

УДК 577.2

ГОМЕОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ *DUX4* ОБРАЗУЮТ ДИНАМИЧНЫЕ КОНТАКТЫ С ЯДРЫШКАМИ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Е. С. Клушевская¹, И. Р. Алембеков¹, Ю. В. Кравацкий¹, Н. А. Чуриков^{1, *}

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым

Поступило 25.03.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принято к публикации 16.04.2024 г.

Ядрышки образуют меж-хромосомные контакты с генами, контролирующими дифференцировку и канцерогенез. Гены *DUX4* кодируют фактор транскрипции, содержащий двойной гомеодомен. Ранее с помощью метода 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) на популяции клеток было обнаружено, что гены *DUX4* образуют частые контакты с генами рРНК. Также было найдено, что после теплового шока контакты почти полностью пропадают. Метод 4C, как и другие ligation-mediated подходы, способен заметить только близкие контакты между петлями хроматина в ядрах. Для того чтобы независимо подтвердить наличие и выявить частоту контактов генов *DUX4* с кластерами генов рРНК в отдельных клетках и выяснить, как далеко при тепловом стрессе уходят эти гены от ядрышек, мы использовали метод FISH. В результате впервые на отдельных клетках линии НЕК293Т было обнаружено, что гены *DUX4* образуют стабильные контакты с ядрышками во всех исследованных клетках, а при тепловом шоке гены *DUX4* обратимо удаляются от ядрышек на 1–3 микрометра. Следовательно, меж-хромосомные контакты, образуемые ядрышками, прочны, динамичны и обратимы. Мы предполагаем, что их стабильность важна для поддержания состояния дифференцировки.

Ключевые слова: гены рРНК, гены *DUX*, меж-хромосомные контакты, тепловой шок, FISH

DOI: 10.31857/S2686738924040121

К настоящему времени накапливаются данные о важной роли ядрышек в процессах, не связанных с синтезом рРНК и биогенезом рибосом. Ядрышки вовлечены в глобальные механизмы регуляции экспрессии генов, в репарацию разрывов в ДНК, в клеточные ответы на стрессы и в другие процессы [1–5]. Ядрышки образуют меж-хромосомные контакты с генами, контролирующими дифференцировку и канцерогенез [6,7]. Предполагается, что вокруг ядрышек формируются микро-конденсаты, содержащие репрессоры или активаторы транскрипции, и что гены из разных областей генома, попадая в такие микрокапли, совместно активируются либо репрессируются [2,3,8].

Гены *DUX4* кодируют фактор транскрипции, содержащий двойной гомеодомен. Они образуют частые контакты с генами рРНК [9]. Это было обнаружено с помощью метода 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) на популяции

клеток. С помощью данного метода было найдено, что после теплового шока контакты почти полностью пропадают [9]. Метод 4C, как и другие ligation-mediated подходы, способен заметить только близкие контакты между петлями хроматина в ядрах. Для того чтобы независимо подтвердить наличие и выявить частоту контактов генов *DUX4* с кластерами генов рРНК в отдельных клетках и выяснить, как далеко при тепловом стрессе уходят эти гены от ядрышек, мы использовали метод FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). В результате впервые на отдельных клетках линии НЕК293Т было обнаружено, что гены *DUX4* образуют стабильные контакты с ядрышками во всех исследованных клетках, а при тепловом шоке гены *DUX4* удаляются от ядрышек на 1–3 микрометра. Такое удаление соответствует примерно 150 kb ДНК, упакованной в 30 nm фибрилле хроматина [8,10], что критично для метода 4C. Следовательно, меж-хромосомные контакты, образуемые ядрышками, прочны, динамичны и обратимы. Мы предполагаем, что их стабильность важна для поддержания состояния дифференцировки.

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии наук, Москва, Россия

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Для экспериментов FISH использовали Alexa-3-меченый клонированный фрагмент гена рРНК [11]. Фрагмент ДНК длиной около 5.5 kb из chr4 человека, расположенный на расстоянии около 7 kb от кластера генов *DUX* в субтеломерном районе данной хромосомы (рис. 1) наработали с помощью long PCR и метили Alexa-5. Эксперименты проводили на клетках HEK293T. Тепловой шок проводили в течение 30 минут при 43°C, с последующим восстановлением клеток в течение 2,5 часов в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Гибридизацию проводили, как описано ранее [12]. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5. Анализ изображений проводили с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США) [https://imagej.net/software/fiji/]. Степень ко-локализации определяли с помощью инструмента оценки ко-локализации сигналов флуоресценции JACoP, (Just Another Co-localization Plugin) [13]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA v10 (StatSoft, США). Сравнение 2 выборок осуществляли с помощью дисперсионного анализа. Для оценки значимости различий двух групп использовали метод χ^2 Пирсона.

На рис. 2 представлены результаты FISH. Оказалось, что имеется около 10 фокусов гибридизации *DUX*, что было ожидаемым, т.к. амплифицированный фрагмент является повтором, связанным с генами *DUX*, и по данным BLAST – Genome (GRCh38.p14 reference assembly RS_2023_10) представлен в хромосомах 3, 4, 10, 12–15, 21, 22, и в нескольких еще нелокализованных областях генома человека. Известно, что в хромосомах 4 и 10 в кластере генов *DUX* имеется от 8 до 100 копий [14, 15]. Видно, что имеются гены *DUX*, которые расположены вокруг ядрышка (рис. 2а). Кластеры генов рРНК в клетках HEK293T представлены в виде одного ядрышка. Профили сигналов *DUX* и *rDNA* позволили выявить, что в исходных клетках гены *DUX* расположены непосредственно по краям области ядрышка (рис. 2б). После теплового шока они немного – до 2.5 μm – удаляются от ядрышка (рис. 2г).

Мы наблюдали контакты генов *DUX* с ядрышками во всех исследованных таким образом клетках. Меж-хромосомные контакты генов *DUX* с генами рРНК исходно были обнаружены с помощью метода 4C на популяции клеток [6, 9, 16]. В настоящей работе с помощью FISH на отдельных клетках выявлено, что эти контакты характерны для всех клеток. Кроме того, удалось выявить достоверные изменения характера контактов после теплового шока. Оказалось, что этот стресс вызывает диссоциацию контактов – небольшое удаление хроматиновых петель разных хромосом от ядрышек. Клетки после шести часов восстанавливают прежний характер контактов (не показано). Следовательно,

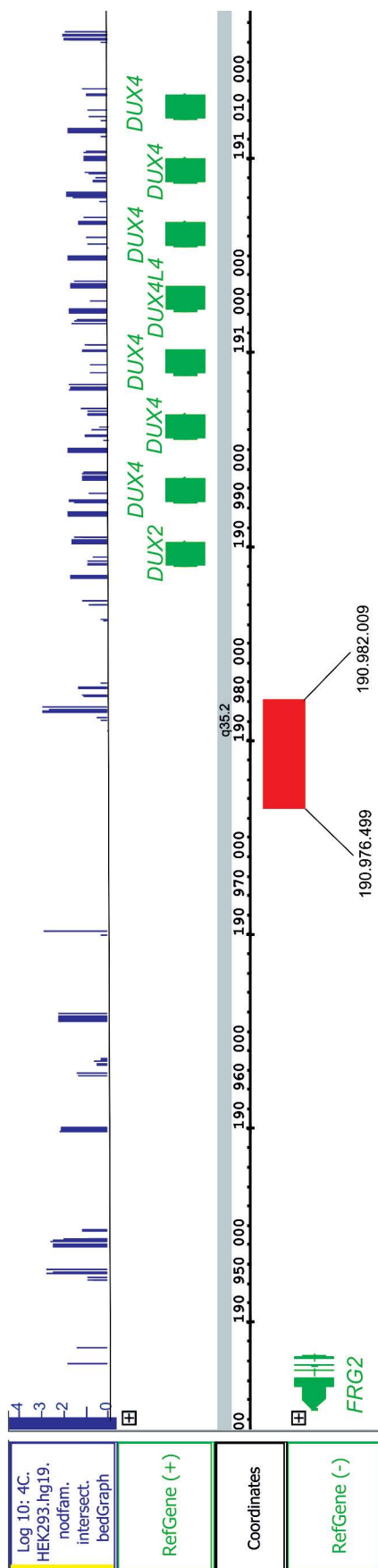


Рис. 1. Физическая карта субтеломерной области chr4 и места контактов генов рРНК, выявленные с помощью метода 4C в линии клеток HEK293T (координаты в геномном браузере IGB приведены для версии генома человека hg19). Синим показаны места контактов генов рРНК. Зеленым указаны гены *DUX*. Красный прямоугольник указывает область ДНК длиной 5511 bp, которая была наработана с помощью long PCR и использована для FISH.

диссоциация обратима и что-то еще удерживает удаленные на 2.5 μm петли хроматина из разных хромосом близко около ядрышек.

Использование программы ImageJ позволило оценить число близких контактов генов *DUX4* с ядрышками. Оказалось, что в среднем около двух таких контактов приходится на ядрышко в исходных клетках, тогда как после теплового шока в четыре раза меньше — один контакт на два ядрышка (рис. 3а). По данным 4С, наибольшее число контактов генов рРНК с генами

DUX4 приходится на субтеломерные районы хромосом 4 и 10. Поэтому мы считаем, что два наиболее стабильных контакта должны соответствовать данным районам. Это согласуется и с данными, представленными на рис. 2.

Интересные данные были получены при анализе доли фокусов гибридизации генов *DUX* по мере удаления от границ ядрышек в исходных клетках и в клетках после теплового шока. Доли генов *DUX* на расстоянии 1–3 мкм от ядрышек резко уменьшаются. При удалении более чем на 3 мкм доли

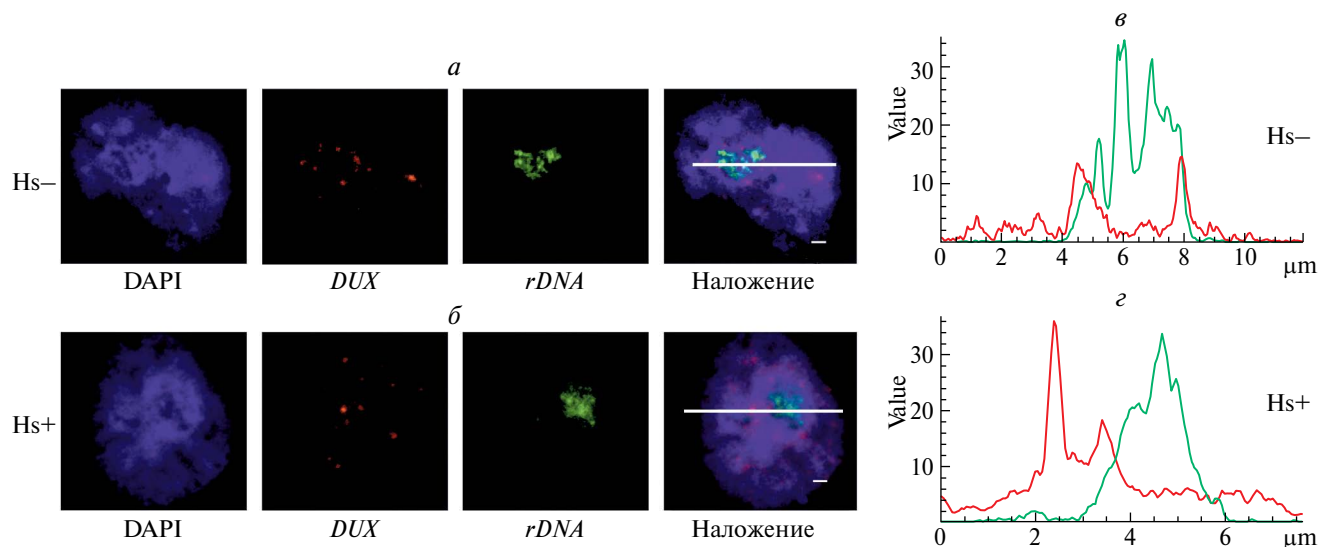


Рис. 2. Результаты FISH. *a* — эксперименты с исходными клетками. *б* — эксперименты с клетками после теплового шока. Белым показана ось при сканировании сигналов флуоресценции, проходящая через центр ядрышек. *в* — профиль сканирования ядра без теплового шока. *г* — профиль сканирования ядра после теплового шока. Сигнал *DUX* (Alexa-5) показан красным, а сигнал *rDNA* (Alexa-3) — зеленым. По горизонтали показаны расстояния в мкм.

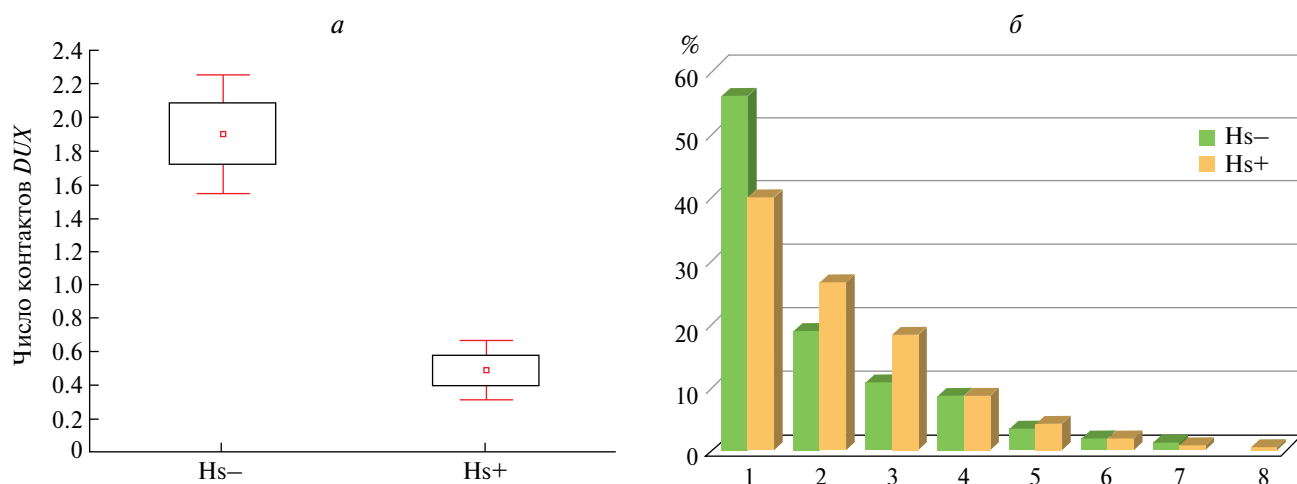


Рис. 3. Диаграммы, показывающие число фокусов гибридизации зонда *DUX*, приходящееся на одно ядро в исходных клетках и в клетках после теплового шока (*a*) и % фокусов гибридизации пробы *DUX* в ядрах по мере удаления от центра ядрышка (*б*). HS — эксперименты с исходными клетками. HS+ — эксперименты с клетками после теплового шока. Для анализа использовали по 100 клеток. *p*-value < 0.05.

генов *DUX* в экспериментах с тепловым шоком и без него уменьшаются, но уже мало отличаются друг от друга. Т.е. изменения в ядрышках при тепловом шоке не влияют на копии генов *DUX*, расположенные на расстоянии более 4 мкм. Это независимо подтверждает вывод о том, что межхромосомные контакты генов *DUX* с ядрышками довольно близки (см. рис. 2в) и их число резко уменьшается на удалении уже в 2 мкм от ядрышка (рис. 3б). Таким образом, при тепловом шоке удерживающее влияние ядрышек на петли хроматина на удалении более 4 мкм не распространяется.

Пока неизвестны механизмы образования межхромосомных контактов, в которые вовлечены гены, контролирующие дифференцировку и рак [6]. В разных типах клеток человека в местах таких контактов обнаружены метки неактивного хроматина H3K27me3 в генах, контролирующих морфогенез [17]. Эти метки характерны для эпигенетического сайленсинга. Известно, что гены *DUX* подвергаются сайленсингу в раннем развитии уже на стадии двух бластомеров [18].

Обнаружено, что местам частых контактов генов рРНК в многочисленных областях генома человека соответствуют протяженные (до 50 kb) области хроматина, содержащие метки активного хроматина H3K27ac [2, 6]. Такие области соответствуют супер-энхансерам [19]. Недавно было обнаружено, что области супер-энхансеров формируют микроконденсаты путем образования разделения жидких фаз в ядре (liquid-liquid phase separation) [20] и что большие группы генов, контролирующих дифференцировку и контактирующих с ядрышками, ко-экспрессируются в разных комбинациях [8]. Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные позволяют предполагать, что наборы факторов транскрипции в составе микроконденсатов, которые образуются вокруг ядрышка, обеспечивают ко-экспрессию больших групп генов, которые образуют межхромосомные контакты с кластерами генов рРНК. В настоящее время мы проверяем эти предположения экспериментально.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №124032100001-4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием человека и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savic N., Bär D., Leone S., Frommel S.C., Weber F.A., Vollenweider E., Ferrari E., Ziegler U., Kaech A., Shakhova O., Cinelli P., Santoro R. lncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs // *Cell Stem Cell*. 2014. Vol. 15. № 6. P. 720–734.
2. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation // *J. Mol. Cell Biol.* 2015. Vol. 7. № 4. P. 366–382.
3. Tchurikov N.A., Kravatsky Y.V. The Role of rDNA Clusters in Global Epigenetic Gene Regulation // *Front. Genet.* 2021. Vol. 12. P. 730633.
4. Kobayashi T. Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2014. Vol. 90. № 4. P. 119–129.
5. Feng S., Desotell A., Ross A., Jovanovic M., Manley J.L. A nucleolar long “non-coding” RNA encodes a novel protein that functions in response to stress // *PNAS*. 2023. Vol. 120. № 9. P. e2221109120.
6. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Klushevskaya E.S., Slovohtov I.Y., Chechetkin V.R., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. rDNA clusters make contact with genes that are involved in differentiation and cancer and change contacts after heat shock treatment // *Cells*. 2019. Vol. 8. № 11. P. 1393.
7. Diesch J., Bywater M.J., Sanij E., Cameron D.P., Schierding W., Brajanovski N., Son J., Sornkom J., Hein N., Evers M., Pearson R.B., McArthur G.A., Ganley A.R.D., O’Sullivan J.M., Hannan R.D., Poortinga G. Changes in long-range rDNA-genomic interactions associate with altered RNA polymerase II gene programs during malignant transformation // *Commun. Biol.* 2019. Vol. 2. P. 39.
8. Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Alembekov I.R., Kretova A.N., Chechetkin V.R., Kravatsky G.I., Kravatsky Y.V. Induction of the Erythroid Differentiation of K562 Cells Is Coupled with Changes in the Inter-Chromosomal Contacts of rDNA Clusters // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. № 12. P. 9842.
9. Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Kravatsky Y.V., Kravatsky G.I., Fedoseeva D.M., Kretova O.V. Interchromosomal Contacts of rDNA Clusters with DUX Genes in Human Chromosome 4 Are Very Sensitive to Heat Shock Treatment // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. Vol. 490. № 1. P. 50–53.

10. Bystricky K., Heun P., Gehlen L., Langowski J., Gasser S.M. Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. PNAS. 2004. Vol. 101. № 47. P. 16495–16500.
11. Maden B.E., Dent C.L., Farrell T.E., Garde J., McCallum F.S., Wakeman J.A. Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S-rRNA and 28 S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones // Biochem. J. 1987. Vol. 246. № 2. P. 519–527.
12. Nakamura R.M. Overview and Principles of In-Situ Hybridization // Clinical Biochemistry. 1990. V. 23. № 4. P. 255–259.
13. Bolte S., Cordelières F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy // Journal of Microscopy. 2006. Vol. 224. № 3. P. 213–232.
14. Schaap M., Lemmers R.J., Maassen R., van der Vliet P.J., Hoogerheide L.F., van Dijk H.K., Basturk N., de Knijff P., van der Maarel S.M. Genome-wide analysis of macrosatellite repeat copy number variation in worldwide populations: Evidence for differences and commonalities in size distributions and size restrictions // BMC Genomics 2013. 14:143.
15. Lemmers R.J.L.F., van der Vliet P.J., Vreijling J.P., Henderson D., van der Stoep N., Voermans N., van Engelen B., Baas F., Sacconi S., Tawil R., van der Maarel S.M. Cis D4Z4 repeat duplications associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 // Human Molecular Genetics. 2018. Vol. 27. № 20. P. 3488–3497.
16. Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Kravatsky Y.V., Alembekov I.R., Slovohotov I.Y., Tchurikov N.A. Homeotic DUX4 Genes that Control Human Embryonic Development at the Two-Cell Stage are Surrounded by Regions Contacting with rDNA Gene clusters // Molecular Biology. 2019. T. 53. № 2. С. 237–241.
17. Чуриков Н.А., Клушевская Е.С., Кравацкий Ю.В., Кравацкая Г.И., Федосеева Д.М. Меж-хромосомные контакты генов рРНК в трех линиях клеток человека связаны с сайленсингом генов, контролирующих морфогенез // ДАН. Науки о жизни. 2021. Т.496. № 1. С. 70–74.
18. Percharde M., Lin C.J., Yin Y., Guan J., Peixoto G.A., Bulut-Karslioglu A., Biechele S., Huang B., Shen X., Ramalho-Santos M. A LINE1-nucleolin partnership regulates early development and ESC identity // Cell. 2018. Vol. 174. № 2. P. 391–405.e19.
19. Hnisz D., Abraham B.J., Lee T.I., Lau A., Saint-Andre V., Sigova A.A., Hoke H.A., Young R.A. Super-enhancers in the control of cell identity and disease // Cell. 2013. Vol. 155. № 4. P. 934–947.
20. Shrinivas K., Sabari B.R., Coffey E.L., Klein I.A., Boija A., Zamudio A.V., Schuijers J., Hannett N.M., Sharp P.A., Young R.A., Chakraborty A.K. Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates // Mol Cell. 2019. Vol. 75. № 3. P. 549–561.e7.

HOMEOTIC *DUX4* GENES SHAPE DYNAMIC INTER-CHROMOSOMAL CONTACTS WITH NUCLEOLI IN HUMAN CELLS

E. S. Klushevskaya^a, I. R. Alembekov^a, Y. V. Kravatsky^a, N. A. Tchurikov^{a,*}

^aEngelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Presented by Academician of the RAS P. G. Georgiev

Nucleoli shape inter-chromosomal contacts with genes controlling differentiation and cancer genesis. *DUX4* genes specify transcription factor possessing two homeodomains. Previously, using Circular Chromosome Conformation Capture (4C) approach on population of cells, it was demonstrated that *DUX4* gene clusters form frequent contacts with nucleoli. It was found also that these contacts are almost completely abolished after heat shock treatment. 4C approach as all ligation-mediated methods is capable to detect rather close interactions between chromatin loops in nuclei. In order to independently confirm the formation and the frequency of the contacts in single cells we used FISH approach. Here, we show that *DUX* genes in single cells form stable contacts in all tested HEK293T cells. The contacts after heat shock treatment reversibly retreat up to 1–3 μm distance. We conclude that inter-chromosomal contacts shaping by nucleoli are dynamic and stable providing both the initiation and maintenance of a differentiated state.

Key words: rDNA, *DUX4*, inter-chromosomal contacts, heat shock, FISH