events using cross-species EST-to-genome comparisons in human, mouse and rat. *BMC Bioinformatics* 2006;7:136.
29. Chen FC, Wang SS, Chaw SM, Huang YT, Chuang TJ. Plant gene and alternatively spliced variant annotator. A plant genome annotation pipeline for rice gene and alternatively spliced variant identification with cross-species expressed sequence tag conservation from seven plant species. *Plant Physiol* 2007;143:1086-1095.
30. Huang YT, Chen FC, Chen CJ, Chen HL, Chuang TJ. Identification and analysis of ancestral hominoid transcriptome inferred from cross-species transcript and processed pseudogene comparisons. *Genome Res* 2008;18:1163-1170.



# 生物醫學

BIOMEDICINE JOURNAL

# 人類基因跳動式剪接機制

吳瑞裕（臺北醫學大學醫學系生化學科助理教授）

選擇性剪接（alternative splicing）是指，信使核糖核酸前體（precursor messenger RNA; precursor mRNA）經由不同的剪接方式，亦即選擇不同的剪接點位置（splicing site）組合，產生不同的mRNA異構體（isoform）的過程。它是一種真核生物（eukaryote）在轉錄（transcript）後調控基因表達的重要機制，也是生物體得以從有限的基因表現出大量複雜的蛋白質，進而產生多樣性（diversity）的重要機制。因此，選擇性剪接型式的鑑定，對不同的mRNA異構體的研究具有重要作用。

藉由選擇性剪接產生特定的轉錄產物及蛋白質，目前已發現數種形式存在。在本文中，作者歸納過去幾年之研究成果，提出另一種形式的選擇性剪接—跳動式剪接（wobble splicing）<sup>1-3</sup>。在某些基因的表現中，在接近剪接點位置的內含子（intron）序列中若出現兩種特定的五核苷酸（pentanucleotides, AGNAG及GTNGT）重複序列時，會造成選擇性地使用不同的剪接選擇位點，形成三個核苷酸（nucleotide）序列的差異而使得蛋白質中一個氨基酸（amino acid）改變。除了這些重要的發現，作者也詳盡地綜述了參與跳動式剪接發生的重要因素及其可能的形成機制。藉此，我們可以對於一些疾病的形成原因有更進一步的了解。

近來藉由全基因體（genome-wide）實驗的分析<sup>4-7</sup>顯示，約40-60%的人類基因中具有選擇性剪接的形式存在，而其中之80%會造成正常編碼（coding）的蛋白質產生變異，顯示此過程在具高度功能複雜性的人類基因體中扮演極重要的角色。因此，過去幾年針對選擇性剪接進行的研究急速增加，分子生物學家亟欲了解其作用方式：

（1）其生物目的為何？（2）是否具有特定的機轉模式？（3）是受到哪些因子來調控？（4）與許多臨床疾病（例如癌症）是否相關？

由於選擇性剪接發生於單股之mRNA單體，其影響的層面相當廣泛，包括：序列、位置、可能形成的二級或三級結構<sup>8-11</sup>、選擇不同的剪接位點、選擇不同的剪接末端、外顯子（exon）的不同組合及內含子（intron）的剪接與否等。選擇性剪接過程受到許多順式元件（*cis*-element）和反式元件（*trans*-element）的調控<sup>9,12,13</sup>，並與基本剪接過程緊密聯繫。剪接體（spliceosome）中的一些剪接因子也參與了對選擇性剪接的調控。選擇性剪接也是一個伴隨轉錄發生的過程，不同的啟動子（promoter）可調控產生不同的剪接產物<sup>4,14</sup>。此外，研究也發現RNA編輯（editing）<sup>15,16</sup>和反式剪接（*trans*-splicing）也可參與選擇性剪接過程。

已有許多研究顯示，許多疾病相關基因，例如致癌基因（oncogene）、抑瘤基因（tumor suppressor gene）、轉移抑制基因（metastasis suppressor gene）等可發生選擇性剪接<sup>17-20</sup>，因此選擇性剪接與腫瘤發生及發展的關係相當密切。上述基因的蛋白異構體參與基因轉錄、細胞週期（cell cycle）和凋亡（apoptosis）等生命過程，對腫瘤生長有一定作用。所以將選擇性剪接蛋白異構體（spliceosome）作為標靶或干預選擇性剪接過程<sup>21</sup>，可望有機會進行腫瘤的分子治療（molecular therapy）<sup>22,23</sup>。此外，選擇性剪接在個體發育、細胞分化和癌症形成等過程中扮演非常重要的角色。近年來，越來越多的研究發現選擇性剪接與癌症有著密切的關係，而且由於癌症特異性的剪接變體（splicing isoform）極具診斷價值，使得癌症與選擇性剪接之關係成為相當熱門

的研究課題。

mRNA前體的選擇性剪接是控制基因表達和產生蛋白質多樣性的一種方式，因此未來仍是功能基因體（functional genomics）時代的研究重點之一<sup>24,25</sup>。但是由於其涉及相當複雜的交互關係，唯有透過生物資訊學（bioinformatics）的方式，才能大量且快速的篩選出具特徵性的選擇性剪接基因及辨別其結構、分析選擇性剪接的功能和調控方式等各方面的課題<sup>26-28</sup>。除了耗時的實驗研究之外，找出選擇性剪接基因及其結構主要是透過比較表現序列標籤（expressed sequence tag; EST）、mRNA等轉錄資料與基因體序列，來找出屬於同一基因，但具有不同結構組成之標的。另一方面，分析蛋白質產物可對選擇性剪接的功能進行預測；潛在調控因子的統計分析則可作為選擇性剪接調控機制的研究，以提供必要的資料。相信未來對於選擇性剪接及其調控機制將會有更深入研究，為基因體和蛋白質體之間的結合提供一個重要的溝通平台。

## 引用文獻

1. Tsai KW, Lin WC. Quantitative analysis of wobble splicing indicates that it is not tissue specific. *Genomics* 2006;88:855-864.
2. Tsai KW, Tarn WY, Lin WC. Wobble splicing reveals the role of the branch point sequence-to-NAGNAG region in 3' tandem splice site selection. *Mol Cell Biol* 2007;27:5835-5848.
3. Tsai KW, Tseng HC, Lin WC. Two wobble-splicing events affect ING4 protein subnuclear localization and degradation. *Exp Cell Res* 2008;314:3130-3141.
4. Xin D, Hu L, Kong X. Alternative promoters influence alternative splicing at the genomic level. *PLoS ONE* 2008;3:e2377.
5. Kwan T, Benovoy D, Dias C, Gurd S, Provencher C, Beaulieu P, Hudson TJ, Sladek R, Majewski J. Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nat Genet* 2008;40:225-231.
6. Ben-Dov C, Hartmann B, Lundgren J, Valcarcel J. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2008;283:1229-1233.
7. Xing Y, Lee C. Relating alternative splicing to proteome complexity and genome evolution. *Adv Exp Med Biol* 2007;623:36-49.
8. Shepard PJ, Hertel KJ. Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing. *RNA* 2008;14:1463-1469.
9. Hertel KJ. Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem* 2008;283:1211-1215.
10. Dunker AK, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, Uversky VN. The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 2008;9 Suppl 2:S1.
11. Hiller M, Zhang Z, Backofen R, Stamm S. Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS Genet* 2007;3:e204.
12. Tarrío R, Ayala FJ, Rodriguez-Trelles F. Alternative splicing: a missing piece in the puzzle of intron gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7223-7228.
13. Schellenberg MJ, Ritchie DB, MacMillan AM. Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci* 2008;33:243-246.
14. Strausberg RL, Levy S. Promoting transcriptome diversity. *Genome Res* 2007;17:965-968.
15. Ochsenreiter T, Anderson S, Wood ZA, Hajduk SL. Alternative RNA editing produces a novel protein involved in mitochondrial DNA maintenance in trypanosomes. *Mol Cell Biol* 2008;28:5595-5604.
16. Gallo A, Galardi S. A-to-I RNA editing and cancer: From pathology to basic science. *RNA Biol* 2008;5 (in press).
17. Venables JP, Koh CS, Froehlich U, Lapointe E, Couture S, Inkel L, Bramard A, Paquet ER, Watier V, Durand M, Lucier JF, Gervais-Bird J, Tremblay K, Prinos P, Klinck R, Elela SA, Chabot B. Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Mol Cell Biol* 2008;28:6033-6043.
18. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, Seifert M, Borodina T, Soldatov A, Parkhomchuk D, Schmidt D, O'Keefe S, Haas S, Vingron M, Lehrach H, Yaspo ML. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 2008;321:956-960.
19. Pettigrew CA, Brown MA. Pre-mRNA splicing aberrations and cancer. *Front Biosci* 2008;13:1090-1105.
20. Klinck R, Bramard A, Inkel L, Dufresne-Martin G, Gervais-Bird J, Madden R, Paquet ER, Koh C, Venables JP, Prinos P, Jilaveanu-Pelmsus M, Wellinger R, Rancourt C, Chabot B, Abou Elela S. Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. *Cancer Res* 2008;68:657-663.
21. Gabut M, Chaudhry S, Blencowe BJ. SnapShot: The splicing regulatory machinery. *Cell* 2008;133:192.e1.
22. Marozin S, Altomonte J, Stadler F, Thasler WE, Schmid RM, Ebert O. Inhibition of the IFN-beta response in hepatocellular carcinoma by alternative spliced isoform of IFN regulatory factor-3. *Mol Ther* 2008;16:1789-1797.

23. Sekine R, Kitamura T, Tsuji T, Tojo A. Identification and comparative analysis of Pax5 C-terminal isoforms expressed in human cord blood-derived B cell progenitors. *Immunol Lett* 2007;111:21-25.
24. Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bahler J. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 2008;453:1239-1243.
25. Granzier H, Radke M, Royal J, Wu Y, Irving TC, Gotthardt M, Labeit S. Functional genomics of chicken, mouse, and human titin supports splice diversity as an important mechanism for regulating biomechanics of striated muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R557-567.
26. Wong TK, Lam TW, Yang W, Yiu SM. Finding alternative splicing patterns with strong support from expressed sequences on individual exons/introns. *J Bioinform Comput Biol* 2008;6:1021-1033.
27. Ryan MC, Zeeberg BR, Caplen NJ, Cleland JA, Kahn AB, Liu H, Weinstein JN. SpliceCenter: a suite of web-based bioinformatic applications for evaluating the impact of alternative splicing on RT-PCR, RNAi, microarray, and peptide-based studies. *BMC Bioinformatics* 2008;9:313.
28. Kim N, Lee C. Bioinformatics detection of alternative splicing. *Methods Mol Biol* 2008;452:179-197.



# 生物醫學

BIOMEDICINE JOURNAL