

АНАЛИЗ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНА *LGII* С ПОМОЩЬЮ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНА Н3 В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМАХ

© Е. В. Семенова,¹ А. В. Волницкий, М. В. Филатов

*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константина
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл., 188300;*
¹ электронный адрес: semenova_el.spb@mail.ru

Причины разнообразных генетических и эпигенетических изменений в глиомах остаются во многом неясными. Известно, что процесс злокачественной трансформации глиом сопровождается постепенной утратой экспрессии гена *LGII*, однако генетических дефектов, обуславливающих инактивацию *LGII*, не обнаружено. В настоящей работе мы проанализировали экспрессию гена *LGII* в первичных культурах злокачественных глиом и сравнили эти данные с эпигенетическими показателями транскрипционной активности — посттрансляционными модификациями гистона Н3. Мы продемонстрировали наличие маркера генной репрессии Н3К9мe3 вблизи сайта инициации транскрипции гена *LGII* в подавляющем большинстве (5 из 6) исследованных глиом. Экспрессия *LGII* в этих глиомах отсутствовала. Только в одной глиоме зафиксирована экспрессия *LGII*, и именно в этой глиоме нет ассоциации начальной области гена *LGII* с модификацией Н3К9мe3. Таким образом, нами впервые показана корреляция между экспрессией гена *LGII* и эпигенетическим показателем Н3К9мe3 в злокачественных глиомах. Маркер транскрипционной активности Н3К4ас вблизи сайта инициации транскрипции гена *LGII* нами не обнаружен. По-видимому, ген *LGII* инактивирован в злокачественных глиомах с помощью эпигенетических механизмов — измененного гистонового кода.

Ключевые слова: ген *LGII*, гистоновый код, глиома, эпигенетическая регуляция.

Более 50 % диагностируемых при жизни нейроэпителиальных опухолей представлены злокачественными формами глиом — анапластическими астроцитомами и глиобластомами. Это наиболее агрессивные и исключительно плохо поддающиеся лечению неоплазии головного мозга (Pang et al., 2007; Jones, Holland, 2011). Причины и последствия разнообразных генетических и эпигенетических изменений в глиомах, несмотря на достигнутый прогресс, остаются во многом неясными и являются сегодня предметом интенсивного изучения.

Процессы злокачественной трансформации глиом сопровождаются постепенной утратой транскрипционной активности гена *LGII* (*leucine-rich glioma inactivated gene 1*). Так, наименее злокачественные глиомы I и II степени по классификации Всемирной организации здравоохранения имеют в большинстве случаев практически не отличающийся от нормальных клеток мозга уровень экспрессии *LGII*; глиомы III степени злокачественности обнаруживают хотя и сниженный, но хорошо детектируемый уровень экспрессии *LGII*, в то время как в мультиформных глиобластомах (IV степень) экспрессия *LGII* или отсутствует, или едва заметна (Chernova et al., 1998; Krex et al., 2002; Besleaga et al., 2003; Piepoli et al., 2006). В абсолютном большинстве проанализированных клеточных линий глиом транскриптов *LGII* не обнаружено (Chernova et al., 1998; Krex et al., 2002; Besleaga et al., 2003; Piepoli et al., 2006). Поиски мутаций *LGII* в клеточных линиях и первичных культурах злокачественных

глиом, предпринятые рядом исследователей, не дали положительных результатов; мутаций не найдено ни в промоторной, ни в кодирующей областях гена. Предположение о том, что хромосомные транслокации являются универсальным механизмом инактивации этого гена в злокачественных глиомах, также не нашло своего подтверждения (Somerville et al., 2000; Krex et al., 2002; Piepoli et al., 2006). Эти данные указывают на существование альтернативных механизмов регуляции экспрессии гена *LGII* в глиомах. По всей видимости, *LGII* инактивирован в злокачественных глиомах не вследствие структурных хромосомных перестроек, делеций или соматических мутаций, т. е. собственно генетических повреждений, а в результате эпигенетических нарушений — измененного профиля промоторного метилирования ДНК и измененного гистонового кода. Такие эпигенетические нарушения генной активности обусловлены модификациями структуры хроматина и не связаны с мутационными повреждениями ДНК.

Действительно, многочисленные публикации последних лет свидетельствуют о важности эпигенетической регуляции генной экспрессии для патогенеза глиом (Nagarajan, Costello, 2009; Семенова, Филатов, 2013). Более того, в одной из работ предполагается, что нарушение эпигенетических механизмов является основным дефектом глиомогенеза (Nagarajan, Costello, 2009). Очевидно, что ген *LGII* представляет большой интерес как диагностический маркер неоплазий головного мозга (Chernova

et al., 1998; Krex et al., 2002; Besleaga et al., 2003; Piepoli et al., 2006). Однако, несмотря на это, исследований транскрипционной активности гена *LGII* в злокачественных глиомах с точки зрения эпигенетических факторов практически не проводилось. В единственной известной нам работе по изучению эпигенетических нарушений этого гена в мультиформных глиобластомах не зафиксировано различий в степени метилирования промоторной области *LGII* между опухолевыми клетками и здоровыми клетками мозга (Somerville et al., 2000). Сведений в литературе об изучении транскрипционной активности *LGII* в глиомах посредством анализа посттрансляционных модификаций коровых гистонов (так называемого гистонового кода) нам обнаружить не удалось.

Известно, что NH₂-концевые области коровых гистонов — субстраты для многочисленных ковалентных модификаций, таких как ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитилирование, сумоилирование, биотинилирование, АДФ-рибозилирование и др. Эти модификации не только влияют на структуру хроматина, изменяя взаимодействия между ДНК и гистонами, межнуклеосомные взаимодействия и взаимодействия между негистоновыми регуляторными белками и хроматином, но и регулирует важнейшие клеточные процессы, связанные с ДНК, в том числе репликацию, репарацию, рекомбинацию и транскрипцию (Tighe, 2005; Berger, 2007; Kouzarides, 2007; Li et al., 2007; Bannister, Kouzarides, 2011).

Цель представленной работы — определение эпигенетических показателей гена *LGII* в первичных культурах злокачественных глиом с помощью посттрансляционных модификаций гистона H3 и сопоставление этих данных с данными экспрессионного анализа. Используя метод иммунопреципитации хроматина с дальнейшим анализом с помощью ПЦР в реальном времени, мы исследовали ассоциацию области гена *LGII* вблизи сайта инициации транскрипции с двумя эпигенетическими маркерами транскрипционной активности — маркером активно транскрибуируемого хроматина H3K4ac и маркером H3K9me3, способствующего образованию транскрипционно инертных гетерохроматиновых структур.

Полученные нами данные впервые указывают на эпигенетическое подавление транскрипционной активности гена *LGII* в злокачественных глиомах вследствие измененного гистонового кода.

Материал и методика

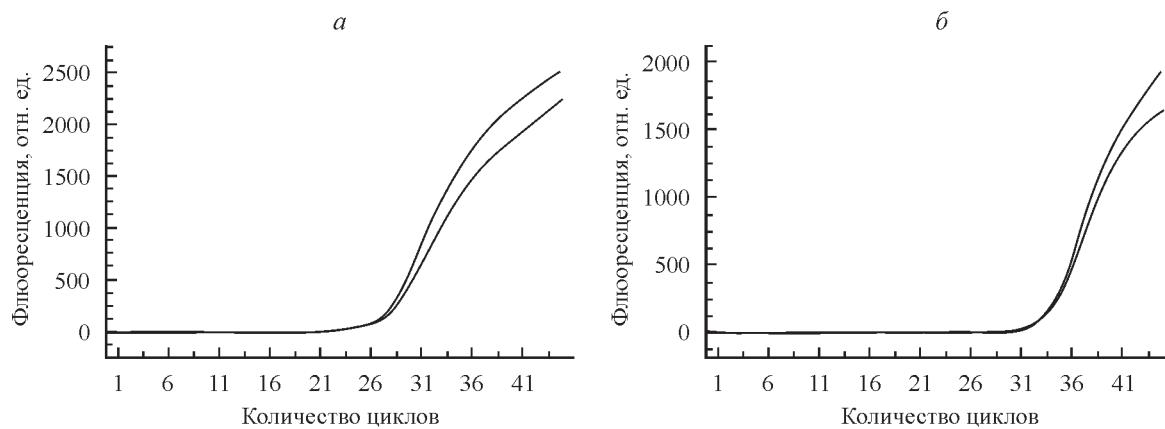
Первичные культуры глиом. В представленном исследовании использовано 6 первичных культур глиом человека, полученных в нашей лаборатории из хирургического материала пациентов Российского научно-исследовательского нейрохирургического института им. проф. А. Л. Поленова. С помощью морфологического и гистологического анализа образцы опухолей были идентифицированы как глиомы IV степени злокачественности (glioblastoma мультиформная) по классификации Всемирной организации здравоохранения. Для выращивания клеток использовали среду DMEM/F-12 (1 : 1), содержащую 10 % сыворотки крови плодов коровы (БиоЛоТ, Россия). Клетки отделяли от субстрата с помощью 0.02%-ного раствора Версена (БиоЛоТ, Россия).

Процедура иммунопреципитации хроматина (СНИР). Процедура была строго стандартизирована. В каждом эксперименте использовали хроматин, по-

лученный из 3 · 10⁶ клеток. С целью образования ковалентных сшивок между ДНК и гистонами клетки 10 мин инкубировали с 1%-ным формальдегидом. Реакцию останавливали добавлением 2.5 М глицина (1/20 объема реакционной смеси) с последующей инкубацией на льду в течение 20 мин. Затем клетки дважды промывали в холодном растворе PBS. После этого клетки инкубировали в течение 10 мин в промывочных растворах 1 (0.25 % Тритона X-100, 10 мМ ЭДТА и 10 мМ HEPES, pH 7.5) и 2 (0.2 M NaCl, 1.5 M ЭДТА и 10 мМ HEPES, pH 7.5), ингибиторы протеаз — PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (Thermo Scientific, США). Лизис проводили в 600 мкл буфера, содержащего 150 мМ NaCl, 25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 5 мМ ЭДТА, 1% Тритона X-100, 0.1% SDS, 0.5 % дезоксихолата натрия и ингибиторы протеаз. Лизат «озвучивали» на дезинтеграторе УЗДН-2Т 8 раз по 10 с, после чего центрифугировали при 13 000 g в течение 15 мин при 4 °C. Супернатант разбавляли буфером 1 : 5 (25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 1 % Тритона X-100 и ингибиторы протеаз) и делили на 3 равные части. Первую часть использовали в качестве негативного контроля, ко второй части добавляли анти-H3K9me3-антитела (anti-trimethyl-Histon H3 (Lys9)-антитела; Upstate, США), к третьей — анти-H3K4ac-антитела (anti-acetyl-Histon H3 (Lys4)-антитела; Upstate, США) и при постоянном вращении инкубировали в течение ночи при 4 °C. Иммунокомплексы адсорбировали на протеин A-агарозу в течение 1 ч и элюировали буфером, содержащим 1 % SDS и 0.1 M NaHCO₃. Далее для разрушения сшивок между ДНК и гистонами элюаты нагревали при 65 °C в течение 6 ч в присутствии 200 мМ NaCl. После обработки элюатов протеиназой K (Fisher, США) (конечная концентрация 100 мкг/мл) осуществляли экстракцию ДНК смесью фенола с хлороформом с последующим осаждением этанолом по стандартной методике. Выделенную ДНК ресуспендировали в 15 мкл H₂O и использовали при ПЦР-анализе.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Общую РНК выделяли из 2 · 10⁶ клеток с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (Fermentas, США), а обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора iScrip cDNA Synthesis Kit (BioRad, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали смесь олиго-dT и случайных гексомеров, предложенную производителем.

ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени выделенных методом СНИР фрагментов ДНК. Реакционная смесь для ПЦР является однократным трисовым буфером для Тақ-полимеразы (pH 8.6) и содержит 1 ммол/л хлорида магния, 0.05 ед./мкл Тақ-полимеразы (Силекс, Россия), 250 мкмоль/л каждого dNTP, 300 нмоль/л прямого и обратного праймеров, 250 нмоль/л флуоресцентно меченного зонда (Синтол, Россия) и 2 мкл кДНК (около 2 мкг) или 2 мкл ДНК, выделенной с помощью процедуры иммунопреципитации хроматина. 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. Использовали праймеры, flankирующие область гена *LGII*, расположенную вблизи точки инициации транскрипции (прямой — 5'-gcagaaagctgtttatttctg-3', обратный — 5'-tgcagctgttcgtggatct-3') и флуоресцентно меченный зонд (FAM-cgaaggctggctgtcgtca-BHQ1). Праймеры для *LGII*



Кинетические кривые гена *LGII* глиомы № 3 (а), показывающие его экспрессию, и этого же гена глиомы № 2 (б), показывающие наличие модификации H3K9me3 вблизи промоторной области данного гена.

ПЦР-анализ в реальном времени. Показано по две кривых (дубли) для каждого случая.

подобраны таким образом, что могут отжигаться на ДНК, поэтому для исключения контаминации кДНК нативной ДНК ставили контроль с образцами РНК без обратной транскрипции. В качестве положительного контроля для проверки праймеров использовали валовую ДНК, выделенную из клеток одного из образцов (glioma № 5). При исследовании экспрессии гена *LGII* в качестве внутреннего положительного контроля использовали экспрессию гена *GAPDH*, которую наблюдали во всех проанализированных образцах. Анализ кинетических кривых, полученных при амплификации гена *LGII*, производили с помощью программы RealTime_PCR v7.3 (НПО ДНК-Технология).

Результаты

Экспрессия гена *LGII* в злокачественных глиомах. Экспрессию *LGII* исследовали методом ОТ-ПЦР в реальном времени в шести первичных культурах клеток злокачественных глиом. Экспрессия *LGII* обнаружена только в 1 из 6 исследованных глиом (№ 3) и отсутствует в остальных глиомах. Кинетические кривые (два дубля), демонстрирующие экспрессию гена *LGII* в глиоме № 3, приведены на рисунке, а.

Анализ ассоциации области гена *LGII* вблизи промоторной области с посттрансляционными модификациями гистона H3 H3K4ac и H3K9me3. Эта часть работы посвящена определению эпигенетических изменений *LGII* посредством посттрансляционных модификаций корового гистона H3 в злокачественных глиомах. Ацетилирование и метилирование лизинов — две наиболее хорошо изученные модификации, которые, как установлено, существенны для канцерогенеза. Известно, что модификация H3K4ac является эпигенетическим маркером активной транскрипции, а модификация H3K9me3 — маркером транскрипционно инертного хроматина (Barski et al., 2007; Kouzarides, 2007; Bannister, Kouzarides, 2011). Используя метод иммуноопреципитации хроматина с дальнейшим ПЦР-анализом в реальном времени, мы исследовали эпигенетические характеристики гена *LGII* в 6 первичных культурах глиом с помощью этих двух противоположных по своим функциям эпигенетических маркеров. Мы показали, что в 5 глиомах область вблизи сайта инициации

транскрипции *LGII* обогащена маркером стабильной генной супрессии H3K9me3. В качестве примера на рисунке, б представлены данные такого анализа для глиомы № 2, у которой обнаружена ассоциация участка гена *LGII* вблизи промоторной области с модификацией H3K9me3.

Ни в одной из исследованных глиобластом не обнаружено модификаций транскрипционной активности H3K4ac в этой области генома. Полученные результаты указывают на подавление транскрипционной активности *LGII* с помощью эпигенетических механизмов в абсолютном большинстве исследованных клеточных культур глиом. Это предположение находит подтверждение при сопоставлении с данными экспрессионного анализа. Обобщенные результаты исследования представлены в таблице. Как видно из данных таблицы, только в одной глиоме № 3 не зафиксировано ассоциации участка гена *LGII* вблизи сайта инициации транскрипции с модификацией H3K9met3, и именно в этой единственной глиоме обнаружена экспрессия *LGII*.

Корреляции между наличием модификации H3K4ac в этой области гена *LGII* и его экспрессией в злокачественных глиомах мы не обнаружили.

Обсуждение

До недавнего времени считалось, что важнейшей предпосылкой превращения здоровой клетки в раковую является инактивация обеих копий генов, кодирующих

Сопоставление экспрессии гена *LGII* в злокачественных глиомах с ассоциацией модификаций H3K4ac и H3K9met3 с областью гена *LGII* вблизи сайта инициации транскрипции

Номер глиомы	Наличие модификации		Экспрессия <i>LGII</i>
	H3K4ac	H3K9met3	
1	—	+	—
2	—	+	—
3	—	—	+
4	—	+	—
5	—	+	—
6	—	+	—

белки-онкосупрессоры, вследствие мутаций и хромосомных перестроек (Berger et al., 2011). Однако в последнее десятилетие появилось понимание того, что активность гена может подавляться эпигенетически. Эпигенетические нарушения, так же как и генетические, отражают механизмы инициации опухолевого процесса и его прогрессию. Сегодня накоплено уже достаточное количество данных, позволяющих утверждать, что измененный профиль посттрансляционных модификаций коровых гистонов является важным показателем молекулярной патологии злокачественных глиом (Somerville, 2000; Семенова, Филатов, 2013).

В представленной работе мы продемонстрировали наличие модификации Н3К9мe3 вблизи сайта инициации транскрипции гена *LGII* в абсолютном большинстве исследованных глиом (в 5 из 6), при этом во всех опухолях зафиксировано отсутствие модификации Н3К4ас в этой области генома. Сопоставление с данными экспрессионного анализа указывает на обратную зависимость экспрессии *LGII* от эпигенетического маркера генной супрессии Н3К9мe3. Из литературы известно, что снижение уровня экспрессии гена *LGII* в злокачественной трансформации глиом носит неслучайный характер (Chernova et al., 1998; Krex et al., 2002; Besleaga et al., 2003; Piepoli et al., 2006). Полученные нами результаты впервые указывают на то, что подавление транскрипционной активности *LGII* в глиобластомах осуществляется с помощью эпигенетических механизмов регуляции: измененного гистонового кода.

Цитогенетические и молекулярные исследования показали, что потеря гетерозиготности 10q 23—26 — характерная черта злокачественных глиобластом (до 80 % мультиформных глиобластом имеют такой генетический дефект), но является редким событием в глиомах низких степеней злокачественности, что указывает на связь расположенных в этой области генов с генезисом и прогрессией опухолей головного мозга. В частности, уровень экспрессии PTEN (локализация 10q23) — важнейший прогностический фактор, коррелирующий со степенью развития злокачественных глиом и продолжительностью жизни (Chernova et al., 1998; Cecener et al., 2009; Alexiou, Voulgaris, 2010; Kim et al., 2010; Navis et al., 2010; Семенова и др., 2012; Семенова, Филатов, 2013). Ген *LGII* также расположен на 10-й хромосоме (10q24), однако показано, что и в первичных культурах, и в клеточных линиях злокачественных глиом представлена по крайней мере 1 копия области 10q24 (Krex et al., 2002; Piepoli et al., 2006). Поиски мутаций гена *LGII* в глиомах, как уже упоминалось, также не увенчались успехом (Somerville et al., 2000; Krex et al., 2002; Piepoli et al., 2006).

Этих аргументов оказалось достаточно, чтобы отказаться от первоначальной идеи о том, что белок LGI1 играет роль онкосупрессора в глиомах (Chernova et al., 1998; Kunapuli et al., 2003, 2004). Сейчас ряд исследователей склоняется к мысли о том, что причиной снижения экспрессии *LGII* в глиомах низких степеней злокачественности и ее последующего исчезновения в мультиформных глиобластомах является постепенное замещение нейронов трансформированными клетками, поскольку именно нейроны считаются основным источником белка LGI1. Т. е. отсутствие экспрессии *LGII* в глиобластомах является скорее вторичным эффектом, отражающим различное количество нейронов в опухолевых образцах, нежели одной из причин глиомогенеза (Gu et al., 2005; Piepoli et al., 2006).

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что подобные выводы делать преждевременно. Гену *LGII* принадлежит определенная роль в механизмах контроля над процессами клеточного деления и подвижности в опухолях головного мозга (Kunapuli et al., 2003, 2004; Gu et al., 2005). Установлено, что индуцированная экспрессия гена *LGII* в клеточных линиях глиом снижает злокачественный потенциал, ингибируя пролиферацию и инвазивность (Kunapuli et al., 2003; Gu et al., 2005; Kunapuli et al., 2010). В первую очередь это связывают с негативным влиянием на экспрессию двух генов (*MMP1* и *MMP3*) матриксных металлопротеаз (Mercapide et al., 2003; Kunapuli et al., 2004). Известно, что в злокачественных глиомах экспрессируется повышенный уровень матриксных металлопротеаз, способных расщеплять практически все компоненты внеклеточного матрикса (Nagase, Woessner, 1999; Nabeshima et al., 2002; Mercapide et al., 2003). Усиление экспрессии *LGII* супрессирует *MMP1* и *MMP3* посредством негативного влияния на сигнальный путь ERK1/2 что в свою очередь существенно снижает способность клеток к миграции и их ростовой потенциал (Mercapide et al., 2003; Kunapuli et al., 2004). Кроме того, экспрессия экзогенного *LGII* стимулирует образование актиновых волокон в глиомах. Такая реорганизация актинового цитоскелета также значительно уменьшает клеточную подвижность (Kunapuli et al., 2004, 2010).

Полученные нами данные об измененном гистоновом коде гена *LGII* в абсолютном большинстве проанализированных клеточных культур глиом (подавление транскрипционной активности посредством эпигенетических механизмов регуляции) подтверждают значимость инактивации этого гена для процессов злокачественной трансформации глиом.

Идентификация эпигенетических детерминант различных онкологических заболеваний представляет большой практический интерес, поскольку такие нарушения, как ДНК-гиперметилирование и измененный профиль посттрансляционных модификаций коровых гистонов, в отличие от генетических мутаций, по всей видимости, носят обратимый характер (Jones, Yoo, 2006; Семенова, Филатов, 2013). При определенных условиях эпимутации могут быть устраниены, а нормальные функции конкретных генов восстановлены. Возможно, восстановление транскрипционной активности гена *LGII* в злокачественных глиомах с помощью специфической лекарственной терапии поможет в дальнейшем при лечении этого вида опухолей головного мозга.

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 : 74—78. (Semenova E. V., Volnitsky A. V., Filatov M. V. 2012. Histone code and epigenetic regulation of *PTEN* gene in malignant gliomas. Siberian J. Oncology. 3 : 74—78.)
- Семенова Е. В., Филатов М. В. 2013. Генетические и эпигенетические маркеры глиом. Цитология. 55 (5) : 290—299. (Semenova E. V., Filatov M. V. 2013. Genetic and epigenetic markers of gliomas. Cell Tissue. Biol. 7 (4) : 303—313.)
- Alexiou G. A., Voulgaris S. 2010. The role of the PTEN gene in malignant gliomas. Neurol. Neurochir. Pol. 44 : 80—86.
- Bannister A. J., Kouzarides T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. 21 : 381—395.
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T. Y., Schones D. E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K. 2007. High-resolution profi-

- ling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 129 : 823—837.
- Berger A. H., Knudson A. G., Pandolfi P. P. 2011. A continuum model for tumour suppression. *Nature.* 476 : 163—169.
- Berger S. L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 447 : 407—412.
- Besleaga R., Montesinos-Rongen M., Perez-Tur J., Siebert R., Deckert M. 2003. Expression of the *LGII* gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression. *Virchows Arch.* 443 : 561—564.
- Cecener G., Tunca B., Egeli U., Bekar A., Guler G., Vatan O., Tolunay S. 2009. Investigation of MMAC/PTEN gene mutations and protein expression in low grade gliomas. *Cell Mol. Neurobiol.* 29 : 733—738.
- Chernova O. B., Somerville R. P., Cowell J. K. 1998. A novel gene, *LGII*, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene.* 17 : 2873—2881.
- Gu W., Brodtkorb E., Piepoli T., Finocchiaro G., Steinlein O. K. 2005. *LGII*: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics.* 6 : 59—66.
- Jones P. A., Yoo C. B. 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5 : 37—50.
- Jones T. S., Holland E. C. 2011. Molecular pathogenesis of malignant glial tumors. *Toxicol. Pathol.* 39 : 158—166.
- Kim B., Myung J. K., Seo J. H., Park C. K., Paek S. H., Kim D. G., Jung H. W., Park S. H. 2010. The clinicopathologic values of the molecules associated with the main pathogenesis of the glioblastoma. *J. Neurol. Sci.* 294 : 112—118.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128 : 693—705.
- Krex D., Hauses M., Appelt H., Mohr B., Ehninger G., Schackert H. K., Schackert G. 2002. Physical and functional characterization of the human *LGII* gene and its possible role in glioma development. *Acta Neuropathol.* 103 : 255—266.
- Kunapuli P., Chitta K. S., Cowell J. K. 2003. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the *LGII* gene. *Oncogene.* 22 : 3985—3991.
- Kunapuli P., Kasyapa C. S., Hawthorn L., Cowell J. K. 2004. *LGII*, a putative tumor metastasis suppressor gene, controls *in vitro* invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the ERK1/2 pathway. *J. Biol. Chem.* 279 : 23 151—23 157.
- Kunapuli P., Lo K., Hawthorn L., Cowell J. K. 2010. Reexpression of *LGII* in glioma cells results in dysregulation of genes implicated in the canonical axon guidance pathway. *Genomics.* 95 : 93—100.
- Li B., Carey M., Workman J. L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128 : 707—719.
- Mercapide J., Lopez De Cicco R., Castresana J. S., Klein-Szanto A. J. 2003. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 106 : 676—682.
- Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y., Sameshima T. 2002. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol. Int.* 52 : 255—264.
- Nagarajan R. P., Costello J. F. 2009. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin. Cancer Biol.* 19 : 188—197.
- Nagase H., Woessner J. F., Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 : 21 491—21 494.
- Navis A. C., van den Eijnden M., Schepens J. T., Hooft van Huysduyven R., Wesseling P., Hendriks W. J. 2010. Protein tyrosine phosphatases in glioma biology. *Acta Neuropathol.* 119 : 157—175.
- Pang B. C., Wan W. H., Lee C. K., Khu K. J., Ng W. H. 2007. The role of surgery in high-grade glioma—is surgical resection justified? A review of the current knowledge. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 36 : 358—363.
- Piepoli T., Jakupoglu C., Gu W., Lualdi E., Suarez-Merino B., Poliani P. L., Cattaneo M. G., Ortino B., Goplen D., Wang J., Mola R., Inverardi F., Frassoni C., Bjerkvig R., Steinlein O., Vincentini L. M., Brüstle O., Finocchiaro G. 2006. Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for *LGII*. *Neuro Oncol.* 8 : 96—108.
- Somerville R. P., Chernova O., Liu S., Shoshan Y., Cowell J. K. 2000. Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of *LGII*. *Mamm. Genome.* 11 : 622—627.
- Turner B. M. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 : 110—112.

Поступила 20 X 2015

THE ANALYSIS OF *LGII* GENE EPIGENETIC ALTERATIONS BY MEANS OF POSTTRANSLATIONAL H3 HISTONE MODIFICATIONS IN MALIGNANT GLIOMAS

E. V. Semenova,¹ A. V. Volnitsky, M. V. Filatov

Petersburg Nuclear Physics Institute (National Research Center «Kurchatov Institute»), Gatchina, 188300;

¹ e-mail: semenova_el.spb@mail.ru

Although there is a progress in understanding the causes and consequences of genetic and epigenetic changes in glioma malignant transformation, many details remain obscure and need further investigation. It is known that process of malignant transformation of gliomas is accompanied by gradual loss of *LGII* gene expression. However, genetic defects causing *LGII* inactivation have not been revealed. In this paper, we have analyzed the *LGII* gene expression in primary cultures of malignant gliomas, and compared these data with epigenetic indicators of transcriptional activity — posttranslational H3 histone modifications. We have shown the presence of an epigenetic marker of gene repression H3K9me3 near the site of *LGII* transcription initiation in most (5 from 6) studied gliomas. There was no *LGII* expression in these gliomas. Only one glioma showed *LGII* expression, and in this glioma there was no association of *LGII* gene with H3K9me3 modification. Thus, we are the first to show a correlation between *LGII* gene expression and the epigenetic indicator H3K9met3 in malignant gliomas. Marker of actively transcribed chromatin H3K4ac have not been found in this area of the genome. The data obtained strongly suggest the possibility of gene *LGII* inactivation by epigenetic mechanism: modified «histone code».

Key words: *LGII* gene, histone code, gliomas, epigenetic regulation.