

УДК 577.21,576.385.5

## ЭКСПРЕССИЯ АКТИВАТОРА ЗИГОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА *DUX4* В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2020 г. А. А. Карпухина<sup>a, b, c, d</sup>, Е. С. Васецкий<sup>a, b, \*</sup><sup>a</sup>CNRS UMR9018, Université Paris-Sud Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France<sup>b</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия<sup>c</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, ул. Ленинские горы, 1 (40), Москва, 119234 Россия<sup>d</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, ул. Ленинские Горы, 1 (73), Москва, 119234 Россия

\*e-mail: yegor.vassetzky@cnrs.fr

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.

После доработки 12.02.2020 г.

Принята к публикации 14.02.2020 г.

Геном зиготы сразу после оплодотворения не транскрибируется. В этот период происходит его перепрограммирование, которое обеспечивает переход дифференцированной половой клетки в тотипотентное состояние и зависит от РНК и белков, накопленных в ооците. За перепрограммированием следует активация зиготического генома (АЗГ). Один из ключевых регуляторов АЗГ у человека — ген *DUX4*, кодирующий транскрипционный фактор с двумя гомеобоксами. Его экспрессия необходима для развития эмбриона, подлечит точной временной регуляции и обычно наблюдается только на ранних стадиях дробления. В большинстве соматических тканей *DUX4* эффективно репрессируется за счет работы множества эпигенетических механизмов. Аберрантная экспрессия *DUX4* в скелетных мышцах вызывает лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию. Экспрессия *DUX4*, связанная с хромосомными перестройками, приводит к подавлению противоопухолевой иммунной активности, и наблюдается при лейкомиях и саркомах.

**Ключевые слова:** *DUX4*, активация зиготического генома, онкогенез, мышечная дистрофия

**DOI:** 10.31857/S0475145020030076

### ВВЕДЕНИЕ

Новообразованный геном зиготы состоит из материнского и отцовского генетического материала, каждый из которых имеет свою хроматинную организацию и нуждается в ремоделировании до открытого состояния, прежде чем его можно будет транскрибировать. Перепрограммирование зиготы происходит сразу после оплодотворения, пока ее геном транскрипционно неактивен. Оно осуществляется за счет РНК и белков, накопленных в яйцеклетке до оплодотворения и обеспечивает переход геномов яйцеклетки и сперматозоида, сформировавших зиготу, в тотипотентное состояние (Newport, Kirschner, 1982; Tadros, Lipshitz, 2009). Впоследствии это приводит к образованию различных типов клеток и тканей. За перепрограммированием следует процесс, известный как переход от материнского типа экспрессии генов к зиготическому (МЗП) (Tadros, Lipshitz, 2009). МЗП включает в себя активацию зиготического генома (АЗГ) и постепенную деградацию продуктов материнского проис-

хождения. После МЗП новообразованный геном зиготы берет на себя полный контроль над транскрипцией в развивающемся эмбрионе.

Механизмы, определяющие начало АЗГ, изучены не полностью. Известно, что АЗГ частично регулируется изменением ядерно-цитоплазматического отношения (Newport, Kirschner, 1982): его повышение способствует титрованию изначально имеющихся в яйцеклетке неспецифических репрессоров, ингибирующих транскрипцию ДНК (Amodeo et al., 2015; Jevtić, Levy, 2015, 2017; Joseph et al., 2017). Быстрые клеточные циклы, присущие многим видам на ранних этапах эмбриогенеза, практически не оставляют времени для транскрипции между делениями (Rothe et al., 1992; Shermoen, O'Farrell, 1991). Начало АЗГ становится возможным по мере замедления деления и удлинения клеточного цикла (Kimelman et al., 1987). В значительной степени АЗГ связана с ремоделированием хроматина. Кроме того, требуется время для полиаденилирования, трансляции и накопления в клетке основных транскрипцион-

ных факторов, унаследованных в виде материнской мРНК и необходимых для АЗГ (Veenstra et al., 1999; Guven-Ozkan et al., 2008). В данном обзоре мы рассмотрим семейство транскрипционных факторов DUX, участвующих в АЗГ млекопитающих (De Iaco et al., 2017).

### ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНА DUX

Семейство генов *DUX* представлено безинтронными *DUX4* у приматов и афротерий (слоны, даманы, тенреки) и *Dux* у мышей и крыс, а также интрон-содержащими *Duxa*, *Duxb* и *Duxc* у других млекопитающих (Leidenroth et al., 2012). Еще один интрон-содержащий вариант, *Duxbl* (DUXB-like), встречается только у мышей и крыс, хотя его псевдогенные формы были найдены и у приматов (Leidenroth, Hewitt, 2010). *DUX4* присутствует в геноме человека во множестве копий, которые организованы в крупные (3.3 кб) макросателлитные тандемные повторы – D4Z4, расположенные в субтеломерных областях хромосом 4q и 10q (Gabiëls et al., 1999). Повторы D4Z4 присутствуют и в других участках человеческого генома в виде отдельных копий. В геноме мыши ген *Dux* также представлен множеством копий и организован в аналогичные повторы размером 4.9 кб (Clapp et al., 2007).

Все белки DUX обладают двумя ДНК-связывающими гомеодоменами (ГД1 и ГД2), разделенными линкером. Хотя гомеодомены обычно связывают ДНК в виде димера, присутствие сразу нескольких гомеодоменов в одном белке довольно необычно и не наблюдается вне группы плацентарных млекопитающих (Eutheria). Помимо гомеодоменов ряд белков DUX (*Duxc*, *Dux* и *DUX4*) имеют консервативный С-концевой трансактивирующий домен (Leidenroth, Hewitt, 2010; Mitsuhashi et al., 2018).

Согласно современной эволюционной модели, семейство DUX появилось после дубликации части гена, содержащего единственный гомеобокс (Leidenroth, Hewitt, 2010). В результате появился новый ген с двумя тандемно расположенными гомеобоксами (Lee et al., 2018). Последний общий предок всех плацентарных млекопитающих, вероятно, имел ген с двумя гомеобоксами – *Duxc*. Гены *DUX4* и *Dux* возникли позднее в результате множественных независимых ретро-транспозиций (Leidenroth et al., 2012).

Два гомеодомена DUX принадлежат к ветви семейства гомеодоменов PAX (Paired-homeobox), но их сходство друг с другом гораздо сильнее, чем с любым из других PAX-гомеодоменов. Это подтверждает гипотезу о том, что семейство DUX, скорее всего, выделилось именно в результате дубликации в последовательности гена, предкового

для всех эутерий (Leidenroth et al., 2012; Lee et al., 2018). Современным гомологом этого предкового гена, вероятно, является содержащий один гомеобокс ген *sDUX*, обнаруженный у неплацентарных млекопитающих (Leidenroth, Hewitt, 2010).

*DUX4* является транскрипционным фактором. Он связывается с определенной последовательностью ДНК посредством гомеодоменов и благодаря трансактивирующему домену активирует экспрессию ряда генов. Консенсусная последовательность, которую узнает *DUX4* в геноме человека – 5'-ТААТСТААТСА-3' (Geng et al., 2012; Yu Zhang et al., 2016). Поскольку ГД1 и ГД2 *DUX4* имеют высокий уровень сходства, изначально предполагалось, что они связывают два одинаковых мотива – ТААТ, располагаясь относительно друг друга в ориентации “голова к хвосту” (Dong et al., 2018), однако недавняя расшифровка кристаллической структуры N-концевой части белка *DUX4* (остатки 15–155, включающие оба гомеодомена *DUX4*) в комплексе со своим ДНК-консенсусом показала, что ГД1 и ГД2 связывают разные мотивы – 5'-ТААТ-3' и 5'-TGАТ-3' соответственно, и ориентируются при этом “голова к голове” (Lee et al., 2018).

### ГЕНЫ DUX И АЗГ

Будучи транскрипционным фактором, *DUX4* активирует экспрессию нескольких сотен генов. Гены-мишени DUX (человеческого *DUX4* и мышиного *Dux*) экспрессируются до активации зиготы в составе первой (минорной) волны АЗГ. Предполагается, что факторы транскрипции DUX являются ключевыми индукторами АЗГ у млекопитающих (De Iaco et al., 2017; Hendrickson et al., 2017). РНК *DUX4* была обнаружена начиная со стадии ооцита и вплоть до стадии четырех клеток (4С). Экспрессия предполагаемых мишеней *DUX4* (например, *ZSCAN4*, *ZFP352*, эндогенных ретровирусных элементов – *MERVL* у мышей и *HERVL* у человека) детектируются начиная с двухклеточной стадии (2С), а к стадии восьми клеток (8С), соответствующей основной волне АЗГ у человека (Vassena et al., 2011), достигает пика (De Iaco et al., 2017).

Эктопическая экспрессия *Dux* в эмбриональных стволовых клетках мыши (mESCs) переводит их в состояние, характерное для эмбрионов на стадии двух бластомеров (2С). Клетки mESCs, экспрессирующие *Dux*, реактивируют экспрессию генов двухклеточной стадии, теряют ассоциированный с плюрипотентностью белок POU5F1 и хромосомы, а также приобретают хроматинный ландшафт, характерный для двухклеточных эмбрионов (Hendrickson et al., 2017). С другой стороны, было показано, что нокаут гена *Dux* в зиготах мышей *ex vivo* “замораживает” зиготы на стадии 2С: такие зиготы не проявляли специфиче-

ских для АЗГ транскрипционных изменений и не могли формировать морулу/бластоцисту (De Iaco et al., 2017).

Тем не менее, более поздние исследования показывают, что деплегия *Dux in vivo* гораздо менее фатальна, и даже полная потеря *Dux* не является препятствием для развития эмбрионов мыши (Chen, Zhang, 2019; Guo et al., 2019). Гомозиготные *Dux*<sup>-/-</sup> мыши хоть и рождаются с частотой несколько меньше ожидаемой по менделевскому распределению, доживают до взрослого возраста, демонстрируя лишь незначительное снижение репродуктивного потенциала. Транскрипты *Dux*<sup>-/-</sup> эмбрионов в конце стадий 1С и 2С существенно не отличаются от транскриптов эмбрионов мышей дикого типа (Chen, Zhang, 2019). Анализ транскрипционного профиля 2С-эмбрионов на ранней, средней и поздней 2С стадиях показывает, что хотя на ранней 2С подмножество АЗГ-генов действительно имеют пониженную экспрессию в *Dux*<sup>-/-</sup> эмбрионах (по сравнению с ранней 2С в эмбрионах дикого типа), экспрессия этих генов резко повышается к концу 2С стадии (по сравнению с ранней 2С стадией в нокаутных эмбрионах), что указывает на то, что их транскрипция хоть и отложена, но активируется даже в отсутствие *Dux* (Guo et al., 2019). Эти данные позволяют предположить, что *Dux* – важный, но не необходимый фактор АЗГ, и является, вероятно, не инициатором, а ко-активатором экспрессии. В двухклеточных эмбрионах мыши помимо *Dux* имеется ряд других транскрипционных факторов и/или модуляторов хроматина, способных обеспечить успешное протекание АЗГ, а модельная система на основе эмбриональных клеток *ex vivo*, по-видимому, не оптимальна для исследований тотипотентных стадий. Кроме того, транскрипция *Dux* не обнаруживается у эмбрионов мышей после поздней стадии 2С (Deng et al., 2014; Guo et al., 2019). Инъекция мРНК *Dux* в бластомеры мышей в конце стадии 2С приостанавливает их развитие, главным образом, на стадии четырех клеток (Guo et al., 2019). Остановившиеся в развитии эмбрионы имеют высокие уровни экспрессии *Zscan4* и *MERVL*, что является признаком 2С-стадии. Таким образом, экспрессия *DUX4* характерна для эмбриона на стадии двух клеток и, вероятно, ускоряет наступление АЗГ, однако для правильного развития эмбриона необходима ее точная временная регуляция.

#### ПОСТ-ЗИГОТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *DUX4* И ЕГО ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Механизмы, обеспечивающие подавление *DUX* в определенный момент эмбриогенеза и его дальнейшее подавление в тканях взрослого организма изучены не до конца, хотя важность репрессии

*DUX4* в соматических тканях не вызывает сомнений. У взрослых людей *DUX4* обычно экспрессируется только в яичках (Snider et al., 2010) и, предположительно, тимусе (Das, Chadwick, 2016), а его патологическая экспрессия в других тканях связана с лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофией (ЛЛПМД), В-клеточным лейкозом (Dib et al., 2019), подавлением противоопухолевой иммунной активности и резистентностью к противоопухолевой терапии (Chew et al., 2019).

Считается, что экспрессия *DUX4* у человека репрессирована эпигенетически. Ген *DUX4* встроен в массив из макросателлитов D4Z4, расположенный в субтеломерной области 4-й хромосомы (4q35). Этот массив имеет полиморфный размер: он содержит от 11 до 200 единиц повтора D4Z4 длиной 3.3 кб. Каждый повтор содержит открытую рамку считывания гена *DUX4*. Репрессия осуществляется посредством метилирования ДНК D4Z4, модификации гистонов и связывания репрессивных белков хроматина. Активность tandemных повторов в геноме тщательно контролируется, и если их количество превышает определенный порог, они репрессировываются (Mitsuda, Shimizu, 2016). Поэтому большой размер массива D4Z4 необходим для эффективного подавления экспрессии *DUX4* в соматических клетках.

Уменьшение количества повторов D4Z4 в массиве на 4-й хромосоме вызывает аутосомно-доминантное генетическое заболевание – лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию I типа (ЛЛПМД1). Индивидуумы с ЛЛПМД1 имеют меньшее количество повторов D4Z4 (от 1 до 10), что обеспечивает более открытое состояние хроматина. Также для них характерен аллель 4qA, в котором содержится функциональный сигнал полиаденилирования, стабилизирующий мРНК *DUX4*.

Пациенты с ЛЛПМД2, формой заболевания, не зависящей от количества повторов D4Z4 и составляющей ~5% от общего числа случаев ЛЛПМД (de Greef et al., 2010), обладают нормальным количеством повторов D4Z4, но несут мутации в гене *SMCHD1*. Продукт этого гена вовлечен в метилирование ДНК, и его мутация приводит к неполному метилированию массива D4Z4 (Dion et al., 2019) и релаксации хроматина, позволяющей экспрессировать *DUX4*.

Примечательно, что одной релаксации хроматина и начала экспрессии *DUX4* недостаточно для развития болезни, поскольку мРНК *DUX4* подвергается альтернативному сплайсингу. Исходная мРНК *DUX4* имеет 2 участка сплайсинга в 3' UTR, генерирующих 2 транскрипта *DUX4f1*, кодирующих полноразмерный белок *DUX4* (Dixit et al., 2007; Snider et al., 2009), но эти транскрипты крайне нестабильны и подвергаются дальнейшему сплайсингу. В результате получается дополнительный транскрипт – *DUX4s*, кодирующий белок,

сохраняющий ДНК-связывающие гомеодомены, но не имеющий С-концевого домена трансактивации, главным образом отвечающего за цитотоксичность (Snider et al., 2010). Транскрипты и белок DUX4s присутствуют как у пациентов с ЛЛПМД, так и у здоровых людей, и не вызывают мышечной патологии. Гаплотип 4qА, ассоциированный с заболеванием, создает функциональный участок полиаденилирования в последнем дистальном повторе D4Z4 и необходим для развития как ЛЛПМД1, так и ЛЛПМД2. Полиаденилирование стабилизирует DUX4fl, что позволяет производить полноразмерный цитотоксический белок.

Интересно, что массив повторов, на 99% гомологичный D4Z4, есть и на 10-й хромосоме. При этом на его дистальной границе не обнаружено канонического сигнала полиаденилирования. Уменьшение количества повторов D4Z4 на 10-й хромосоме не приводит к патологии, что подчеркивает важность хромосомного окружения в патогенезе ЛЛПМД. Недавнее исследование показало, что обмен субтеломерными участками хромосом 4q и 10q, индуцированный CRISPR-Cas, приводит к частичной коррекции патологических изменений в мышечных клетках больных ЛЛПМД (Ma et al., personal communication).

При некоторых патологиях, включая лейкемию, саркому Юинга и рабдомиосаркому, транслокации с участием 4-й хромосомы приводят к появлению модифицированных форм белка DUX4 или его слиянию с другими белками. При остром лимфобластном лейкозе (ALL) перенос гена *DUX4* в локус тяжелой цепи иммуноглобулина (IGH) на 14-й хромосоме (Lilljebjörn et al., 2016; Yasuda et al., 2016) приводит к образованию DUX4 с укороченным С-концом. Перенос *DUX4* в интрон онкогена *ERG* приводит к образованию химерного белка ERG-DUX4 (Sirvent et al., 2009). В опухолевых клетках саркомы Юинга хромосомная транслокация t(4;19)(q35;q13) приводит к слиянию С-концевой области *DUX4* с геном *CIC* и выработке химерного белка CIC-DUX4. Транслокация t(4;22)(q35;q12), связанная с эмбриональной РМС, приводит к выработке химерного белка EWSR1-DUX4 (Sirvent et al., 2009). Экспрессия *DUX4* после хромосомных перестроек, вероятно, обусловлена присутствием контрольных элементов в локусах, в которые он встроился. Эти локусы также содержат сигналы полиаденилирования, необходимые для стабилизации мРНК *DUX4*.

#### ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЭКСПРЕССИИ DUX4 ПРИ ЛЛПМД И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

DUX4 является транскрипционным фактором, поэтому его aberrантная экспрессия в мио-

бластах (Dixit et al., 2007; Kowaljow et al., 2007; Snider et al., 2010), биопсиях пациентов с ЛЛПМД (Snider et al., 2010) и во время эмбрионального развития у больных ЛЛПМД (Ferreboeuf et al., 2014) может иметь серьезные последствия для клеток. Действительно, повышенная экспрессия *DUX4* вызывает следующие эффекты: увеличение чувствительности клеток к окислительному стрессу (Winokur et al., 2003; Bosnakovski et al., 2008; Barro et al., 2010; Bou Saada et al., 2016); атрофию миосимпласмов, опосредованную индукцией *ATROGIN1* и *MURF1* (Vanderplanck et al., 2011); апоптоз за счет активации путей каспазы-3 (Kowaljow et al., 2007) и транскрипционного фактора p53 (Wallace et al., 2011). *DUX4* также вызывает аномалии миогенной дифференцировки (Dmitriev et al., 2013) со снижением уровня экспрессии *MYOD* (Winokur et al., 2003; Celegato et al., 2006). Кроме того, *DUX4* индуцирует экспрессию эмбриональных генов (Geng et al., 2012). Один из них – *PITX1*, ген фактора транскрипции гомеодоменов парного типа (Dixit et al., 2007). Этот ген участвует в сегментации эмбриона и развитии задних конечностей (Szeto et al., 1999), контролируя морфологию их мышц, сухожилий и костей (DeLaurier et al., 2006). Повышенная экспрессия *PITX1* вызывает атрофию скелетных мышц у мышей (Pandey et al., 2012).

В настоящее время роль DUX4 в развитии лейкемии до конца не выяснена. Тем не менее, было показано, что DUX4 ингибирует экспрессию гена *ERG* дикого типа путем активации негативно-доминантной изоформы ERGalt, которая необходима для лейкемогенеза и увеличивает транскрипционную активность в регионе, делая его более чувствительным к мутациям (Zhang et al., 2016). Экспрессия *DUX4* вызывает повреждение ДНК (Dmitriev et al., 2016), что также может приводить к делеции *ERG* при лейкемии. Более того, экспрессия гена *IGH-DUX4* (но не гена *DUX4*) в предшественниках В клеток иммунодефицитных мышей приводила к В-клеточному лейкозу. Это показывает, что DUX4 приобретает онкогенный потенциал после хромосомной перестройки (Yasuda et al., 2016).

При саркоме Юинга *DUX4* сливается с геном *CIC*, кодирующим транскрипционный репрессор, участвующий в регуляции сигнального пути RTK/ERK (Tseng et al., 2007; Jin et al., 2015). Химерный белок CIC-DUX4 проявляет сильную транскрипционную активность и индуцирует экспрессию генов группы транскрипционных факторов *PEA3* (Kawamura-Saito et al., 2006). Белки *PEA3* регулируют несколько генов, вовлеченных в процесс опухолеобразования, например, матричные металлопротеиназы, которые играют важную роль в метастазировании (de Launoit et al., 2006).

При эмбриональной рабдомиосаркоме транслокация приводит к слиянию *DUX4* с *EWSR1* (Sirvent et al., 2009). Это напоминает ситуацию, наблюдаемую при саркоме Юинга, когда ген другого транскрипционного фактора, *ERG*, сливается с геном *EWSR1* (Ida et al., 1995). Опасность такого типа транслокации заключается в выработке химерного белка с aberrантными свойствами.

Помимо хромосомных перестроек с участием гена *DUX4*, обнаруженных при различных формах саркомы и лейкоза, эпигенетические изменения локуса 4q35, в котором находится ген *DUX4*, были описаны и при других видах онкологических заболеваний (Tsumagari et al., 2008; Katargin et al., 2009). Исследование, сравнивающее экспрессию генов при ЛЛПМД с профилями экспрессии при 35 различных видах опухолей, показало, что при ЛЛПМД активно экспрессируются гены, характерные для онкологических заболеваний (Dmitriev et al., 2014). Интересно, что транскриптом ЛЛПМД наиболее сильно напоминает транскриптом клеток саркомы Юинга. Часто наблюдаемые у пациентов с ЛЛПМД воспаление, фиброз, окислительный стресс и повреждение ДНК (Arahata et al., 1995; Barro et al., 2010; Dmitriev et al., 2016; Dmitriev et al., 2016) могут объяснять сходство между профилями экспрессии ЛЛПМД и раковых клеток.

*DUX4* может способствовать онкогенезу через многочисленные мишени, многие из которых, как и сам *DUX4*, принимают участие в программе раннего развития, и, таким образом, их экспрессия характерна для тотипотентных клеток. Например, *ZSCAN4*, белок необходимый для удлинения теломер в эмбриональных стволовых клетках (Zalzman et al., 2010), активен во многих опухолях, экспрессирующих *DUX4*, что, возможно, способствует их пролиферации. Другая мишень *DUX4* – *CCNA* (циклин А), который участвует в сперматогенезе (Liu et al., 1998). *CCNA* аномально экспрессируется в миелоидных и недифференцированных гематологических злокачественных опухолях (Krämer et al., 1998). При его повышенной экспрессии у мышей нарушается миелопоэз и развивается острый миелоидный лейкоз (Liao et al., 2001).

Наконец, *DUX4* связан с подавлением противоопухолевой иммунной активности. Опухоли, экспрессирующие *DUX4*, характеризуются низкой аутоцитолитической активностью, которая связана с распознаванием цитотоксическими Т-клетками антигенов в составе комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Экспрессия *DUX4* ингибирует экспрессию МНС1, что приводит к подавлению презентации антигенов на поверхности раковых клеток (Chew et al., 2019). Транскриптомные данные, полученные от больных с метастатической меланомой, получавших противоопухолевую терапию

антителами против CTLA-4 (Van Allen et al., 2015), выявили повышенную экспрессию *DUX4* у пациентов, не реагирующих на препарат, по сравнению с отвечающими на терапию пациентами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*DUX4* – фактор эмбриональной транскрипции, участвующий в АЗГ млекопитающих. Он экспрессируется на ранних стадиях эмбриогенеза и должен быть репрессирован в соматических тканях взрослого организма. Аномальная постнатальная экспрессия *DUX4* активизирует программу раннего развития, характерную для тотипотентных клеток и вызывает нарушения регуляции экспрессии множества генов и клеточной дифференцировки. Это приводит к развитию ЛЛПМД и ряда онкологических заболеваний.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была поддержана грантом AFM (СТСФСНД), Программой Президиума РАН № 42 “Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий” и Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. ГЗ 0108-2020-0008.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amodeo A.A., Jukam D., Straight A.F., Skotheim J.M.* Histone titration against the genome sets the DNA-to-cytoplasm threshold for the *Xenopus* midblastula transition // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. V. 112. №10. P. E1086–E1095.
- Arahata K., Ishihara T., Fukunaga H., Orimo S., Lee J.H., Goto K., Nonaka I.* Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses // *Muscle & Nerve*. 1995. V. 18. P. S56–S66.
- Barro M., Carnac G., Flavier S., Mercier J., Vassetzky Y., Laoudj-Chenivresse D.* Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. // *J. Cellular and Molecular Medicine*. 2010. V. 14. № 1–2. P. 275–289.
- Bosnakovski D., Xu Z., Gang E.J., Galindo C.L., Liu M., Simsek T., Garner H.R., Agha-Mohammadi S., Tassin A., Co Pée F., Belayew A.* An isogenetic myoblast expression screen identifies *DUX4*-mediated FSHD-associated molecular pathologies // *The EMBO J*. 2008. V. 27. № 20. P. 2766–2779.

- Celegato B., Capitanio D., Pescatori M., Romualdi C., Paccioni B., Cagnin S., Viganò A., Colantoni L., Begum S., Ricci E., Wait R.* Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes // *Proteomics*. 2006. V. 6. № 19. P. 5303–5321.
- Chen Z., Zhang Y.* Loss of DUX causes minor defects in zygotic genome activation and is compatible with mouse development // *Nature Genetics*. 2019. V. 51. № 6. P. 947–951.
- Chew G.L., Campbell A.E., De Neef, E., Sutliff N.A., Shadle S.C., Tapscott S.J., Bradley R.K.* DUX4 suppresses MHC class I to promote cancer immune evasion and resistance to checkpoint blockade. // *Developmental Cell*. 2019. V. 50. № 5. P. 658–671.
- Cla P.J., Mitchell L.M., Bolland D.J., Fantes J., Corcoran A.E., Scotting P.J., Armour J.A., Hewitt J.E.* Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy // *The American J. Human Genetics*. 2007. V. 81. № 2. P. 264–279.
- Das S., Chadwick B.P.* Influence of repressive histone and DNA methylation upon D4Z4 transcription in non-myogenic cells // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 7. e0160022.
- De Iaco A., Planet E., Coluccio A., Verp S., Duc J., Trono D.* DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals // *Nature Genetics*. 2017. V. 49. № 6. P. 941.
- DeLaurier A., Schweitzer R., Logan M.* Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb // *Dev. Biology*. 2006. V. 299. № 1. P. 22–34.
- Deng Q., Ramsköld, D., Reinius B., Sandberg R.* Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells // *Science*. 2014. V. 343. № 6167. P. 193–196.
- Dib C., Zakharova V., Popova E., Kiseleva E., Chernyak B., Lipinski M., Vassetzky Y.S.* DUX4 pathological expression: causes and consequences in cancer // *Trends in Cancer*. 2019. V. 5. № 5. P. 268–271.
- Dion C., Roche S., Laberthonnière C., Broucqsaault N., Mariot V., Xue S., Gurzau A.D., Nowak A., Gordon C.T., Gaillard M.C., El-Yazidi C.* SMCHD1 is involved in de novo methylation of the DUX4-encoding D4Z4 macro-satellite // *Nucleic Acids Research*. 2019. V. 47. № 6. P. 2822–2839.
- Dixit M., Anseau E., Tassin A., Winokur S., Shi R., Qian H., Sauvage S., Mattéotti C., van Acker A.M., Leo O., Figlewicz D.* DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. V. 104. № 46. P. 18157–18162.
- Dmitriev P., Saada Y.B., Dib C., Anseau E., Barat A., Hamade A., Dessen P., Robert T., Lazar V., Louzada R.A., Dupuy C.* DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients // *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. V. 99. P. 244–258.
- Dmitriev P., Kairov U., Robert T., Barat A., Lazar V., Carnac G., Laoudj-Chenivresse D., Vassetzky Y.S.* Cancer-related genes in the transcription signature of facioscapulohumeral dystrophy myoblasts and myotubes // *J. Cellular and Molecular Medicine*. 2014. V. 18. № 2. P. 208–217.
- Dmitriev P., Kiseleva E., Kharchenko O., Ivashkin E., Pichugin A., Dessen P., Robert T., Co Pée F., Belayew A., Carnac G., Laoudj-Chenivresse D.* Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 40. P. 65090.
- Dmitriev P., Stankevics L., Anseau E., Petrov A., Barat A., Dessen P., Robert T., Turki A., Lazar V., Labourer E., Belayew A.* Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients // *J. Biol. Chem*. 2013. V. 288. № 49. P. 34989–35002.
- Dong X., Zhang W., Wu H., Huang J., Zhang M., Wang P., Zhang H., Chen Z., Chen S.J., Meng G.* Structural basis of DUX4/IGH-driven transactivation // *Leukemia*. 2018. V. 32. № 6. P. 1466–1476.
- Ferreboeuf M., Mariot V., Bessieres B., Vasiljevic A., Attié-Bitach T., Collardeau S., Morere J., Roche S., Magdinier F., Robin-Ducellier J., Rameau P.* DUX4 and DUX4 downstream target genes are expressed in fetal FSHD muscles // *Human Molecular Genetics*. 2014. V. 23. № 1. P. 171–181.
- Gabriels J., Beckers M.C., Ding H., De Vriese A., Plaisance S., Van Der Maarel S.M., Padberg G.W., Frants R.R., Hewitt J.E., Collen D., Belayew A.* Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element // *Gene*. 1999. V. 236. № 1. P. 25–32.
- Geng L.N., Yao Z., Snider L., Fong A.P., Cech J.N., Young J.M., van der Maarel S.M., Ruzzo W.L., Gentileman R.C., Tawil R., Tapscott S.J.* DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy // *Developmental Cell*. 2012. V. 22. № 1. P. 38–51.
- De Greef J.C., Lemmers R.J.L.F., Camano P., Day J.W., Sacconi S., Dunand M., Van Engelen B.G.M., Kiuru-Enari S., Padberg G.W., Rosa A.L., Desnuelle C.* Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 // *Neurology*. 2010. V. 75. № 17. P. 1548–1554.
- Guo M., Zhang Y., Zhou J., Bi Y., Xu J., Xu C., Kou X., Zhao Y., Li Y., Tu Z., Liu, K.* Precise temporal regulation of Dux is important for embryo development // *Cell Res*. 2019. V. 29. № 11. P. 956–959.
- Güven-Ozkan T., Nishi Y., Robertson S.M., Lin R.* Global transcriptional repression in *C. elegans* germline precursors by regulated sequestration of TAF-4 // *Cell*. 2008. V. 135. № 1. P. 149–160.
- Hendrickson P.G., Doráis J.A., Grow E.J., Whiddon J.L., Lim J.W., Wike C.L., Weaver B.D., Pflueger C., Emery B.R., Wilcox A.L., Nix D.A.* Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons // *Nature Genetics*. 2017. V. 49. № 6. P. 925.
- Ida K., Kobayashi S., Taki T., Hanada R., Bessho F., Yamamori S., Sugimoto T., Ohki M., Hayashi Y.* EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor // *International J. Cancer*. 1995. V. 63. № 4. P. 500–504.
- Jevtić P., Levy D.L.* Nuclear size scaling during *Xenopus* early development contributes to midblastula transition timing // *Current Biology*. 2015. V. 25. № 1. P. 45–52.

- Jevtić P., Levy D.L. Both nuclear size and DNA amount contribute to midblastula transition timing in *Xenopus laevis* // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–9.
- Jin Y., Ha N., Forés M., Xiang J., Gläßer C., Maldera J., Jiménez G., Edgar B.A. EGFR/Ras signaling controls *Drosophila* intestinal stem cell proliferation via Capicua-regulated genes // PLoS Genetics. 2015. V. 11. № 12.
- Joseph S.R., Palfy M., Hilbert L., Kumar M., Karschau J., Zaburdaev V., Shevchenko A., Vastenhouw N.L. Competition between histone and transcription factor binding regulates the onset of transcription in zebrafish embryos // Elife. 2017. V. 6. e23326.
- Katargin A.N., Pavlova L.S., Kisseljov F.L., Kisseljova N.P. Hypermethylation of genomic 3.3-kb repeats is frequent event in HPV-positive cervical cancer // BMC Medical Genomics. 2009. V. 2. № 1. P. 30.
- Kawamura-Saito M., Yamazaki Y., Kaneko K., Kawaguchi N., Kanda H., Mukai H., Gotoh T., Motoi T., Fukayama M., Aburatani H., Takizawa T. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation // Human Molecular Genetics. 2006. V. 15. № 13. P. 2125–2137.
- Kimelman D., Kirschner M., Scherson T. The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle // Cell. 1987. V. 48. № 3. P. 399–407.
- Kowaljow V., Marcowycz A., Anseu E., Conde C.B., Sauvage S., Mattéotti C., Arias C., Corona E.D., Nuñez N.G., Leo O., Wattiez, R. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein // Neuromuscular Disorders. 2007. V. 17. № 8. P. 611–623.
- Krämer A., Hochhaus A., Saussele S., Reichert A., Willer A., Hehlmann R. Cyclin A1 is predominantly expressed in hematological malignancies with myeloid differentiation // Leukemia. 1998. V. 12. № 6. P. 893–898.
- De Launoit Y., Baert J.-L., Chotteau-Lelievre A., Monte D., Coutte L., Mauen S., Firlej V., Degerny C., Verreman K. The Ets Transcription Factors of the PEA3 Group: Transcriptional Regulators in Metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* // Reviews on Cancer. 2006. V. 1766. № 1. P. 79–87.
- Lee J.K., Bosnakovski D., Toso E.A., Dinh T., Banerjee S., Bohl T.E., Shi K., Orellana K., Kyba M., Aihara H. Crystal structure of the double homeodomain of DUX4 in complex with DNA // Cell Reports. 2018. V. 25. № 11. P. 2955–2962.e3.
- Leidenroth A., Clapp J., Mitchell L.M., Coneyworth D., Dearden F.L., Iannuzzi L., Hewitt J.E. Evolution of DUX gene macrosatellites in placental mammals // Chromosoma. 2012. V. 121. № 5. P. 489–497.
- Leidenroth A., Hewitt J.E. A family history of DUX4: phylogenetic analysis of DUXA, B, C and Duxbl reveals the ancestral DUX gene // BMC Evolutionary Biology. 2010. V. 10. № 1. P. 364.
- Liao C., Wang X.Y., Wei H.Q., Li S.Q., Merghoub T., Pandolfi P.P., Wolgemuth D.J. Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. V. 98. № 12. P. 6853–6858.
- Lilljebjörn H., Henningsson R., Hyrenius-Wittsten A., Olsson L., Orsmark-Pietras C., Von Palffy S., Askmyr M., Rissler M., Schrappe M., Cario G., Castor A. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia // Nature Communications. 2016. V. 7. № 1. P. 1–3.
- Liu D., Matzuk M.M., Sung W.K., Guo Q., Wang P., Wolgemuth D.J. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse // Nature Genetics. 1998. V. 20. № 4. P. 377–380.
- Mitsuda S.H., Shimizu N. Epigenetic repeat-induced gene silencing in the chromosomal and extrachromosomal contexts in human cells // PLoS One. 2016. V. 11. № 8. e0161288
- Mitsuhashi H., Ishimaru S., Homma S., Yu B., Honma Y., Beermann M.L., Miller J.B. Functional domains of the FSHD-associated DUX4 protein // Biology Open. 2018. V. 7. № 4. bio033977.
- Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 687–696.
- Pandey S.N., Cabotage J., Shi R., Dixit M., Sutherland M., Liu J., Muger S., Harper S.Q., Nagaraju K., Chen Y.W. Conditional over-expression of PITX1 causes skeletal muscle dystrophy in mice // Biology Open. 2012. V. 1. № 7. P. 629–639.
- Rothe M., Pehl M., Taubert H., Jäckle H. Loss of gene function through rapid mitotic cycles in the *Drosophila* embryo // Nature. 1992. V. 359. № 6391. P. 156–159.
- Saada Y.B., Dib C., Dmitriev P., Hamade A., Carnac G., Laoudj-Chenivresse D., Lipinski M., Vassetzky Y.S. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage // Histochemistry and Cell Biology. 2016. V. 145. № 4. P. 475–483.
- Shermoen A.W., O'Farrell P.H. Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts // Cell. 1991. V. 67. № 2. P. 303–310.
- Sirvent N., Trassard M., Ebran N., Attias R., Pedeutour F. Fusion of EWSR1 with the DUX4 facioscapulohumeral muscular dystrophy region resulting from t(4;22)(q35;q12) in a case of embryonal rhabdomyosarcoma // Cancer Genetics and Cytogenetics. 2009. V. 195. № 1. P. 12–18.
- Snider L., Asawachaicharn A., Tyler A.E., Geng L.N., Petek L.M., Maves L., Miller D.G., Lemmers R.J., Winokur S.T., Tawil R., van der Maarel S.M. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy // Human Molecular Genetics. 2009. V. 18. № 13. P. 2414–2430.
- Snider L., Geng L.N., Lemmers R.J., Kyba M., Ware C.B., Nelson A.M., Tawil R., Filippova G.N., van der Maarel S.M., Tapscott S.J., Miller D.G. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene // PLoS Genetics. 2010. V. 6. № 10. e1001181.
- Szeto D.P., Rodriguez-Esteban C., Ryan A.K., O'Connell S.M., Liu F., Kioussi C., Gleiberman A.S., Izpisua-Belmonte J.C., Rosenfeld M.G. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development // Genes & Development. 1999. V. 13. № 4. P. 484–494.

- Tadros W., Lipshitz H.D.* The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts // *Development*. 2009. V. 136. № 18. P. 3033–3042.
- Tseng A.S., Tapon N., Kanda H., Cigizoglu S., Edelmann L., Pellock B., White K., Hariharan I.K.* Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signaling pathway // *Current Biology*. 2007. V. 17. № 8. P. 728–733.
- Tsumagari K., Qi L., Jackson K., Shao C., Lacey M., Sowden J., Tawil R., Vedanarayanan V., Ehrlich M.* Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers // *Nucleic Acids Research*. 2008. V. 36. № 7. P. 2196–2207.
- Van Allen E.M., Miao D., Schilling B., Shukla S.A., Blank C., Zimmer L., Sucker A., Hillen U., Foppen M.H., Goldinger S.M., Utikal J.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma // *Science*. 2015. V. 350. № 6257. P. 207–211.
- Vanderplanck C., Anseau E., Charron S., Stricwant N., Tassin A., Laoudj-Chenivresse D., Wilton S.D., Coppee F., Belayew A.* The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 10.
- Vassena R., Boué S., González-Roca E., Aran B., Auer H., Veiga A., Belmonte J.C.* Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development // *Development*. 2011. V. 138. № 17. P. 3699–3709.
- Veenstra G.J., Destrée O.H., Wolffe A.P.* Translation of maternal TATA-binding protein mRNA potentiates basal but not activated transcription in *Xenopus* embryos at the midblastula transition // *Molecular and Cellular Biology*. 1999. V. 19. № 12. P. 7972–7982.
- Wallace L.M., Garwick S.E., Mei W., Belayew A., Coppee F., Ladner K.J., Guttridge D., Yang J., Harper S.Q.* DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy *in vivo* // *Annals of Neurology*. 2011. V. 69. № 3. P. 540–552.
- Winokur S.T., Barrett K., Martin J.H., Forrester J.R., Simon M., Tawil R., Chung S.A., Masny P.S., Figlewicz D.A.* Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress // *Neuromuscular Disorders*. 2003. V. 13. № 4. P. 322–333.
- Winokur S.T., Chen Y.W., Masny P.S., Martin J.H., Ehmssen J.T., Tapscott S.J., van der Maarel S.M., Hayashi Y., Flanigan K.M.* Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation // *Human Molecular Genetics*. 2003. V. 12. № 22. P. 2895–2907.
- Yasuda T., Tsuzuki S., Kawazu M., Hayakawa F., Kojima S., Ueno T., Imoto N., Kohsaka S., Kunita A., Doi K., Sakura T.* Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults // *Nature Genetics*. 2016. V. 48. № 5. P. 569.
- Zalzman M., Falco G., Sharova L.V., Nishiyama A., Thomas M., Lee S.L., Stagg C.A., Hoang H.G., Yang H.T., Indig F.E., Wersto R.P.* Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells // *Nature*. 2010. V. 464. № 7290. P. 858–863.
- Zhang J., McCastlain K., Yoshihara H., Xu B., Chang Y., Churchman M.L., Wu G., Li Y., Wei L., Iacobucci I., Liu Y.* Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia // *Nature Genetics*. 2016. V. 48. № 12. P. 1481–1489.
- Zhang Y., Lee J.K., Toso E.A., Lee J.S., Choi S.H., Slattey M., Aihara H., Kyba M.* DNA-binding sequence specificity of DUX4 // *Skeletal Muscle*. 2015. V. 6. № 1. P. 8.

## DUX4, a Zygotic Genome Activator, Is Involved in Oncogenesis and Genetic Diseases

A. A. Karpukhina<sup>1,2,3,4</sup> and Y. S. Vassetzky<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR9018, Université Paris-Sud Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France

<sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>3</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Leninskie Gory 1 (40), Moscow, 119234 Russia

<sup>4</sup>Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1 (73), Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: yegor.vassetzky@cnrs.fr

After fertilization, the genome is transcriptionally quiescent to allow zygote reprogramming that relies on the RNA and proteins accumulated in the oocyte and ensures the transition from the differentiated germ cells to a totipotent state. Reprogramming is followed by zygotic genome activation (ZGA). *DUX4* gene encoding for a double homeobox transcription factor is one of the key ZGA drivers in humans. Its expression, essential for embryo development, is subject to precise temporal regulation and is normally observed only at early cleavage stages. *DUX4* is efficiently silenced in most somatic tissues *via* numerous epigenetic mechanisms, while its aberrant expression in skeletal muscle causes facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *DUX4* expression following chromosomal rearrangements is also observed in a subset of leukemias and sarcomas; it leads to anti-cancer immune activity suppression.

**Keywords:** DUX4, zygotic genome activation (ZGA), oncogenesis, muscular dystrophy