

BRCA1 УЧАСТВУЕТ В ЛОКАЛИЗАЦИИ РНК XIST НА НЕАКТИВНОЙ X-ХРОМОСОМЕ

Е.А. Шестакова, Т.А. Богущ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Анатольевна Шестакова elenaanshestakova@mail.ru

Введение. Инактивированная X-хромосома (Xi) ассоциирована с некодирующей РНК XIST, с целым рядом белков и содержит многочисленные эпигенетические модификации хроматина, что приводит к ингибированию экспрессии большинства генов на этой хромосоме. В последние годы были получены данные, свидетельствующие о том, что супрессор опухолей BRCA1 также взаимодействует с Xi.

Цель исследования – выявить колокализацию BRCA1 и РНК XIST и детально проанализировать пространственную организацию BRCA1 и РНК XIST на Xi с помощью конфокальной микроскопии с высоким пространственным разрешением и контрастом.

Материалы и методы. Объектом исследования служили диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии IMR90hTERT. Для локализации BRCA1 и РНК XIST на Xi использовали метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, сопряженный с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток, и конфокальную микроскопию. Для локализации BRCA1 и белков гетерохроматина-1 использовали метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток и традиционную флуоресцентную микроскопию.

Результаты. Впервые исследования, проведенные с использованием конфокальной микроскопии, продемонстрировали на более высоком уровне разрешения, чем было представлено в предыдущих работах, колокализацию BRCA1 с зоной РНК XIST на Xi, выявленную с зондами к РНК XIST. С помощью BrdU выявлена также локализация BRCA1 с реплицирующимися участками Xi и аутосомами в поздней S-фазе клеточного цикла. В целом приведенные данные позволяют предположить участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi, обусловленном влиянием BRCA1 на ассоциацию РНК XIST с Xi. Помимо этого, впервые с использованием конфокальной микроскопии выявлена колокализация BRCA1 с реплицирующимися Xi и аутосомами, идентифицированными с использованием BrdU, в поздней S-фазе клеточного цикла, что указывает на возможное участие этого белка в репликации перичентромерных повторов хромосом. В поддержку этой гипотезы также свидетельствуют данные о колокации BRCA1 с белком гетерохроматина-1 α , присутствующим в перичентромерных участках всех хромосом.

Заключение. Полученные данные указывают на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi в результате регуляции ассоциации некодирующей ингибирующей РНК XIST с Xi, а также в репликации гетерохроматиновых участков хромосом.

Ключевые слова: BRCA1, РНК XIST, инактивированная X-хромосома (Xi), колокализация, конфокальная микроскопия

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-21-26

BRCA1 PARTICIPATES IN XIST RNA LOCALIZATION ON INACTIVE X CHROMOSOME

E.A. Shestakova, T.A. Bogush

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. Inactive X chromosome (Xi) is associated with noncoding XIST RNA, series of proteins and contains multiple epigenetic modifications that altogether determine a silence of the most of X-linked genes. Recently the data were obtained that tumor suppressor BRCA1 is also associated with Xi.

The purpose of this study was to reveal the colocalization of BRCA1 and XIST RNA and precise spatial organization on Xi with the high resolution of confocal microscopy.

Materials and methods. The object of the study is IMR90hTERT diploid immortalized fibroblast cell line. For BRCA1 and XIST RNA colocalization analysis on Xi the method of fluorescent hybridization *in situ* associated with immunofluorescent cell staining (immunoFISH) and confocal microscopy were used. For BRCA1 and heterochromatin protein-1 colocalization study the method of double immunofluorescent staining and common fluorescent microscopy were applied.

Results. The study using confocal fluorescent microscopy with higher resolution has demonstrated at first the colocalization of BRCA1 with XIST RNA region of Xi revealed with XIST RNA probes and with replicating Xi and autosomes revealed with BrdU in late S-phase of cell cycle. Altogether, the data obtained suggest the involvement of BRCA1 in the inhibition of gene expression on Xi due to the regulation of XIST RNA association with Xi. Moreover, according to the results of confocal microscopy, BRCA1 also colocalizes with replicating Xi and autosomes revealed with BrdU in late S-phase of cell cycle. This indicates a possible involvement of this protein in the replication of pericentromeric repeats in cellular chromosomes. Colocalization of BRCA1 with heterochromatin protein-1 α presented in pericentromeric regions of all chromosomes supports this suggestion.

Conclusions. Altogether, the data obtained in this study suggest the involvement of BRCA1 in the inhibition of gene expression on Xi due to the association with noncoding inhibiting XIST RNA and in replication of heterochromatin regions.

Key words: BRCA1, XIST RNA, inactive X chromosome (Xi), colocalization, confocal microscopy

Введение

Инактивация одной из двух X-хромосом (Xi) в эмбриональном развитии самок млекопитающих приводит к дозовой компенсации генов и представляет собой яркий пример эпигенетической регуляции экспрессии генов, затрагивающей одновременно всю хромосому [1–3]. Формирование транскрипционно неактивной Xi включает ее инициацию и необратимую инактивацию. На стадии инициации наблюдаются ассоциация РНК XIST с хроматином, ингибирование транскрипции и запаздывание репликации Xi. В ходе необратимой инактивации происходит ассоциация белков группы Polysomb, модификация гистонов H3 и H4, ассоциация гистона MacroH2A, метилирование CpG островков в ДНК [3].

В полностью инактивированной Xi различают 2 неперекрывающихся области [4]. Одна из областей ассоциирована с РНК XIST, гистонами MacroH2A и H3, трижды метилированным по остатку лизина 27, в то время как другая область ассоциирована с белком гетерохроматина-1 (heterochromatin protein-1, HP1) и гистонами H3, трижды метилированным по остатку лизина 9, гистонами H3, трижды метилированным по остатку лизина 20. Активация транскрипции РНК XIST также сопровождается модификациями нуклеосомных гистонов.

В 2005 г. В.Р. Chadwick и Т.Ф. Lane обнаружили, что BRCA1 частично колокализуется с инактивированной Xi в поздней S-фазе клеточного цикла [5], что предполагает участие BRCA1 также и в репликации Xi. На основании того, что BRCA1 колокализуется с хромоцентрами, G.J. Pageau и J.B. Lawrence предположили участие BRCA1 в репликации перичентромерного гетерохроматина [6].

В наших работах было показано, что BRCA1 участвует в ассоциации некодирующей инактивирующей РНК XIST с Xi. Однако иммунофлуоресцентный анализ проводили с использованием традиционной флуоресцентной микроскопии, не позволяющей получить микрофотографии с высоким разрешением [7, 8].

Некодирующая РНК XIST играет важную роль в эпигенетической регуляции генов, и BRCA1 участвует в этих процессах. Следует также отметить, что экспрессия самого BRCA1 также регулируется на эпигенетическом уровне [9, 10].

В данном исследовании мы применили высоко-разрешающую конфокальную микроскопию. Это позволило детально изучить пространственную организацию и колокализацию BRCA1 и РНК XIST

на Xi и предположить участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов, локализованных на Xi.

Цель исследования – определение пространственной локализации BRCA1 и РНК XIST на Xi с помощью высокоразрешающей конфокальной микроскопии.

Материалы и методы

Культуры клеток. Диплоидные иммортализованные фибробласты линии IMR90hTERT, созданные путем интеграции hTERT в геном клеток IMR90 в результате ретровирусной трансдукции, культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей антибиотики, L-глутамин, несущественные аминокислоты и 10 % эмбриональную телячью сыворотку. Клеточный цикл блокировали путем инкубации клеток с 0,5 мМ мимозина в течение 17 ч, далее клетки отмывали от мимозина и фиксировали через 18 ч для последующего анализа с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, сопряженной с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток, или двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток и конфокальной микроскопии.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*, сопряженная с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток. Флуоресцентная гибридизация *in situ*, сопряженная с иммунофлуоресценцией, была выполнена, как описано в работе [11], с небольшими модификациями. Клетки фиксировали 1 % параформальдегидом в фосфатном буфере 20 мин, затем в метаноле при -20°C 10 мин, пермеабилizировали раствором 0,1 % Тритона X-100 в фосфатном буфере 5 мин и инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к BRCA1 (sc6954, Santa Cruz Biotechnology, 1 : 4000) в течение 45 мин при комнатной температуре и вторичными флуоресцентно-мечеными козыми антителами против иммуноглобулинов G мыши (FITC goat anti-mouse IgG, Molecular Probes) в течение 45 мин при комнатной температуре. После иммунофлуоресцентного окрашивания клетки еще раз фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в фосфатном буфере 3 мин, пермеабилizировали раствором 0,1 % Тритона X-100 в фосфатном буфере 3 мин, обрабатывали раствором 0,1 М Tris-HCl, pH 7,02 мин и дважды в растворе $2 \times \text{SSC}$ по 2 мин. Далее клетки дегидратировали в 70, 80, 90 и 100 % этаноле при 4°C по 2 мин, высушивали и проводили гибридизацию *in situ*. Клетки гибридизовали с 10 нг

плазмидного зонда для РНК *XIST*. Плазмиду метили Spectrum Red (Amersham Pharmacia) с помощью стандартных протоколов ник-трансляции. Пробу в растворе, содержащем 75 % формамид, 10 % декстран сульфат, $2 \times$ SSC, 2,5 мг одноцепочечной ДНК из спермы лосося (Boehringer), 50 мкл, денатурировали при 95 °C 5 мин. Покровные стекла с клетками помещали на предметные, на которые наносили каплю раствора с денатурированной меченой плазмидной ДНК. Гибридизацию проводили на стеклах в течение 5 мин при 80 °C (денатурация клеточной ДНК), а затем в течение ночи при 37 °C. После этого покровные стекла с клетками промывали в $2 \times$ SSC 30 мин при 37 °C, в $1 \times$ SSC – 30 мин при комнатной температуре, в $0,5 \times$ SSC – 30 мин при комнатной температуре и помещали на стекла с нанесенной каплей мовиола (Mounting media) для последующего изучения с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к BRCA1 (Millipore) и моноклональными антителами к HP1 α , HP1 β или HP1 γ (Euromedex) в течение 45 мин при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали со вторичными козыими флуоресцентно-мечеными антителами против иммуноглобулинов G кролика или мыши (Rhodamine-Red goat anti-rabbit или FITC goat anti-mouse IgG, Molecular Probes) в течение 45 мин при комнатной температуре.

Конфокальная микроскопия. Микрофотографии клеток получены с использованием конфокального микроскопа Zeiss, LSM510 Meta и программного обеспечения LSM510 software.

Результаты и обсуждение

Пространственная организация BRCA1 и РНК *XIST* на Xi, выявленная с использованием конфокальной микроскопии

Известно, что BRCA1 локализуется вместе с Xi в основном в средней/поздней S-фазе клеточного цикла. Поэтому для конфокальной микроскопии мы использовали синхронизированные с помощью мимозина диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии IMR90hTERT, созданные путем интеграции hTERT в геном клеток IMR90 в результате ретровирусной трансдукции.

Клеточная культура, синхронизированная с использованием 0,5 мМ мимозина в течение 17 ч и далее в его отсутствие инкубированная в течение 18 ч, содержала по данным окрашивания йодидом пропидия и проточной цитофлуориметрии 17 % клеток в фазе G₁, 61 % клеток в фазе G₂ и 22 % клеток в фазе S. Таким образом, с помощью конфокальной

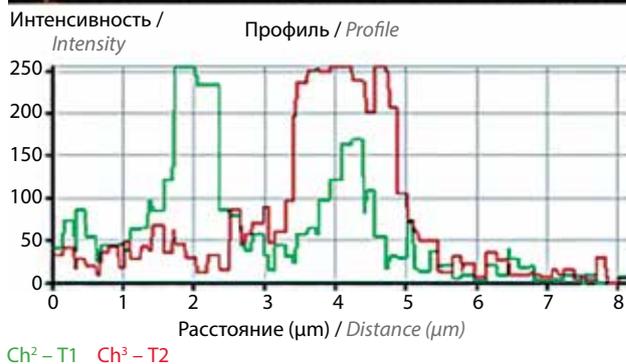
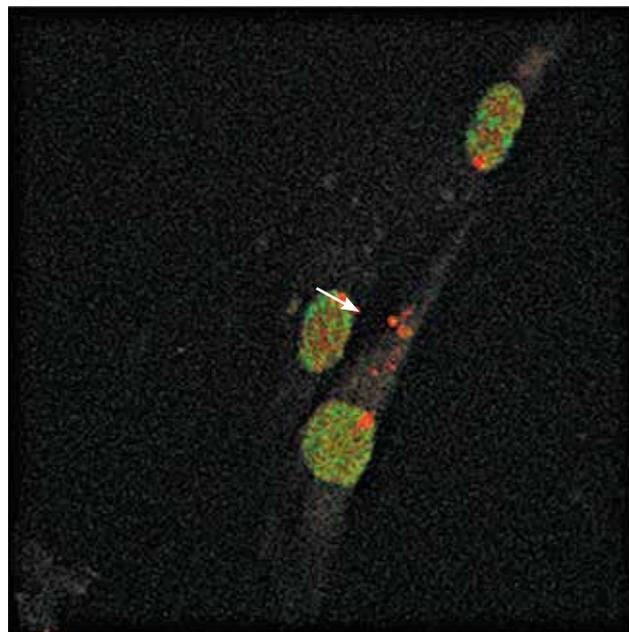


Рис. 1. Колокализация BRCA1 и РНК *XIST* в поздней S-фазе клеточного цикла. Результаты конфокальной микроскопии диплоидных иммортализованных фибробластов линии IMR90hTERT, зафиксированных через 18 ч после остановки инкубации с мимозином, блокирующим клеточный цикл. Количественное распределение клеток в различных фазах клеточного цикла, полученное с помощью проточной цитофлуориметрии: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-FITC и *XIST*-Spectrum Red

Fig. 1. BRCA1 and *XIST* RNA colocalization in the late S-phase of the cell cycle. Results of confocal microscopy of IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts fixed 18 hours after the end of incubation with mimosine blocking the cell cycle. Quantitative distribution of the cells in different phases of the cell cycle obtained using flow cytometry: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Labeled BRCA1-FITC and *XIST*-Spectrum Red were used for fluorescent microscopy

микроскопии мы анализировали популяцию клеток IMR90hTERT в поздней фазе S клеточного цикла.

На рис. 1 показано, что в поздней S-фазе клеточного цикла белок-супрессор BRCA1 частично локализуется вместе с Xi, выявленной с помощью метода РНК-FISH, зондов для РНК *XIST*, антител к BRCA1 и высокоразрешающей конфокальной микроскопии. Вверху рис. 1 приведена микрофотография оптического среза через ядра 3 клеток, полученная на конфокальном микроскопе. Через зону Xi, четко выявляемую

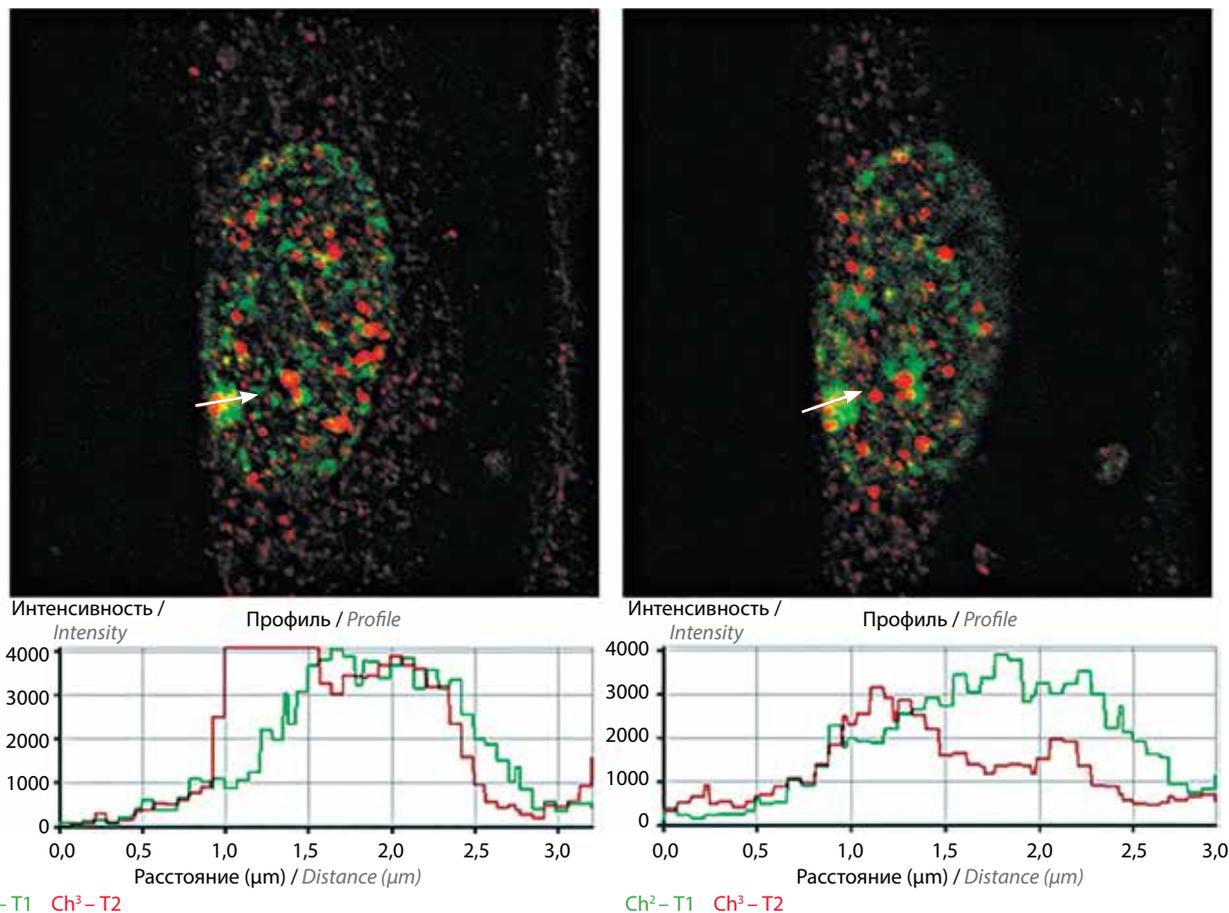


Рис. 2. Колокализация BRCA1 и Xi, выявленной с помощью BrdU, в поздней S-фазе клеточного цикла. Результаты конфокальной микроскопии диплоидных иммортализованных фибробластов линии IMR90hTERT, зафиксированных через 18 ч после остановки инкубации с мимозином. Количественное распределение клеток в различных фазах клеточного цикла, полученное с помощью проточной цитофлуориметрии: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC

Fig. 2. BRCA1 and Xi colocalization detected using BrdU in the late S-phase of the cell cycle. Results of confocal microscopy of IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts fixed 18 hours after the end of incubation with mimosine blocking the cell cycle. Quantitative distribution of the cells in different phases of the cell cycle obtained using flow cytometry: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Labeled BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC were used for fluorescent microscopy

зондами к РНК XIST (красная область), проведена стрелка белого цвета. На графике внизу рисунка представлен профиль интенсивности флуоресценции вдоль указанной стрелки белого цвета. Красная кривая соответствует сигналу Spectrum Red для РНК XIST и зеленая – сигналу FITC для BRCA1. Вдоль стрелки, проведенной через Xi, видны зоны выраженной колокализации сигналов BRCA1 и РНК XIST, умеренной колокализации этих сигналов и участки, где такие сигналы отсутствуют, что говорит о частичной колокализации BRCA1 и РНК XIST на Xi.

Аналогичные результаты были получены с применением BrdU для меченя Xi в поздней S-фазе клеточного цикла. На рис. 2 представлены 2 оптических среза через ядро одной и той же клетки. Обнаружено, что в поздней S-фазе клеточного цикла BRCA1 частично колокализуется с Xi, выявленной

с использованием меченя клеток BrdU, антител к BRCA1 и BrdU, и высокоразрешающей конфокальной микроскопии. Вверху рис. 2 приведены микрофотографии оптических срезов через ядро одной и той же клетки, полученные с помощью конфокальной микроскопии. На каждом из срезов через зону Xi, четко выявляемую антителами к BrdU (зеленая плотная область), проведена стрелка белого цвета. На графиках в нижней части рис. 2 представлены профили интенсивности флуоресценции вдоль этих стрелок. Зеленая кривая соответствует сигналу FITC для BrdU на Xi, а красная – сигналу Rhodamine-Red для BRCA1. Видно, что вдоль стрелки, проведенной через Xi, присутствуют зоны выраженной колокализации сигналов BRCA1 и BrdU, умеренной колокализации этих сигналов и участки без указанных сигналов, что также указывает на частичную колокализацию BRCA1 и Xi.

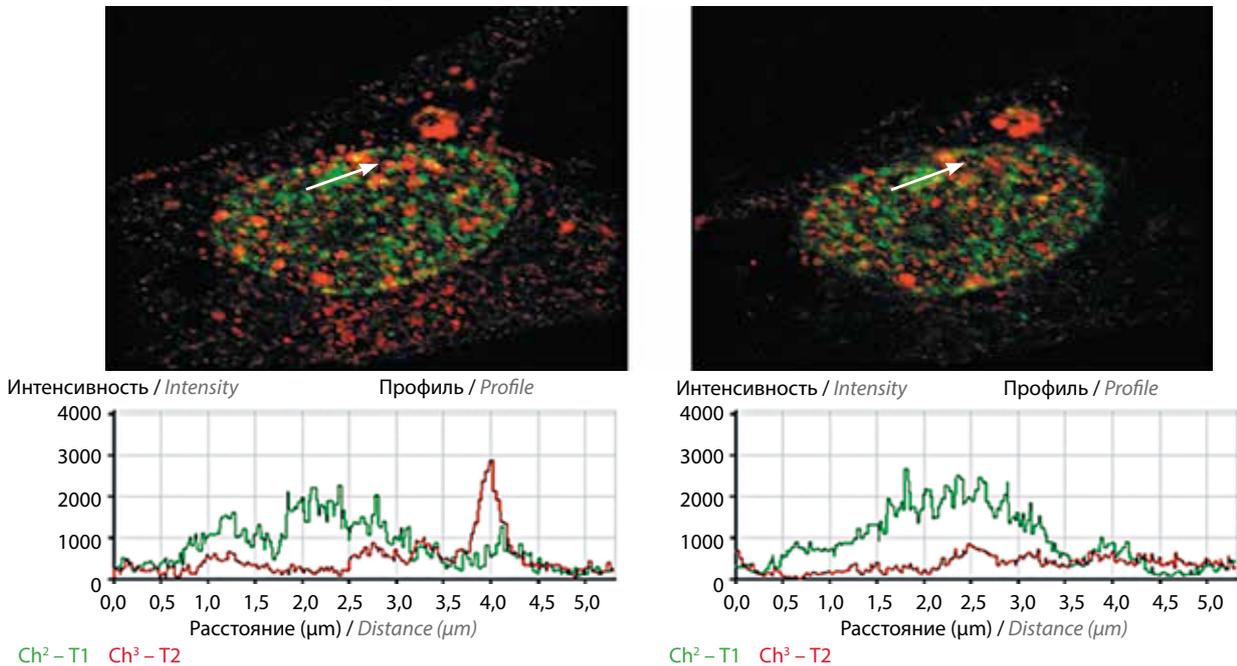


Рис. 3. Колокализация BRCA1, Xi и других локусов, выявленных с помощью BrdU, в поздней S-фазе клеточного цикла. Результаты конфокальной микроскопии диплоидных иммортализованных фибробластов линии IMR90hTERT, зафиксированных через 18 ч после остановки инкубации с мимозином. Количественное распределение клеток в различных фазах клеточного цикла, полученное с помощью проточной цитофлуориметрии: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC

Fig. 3. BRCA1, Xi and other loci colocalization detected using BrdU in the late S-phase of the cell cycle. Results of confocal microscopy of IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts fixed 18 hours after the end of incubation with mimosine blocking the cell cycle. Quantitative distribution of the cells in different phases of the cell cycle obtained using flow cytometry: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Labeled BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC were used for fluorescent microscopy

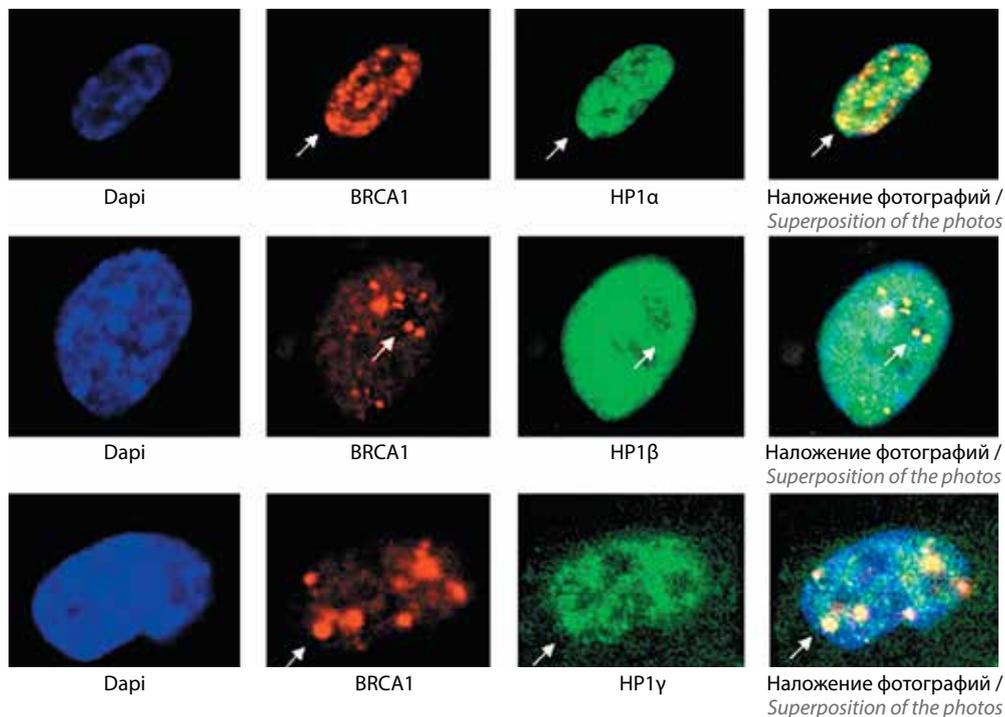


Рис. 4. BRCA1 колокализуется с белком гетерохроматина-1. Диплоидные иммортализованные фибробласты линии IMR90hTERT проанализированы с помощью метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания и обычной флуоресцентной микроскопии. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-Rhodamine-Red, HP1α-FITC, HP1β-FITC, HP1γ-FITC

Fig. 4. BRCA1 is colocalized with heterochromatin protein 1. IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts was analyzed using double immunofluorescent staining and fluorescent microscopy. Labeled BRCA1-Rhodamine-Red, HP1α-FITC, HP1β-FITC, HP1γ-FITC were used for fluorescent microscopy

Роль BRCA1 в поддержании структуры гетерохроматина

В данной части исследования также использовались синхронизованные с помощью мимозина диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии IMR90hTERT, созданные путем интеграции hTERT в геном клеток IMR90 в результате ретровирусной трансдукции, и метод конфокальной микроскопии. Синхронизация культуры описана в предыдущем разделе.

Следует отметить, что иногда наблюдалась колокализация BRCA1 с небольшими локусами BrdU в поздней S-фазе клеточного цикла. Это указывает на участие BRCA1 не только в ассоциации РНК XIST с Xi, но и в репликации перичентромерных повторяющихся последовательностей гетерохроматина на Xi и/или на других хромосомах (рис. 3).

Более того, как показано на рис. 4, BRCA1 колокализуется со всеми тремя изоформами белка HP1: HP1 α , HP1 β и HP1 γ в линии диплоидных иммортализованных фибробластов IMR90hTERT. При этом наиболее полно BRCA1 колокализован с изоформой HP1 α . Эти данные указывают на возможное участие BRCA1 в репликации перичентромерных повторяющихся последовательностей гетерохроматина, с которыми ассоциированы белки семейства HP1.

Заключение

В целом данные, полученные с использованием высокоразрешающей конфокальной микроскопии, указывают на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi, в частности, на влияние BRCA1 на ассоциацию РНК XIST с Xi, а также на репликацию гетерохроматиновых участков хромосом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Jegu T., Aeby E., Lee J.T. The X chromosome in space. *Nat Rev Genet* 2017;18(6): 377–89. DOI: 10.1038/nrg.2017.17.
- Yang L., Froberg J., Lee J.T. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem Sci* 2014;39(1):35–43. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.10.002.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 BRCA1 regulation. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2017;23(2):4–11. (In Russ.)].
- 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.

Благодарность

Авторы выражают особую благодарность профессору Дэвиду М. Ливингстону (Pr.D. M. Livingston) за финансирование и общее руководство данным исследованием, выполненным в Онкологическом институте им. Дана-Фарбера (Бостон, США).

Acknowledgements

The authors are very grateful to Professor David M. Livingston for financial support and general guidance during this study performed at the Dana Farber Cancer Institute (Boston, USA).

ORCID авторов/ORCID of authors

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

Т.А. Богуш/T.A. Bogush: <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.

Финансирование. Представленное исследование поддержано грантами Национального института онкологических исследований (США), Фонда по исследованиям в области рака молочной железы (США), Института по биомедицинским исследованиям (США), выданными проф. Дэвиду М. Ливингстону (Pr.D. M. Livingston).

Funding. This study was supported by grants from the National Cancer Institute (USA), Breast Cancer Research Foundation (USA), Novartis Institute for Biomedical Research (USA) issued to Professor David M. Livingston.

Статья поступила: 12.10.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 12.10.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.