

# BRCA1 УЧАСТВУЕТ В ЭКСПРЕССИИ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК XIST

Е.А. Шестакова, Т.А. Богущ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Анатольевна Шестакова elenaanshestakova@mail.ru

**Введение.** Некодирующая РНК гена XIST (*X inactivation-specific transcript*) инициирует процесс инактивации одной из хромосом X в клетках женского организма. Последующие стадии этого процесса включают эпигенетические модификации хроматина, что приводит к ингибированию экспрессии большинства генов на X-хромосоме. В последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что белок – супрессор опухолей BRCA1 взаимодействует с неактивной X-хромосомой (*inactive X chromosome, Xi*), влияя на локализацию и транскрипцию РНК XIST.

**Цель исследования** – изучение роли BRCA1 в индукции экспрессии РНК XIST.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили клеточные линии рака молочной железы (PMЖ), мутантные по гену BRCA1 (*BRCA1<sup>-/-</sup>*): HCC1395, HCC1937, SUM149PT, и в качестве контроля – клеточные линии, содержащие ген BRCA1 дикого типа (*BRCA1<sup>+/+</sup>*): IMR90 и 293T. Для анализа экспрессии РНК XIST использовали полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

**Результаты.** В клоне доксициклин-индуцированной клеточной линии PMЖ HCC1937 наблюдалась экспрессия РНК XIST при индукции BRCA1 (инициации экспрессии гена BRCA1 с последующим синтезом белка BRCA1, который активирует экспрессию РНК XIST, т. е. ее транскрипцию с гена XIST). В клеточных линиях PMЖ HCC1395, HCC1937, SUM149PT, мутантных по гену BRCA1 (*BRCA1<sup>-/-</sup>*) и содержащих нефункциональный белок BRCA1, с помощью ОТ-ПЦР экспрессии РНК XIST не обнаружено. Это говорит о важной роли функционального белка BRCA1 в индукции экспрессии данной РНК.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о роли BRCA1 в экспрессии некодирующей инактивирующей РНК XIST и указывают на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, клеточные линии, BRCA1, экспрессия РНК XIST

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-67-74

## BRCA1 PARTICIPATES IN THE EXPRESSION OF NONCODING XIST RNA

E.A. Shestakova, T.A. Bogush

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** Noncoding RNA of XIST gene (*X inactivation-specific transcript*) initiates inactivation of one of X chromosomes in cells of female organism. Further stages of this process include chromatin epigenetic modifications leading to the inhibition of the most genes on X chromosome. Recently the data were obtained that tumor suppressor BRCA1 is associated with inactive X chromosome (*Xi*) participating in XIST RNA localization on Xi and influencing XIST RNA expression.

**Objective:** to reveal the role of BRCA1 in XIST RNA expression.

**Materials and methods.** The objects of the study were mutant breast cancer cell lines (*BRCA1<sup>-/-</sup>*): HCC1395, HCC1937, SUM149PT, and, as controls – cell lines containing wild type of BRCA1 gene (*BRCA1<sup>+/+</sup>*): IMR90 и 293T. Method of reverse transcription coupled with polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for the analysis of XIST RNA expression.

**Results.** In the clone of doxycycline-inducible HCC1937 breast cancer cell line XIST RNA expression was observed upon BRCA1 induction. In HCC1395, HCC1937 and SUM149PT breast cancer cell lines containing mutant BRCA1 gene (*BRCA1<sup>-/-</sup>*) and nonfunctional BRCA1 protein the absence of XIST RNA expression was observed using RT-PCR. This observation indicates the indispensable role of functional BRCA1 protein in XIST RNA expression.

**Conclusion.** Altogether, the data obtained in this study confirm the role of BRCA1 in the expression of noncoding inhibiting XIST RNA and suggest the involvement of BRCA1 in the inhibition of gene expression on Xi.

**Key words:** breast cancer, cell lines, BRCA1, XIST RNA expression

### Введение

Некодирующая РНК гена *XIST* (*X inactivation-specific transcript*) играет ключевую роль в инактивации и стабилизации структуры одной из двух X-хромосом в клетках женского организма, обеспечивая дозовую компенсацию генов, поскольку в клетках мужского организма имеется одна X-хромосома (XY). Распространение РНК *XIST* по X-хромосоме и эпигенетические модификации хроматина приводят к формированию протяженных гетерохроматиновых участков на неактивной X-хромосоме (inactive X chromosome, Xi) и к ингибированию экспрессии более 90 % генов, локализованных на Xi [1, 2]. Инактивация одной из двух X хромосом – один из самых ярких примеров эпигенетической регуляции генной экспрессии на протяжении всей хромосомы, а не отдельных генов или одной области.

Инактивация X-хромосомы начинается с синтеза РНК *XIST* от центра инактивации, включающего ген *XIST* и локализованного на длинном плече X-хромосомы, Xq13 (X-inactivation centre, Xic). Гетерохроматин Xi связан с определенным участком транскрипта РНК *XIST* и с белками комплекса Polycomb, модифицирующими хроматин, что подавляет транскрипцию генов вследствие инактивации их промоторов. В состав гетерохроматина Xi входят также модифицированный гистон масгоH2A, гипоацетилированные гистоны H3 и H4, убиквитинированный H2A, трижды метилированный по остатку лизина 27 гистон H3 (H3K9me3) и метилированные CpG-островки ДНК [2].

В хромосоме Xi различают 2 неперекрывающихся области гетерохроматина [3]. Одна из областей ассоциирована с РНК *XIST*, гистонами масгоH2A и H3K27me3. Вторая область ассоциирована с гетерохроматин-специфичным белком HP1, гистонами H3K9me3 и H3K20me3. При активации транскрипции РНК *XIST* также модифицируются нуклеосомные гистоны. Гистоны в составе гетерохроматина гипоацетилированы по остаткам лизина и легко связываются с кислыми фосфатными группами ДНК, формируя компактную структуру. Метилирование гистона H3 по остаткам лизина 9 и 27 обуславливает высокоаффинную связь H3 с гетерохроматин-специфичным белком HP1.

Белок BRCA1 обладает активностью E3-убиквитинлигазы и отвечает за убиквитинирование топоизомеразы 11α и модификацию ДНК в гетерохроматиновых районах при ее репликации, включая инактивированную Xi. Обнаружена ко-локализация белка BRCA1 с хромоцентрами и перицентромерным гетерохроматином Xi в поздней S-фазе клеточного цикла [4, 5].

С помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что белок BRCA1 вовлечен во взаимодей-

ствии РНК *XIST* с Xi [6,7]. Известно, что активация экспрессии гена *BRCA1* вдвое усиливает транскрипцию *XIST* и ряда других генов [8]. Некодирующая РНК *XIST* является одним из важнейших компонентов эпигенетической регуляции генов на Xi с участием BRCA1, причем экспрессия самого BRCA1 также регулируется на эпигенетическом уровне [9, 10].

В данном исследовании с использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), клеточных линий рака молочной железы (PMЖ), мутантных по гену *BRCA1* (*BRCA1*<sup>-/-</sup>), и контрольных клеточных линий, содержащих ген *BRCA1* дикого типа (*BRCA1*<sup>+/+</sup>), показано, что BRCA1 может регулировать экспрессию РНК *XIST*, что указывает на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi. Так как BRCA1 может регулировать экспрессию РНК *XIST*, которая участвует в инактивации X-хромосомы и ингибировании около 90 % генов, расположенных на X-хромосоме, следовательно, BRCA1, влияя на экспрессию РНК *XIST*, оказывает влияние через РНК *XIST* также и на экспрессию генов на Xi, вызывая ингибирование транскрипции этих генов.

**Цель исследования** – изучение роли BRCA1 в индукции экспрессии РНК *XIST* на клеточных линиях PMЖ.

### Материалы и методы

**Культуры клеток.** В работе использовали следующие клеточные линии PMЖ, мутантные по гену *BRCA1* (*BRCA1*<sup>-/-</sup>): HCC1937, HCC1395, SUM149PT.

Клеточная линия HCC1937 содержит одну из самых распространенных в российской популяции мутацию (founder mutation) в гене *BRCA1*: 5382insC [11–16]. Клеточная линия HCC1395 содержит мутацию 5251C>T в гене *BRCA1* [16]. Обе клеточные линии – HCC1937 и HCC1395 – относятся к трижды негативному PMЖ (ТНPMЖ), поэтому в клетках не экспрессируются эстрогеновый рецептор (estrogen receptor negative, ER<sup>-</sup>), прогестероновый рецептор (progesterone receptor negative, PR<sup>-</sup>) и рецептор эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2/neu negative, HER2/neu<sup>-</sup>), или ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>, и синтезируется мутантный белок BRCA1 [11, 17]. Эти 2 линии относятся к базально-подобному типу PMЖ [17, 18]. Клетки линий HCC1937 и HCC1395 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей антибиотика, L-глутамин и 10 % эмбриональную телячью сыворотку.

Клетки линии SUM149PT содержат мутацию 2288delT в гене *BRCA1* и синтезируют мутантный белок BRCA1 [11]. В клетках линии SUM149PT не экспрессируются эстрогеновый и прогестероновый рецепторы, но экспрессируется рецептор эпидермального фактора роста человека HER2/neu

(ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>). Клетки SUM149PT культивировали в среде Ham's F-12, содержащей гидрокортизон (1 мкг/мл), инсулин (5 мкг/мл) и 10 % эмбриональную телячью сыворотку.

Диплоидные иммортализованные фибробласты линии IMR90 и эпителиальные клетки эмбриональной почки линии 293T получены от лиц женского пола (XX). Обе линии культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей антибиотики, L-глутамин, незаменимые аминокислоты и 10 % эмбриональную телячью сыворотку.

**Индукция доксициклином клона клеток линии HCC1937, стабильно трансфецированных доксициклин-индуцируемым аллелем BRCA1.** Клетки линии HCC1937, стабильно трансфецированные доксициклин-индуцируемым аллелем BRCA1 (клон 5), обрабатывали доксициклином (doxycycline, Dox) в концентрации 2 мкг/мл в течение 24 ч.

**Флуоресцентная гибридизация *in situ*, сопряженная с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток (иммуноFISH).** Синтез белка BRCA1 и экспрессию РНК *XIST* анализировали с использованием модифицированного метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, сопряженной с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток (иммуноFISH), как описано в работе [19].

Клетки, выросшие на покровных стеклах, помещенных в культуральные чашки, фиксировали 20 мин в 1 % параформальдегиде в фосфатном буфере (PBS), затем 10 мин в метаноле при  $-20^{\circ}\text{C}$ , далее 5 мин пермеабилizировали в растворе 0,1 % Тритона X-100 в PBS и инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к BRCA1 (sc6954, Santa Cruz Biotechnology, 1:4000) и вторичными козьими флуоресцентно-меченными антителами против иммуноглобулинов G мыши (FITC goat anti-mouse IgG, Molecular Probes) по 45 мин при комнатной температуре. После иммунофлуоресцентного окрашивания клетки еще раз фиксировали в 4 % параформальдегиде в PBS и пермеабилizировали в растворе 0,1 % Тритона X-100 в PBS по 3 мин, обрабатывали раствором 0,1 М Tris-HCl pH 7,0 в течение 2 мин и дважды – 2xSSC по 2 мин. Далее клетки дегидратировали в 70, 80, 90 и 100 % этаноле по 2 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  и высушивали на воздухе. Затем клетки обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл) в течение 45 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , промывали, дегидратировали и высушивали на воздухе. С помощью стандартного протокола ник-трансляции (nick translation) 10 нг плазмидного зонда, содержащего вставку РНК *XIST*, метили Spectrum Red (Amersham-Pharmacia). Пробу, помещенную в раствор для гибридизации, содержащий 75 % формамид, 10 % декстран сульфат, 2xSSC, 2,5 мг (50 мкл) одноцепочечной ДНК из спермы лосося (Boehringer), денатурировали 5 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ . Каплю этого рас-

творя с денатурированной пробой наносили на чистое предметное стекло и закрывали покровным стеклом с клетками, мечеными флуоресцентными антителами. Для денатурации ДНК в клетках стекла прогревали 5 мин при  $80^{\circ}\text{C}$ , а затем инкубировали с пробой в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$ . Далее покровные стекла с клетками по 30 мин промывали в 2xSSC при  $37^{\circ}\text{C}$ , в 1xSSC и в 0,5xSSC – при комнатной температуре. Для флуоресцентной микроскопии клетки на покровном стекле заключали в каплю среды Мовиол (Mounting media), нанесенную на чистое предметное стекло.

**Проведение ОТ-ПЦР.** РНК выделяли из культуры клеток с использованием набора реагентов RNA-Mini kit (Qiagen) по инструкции производителя. Для синтеза кДНК на матрице геномной РНК использовали набор реагентов Superscript One-Step RT-PCR (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Последующую ПЦР проводили с парой праймеров – прямым и обратным, комплементарными концу экзона 5 (5'-GTGCAGAGAGCTGAGTCTTCAGC) и началу экзона 6 (5'-GCAAAGGCACACGAAAGA-AATTAGC) гена *XIST* соответственно.

Реакционная смесь в общем объеме 50 мкл содержала 5 мкл 10-кратного буфера для полимеразы Taq (Taq polymerase), 3 мкл 25 мМ раствора  $\text{MgCl}_2$  (конечная концентрация в реакционной смеси 1,5 мМ), 0,4 мкл смеси 4 дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), каждый в концентрации 25 мМ (конечная концентрация каждого из нуклеотидов в реакционной смеси 200 мкМ), 1 мкл раствора кДНК, 2 мкл прямого и 2 мкл обратного праймера, 0,5 мкл полимеразы Taq (Sigma) и 36,1 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ .

ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл при  $94^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин, 25 циклов при  $94^{\circ}\text{C}$  в течение 30 с, далее при  $68^{\circ}\text{C}$  в течение 30 с и затем при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин 30 с; 1 цикл при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин; охлаждали при  $4^{\circ}\text{C}$ .

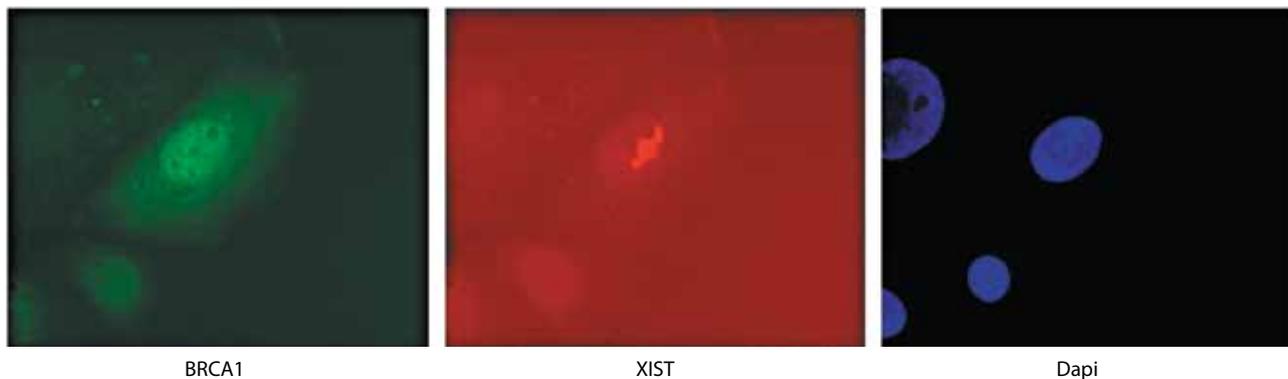
Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

#### Результаты и обсуждение

**Индукция Dox клона клеток HCC1937, стабильно трансфецированных Dox-индуцируемым аллелем BRCA1, приводит к экспрессии РНК *XIST*.**

Мы неоднократно обнаруживали ранее, что BRCA1 участвует в ассоциации некодирующей РНК *XIST* с Xi. Кроме того, полученные нами результаты подтверждают роль BRCA1 в регуляции экспрессии РНК *XIST*.

Мы показали, что при экспрессии BRCA1, индуцированной Dox, в ядрах у части клеток выявляется большое количество РНК *XIST*, что указывает на участие BRCA1 в активации транскрипции РНК *XIST* (рис. 1). В частности, среди 293 Dox-индуцированных



BRCA1

XIST

Dapi

**Рис. 1.** Индукция *Dox* клонированных клеток *HCC1937*, стабильно трансфицированных *Dox*-индуцируемым аллелем *BRCA1*, приводит к экспрессии РНК *XIST*. Клетки обрабатывали *Dox* в концентрации 2 мкг/мл в течение 24 ч и анализировали методом иммуноFISH. Микрофотографии получены с помощью флуоресцентной микроскопии. *BRCA1* – FITC, РНК *XIST* – Spectrum Red

клеток наблюдалось 9 трансфицированных клеток, которые экспрессировали *BRCA1*. При этом в 8 (89 %) из этих *BRCA1*-экспрессирующих клеток наблюдалось накопление РНК *XIST* в ядрах (см. рис. 1). В 319 контрольных клетках, которые не инкубировали с *Dox*, экспрессии *BRCA1* и накопления РНК *XIST* не наблюдалось.

Полученные данные согласуются с результатами G.J. Pageau и соавт. [20], показавших, что в клетках линии *HCC1937*, стабильно синтезирующих белок *BRCA1*, выявляется транскрипция локуса *XIST* – одного из генов, экспрессия которого усиливается в результате индукции экспрессии *BRCA1* [8].

В данных экспериментах при *Dox*-индуцированной экспрессии *BRCA1* в ядрах доли клеток выявляется область, содержащая большое количество РНК *XIST*, не всегда совпадающая с локусом гена *XIST* на *Xi*. В связи с этими данными следует упомянуть работу S.M. Sitchia и соавт. [21], в которой на клеточной линии РМЖ *MCF7* показано, что большие количества РНК *XIST* в ядрах клеток РМЖ не обязательно связаны с наличием *Xi* и не всегда перекрываются с областями *X*-хромосомы.

Клетки ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395*, содержащие мутантный белок *BRCA1*, не экспрессируют РНК *XIST*.

Анализ экспрессии РНК *XIST* методом ОТ-ПЦР в различных клеточных линиях показал, что клеточные линии, не синтезирующие белок *BRCA1* (*BRCA1*<sup>-/-</sup>), не экспрессируют РНК *XIST*, в то время как контрольные клеточные линии, синтезирующие белок *BRCA1* (*BRCA1*<sup>+/+</sup>), экспрессируют значительные количества РНК *XIST* (рис. 2, 3).

Для анализа экспрессии РНК *XIST* методом ОТ-ПЦР использовали клеточную линию *HCC1937* с преобладающей среди пациентов с наследственным РМЖ мутацией в экзоне 20 гена *BRCA1*: 5382insC [11–16], а также клетки линии *HCC1395* с мутацией 5251C>T в гене *BRCA1* [16]. Обе эти линии относятся

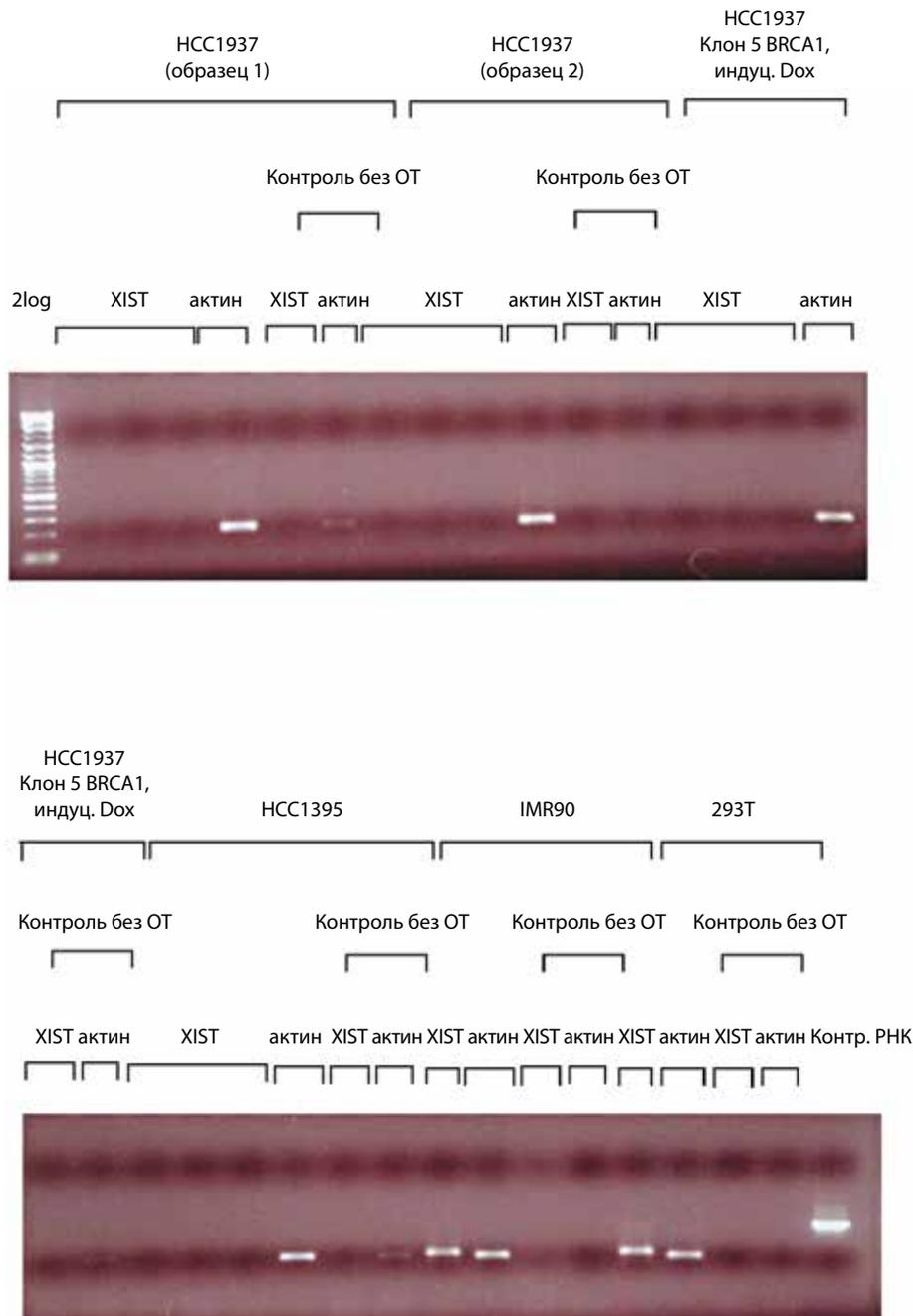
к ТНРМЖ и не экспрессируют рецепторы эстрогенов (ER<sup>-</sup>), прогестерона (PR<sup>-</sup>) и эпидермального фактора роста человека (HER2/neu<sup>-</sup>), т.е. являются ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>. Однако в клетках этих линий синтезируется мутантный белок *BRCA1* [11, 17]. Обе линии относятся к базальноподобному типу РМЖ [17, 18].

Как показано на рис. 2, РНК *XIST* не выявлена ни в одной из двух указанных линий ТНРМЖ, содержащих нефункциональный мутантный белок *BRCA1*. Для сравнения, экспрессия актина в клетках линий *HCC1937* и *HCC1395* соответствовала норме (см. рис. 2). Отсутствие РНК *XIST* в клетках *BRCA1*<sup>-/-</sup> может быть также связано с потерей этими клетками *Xi*, которая наблюдается в некоторых клетках *BRCA1*<sup>-/-</sup> [22].

В качестве контроля использовали диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии *IMR90* и эпителиальные клетки эмбриональной почки человека линии *293T*, в которых экспрессируется ген *BRCA1* дикого типа и, следовательно, функциональный белок *BRCA1*. Как показано на рис. 2, в этих клетках наблюдается экспрессия РНК *XIST*, а также референсной РНК актина.

Так как в методе ОТ-ПЦР используется стадия обратной транскрипции, в которой с РНК синтезируется комплементарная ДНК (кДНК) с помощью фермента ОТ, были проведены контрольные реакции с отсутствием стадии ОТ, для того чтобы удостовериться, что в препарате выделенной геномной РНК нет примесей геномной ДНК. С примесью геномной ДНК может синтезироваться продукт реакции ПЦР с помощью полимеразы Taq, узнающей субстрат ДНК. Оказалось, что при проведении ПЦР без предшествующей стадии ОТ не наблюдалось продукта реакции ПЦР, что говорит об отсутствии примесей геномной ДНК в препарате выделенной геномной РНК (см. рис. 2).

В наших экспериментах РНК *XIST* не была идентифицирована в клетках *HCC1937* клон 5, стабильно трансфицированных *Dox*-индуцируемым аллелем



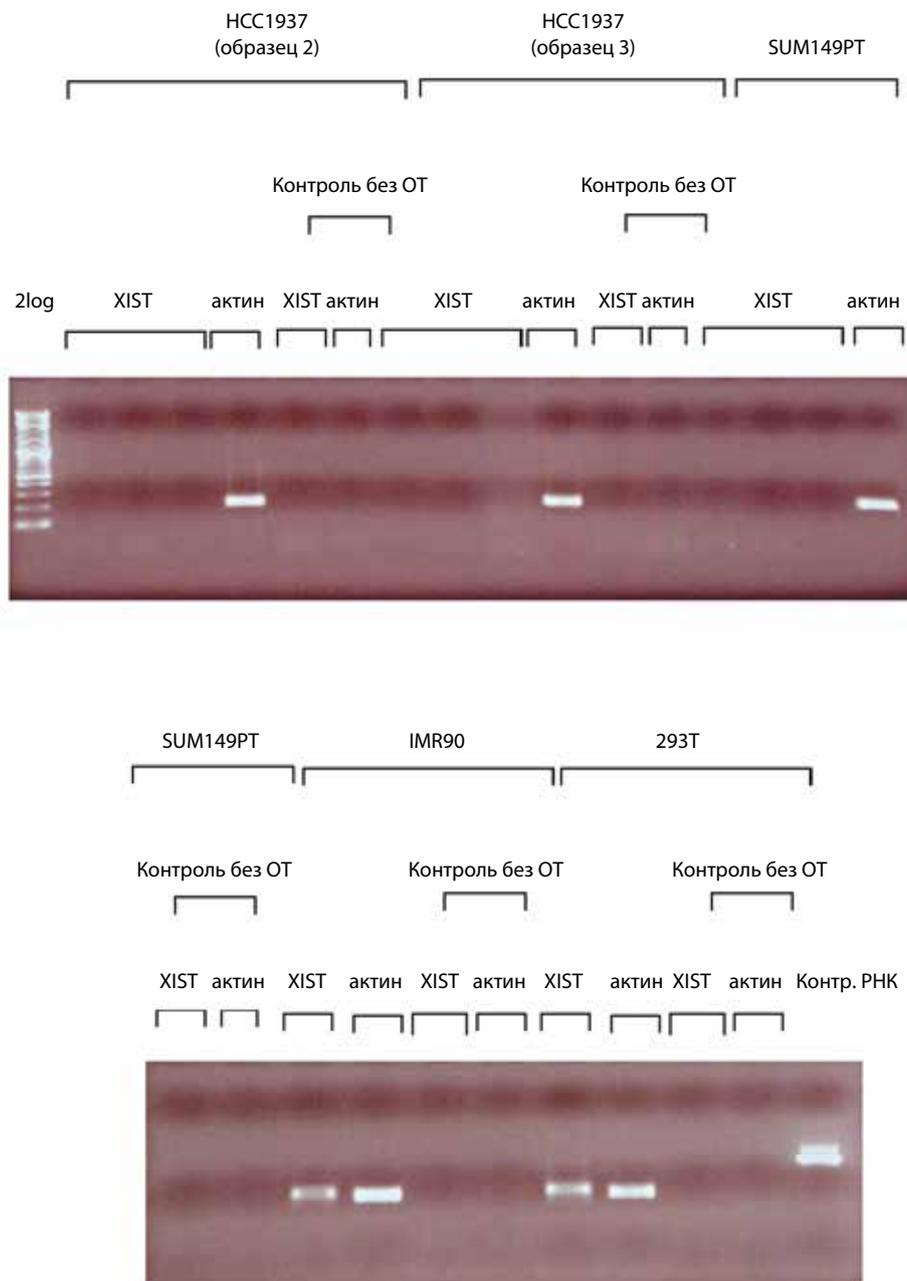
**Рис. 2.** Анализ уровня экспрессии РНК *XIST* в клетках ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395* с использованием ОТ-ПЦР. На рисунке представлен гель с продуктами ОТ-ПЦР, окрашенный бромидом этидия

*BRCA1*, в случае, когда синтез *BRCA1* был индуцирован Dox (см. рис. 2). Возможно, это было связано с тем, что очень малое количество клеток экспрессировало *BRCA1* (~3 %, 9 из 293). Возможно также, что 3 % – это немного завышенное процентное содержание клеток, синтезирующих белок *BRCA1*, так как в данном случае были посчитаны около 300 клеток. Если посчитать 1000 клеток и более, то может оказаться, что меньше 1 % клеток синтезирует белок *BRCA1* и еще немного меньше клеток экспрессирует РНК

*XIST*. Такое малое количество РНК *XIST*, по-видимому, не выявляется методом стандартной ПЦР, использованной в данных экспериментах, но может выявиться при применении ПЦР в реальном времени.

**Клетки РМЖ линии SUM149PT, содержащие мутантный белок *BRCA1*, не экспрессируют РНК *XIST*.**

Мы оценили уровни экспрессии РНК *XIST* в клеточной линии SUM149PT с мутацией 2288delT в гене



**Рис. 3.** Анализ уровня экспрессии РНК *XIST* в клетках РМЖ линии *SUM149PT* с использованием ОТ-ПЦР. На рисунке представлен гель с продуктами ОТ-ПЦР, окрашенный бромидом этидия

*BRCA1* и мутантным белком *BRCA1* [11] (см. рис. 3). В отличие от клеток ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395*, в клетках линии *SUM149PT* не экспрессируются эстрогеновый и прогестероновый рецепторы, но экспрессируется рецептор эпидермального фактора роста человека ( $ER^-/PR^-/HER2/neu^+$ ).

Оказалось, что в клетках РМЖ линии *SUM149PT*, как и в клетках ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395*, содержащих нефункциональный мутантный белок *BRCA1*, экспрессии РНК *XIST* не наблюдалось (см. рис. 3).

### Заключение

В клетках некоторых линий РМЖ, содержащих мутантный ген *BRCA1* и соответствующий нефункциональный белок *BRCA1*, экспрессия РНК *XIST* отсутствует. Это указывает на возможный вклад *BRCA1* в регуляцию экспрессии РНК *XIST*.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли *BRCA1* в экспрессии некодирующей ингибирующей РНК *XIST* и позволяют предположить участие *BRCA1* в ингибировании экспрессии генов на  $X_i$ , обусловленном влиянием *BRCA1* на ас-

социацию РНК *XIST* с *Xi*. Полученные данные согласуются с работой [23], выполненной с использованием анализа герминальных мутаций в больших популяциях больных спорадическим и наследственным РМЖ и/или раком яичников. В случае мутантного *BRCA1* нарушаются экспрессия и ассоциация РНК *XIST* с транскрипционно неактивной X-хро-

мосомой, а также эпигенетическая трансрегуляция генной экспрессии. Помимо этого, нарушаются убиквитинирование топоизомеразы *11α* и структура гетерохроматиновых районов генома, включая инактивированную X-хромосому, что может привести к накоплению ошибок репликации и репарации ДНК и в итоге к развитию патологий, включая РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Galupa R., Heard E. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2015;31:57–66. DOI: 10.1016/j.gde.2015.04.002. PMID: 26004255.
- Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(3):247–55. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.03.005. PMID: 15145348.
- Chadwick B.P., Willard H.F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(50):17450–5. DOI: 10.1073/pnas.0408021101. PMID: 15574503.
- Chadwick B.P., Lane T.F. *BRCA1* associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma* 2005;114(6):432–9. DOI: 10.1007/s00412-005-0029-1. PMID: 16240122.
- Pageau G.J., Lawrence J.B. *BRCA1* foci in normal S-phase nuclei are linked to interphase centromeres and replication of pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* 2006;175(5):693–701. DOI: 10.1083/jcb.200602055. PMID: 17145961.
- Ganesan S.C., Silver D.P., Greenberg R.A. et al. *BRCA1* supports *XIST* RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002;111(3):393–405. PMID: 12419249.
- Silver D.P., Dimitrov S.D., Feunteun J. et al. Further evidence for *BRCA1* communication with the inactive X chromosome. *Cell* 2007;128(5):991–1002. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.025. PMID: 17350581.
- Welsh P.L., Lee M.K., Gonzalez-Hernandez R.M. et al. *BRCA1* transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(11):7560–5. DOI: 10.1073/pnas.062181799. PMID: 12032322.
- Shestakova E.A. Epigenetic regulation of *BRCA1* expression and its role in breast cancer stem cell development. *Turk J Biol* 2016;40(5):981–9. DOI: 10.3906/biy-1507-145.
- Богуш Т.А., Шестакова Е.А., Вихлянцева Н.О. и др. Эпигенетические механизмы регуляции *BRCA1*. *Онкогинекология* 2017;23(2):4–11. [Bogush T.A., Shestakova E.A., Vikhlyantseva N.O. et al. Epigenetic mechanisms of regulation of *BRCA1*. *Онкогинекология* = *Oncogynecology* 2017;23(2):4–11. (In Russ.)].
- Elstrodt F., Hollestelle A., Nagel J.H. et al. *BRCA1* mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* 2006;66(1):41–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2853. PMID: 16397213.
- Karami F., Mehdi-pour P. A comprehensive focus on global spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:928562. DOI: 10.1155/2013/928562. PMID: 24312913.
- Wang F., Fang Q., Ge Z. et al. Common *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Rep* 2012;39(3):2109–18. DOI: 10.1007/s11033-011-0958-0. PMID: 21643751.
- Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Kroeze K. et al. Non-founder *BRCA1* mutations in Russian breast cancer patients. *Cancer Lett* 2010;298(2):258–63. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.07.013. PMID: 20727672.
- Stadler Z.K., Salo-Mullen E., Patil S.M. et al. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jewish families with breast and pancreatic cancer. *Cancer* 2012;118(2):493–9. DOI: 10.1002/cncr.26191. PMID: 21598239.
- Stephens P.J., McBride D.J., Lin M.L. et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 2009;462(7276):1005–10. DOI: 10.1038/nature08645. PMID: 20033038.
- Olsson E., Winter C., George A. et al. Mutation screening of 1,237 cancer genes across Six model cell lines of basal-like breast cancer. *PLoS One* 2015;10(12):e0144528. DOI: 10.1371/journal.pone.0144528. PMID: 26670335.
- Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121(7):2750–67. DOI: 10.1172/JCI45014. PMID: 21633166.
- Robert-Forcel I., Junera H.R., Geraud G. et al. Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 1993;102(3):146–57. PMID: 7681367.
- Pageau G.J., Hall L.L., Lawrence J.B. *BRCA1* does not paint the inactive X to localize *XIST* RNA but may contribute to broad changes in cancer that impact *XIST* and *Xi* heterochromatin. *J Cell Biochem* 2007;100(4):835–50. DOI: 10.1002/jcb.21188. PMID: 17146760.
- Sirchia S.M., Tabano S., Monti L. et al. Misbehaviour of *XIST* RNA in breast cancer cells. *PLoS One* 2009;4(5):e5559. DOI: 10.1371/journal.pone.0005559. PMID: 19440381.
- Richardson A.L., Wang Z.C., De Nicolo A. et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006;9(2):121–32. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.01.013. PMID: 16473279.
- Поспехова Н.И. Комплексный анализ наследственной формы рака молочной железы и/или яичников: молекулярно-генетические и фенотипические характеристики. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2011. [Pospekhova N.I. Complex analysis of hereditary form of breast and/or ovarian cancer: molecular genetic and phenotypic characteristics. Author's abstract of thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 2011. (In Russ.)].

**Благодарности**

Выражаю благодарность профессору Дэвиду М. Ливингстону (Prof. D.M. Livingston) за финансирование и общее руководство данным исследованием, выполненным в Онкологическом институте Дана–Фарбер (Бостон, США). Представленное исследование поддержано грантами Национального института онкологических исследований (США) (National Cancer Institute, USA), Фонда по исследованиям в области рака молочной железы (США) (Breast Cancer Research Foundation, USA), Института по биомедицинским исследованиям Novartis (США) (Novartis Institute for Biomedical Research, USA), выданными профессору Дэвиду М. Ливингстону (Prof. D.M. Livingston).

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Е.А. Шестакова/E.A. Shestakova: <https://orcid.org/0000-0002-0158-4605>

Т.А. Богдаш/Т.А. Bogdash: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.