

## Надекспресія генів на різних стадіях розвитку астроцитарних гліом

В. В. Дмитренко, О. І. Бойко, К. О. Шостак, О. Є. Симиренко, Т. В. Букреєва, В. Д. Розуменко<sup>1</sup>, Т. А. Малишева<sup>1</sup>, М. І. Шамаєв<sup>1</sup>, Ю. П. Зозуля<sup>1</sup>, В. М. Кавсан

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

<sup>1</sup>Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України  
Вул. Мануїльського, 32, Київ, 04050, Україна

E. mail: dmitrenko@imbg.org.ua

---

*Публічну базу даних із серійного аналізу генної експресії (SAGE) використано для ідентифікації потенційних молекулярних маркерів астроцитарних гліом людини. При порівнянні дев'яти SAGE-бібліотек гліобластом, 11 SAGE-бібліотек анапластичних астроцитом, восьми SAGE-бібліотек дифузних астроцитом та п'яти SAGE-бібліотек нормального головного мозку виявлено 57 генів, рівень експресії яких був більш ніж у 5 разів вищий ( $P \leq 0,05$ ) в астроцитарних гліомах відносно нормального головного мозку. Серед змін експресії генів, які відбуваються на ранньому етапі формування астроцитом та виявляються і на наступних етапах їхнього розвитку, деякі модифікації є характерними лише для високозлоякісних стадій розвитку пухлин і відсутні в пухлинах низького ступеня злоякісності. Результати аналізу експресії виявлених генів можна використовувати для молекулярної класифікації гліальних пухлин, діагностики, прогностичної оцінки пухлин та визначення потенційних мішеней протипухлинної терапії.*

---

*Ключові слова: SAGE, диференційна експресія, астроцитарні гліоми, молекулярні маркери.*

---

**Вступ.** Злоякісні гліоми, найрозповсюдженіші первинні пухлини головного мозку людини, характеризуються значною агресивністю, високою інвазивністю і нейрологічною деструктивністю. Більшість гліом (до половини всіх внутрішньочерепних пухлин) складають астроцитарні гліоми — новоутворення астроцитарної глії головного мозку. Пухлини прогресують через стадії зростаючої злоякісності, асоційовані з акумуляцією генетичних аномалій на різних хромосомах та із змінами експресії генів. Класифікація ВООЗ [1] базується на певних гістологічних властивостях пухлинних клітин, тому гістологічний діагноз є основним критерієм для прогностичної оцінки і терапії.

Спроби встановити кореляцію між генотипом і фенотипом гліальних пухлин не дали однозначних

© В. В. ДМИТРЕНКО, О. І. БОЙКО, К. О. ШОСТАК, О. Є. СИМИРЕНКО, Т. В. БУКРЕЄВА, В. Д. РОЗУМЕНКО, Т. А. МАЛИШЕВА, М. І. ШАМАЄВ, Ю. П. ЗОЗУЛЯ, В. М. КАВСАН, 2006

результатів. Зокрема, мутації гена *p53* (характерна ознака дифузних астроцитом, стійких до хіміотерапії) і втрату гетерозиготності (LOH) на хромосомах 1p і 19q (ознаки, притаманні олігодендрогліомам, які пов'язують з їхньою чутливістю до хіміотерапії і кращим прогнозом) виявлено як в астроцитоммах, так і в олігодендрогліомах [2]. В роботі [3] на основі генетичного аналізу астроцитом і олігодендрогліом також дійшли висновку, що генетичні зміни (мутації гена *p53* і LOH на хромосомах 1p і 19q) не можна вважати вірогідними прогностичними факторами.

З появою кДНК-мікроарейв, олігонуклеотидних чипів, секвенування бібліотек кДНК, цифрового диференційного дисплею (Digital Differential Display, DDD) та серійного аналізу генної експресії (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) стала можливою ідентифікація генів, експресія яких змі-

нюється при різноманітних захворюваннях. Ці технології дозволяють ідентифікувати не поодинокі гени, а генні кластери, які характеризують профілі експресії генів у нормальному стані та при захворюванні. Відмінності в рівнях експресії генів можуть бути використані не лише для класифікації пухлин та прогнозу відповіді при лікуванні, але й для виявлення множинних біомаркерів для ранньої діагностики раку [4].

Так, у роботах з профілювання генної експресії гліом за допомогою диференційної гібридації кДНК-ареїв [5] та олігонуклеотидних мікроареїв [6] визначено молекулярні субтипи астроцитом II—IV ступенів злоякісності і олигодендрогліом, які мають подібний статус LOH 1p та 19q, але відрізняються за профілями експресії генів, що корелюють з певними клінічними ознаками цих пухлин.

Встановлено, що експресія відносно невеликої кількості генів відрізняється в злоякісних і нормальних тканинах. Відмінності в експресії цих генів можуть відображати важливі зміни в таких критичних процесах, як клітинна проліферація, протеосомна функція, енергетичний метаболізм та перенос сигналу. Однак значна гетерогенність гліальних пухлин і множинність шляхів їхнього розвитку потребують подальших досліджень.

Ми проаналізували експресію генів в астроцитарних гліомах II—IV ступенів злоякісності і в нормальному головному мозку (НГМ) за допомогою SAGE для ідентифікації генів, які можна використовувати як молекулярні маркери гліальних пухлин. Викладені нижче результати демонструють, що близько 60 генів експресуються на значно вищому рівні в астроцитарних гліомах порівняно з НГМ. Виявлені гени є потенційними маркерами для молекулярної класифікації гліальних пухлин, діагностики, прогностичної оцінки і протипухлинної терапії.

**Матеріали і методи.** Дев'ять SAGE-бібліотек гліобластом (ГБ, астроцитоми IV ступеня за класифікацією WHO), 11 SAGE-бібліотек анапластичних астроцитом (AA, астроцитоми III ступеня), вісім SAGE-бібліотек дифузних астроцитом (A, астроцитоми II ступеня) та п'ять SAGE-бібліотек НГМ проаналізовано для порівняння експресії генів з використанням пошукової програми DGED (Digital Gene Expression Display) і бази даних SAGE Genie (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). Беручи до уваги об'єднання зразків у деяких SAGE-бібліотеках (GSM765 є пулом п'яти гліобластом, а GSM763 — двох зразків НГМ), фактично про-

аналізовано 13 зразків ГБ і шість зразків НГМ (табл. 1). Базу даних Unigene NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) використано для пошуку клонів кДНК, які містять кодуєчі ділянки виявлених мРНК. Відібрані клони кДНК одержано з Центру ресурсів геномних досліджень Німеччини (RZPD, Resource Center/Primary DataBase (<http://www.rzpd.de>)).

Хірургічні зразки гліальних астроцитом і НГМ (гістологічно нормальна тканина головного мозку, прилегла до пухлини, яка вимушено видаляється разом з пухлиною під час операції) отримано з Інституту нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України. Всього проаналізовано 35 зразків пухлин, у тому числі 14 гліобластом, 10 анапластичних астроцитом, шість астроцитом, дві олигоастроцитоми, одну анапластичну олигодендрогліому.

Тотальну РНК виділяли із заморожених у рідкому азоті тканин методом фенольної екстракції гуанідинізоціанатного розчину, як описано в роботах [7, 8]. РНК (10 мкг на доріжку) фракціонували в горизонтальному 1,5 %-му агарозному гелі за присутності 2,2 М формальдегіду в боратному буфері (0,2 мМ ЕДТА, рН 8,0, 30 мМ борна кислота, 3,3 мМ тетраборат натрію, рН 7,5), а потім переносили на нейлонові мембрани Hybond-N («Amersham Pharmacia Biotech», Австрія)

Мембрани гібридували протягом 16 год за температури 42 °С з <sup>32</sup>P-міченими пробами кДНК у 50 %-му розчині формаміду, 5 × SSC, 5 × Denhardt, 0,1 % SDS, 100 мкг/мл ДНК лосося. Фільтри відмивали двічі по 15 хв при кімнатній температурі в розчині 2 × SSC, 0,1 % SDS; один раз упродовж 15 хв в розчині 2 × SSC, 0,1 % SDS за температури 65 °С і остаточно — в розчині 0,2 × SSC, 0,1 % SDS протягом 15 хв (65 °С). Мембрани експонували на рентгенівську плівку з використанням посилюючого екрану за температури -70 °С, далі їх відмивали і гібридували повторно з <sup>32</sup>P-міченою кДНК β-актину людини для контролю нанесення РНК на агарозний гель. Денситометричний аналіз гібридаційних сигналів проводили за допомогою програми Scion Image 1.62c.

**Результати і обговорення.** Для визначення відносних рівнів експресії генів в астроцитарних пухлинах різних ступенів злоякісності та НГМ за допомогою SAGE ми використали публічну базу даних CGAP (Cancer Genome Anatomy Project). У попередній роботі [9] порівняння п'яти SAGE-бібліотек ГБ з двома SAGE-бібліотеками НГМ, які існували в цій базі даних на той час, виявило 117

Таблиця 1  
SAGE-бібліотеки астроцитарних гліом, проаналізовані в даній роботі

Назва бібліотеки	Кількість
<i>Нормальний головний мозок</i>	
Normal human thalamus SAGE library (GSM713: SAGE_Brain_normal_thalamus_B_1)	
Normal human brain SAGE library (GSM676: SAGE_Brain_normal_cortex_B_BB542)	
Normal human brain SAGE library (GSM763: SAGE_Brain_normal_cortex_B_pool6)	
Normal human cerebellum SAGE library (GSM695: SAGE_Brain_normal_cerebellum_B_BB542)	
Normal human cerebellum SAGE library (GSM761: SAGE_Brain_normal_cerebellum_B_1)	
Загальна кількість «ярликів» у пулі SAGE-бібліотек	2715
<i>Дифузні астроцитомы</i>	
Astrocytoma grade II SAGE library (GSM1732: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H127)	
Astrocytoma grade II SAGE library (GSM14739: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H563)	
Astrocytoma grade II SAGE library (GSM14765: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H530)	
Astrocytoma grade II SAGE library (GSM2451: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H388)	
Astrocytoma grade II SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H359)	
Astrocytoma grade II SAGE library (GSM14737: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H518)	
Astrocytoma grade II SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H516)	
Astrocytoma grade II SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H501)	
Загальна кількість «ярликів» у пулі SAGE-бібліотек	8699
<i>Анапластичні астроцитомы</i>	
Astrocytoma grade III SAGE library (GSM14773: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_R140)	
Astrocytoma grade III SAGE library (GSM697: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H1020)	
Astrocytoma grade III SAGE library (GSM14763: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H970)	
Astrocytoma grade III SAGE library (GSM14766: SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_R927)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_407)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_343)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_439)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_828)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H584)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H1055)	
Astrocytoma grade III SAGE library (SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H272)	
Загальна кількість «ярликів» у пулі SAGE-бібліотек	1109
<i>Гліобластоми</i>	
Glioblastoma SAGE library (GSM696: SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1110)	
Glioblastoma SAGE library (GSM765: SAGE_Brain_glioblastoma_B_pooled)	
Glioblastoma SAGE library (GSM14768: SAGE_Brain_glioblastoma_B_R336)	
Glioblastoma SAGE library (GSM14769: SAGE_Brain_glioblastoma_B_R70)	
Glioblastoma SAGE library (GSM14767: SAGE_Brain_glioblastoma_B_H833)	
Glioblastoma SAGE library (SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1353)	
Glioblastoma SAGE library (SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1425C)	
Glioblastoma SAGE library (SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1371)	
Glioblastoma SAGE library (SAGE_Brain_glioblastoma_B_R20)	
Загальна кількість «ярликів» у пулі SAGE-бібліотек	7910

Таблиця 2

Список 44 генів з більш ніж п'ятиразовим розподілом «ярликів» у SAGE-бібліотеках гліобластом (ГБ) та нормального головного мозку (НГМ) за результатами DGED

«Ярлик»	Назва гену	Умовне позначення гену	Кількість бібліотек з «ярликами»		Кількість «ярликів» в об'єднаному пулі бібліотек, нормалізованих до 1 млн «ярликів»		Надлишок «ярликів» у пухлині порівняно з НГМ	p**
			ГБ	НГМ	ГБ	НГМ		
TGGGATTCCC	Chitinase 3-like 2	<i>CHI3L2</i>	9	0	256	0	NaN*	0,00
CCACAGGGGA	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	<i>COL3A1</i>	8	0	169	0	NaN*	0,00
AGTGGTGGCT	Fibromodulin	<i>FMOD</i>	9	0	145	0	NaN*	0,01
TTAAATAGCA	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	<i>SERPI</i>	6	0	140	0	NaN*	0,01
GTCAACAGTA	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	<i>ABCC3</i>	8	0	103	0	NaN*	0,04
TGCTCCTACC	Fc fragment of IgG binding protein	<i>FCGBP</i>	9	2	556	2	95,44	0,00
GTATGGGCCC	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	<i>CHI3L1</i>	9	2	826	4	70,92	0,00
ACCAAAAACC	Collagen, type I, alpha 1	<i>COL1A1</i>	8	2	1125	6	64,42	0,01
ACATTCTTTT	Glycoprotein (transmembrane) nmb	<i>GPNMB</i>	9	1	361	2	61,95	0,00
AGTACCTTAT	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian	<i>EGFR</i>	8	1	163	1	55,93	0,01
AGTACCTTAT	Microfibrillar-associated protein 2	<i>MFAP2</i>	6	1	153	1	52,50	0,01
ATCCTGAGTT	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	<i>HLA-DQB1</i>	9	1	153	1	52,50	0,01
GAAATAAAGC	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (Glm marker)	<i>IGHG1</i>	7	3	605	5	41,54	0,00
TTTGGTTTTT	Collagen, type I, alpha 2	<i>COL1A2</i>	8	2	529	5	36,32	0,00
ATAATAAAGC	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	<i>RARRES2</i>	9	1	205	2	35,17	0,00
CATATCATTA	Insulin-like growth factor binding protein 7	<i>IGFBP7</i>	9	5	1189	13	31,42	0,00
TCACCAAAAA	Stabilin 1	<i>STAB1</i>	8	1	174	2	29,85	0,01
GCCCTTTCTC	Mannose receptor, C type 2	<i>MRC2</i>	9	1	159	2	27,28	0,02
GCCAACAACG	Nicotinamide N-methyltransferase	<i>NNMT</i>	9	2	153	2	26,25	0,03
CTTGGGTTTT	Putative insulin like growth factor 2 associated protein	<i>C11orf43</i>	9	3	289	4	24,80	0,00
GCTGCCCTTG	Tubulin alpha 6	<i>TUBA6</i>	9	3	259	4	22,22	0,00
ATCTTGTTAC	Fibronectin 1	<i>FN1</i>	9	3	192	3	21,96	0,01
AGAAAGATGT	Annexin A1	<i>ANXA1</i>	9	5	437	7	21,43	0,00
TAACTCTCCT	Scavenger receptor class A, member 3	<i>SCARA3</i>	9	3	241	4	20,68	0,00
AGAACCTTCC	Major histocompatibility complex, class I, A	<i>HLA-A</i>	9	5	395	8	16,95	0,00

Закінчення табл. 2

«Ярлик»	Назва гена	Умове позначення гена	Кількість бібліотек з «ярликами»		Кількість «ярликів» в об'єднаному пулі бібліотек, нормалізованих до 1 млн «ярликів»		Надлишок «ярликів» у пухлині порівняно з НГМ	p**
			ГБ	НГМ	ГБ	НГМ		
GCAACAGCAA	Sec61 gamma subunit	<i>SEC61G</i>	9	5	576	12	16,48	0,00
ATCAAGAATC	Interferon, gamma inducible protein 30	<i>IFI30</i>	9	2	185	4	15,87	0,04
GGATATGTGG	Early growth response 1	<i>EGR1</i>	9	3	275	6	15,73	0,01
AATAGAAATT	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	<i>SPP1</i>	8	4	438	11	13,67	0,00
GACTCTTCAG	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 3	<i>SERPINA3</i>	9	5	1239	32	13,30	0,00
GGGCATCTCT	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	<i>HLA-DRA</i>	9	5	814	22	12,71	0,00
AGCAGATCAG	S100 calcium-binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	<i>S100A10</i>	9	4	475	13	12,54	0,00
TTCACTGTGA	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	<i>LGALS3</i>	9	5	386	11	12,04	0,00
TTCTATTTCA	Moesin	<i>MSN</i>	9	5	254	8	10,90	0,05
TGCTGACTCC	Nestin	<i>NES</i>	9	4	284	9	10,83	0,03
GTTCACATTA	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	<i>CD74</i>	9	5	2959	99	10,29	0,00
GTTGTGGTTA	Beta-2-microglobulin	<i>B2M</i>	9	5	2830	95	10,25	0,00
CTCTAAGAAG	Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	<i>C1QA</i>	9	5	882	30	10,10	0,00
TTTGCACCTT	Connective tissue growth factor	<i>CTGF</i>	9	3	435	15	9,95	0,01
GGATGTGAAA	CD99 antigen	<i>CD99</i>	9	5	399	14	9,78	0,02
TAATTTAAAC	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	<i>PTPRZ1</i>	9	5	336	12	9,61	0,04
TGGCCCCAGG	Apolipoprotein C-1	<i>APOC1</i>	9	3	755	27	9,60	0,00
ATGTGAAGAG	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	<i>SPARC</i>	9	5	2717	112	8,35	0,00
ACAAAGCATT	Insulin-like growth factor binding protein 5	<i>IGFBP5</i>	9	5	750	36	7,15	0,04

Примітка. \*NaN означає «not a number», тобто відсутність ярликів гена в пулі НГМ і неможливість ділення на 0; \*\*p — вірогідність.

генів з більш ніж п'ятиразовою різницею в експресії ( $P \leq 0,05$ ) у ГБ порівняно з НГМ.

Чотири нові SAGE-бібліотеки ГБ з'явилися недавно в базі даних SAGE Genie. Крім того, зросла кількість SAGE-бібліотек анапластичних астроцитом, яких тепер налічується 11, та SAGE-бібліотек дифузних астроцитом — тепер вісім бібліотек. В результаті зіставлення взятих разом дев'яти

бібліотек ГБ з п'ятьма об'єднаними бібліотеками НГМ знайдено 199 генних «ярликів» з п'ятиразовою різницею в їхньому розподілі в цих двох пулах ( $P \leq 0,05$ ). Практично всі «ярлики» відповідають відомим нуклеотидним послідовностям GenBank, за винятком двох, для яких не виявлено відповідних відомих транскриптів. Біля 90 % цих відомих нуклеотидних послідовностей є добре охарактери-

Таблиця 3  
Зміни експресії 44 генів на різних стадіях розвитку астроцитарних гліом людини

«Ярлик»	Умовне позначення гена	Кількість бібліотек з «ярликами»				Кількість «ярликів» в об'єднаному пулі бібліотек, нормалізованих до 1 млн «ярликів»				Надлишок «ярликів» у пухлинці порівняно з НГМ		
		НГМ <sup>1</sup>	А <sup>2</sup>	АА <sup>3</sup>	ГБ <sup>4</sup>	НГМ	А	АА	ГБ	А	АА	ГБ
TGGCCCCFGG	APOC1	3	8	11	9	99	836	905	951	9,05	9,12	9,60
GTTGTGGTTA	B2M	5	8	11	9	350	2737	2816	3566	8,43	8,08	10,25
GGGCATCTCT	HLA-DRAH	5	8	11	9	81	605	874	1026	8,02	10,81	12,71
CATATCATTA	IGFBP7	5	8	11	9	48	1176	1154	1498	26,42	24,16	31,42
ATGTGAAGAG	SPARC	5	8	11	9	412	3852	2815	3423	10,07	6,85	8,35
ТААСТСТССТ	SCARA3	3	8	11	9	15	72	108	326	10,38	6,97	20,68
GTTACATTA	CD74	5	8	11	9	364	1630	2015	3727	4,81	5,54	10,29
ТААТТТАААС	PTPRZ1	5	8	11	9	44	292	312	423	7,10	7,08	9,61
GACTCTTCAG	SERPINA3	5	7	11	9	118	485	758	1561	4,44	6,44	13,30
AGCAGATCAG	S100A10	4	8	11	9	48	171	264	599	3,84	5,52	12,54
СТСТААГААГ	C1QA	5	8	11	9	110	253	504	1111	2,46	4,57	10,10
GGATGTGAAA	CD99	5	8	11	9	52	275	380	503	5,73	7,39	9,78
TTCACGTGA	LGALS3	5	8	10	9	40	74	175	486	1,96	4,32	12,04
AGAAAGATGT	ANXA1	5	7	10	9	26	194	256	550	8,07	9,93	21,43
TGGGATTCCC	CHI3L2	0	5	9	9	0	107	133	323	NaN*	NaN*	NaN*
GCTGCCCTTG	TUBA6	3	8	11	9	15	72	108	326	5,23	7,34	22,22
TGCTCCTACC	FCGBP	2	8	11	9	7	49	106	700	7,18	14,44	95,44
ATCTTGTTAC	FN1	3	6	10	9	11	30	116	242	2,91	10,52	21,96
AGAACCTTCC	HLA-A	5	8	11	9	29	224	185	498	8,16	6,30	16,95
TTTGACCTT	CTGF	3	8	11	9	55	229	241	548	4,45	4,37	9,95
AATAGAAATT	SPP1	4	8	11	8	40	211	644	552	5,59	15,94	13,67
GTATGGGCCC	CHI3L1	2	2	6	9	15	18	280	1040	1,33	19,03	70,92
GCAACAGCAA	SEC61G	5	8	11	9	44	51	861	726	1,25	19,53	16,48
TCACCAAAAA	STAB1	1	7	11	8	7	46	51	219	6,71	6,97	29,85
GCCCTTCTC	MRC2	1	7	9	9	7	44	40	200	6,40	5,38	27,28
ATCCTGAGTT	HLA-DQB1	1	7	11	9	4	46	77	158	13,42	21,05	42,89
AGTACCTTAT	EGFR	1	7	10	8	4	44	68	205	12,80	18,35	55,93
CCACAGGGGA	COL3A1	0	2	3	8	0	3	5	213	NaN*	NaN*	NaN*
AGTGGTGGCT	FMOD	0	5	5	9	0	9	16	183	NaN*	NaN*	NaN*
GTCAACAGTA	ABCC3	0	3	7	8	0	4	14	130	NaN*	NaN*	NaN*
TTAAATAGCA	SERP1	0	1	1	6	0	1	1	176	NaN*	NaN*	NaN*
ACCAAAAACC	COL1A1	2	4	2	8	22	4	12	1418	0,21	0,53	64,42
GACCACCTTT	MFAP2	1	2	5	7	4	2	9	193	0,62	2,45	52,50
GAAATAAAGC	IGHG1	3	4	6	6	18	26	13	762	1,50	0,69	41,54
TTTGGTTTTTC	COL1A2	2	2	5	8	18	4	11	667	0,25	0,59	36,32
GCCAACAACG	NNMT	2	3	6	9	7	10	23	193	0,94	3,06	26,25
CTTGGGTTTT	C11orf43	3	5	3	9	15	74	15	364	5,38	1,04	24,80
ATCAAGAATC	IFI30	2	5	9	9	15	142	103	304	1,56	4,04	15,87

Закінчення табл. 3

«Ярлик»	Умовне позначення гена	Кількість бібліотек з «ярликами»				Кількість «ярликів» в об'єднаному пулі бібліотек, нормалізованих до 1 млн «ярликів»				Надлишок «ярликів» у пухлині порівняно з НГМ		
		НГМ <sup>1</sup>	А <sup>2</sup>	АА <sup>3</sup>	ГБ <sup>4</sup>	НГМ	А	АА	ГБ	А	АА	ГБ
TGCTGACTCC	NES	4	8	11	9	33	142	116	358	4,61	3,51	10,83
ACAAAGCATT	IGFBP5	5	8	11	9	132	311	270	945	2,52	2,04	7,15
TTCTATTCSA	MSN	5	8	10	9	29	128	82	320	4,68	2,78	10,90
ACATTCTTTT	GPNUMB	1	5	11	9	7	452	63	455	65,90	7,22	61,95
ATAATAAAGC	RARRES2	1	8	7	9	7	117	71	258	17,02	9,67	35,17
GGATATGTGG	EGR1	3	8	11	9	22	351	177	347	17,07	8,04	15,73

П р и м і т к а. <sup>1</sup>Нормальний головний мозок; <sup>2</sup>астроцитом; <sup>3</sup>анапластична астроцитом; <sup>4</sup>гліобластома; \*NaN означає «not a number», тобто відсутність ярликів гена в пулі НГМ і неможливість ділення на 0.

зованими мРНК, інші — неохарактеризованими ESTs (expressing sequence tags — «ярлики» експресованих послідовностей). Нуклеотидні послідовності, які відповідають «ярликам» з більш ніж п'ятиразовим надлишком у групі гліобластом порівняно з групою НГМ, можна позначити як «надекспресовані в пухлинах», а ті, що відповідають «ярликам» з більш ніж п'ятиразовим надлишком у групі НГМ стосовно групи гліобластом — як «надекспресовані в нормальному головному мозку».

«Ярлики» для генів гіпотетичних білків, невідомих кДНК, мітохондріальних генів, а також «ненадійні ярлики», тобто внутрішні, розташовані всередині мРНК на додаток до справжнього «ярлика», було виключено з аналізу. Отже, п'ятиразові зміни експресії в гліобластомах виявлено загалом для 129 генів, 44 з яких відповідають критерію «надекспресовані в пухлинах». Їх представлено в табл. 2. Якщо коефіцієнт зміни експресії вибрати менше п'яти, то кількість «надекспресованих в пухлинах» генів зростає, але суттєвіше біологічне значення, напевне, мають гени з більш істотними змінами в рівні експресії. Представники цієї групи генів з високою вірогідністю залучені до розвитку гліом [10, 11], тому ми зосередили увагу саме на вивченні генів, які надекспресуються в пухлинах.

Наше дослідження базується на наявних у цей час SAGE-бібліотеках в базі даних SAGE Genie — дев'яти бібліотеках ГБ дорослих пацієнтів, 11 бібліотеках АА, восьми бібліотеках дифузних астроцитом і п'яти бібліотеках НГМ. Звичайно, розширення наборів бібліотек може призвести до деяких варіацій у картині експресії генів. Однак зіставлення результатів, наведених у цій роботі, з результатами, отриманими раніше при порівнянні п'яти SAGE-бібліотек гліобластом з двома SAGE-

бібліотеками НГМ [9] не виявило драматичних розходжень у переліку генів, які диференційно експресуються.

При порівнянні взятих разом 11 SAGE-бібліотек АА з п'ятьма SAGE-бібліотеками НГМ за тих же умов аналізу (більш ніж п'ятиразова різниця в розподілі «ярликів» та поріг вірогідності  $P \leq 0,05$ ) загальна кількість «ярликів» з п'ятиразовою різницею в розподілі була менша (118 «ярликів»), ніж при порівнянні гліобластом та НГМ. Для п'яти «ярликів» не виявлено відповідних відомих транскриптів, інші представляють собою добре охарактеризовані мРНК та неохарактеризовані ESTs. Після вилучення «ярликів», які відповідають генам гіпотетичних білків, невідомим кДНК, мітохондріальним генам, а також «ярликів», які є «ненадійними», загальна кількість генів, експресія яких змінюється в АА порівняно з НГМ, становила 66, з них 18 генів були з підвищеним рівнем експресії. При порівнянні взятих разом восьми SAGE-бібліотек дифузних астроцитом з п'ятьма SAGE-бібліотеками НГМ п'ятиразову різницю знайдено для 83 «ярликів», з яких два «ярлики» не мали відповідних відомих нуклеотидних послідовностей. Після відповідної обробки результатів виявлено 42 гени із зміненою більш ніж у 5 разів експресією в дифузних астроцитомах, з яких 16 генів підвищували свою експресію.

Одержані результати вказують на те, що кількість генів, експресія яких активована в астроцитарних гліомах, збільшується із злоякісною прогресією пухлин. Деякі експресійні зміни виявляються на ранній стадії формування астроцитом і спостерігаються на вищому рівні у більш злоякісних астроцитомах (табл. 3). Експресія генів *APOC1*, *B2M*, *HLA-DRA*, *IGFBP7* і *SPARC* (виді-

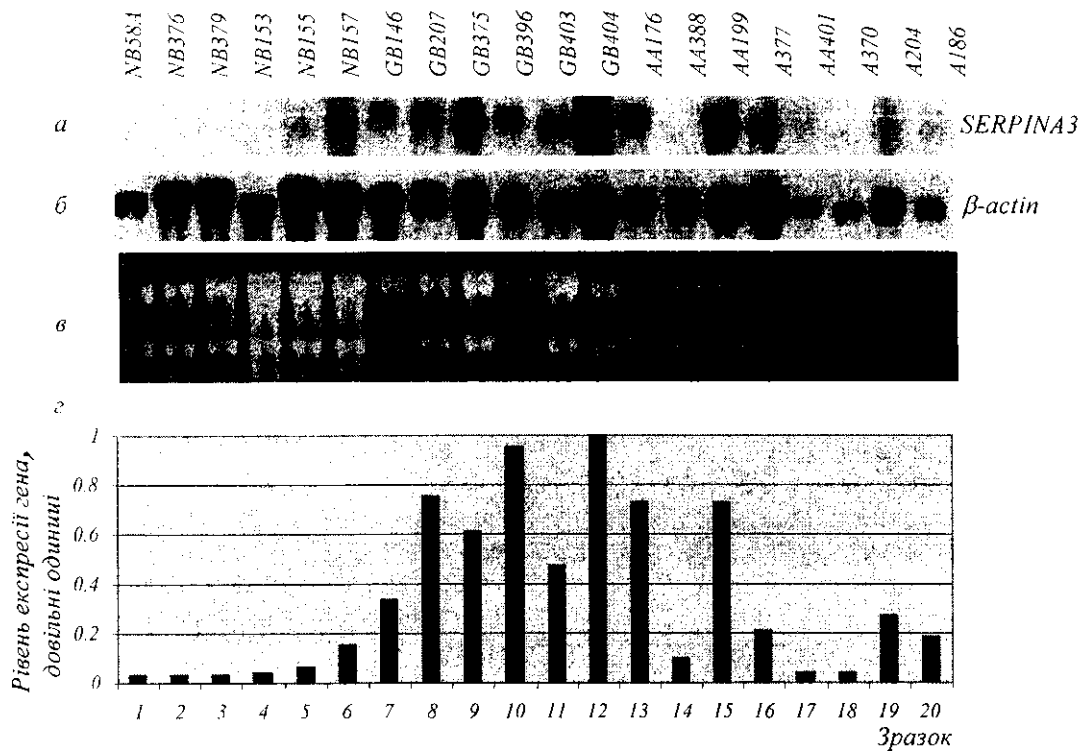


Рис. 1. Аналіз експресії гена *SERPINA3* в гліальних пухлинах. Нозерн-гібридизація панелі РНК з  $^{32}\text{P}$ -міченою пробєю кДНК *SERPINA3* (а) та контрольною пробєю кДНК  $\beta$ -актину (б); в — фотографія агарозного гелю, забарвленого бромистим етидієм; г — діаграма, яка показує відносний рівень експресії гена. Типи тканин і види пухлин позначено над кожною доріжкою блоту, числа в дужках означають умовний номер зразка РНК. *NB* — нормальний головний мозок людини; *GB* — гліобластома; *AA* — анапластична астрочитома; *A* — астрочитома

лені жирним шрифтом у табл. 3) підвищується в дифузних астрочитомах і детектується приблизно на тому ж рівні на наступних стадіях розвитку астрочитом. Для деяких генів експресійні зміни характерні лише для найзлоякіснішої форми — гліобластоми (виділені курсивом у табл. 3). Не зовсім зрозумілим є зменшений рівень експресії деяких генів (вони розташовані внизу табл. 3) в *AA* порівняно з дифузними астрочитомами та *GB*, у яких він набагато вищий, ніж у НГМ. Можливо, значний ріст експресії цих генів характерний лише для певної групи пухлин і є відображенням специфічного шляху їхнього розвитку.

Для підтвердження результатів *SAGE* та оцінки рівнів експресії генів у незалежних наборах зразків гліальних пухлин та НГМ ми довільно відібрали вісім «надекспресованих у пухлинах» транскриптів і провели аналіз їхньої експресії за допомогою Нозерн-гібридизації. Відібрані гени мають достатній рівень експресії для визначення цим методом, і хоча Нозерн-гібридизація менш чутлива, ніж зворотна транскрипція—полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР), вона має перевагу в тому, що дозволяє визначити не лише відносний рівень транскрипції гена, але й розміри можливих альтернативних транскриптів.

Загалом картини експресії генів були відтво-

рюваними для проаналізованих зразків пухлин і НГМ. Кожен з восьми відібраних генів мав суттєво вищий рівень експресії в зразках *GB*, ніж у зразках НГМ (рис. 1—3). Важливо відмітити варіації в рівні експресії генів в індивідуальних зразках пухлин, що може пояснюватися гетерогенністю біологічних властивостей пухлин, яку відзначено раніше [12, 13]. У дифузних та анапластичних астрочитомах експресія генів варіює в широких межах для різних генів — у деяких пухлинах рівні експресії генів майже такі ж високі, як у гліобластомах, у деяких — значно нижчі, а в інших — експресія генів відсутня, як у НГМ.

Якщо подивитися на комбінації рівнів експресії хоча б чотирьох генів для пухлин однакового ступеня злоякісності (рис. 3), то окремі пухлини можна об'єднати в певні групи. Наприклад, гліобластоми можна розділити на дві групи відносно рівня експресії гена *SEC61G*. Анапластичні астрочити *AA401* і *AA394* мають подібний профіль експресії, *AA230* і *AA416* також схожі між собою. Картина гібридизаційних сигналів для *AA199* подібна до такої гліобластоми *GB450*. Можливо, це свідчить про агресивніший характер розвитку цієї анапластичної астрочити. Звичайно, профілі експресії пухлин не можна характеризувати на основі аналізу експресії чотирьох генів, однак одночасний



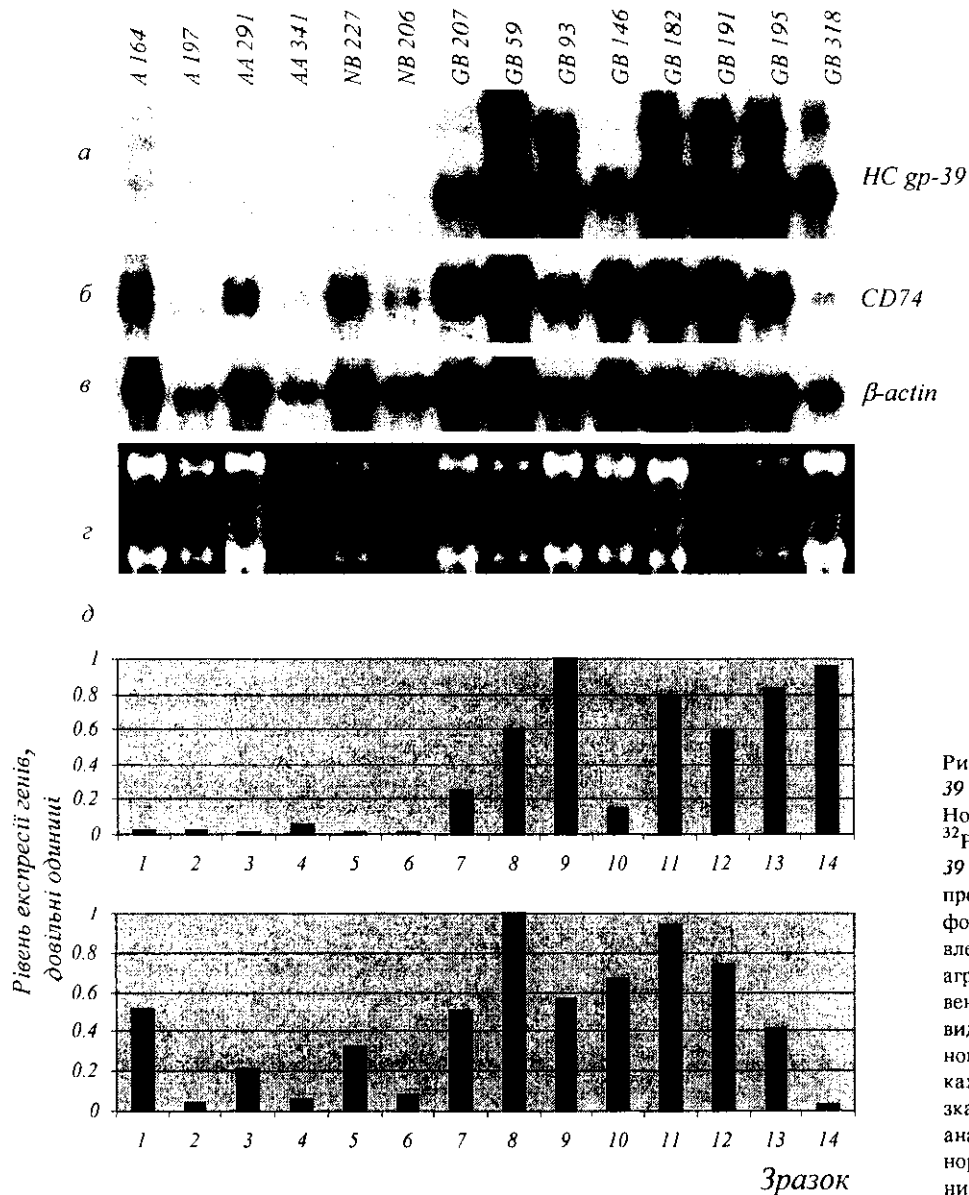


Рис. 2. Аналіз експресії генів *HCgp-39* і *CD74* в гліальних пухлинах. Нозерн-гібридизація панелі РНК з  $^{32}\text{P}$ -міченою пробою кДНК *HCgp-39* (а), *CD74* (б) та контрольною пробою кДНК  $\beta$ -актину (в); г — фотографія агарозного гелю, забарвленого бромистим етидієм; д — діаграма, яка показує відносний рівень експресії генів. Типи тканин і види пухлин позначено над кожною доріжкою блоту, числа в дужках означають умовний номер зразка РНК. А — астроцитом; АА — анапластична астроцитом; NB — нормальний головний мозок людини; GB — гліобластома

аналіз декількох десятків генів у великій кількості зразків індивідуальних пухлин повинен виявити певні молекулярні варіанти, що мають однаковий гістопатологічний діагноз, і об'єднати пухлини в окремі групи, які відображають ті чи інші клінічні особливості захворювань.

Таким чином, злоякісна прогресія астроцитарних гліом супроводжується поступовим накопиченням експресійних змін. Повторення цих змін в астроцитомах різного ступеня анаплазії свідчить про те, що вони не є випадковими, а напевне, віддзеркалюють специфічні біохімічні процеси в пухлинних клітинах. Рівень експресії більшості «надекспресованих у пухлинах» генів поступово

підвищується при прогресії астроцитом і є найвищим у ГБ. Можна бачити, що існує обмежена кількість генів, експресія яких активована більш ніж у 5 разів на всіх етапах розвитку астроцитом або принаймні на двох останніх, найзлоякісніших стадіях розвитку.

При порівнянні експресійних профілів пухлин ці гени можуть слугувати для розпізнавання більш злоякісних варіантів пухлин. Експресійні зміни генів, характерні лише для ГБ, можуть бути використані для їхнього розпізнавання. Взагалі, аналіз експресії таких генів може бути одним із основних методів при розпізнаванні гліальних пухлин з різним ступенем злоякісності, можливо, для ранньої

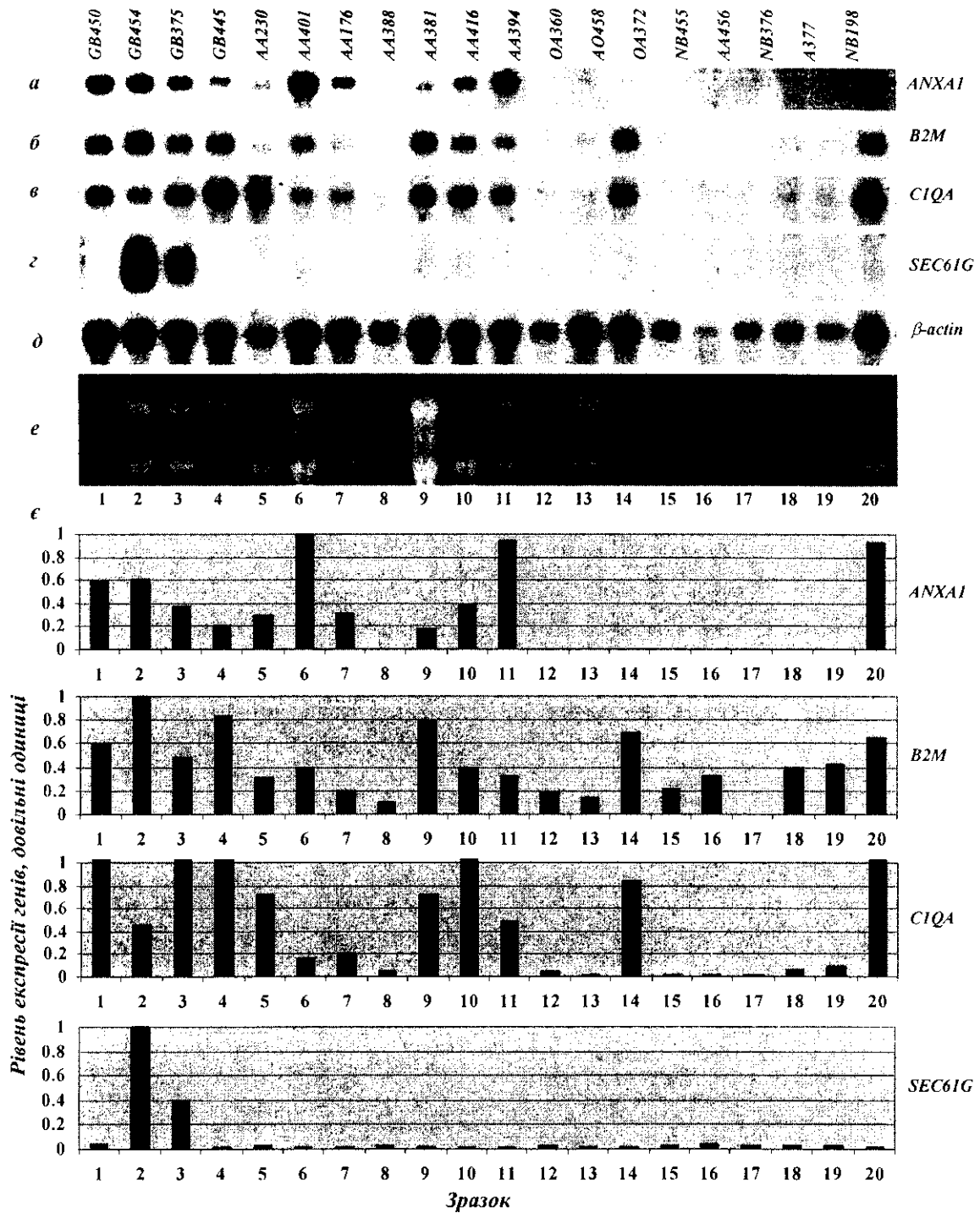


Рис. 3. Аналіз експресії генів *ANXA1*, *B2M*, *CIQA* і *SEC61G* у гліальних пухлинах. Нозерн-гібридизація панелі РНК з  $^{32}$ P-міченою пробою кДНК *ANXA1* (а), *B2M* (б), *CIQA* (в), *SEC 1G* (г) та контрольною пробою кДНК  $\beta$ -актину (д); е — фотографія агарозного гелю, забарвленого бромистим етидієм. с — діаграма, яка показує відносний рівень експресії генів. Типи тканин і види пухлин позначено над кожною доріжкою блоту, числа в дужках означають умовний номер зразка РНК. *GB* — гліобластома; *AA* — анапластична астроцитома; *A* — астроцитома; *OA* — олигоастроцитома; *AO* — анапластична олигодендрогліома; *NB* — нормальний головний мозок людини

діагностики, прогностичних цілей та антиракової терапії.

Роботу частково профінансовано Державним фондом фундаментальних досліджень, проект № Ф7.282-2001, Національною академією наук України в рамках програми «Новітні медико-біологічні проблеми та оточуюче середовище людини» та NATO Collaborative Linkage Grant No. 977284.

V. V. Dmytrenko, O. I. Boyko, C. O. Shostak, O. E. Symyrenko, T. V. Bukreyeva, V. D. Rozumenko, T. A. Malysheva, M. I. Shamaev, Y. P. Zozulya, V. M. Kavsan

Overexpression of genes at different stages of astrocytic glioma development

Summary

Public database of Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) was used for identification of potential human astrocytic glioma molecular markers. The comparison of nine glioblastoma SAGE-libraries, eleven anaplastic astrocytoma SAGE-libraries, eight diffuse astrocytoma SAGE-libraries, and five human normal brain SAGE-libraries revealed 57 genes with more than 5-fold increase of expression in astrocytic gliomas ( $P \leq 0.05$ ) comparing to the human normal brain. Besides the genes expression changes which occur at the early stage of astrocytomas formations and are revealed also during the subsequent stages of progression, some changes are characteristic only of highly malignant stages of tumor development while they are absent in the tumors of low stage of malignancy. The analysis of revealed genes expression can be used for glial tumor molecular classification, diagnosis, prognostic evaluation and determination of potential targets for anticancer therapy.

Key words: SAGE, differential expression, astrocytic glioma, molecular markers.

В. В. Дмитренко, О. І. Бойко, Е. А. Шостак, О. Е. Симиренко, Т. В. Букреева, В. Д. Розуменко, Т. А. Мальшева, М. І. Шамаев, Ю. А. Зозуля, В. М. Кавсан

Суперекспрессия генов на разных стадиях развития астроцитарных глиом

Резюме

Публичная база данных по серийному анализу генной экспрессии (SAGE) использована для идентификации потенциальных молекулярных маркеров астроцитарных глиом человека. При сравнении девяти SAGE-библиотек глиобластом, 11 SAGE-библиотек анапластических астроцитом, восьми SAGE-библиотек диффузных астроцитом и пяти SAGE-библиотек нормального головного мозга было выявлено 57 генов, уровень экспрессии которых был более чем в 5 раз выше ( $P \leq 0,05$ ) в астроцитарных глиомах по сравнению с нормальным головным мозгом. Кроме изменений экспрессии генов, которые происходят на ранней стадии формирования астроцитом и выявляются также на последующих этапах их развития, некоторые изменения характерны лишь для высокозлокачественных стадий развития опухоли и отсутствуют в опухолях низкой степени злокачественности. Анализа экспрессии выявленных генов может быть использован для молекулярной классификации глиальных опухолей, диагностики, прогностической оценки опухолей и определения потенциальных мишеней противопухоловой терапии.

Ключевые слова: SAGE, дифференциальная экспрессия, астроцитарные глиомы, молекулярные маркеры.

PERELIK LITERATURI

1. Kleihues P., Louis D. N., Scheithauer B. W., Rorke L. B., Reifenberger G., Burger P. C., Cavenee W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system // J. Neuropathol. Exp. Neurol.—2002.—61.—P. 215—225.
2. Watanabe T., Nakamura M., Kros J. M., Burkhard C., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas // Acta Neuropathol.—2002.—103.—P. 267—275.
3. Okamoto Y., Di Patre P. L., Burkhard C., Horstmann S., Jourde B., Fahey M., Schuler D., Probst-Hensch N. M., Yasargil M. G., Yonekawa Y., Lutolf U. M., Kleihues P., Ohgaki H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas // Acta Neuropathol.—2004.—108.—P. 49—56.
4. Negm R. S., Verma M., Srivastava S. The promise of biomarkers in cancer screening and detection // Trends Mol. Med.—2002.—8.—P. 288—293.
5. Huang H., Okamoto Y., Yokoo H., Heppner F. L., Vital A., Fevre-Montange M., Jouve A., Yonekawa Y., Lazaridis E. N., Kleihues P., Ohgaki H. Gene expression profiling and subgroup identification of oligodendrogliomas // Oncogene.—2004.—23.—P. 6012—6022.
6. Shai R., Shi T., Kremen T. J., Horvath S., Liau L. M., Cloughesy T. F., Mischel P. S., Nelson S. F. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas // Oncogene.—2003.—22.—P. 4918—4923.
7. Shostak K., Labunskyy V., Dmitrenko V., Malysheva T., Shamayev M., Rozumenko V., Zozulya Y., Zehetner G., Kavsan V. HC gp-39 gene is upregulated in glioblastomas // Cancer Lett.—2003.—198.—P. 203—210.
8. Dmitrenko V., Shostak K., Boyko O., Khomenko O., Rozumenko V., Malysheva T., Shamayev M., Zozulya Y., Kavsan V. Reduction of the transcription level of the mitochondrial genome in human glioblastoma // Cancer Lett.—2005.—218.—P. 99—107.
9. Kavsan V., Shostak K., Dmitrenko V., Chausovskiy T., Zozulya Y., Demotes-Mainard J. Peculiarities of molecular events in human glial tumors revealed by serial analysis of gene expression (SAGE) // Exp. Oncol.—2004.—26.—P. 196—204.
10. Loding W. T., Lal A., Siu J. M., Loney T. L., Wikstrand C. J., Marra M. A., Prange C., Bigner D. D., Strausberg R. L., Riggins G. J. Identifying potential tumor markers and antigens by database mining and rapid expression screening // Genome Res.—2000.—10.—P. 1393—1402.
11. Ljubimova J. Y., Lakhter A. J., Loksh A., Yong W. H., Riedinger M. S., Miner J. H., Sorokin M. L., Ljubimov A. V., Black K. L. Overexpression of i4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis // Cancer Res.—2001.—61.—P. 5601—5610.
12. Cheng Y., Ng H. K., Ding M., Zhang S. F., Pang J. C., Lo K. W. Molecular analysis of microdissected de novo glioblastomas and paired astrocytic tumors // J. Neuropathol. Exp. Neurol.—1999.—58.—P. 120—128.
13. Zhang L., Zhou W., Velculescu V. E., Kern S. E., Hruban R. H., Hamilton S. R., Vogelstein B., Kinzler K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells // Science.—1997.—276.—P. 1268—1272.

УДК 577.21:577.214.622  
Надійшла до редакції 28.05.04