

Транскрипция сателлитной ДНК2/3 в клеточной линии А549 при тепловом шоке.

Научный руководитель – Енукашвили Натэлла Иосифовна

Пономарцев Н.В.¹, Чубарь А.В.²

1 - Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: ponomartsev@yandex.ru*; 2 - Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: annachubar95@gmail.com*

Фактор теплового стресса 1 (HSF-1) является ключевым белком, участвующим в повышении транскрипции генов, белковые продукты которых выполняют защитные функции. Известно, что HSF-1 индуцирует активацию прицентромерной сателлитной ДНК2/3 (сатДНК2/3). СатДНК2/3 представляет собой прицентромерные tandemные повторы некодирующей ДНК и в норме транскрипционно не активна. Транскрипты сатДНК2/3 при тепловом шоке рекрутируют белки, участвующие в процессинге пре-мРНК, образуя с ними комплексы (ядерных стресс телец, ЯСт). Маркерным белком ЯСт является HSF-1. СатДНК2/3 располагается на большинстве хромосом человека, однако ранее транскрипция сатДНК2/3 и образование ЯСт в ответ на тепловой шок наблюдались только на 9 и Y-хромосоме. Данных о транскрипции сатДНК2/3 с других хромосом нет.

Цель работы - исследовать транскрипцию сатДНК2/3 человека с помощью панприцентромерного зонда в клеточной линии человека.

Эксперименты проводили на клеточной линии аденокарциномы легкого человека А549, которые подвергали тепловому воздействию при 43°C, после чего переносили в нормальные культуральные условия. Анализ клеток проводили методами флуоресцентной ДНК-РНК in situ гибридизации (FISH), комбинированной с иммуноцитохимическим окрашиванием. Использовали зонд DYZ1 к последовательности сатДНК2/3, который в зависимости от условий гибридизуется либо только с хромосомой 9 и Y, либо с прицентромерами большинства хромосом. С помощью антител исследовали локализацию белка HSF-1. Уровень транскрипции сатДНК2/3 анализировали с помощью выделения РНК с последующим ОТ-ПЦР и РТ-ПЦР.

В клетках до теплового шока сигнала от зонда DYZ1 не наблюдалось. Через 1 ч теплового шока в клетках детектировали 2-4 крупных (2-3 мкм) сигнала от DYZ1, а также множество (1-11 штук) мелких (0,5-1 мкм) сигналов. Через 1 и 4 ч восстановления количество сигналов и интенсивность флуоресценции увеличивались. Через 4 ч интенсивность флуоресценции от зонда DYZ1 снижалась, но была выше, чем в клетках, которые анализировали сразу после теплового шока. Данные были проверены с помощью РТ-ПЦР. До теплового воздействия HSF-1 располагался в цитоплазме клеток. После 1 ч теплового шока HSF-1 образует гранулы, которые перекрываются со всеми крупными, но не мелкими сигналами DYZ1. Через 1 ч восстановительного периода большинство сигналов от DYZ1 не перекрывалось с HSF-1, через 4 ч HSF-1 детектировали в цитоплазме. При проведении FISH в условиях хромосомспецифичной гибридизации динамика появления сигналов не изменялась, однако присутствовали только крупные гибридизованные сигналы, локализованные с HSF1.

Таким образом, в клеточной линии А549 при тепловом шоке транскрипция сатДНК2/3 происходит не только с 9 и Y хромосом. ЯСт колокализовались только с крупными сигналами от DYZ1, что может говорить о разных механизмах транскрипции сатДНК2/3 с разных хромосом человека и различной функции этих транскриптов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-74-20102.

