

АБЕРРАНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *sox2* В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМАХ

© А. В. Волницкий,¹ Е. В. Семенова,¹ Т. А. Штам,¹
Р. А. Ковалев,¹ М. В. Филатов^{1, 2, *}

¹ С.-Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
(НИЦ Курчатовский институт), Гатчина,
² С.-Петербургский государственный политехнический университет;
* электронный адрес: *fil_53@mail.ru, filatov@omrb.pnpi.spb.ru*

Эпигенетические нарушения, так же как и генетические, отражают механизмы инициации опухолевого процесса и его прогрессию. Представленная работа посвящена исследованию экспрессии и эпигенетической регуляции гена *sox2* в первичных культурах клеток злокачественных глиом. Экспрессия *sox2* обнаружена в абсолютном большинстве (74 %) исследованных глиом и отсутствовала в морфологически нормальной ткани головного мозга, что указывает на связь транскрипционной активности гена *sox2* с малигнизацией клеток. Показано, что ассоциация различных участков гена *sox2* с важными эпигенетическими маркерами — посттрансляционными модификациями гистона H3 (H3K4ac и H3K9met3) — не коррелирует с экспрессией *sox2*, однако может указывать на стохастический характер регуляции экспрессии гена *sox2* в злокачественных глиомах.

Ключевые слова: аберрантная экспрессия генов, глиомы, посттрансляционные модификации гистона H3, Sox2.

Принятые сокращения: ИФА — иммуноферментный анализ, ОТ-ПЦР — обратная транскрипционная полимеразная цепная реакция, ChIP — иммунопреципитация хроматина, H3K4ac — ацетилирование гистона H3 по четвертому остатку лизина, H3K9met3 — метилирование гистона H3 по девятому остатку лизина.

Ген *sox2* поддерживает плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток и участвует в развитии нервной системы (Noisa et al., 2012). Транскрипционный фактор Sox2 связывается со специфической последовательностью по малой бороздке ДНК и стабилизирует связывание с ДНК других транскрипционных факторов, например Oct4, в эмбриональных стволовых клетках (Rizzino, 2009). Экспрессия гена *sox2* в соматических клетках здорового взрослого организма практически отсутствует. Но он входит в число генов, необходимых для перепрограммирования соматических клеток в стволовые (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Существенное изменение экспрессионного профиля *sox2* зафиксировано в различных опухолях, включая злокачественные глиомы (Annovazzi et al., 2011). Установлено, что мультиформные глиобластомы обнаруживают высокий уровень экспрессии *sox2* по сравнению со здоровыми тканями, включая различные отделы головного мозга (Schmitz et al., 2007).

Показано, что Sox2 поддерживает вхождение опухолевых клеток в S-фазу клеточного цикла (Orpel et al., 2011), участвует в процессах инвазии и миграции клеток глиом (Kong et al., 2008; Alonso et al., 2011; Orpel et al., 2011). Нокдаун *sox2* приводит к значительному снижению пролиферации клеток глиом и их способности образовывать опухоли в мозге иммунодефицитных мышей

(Gangemi et al., 2009), значительно повышает чувствительность клеток к комбинации ингибиторов рецепторов PDGF и IGF—1 (Hagerstrand et al., 2011). Идентифицировано значительное количество генов, экспрессия которых изменяется при нокдауне *sox2*, а также определен круг белков, взаимодействующих с Sox2 в глиомах (Fang et al., 2011a, 2011b).

Представленная работа посвящена исследованию экспрессии и эпигенетической регуляции гена *sox2* в злокачественных глиомах. Используя методы ОТ-ПЦР в реальном времени и иммуноферментный анализ (ИФА), мы проанализировали экспрессию гена *sox2* в перевиваемой клеточной линии глиобластомы A-172 и 18 первичных культурах злокачественных глиом. Мы сравнили данные экспрессионного анализа шести из этих глиом с эпигенетическими показателями транскрипционной активности — посттрансляционными модификациями гистона H3 H3K4ac (маркера активно транскрибируемого хроматина) и H3K9met3 (маркера транскрипционной инертности).

Материал и методика

Клеточные линии, первичные культуры и образцы ткани головного мозга. Использовано 19 глиом, включая перевиваемую клеточную линию

Таблица 1

**Последовательности праймеров и флуоресцентномеченного зонда
для идентификации экспрессии генов *sox2* и *GAPDH***

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд (FAM-BHQ1)
<i>sox2</i>	ATGAGAGAGATCTGGACTT	TCGCTTGGAGACTAGCTCT	TGGACCTTGTATAGATCTGGAGGA
<i>GAPDH</i>	CATGGGTGTGAACCATGAGAA	GGTCATGAGTCCTCCACGAT	AACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCT

A-172 из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и 18 первичных культур, полученных в нашей лаборатории из хирургического материала пациентов с глиобластомами и анапластическими астроцитомами (3-я и 4-я степени злокачественности по классификации ВОЗ). Для выращивания клеток использовали смесь сред DMEM и F-12 (1 : 1), содержащую и 10 % сыворотки крови плодов коровы (Биолот, Россия).

Кроме того, исследовали несколько образцов ткани головного мозга, включая эпендимому, объемное образование мозолистого тела мозга и образец морфологически нормальной ткани мозга. Все процедуры, связанные с получением биопсийного материала во время хирургических операций, осуществляемых в плановом порядке по медицинским показаниям, были выполнены в Российском научно-исследовательском нейрохирургическом институте им. А. Л. Поленова (РНХИ, Санкт-Петербург). Протокол и дизайн исследования были одобрены ученым советом и Этическим комитетом РНХИ. Все пациенты предоставили информированное согласие перед проведением хирургического вмешательства.

Выделение общей РНК и ОТ-ПЦР в режиме реального времени (TaqMan). Анализ экспрессии гена *sox2* с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени производили в соответствии со стандартными требованиями к этому методу (Bustin et al., 2009, 2010).

Общую РНК выделяли из 2 млн клеток с помощью набора The Aurum total RNA minikit (BioRad, США) и ДНКазы I для деградации геномной ДНК, а обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали смесь олиго-dT и случайных гексамеров, предложенную фирмой-производителем.

Реакционная смесь для ПЦР является однократным Tris-буфером для Taq-полимеразы (pH 8.6) и содержит 1 mM MgCl₂, 0.05 ед./мкл Taq-полимеразы (Силекс, Россия), по 250 мкМ каждого dNTP, 300 нМ прямого и обратного праймеров, 300 нМ флуоресцентномеченного зонда (Синтол, Россия) и 40 нг/мл кДНК.

Реакцию проводили в 50 мкл смеси на детектирующем амплификаторе ДТ-322 в течение 45 циклов. В каждом цикле денатурацию двухнитевой ДНК осуществляли при 95 °C в течение 15 с, а отжиг праймеров и амплификацию — при 60 °C в течение 1 мин. Определение пороговых циклов и расчет относительных уровней экспрессии гена *sox2* производили с помощью программы Real-Time_PCR v7.3 (НПО ДНК-Технология, Россия).

Конструкции праймеров и флуоресцентномеченных зондов для идентификации экспрессии генов *sox2* и *GAPDH* (Kreth et al., 2010; Gresner et al., 2011) приведены в табл. 1.

Иммуноферментный анализ экспрессии гена *sox2* с использованием коммерческих моноклональных мышинных антител к белку Sox2. Уровень экспрессии *sox2* оценивали по уровню содержания белка Sox2, выявляемого с помощью иммуноферментного анализа электрофоретически разделенных и иммобилизованных на мембране PVDF белков исследуемых клеток. Для этого (1—2) · 10⁶ клеток снимали смесью растворов Версена и Трипсина (2 : 1) и дважды промывали раствором PBS. Число клеток в каждой пробе подсчитывали для дальнейшего выравнивания нагрузки дорожек и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин с лизирующим буфером (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 % Тритона X-100, 5 mM PMSF, 5 mM MgCl₂, 5 ед./мл ДНКазы I и 20 mM β-меркаптоэтанола). Полученные клеточные лизаты кипятили в течение 5 мин в стандартном буфере для нанесения (0.25M Tris, pH 6.8, 8 % SDS, 40 % глицерина, 20 % β-меркаптоэтанола и 0.2 % бромфенолового синего). Электрофоретическое разделение белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0.1 % SDS, с последующим переносом белков на мембрану PVDF. Визуализацию белка Sox2 на мембране осуществляли методом голубой сухой Вестерн (Naryzhny, 2009) с помощью моноклональных мышинных антител (Upstate, США) в разведении 1 : 1000 и с последующей инкубацией с антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США), которые выявляли методом усиленной хемилюминесценции (Pierce). В качестве стандартного контроля за выравниванием нагрузки дорожек на мембране параллельно визуализировали белок GAPDH, используя моноклональные мышинные антитела (Clone: ZG003) (Zymed®, Австрия) в разведении 1 : 10 000.

Иммунопреципитация хроматина (ChIP) и ПЦР-анализ. В каждом эксперименте использовали хроматин, полученный из 3 млн клеток. С целью образования ковалентных сшивок между ДНК и гистонами клетки 10 мин инкубировали с 1%-ным формальдегидом при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2.5 M глицина (1/20 объема реакционной смеси) с последующей инкубацией на льду в течение 20 мин. Клетки 5 мин осаждали центрифугированием (1500 g) при 4 °C и дважды промывали в холодном растворе PBS. После этого клетки последовательно инкубировали по 10 мин в промывочных растворах 1 (0.25 % Тритона X-100, 10 mM EDTA и 10 mM Hepes, pH 7.5) и 2 (0.2 M NaCl, 1.5 M EDTA и 10 mM Hepes, pH 7.5), содержащих ингибиторы протеаз — PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (Thermo scientific, США). Затем в течение 20 мин клетки лизировали на льду в 600 мкл буфера, содержащего 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 % Тритона X-100, 0.1 % SDS, 0.5 % дезоксихолата натрия и ингибиторы протеаз. Лизат «озвучивали» на дезинтеграторе УЗДН-2Т (Россия) 8 × 10 с, после чего центрифугировали при 13 000 g в течение 15 мин при

Таблица 2

Последовательности праймеров и флуоресцентномеченного зонда для идентификации ассоциации различных участков гена *sox2* с модификациями гистона H3 H3K4ac и H3K9me3 (в направлении от 5'-к 3'-концу)

Участок гена <i>sox2</i>	Прямой праймер	Обратный праймер
21—194	GTATCAGGAGTTGTCAAGGC	CGCCGCCGATGATTGTTATT
363—610	CCAAAGTCCC GCCGGCCGAGG	CTGGGCCATCTTGC GCCGCTG
1609—1819	ATGAGAGAGATCCTGGACTT	TCGCTTGGAGACTAGCTCT
Зонд (FAM-BHQ1)		
21—194	GACTAGGACTGAGAGAAAGAAGAG	
1609—1819	TGGACCTTGTATAGATCTGGAGGA	

4 °С. Супернатант разводили в соотношении 1 : 5 буфером, содержащим 25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 % Тритона X-100 и ингибиторы протеаз, и делили на 3 равные части. Первую часть использовали в качестве негативного контроля, ко второй части добавляли антитела к H3K9me3 (Upstate, США), к третьей — антитела к H3K4ac (Upstate, США) и при постоянном вращении инкубировали ночь при 4 °С. Затем иммунокомплексы адсорбировали на протеин-А-агарозу и после нескольких промывок агарозу инкубировали с РНКазой (конечная концентрация 50 мкг/мл) в течение 1 ч при 37 °С. Иммунокомплексы элюировали буфером, содержащим 1 % SDS и 0.1 М NaHCO₃, после чего разрушали сшивки меж-

ду ДНК и гистонами, инкубируя элюаты в течение 6 ч при 65 °С в присутствии 200 мМ NaCl. После обработки элюатов в течение 1 ч при 45 °С протеиназой К (Fisher, США) (конечная концентрация 100 мкг/мл), осуществляли экстракцию ДНК смесью фенола с хлороформом с последующим осаждением этанолом по стандартной методике. Выделенную ДНК растворяли в 20 мкл H₂O и исследовали с помощью обычной ПЦР и ПЦР в реальном времени (условия те же, что в уже описанном выше методе ОТ-ПЦР в реальном времени).

ПЦР проводили в 20 мкл смеси, содержащей 62 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1.5 мМ MgCl₂, 35 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.15 % Тритона X-100, 0.01 мМ EDTA, 0.1 мМ DTT, 5 % глицерина, по 250 мМ каждого dNTP (Медиген, Россия), 10 пМ прямого и обратного праймеров (Синтол, Россия), 5 мкл ДНК, выделенной в процессе ChIP, и 1 ед. Taq-полимеразы (СибЭнзим, Россия). Амплификацию проводили на амплификаторе Терцик (Россия) в следующем температурном режиме: (94 °С — 240 с) + (94 °С — 45 с, 60 °С — 30 с, 72 °С — 60 с) × 30 + (72 °С — 300 с). ПЦР-продукты разделяли электрофоретически в 6%-ном акриламидном геле. Фрагменты ДНК визуализировали с помощью окрашивания азотно-кислым серебром (AgNO₃).

Последовательности праймеров и флуоресцентномеченных зондов для идентификации различных участков гена *sox2* приведены в табл. 2.

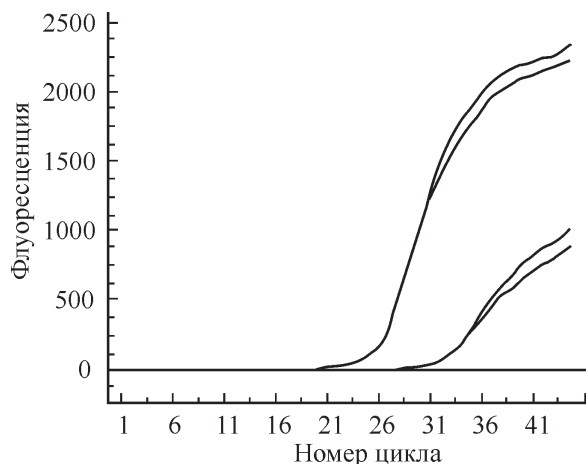


Рис. 1. Кинетические кривые генов *sox2* (2 дубля справа) и *GAPDH* (2 дубля слева), полученные для одной из глиом методом ОТ-ПЦР.

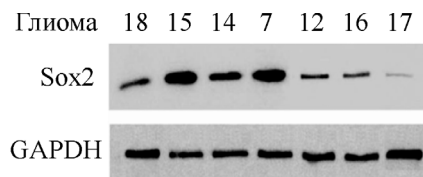


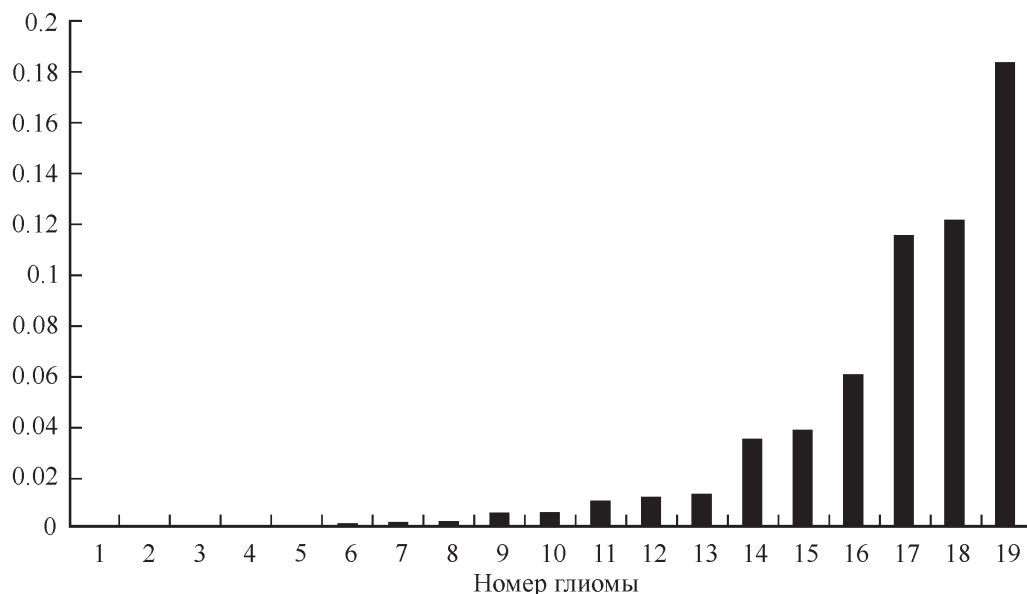
Рис. 2. Уровни белка Sox2 по отношению к уровням белка GAPDH в культурах злокачественных глиом под номерами 18, 15, 14, 7, 12, 16 и 17 на фотографии одного из иммуноблотов.

ИФА с использованием моноклональных мышиных антител к белкам Sox2 и GAPDH. Номера тех же глиом показаны на рис. 3.

Результаты

Экспрессия гена *sox2* в злокачественных глиомах. Экспрессию исследовали методами ОТ-ПЦР в реальном времени и иммуноферментного анализа в 19 глиомах, включая 18 первичных культур и клеточную линию A-172. На рис. 1 приведен пример кинетических кривых генов *sox2* и *GAPDH*, полученных для одной из глиом методом ОТ-ПЦР в реальном времени, а на рис. 2 показана фотография одного из иммуноблотов, визуализирующая уровень белка Sox2 по отношению к уровню GAPDH для 7 глиом.

Количественный анализ экспрессии *sox2* проводили по данным ОТ-ПЦР с использованием программы RealTime_PCR v7.3 (НПО ДНК-Технология, Россия). Результаты представлены в виде соотношения транскрипционных уровней генов *sox2* и *GAPDH* на рис. 3. Видно, что экспрессия *sox2* не обнаружена в 5 глиомах (1—5), а в остальных глиомах (6—19) варьирует в широком диапазоне.

Рис. 3. Экспрессия гена *sox2* в злокачественных глиомах.

Количественный анализ по данным ОТ-ПЦР. По вертикали — соотношение транскрипционных уровней генов *sox2* и *GAPDH*.

Для сравнения с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени экспрессию *sox2* проверили в образце морфологически нормальной ткани мозга, окружавшей одну из глиом, и в двух образцах опухолей, не относящихся к глиомам, включая эпендимому и объемное образование мозолистого тела мозга. Экспрессия *sox2* в этих образцах по отношению к максимальному уровню экспрессии *sox2* в исследованных глиомах показана на рис. 4. Видно, что в морфологически нормальных клетках мозга нет экспрессии *sox2*, тогда как в опухолях менее злокачественных, чем глиомы, уровень экспрессии *sox2* значительно выше, чем в исследованных глиомах.

Анализ ассоциации различных участков гена *sox2* с модификациями гистона H3 (H3K4ac и H3K9met3) в злокачественных глиомах. Для дальнейшего исследования выбрали 6 хорошо растущих первичных культур клеток злокачественных глиом (2, 12, 14, 15, 17 и 18 на рис. 3), демонстрирующих различные экспрессионные уровни *sox2*, из которых только у глиомы 2 не зафиксирована экспрессия *sox2*. Из клеток этих культур методом ChIP были получены фракции, содержащие фрагменты ДНК, связанные с модификациями гистона H3 H3K4ac и H3K9met3. С помощью праймеров, подобранных к участкам в начале (21—194), середине (363—610) и конце (1609—1819) гена *sox2*, выясняли, связан ли ген *sox2* в этих областях с исследуемыми модификациями корового гистона H3.

Оказалось, что участок в начале гена (21—194) не связан ни с одной из исследуемых модификаций гистона H3 ни в одной из 6 глиом. Участок, расположенный в первой четверти гена (363—610), обнаружен во фракции с модификацией H3K4ac в глиомах 2, 14, 15, 18 и во фракции с модификацией H3K9met3 в глиомах 2, 12, 14 и 17. Таким образом, хроматин в этом участке гена *sox2* может нести маркеры как активно транскрибируемой, так и транскрипционно инертной упаковки. Интересно отметить, что этот участок гена *sox2* может быть связан как с любой из исследуемых модификаций, так и с обеими модификациями одновременно независимо от наличия экспрессии *sox2* в клетках данной глиомы (рис. 5).

Участок в конце гена (1609—1819) был обнаружен только во фракции с модификацией H3K9met3 во всех исследованных глиомах. Эти данные, сопоставленные с данными по экспрессии гена *sox2* в этих глиомах, представлены в табл. 3.

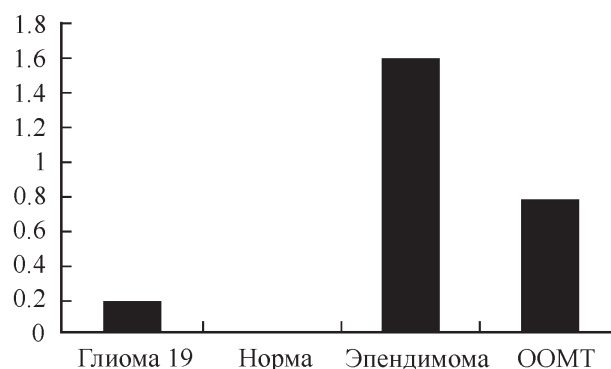


Рис. 4. Экспрессия гена *sox2* в образцах ткани головного мозга, включая объемное образование мозолистого тела мозга (ООМТ), эпендимому и морфологически нормальную ткань мозга (норма), окружавшую одну из глиом, по отношению к максимальному уровню экспрессии *sox2* (глиома 19) среди исследованных злокачественных глиом.

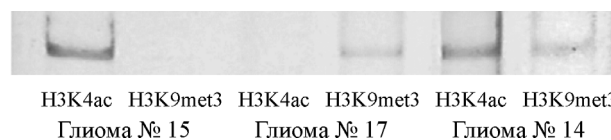


Рис. 5. Ассоциация гена *sox2* с модификациями гистона H3 (H3K4ac и H3K9met3) в злокачественных глиомах (ПЦР и электрофорез).

Таблица 3

Экспрессия гена *sox2* и ассоциация его различных участков с модификациями гистона H3 H3K4ac и H3K9met3 в исследованных глиомах

Номер глиомы	H3K4ac 21—194	H3K9met3 21—194	H3K4ac 363—610	H3K9met3 363—610	H3K4ac 1609—1819	H3K9met3 1609—1819	Экспрессия <i>sox2</i>
15	—	—	+	—	—	+	+
18	—	—	+	—	—	+	+
12	—	—	—	+	—	+	+
17	—	—	—	+	—	+	+
14	—	—	+	+	—	+	+
2	—	—	+	+	—	+	—

Обсуждение

В последнее время все больше сторонников приобретает теория о стволоподобной природе злокачественно перерожденных клеток. Рассматриваются как варианты существования в опухолях особой субпопуляции стволовых клеток, так и варианты, при которых любая трансформированная клетка с некоторой вероятностью приобретает способность становиться стволоподобной. В этом контексте особый интерес приобретают работы, исследующие изменение в опухолевых клетках экспрессии генов, способных вызывать или поддерживать стволоподобное состояние клеток. Одним из таких генов является *sox2* (Takahashi et al., 2006, 2007; Yu et al., 2007; Noisa et al., 2012), особенности экспрессии которого в злокачественных глиомах представлены в этой работе.

Следует отметить, что современные представления о природе злокачественной трансформации клеток все чаще связывают эти процессы не только с мутационными повреждениями генома, но и с эпигенетической изменчивостью, в первую очередь с измененным профилем промоторного метилирования ДНК и измененным гистоновым кодом. Такие эпигенетические нарушения влияют на транскрипционную активность и как следствие — на экспрессию онкогенов и генов-онкосупрессоров. Публикации последних лет свидетельствуют о важности эпигенетической регуляции генной экспрессии и для патогенеза глиом (Nagarajan, Costello, 2009; Семенова, Филатов, 2013).

Нам известно лишь несколько работ, посвященных изучению регуляции экспрессии *sox2* в глиомах. Например, получены данные о том, что экспрессия *sox2* в глиомах может регулироваться сигнальным путем TGF- β через транскрипционный фактор Sox4, образующий комплекс с Oct4 на энхансере гена *sox2* (Ikushima et al., 2009, 2011). Показано также, что ген *sox2* является мишенью транскрипционных факторов MEF (Bazzoli et al., 2012) и Gli2 (Takanaga et al., 2009; Rao et al., 2012), подавление активности которых приводит к снижению уровня экспрессии *sox2* в глиомах и уменьшению прогрессии опухолевых клеток. Получены данные и о регуляции экспрессии *sox2* в глиомах метилированием регуляторных областей этого гена. Показано, что степень метилирования промотора *sox2* в злокачественных глиомах, показывающих экспрессию *sox2*, существенно ниже, чем в нормальных клетках. В глиомах, негативных по *sox2*, экспрессия *sox2* восстанавливалась после обработки клеток 5-азациитидином (Alonso et al., 2011).

Однако остается открытым вопрос о том, как экспрессия *sox2* связана с малигнизацией глиом. Кроме того,

совершенно не изучены механизмы контроля экспрессии *sox2* различными модификациями коровых гистонов в глиомах.

Нами зафиксирована экспрессия гена *sox2* в 74 % случаев злокачественных глиом в сделанной нами выборке, при этом уровень экспрессии варьирует в широком диапазоне (рис. 3). В отличие от ранее опубликованных данных (Annovazzi et al., 2011) мы не обнаружили жесткой корреляции уровня экспрессии *sox2* со степенью малигнизации глиом. Так, в менее агрессивных, чем глиомы, опухолях головного мозга уровень экспрессии *sox2* оказался значительно выше. В то же время в морфологически нормальной ткани мозга экспрессии *sox2* не зафиксировано (рис. 4). Полученные результаты указывают на связь процессов злокачественной трансформации глиом с изменением экспрессионного профиля гена *sox2*, подтверждая и дополняя данные других авторов (Schmitz et al., 2007; Kong et al., 2008; Alonso et al., 2011; Annovazzi et al., 2011; Guo et al., 2011; Holmberg et al., 2011).

В настоящей работе впервые изучена роль эпигенетического показателя транскрипционной активности — гистонного кода — в регуляции экспрессии *sox2* в злокачественных глиомах. Ранее мы проводили подобные исследования для генов, не обладающих свойствами, позволяющими им поддерживать плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток. Мы установили, что экспрессия гена *lgil* в злокачественных глиомах инактивируется модификацией H3K9met3 (данные готовятся к публикации). Кроме того, мы показали, что в глиобластомах область вблизи сайтов инициации транскрипции антионкогена *pten* обогащена маркером стабильной генной репрессии H3K9me3, при этом модификации гистона H3 H3K4ac и H3K9met3 ассоциируются с геном *pten* взаимноисключающим образом (Семенова и др., 2012). По всей видимости, эти результаты свидетельствуют о значительной универсальности эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов *pten* и *lgil* в глиомах. Однако для *sox2* прямой корреляции между экспрессией этого гена и ассоциацией различных его участков с исследуемыми модификациями гистона H3 нам обнаружить не удалось.

Мы проанализировали распределение двух модификаций H3K4ac и H3K9met3 по гену *sox2* в выборке из 6 исследуемых глиом. Ни в одной из этих 6 глиом модификация H3K9met3 не была связана с начальной областью гена рядом с промотором, где она могла бы эффективно инактивировать экспрессию *sox2*. Однако и эпигенетического маркера активной транскрипции H3K4ac, ассоциированного с данной областью генома, мы не зафиксировали. Как следует из данных табл. 3, во всех глиомах участок в конце гена *sox2* связан с модификацией

НЗК9met3, которая стабилизирует хроматин, и не связан с модификацией НЗК4ас. В середине гена вероятность обнаружить модификацию НЗК9met3 падает, а НЗК4ас, напротив, растет. Кроме того, и в глиоме с достаточно высоким уровнем экспрессии *sox2*, и в глиоме, в которой экспрессия *sox2* отсутствует, на этом участке ген может быть ассоциирован с обеими модификациями одновременно. Мы предполагаем, что полученные данные могут указывать на стохастическое снижение порогового уровня перехода хроматина из инактивированного состояния в активное. В частности, в глиоме 2, не показывающей экспрессию гена *sox2*, начальный участок гена не инактивирован модификацией НЗК9met3, а участок в середине гена связан как с модификацией НЗК4ас, так и с НЗК9met3. Возможно, такое нехарактерное в целом распределение эпигенетических маркеров транскрипционной активности вдоль гена *sox2* является особенностью таких необычных генов, каковым является *sox2*, и именно сбой эпигенетической регуляции гена *sox2* позволяет опухолевым клеткам восстанавливать его экспрессию в злокачественных глиомах.

Список литературы

- Семенова Е. В., Волницкий А. В., Филатов М. В. 2012. Гистоновый код и эпигенетическая регуляция гена *PTEN* в злокачественных глиомах. Сиб. онкол. журн. 3 (51) : 74—78. (Semenuova E. V., Volnitskiy A. V., Filatov M. V. 2012. Histone code and epigenetic regulation of *PTEN* gene in malignant gliomas. Siberian J. Oncol. 3 (51) : 74—78.)
- Семенова Е. В., Филатов М. В. 2013. Генетические и эпигенетические маркеры глиом. Цитология. 55 (5) : 290—299. (Semenuova E. V., Filatov M. V. 2013. Genetic and epigenetic markers of gliomas. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 7(4) : 303—313.)
- Alonso M. M., Diez-Valle R., Manterola L., Rubio A., Liu D., Cortes-Santiago N., Urquiza L., Patricia Jauregi, Lopez de Munain A., Sampron N., Aramburu A., Tejada-Solis S., Vicente C., Ode-ro M. D., Bandres E., Garcia-Foncillas J., Idoate M. A., Lang F. F., Fueyo J., Gomez-Manzano C. 2011. Genetic and Epigenetic Modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. PLoS ONE (www.plosone.org). 6 (11) : e26740.
- Annovazzi L., Mellai M., Caldera V., Valente G., Schiffer D. 2011. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. Cancer Genomics Proteomics. 8 : 139—147.
- Bazzoli E., Pulvirenti T., Oberstadt M. C., Perna F., Wee B., Schultz N., Huse J. T., Fomchenko E. I., Voza F., Tabar V., Brennan C. W., DeAngelis L. M., Nimer S. D., Holland E. C., Squatrito M. 2012. MEF promotes stemness in the pathogenesis of gliomas. Cell Stem Cell. 11 : 836—844.
- Ben-Porath I., Thomson M. W., Carey V. J., Ge R., Bell G. W., Regev A., Weinberg R. A. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat. Genet. 40 : 499—507.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chem. 55 : 611—622.
- Bustin S. A., Beaulieu J. F., Huggett J., Jaggi R., Kibenge F. S., Olsvik P. A., Penning L. C., Toegel S. 2010. MIQE précis: practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. BMC Mol. Biol. 11 (74) : doi: 10.1186/1471-2199-11-74.
- Fang X., Yoon J. G., Li L., Tsai Y. S., Zheng S., Hood L., Goodlett D. R., Foltz G., Lin B. 2011a. Landscape of the SOX2 protein-protein interactome. Proteomics. 11 : 921—934.
- Fang X., Yoon J.-G., Li L., Yu W., Shao J., Hua D., Zheng S., Hood L., Goodlett D. R., Foltz G., Lin B. 2011b. The Sox2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. BMC Genomics. 12 (11) : doi : 10.1186/1471-2164-12-11.
- Gangemi R. M. R., Griffero F., Marubbi D., Perera M., Capra M. C., Malatesta P., Ravetti G. L., Zona G. L., Daga A., Corte G. 2009. Sox2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells. 27 : 40—48.
- Gresner S. M., Golanska E., Kulczycka-Wojdala D., Jaskolski D. J., Papierz W., Liberski P. P. 2011. Selection of reference genes for gene expression studies in astrocytomas. Anal. Biochem. 408 : 163—165.
- Guo Y., Liu S., Wang P., Zhao S., Wang F., Bing L., Zhang Y., Ling E. A., Gao J., Hao A. 2011. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. Histopathology. 59 : 763—775.
- Hagerstrand D., He X., Lindh M. B., Hoefs S., Hesselager G., Ostman A., Nister M. 2011. Identification of a Sox2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. Neuro Oncol. 13 : 1178—1191.
- Holmberg J., He X., Peredo I., Orrego A., Hesselager G., Ericsson C., Hovatta O., Oba-Shinjo S. M., Marie S. K. N., Nister M., Muhr J. 2011. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. PLoS ONE (www.plosone.org). 6 (3) : e18454.
- Ikushima H., Todo T., Ino Y., Takahashi M., Miyazawa K., Miyazono K. 2009. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. Cell Stem Cell. 5 : 504—514.
- Ikushima H., Todo T., Ino Y., Takahashi M., Saito N., Miyazawa K., Miyazono K. 2011. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. J. Biol. Chem. 286 : 41 434—41 441.
- Kong D. S., Kim M. H., Park W. Y., Suh Y. L., Lee J. I., Park K., Kim J. H., Nam D. H. 2008. The progression of gliomas is associated with cancer stem cell phenotype. Oncol. Rep. 19 : 639—643.
- Kreth S., Heyn J., Grau S., Kretschmar H. A., Egensperger R., Kreth F. W. 2010. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. Neuro Oncol. 12 (6) : 570—579.
- Nagarajan R. P., Costello J. F. 2009. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. Semin. Cancer Biol. 19 : 188—197.
- Naryzhny S. N. 2009. Blue Dry Western: simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. Anal. Biochem. 392 : 90—95.
- Noisa P., Ramasamy T. S., Lamont F. R., Yu J. S. L., Sheldon M. J., Russell A., Jin X., Cui W. 2012. Identification and characterisation of the early differentiating cells in neural differentiation of human embryonic stem cells. PLoS ONE (www.plosone.org). 7 (5) : e37129.
- Oppel F., Muller N., Schackert G., Hendruschk S., Martin D., Geiger K. D., Temme A. 2011. SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. Mol. Cancer. 10 (137) : doi : 10.1186/1476-4598-10-137.
- Rao J. S., Gopinath A., Malla R. R., Alapati K., Gorantla B., Gujrati M., Dinh D. H. 2012. Cathepsin B and uPAR regulate self-renewal of glioma-initiating cells through GLI-regulated Sox2 and Bmi1 expression. Carcinogenesis. 34 : 550—559.
- Rizzino A. 2009. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells by functioning as molecular rheostats. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 1 : 228—236.
- Schmitz M., Temme A., Senner V., Ebner R., Schwind S., Stevanovic S., Wehner R., Schackert G., Schackert H. K., Fussel M., Bachmann M., Rieber E. P., Weigle B. 2007. Identification of Sox2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. British J. Cancer. 96 : 1293—1301.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells

from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131 : 861—872.

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 : 663—676.

Takanaga H., Tsuchida-Straeten N., Nishide K., Watanabe A., Aburatani H., Kondo T. 2009. Gli2 is a novel regulator of Sox2 ex-

pression in telencephalic neuroepithelial cells. *Stem Cells*. 27 : 165—174.

Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318 : 1917—1920.

Поступила 10 II 2014

ABERRANT EXPRESSION OF *sox2* GENE IN MALIGNANT GLIOMAS

A. V. Volnitskiy,¹ E. V. Semenova,¹ T. A. Shtam,¹ R. A. Kovalev,¹ M. V. Filatov^{1, 2, *}

¹ B. P. Konstantinov's Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina,
and ² St. Petersburg State Polytechnic University;

* e-mail: fil_53@mail.ru, filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Both genetic and epigenetic changes underlie the mechanisms of tumor initiation and progression. In the present study we analyze *sox2* gene expression and its epigenetic regulation in primary cultures of malignant gliomas. The *sox2* expression was detected in the vast majority (74 %) of the investigated gliomas and absent in morphologically normal brain tissue. This indicates the process of glioma malignant transformation. We have also shown that the association of different areas of the *sox2* gene with important epigenetic markers, posttranslational modifications of H3 histone H3K4ac and H3K9me3, does not correlate with the *sox2* expression. However, this may indicate the stochastic nature of the regulation of *sox2* gene expression in malignant gliomas.

Key words: aberrant gene expression, gliomas, posttranslational H3 histone modifications, Sox2.