

Підвищена експресія генів *SOX-2* та *НС gp-39* в астроцитарних гліомах

О. М. Гарифулін, К. О. Шостак, В. В. Дмитренко, В. Д. Розуменко¹,
О. В. Хоменко¹, Ю. П. Зозуля¹, Г. Цехетнер², В. М. Кавсан

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова АМН України
Вул. Мануїльського, 32, Київ, 04050, Україна

² Інститут молекулярної генетики ім. Макса Планка
Берлін, Німеччина

*Порівняння рівнів експресії генів у клітинах нормальної тканини і злоякісних пухлин є одним з альтернативних підходів до виявлення генів, залучених до процесу малігнізації. Використання SAGEmap і DDD (Digital Differential Display) — різновидностей методу «електронного віднімання» — для порівняння профілів експресії генів у нормальному головному мозку та мультиформній гліобластомі показало, що гени *НС gp-39* та *SOX-2* відносяться до генів з найбільш зміненим рівнем експресії в цій злоякісній пухлині. Рівень експресії *НС gp-39* підвищений в 82 рази, а *SOX-2* — в 109 разів порівняно з нормальним головним мозком. Нозерн-аналіз підтвердив результати комп'ютерного аналізу і виявив винятково високий вміст мРНК *НС gp-39* у гліобластомі та підвищений вміст мРНК *SOX-2* в астроцитарних пухлинах різного ступеня злоякісності. Дуже вірогідно, що надекспресія гена *НС gp-39* у гліобластомі пов'язана з позитивною регуляцією цього гена в активованих макрофагах, які є найбільш представленими на кінцевих етапах розвитку астроцитарних гліом. *НС gp-39* є потенційним молекулярним маркером для діагностики гліобластом, а підвищена активність гена *SOX-2*, можливо, є одним з суттєвих компонентів формування астроцитарних пухлин.*

Вступ. Астроцитарні гліоми — найрозповсюдженіші і найзлоякісніші гліальні пухлини центральної нервової системи. Вони характеризуються практично стовідсотковою летальністю і високою частотою рецидивів. Астроцитоми низького ступеня злоякісності майже завжди прогресують до більш злоякісного фенотипу і, зрештою, досягають клінічних проявів найагресивнішої форми захворювання — гліобластоми.

Сучасна картина молекулярних основ формування і злоякісної прогресії астроцитарних пухлин відображає складну взаємодію багатьох генетичних подій, які включають хромосомні аномалії на ді-

лянках 9p, 10p, 10q, 11p, 13q, 19q, 22q, інактивіацію супресорних генів *p53*, *Rb* і аберантну експресію факторів росту та їхніх рецепторів: EGF та EGFR, PDGF та PDGFR, VEGF [1, 2].

Існуючі на сьогодні знання відображають частину біологічних механізмів, які, за припущенням, сприяють ініціації і розвитку астроцитом. Більш інформативний підхід включає вивчення експресії генів для концентрування уваги не лише на структурних змінах, але й на регуляторних відмінностях. Зміни в експресії генів є важливими детермінантами нормальної клітинної фізіології і якщо якимось чином порушено їхній нормальний перебіг, це безпосередньо призводить до клітинних аномалій, включаючи злоякісний стан. У цьому контексті ідентифікація, клонування і характеристика генів, що диференційно експресуються, по-

© О. М. ГАРИФУЛІН, К. О. ШОСТАК, В. В. ДМИТРЕНКО,
В. Д. РОЗУМЕНКО, О. В. ХОМЕНКО, Ю. П. ЗОЗУЛЯ,
Г. ЦЕХЕТНЕР, В. М. КАВСАН, 2002

винні пролити світло на молекулярні детермінанти пухлинного процесу [3].

Ми використали можливості публічної бази даних CGAP (Cancer Genome Anatomy Project) [4] для аналізу експресії більш ніж 47000 генів у нормальному головному мозку порівняно з гліобластомою. Використання програми SAGEmap (Serial Analysis of Gene Expression Map) показало, що найбільших змін у гліобластомі зазнає експресія гена HC gp-39, вміст так званих «ярликів» (tags) якого у 82 рази більший в SAGE-бібліотеці мультиформної гліобластоми, ніж в SAGE-бібліотеці нормального головного мозку.

За допомогою другої програми — «диференційного цифрового дисплею» (DDD, Differential Digital Display) — було виявлено 109-разове перевищення вмісту EST_s (expressing sequence tags) гена SOX-2 в бібліотеці кДНК гліобластоми порівняно з бібліотекою кДНК нормального головного мозку. Над-експресія гена HC gp-39 у гліобластомі і підвищена експресія гена SOX-2 в астроцитомах II—IV ступеня, а також в епендимоммах I—III ступеня та в шурячій гліомі були підтверджені Нозерн-гібридизацією РНК. Одержані дані свідчать про те, що HC gp-39 та SOX-2 беруть участь у різних пухлинних процесах формування астроцитарних гліом.

Матеріали і методи. *Пухлини і нормальні тканини.* Хірургічні зразки астроцитарних гліом, інших видів пухлин головного мозку та нормального головного мозку людини (прилеглий до пухлин гістологічно нормальний головний мозок, який вимушено видаляється під час операції), шуряча гліома (лінія 101.8) були отримані з Інституту нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України. Нормальний шурячий мозок отримано з дорослого щура лінії Wistar.

«Електронне віднімання». «Диференційний цифровий дисплей» (веб-сторінка NCBI — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncigar>) здійснено для визначення відносної репрезентативності транскриптів близько 7890 генів в 13000 EST_s з бібліотеки кДНК мультиформної гліобластоми порівняно з 73000 EST_s з п'яти бібліотек кДНК нормального головного мозку.

Профілі експресії близько 47000 генів, для яких отримано 284000 tags (10-нуклеотидних «ярликів» генів) в SAGE-бібліотеках нормального головного мозку і гліобластоми, було порівняно з використанням програми SAGEmap (веб-сторінка NCBI — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>).

Клони кДНК HC gp-39 та SOX-2. Пошук EST_s, які містять кодуючі ділянки генів HC gp-39 та SOX-2, здійснювали в базі даних нуклеотидних послідовностей UniGene [5] (веб-сторінка NCBI —

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>). Для наступного аналізу з бази даних GeneBank відбирали EST_s з реєстраційними номерами AI097136 для гена SOX-2 та R74158 для гена HC gp-39. Відповідні клони кДНК отримано з Центру ресурсів і бази даних проекту «Геном людини» Німеччини (RZPD, Resource Zentrum/Primary Data Base).

Нозерн-аналіз РНК. Тотальну РНК виділяли гуанідинтіоціанатним методом [6] із заморожених в рідкому азоті хірургічних зразків пухлин та нормального головного мозку. Після електрофоретичного фракціонування зразків тотальної РНК (10 мкг на одну доріжку) в буфері TBE (0,089 М Трис; 0,089 М борна кислота; 2 мМ ЕДТА) в 1 %-му агарозному гелі, який містив 2,2 М формальдегід, РНК переносили на нейлонові мембрани Hybond-N («Amersham Pharmacia Biotech», Австрія). Рестриктні фрагменти кДНК SOX-2 та кДНК HC gp-39, які відповідають кодуючим ділянкам цих генів, використано для отримання [³²P]-мічених зондів за допомогою набору для мічення Redi-PrimeII («Amersham Pharmacia Biotech»). Гібридизацію РНК проводили при температурі 42 °С впродовж 16 год у розчині, який містив 50 %-й формамід, 4 × SSC, 4 × розчин Денхардта, 0,1 %-й SDS та 100 мг/мл низькомолекулярної геномної ДНК курки.

Мембрани відмивали спочатку двічі по 20 хв у розчині 2 × SSC; 0,1 % SDS, потім протягом 2 год при температурі 65 °С у розчині 0,5 × SSC; 0,1 %-й SDS.

Результати і обговорення. Формування і зло-якісна прогресія астроцитарних гліом асоційовані зі змінами в різних генах, які можуть бути результатом мутацій, тобто змін на рівні ДНК, як, наприклад, це відомо для генів p53, Rb та EGFR, або модуляцій рівнів експресії генів, тобто змін на рівні РНК, яка привертає все більшу увагу для прояснення механізмів канцерогенезу [3]. Гени із зміненою в пухлинних клітинах експресією можуть стати новими молекулярними маркерами для діагностики і терапії астроцитарних гліом.

Найширше використання для ідентифікації генів, які диференційно експресуються, отримали методи віднімальної супресивної гібридизації (SSH, suppression subtractive hybridization) [7, 8], «електронне віднімання» [9, 10], диференційний дисплей (DD, differential display) [11], технології мікропобудов ДНК (DNA microarray technology) [12]. Але всі ці методи або дуже дорогі, або трудомісткі для реалізації. З іншого боку, створені як компонент CGAP загальнодоступні бази даних EST_s, звичайних бібліотек кДНК та «ярликів» кДНК (SAGE)-бібліотек різних тканин і пухлин дають мож-

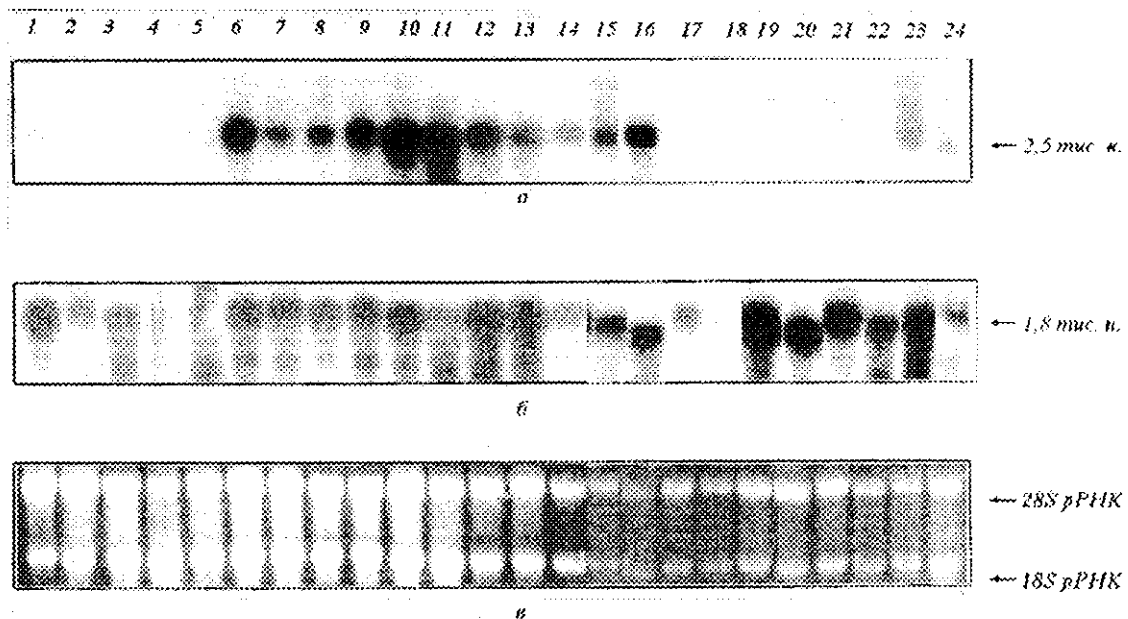


Рис. 1. Аналіз експресії гена *SOX-2* в пухлинах головного мозку людини: *a* — Нозерн-гібридизація з $[^{32}\text{P}]$ -міченою пробєю кДНК *SOX-2* (кожна доріжка містить 10 мкг тотальної РНК; 1 — головний мозок ембріона (вік 12–14 тижнів) людини; 2, 3 — головний мозок дорослої людини; 4 — мозок щура; 5, 6 — астроцитомі II ступеня; 7–12 — анапластичні астроцитомі III ступеня; 13 — гліобластома; 14 — гліома щура; 15 — епендимома I ступеня; 16 — епендимома II–III ступенів; 17–21 — менінгіоми I ступеня (17–19 — менінготеціальна менінгіома; 20 — менінгіома змішаного складу; 21 — фібробластична менінгіома); 22 — менінгіома II ступеня; 23 — метастаз злоякісної пухлини легень до головного мозку людини; 24 — саркома головного мозку); *б* — Нозерн-гібридизація з контрольною пробєю кДНК β -актину; *в* — забарвлення бромистим етидієм зразків РНК в агарозному гелі після електрофорезу до перенесення на мембрану

ливість порівнювати профілі експресії генів у нормальних і пухлинних клітинах за допомогою комп'ютерного аналізу з використанням відповідної веб-сторінки.

Ми використали бази даних CGAP для проведення «електронного віднімання» для тисяч генів, які експресуються в клітинах нормального головного мозку і гліобластоми. Серед 7980 генів, проєктованих за допомогою DDD визначено 41 ген, кількість EST, яких варіює в 70–900 разів ($p < 0,05$) у бібліотеці кДНК гліобластоми порівняно з бібліотеками кДНК нормального головного мозку людини. Порівняння експресії генів за допомогою SAGEmap показало, що близько 1 % генів, тобто 471 із 47174 генів, виявляють диференційний розподіл «ярликів» у кДНК (SAGE)-бібліотеках нормального головного мозку і гліобластоми в межах 5–100-разової відмінності ($p < 0,001$) [4].

Для детальнішого аналізу відібрано два гени, великі зміни у представленості мРНК яких в гліобластомі порівняно з нормальним мозком, віро-

гідно, мають важливе біологічне значення в процесі набуття злоякісності астроцитарними гліомами. Представленість транскриптів гена транскрипційного фактора *Sox-2* [13] у 109 разів, а гена *NC gp-39* [14] — у 82 рази вища в бібліотеці кДНК гліобластоми, ніж у бібліотеці кДНК нормального головного мозку. Для підтвердження диференційної експресії цих генів здійснено Нозерн-аналіз РНК нормального головного мозку і пухлин головного мозку різного типу. Нозерн-гібридизація показала високий рівень експресії гена *SOX-2* у вигляді одного транскрипта розміром 2,5 тис. н. в усіх зразках астроцитарних гліом, епендимом, шурячій гліомі (рис. 1).

Набагато меншим вміст мРНК *SOX-2* виявився в ембріональному головному мозку людини, в метастазі пухлини легень, у саркомі мозку. Зовсім не детектувалася мРНК *SOX-2* в нормальному головному мозку дорослої людини і щура, а також менінгіомах I і II ступеня злоякісності. Високий рівень мРНК *NC gp-39* [14] виявлено в гліо-

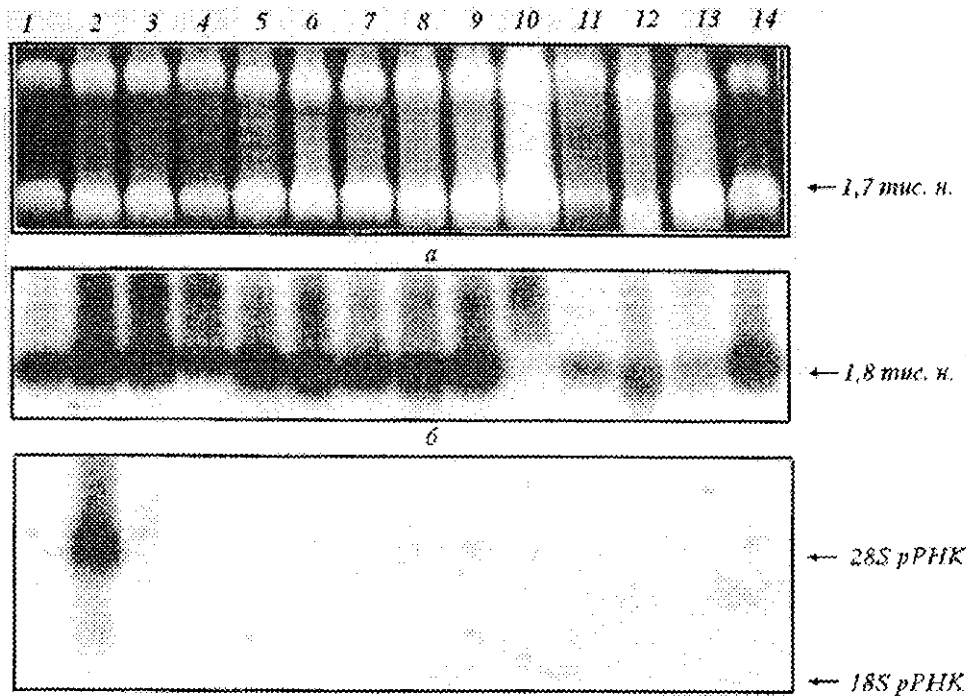


Рис. 2. Аналіз експресії гена *HC gp-39* в пухлинах головного мозку людини: *a* — Нозерн-гібридизація з ^{32}P -міченою пробою кДНК *HC gp-39* (кожна доріжка містить 10 мкг тотальної РНК; 1 — головний мозок ембріона (вік 12—14 тижнів) людини; 2, 3 — головний мозок дорослої людини; 4 — мозок щура; 5, 6 — астроцитомы II ступеня; 7—12 — анапластичні астроцитомы III ступеня; 13 — гліобластома; 14 — гліома щура); *b* — Нозерн-гібридизація з контрольною пробою кДНК β -актину; *в* — забарвлення бромистим етидієм зразків РНК в агарозному гелі після електрофорезу до перенесення на мембрану

бластомі, набагато менший — в анапластичних астроцитомах (ступінь III за класифікацією ВООЗ). В інших пухлинах, а також у нормальному головному мозку ця мРНК зовсім не детектувалася (рис. 2).

Sox-2 є представником родини транскрипційних факторів *Sox*, яка складається більш ніж з 30 генів. Ген *SOX-2*, як і гени *SOX-1* та *SOX-3*, експресується переважно в центральній нервовій системі під час розвитку, а також в генітальній складці ембріона. Надекспресія гена *SOX-2* в гліомах може відігравати важливу роль у канцерогенезі цих пухлин, впливаючи на транскрипційну активність певної групи генів, які не експресуються в нормальному головному мозку. Показано, що експресія протоонкогена *FGF-4* (fibroblast growth factor 4) в нормальних клітинах пригнічена [16, 17], але його активація в клітинах ембріональної карциноми потребує синергічної взаємодії транскрипційних факторів *Oct-3* і *Sox-2* з енхансером *FGF-4*, підкреслюючи диференційну транскрипцію гена *FGF-4* [18]. Можливо, інактивація гена *SOX-2* призведе до пригнічення проліферативної активності і злоякісної прогресії пухлинних клітин.

Глікопротеїн *HC gp-39* є представником білкової родини хітиназ ссавців, однак не проявляє ніякої глікозидної активності стосовно хітиназних субстратів. Цей білок є мажорним секреторним продуктом хондроцитів суглобів і синовіальних клітин. мРНК *HC gp-39* виявлено в хондроцитах суглобів людини, а також у печінці і на дуже низькому рівні — в мозку, нирках, плаценті [14]. Хоча мРНК *HC gp-39* не детектується в мононуклеарних клітинах крові, підвищений рівень цієї мРНК, а також білка знайдено в макрофагах запальних тканин [19].

Індукція експресії гена *HC gp-39* може бути асоційована зі стимуляцією мононуклеарних клітин різними екзогенними та ендогенними факторами, присутніми в запальних тканинах (інтерлейкіни, цитокіни, фактори росту). В 5'-фланкуючій геномній ділянці гена ідентифіковано передбачувані для цих факторів регуляторні елементи [20].

Аналіз SAGE-бібліотек не виявляє «ярликів» для гена *HC gp-39*, але надекспресія його в гліобластомі (рис. 2) може бути асоційована з метоплазією кісток або хряща, яка спостерігається в цій пухлинній тканині внаслідок дедиференціації висо-

козляючих клітин [21]. З іншого боку, не виключено, що HC gp-39 експресується на високому рівні в активованих мононуклеарах крові гліобластоми. Ця тканина має найвищий рівень стимуляторів запалення, які діють на мононуклеари внаслідок підвищеного ангиогенезу, а також імунного і некротичного процесів порівняно з астроцитомами нижчих ступенів злоякісності [1]. Дуже вірогідно, що всі наведені вище причини є причетними до селективної активації гена HC gp-39 в астроцитарних пухлинах.

Нами показано ефективність використання «електронного віднімання» для ідентифікації нових генів, залучених до патогенезу астроцитарних гліом. Надекспресія гена SOX-2 в гліомах, ідентифікована за допомогою SAGEmap, може активувати набір генів, експресія яких обмежена лише ембріональною гліальною тканиною і, таким чином, залучити їх до злоякісної трансформації гліальних клітин. Високий рівень експресії гена HC gp-39, знайдений за допомогою DDD виключно в гліобластомі, може бути асоційований з процесами запалення або метаболізму, які є специфічними лише для астроцитом найвищого ступеня. Обидва гени є потенційними молекулярними маркерами гліальних пухлин.

Робота частково фінансувалася за рахунок гранту NATO CLG N 977284.

O. M. Garifulin, K. O. Shostak, V. V. Dmitrenko,
V. D. Rozumenko, O. V. Khomenko, Yu. A. Zozulya,
G. Zehetner, V. M. Kavsan

The genes SOX-2 and HC gp-39 are overexpressed in astrocytic gliomas

Summary

The comparison of gene expression in normal and tumour cells is one of the alternative approaches to determine genes involved in cancerogenesis. The comparison of gene expression profiles for normal brain and glioblastoma multiforme by utilising SAGEmap and DDD public databases of Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) revealed that the expressions of the HC gp-39 and SOX-2 genes had the greatest changes in the tumor cells. The expression of HC gp-39 gene is 82 times and SOX-2 — 109 times greater in glioblastoma multiforme. Northern-analysis confirmed the results of computation and showed enhanced expression of the HC gp-39 gene only in glioblastoma multiforme and elevated level of SOX-2 mRNA in astrocytic tumours of different malignancy grades. Very likely that overexpression of the HC gp-39 gene may be related to upregulation of this gene in the activated macrophages which are more abundant during the terminal stages of astrocytic gliomas or due to cartilage metaplasia in glioblastoma. Expression of the SOX-2 gene was observed prevalently only in gliomas. We assume that increased activity of the SOX-2 gene in astrocytic tumours has an essential biological significance in the glioma formation and the HC gp-39 gene may be used as a molecular marker for the glioblastoma diagnostics.

O. M. Garifulin, K. A. Shostak, V. V. Dmitrenko,
V. D. Rozumenko, O. V. Khomenko, Yu. P. Zozulya,
G. Zehetner, V. M. Kavsan

Повышенная экспрессия генов SOX-2 и HC gp-39 в астроцитарных глиомах

Резюме

Сравнение уровней экспрессии генов в клетках нормальной ткани и злокачественных опухолей является одним из альтернативных подходов к выявлению генов, вовлеченных в процесс малигнизации. Использование SAGEmap и DDD (Digital Differential Display) — разновидности метода «электронного вычитания» — для сравнения профилей экспрессии генов в нормальном головном мозге и мультиформной глиобластоме показало, что гены HC gp-39 и SOX-2 относятся к генам с наиболее измененным уровнем экспрессии в этой злокачественной опухоли. Уровень экспрессии HC gp-39 повышен в 82 раза, а SOX-2 — в 109 раз по сравнению с нормальным головным мозгом. Нозерн-анализ подтвердил результаты компьютерного анализа и показал исключительно высокое содержание мРНК HC gp-39 в глиобластоме и повышенное содержание мРНК SOX-2 в астроцитарных опухолях разной степени злокачественности. Очень вероятно, что надэкспрессия гена HC gp-39 в глиобластоме связана с позитивной регуляцией этого гена в активированных макрофагах, наиболее представленных на конечных этапах развития астроцитарных глиом. HC gp-39 является потенциальным молекулярным маркером для диагностики глиобластом, а повышенная активность гена SOX-2, возможно, — одним из существенных компонентов формирования астроцитарных опухолей.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Louis D. N. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology // Brain Pathol.—1997.—7.—P. 755—764.
2. Smith J. S., Jenkins R. B. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications // Front Biosci.—2000.—5.—P. 213—231.
3. Sager R. Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 952—955.
4. Lal A., Lash A. E., Altschul S. F. A public database for gene expression in human cancers // Cancer Res.—1999.—59.—P. 5403—5407.
5. Schuler G. D. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes // J. Mol. Med.—1997.—75.—P. 694—698.
6. Chomchinsky P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem.—1987.—162.—P. 156—159.
7. Diachenko L., Lau Y.-F. C., Campbell A. P., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S., Gurskaya N., Sverdlov E. D., Siebert P. D. Suppression subtractive hybridization. A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 6025—6030.
8. Von Stein O. D., Thies W.-G., Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes // Nucl. Acids Res.—1997.—25.—P. 2598—2602.
9. Okubo K., Hori N., Matoba R. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression // Nat. Genet.—1992.—2.—P. 173—179.
10. Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W. Serial analysis of gene expression // Science.—1995.—270.—P. 484—487.

11. Liang P., Pardee A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction // Science.—1992.—257.—P. 967—971.
12. Schena M., Shalon D., Heller R. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 10614—10619.
13. Stevanovic M., Zuffardi O., Collignon J., Lovell-Badge R., Goodfellow P. The cDNA sequence and chromosomal location of the human Sox-2 gene // Mamm. Genome.—1994.—5.—P. 640—642.
14. Hakala B. E., White C., Recklies A. D. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family // J. Biol. Chem. —1993.—268.—P. 25803—25810.
15. Collignon J., Sockanathan S., Hacker A., Cohen-Tannoudji M., Norris D., Rastan S., Stevanovich M., Goodfellow P. N., Lovell-Badge R. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2 // Development.—1996.—12.—P. 509—520.
16. Bovi D. P., Curatola A. M., Kern F. G. An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is member of the FGF family // Cell.—1987.—50.—P. 729—737.
17. Taira M., Yoshida T., Miyagawa K., Sakamoto H., Terada M., Sugimura T. CDNA sequence of a human transforming gene *hst* and identification of the coding sequence required for transforming activity // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84.—P. 290—298.
18. Ambrosetti D.-C., Basilico C., Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox-2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites // Mol. Biol. Cell.—1997.—17.—P. 6321—6329.
19. Boot R. G., van Achterberg T. A., van Aken B. E. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.—1999.—19.—P. 687—694.
20. Rehli M., Krause S. W., Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation // Genomics.—1997.—43.—P. 221—222.
21. Richman A. V., Balis G. A., Maniscalco J. E. Primary intracerebral tumor with mixed hondrosarcoma and glioblastoma-gliosarcoma or sarcogliomai // J. Neuropathol. Exp. Neurol.—1980.—39.—P. 329—335.

УДК 577.21:577.214.622
Надійшла до редакції 21.08.2000