

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

МАЛЬКЕЕВА ДИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**Влияние делеции гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc* на
устойчивость *Drosophila melanogaster* к различным типам
стресса**

1.5.22. – клеточная биология

1.5.7. – генетика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

к.б.н. Киселева Е. В.,

к.б.н. Фёдорова С. А.

Новосибирск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 10 |
| 1.1. Белки теплового шока | 10 |
| 1.2. Характеристика семейств белков теплового шока | 11 |
| 1.2.1. Семейство Hsp70 и кошапероны Hsp40 и NEF | 11 |
| 1.2.2. Семейство Hsp100 | 13 |
| 1.2.3. Шаперонины Hsp60 и кошапероны Hsp10 | 15 |
| 1.2.4. Семейство Hsp90 | 17 |
| 1.2.5. Семейство sHsp..... | 19 |
| 1.3. sHsp <i>D. melanogaster</i> и температурный стресс..... | 24 |
| 1.4. Малый белок теплового шока Hsp67Bc..... | 26 |
| 1.5. Макроаутофагия – один из типов аутофагии | 27 |
| 1.5.1. Пути регуляции макроаутофагии | 29 |
| 1.5.2. Исследование макроаутофагии на <i>D. melanogaster</i> | 33 |
| 1.6. Заключение | 38 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 39 |
| 2.1. Используемые линии и генотипы <i>D. melanogaster</i> | 39 |
| 2.2. Молекулярные методы | 40 |
| 2.2.1. Выделение нуклеиновых кислот..... | 40 |
| 2.2.2. Полимеразная цепная реакция..... | 41 |
| 2.2.3. Электрофорез в агарозном геле | 43 |
| 2.2.4. Секвенирование ДНК..... | 43 |
| 2.3. Методы изучения ответа на различные типы стресса | 44 |
| 2.3.1. Оценка жизнеспособности и плодовитости взрослых <i>D. melanogaster</i> в нормальных условиях и при воздействии повышенной температуры | 44 |
| 2.3.2. Исследование воздействия повышенной температуры на личинок и куколок <i>D. melanogaster</i> | 45 |
| 2.3.3. Оценка скорости восстановления и выживаемости взрослых мух после холодной комы | 45 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.4. Измерение плодовитости самок <i>D. melanogaster</i> после холодной комы | 46 |
| 2.3.5. Изучение воздействия пониженной температуры на личинок и куколок | 46 |
| 2.3.6. Белковое голодание | 47 |
| 2.4. Цитологические методы | 47 |
| 2.4.1. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) | 47 |
| 2.4.2. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)..... | 48 |
| 2.4.3. Окрашивание LysoTracker Red (LTR) | 49 |
| 2.5. Статистический анализ полученных данных | 49 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ | 51 |
| 3.1. Получение линии <i>D. melanogaster</i> с делецией в гене <i>Hsp67Bc</i> | 51 |
| 3.2. Жизнеспособность и фертильность мух с делецией <i>Hsp67Bc</i> в нормальных условиях..... | 53 |
| 3.3. Устойчивость мух с делецией в гене <i>Hsp67Bc</i> к повышенной температуре .. | 55 |
| 3.3.1. Влияние повышенной температуры на плодовитость мух..... | 59 |
| 3.4. Устойчивость мух с делецией гена <i>Hsp67Bc</i> к пониженной температуре..... | 62 |
| 3.4.1. Восстановление взрослых <i>D. melanogaster</i> после холодной комы..... | 62 |
| 3.4.2. Выживаемость мух на различных стадиях развития после воздействия холода | 64 |
| 3.4.3. Влияние пониженной температуры на плодовитость <i>D. melanogaster</i> | 68 |
| 3.4.4. Уровни экспрессии генов некоторых белков теплового шока, <i>Frost</i> и <i>starvin</i> <i>D. melanogaster</i> на стадиях личинки, куколки и имаго во время холодового стресса и восстановления после него | 68 |
| 3.5. Влияние делеции гена <i>Hsp67Bc</i> на степень дегенерации глаз мух, экспрессирующих мутантный <i>ATXN3</i> | 76 |
| 3.6. Влияние делеции гена <i>Hsp67Bc</i> на макроаутофагию в яичниках и нейронах мозга мух | 79 |
| 3.6.1. Влияние делеции гена <i>Hsp67Bc</i> на макроаутофагию в яичниках мух при белковом голодании | 80 |
| 3.6.2. Содержание бактерий <i>Wolbachia</i> штамма <i>wMelPop</i> в мозге личинок, куколок и взрослых мух с делецией в гене <i>Hsp67Bc</i> | 83 |
| 3.6.3. Аутофагия бактерий <i>Wolbachia</i> в нейронах взрослых <i>D. melanogaster</i> | 85 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.6.4. Влияние делеции гена <i>Hsp67Bc</i> на морфологию аутофагосом и аутолизосом в нейронах мозга мух, инфицированных <i>Wolbachia</i> | 92 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ..... | 95 |
| 4.1. <i>Hsp67Bc</i> и температурный стресс..... | 95 |
| 4.2. <i>Hsp67Bc</i> и макроаутофагия..... | 99 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 103 |
| ВЫВОДЫ..... | 105 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 106 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DAPI – 4',6-**d**iamidino-2-**p**henylindole – 4',6-диамидино-2-фенилиндол;

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*;

HSP – **h**eat **s**hock **p**roteins – белки теплового шока;

LTR – краситель LysoTracker **R**ed DND-99;

SDS – **s**odium **d**odecyl sulfate – додецилсульфат натрия

sHsp – **s**mall **h**eat **s**hock **p**roteins – малые белки теплового шока;

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

ПЖ – продолжительность жизни;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;

ЦНС – центральная нервная система;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭПС – эндоплазматическая сеть.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В онтогенезе живые организмы сталкиваются с воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды, и им необходимо поддерживать гомеостаз в меняющихся условиях обитания. Универсальным механизмом противодействия стрессовому воздействию, общим для всех изученных про- и эукариотических организмов, является активация синтеза группы крайне консервативных белков – белков теплового шока (**heat shock proteins, HSP**) (Lindquist, 1986). Схожесть последовательностей аминокислот HSP семейства Hsp70 про- и эукариот достигает 50% (Parsell, Lindquist, 1993), а при сравнении последовательностей генов внутри семейств HSP можно проследить эволюцию представителей всех царств живых организмов и, кроме того, родство митохондрий и хлоропластов с α -протеобактериями и цианобактериями, соответственно (Huang et al., 2008).

Вопреки своему названию, HSP индуцируются в ответ не только на тепловой шок, но также на широкий спектр других стрессовых факторов, к примеру, пониженную температуру, радиацию, гипоксию, окислительный стресс, тяжёлые металлы, бактериальные и вирусные инфекции (Lindquist, 1986; Sørensen et al., 2003). Кроме того, некоторые HSP синтезируются в отсутствие стресса и необходимы для нормального роста и развития живых организмов (Kampinga et al., 2009; Sarkar et al., 2011). К примеру, исследования на плодовых мушках *Drosophila melanogaster* показали, что нокдаун 42 из 95 исследованных генов *HSP* приводил к гибели особей в поколении F1, что указывает на важную роль в развитии и жизнедеятельности мух (Raut et al., 2017). Мутации в ряде HSP приводят к развитию заболеваний у человека – нейропатий, миопатий и заболеваний сетчатки и хрусталика глаза (Macario et al., 2005; Kakkar et al., 2014).

Несмотря на их ключевую роль в обеспечении выживаемости организмов, свойства и функции множества HSP мало изучены. Одним из таких белков является Hsp67Bc дрозофилы, имеющий функциональный ортолог у человека – HSPB8 (Carra et al., 2010). Hsp67Bc успешно предотвращает агрегацию мутантных белков, приводящую к развитию нейродегенеративных заболеваний человека, и вовлечён в регуляцию макроаутофагии – фундаментального процесса, при помощи которого

происходит удаление из цитоплазмы клеток и переработка повреждённых органелл, белковых агрегатов и инфекционных агентов (Amano et al., 2006; He, Klionsky, 2009; Carra et al., 2010; Zhang, Calderwood, 2011; Vos et al., 2016). Другие функции *Hsp67Bc* до настоящего времени изучены не были.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы – определение влияния делеции гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc* на устойчивость мух *Drosophila melanogaster* к различным типам стресса – температурному, агрегации пептида с полиглутаминовым трактом, белковому голоданию и присутствию патогенного штамма бактерий *Wolbachia*.

Для выполнения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. При помощи неточного вырезания *P*-элемента получить делецию гена *Hsp67Bc D. melanogaster*, создать и охарактеризовать линию мух с данной делецией;
2. Оценить продолжительность жизни, выживаемость и плодовитость нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух в условиях повышенной и пониженной температуры;
3. Исследовать морфологию глаз нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух на фоне эктопической экспрессии гена, кодирующего мутантный белок Ataxin-3 человека с удлинённым полиглутаминовым трактом;
4. Проанализировать процесс макроаутофагии у нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух в яичниках в условиях белкового голодания и в нейронах центральной нервной системы в присутствии бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop.

Научная новизна

Впервые на организменном уровне изучен вклад гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc D. melanogaster* в формирование ответа на воздействие повышенной и пониженной температуры. Обнаружено, что *Hsp67Bc* необходим для устойчивости взрослых мух к воздействию пониженной температуры разной длительности. В результате подробного анализа процесса макроаутофагии в центральной нервной системе дрозофил на ультраструктурном уровне было выявлено, что в отсутствие гена *Hsp67Bc* нарушается стадия созревания аутофагосом.

Теоретическая и практическая значимость

Значительно расширены знания о функциях *Hsp67Bc* *D. melanogaster*. Полученные данные могут быть использованы для чтения лекций и проведения семинаров для студентов биологических специальностей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Делеция гена *Hsp67Bc*, кодирующего малый белок теплового шока, снижает скорость восстановления имаго и выживаемость самок *D. melanogaster* после холодовой комы при 0 °С длительностью 2, 4 и 12 ч.
2. Делеция гена *Hsp67Bc* у взрослых *D. melanogaster* с эктопической экспрессией гена, кодирующего белок Ataxin-3 человека с удлинённым полиглутаминовым трактом, усиливает патологический фенотип, характерный для дегенерации глаз мух – деградацию фасеток.
3. Делеция гена *Hsp67Bc* у имаго *D. melanogaster* нарушает процесс макроаутофагии на стадии созревания аутофагосом в нейронах центральной нервной системы в присутствии бактерий *Wolbachia*.

Вклад автора

Все результаты исследования, за исключением следующих, были получены автором самостоятельно. Регистрация продолжительности жизни мух при нормальной и повышенной температуре, а также после теплового шока проводилась совместно с к.б.н. С.А. Фёдоровой; подсчёт яиц, отложенных самками в этих условиях, производился к.б.н. С.А. Фёдоровой. Получение дрозофил, экспрессирующих ген *ATXN3* человека на фоне делеции гена *Hsp67Bc*, было осуществлено к.б.н. С.А. Фёдоровой, анализ морфологии глаз этих мух был выполнен совместно с к.б.н. С.А. Фёдоровой.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях:

1. VIII Всероссийский с международным участием конгресс молодых учёных-биологов «Симбиоз – Россия 2015» (Новосибирск, Россия, 2015);
2. The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (Новосибирск, Россия, 2016);

3. Международная конференция Хромосома 2018 (Новосибирск, Россия, 2018);
4. 3rd International Conference “Smart Bio” (Каунас, Литва, 2019);
5. Stress Signalling, Quality Control, Phase Separation, Aging and Disease in Proteostasis (Gordon Research Conference) (Барга, Италия, 2019).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. Malkeyeva D.A., Kiseleva E.V. THE FUNCTIONAL ROLE OF SMALL HEAT SHOCK PROTEIN Hsp67Bc IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* // *Tsitologiya*. – 2016. – Vol. 58. – № 4. – P. 272–276.
2. Malkeyeva D., Kiseleva E., Fedorova S. Small heat shock protein Hsp67Bc plays a significant role in *Drosophila melanogaster* cold-stress tolerance // *J. Exp. Biol.* – 2020. – Vol. 223. – № 21. – P. jeb219592.
3. Malkeyeva D., Kiseleva E., Fedorova S.A. Loss of *Hsp67Bc* leads to autolysosome enlargement in the *Drosophila* brain // *Cell Biol. Int.* – 2022. – Vol. 46. – № 2. – P. 203–212.
4. Malkeyeva D., Fedorova S.A., Kiseleva E. The impact of the *Hsp67Bc* gene product on *Drosophila melanogaster* longevity, fecundity, and acute heat stress tolerance // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2022. – Vol. 26. – № 2. – P. 169–178.

Структура и объём работы

Настоящая работа включает оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы из 180 источников. Диссертация изложена на 123 страницах, содержит 31 рисунок и 5 таблиц.

Благодарности

Автор благодарен всем принимавшим участие в получении и обсуждении результатов настоящей работы. Отдельную благодарность автор выражает сотрудникам лаборатории эволюционной генетики за предоставление доступа к своему оборудованию и, в особенности, к.б.н. Ю.Э. Гербеку за обучение методике проведения количественной ПЦР и помощь в проведении секвенирования ДНК.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Белки теплового шока

Изучение HSP началось с обнаружения в 1962 г. новых пуфов (вздутый, свидетельствующих об активной транскрипции конкретного участка ДНК) на политенных хромосомах слюнных желёз плодовой мухи *Drosophila busckii*, формирующихся в ответ на повышение температуры, обработку динитрофенолом или салицилатом натрия (Ritossa, 1962). В течение следующего десятилетия учёные выяснили, что образование пуфов (1) происходит в ответ на более широкий спектр стрессовых воздействий (Berendes, 1968; Ashburner, 1970; Leenders, Berendes, 1972), (2) занимает всего нескольких минут с начала стрессового воздействия (Ritossa, 1962; Berendes, 1968; Ashburner, 1970), (3) ассоциировано с синтезом новой РНК (Leenders, Berendes, 1972), (4) обнаруживается у других видов *Drosophila* в различных тканях (Ritossa, 1964; Berendes, 1965), (5) сопровождается исчезновением ранее активных пуфов (Berendes, 1968; Ashburner, 1970; Leenders, Berendes, 1972). В 1973 г. Tissières и Mitchell выявили, что появление пуфов совпадает с синтезом небольшого числа новых белков (Tissières et al., 1974). В последующем гены *HSP* дрозофилы стали одними из первых клонированных генов эукариот, была выявлена их геномная организация, регуляторные последовательности и транскрипционные факторы (Lindquist, 1986). Вскоре синтез подобных белков в ответ на стрессовое воздействие различных типов был обнаружен в клетках культур птиц, дрожжей и множества других организмов (Lindquist, 1986). Позднее стало известно, что HSP присутствуют в клетках и при нормальных условиях, обеспечивая приобретение новосинтезированными пептидами правильной конформации, то есть выполняя функцию «молекулярных шаперонов» (Ellis, 1987; Feder, Hofmann, 1999). Шапероны нековалентно связываются с гидрофобными участками белков неправильной конформации (которые в норме обращены внутрь и недоступны для взаимодействия), предотвращая таким образом агрегацию подобных белков. Затем HSP либо придают белкам нужную конформацию в ходе АТФ-зависимых циклов фолдинга, либо стабилизируют денатурировавшие белки в связанном виде для последующего фолдинга, либо метят их для деградации (Sarkar et al., 2011). В настоящее время HSP разделяют на несколько семейств на основании молекулярной

массы (в кДа) основных представителей и выполняемых ими функций, которые описаны подробнее в следующем параграфе.

1.2. Характеристика семейств белков теплового шока

Существует несколько вариантов классификации HSP. Выделяют пять основных семейств шаперонов – Hsp100 (или Hsp110), Hsp90, Hsp70, Hsp60 и малые HSP (**s**mall **h**eat **s**hock **p**roteins, sHsp), а также их кошапероны – Hsp40, Hsp10 и GrpE, которые иногда также выносят в отдельные семейства. В 2009 г. была предложена стандартная номенклатура HSP человека: HSPH (Hsp110), HSPC (Hsp90), HSPA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HSPB (sHsp), а также семейства шаперонинов HSPD/E (HSP60/HSP10) и CCT (TRiC) (Kampinga et al., 2009).

1.2.1. Семейство Hsp70 и кошапероны Hsp40 и NEF

Белки семейства Hsp70 (DnaK у прокариот, HSPA у человека) являются самыми консервативными – последовательность их аминокислот совпадает приблизительно на 50% у всех охарактеризованных видов живых существ (Sarkar et al., 2011). Уникальной среди остальных семейств HSP чертой Hsp70 является наличие множества копий их генов у большинства изученных видов (Sarkar et al., 2011). Так, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обнаружено 14 копий *Hsp70* (Sarkar et al., 2011); у *D. melanogaster* описано шесть стресс-индуцируемых практически идентичных генов *Hsp70*, стресс-индуцируемый ген *Hsp68* и семь постоянно экспрессирующихся генов *Hsc70* (**h**eat **s**hock **c**ognate **70**) (<https://flybase.org>; Tower, 2011; Xiao et al., 2019). Шапероны семейства Hsp70 располагаются в цитозоле архей и эубактерий и в различных клеточных компартментах эукариот – в ядре, цитоплазме, митохондриях, хлоропластах и эндоплазматической сети (ЭПС) (Sarkar et al., 2011; Rosenzweig et al., 2019). Функции, выполняемые белками Hsp70, разнообразны: к ним относятся фолдинг полипептидов и реактивация агрегировавших белков, поддержание склонных к агрегации пептидов в развёрнутом виде, участие в транслокации белков через мембраны органелл и разрушение белковых агрегатов (Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Связывание и высвобождение субстрата шаперонами Hsp70 регулируется присоединением и гидролизом АТФ (Larburu et al., 2020). Схема этого процесса

представлена на рисунке 1. Для эффективной работы шаперонов Hsp70 важно наличие кошаперонов двух групп – Hsp40 (DnaJ у прокариот) и NEF (**n**ucleotide **e**xchange **f**actor) (Larburu et al., 2020). Гидролиз АТФ в каталитическом центре Hsp70 происходит со скоростью 1 молекула в 20–30 мин, однако присоединение к Hsp70 кошаперона Hsp40 вместе с субстратом ускоряет этот процесс более чем в 1000 раз (Bar-Lavan et al., 2016; Larburu et al., 2020). NEF катализирует замену АДФ на АТФ (Bar-Lavan et al., 2016).

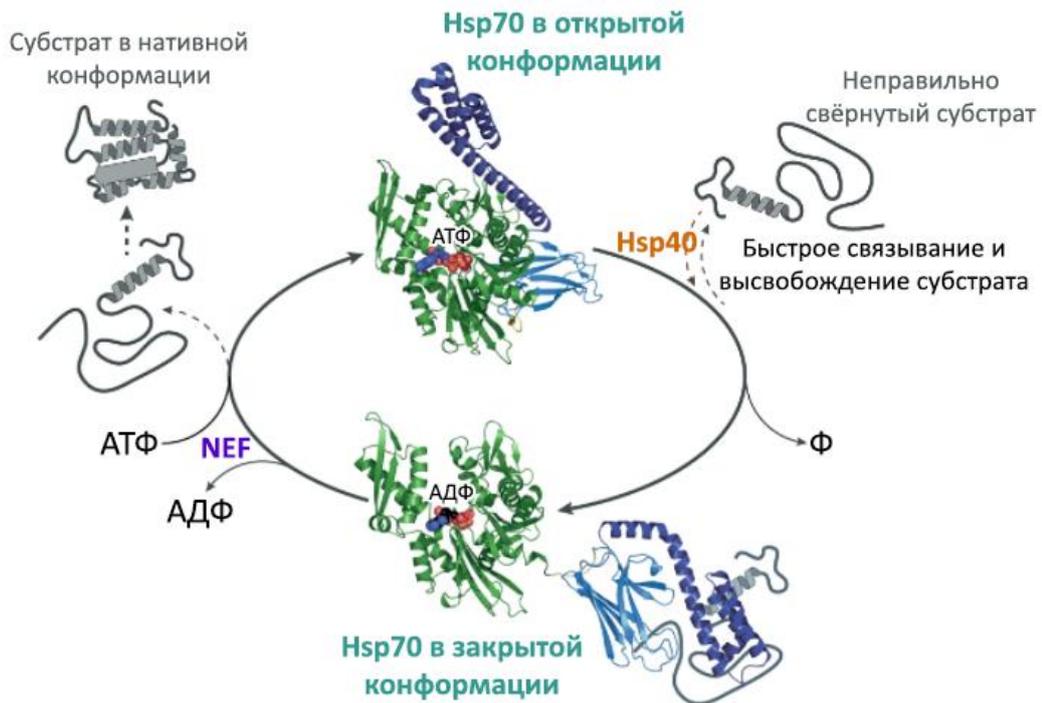


Рисунок 1. Цикл связывания и высвобождения субстрата шаперонами Hsp70. В связанном с АТФ состоянии полипептид-связывающий карман субстрат-связывающего домена (его α - и β -субдомены обозначены тёмно-синим и синим, соответственно) Hsp70 открыт и способен связывать и высвобождать неправильно свёрнутые полипептиды-субстраты (серый), подаваемые кошаперонами Hsp40. Hsp40 ускоряют гидролиз АТФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70 (зелёный), и его субстрат-связывающий домен закрывается, зажимая субстрат. Кошаперон NEF обменивает АДФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70 на АТФ, субстрат-связывающий домен Hsp70 открывается, высвобождая субстрат, который затем приобретает нативную конформацию. Адаптировано из (Rosenzweig et al., 2019).

Существуют разные гипотезы о том, как именно Hsp70 способствуют фолдингу белков. Некоторые модели предполагают пассивную роль Hsp70: связывание шаперонами гидрофобных участков денатурировавших белков защищает их от агрегирования; в последующем освобождённый субстрат самостоятельно принимает правильную конформацию (Bar-Lavan et al., 2016). Другие модели предполагают,

что шапероны Hsp70 способствуют разворачиванию белков-субстратов их зажиманием в субстрат-связывающем кармане или благодаря скооперированному взаимодействию нескольких Hsp70, связанных с субстратом (Bar-Lavan et al., 2016). Так как известно, что шапероны Hsp70 не только предотвращают агрегацию и способствуют фолдингу полипептидов, но и реактивируют агрегировавшие белки, модели, указывающие главной функцией Hsp70 разворачивание пептидов, более правдоподобны (Bar-Lavan et al., 2016).

1.2.2. Семейство Hsp100

Белки семейства Hsp100 (Clp у прокариот, HSPH у человека) включают стресс-индуцируемые и синтезирующиеся на постоянной основе шапероны молекулярной массой в среднем 100–110 кДа, обладающие протеолитической активностью и способные разрушать белковые агрегаты (Sarkar et al., 2011; Mogk et al., 2015). Шапероны этого семейства широко распространены у прокариот, присутствуют у одноклеточных эукариот (к примеру, Hsp104 и Hsp78 у дрожжей *S. cerevisiae*); у многоклеточных обнаруживаются только в митохондриях (Bar-Lavan et al., 2016).

В присутствии АТФ пептиды Hsp100 объединяются в кольцеобразные гомогексамеры с центральной порой диаметром около 15 Å, через которую протягивается разворачиваемый субстрат – пептид, находящийся в составе белкового агрегата (Hodson et al., 2012; Duran et al., 2017). Avellaneda с соавторами показали, что субстрат вовлекается в пору Hsp100 не свободным концом (что, тем не менее, также возможно), а петлей, так как внутренние сегменты агрегировавших белков легче захватываются этими шаперонами (Avellaneda et al., 2020). Предлагаемая Avellaneda с соавторами схема действия Hsp100 приведена на рисунке 2.

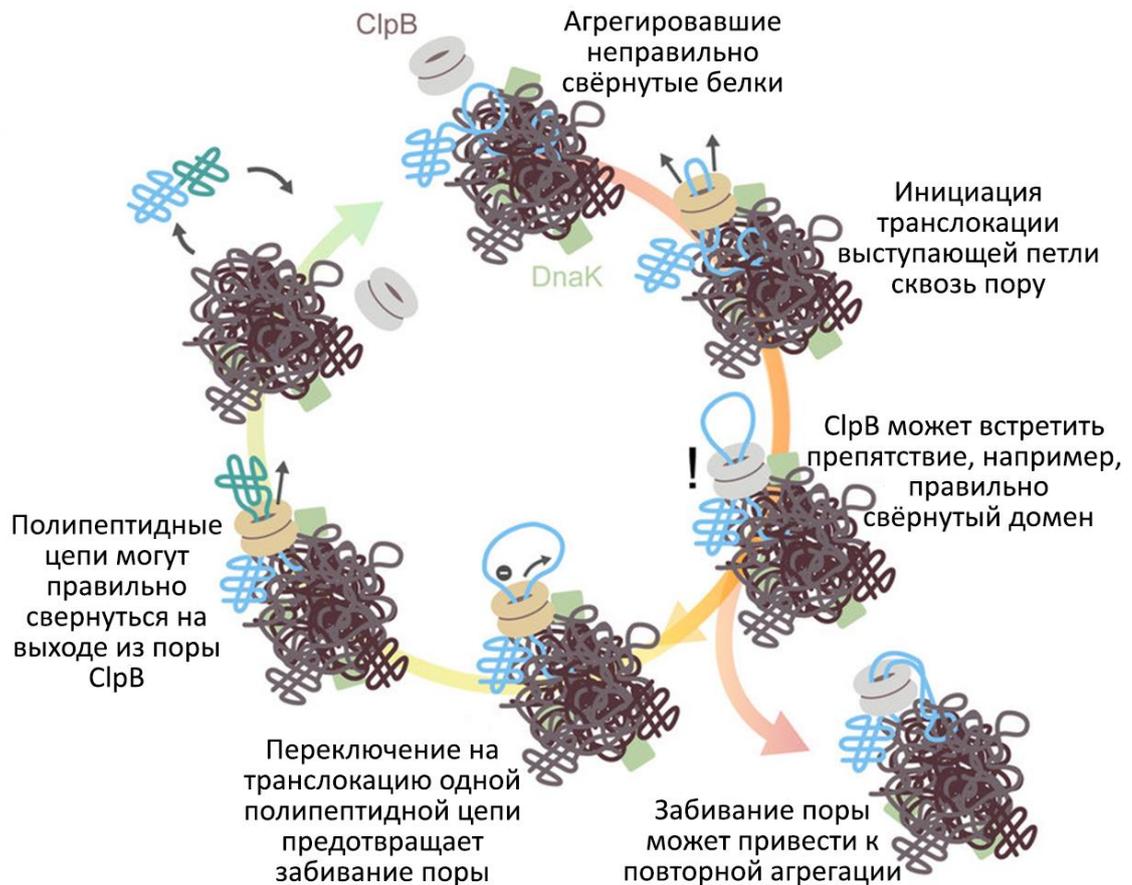


Рисунок 2. Схема разрушения белковых агрегатов шаперонами семейства Hsp100 на примере ClpV *Escherichia coli*. Адаптировано из (Avellaneda et al., 2020).

Некоторые представители семейства Hsp100 могут быть ассоциированы с протеазами, как, например, белки бактерий ClpA, ClpC, ClpX – с протеазой ClpP, а шаперон HslU (ClpY) – с протеазой HslV (ClpQ). В этом случае шапероны разворачивают субстрат и транслоцируют его напрямую в протеазы для деградации (Hodson et al., 2012). Шапероны ClpV бактерий, Hsp104 и Hsp78 дрожжей *S. cerevisiae*, а также Hsp101 растений не имеют связанных с ними протеаз и, таким образом, реактивируют агрегировавшие белки (Hodson et al., 2012). Шапероны Hsp100 способны разрушать белковые агрегаты самостоятельно, однако в присутствии системы шаперонов Hsp70/Hsp40/NEF эффективность дезагрегации значительно увеличивается (Mokry et al, 2015).

1.2.3. Шаперонины Hsp60 и кошапероны Hsp10

Белки семейства Hsp60 (GroEL у эубактерий, HSPD у человека), также называемые «шаперонинами» (Hemmingsen, 1992), синтезируются не только в ответ на стресс, но и на постоянной основе, и необходимы для жизнедеятельности большинства организмов, в том числе *D. melanogaster*, даже в нормальных условиях (Sarkar et al., 2011; Fan et al., 2020). Последовательность ДНК шаперонинов крайне консервативна, что позволяет использовать её при филогенетическом анализе и идентификации организмов (Sarkar et al., 2011). На основании схожести последовательностей ДНК генов Hsp60 и строения шаперонины относят к одной из двух групп (Saibil, 2013; Var-Lavan et al., 2016). К группе I относятся GroEL и его кошаперон GroES в цитоплазме бактерий, Hsp60 и кошаперон Hsp10, находящиеся в матриксе митохондрий, и Cpn60 с кошапероном Cpn20, расположенные в строме хлоропластов (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Zhang et al., 2016). Группа II включает термосому архей и цитоплазматический белок CCT (chaperonin-containing TCP1, также известный как TriC) эукариот (Saibil, 2013). Шаперонины представляют собой симметричные структуры из двух колец, состоящих из 7 (группа I) или 8–9 (группа II) 60-кДа мономеров (Lopez et al., 2015). Кошапероны Hsp10 представляют собой гомогептамеры, состоящие из 10-кДа субъединиц, способные закрывать полости колец шаперонинов группы I подобно крышке (Saibil, 2013). Функцию кошаперонов Hsp10 у шаперонинов группы II выполняет дополнительный участок апикального домена (Saibil, 2013). Реакционный цикл шаперонинов группы I GroEL/GroES представлен на рисунке 3. Реакционный цикл шаперонинов группы II происходит по похожей схеме, за следующими исключениями: закрытие камеры Hsp60 происходит не кошапероном, а в результате изменения конформации апикальных доменов мономеров Hsp60, вызванном гидролизом АТФ; кольца шаперонинов группы II работают синхронно, а не последовательно (Kumar et al., 2015; Lopez et al., 2015).

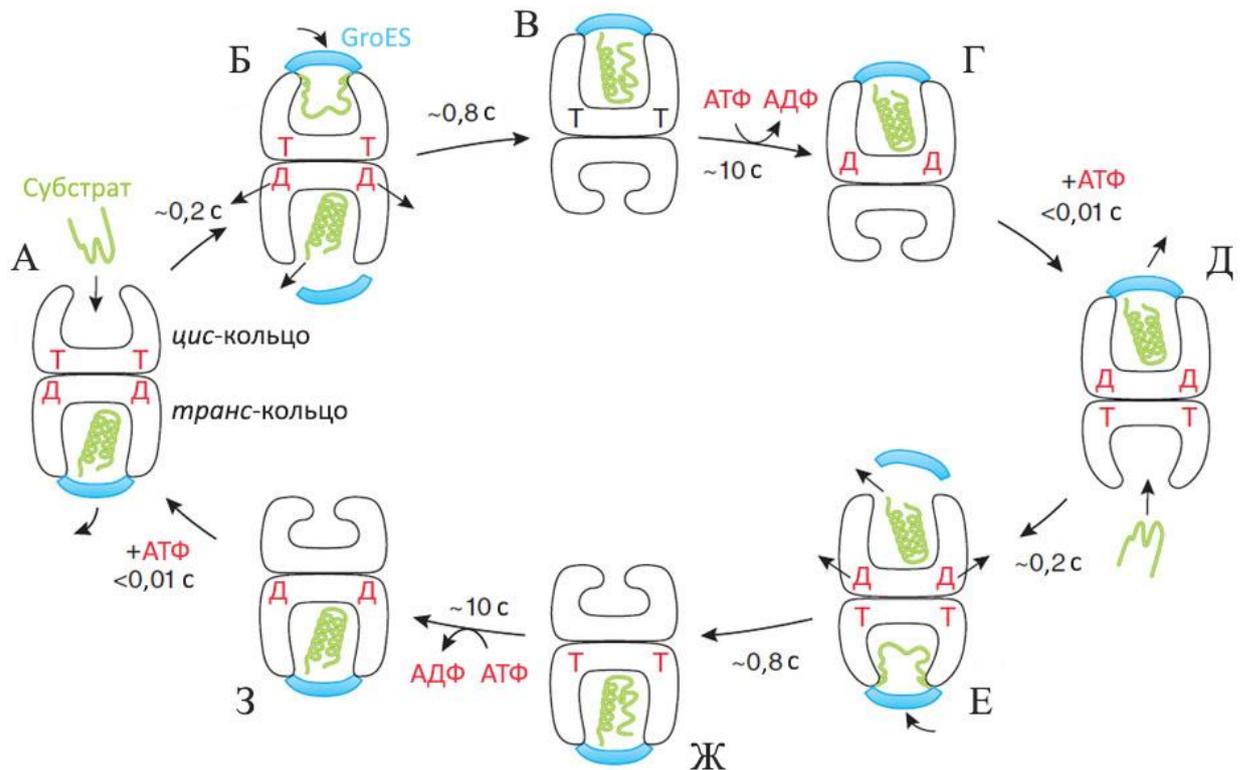


Рисунок 3. Реакционный цикл Hsp60 на примере GroEL (и кошаперона GroES); процесс описан в основном для *цис*-кольца. А – неправильно свёрнутый белок-субстрат (обозначен зелёным) взаимодействует обращёнными в цитоплазму гидрофобными участками с гидрофобной внутренней поверхностью *цис*-кольца GroEL, присоединившего АТФ. Б – полость GroEL очень быстро (в течение $\sim 0,2$ с) закрывается «крышкой» из кошаперона GroES (синяя), и субстрат оказывается «запертым» внутри камеры шаперонина. В – присоединение кошаперона GroES вызывает изменение конформации мономеров GroEL, и поверхность содержащей субстрат камеры становится гидрофильной, что способствует фолдингу белка-субстрата. Г – медленный (~ 10 с) гидролиз АТФ в экваториальных доменах *цис*-кольца приводит к ослаблению связи между двумя кольцами, благодаря чему *транс*-кольцо становится способным связать АТФ и начать цикл фолдинга. Д – кошаперон GroES отсоединяется от *цис*-кольца GroEL; в *транс*-кольце начинается цикл фолдинга нового субстрата. Е – правильно свёрнутый (или всё так же не свёрнутый) субстрат покидает открывшуюся полость *цис*-кольца; АДФ и фосфат отсоединяются от экваториальных доменов *цис*-кольца GroEL. Ж, З – *цис*-кольцо находится в «закрытом» состоянии, не способном связывать АТФ и, соответственно, белок-субстрат, до тех пор, пока не произойдёт гидролиз АТФ в *транс*-кольце. Адаптировано из (Horwich, 2011).

В отличие от шаперонов Hsp70 и Hsp100, в основном исправляющих конформацию денатурировавших белков и разрушающих белковые агрегаты, Hsp60 в первую очередь задействованы на ранних этапах фолдинга пептидов (Saibil, 2013). Известно, что около 30% всех новосинтезированных пептидов *Escherichia coli* приобретают правильную конформацию благодаря GroEL (Koumoto et al., 2001). Субстратами Hsp60 являются пептиды молекулярной массой от 35 до 60 кДа;

верхняя граница размера субстрата определяется объёмом полости колец Hsp60, который у GroEL составляет $\sim 175000 \text{ \AA}^3$ (Bar-Lavan et al., 2016). Шаперонины производят фолдинг таких важнейших для клеток белков, как актин и тубулин эукариот, а также субъединицы RbcL фермента RuBisCO, являющегося участником цикла Кальвина (Sarkar et al., 2011; Hayer-Hartl, 2017).

1.2.4. Семейство Hsp90

Белки семейства Hsp90 (HtpG у бактерий, HSPC у человека) являются одними из самых консервативных и распространённых шаперонов, которые в эукариотических клетках составляют до 1–2% от всех белков (Sarkar et al., 2011; Li, Buchner, 2013). Шапероны этого семейства не только осуществляют фолдинг денатурированных белков, но и задействованы в созревании множества новосинтезированных пептидов (Bar-Lavan et al., 2016). Для дрожжей известно два представителя семейства Hsp90 – Hsc82 и Hsp82, расположенных в цитозоле (Li, Buchner, 2013). У млекопитающих выявлено несколько представителей этого семейства, локализующихся в различных компартментах. У растений присутствует ch-Hsp90, располагающийся в хлоропластах (Li, Buchner, 2013). Для *D. melanogaster* известен только один представитель семейства Hsp90 – Hsp83, ген которого является единственным содержащим интрон среди генов *HSP Drosophila* (Sarkar et al., 2011). В нормальных условиях Hsp83 располагается в основном в цитоплазме, тогда как во время теплового шока этот белок обнаруживается в ядре в районе пуфа 93D полигенных хромосом слюнных желёз *D. melanogaster* (Carbajal et al., 1990; Morcillo et al., 1993).

Hsp90 представляет собой гомодимер, который может иметь V-образную структуру, называемую «открытой конформацией» (Рисунок 4, А) или быть в «закрытой конформации» (Рисунок 4, Б). Переход между конформациями определяется взаимодействием с белками-клиентами и многочисленными кошаперонами Hsp90 (Li, Buchner, 2013; Bar-Lavan et al., 2016). Они регулируют функционирование Hsp90 путём ингибирования и активации их АТФ-азной активности и привлечения специфических белков-клиентов (Li, Buchner, 2013). Взаимодействие Hsp90 с кошаперонами и белками-клиентами происходит в «открытой конформации», гидролиз АТФ способствует постепенному переходу

гомодимера в «закрытую конформацию», в процессе которого происходит фолдинг субстрата; АДФ, фосфат, белки-клиенты и кошапероны затем отсоединяются от Hsp90, и шаперон вновь приобретает «открытую конформацию» (Li, Buchner, 2013).

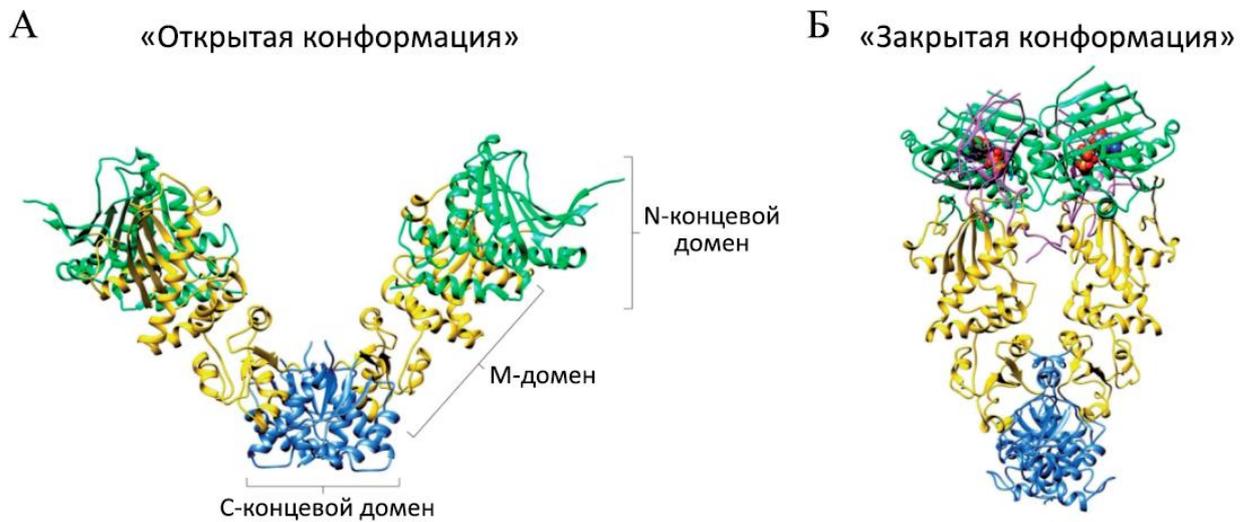


Рисунок 4. Схема строения шаперонов семейства Hsp90. А – HtpG *E. coli* в «открытой» конформации в отсутствие АТФ; Б – связанный с АТФ Hsc82 (heat shock cognate 82) *S. cerevisiae* в «закрытой» конформации. Адаптировано из (Saibil, 2013).

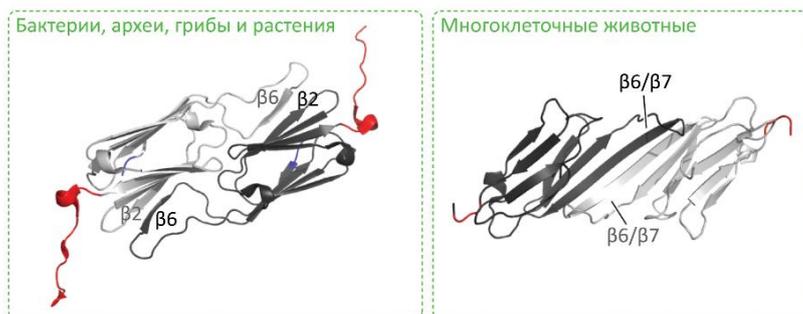
Функционально Hsp90 более специализированы по сравнению с другими HSP. Совместно с кошаперонами Hsp90 играют важную роль в фолдинге по крайней мере 200 различных пептидов в нормальных условиях, а также в рефолдинге денатурировавших белков после стрессового воздействия (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013). В отличие от таких шаперонов как Hsp60 и Hsp70, Hsp90 не обязательны для фолдинга пептидов *de novo*, но способствуют завершению созревания определённых белков-клиентов (Li, Buchner, 2013). Субстраты шаперонов этого семейства включают белки, вовлечённые в регуляцию клеточного цикла, рецепторы стероидных гормонов, киназы и супрессор опухолей p53 (Saibil, 2013).

1.2.5. Семейство sHsp

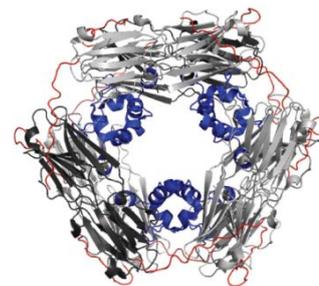
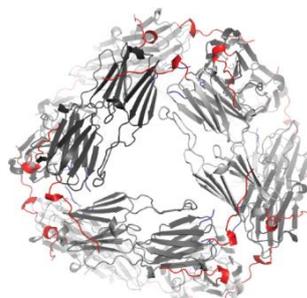
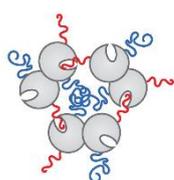
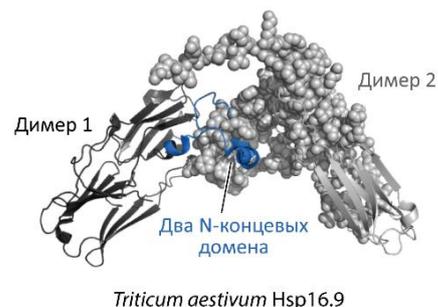
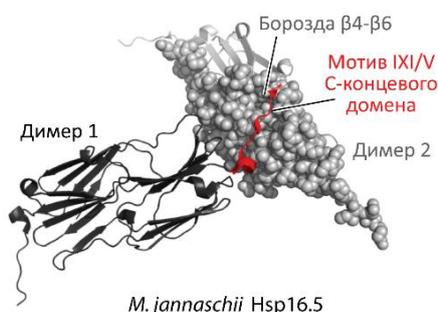
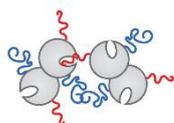
К малым белкам теплового шока (семейство HSPB у человека) относятся HSP с молекулярной массой от 12 до 43 кДа (Sarkar et al., 2011). У эукариот они встречаются в цитоплазме и ядре, а у растений они также присутствуют в митохондриях, хлоропластах и пероксисомах; прокариоты и одноклеточные эукариоты обычно имеют один или два цитозольных sHsp, однако некоторые бактерии могут иметь несколько (к примеру, у бактерий рода *Bradyrhizobium* насчитывается до 8 белков этого семейства) (Mogk et al., 2019). У многоклеточных эукариот число sHsp выше: 16 у *Caenorhabditis elegans*, 12 у *D. melanogaster*, 10 у человека, до 50 у высших растений (Morrow, Tanguay, 2015; Mogk et al., 2019). Это семейство HSP является единственным, представители которого не требуют гидролиза АТФ для выполнения своих функций, основная из которых – предотвращение агрегации денатурировавших и несвёрнутых белков (Bar-Lavan et al., 2016). Помимо предотвращения агрегации sHsp вовлечены в ряд ключевых физиологических процессов, к которым относятся клеточная дифференцировка и апоптоз (Fu, 2015).

Характерной чертой представителей семейства sHsp является наличие консервативного α -кристаллинового домена, название которого произошло от α -кристаллина – белка хрусталика глаза позвоночных (Bar-Lavan et al., 2016; Paul et al., 2016; Sarkar et al., 2011; Mogk et al., 2019). Этот домен состоит из 90–100 аминокислотных остатков, формирующих β -сэндвич, содержащий 7–8 антипараллельных β -листов (Рисунок 5, А) (Mogk et al., 2019). α -кристаллиновый домен sHsp фланкирован N- и C-концевыми доменами варьирующей длины и структуры (Mogk et al., 2019). В отличие от α -кристаллинового, N- и C-концевые домены не подвергались жёсткому отбору в ходе эволюции, и за счёт различий в их строении произошла функциональная специализация sHsp (Mogk et al., 2019). N-концевые домены особенно разнообразны по длине и последовательности аминокислот и состоят из 24–247 аминокислотных остатков (в среднем, из 56) (Mogk et al., 2019). C-концевые домены имеют длину менее 20 аминокислотных остатков (в среднем, 10) и в большинстве случаев содержат консервативный мотив Ile-X-Ile/Val (IXI/V), играющий ключевую роль в олигомеризации sHsp (Saji et al., 2008; Mogk et al., 2019).

А Структура димера sHsp



Б Олигомеризация



Mogk A, et al. 2019.
Annu. Rev. Microbiol. 73:89–110

Рисунок 5. Схема строения димеров и олигомеров sHsp. А – димеры sHsp бактерий, архей, растений и грибов (в левой рамке) на примере Hsp16.5 археи *Methanocaldococcus jannaschii*, взаимодействующих петлями $\beta 6$ и нитями $\beta 2$ α -кристаллиновых доменов, и димеры sHsp многоклеточных животных (в правой рамке) на примере HSPB5 человека, взаимодействующих удлинёнными нитями $\beta 6/\beta 7$ α -кристаллиновых доменов. Б – схемы формирования олигомеров sHsp посредством взаимодействия их N-концевых доменов и мотивов IXI/V C-концевых доменов. Адаптировано из (Mogk et al., 2019).

В отсутствие стресса большинство sHsp существуют в виде нестабильных полых сферических олигомеров, включающих 12–32 протомера (Saji et al., 2008; Mogk et al., 2019). Протомеры могут быть представлены как одним видом sHsp, так и несколькими, и являются димерами sHsp (Mogk et al., 2019). Димеризация sHsp происходит за счёт взаимодействия α -кристаллиновых доменов, при этом объединение в димеры может происходить одним из двух способов (Mogk et al., 2019). У архей, бактерий, растений и грибов петля $\beta 6$ одного α -кристаллинового домена взаимодействует с нитью $\beta 2$ другого (Рисунок 5, А). У α -кристаллинового домена многоклеточных животных петля $\beta 6$ отсутствует, вместо неё имеется

удлинённая $\beta 6$ - $\beta 7$ нить, которая взаимодействует с $\beta 6$ - $\beta 7$ другого α -кристаллинового домена, в результате чего формируется общий антипараллельный β -лист (Рисунок 5, А) (Mogk et al., 2019). Олигомеризация sHsp происходит за счёт элементов N- и C-концевых доменов (Рисунок 5, Б). Мотив IXI/V C-концевого домена sHsp одного димера связывается с гидрофобной бороздой, сформированной нитями $\beta 4$ и $\beta 8$ sHsp другого димера, соединяя эти димеры и т.д. (Mogk et al., 2019). Похожим образом, N-концевые домены одних димеров связываются с N-концевыми доменами или α -кристаллиновыми доменами других димеров, внося вклад в образование олигомеров и играя ключевую роль в их пластичности (Haslbeck et al., 2019; Mogk et al., 2019). Внесение делеций в N- и C-концевые домены sHsp приводит к нарушению их олигомеризации; при этом мутации в N-концевом домене могут привести не только к отсутствию или уменьшению размеров, но и к увеличению размеров олигомеров, как, например, в случае Hsp16.5 археи *Methanocaldococcus jannaschii* (Mogk et al., 2019). Олигомеры sHsp динамичны и постоянно обмениваются субъединицами (димерами); во время воздействия стресса, к примеру, изменения температуры, концентрации солей и pH; sHsp активируются, и равновесие смещается в сторону формирования меньших олигомеров и распада на димеры, которые связываются с гидрофобными участками денатурировавших белков (Żwirowski et al., 2017; Mogk et al., 2019).

Шаперонная активность малых белков теплового шока отличается от таковой HSP других семейств тем, что sHsp не обладают способностью к рефолдингу денатурировавших и агрегировавших белков и не используют энергию АТФ (Mogk et al., 2019). sHsp предотвращают агрегацию неправильно свёрнутых и денатурировавших белков; они обладают малой специфичностью и взаимодействуют с широким спектром различных белков-субстратов (Mogk et al., 2019). Связываясь с субстратами, sHsp образуют комплексы sHsp–субстрат, включающие множество sHsp и белков-субстратов (Żwirowski et al., 2017; Mogk et al., 2019). Комплексы sHsp–субстрат состоят из двух слоёв – стабильного ядра, в состав которого входят sHsp и неподвижные белки-субстраты, и динамичной оболочки из sHsp, которые связываются с комплексом и диссоциируют из него (Żwirowski et al., 2017). Размеры таких комплексов меньше, чем агрегатов, сформированных денатурировавшими белками, но, тем не менее, их молекулярная

масса обычно превышает 1 МДа (Żwirowski et al., 2017). Размеры комплексов sHsp–субстрат зависят от соотношения sHsp и белков-субстратов в них. Так, чем выше значение этого соотношения (то есть, чем выше содержание sHsp), тем меньше размеры комплексов; при достаточно высоком содержании sHsp комплексы становятся растворимыми (Mogk et al., 2019). При малых значениях соотношения sHsp : субстрат субстраты формируют плотные нерастворимые комплексы, но, в отличие от нерастворимых агрегатов, образованных исключительно денатурировавшими белками, субстраты поддерживаются в изменённой конформации, позволяющей шаперонам других семейств извлечь их из комплекса и произвести их фолдинг (Mogk et al., 2019). Реактивация денатурировавших белков, входящих в состав комплексов с sHsp, происходит благодаря шаперонам Hsp70: путём конкурентного связывания субстрата Hsp70 вытесняют sHsp из оболочки комплексов и производят фолдинг субстрата, иногда совместно с Hsp100 (Żwirowski et al., 2017) (Рисунок 6). Оболочка комплексов несёт несколько важных физиологических функций: во-первых, она поддерживает размер и растворимость комплекса благодаря защите гидрофобных участков белков-субстратов от взаимодействия с другими денатурировавшими белками; во-вторых, она образует селективный барьер, проницаемый лишь для шаперонов Hsp70; в-третьих, оболочка комплекса увеличивает потребность в Hsp70 по сравнению с белковыми агрегатами (Żwirowski et al., 2017).

Таким образом, несмотря на то, что sHsp поддерживают денатурировавшие белки в удобном для фолдинга состоянии, они замедляют ренатурацию субстрата при недостаточных концентрациях Hsp70. Возможно, такой механизм действия sHsp позволяет изолировать денатурировавшие белки и предотвратить их агрегацию в неблагоприятных условиях, когда количество доступных Hsp70 ограничено, например, при хроническом стрессе (Żwirowski et al., 2017). Однако при малых концентрациях шаперонов Hsp70 sHsp могут оказаться вовлечёнными в формирование белковых агрегатов, так как они предотвращают убиквитинирование субстрата в комплексе и его деградацию (Mogk et al., 2019).

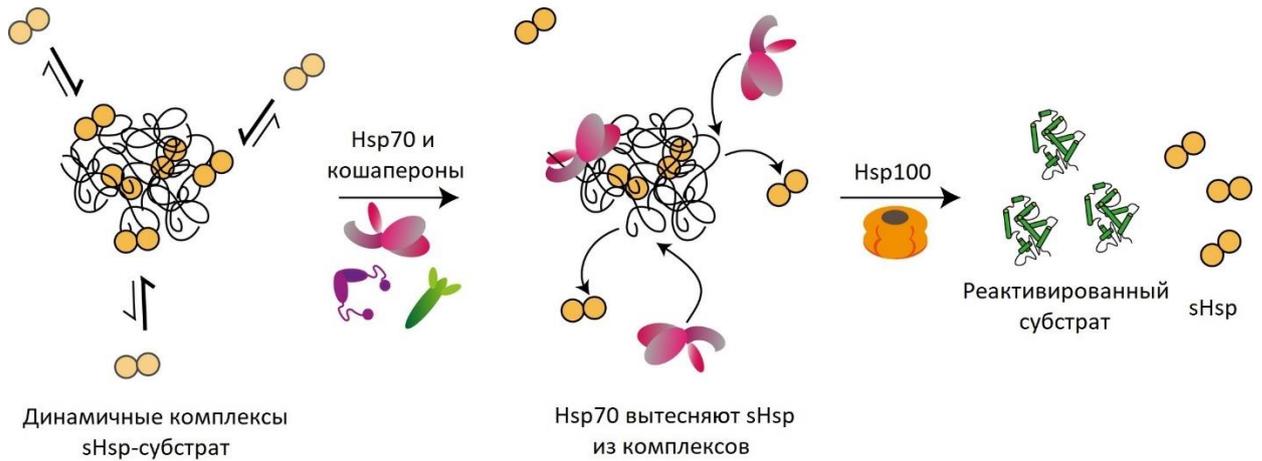


Рисунок 6. Схема процесса высвобождения sHsp из комплексов sHsp–субстрат шаперонами Hsp70 и реактивации белков-субстратов Hsp70 и Hsp100. Комплексы sHsp–субстрат состоят из стабильного ядра, составленного из денатурировавших белков и связанных с ними sHsp, и динамичной оболочки, на поверхности которой происходит связывание с субстратом и диссоциация sHsp (равновесие смещено в сторону связывания). Шапероны Hsp70 затем вытесняют sHsp из комплексов, высвобождая их. Денатурировавшие белки-субстраты подвергаются рефолдингу шаперонами Hsp70 и Hsp100. Адаптировано из (Żwirowski et al., 2017).

У *D. melanogaster* обнаружено 12 генов, кодирующих белки с характерным для sHsp α -кристаллиновым доменом (Morrow, Tanguay, 2015). К настоящему времени 11 из них отнесены к генам sHsp: *Hsp22*, *Hsp23*, *Hsp26*, *Hsp27*, *Hsp67Ba*, *Hsp67Bc*, *l(2)efl*, *CG4461*, *CG7409*, *CG13133* и *CG14207* (<https://flybase.org>; Vos et al., 2016). Потенциальный двенадцатый sHsp, CG43851, по своей структуре имеет большее сходство с растительными sHsp, чем с остальными sHsp дрозофилы: у него отсутствует петля $\beta 6$ α -кристаллинового домена, что свойственно для sHsp растений (Morrow, Tanguay, 2015; Mogk et al., 2019). В нормальных условиях гены *sHsp* мух экспрессируются с разной интенсивностью в различных органах и на разных стадиях развития (Jagla et al., 2018). Для двух sHsp *D. melanogaster* идентифицированы гомологи у человека – это Hsp67Bc (функциональный ортолог HSPB8 человека по данным Carra et al. 2010) и *l(2)efl* (гомолог HSPB5, или αB -кристаллина, человека по Wang et al. 2011). Экспрессия генов всех *sHsp* дрозофилы, за исключением *CG14207* и *CG13133*, повышается в ответ на тепловое воздействие (Vos et al., 2016).

Первыми были обнаружены четыре sHsp, которые изучены лучше других – Hsp22, Hsp23, Hsp26 и Hsp27 (Corces et al., 1980; Ayme, Tissières, 1985; Morrow et al., 2006). Белок Hsp23, расположенный в цитозоле, как большинство sHsp (за

исключением митохондриального Hsp22 и имеющего ядерную локализацию Hsp27), играет важную роль в обеспечении устойчивости к гипоксии (Azad et al., 2009; Morrow, Tanguay, 2015). Экспрессия генов *Hsp22*, *Hsp23*, *Hsp26* и *Hsp27* возрастает после воздействия пониженной температуры; Hsp22 и Hsp23 вовлечены в формирование ответа на холодовой стресс (Colinet et al., 2010a,b). Hsp26 необходим для нормального формирования нервно-мышечных соединений у личинок *D. melanogaster* (Jagla et al., 2018). Мутации в гене *Hsp27* снижают способность мух противостоять бактериальным и грибковым заболеваниям (Chen et al., 2010), а делеция приводит к снижению устойчивости к голоданию (Hao et al., 2007). Hsp22 расположен в матриксе митохондрий и играет важную роль в жизнедеятельности мух: нокаун гена *Hsp22* значительно сокращает продолжительность жизни (ПЖ), а повышение экспрессии – увеличивает (Morrow, Tanguay, 2015). Помимо *Hsp22*, увеличение ПЖ мух в результате повышения экспрессии было показано для шести генов *sHsp* – *Hsp23*, *Hsp26*, *Hsp27*, *Hsp67Bc*, *l(2)efl* и *CG14207* (Morrow, Tanguay, 2015; Vos et al., 2016). Подобные исследования для остальных генов *sHsp* дрозофилы к настоящему времени не проводились. Функции *sHsp D. melanogaster*, за исключением функций четырёх «основных» представителей, плохо изучены.

1.3. *sHsp D. melanogaster* и температурный стресс

Температурный стресс – часто испытываемый наземными насекомыми тип стресса (Malmendal et al., 2006). При повышенной температуре ингибируется транскрипция большинства генов и активируется экспрессия генов, имеющих сайты связывания фактора теплового шока (heat shock factor, HSF) (Telonis-Scott et al., 2013). Гены *HSP* всех семейств, включая *sHsp*, содержат такие сайты (heat shock elements, HSE) в области промотора (Pelham, 1982; Sorger, Pelham, 1987; Chen et al., 2000). Из девяти индуцируемых воздействием повышенной температуры *sHsp* дрозофилы по крайней мере семь – Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27, Hsp67Ba, Hsp67Bc и *l(2)efl* – способны связываться и активироваться HSF (Morrow, Tanguay, 2015). В результате воздействия повышенной температуры и других стрессоров (к примеру, осмотического и окислительного) HSF тримеризуется и связывается с HSE, что запускает транскрипцию генов *HSP* (Chen et al., 2000). У эукариот тепловой шок также ингибирует сплайсинг мРНК, что не оказывает влияния на свободные от

интронов транскрипты большинства генов *HSP* и на все гены *sHsp* дрозофилы (Sarkar et al., 2011; Telonis-Scott et al., 2013). Влияние повышенной температуры приводит также к ускорению метаболизма и росту количества неправильно свёрнутых белков (Malmendal et al., 2006; Haslbeck, Vierling, 2015). Воздействие на *D. melanogaster* температуры, превышающей 38 °С, может вызвать их гибель (Malmendal et al., 2006). *sHsp* представляют собой «первую линию защиты» клеток от агрегации повреждённых белков (Haslbeck, Vierling, 2015). Они распознают субстраты на ранних стадиях нарушения конформации, задолго до того как будет утеряна их основная структура (Basha et al., 2012).

При охлаждении до критической температуры, индивидуальной для каждого вида, насекомые впадают в холодовую кому – обратимое состояние полного нервно-мышечного паралича (Overgaard, MacMillan, 2017). Для *D. melanogaster* эта температура составляет $7,0 \pm 0,9$ °С (Hosler et al., 2000). Впадение в холодовую кому вызвано распространяющейся деполяризацией мембран клеток центральной нервной системы (ЦНС), за которой следует деполяризация мембран мышечных волокон (Andersen, Overgaard, 2019). Длительное пребывание на холоде приводит к нарушению ионного и водного гомеостаза, что наносит серьёзный вред клеткам (Sinclair, Roberts, 2005; Overgaard, MacMillan, 2017). К примеру, у насекомых повышается концентрация ионов K^+ в гемолимфе, что, вкупе с длительным влиянием низкой температуры, приводит к гибели клеток (Overgaard, MacMillan, 2017). Как было упомянуто выше, экспрессия генов *Hsp22*, *Hsp23*, *Hsp26* и *Hsp27* дрозофилы возрастает после холодового воздействия, а для *Hsp22* и *Hsp23* было показано участие в формировании устойчивости к холоду (Colinet et al., 2010a,b). Так, мухи, у которых был произведён нокдаун генов *Hsp22* и *Hsp23* при помощи РНК-интерференции, демонстрировали замедленное восстановление после холодовой комы и меньшую мобильность после воздействия пониженной температуры (Colinet et al., 2010a). При этом нокдаун *Hsp23* имел более выраженные негативные последствия: через 60 мин после окончания воздействия холода (0 °С, 12 ч) около 40% дрозофил с нокдауном *Hsp23* всё ещё пребывали в состоянии холодовой комы, тогда как для мух с нокдауном *Hsp22* этот показатель составил 12%, а для контроля – 0–10% (Colinet et al., 2010a).

1.4. Малый белок теплового шока Hsp67Bc

Ген *Hsp67Bc* расположен в локусе 67B левого плеча третьей хромосомы *D. melanogaster*, где, помимо него, находятся гены ещё шести *sHsp* – *Hsp22*, *Hsp23*, *Hsp26*, *Hsp27*, *Hsp67Ba*, *Hsp67Bc* и *CG4461* (<https://flybase.org>; Ауме, Tissières, 1985; Morrow, Tanguay, 2015). В отсутствие стресса *Hsp67Bc* экспрессируется с различной интенсивностью на всех стадиях развития мух (<https://flybase.org>). Экспрессия гена начинается в желточных ядрах на стадии 11–12 эмбрионального развития *D. melanogaster* (<https://flybase.org>; Pauli, Tonka, 1987). На стадиях 13–16 *Hsp67Bc* экспрессируется в клетках формирующегося мозга, брюшной нервной цепочки и зачатков сенсорной нервной системы эмбриона (<https://flybase.org>). У личинок, начиная с первого возраста (L1), уровень мРНК *Hsp67Bc* снижается и начинает возрастать лишь у блуждающих личинок третьего возраста (L3), готовящихся перейти на стадию куколки (<https://flybase.org>; Pauli, Tonka, 1987). Максимум транскрипция гена *Hsp67Bc* достигает на стадии ранней куколки, после чего концентрация его мРНК убывает (Pauli, Tonka, 1987). У взрослых мух *Hsp67Bc* наиболее интенсивно экспрессируется в мозге и мальпигиевых сосудах (<https://flybase.org>). При воздействии повышенной температуры уровень экспрессии *Hsp67Bc* многократно увеличивается. На культуре клеток S2 *D. melanogaster* было показано, что непосредственно после теплового шока (30 мин при 38 °C) уровень его мРНК повышается приблизительно в 30 раз по сравнению с нормальной температурой (25 °C), а через 1 ч после теплового воздействия – ещё в 6 раз (Vos et al., 2016).

Белок *Hsp67Bc* состоит из 199 аминокислот и имеет молекулярную массу 22,18 кДа (<https://www.uniprot.org/uniprot/P22979>). Как и все *sHsp*, он содержит α -кристаллиновый домен (Jabłońska et al., 2018). На культуре клеток S2 Vos с соавторами (2016) продемонстрировали, что *Hsp67Bc* эффективнее других белков семейства *sHsp* предотвращает агрегацию мутантного белка Huntingtin (Htt) человека, несущего аномально длинный полиглутаминовый тракт, состоящий из 119 остатков глутамина (в белке дикого типа таких остатков до 36 (Kremer et al., 1994)). Белки с увеличенным количеством глутаминовых остатков являются причиной нейродегенеративных заболеваний человека за счёт образования нерастворимых агрегатов, приводящих к гибели нейронов (Ashley, Warren, 1995; Vos et al., 2016).

Агрегация Htt, имеющего 36 и более остатков глутамина, приводит к развитию болезни Хантингтона (Kremer et al., 1994; Ashley, Warren, 1995). Исследования *in vivo* на модели *D. melanogaster*, экспрессирующих в глазах мутантный *ATXN3* человека, кодирующий белок Ataxin-3 с 78 глутаминовыми остатками, являющийся причиной развития у людей болезни Мачадо – Джозефа, выявили, что повышенная экспрессия гена *Hsp67Bc* снижает, а нокдаун путём РНК-интерференции – наоборот – усиливает дегенерацию глаз мух, вызванную агрегацией этого белка (Carra et al., 2010). Такими же свойствами обладал человеческий ортолог *Hsp67Bc* – HSPB8 (Carra et al., 2010). В экспериментах Carra с соавторами (2010) на клетках S2 повышенная экспрессия *Hsp67Bc* не только предотвращала агрегацию растворимого мутантного Htt, но и снижала содержание нерастворимых агрегатов Htt со 128 глутаминовыми повторами за счёт стимуляции макроаутофагии.

1.5. Макроаутофагия – один из типов аутофагии

Аутофагия – процесс деградации и переработки компонентов цитоплазмы в лизосомах (Parzych, Klionsky, 2014; Lőrincz, Juhász, 2020). В зависимости от способа доставки компонентов цитоплазмы в лизосомы различают четыре типа аутофагии – макроаутофагию, микроаутофагию, шаперон-зависимую аутофагию (chaperone-mediated autophagy) и кринофагию (Eskelinen, 2005; Weckman et al., 2014; Csizmadia, Juhász, 2020; Lőrincz, Juhász, 2020). При микроаутофагии инвагинации или выросты лизосом захватывают порции цитоплазмы для дальнейшей переработки. К микроаутофагии также относят эндосомную микроаутофагию (endosomal microautophagy), в процессе которой компоненты цитоплазмы захватываются путём инвагинации мембраны поздних эндосом с образованием мультивезикулярных телец, которые затем сливаются с лизосомами (Parzych, Klionsky, 2014; Oku, Sakai, 2018). Посредством шаперон-зависимой аутофагии белки, несущие последовательность из пяти аминокислот (KFERQ-подобный мотив), распознаются шапероном Hsc70 (**h**eat **s**hock **c**ognate 71 kDa protein из семейства Hsp**70**), доставляются к лизосоме и транслоцируются внутрь через канал, образованный белками Lamp-2A в её мембране (Kirchner et al., 2019). Так как Lamp-2A обнаружен лишь у млекопитающих, птиц и рыб, шаперон-зависимая аутофагия, по-видимому, ограничена позвоночными (Lescat et al., 2020). При кринофагии с лизосомами

сливаются неэксcretированные и избыточные секреторные гранулы (Weckman et al., 2014; Csizmadia, Juhász, 2020). У *D. melanogaster* таким путём осуществляется деградация гранул, содержащих белки, вырабатываемые слюнными железами поздних личинок третьего возраста для прикрепления формирующейся куколки к субстрату (Csizmadia et al., 2018). Макроаутофагию от других типов аутофагии отличает *de novo* построение особых органелл – аутофагосом – вокруг предназначенных для деградации компонентов цитоплазмы (Parzych, Klionsky, 2014). К субстратам макроаутофагии относятся долгоживущие белки, белковые агрегаты, повреждённые органеллы и даже инфекционные агенты (Amano et al., 2006; He, Klionsky, 2009; Zhang, Calderwood, 2011). У многоклеточных организмов процесс макроаутофагии начинается с формирования на специальном субдомене ЭПС (омегасоме) чашеобразной двумембранной структуры – фагофора (Parzych, Klionsky, 2014; Zhao, Zhang, 2019). При участии белков семейства Atg (**autophagy-related**) фагофор растёт и замыкается вокруг предназначенных для переработки компонентов цитоплазмы, образуя двумембранную аутофагосому (Parzych, Klionsky, 2014; Lőrincz, Juhász, 2020; Nishimura, Tooze, 2020) (Рисунок 7). Затем происходит созревание аутофагосом, в процессе которого с ними сливаются эндосомы (с образованием амфисом) и лизосомы (с образованием аутолизосом) (He, Klionsky, 2009; Zhao, Zhang, 2019). После слияния с эндосомами и лизосомами внутренняя мембрана аутофагосом растворяется, поэтому амфисомы и аутолизосомы имеют одну мембрану (Eskelinen, 2005; Klionsky et al., 2014; Zhao, Zhang, 2019). В аутолизосомах происходит переработка содержимого ферментами лизосом, и продукты деградации выпускаются в цитоплазму посредством лизосомных пермеаз (Parzych, Klionsky, 2014). Последним этапом процесса макроаутофагии является аутофагическая реформация лизосом (**autophagic lysosome reformation**), при которой от аутолизосом отделяются протолизосомы, позднее созревающие до функциональных лизосом (Рисунок 7) (Chen, Yu, 2017).

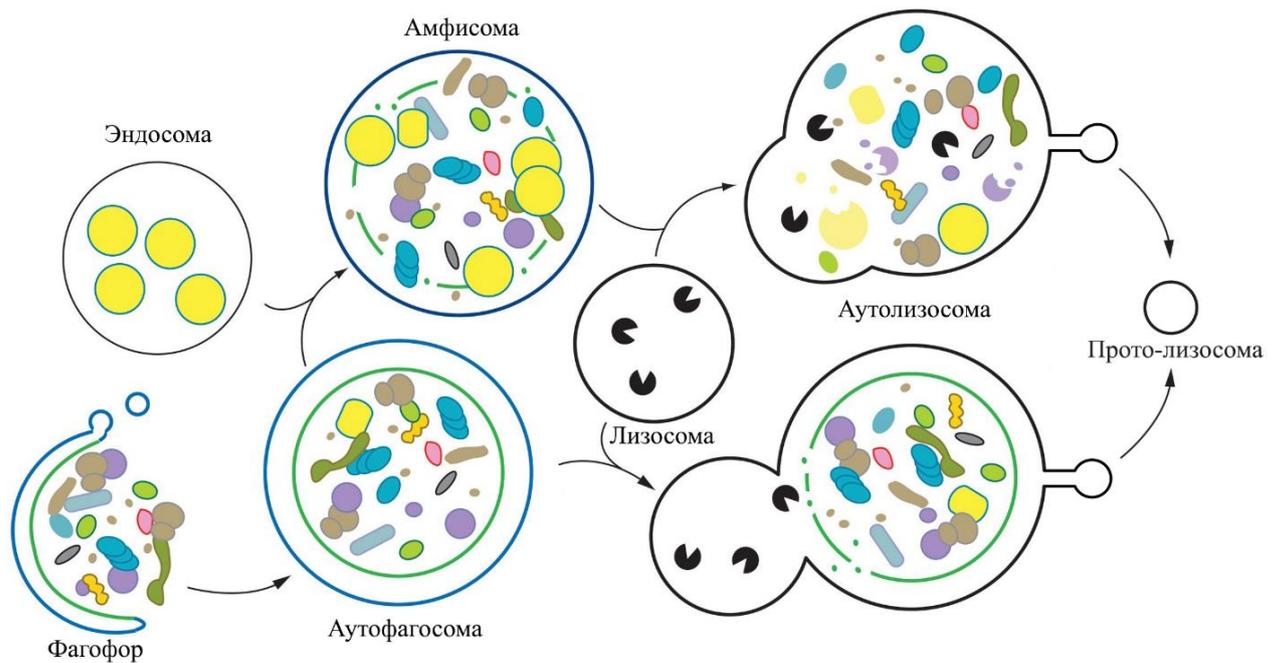


Рисунок 7. Схема процесса макроаутофагии (по рисунку из статьи Klionsky et al., 2014, с модификациями и дополнениями). Вокруг подлежащих переработке элементов цитоплазмы формируется двухслойная мембранная структура – фагофор, который, замыкаясь, образует двумембранную структуру – аутофагосому. Внешняя мембрана аутофагосомы сливается с эндосомами с образованием амфисомы и/или лизосомой с образованием аутолизосомы. В аутолизосоме содержимое аутофагосомы (и эндосом) расщепляется лизосомными ферментами. Макроаутофагия завершается аутофагической реформацией лизосом, в процессе которой от аутолизосомы отщепляются протолизосомы, созревающие затем до лизосом.

1.5.1. Пути регуляции макроаутофагии

Макроаутофагия происходит с низкой интенсивностью в нормальных условиях для поддержания гомеостаза в клетках и усиливается при таких стрессовых состояниях, как, например, голодание, гипоксия и инвазия патогенов (Amano et al., 2006; He, Klionsky, 2009; Juennemann, Reits, 2012). Макроаутофагия вовлечена также в ряд физиологических процессов, включающих эмбриональное развитие многоклеточных организмов и метаморфоз насекомых (Juennemann, Reits, 2012; Tracy, Baehrecke, 2013). Интенсивность макроаутофагии регулируется множеством различных путей в зависимости от того, какие факторы среды влияют на организм. Основным ингибитором макроаутофагии является киназа TOR (*target of rapamycin*) (He, Klionsky, 2009). В условиях достатка питательных веществ и факторов роста она подавляет киназу Atg1, являющуюся индуктором макроаутофагии (He, Klionsky, 2009). Сокращение поступления в клетку аминокислот и факторов роста или

обработка рапамицином приводят к снижению активности киназы TOR, благодаря чему происходит стимуляция макроаутофагии (He, Klionsky, 2009; Kim et al., 2013). Физиологические нагрузки на клетку, такие как усиленная секреция, недостаток глюкозы и синтез мутантных белков, оказывают стрессирующее воздействие на ЭПС, так как именно в этой органелле происходит фолдинг мембранных и секретируемых белков (Lin et al., 2008; He, Klionsky, 2009). В ЭПС накапливаются белки с неправильной конформацией, и для снижения нагрузки на эту органеллу запускается механизм ответа на несвёрнутые белки (unfolded protein response) (He, Klionsky, 2009). У *D. melanogaster* этот механизм включает в себя активацию локализующихся в мембране ЭПС белков, одним из которых является киназа РЕК (pancreatic eIF-2 α kinase, PERK у млекопитающих) (<https://flybase.org>; Sood et al., 2000; He, Klionsky, 2009). РЕК фосфорилирует α -субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции (eIF2 α), в результате чего происходит подавление синтеза белка и усиление макроаутофагии (Kouroku et al., 2007; He, Klionsky, 2009; Nagy et al., 2013; Galluzzi et al., 2014). Стимуляция макроаутофагии путём фосфорилирования eIF2 α происходит также посредством других киназ (He, Klionsky, 2009), в этот путь вовлечён и Hsp67Bc.

На культурах клеток S2 *D. melanogaster* и HEK293T человека было показано, что посредством фосфорилирования eIF2 α стимулирует макроаутофагию и комплекс Hsp67Bc с его кошапероном Starvin (Stv) (Carra et al., 2010). Так, Carra с соавторами обнаружили, что запуск экспрессии гена *Hsp67Bc*, *stv* или обоих этих генов дрозофилы в клетках HEK293T человека и эктопическая экспрессия этих генов поодиночке или совместно в клетках S2 дрозофилы повышает уровень LC3-II (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 II; Atg8a у *D. melanogaster*) (<https://flybase.org>; Carra et al., 2010). LC3-II – липидированная форма белка LC3 – образуется в результате присоединения фосфатидилэтаноламина к цитозольной форме белка LC3 (LC3-I) и принимает активное участие в сборке фагофора (Tanida et al., 2008; Nath et al., 2014). Переход LC3-I в LC3-II является маркером макроаутофагии (Kabeya et al., 2000; Carra et al., 2010). Кроме того, повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* приводило к значительному увеличению содержания фосфорилированной eIF2 α (Carra et al., 2010). Ранее на культурах клеток эмбриональных фибробластов мыши было выявлено, что стимуляция

макроаутофагии позволяет клеткам избавляться от мутантных белков с полиглутаминовым трактом и избегать, таким образом, вызванного стрессом ЭПС апоптоза (Kouroku et al., 2007). Нарушение процесса фосфорилирования eIF2 α и, следовательно, нарушение стимуляции макроаутофагии приводит к накоплению агрегатов таких белков и к гибели клеток (Kouroku et al., 2007). Carra с соавторами индуцировали синтез мутантного варианта белка Htt с 74 глутаминовыми остатками в клетках S2 *D. melanogaster* с нормальным или нефосфорилируемым вариантом eIF2 α (Carra et al., 2010). В клетках с нефосфорилируемым вариантом eIF2 α наблюдалось увеличение агрегации мутантного Htt, по сравнению с клетками с нормальным eIF2 α (Carra et al., 2010). Затем в клетках S2 авторы исследования запустили экспрессию гена *Htt* со 128 повторами CAG и эктопическую экспрессию генов *Hsp67Bc* и субъединицы 15 протеинфосфатазы 1 *PPP1R15* (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15), производящей дефосфорилирование eIF2 α (<https://flybase.org>; Carra et al., 2010). В таких клетках содержание LC3-II значительно снижалось, что указывало на снижение уровня макроаутофагии (Carra et al., 2010). Коэкспрессия гена *Hsp67Bc* с геном нефосфорилируемого варианта eIF2 α приводила к невозможности понижения содержания как растворимого, так и агрегировавшего Htt со 128 остатками глутамина (Carra et al., 2010). Совокупность полученных Carra с соавторами данных указывает на то, что Hsp67Bc способен влиять на интенсивность макроаутофагии путём фосфорилирования eIF2 α (Carra et al., 2010). Предлагаемая авторами схема действия Hsp67Bc представлена на рисунке 8.

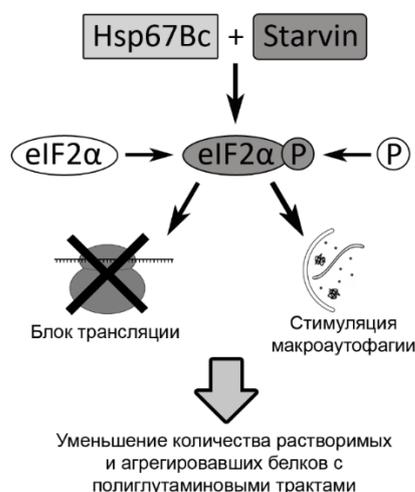


Рисунок 8. Предполагаемая Carra с соавторами (2010) схема воздействия белков Hsp67Bc и Stv на уровень трансляции и макроаутофагии через инактивацию eIF2 α посредством её фосфорилирования (Malkeyeva, Kiseleva, 2016).

Hsp67Bc вовлечён в процесс макроаутофагии также через взаимодействие с комплексом, включающим Stv, шаперон Hsc70-4 (**H**eat **s**hock protein **c**ognate **4**) из семейства Hsp70 и убиквитин-лигазу STUB1 (**S**TIP1 homology and **U**-box containing protein **1**) (<https://flybase.org>; Arndt et al., 2010; Brooks et al., 2020). Посредством этого комплекса белков осуществляется селективная аутофагия при содействии шаперонов (chaperone-assisted selective autophagy) – разновидность макроаутофагии, при помощи которой осуществляется удаление и деградация соединяющего актин в составе Z-дисков мышечных клеток и стресс-фибрилл других клеток белка Filamin (Fil) (<https://flybase.org>; Brooks et al., 2020). Stv распознаёт Hsp67Bc, который связывается с повреждённым Fil, и опосредует взаимодействие Fil с Hsc70-4 (Arndt et al., 2010; Brooks et al., 2020). Stv затем выполняет роль фактора обмена нуклеотидов в АТФ-зависимом шаперонном цикле Hsc70-4 (Arndt et al., 2010). Формирование аутофагосомы вокруг всего комплекса белков происходит благодаря тому, что STUB1 осуществляет полиубиквитинирование повреждённого Fil, что привлекает белок p62 (Ref(2)P у *D. melanogaster*), который инициирует сборку фагофора (<https://flybase.org>; Arndt et al., 2010; Brooks et al., 2020). Схема строения и действия комплекса, осуществляющего селективную аутофагию при содействии шаперонов, представлена на рисунке 9.

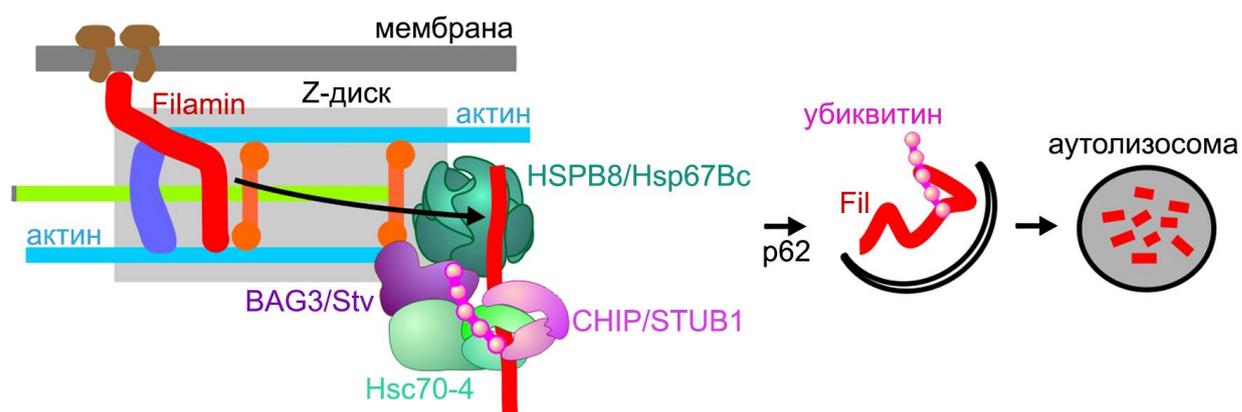


Рисунок 9. Схема удаления повреждённого белка Filamin (Fil) из Z-дисков мышечных клеток посредством селективной аутофагии при содействии шаперонов. Повреждённый Fil распознаётся шаперонами HSPB8 (Hsp67Bc у дрозофилы), BAG3 (Stv у дрозофилы) и Hsc70-4, затем убиквитин-лигаза CHIP (STUB1 у дрозофилы) присоединяет убиквитин к Fil, что привлекает белок p62, инициирующий макроаутофагию. Адаптировано из (Arndt et al., 2010).

1.5.2. Исследование макроаутофагии на *D. melanogaster*

Макроаутофагия – весьма консервативный процесс, общий для живых существ от дрожжей до человека (Juenemann, Reits, 2012). Гомологи генов *ATG* дрожжей идентифицированы у высших эукариот, что также указывает на консервативность макроаутофагии (He, Klionsky, 2009). *D. melanogaster* является удобным объектом для изучения различных процессов за счёт короткого репродуктивного цикла, хорошей изученности генома, простоты в содержании и получении генетических мутаций, а также наличия и доступности множества разнообразных линий с мутациями в различных генах (Lőrincz et al., 2017). Кроме того, ключевые физиологические процессы, в том числе макроаутофагия, общи для дрозофилы и человека, а идентичность генов дрозофилы и млекопитающих составляет в среднем 40%, и в случае консервативных доменов может достигать 80–90% (Pandey, Nichols, 2011; Lőrincz et al., 2017). 75% генов, мутации в которых у человека приводят к развитию заболеваний, имеют функциональные гомологи у дрозофилы (Pandey, Nichols, 2011). Всё это делает *D. melanogaster* хорошим объектом для изучения макроаутофагии.

Макроаутофагия в яичниках дрозофил

Популярным органом для исследования макроаутофагии являются яичники дрозофил (Barth et al., 2011). Яичники остро реагируют на голодание: морфология и производительность этих органов зависят от доступности питательных веществ (Barth et al., 2011; Sarikaya et al., 2012). К примеру, в экспериментах Drummond-Barbosa и Spradling количество яиц, откладываемое в день самками мух, содержащихся на безбелковой корме, было в среднем в 60 раз меньше по сравнению с таковым у дрозофил, содержащихся на нормальной корме (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001).

Яичники дрозофил состоят из овариол (Рисунок 10) – функциональных единиц, представляющих собой трубочки, содержащие последовательно созревающие яйцевые камеры (Sarikaya et al., 2012). Закладка яичников происходит на стадии личинки третьего возраста с формирования терминальных филаментов (Рисунок 10), число которых определяет будущее количество овариол (Sarikaya et al., 2012). При этом содержание личинок при температуре ниже нормальной (18 °C вместо 25 °C в экспериментах Sarikaya с соавторами) или на обеднённой корме приводит к

формированию у имаго дрозофил меньшего числа овариол по сравнению с мухами, содержащимися в нормальных условиях (Sarıkaya et al., 2012).

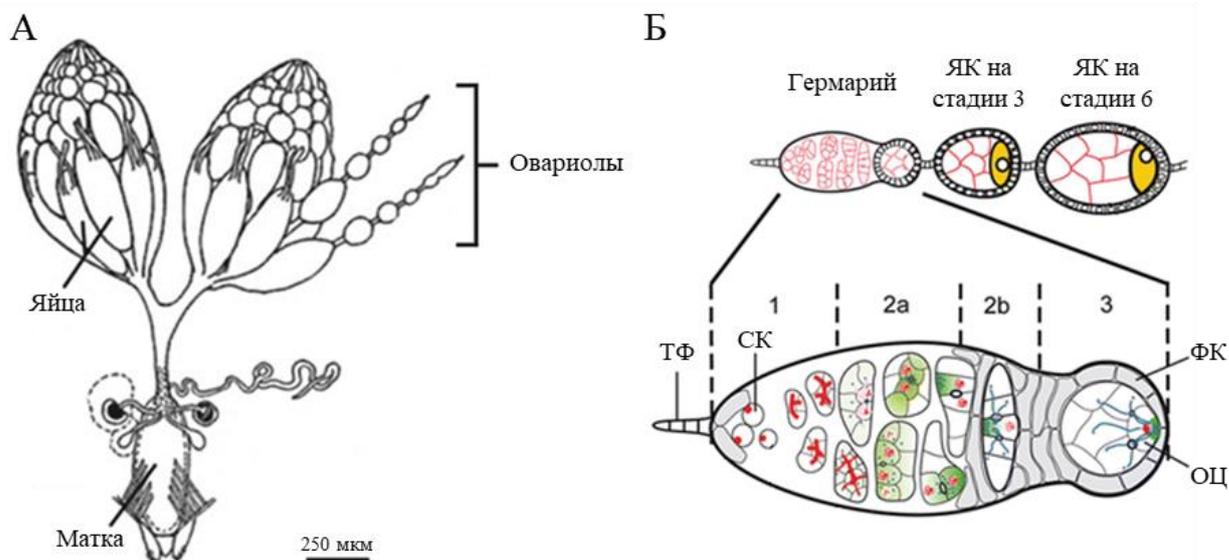


Рисунок 10. Схема строения яичников (А) и гермария (Б) *D. melanogaster*. ТФ – терминальный филламент, СК – стволовая клетка зародышевой линии, ФК – фолликулярная клетка, ОЦ – ооцит. 1, 2а, 2b и 3 – четыре региона гермария, в которых вследствие деления СК происходит формирование яйцевой камеры (ЯК). Адаптировано из (Rubin, Huynh, 2015).

Оогенез у имаго *D. melanogaster* начинается в гермарии – переднем отделе овариолы (Рисунок 10) – делением стволовой клетки зародышевой линии с образованием такой же стволовой клетки и цистобласта (Rubin, Huynh, 2015). В процессе деления цистобласта образуется циста, состоящая из 16 клеток, одна из которых разовьётся в ооцит, а остальные 15 – в питающие клетки (Rubin, Huynh, 2015). Циста продвигается внутри гермария в постериорном направлении и окружается фолликулярными клетками в регионе гермария 2b (Рисунок 10, Б) (Rubin, Huynh, 2015). На выходе из гермария циста окружается одним слоем фолликулярных клеток и образует сферическую яйцевую камеру (Рисунок 10, Б) (Rubin, Huynh, 2015). Яйцевая камера проходит 14 стадий оогенеза, последней из которых является зрелое яйцо (Bastock, Johnston, 2008). Макроаутофагия в яичнике происходит в нормальных условиях в гермарии (регион 2a/2b), где формирующиеся яйцевые камеры проходят «контроль качества», и запускает апоптоз цист, не окружённых слоем фолликулярных клеток (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001; Nezis et al., 2009; Barth et al., 2011). С помощью окрашивания LysoTracker (краситель, маркирующий кислые органеллы, такие как лизосомы и аутолизосомы (Scott et al.,

2004; Klionsky et al., 2007)) и регистрации сигналов от белков Atg5 и Atg8a, связанных с флуоресцентными белками RFP (**red fluorescent protein**) и GFP (**green fluorescent protein**), соответственно, Barth с соавторами выявили, что при голодании макроаутофагия в гермарию усиливается, а также начинает регистрироваться в клетках зародышевой линии и фолликулярных клетках яйцевых камер на стадиях 1–8 (Barth et al., 2011). Как и в гермарию, яйцевые камеры на стадии 8 оогенеза проходят «контроль качества», и усиленная макроаутофагия способствует гибели «отбракованных» яйцевых камер (Barth et al., 2011). Таким образом, яичники *D. melanogaster* представляют собой удобную модель для изучения макроаутофагии в нормальных условиях и, в особенности, в таких условиях стимуляции макроаутофагии как голодание.

Макроаутофагия и симбиотические бактерии *Wolbachia*

Ещё одним фактором, стимулирующим макроаутофагию, является присутствие инфекционных агентов. На *D. melanogaster* было показано участие макроаутофагии в регуляции численности бактерий *Listeria monocytogenes* и *Wolbachia pipientis* (Yano et al., 2008; Voronin et al., 2012). Особый интерес представляют граммотрицательные α -протеобактерии *W. pipientis* – единственный вид рода *Wolbachia*, принадлежащего порядку Rickettsiales (O'Neill et al., 1992; Dumler et al., 2001). Они являются широко распространёнными облигатными внутриклеточными симбионтами членистоногих и нематод: этими бактериями инфицированы около 40% исследованных видов членистоногих в мире (Zug, Hammerstein, 2012). *Wolbachia* локализуются в клетках репродуктивных органов, мышечной ткани, нервной системы, мальпигиевых сосудов, кишечника, жирового тела, слюнных желёз и имагинальных дисков своих хозяев и передаются по материнской линии (Min, Benzer, 1997; Stouthamer et al., 1999; Clark et al., 2005). *Wolbachia* могут иметь коккоидную (0,25 – 0,5 мкм в диаметре) или палочковидную (до 1,8 мкм в длину) форму (Stouthamer et al., 1999). В цитоплазме хозяйской клетки эти бактерии существуют в вакуолеподобных пузырьках и имеют трёхслойную оболочку; внешняя мембрана имеет хозяйское происхождение, средняя представляет собой клеточную стенку бактерии, а внутренняя – её плазматическую мембрану (Stouthamer et al., 1999).

Симбиотические ассоциации беспозвоночных с *Wolbachia* варьируют от облигатного мутуализма до паразитизма, вызывающего патологии и раннюю гибель

хозяина (Voronin et al., 2012). Примером облигатного мутуализма является симбиоз *Wolbachia* с такими паразитическими нематодами-филяриями как *Brugia malayi* и *Onchocerca volvulus*, вызывающими у человека, соответственно, слоновую болезнь и онхоцеркоз (Slatko et al., 2010). Нематоды-хозяева способны снабжать эндосимбионта аминокислотами, тогда как *Wolbachia*, по-видимому, обеспечивают хозяев рибофлавином, гемом, флавинадениндинуклеотидом и нуклеотидами, которые паразитические филярии не способны синтезировать (Taylor et al., 2005). Элиминация бактерий из организма существующих в симбиозе с *Wolbachia* паразитических нематод в большинстве случаев приводит к угнетению эмбриогенеза и стерильности филярий (Taylor et al., 2005). Излеченные от *Wolbachia* с помощью таких антибиотиков как доксициклин и рифампицин *B. malayi* нежизнеспособны: в отсутствие эндосимбионта у филярий нарушаются эмбриогенез и личиночное развитие, макрофилярии становятся стерильными (Slatko et al., 2010). В связи с этим направленное против *Wolbachia* лечение вызванных паразитическими нематодами-филяриями заболеваний является весьма действенным (Taylor et al., 2005; Slatko et al., 2010). К механизмам воздействия бактерий *Wolbachia* на хозяина относятся также репродуктивные модификации, способствующие передаче бактерий в следующее поколение – партеногенез, андрокцид (гибель самцов), феминизация и цитоплазматическая несовместимость (Werren et al., 2008). Индукция партеногенеза бактериями *Wolbachia* была описана только для видов членистоногих с гапло-диплоидным типом определения пола, при котором самки развиваются из оплодотворённых яиц, а самцы – из неоплодотворённых (клещи, перепончатокрылые, трипсы) (Stouthamer et al., 1990; Arakaki et al., 2001; Weeks, Breeuwer, 2001). У инфицированных *Wolbachia* самок из неоплодотворённых яиц развиваются не самцы, а самки, которые, в отличие от самцов, способны передать бактерии потомству (Werren et al., 2008). Гибель самцов происходит на эмбриональных стадиях развития, что создаёт благоприятные условия для развития инфицированных *Wolbachia* самок за счёт снижения конкуренции за пищевые ресурсы (Werren et al., 2008). Феминизация приводит к тому, что особи, имеющие набор генов самцов, развиваются в самок (Werren et al., 2008). Цитоплазматическая несовместимость является самым распространённым вызываемым *Wolbachia* фенотипом и проявляется в гибели части потомства на эмбриональной стадии

развития при скрещивании инфицированного самца с неинфицированной или инфицированной другим штаммом *Wolbachia* самкой (Stouthamer et al., 1999; Werren et al., 2008).

Для *D. melanogaster* известно три штамма *Wolbachia* – wMel, wMelCS и wMelPop (Truitt et al., 2019). Все эти штаммы вызывают у хозяев слабую цитоплазматическую несовместимость и обладают способностью в разной степени повышать устойчивость дрозофил к вирусам (Chrostek, Teixeira, 2015; Truitt et al., 2019). В отличие от природных wMel и wMelCS, штамм wMelPop является патогенным; он развился в лабораторной популяции дрозофил из штамма wMelCS (Min, Benzer, 1997; Truitt et al., 2019). *Wolbachia* штамма wMelPop сокращает ПЖ своих хозяев почти вдвое благодаря усиленной пролиферации в их тканях, в особенности в головном мозге (Min, Benzer, 1997). В то же время, wMelPop повышает устойчивость хозяина к вирусным инфекциям значительно сильнее, чем другие два штамма, за счёт своей высокой численности в клетках (Chrostek et al., 2013). На основании этого свойства wMelPop разрабатываются способы борьбы с такими векторными заболеваниями человека как лихорадка денге и вирус Зика (Chrostek et al., 2013; Truitt et al., 2019).

На дрозофилах, инфицированных штаммом *Wolbachia* wMelPop, и на культурах клеток комаров *Aedes albopictus* и паразитических нематод *B. malayi*, инфицированных штаммами wAlbV и wVm, соответственно, было показано, что интенсивность макроаутофагии находится в прямой зависимости от численности бактерий в организме хозяев (Voronin et al., 2012). К примеру, у микрофилярий *B. malayi*, имеющих очень низкий титр бактерий, содержание являющегося компонентом аутофагосом и аутолизосом белка Atg8a было значительно меньше, чем у 14-дневных личинок и взрослых филярий, у которых численность *Wolbachia* в организме выше (Voronin et al., 2012). В то же время, у взрослых неинфицированных нематод *Acanthocheilonema vitae* наблюдались лишь следовые количества Atg8a (Voronin et al., 2012). У инфицированных штаммом wMelPop *D. melanogaster* линии w¹¹¹⁸ экспрессия гена *atg8a* была в три раза выше по сравнению с неинфицированными мухами этой линии (Voronin et al., 2012).

Кроме того, Voronin с соавторами показали, что численность бактерий *Wolbachia* находилась в обратной зависимости от интенсивности макроаутофагии.

Стимуляция макроаутофагии посредством рапамицина или сайленсинга TOR приводила к снижению численности *Wolbachia*, тогда как ингибирование макроаутофагии при помощи вортманнина, 3-метиладенина или сайленсинга Atg1 приводило к её росту в экспериментах на культурах клеток *Ae. albopictus* и *D. melanogaster*, а также на нематодах *B. malayi* (Voronin et al., 2012). Добавление рапамицина в корм инфицированных патогенным штаммом *wMelPop* дрозофил приводило к снижению численности *Wolbachia* на 30% у их потомства по сравнению с потомством контроля, содержавшегося на нормальном корме (Voronin et al., 2012).

1.6. Заключение

Hsp67Bc относится к семейству sHsp белков теплового шока – крайне консервативных белков, необходимых для выживания и развития живых организмов в нормальных и стрессовых условиях. Представители семейства sHsp выделяются своей многофункциональностью и участием в широком спектре физиологических процессов (Fu, 2015), однако не все из них хорошо изучены. Hsp67Bc имеет функциональный ортолог у человека и лучше других представителей семейства предотвращает агрегацию человеческого белка Htt с увеличенным полиглутаминовым трактом, являющуюся причиной развития болезни Хантингтона (Vos et al., 2016). Кроме того, было показано, что увеличение экспрессии *Hsp67Bc* приводит к усилению макроаутофагии в клетках дрозофилы и человека и к увеличению ПЖ дрозофил (Carra et al., 2010; Vos et al., 2016). Тем не менее, оставалось неизвестным, насколько важную роль Hsp67Bc играет в жизнедеятельности мух в нормальных условиях и под воздействием стрессовых факторов. В настоящей работе для изучения функций этого белка впервые была получена линия *D. melanogaster* с делецией гена *Hsp67Bc* и проанализированы ПЖ, выживаемость и плодовитость полученных мух в условиях температурного стресса. Кроме того, с использованием цитологических методов был проведён детальный анализ морфологических изменений в органеллах, связанных с процессом макроаутофагии, в клетках мух с делецией *Hsp67Bc* в условиях белкового голодания и в присутствии патогенного штамма бактерий *Wolbachia wMelPop*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Используемые линии и генотипы *D. melanogaster*

Используемые в настоящей работе исходные линии мух приведены в таблице 1.

Таблица 1. Исходные линии *D. melanogaster*, использованные в экспериментах.

| Название | Генотип | Источник | Особенности |
|----------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d06009 | $P\{XP\}Hsp67Bc^{d06009}$ | Exelixis at Harvard Medical School | Кодирует <i>P</i> -элемент в 115 п.н. до старта транскрипции гена <i>Hsp67Bc</i> |
| – | $y^l w^l; Ki P\{\Delta 2-3\}99B$ | Коллекция лаборатории | Кодирует транспозазу |
| – | w^{1118} | Проф. Скотт О'Нейл (Prof. Scott O'Neill, University of Queensland, Australia) | Несёт ген <i>Hsp67Bc</i> нормальной длины (987 п.н.) |
| №1104 | $w[*]; P\{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR\}12$ | Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center | Кодирует драйвер GAL4 под промотором гена <i>glass</i> |
| №33609 | $P\{UAS-hATXN3.fl-Q27.myc\}46.2$ | Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center | Несёт нормальный вариант гена <i>ATXN3</i> человека с 27 повторами CAG под промотором <i>UAS</i> |
| №8150 | $P\{UAS-hATXN3.tr-Q78\}c211.2$ | Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center | Несёт мутантный вариант гена <i>ATXN3</i> человека с 78 повторами CAG под промотором <i>UAS</i> |

Все дрозофилы содержались на кукурузно-изюмном корме (в 1 л корма – 50 г кукурузной крупы, 40 г изюма, 20 г сахара, 5,2 г агар-агара, 18 г сухих пекарских дрожжей). Исключением являются эксперименты с белковым голоданием (параграф 2.3.6.).

2.2. Молекулярные методы

2.2.1. Выделение нуклеиновых кислот

Выделение ДНК для классической полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Одного самца *D. melanogaster* наркотизировали диэтиловым эфиром и гомогенизировали в буфере STE (100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и 1 мМ ЭДТА) с SDS и протеиназой К в финальных концентрациях 1% и 0,2 г/л, соответственно. Гомогенат затем инкубировали 90 мин при 56 °С, после чего останавливали действие протеиназы К нагревом до 95 °С в течение 7–8 мин. Далее образцы центрифугировали 5 мин, добавляли ½ объёма 5 М ацетата натрия и 2 объёма абсолютного этилового спирта и оставляли в холодильнике (+4 °С) на 30 мин для осаждения ДНК. После этого образцы центрифугировали 10 мин, дважды промывали 75% этанолом и растворяли в деионизованной воде.

Выделение ДНК для количественной ПЦР

Тотальная ДНК была выделена из мозга блуждающих личинок третьего возраста и 12-ч куколок и из голов 5-дневных имаго *D. melanogaster*. Для анализа было подготовлено по 3–6 образцов ДНК, каждый из которых содержал по 15 образцов мозга или голов. Выделение ДНК производилось с использованием фенола и хлороформа по следующей схеме. Образцы мозга (диссектированы в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (Медиген, Россия), pH 7,4) или головы гомогенизировали в лизирующем буфере (100 мМ NaCl; 10 мМ Tris pH 8,0; 25 мМ ЭДТА pH 8,0; 0,5% SDS; 0,1 г/л протеиназы К) и инкубировали 1,5–2 ч при +55 °С. Затем в образцы добавляли 1/9 объёма 3 М ацетата натрия, 1/2 объёма воднонасыщенного фенола и 40 мкл хлороформа, тщательно взбалтывали около 40 с и 10 мин центрифугировали при комнатной температуре на максимальной скорости. После этого осторожно переносили верхнюю фазу в чистые пробирки и добавляли 0,7 объёма изопропилового спирта, перемешивали и переносили на +4 °С на 30 мин. Затем образцы центрифугировали 10 мин при комнатной температуре на максимальной скорости, убирали супернатант, дважды промывали 2–3 объёмами 70% этилового спирта, сушили на воздухе и растворяли в деионизованной воде.

Выделение РНК и синтез кДНК

Тотальная РНК была выделена из целых *D. melanogaster* (по три взрослых самца или самки на образец или по четыре личинки или куколки на образец) с помощью реагента ЛИРА (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом, выложенным на сайте производителя (https://biolabmix.ru/upload/iblock/ed3/Lira_protocol.pdf). Концентрация выделенной РНК была измерена посредством спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Затем РНК (по 1,1 мкг РНК на 20 мкл реакционной смеси) была очищена от примеси ДНК с помощью ДНКазы I с добавлением ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific, США). Комплементарная ДНК была синтезирована с использованием праймера oligo(dT)₁₇ (Евроген, Россия) и обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012757_RevertAid_Reverse_Transcriptase_UG.pdf).

2.2.2. Полимеразная цепная реакция

Все ПЦР проводились в объёме 20 мкл с концентрацией ДНК (или кДНК) 0,5–1 мг/л и концентрацией праймеров 125–200 нМ.

Классическая ПЦР

Реакция проводилась с использованием набора BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе BIS Termocycler 111-02 (ООО «БИС-Н», Россия). Программа была следующей: денатурация 5 мин при 95 °С, 30 циклов амплификации по 30 с при 95 °С, 30 с при 57 °С и 45 с при 72 °С, элонгация при 72 °С 5 мин. Праймеры PrL и PrR для реакции были подобраны на основе обратного транскрипта последовательности AE014296.5 GenBank (Таблица 2).

Количественная ПЦР

Реакция проводилась с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе LightCycler 96 (Roche). Для определения содержания бактерий *Wolbachia* в мозге дрозофил использовались праймеры к генам поверхностного белка *Wolbachia* (*Wolbachia surface protein, wsp*) и *αTubulin84B D. melanogaster* (Таблица 2) и следующая программа на

амплификаторе: денатурация 5 мин при 95 °С; 40 циклов с температурным профилем 15 с при 95°С, 20 с при 62°С и 30 с при 72°С; плавление при 65–97 °С.

Таблица 2. Праймеры, использовавшиеся в ПЦР

| Участок гена | Праймер | Последовательность | Длина продукта, п.н. |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Классическая ПЦР для выявления делеции в гене <i>Hsp67Bc</i> | | | |
| 285 п.н. + <i>Hsp67Bc</i> + 236 п.н. | PrL | 5'-attacacttatggcgggcttctc-3' | 1508 / 444 (см. §3.1) |
| | PrR | 5'-gattgcgcctctcatctgtatc-3' | |
| Количественная оценка <i>Wolbachia</i> | | | |
| <i>αTubulin84B</i> (интрон) | Прямой | 5'-tcgcaatgaggaatggctct-3' | 73 |
| | Обратный | 5'- tgaagcgttccagcagcata-3' | |
| <i>wsp</i> | Прямой | 5'-agcgtatattagcactcctttgga-3' | 69 |
| | Обратный | 5'-tgaccagcaaaaccaatttacttt-3' | |
| Оценка уровня экспрессии генов во время и после воздействия холода | | | |
| <i>αTubulin84B</i> (экзоны) (Ponton et al., 2011) | Прямой (экзон 1) | 5'-tgtcgcgtgtgaaacacttc-3' | 96 |
| | Обратный (экзон 2) | 5'-agcagggcgttccaatctg-3' | |
| <i>Hsp67Bc</i> | Прямой | 5'-gtcaaggtgaattgtgcgcaaac-3' | 106 |
| | Обратный | 5'-aacgcagcactgttttct-3' | |
| <i>stv</i> | Прямой | 5'-gacacaacggcaaggacag-3' | 109 |
| | Обратный | 5'-ccgctctggcattctctc-3' | |
| <i>Hsp67Ba</i> | Прямой | 5'-atgtcgtgataccggttcatac-3' | 109 |
| | Обратный | 5'-ccagtggatacaaccggaatc-3' | |
| <i>Hsp70</i> | Прямой | 5'-acctcaacctatccatcaacc-3' | 157 |
| | Обратный | 5'-attacacctccagcggctc-3' | |
| <i>Hsp22</i> (Colinet et al., 2010a) | Прямой | 5'-gcctctcctcgccctttcac-3' | 66 |
| | Обратный | 5'-tcctcggtagcgccacactc-3' | |
| <i>Hsp23</i> | Прямой | 5'-tcactttgtccgcccgtatg-3' | 135 |
| | Обратный | 5'-atgcgctcgttgccttatac-3' | |
| <i>l(2)efl</i> | Прямой | 5'-agggactgaagagggatgac-3' | 164 |
| | Обратный | 5'-cacatccagaatgacctcgaac-3' | |
| <i>Fst</i> (Newman et al., 2017) | Прямой | 5'-agtggaaatccaatggcaac-3' | 221 |
| | Обратный | 5'-atcctcgggtgcaactcag-3' | |

Для определения уровня экспрессии различных генов во время и после воздействия холодового стресса использовалась следующая программа на амплификаторе: денатурация 5 мин при 95 °С; 40 циклов с температурным профилем 15 с при 95°С, 20 с при 60 °С и 30 с при 72 °С; плавление при 65–97 °С. В качестве референсного гена был также выбран *αTubulin84B*, так как уровень его РНК был стабильным как во время, так и после воздействия холода. В отличие от

количественной ПЦР для определения содержания *Wolbachia*, в этих реакциях праймеры к *αTubulin84B* были комплементарны двум его экзонам (на основании референсной последовательности NCBI NT_033777.3), чтобы исключить влияние возможного присутствия ДНК в реакции. Последовательности всех использовавшихся праймеров приведены в таблице 2.

Результаты количественных ПЦР были проанализированы в программе REST 2009 (<https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>).

2.2.3. Электрофорез в агарозном геле

Продукты ПЦР наносились на 1%-агарозный гель, приготовленный на Tris-боратном буфере (рН 8,3) с добавлением бромистого этидия (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромида) до концентрации 0,5 мг/л. Состав буфера: 890 мМ Tris-ОН, 890 мМ борная кислота, 18 мМ ЭДТА. Электрофорез проводился в Tris-боратном буфере в кювете 13×29 см (Хеликон, Россия) под напряжением 100 В в течение 45 мин с источником питания EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания).

2.2.4. Секвенирование ДНК

Тотальная ДНК была экстрагирована из 2–3 мух и амплифицирована с использованием праймеров PrL и PrR (Таблица 2) так же, как описано в параграфе 2.2.2. Качество ДНК было проанализировано с помощью электрофореза в агарозном геле. Амплифицированная ДНК была осаждена в 20% полиэтиленгликоле и 75% этаноле, затем растворена в деионизованной воде. Секвенирование было проведено с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, США) с праймером PrL или PrR (Таблица 2). Программа на амплификаторе была следующей: инкубирование в течение 1 мин при 95 °С и 35 циклов амплификации по 10 с при 98 °С, 10 с при 50 °С и 4 мин при 60 °С. Реакционная смесь затем была очищена смесью 7,5 М ацетата натрия и абсолютного этанола, промыта 75% этанолом, после чего была высушена на воздухе и передана в Центр коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Результаты секвенирования были

проанализированы с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor, v7.2.5 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>).

2.3. Методы изучения ответа на различные типы стресса

2.3.1. Оценка жизнеспособности и плодовитости взрослых *D. melanogaster* в нормальных условиях и при воздействии повышенной температуры

В целях определения ПЖ, выживаемости и плодовитости мух в нормальных условиях (24–25 °С), во время и после теплового воздействия для экспериментов были отобраны взрослые дрозофилы в день вылупления из куколки и помещены в пробирки со стандартным кормом, по 8 самцов и 8 самок в каждую. Отобранные мухи были разделены на четыре группы:

1. контроль, содержащийся в нормальных условиях (24–25 °С) в течение всего эксперимента;
2. мухи, подвергнутые тепловому стрессу (37 °С, 2 ч) в возрасте 1 дня и далее содержащиеся в нормальных условиях (24–25 °С);
3. мухи, подвергнутые тепловому стрессу (37 °С, 2 ч) в возрасте 7 дней, остальное время содержащиеся в нормальных условиях (24–25 °С);
4. мухи, содержащиеся при повышенной температуре (29 °С) в течение всего эксперимента.

Дрозофилы всех экспериментальных групп содержались в указанных условиях до гибели всех особей. Одновременно производился подсчёт среднего количества яиц, отложенных самками в каждой пробирке за 24 ч. Мух 1-й, 2-й и 4-й групп переносили на свежий корм каждый день в течение первых 10 дней эксперимента, затем каждые 1–2 дня в течение двух недель и каждый второй день до окончания эксперимента. Подсчёт среднего количества отложенных самками яиц производился после удаления родительских особей из пробирок как отношение количества отложенных за 24 ч яиц в пробирке к числу самок, содержащихся в данной пробирке. Регистрация проводилась в течение первых 10 дней эксперимента, затем на 14-й, 15-й, 16-й, 21-й, 22-й и 23-й дни. Мух 3-й группы переносили на свежий корм каждый второй день до теплового воздействия в возрасте 7 дней, после чего производили пересадку на свежий корм с последующим подсчётом отложенных яиц по схеме, схожей с группами 1, 2 и 4. Подсчёт погибших индивидов во всех

экспериментальных группах производился одновременно со сменой корма. В каждой группе насчитывалось по 45–64 самцов или самок каждого генотипа.

2.3.2. Исследование воздействия повышенной температуры на личинок и куколок *D. melanogaster*

Для изучения влияния отсутствия гена *Hsp67Bc* на выживаемость мух до стадии имаго после теплового воздействия блуждающие личинки третьего возраста контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий были собраны из родительских пробирок и помещены в пробирки со свежим кормом, по 20 личинок в каждую. Личинки содержались в нормальных условиях (24–25 °С) до достижения нужной стадии развития (блуждающей личинки третьего возраста, белой предкуколки (менее чем через 1 ч после окукливания по Vainbridge, Bownes, 1981), 12-ч куколки или 48-ч куколки). Затем пробирки с личинками или куколками были помещены на 2 ч в водяную баню в термостат с температурой 37 °С (вата, закрывавшая пробирки, была предварительно увлажнена во избежание высыхания насекомых), после чего возвращены в нормальные условия для развития мух в имаго. Далее были посчитаны доли индивидов, успешно завершивших метаморфоз (в случае личинок – также доля окуклившихся животных), в отношении к изначальному количеству отобранных для эксперимента дрозофил. В экспериментах участвовали по 39–107 насекомых каждого генотипа.

2.3.3. Оценка скорости восстановления и выживаемости взрослых мух после холодной комы

За один день до проведения этих экспериментов 3-дневные дрозофилы были разделены по половому признаку и помещены в пробирки со свежим кормом по 15 индивидов в каждую. На следующий день пробирки с мухами были помещены на лёд (0 °С) на 2, 4 или 12 ч, после чего возвращены в нормальные условия (24–25 °С) для восстановления. Процент восстановившихся после комы (стоящих на ногах) дрозофил измерялся каждые 5 мин (в случае 2- и 4-ч воздействия холода) или 10 мин (12-ч пребывание при 0 °С). Эксперименты были повторены по три (2- и 4-ч кома) или семь (12-ч кома) раз, в каждом из которых участвовало по 60–107 мух.

Через 48 ч после окончания воздействия холода были посчитаны доли выживших самок и самцов по отношению к изначальному количеству участвовавших в эксперименте самок и самцов, соответственно. Этот срок был выбран, так как почти 100% смертей вследствие холодового стресса происходило в течение этого времени.

2.3.4. Измерение плодовитости самок *D. melanogaster* после холодовой комы

За один день до начала эксперимента 3-дневные мухи были помещены в пробирки со стандартным кормом, по 8 самцов и 10 самок в каждую из 10 пробирок (опыт) или по 6 самцов и 8 самок (контроль) в каждую из 4 пробирок. Изначальное количество мух отличалось между контрольной и опытной группами во избежание больших отличий в размерах выборок в группах после обработки холодом, так как предварительные эксперименты с холодовым стрессом показали, что часть самок погибает после воздействия пониженной температуры. Контрольная группа содержалась в нормальных условиях (24–25 °C), тогда как пробирки с особями опытной группы на следующий день были помещены на лёд (0 °C) на 12 ч, после чего возвращены в нормальные условия. *D. melanogaster* обеих групп перемещались на свежий корм каждый день, и плодовитость самок измерялась каждый день в течение недели после окончания холодового воздействия как отношение количества отложенных за 24 ч яиц к числу самок, содержавшихся в данной пробирке.

2.3.5. Изучение воздействия пониженной температуры на личинок и куколок

Для экспериментов по выживаемости личинок и куколок мух после воздействия холода были использованы личинки и куколки на тех же стадиях развития, которые описаны в параграфе 2.3.2. После сбора блуждающих личинок третьего возраста и достижения ими нужной стадии развития пробирки с ними были перенесены на лёд (0 °C) на 2, 4 или 12 ч, после чего возвращены в нормальные условия (24–25 °C) для развития насекомых в имаго. Далее были посчитаны доли особей, успешно завершивших метаморфоз (в случае личинок – также доля окуклившихся животных), в отношении к изначальному количеству отобранных для эксперимента дрозофил. В экспериментах участвовали по 44–292 животных каждого генотипа.

2.3.6. Белковое голодание

Для проведения этого эксперимента были отобраны взрослые *D. melanogaster* в возрасте ≤ 2 ч после выхода из куколки. Мухи были перенесены в пробирки с кормом, содержащим сахарозу (100 г/л), агар-агар (5 г/л) и метил-4-гидроксibenзоат (0,78 г/л). В каждой пробирке содержалось по 8 самцов и 8 самок. На безбелковом корме указанного состава дрозофилы содержались до гибели всех особей; корм сменялся каждый второй день.

2.4. Цитологические методы

Препараты, полученные цитологическими методами, анализировались в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

2.4.1. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

При приготовлении образцов мозга *D. melanogaster* с использованием FISH в основном использовалась методика, описанная в статье Strunov et al. (2013). Образцы мозга наркотизированных диэтиловым эфиром 5-дневных взрослых самок дрозофил выделялись в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (Медиген, Россия), pH 7,4. Выделенный материал фиксировался в модифицированном фиксаторе Карнуа (хлороформ, спирт, ледяная уксусная кислота в соотношении 6:3:1) в течение 2–3 ч. После фиксации образцы отмывались 2 раза в 70% спирте и проводилась гибридизация *in situ* в течение 2 ч при 46°C в заранее подогретом и специфичном для флуоресцентного зонда буфере (0,9 М NaCl, 20 мМ Tris pH 8,0, 0,01% SDS, 20% формамид и 1 мкМ зонда). В работе использовался зонд W2 (5'-Cy5-СТТСТGTGAGTACCGTCАТТАТС-3'), комплементарный 16S рРНК бактерий *Wolbachia* (Heddi et al., 1999). После гибридизации образцы отмывались 15 мин при 48 °С в заранее подогретом промывочном буфере (20 мМ Tris-HCl; 0,01 % SDS; 0,5 М ЭДТА; 0,2 М NaCl) и помещались на предметное стекло в каплю среды для заливки *SlowFade Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США), содержащей 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). Через 10 мин образцы закрывались покровным стеклом и запечатывались лаком по периметру стекла.

Приготовленные препараты хранились в темноте при +4 °С до анализа с использованием лазерно-сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Zeiss, Германия).

2.4.2. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Приготовление образцов мозга *D. melanogaster* производилось согласно методике, описанной в статьях Terasaki et al. (2001) и Strunov, Kiseleva (2016). Образцы мозга наркотизированных диэтиловым эфиром 5-дневных взрослых самок дрозофил выделялись в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (Медиген, Россия), рН 7,4. Фиксация проводилась в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере (Panreac, Испания), рН 7,4 в течение 2,5 ч, после чего образцы отмывались в трёх сменах 0,1 М Na-какодилатного буфера (рН 7,4). Постфиксация проводилась в 1% растворе тетраоксида осмия на том же буфере в течение 1 ч, затем образцы трижды промывались дистиллированной водой и помещались в 1% водный раствор ацетата уранила (SERVA, Германия) на ночь при температуре +4 °С. После этого образцы мозга отмывались водой, обезвоживались в спиртах возрастающей концентрации (по 10 минут в 30%, 50%, 70%, 96% и 100% растворах этанола) и в ацетоне (2 смены по 20 минут). Затем образцы пропитывались смесью смолы, включающей 4 компонента (Epon 812, DDSA, MNA и DMP-30), по следующей схеме: смола, ацетон в соотношении 1:3 – 30 мин, в соотношении 1:1 – 30 мин, в соотношении 3:1 – 2–2,5 ч; чистая смола – 2 ч, ночь. Образцы затем инкубировались 8–10 ч в эксикаторе для удаления воздуха из смолы и полимеризовались в термостате при +60 °С в течение 2–3 суток.

В подготовленных образцах поиск нужного участка мозга осуществлялся на полутонких срезах толщиной 0,5 мкм, полученных с помощью стеклянного ножа на ультрамикротоме Ultracut E (Reichert-Jung, Германия). Полутонкие срезы помещались на предметное стекло, окрашивались метиленовым синим и анализировались под световым микроскопом Axioskop 40 (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы толщиной 60–80 нм получались с помощью алмазного ножа (Diatome, Швейцария) на ультрамикротоме Leica Ultracut UCT (Leica Microsystems, Германия), после чего исследовались с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) или JEM-100SX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении

80 кВ. Было исследовано по одному срезу в пяти образцах мозга взрослых самок контрольной линии и шести образцах мозга самок линии с делецией гена *Hsp67Bc*. Подсчёт площади сечения аутофагосом и аутолизосом осуществлялся в программе ImageJ 1.49v (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.4.3. Окрашивание LysoTracker Red (LTR)

На пятый и пятнадцатый дни белкового голодания яичники голодавших и содержавшихся на стандартном корме самок *D. melanogaster* были диссектированы в 0,01 М (здесь и далее) фосфатно-солевом буфере (Медиген, Россия), pH 7,4 и окрашены LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies, США) и DAPI. Окрашивание LTR проводилось по следующей схеме: яичники были помещены на 10 мин в 100 нМ раствор LTR в фосфатно-солевом буфере, трижды промыты фосфатно-солевым буфером, затем яичники фиксировались в течение 20 мин 4%-раствором параформальдегида, были трижды промыты 0,1%-раствором Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере и помещены на предметное стекло в каплю содержащего DAPI *SlowFade* Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты были оставлены в темноте без покровного стекла в течение 10 мин для равномерного прокрашивания DAPI, после чего закрыты покровным стеклом и запечатаны лаком. Образцы хранились в темноте при +4 °С до анализа с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Zeiss, Германия).

2.5. Статистический анализ полученных данных

В настоящей работе применялся широкий спектр статистических методов, так как полученные данные требовали различных способов обработки.

Кривые выживаемости мух в нормальных условиях, после и во время теплового воздействия были построены по методу Каплана — Мейера, преимуществом которого является возможность учитывать выбывающих из эксперимента особей (Rich et al., 2010). Сравнение динамики выживаемости дрозофил производилось с использованием логрангового критерия (Log-rank test), широко применяемого для таких целей (Bland, Altman, 2004).

Сравнение скорости восстановления взрослых мух после холодовой комы проводилось отдельно для каждого эксперимента по критерию Колмогорова —

Смирнова для накопленных частот (Васильева, 2007). Этот метод был выбран, так как через выбранные промежутки времени (5 или 10 мин) измерялось общее («накопленное») на каждый момент измерения количество вышедших из состояния комы мух. Выводы о статистической достоверности различий между сравниваемыми линиями мух были сделаны на основании результатов большинства тестов.

Сравнение средних значений выборок, состоящих из непрерывных переменных (средняя ПЖ мух, среднее количество бактерий *Wolbachia* в инфицированных нейронах, среднее количество гибнущих яйцевых камер на овариолу и т.п.), производилось с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок или непараметрического *U*-критерия Манна — Уитни, в зависимости от того, имеют ли данные нормальное распределение (Васильева, 2007). Для определения нормальности распределения применялся тест Шапиро — Уилка.

Статистический анализ данных, состоящих из категориальных переменных, таких как, например, процент мух, выживших после холодовой комы, процент инфицированных нейронов и LTR-положительных гермариев, проводился с помощью критерия хи-квадрат (Васильева, 2007).

Сравнение динамики средней плодовитости самок осуществлялось в каждой сравниваемой временной точке с использованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок с последующим применением процедуры Бенджамини — Кригера — Иекутиели. Процедура Бенджамини — Кригера — Иекутиели позволяла избегать ложноположительных результатов, которые могли возникнуть за счёт множественных сравнений данных (Benjamini et al., 2006; Groppe et al., 2011).

Корреляционный анализ данных, полученных с помощью ПЭМ, проводился в программе JASP 0.13.1 (<https://jasp-stats.org/>).

Во всех экспериментах различия считались статистически значимыми при значениях $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение линии *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc*

Для получения делеции в гене *Hsp67Bc* был использован метод неточного вырезания *P*-элемента, расположенного в 115 п.н. до старта транскрипции этого гена (Рисунок 11). На первом этапе были скрещены самцы линии d06009, имеющие встройку элемента *XP* с маркерным геном *mini-white* вблизи гена *Hsp67Bc* на третьей хромосоме (генотип $w; P\{XP\}Hsp67Bc^{d06009}$), и самки мух, несущих ген транспозазы на третьей хромосоме (генотип $y; Ki P\{\Delta 2-3\}99B$). В поколении F1 были получены дрозophilы, несущие и транспозазу, и *P*-элемент, что приводило к его вырезанию и встройкам в новые области ДНК мух. Самцы этого генотипа были скрещены с самками, одна третья хромосома которых кодировала *P*-элемент, а вторая являлась балансёром (генотип $w; P\{XP\}Hsp67Bc^{d06009}/TM6B, Hu$); в потомстве были отобраны самцы с белыми глазами, что являлось признаком того, что мобильный элемент был вырезан и утерян. Всего было получено 294 таких самца. Они были затем индивидуально скрещены с самками генотипа $w; P\{XP\}Hsp67Bc^{d06009}/TM6B, Hu$ для получения стабильных линий мух. Эти линии позднее проверялись на наличие делеций внутри гена *Hsp67Bc* с помощью классической ПЦР с праймерами PrL и PrR, комплементарными участкам в 263 п.н. до начала и в 214 п.н. после конца последовательности гена *Hsp67Bc*, соответственно (Рисунок 12, А, Таблица 2).

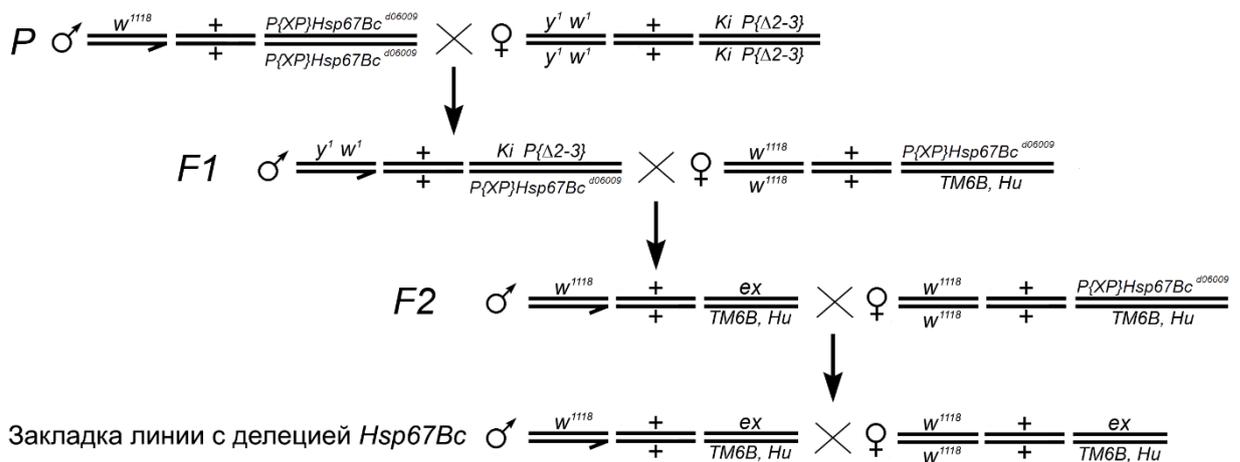


Рисунок 11. Схема скрещиваний для получения линии *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc* путём неточного вырезания *P*-элемента, расположенного в 115 п.н. до старта транскрипции *Hsp67Bc* на третьей хромосоме.

Из 278 полученных линий мух (16 из 294 самцов оказались стерильными) 261 была проанализирована с помощью ПЦР. В результате была обнаружена только одна линия (№ 120) с делецией, затрагивающей исключительно ген *Hsp67Bc* (Рисунок 12, Б). Продукт амплификации ДНК нескольких линий был длиннее по сравнению с 1508 п.н. в линии *w¹¹¹⁸*, использованной здесь в качестве контрольной, вследствие неполного вырезания *P*-элемента; в случае ряда других линий продукт ПЦР отсутствовал на гель-электрофореze, что могло говорить о наличии делеции, выходящей за пределы гена *Hsp67Bc*, или о присутствии участка *P*-элемента, слишком длинного для успешной амплификации фрагмента ДНК, расположенного между праймерами PrL и PrR. Более 190 проанализированных линий имели продукт ПЦР нормальной длины (1508 п.н.), что указывает на точное вырезание *P*-элемента. Включающий область гена *Hsp67Bc* участок ДНК нескольких таких линий, как и выбранной для дальнейших экспериментов нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линии № 120, был секвенирован. Секвенирование ДНК нескольких линий дрозофил с точно вырезанным *P*-элементом выявило отсутствие следов этого мобильного элемента и ген *Hsp67Bc* дикого типа, идентичный последовательности AE014296.5 GenBank. Одна из этих линий (№ 254) была выбрана в качестве контрольной. У мутантной линии мух результаты секвенирования показали наличие делеции размером 1076 п.н., включающей промотор гена *Hsp67Bc* (Рисунок 12, Б) и соответствующей позициям 9 371 643 – 9 372 718 последовательности AE014296.5 GenBank. Таким образом, в геноме нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линии мух присутствовали лишь последние 132 п.н. кодирующей части гена *Hsp67Bc*, в норме имеющего длину 987 п.н. (<https://flybase.org>). Кроме того, на месте вырезавшегося *P*-элемента была обнаружена инсерция 12 п.н., предположительно являющаяся частью мобильного элемента (Рисунок 12, Б). Отсутствие продукта гена *Hsp67Bc* было подтверждено также с помощью количественной ПЦР. Полученные использовавшиеся в дальнейших экспериментах контрольная и нуль-аллельная по гену *Hsp67Bc* линии мух далее в тексте названы, соответственно, *Hsp67Bc*-2 и *Hsp67Bc*-0.

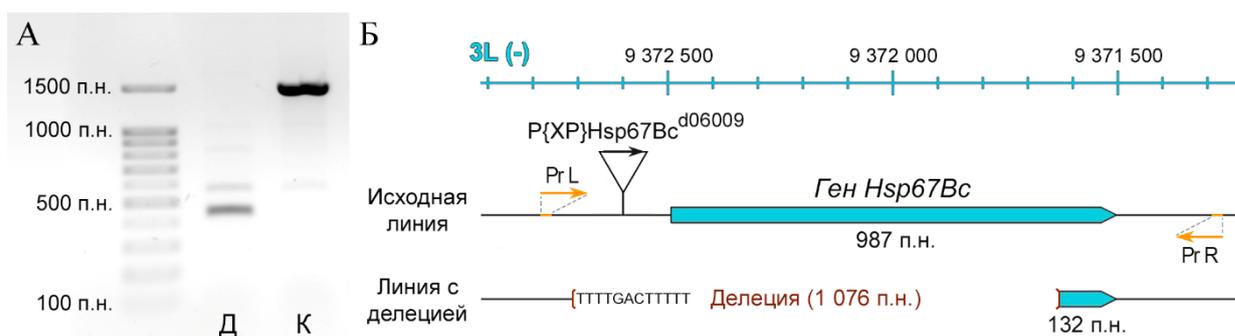


Рисунок 12. Электрофореграмма участка ДНК, включающего ген *Hsp67Bc*, в контрольной и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линиях (А) и схема расположения полученной делеции (Б). А – ампликоны участков ДНК, синтезированных с использованием праймеров, комплементарных последовательностям в 285 п.н. от промотора и в 236 п.н. от конца гена *Hsp67Bc*, в образцах полученной линии с делецией *Hsp67Bc* (Д) и линии с точно вырезанным *P*-элементом, использовавшейся в качестве контрольной (К); длина ампликона составляет около 1500 п.н. в контрольной линии и около 450 п.н. в линии с делецией. Б – схема строения участка ДНК *D. melanogaster* вблизи гена *Hsp67Bc* на левом плече третьей хромосомы (3L (-)) с местом встройки *P*-элемента ХР в 115 п.н. от промотора *Hsp67Bc* в исходной линии мух d06009, сайтами посадки праймеров, использовавшихся в ПЦР (PrL, PrR, оранжевые сегменты), и полученной делецией (тёмно-красные скобки). Двенадцать п.н. на месте вырезанного *P*-элемента, не соответствующие последовательности ДНК в контрольной линии, предположительно являются частью *P*-элемента.

3.2. Жизнеспособность и фертильность мух с делецией *Hsp67Bc* в нормальных условиях

Созданная линия мух с делецией гена *Hsp67Bc* оказалась жизнеспособной и фертильной в гомозиготе и не имела видимых отклонений морфологии от контрольной. Более того, средняя ПЖ мутантных мух в нормальных условиях (24–25 °С) была достоверно повышена на 35% в случае самцов и на 34% в случае самок (Рисунок 13, А–В). Так, средняя ПЖ самцов линии *Hsp67Bc*-0 составила $70,9 \pm 1,3$ дня по сравнению с $52,4 \pm 1,9$ дня самцов контрольной линии ($p < 0,001$); средняя ПЖ нуль-аллельных по *Hsp67Bc* самок составила $63,9 \pm 2,2$ дня ($47,8 \pm 2,4$ у контроля, $p < 0,001$). При этом средняя плодовитость самок линии *Hsp67Bc*-0, измерявшаяся в течение первого месяца жизни, была снижена приблизительно на 6% (статистически не достоверно) по сравнению с контролем (Рисунок 13, Г).

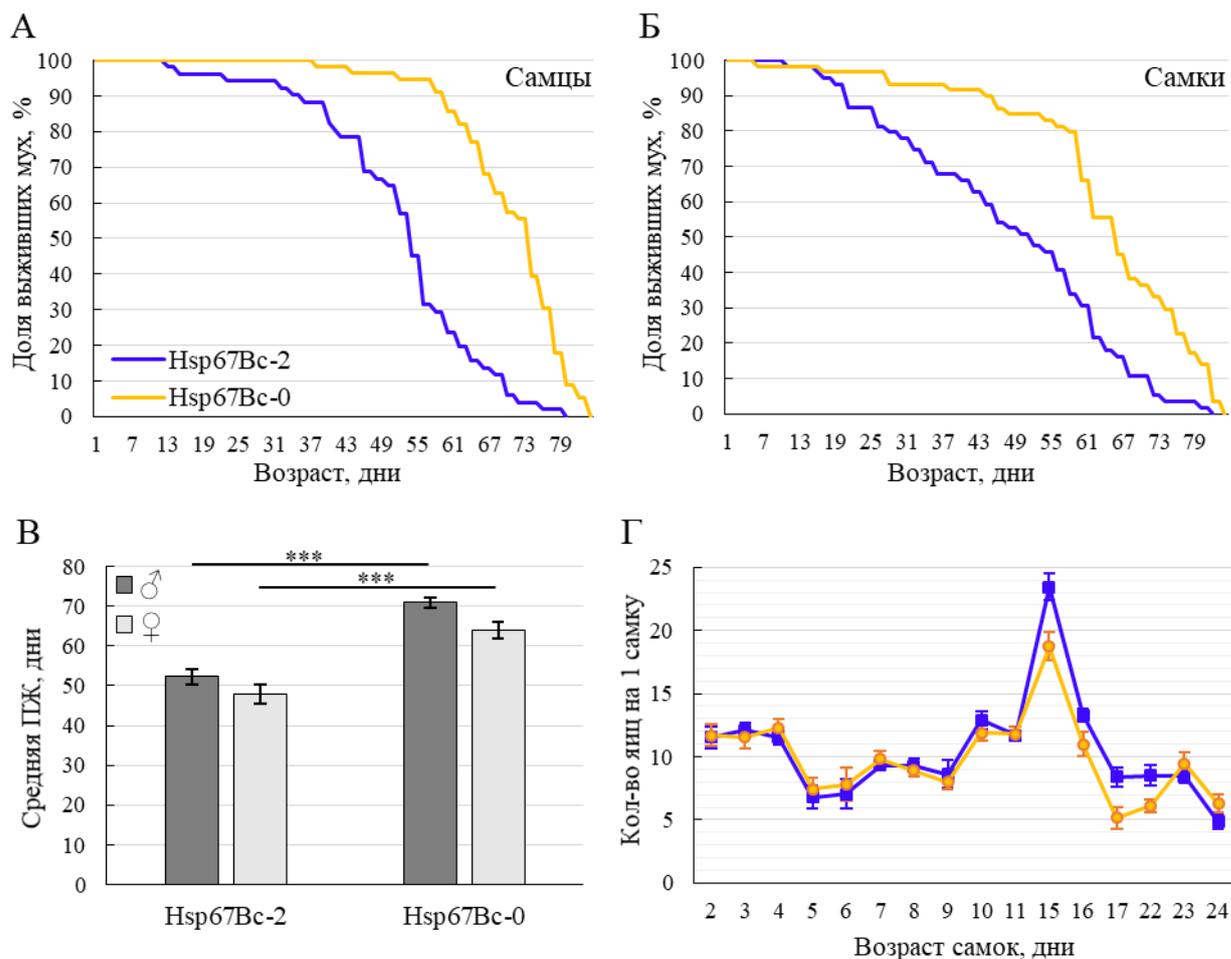


Рисунок 13. Показатели жизнеспособности и плодовитости *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc* в нормальных условиях (24–25 °С). А, Б – кривые выживаемости самцов (А) и самок (Б) контрольной (*Hsp67Bc-2*) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) линий мух. В – средняя продолжительность жизни (ПЖ) мух контрольной и мутантной линий. Г – плодовитость самок (среднее количество отложенных яиц на самку) контрольной и мутантной линий мух, измерявшаяся в течение первого месяца их жизни. Цвета, использованные для обозначения показателей контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий на графиках, одинаковы на панелях А, Б и Г. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего. ***Достоверные различия с $p \leq 0,001$.

В поисках причины снижения плодовитости самок нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* дрозофил мы изучили морфологию яичников 5- и 15-дневных мух мутантной и контрольной линий. В яичниках мух обеих линий наблюдались яйцевые камеры на всех стадиях оогенеза, однако количество овариол в мутантной линии было меньше по сравнению с контрольной. В яичниках самок контрольной линии насчитывалось в среднем по 16,9–18,4 овариолы, тогда как в яичниках мух линии с делецией *Hsp67Bc* – по 14,6–16,2 ($p = 0,680$ в случае 5-дневных мух и $p < 0,001$ в случае 15-дневных мух). Ранее другие исследователи отмечали, что число откладываемых *D. melanogaster* яиц находится в прямой зависимости от количества

овариол (Yamamoto et al., 2021). Следовательно, небольшое снижение плодовитости самок нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии по сравнению с контрольной, выявленное в наших экспериментах, может быть обусловлено сокращённым числом овариол в мутантной линии.

3.3. Устойчивость мух с делецией в гене *Hsp67Bc* к повышенной температуре

Так как в нормальных условиях делеция гена *Hsp67Bc* не только не уменьшила, но даже увеличила среднюю ПЖ *D. melanogaster* при лишь незначительном снижении плодовитости, и при этом в природных популяциях мух утери этого гена не фиксировалось, возник вопрос, какова роль *Hsp67Bc* в жизнедеятельности *D. melanogaster*. Известно, что гены *HSP*, к которым относится *Hsp67Bc*, необходимы живым организмам для формирования ответа на стресс, и их экспрессия возрастает в ответ на воздействие стрессов разного рода (Lindquist, 1986; Sørensen et al., 2003). Поэтому, чтобы выявить функции *Hsp67Bc*, мы исследовали влияние делеции этого гена на жизнеспособность мух в различных стрессовых условиях.

Известно, что экспрессия *Hsp67Bc*, как и большинства генов *HSP*, возрастает в условиях повышенной температуры (Vos et al., 2016). Поэтому в первую очередь мы исследовали влияние повышенной температуры на жизнеспособность и плодовитость нуль-аллельных по этому гену мух. По данным FlyBase (<https://flybase.org>) экспрессия этого гена наиболее высока на стадиях блуждающей личинки третьего возраста, белой предкуколки (менее чем через 1 ч после окукливания по Bainbridge, Bownes (1981), в тексте относится к куколкам), 12-ч куколки и 48-ч куколки. В связи с этим в эксперименты по определению влияния делеции в гене *Hsp67Bc* на устойчивость мух к воздействию повышенной температуры были вовлечены *D. melanogaster* на этих стадиях развития, а также взрослые насекомые.

Личинки и куколки подвергались кратковременному тепловому воздействию (37 °C, 2 ч), после чего возвращались в нормальные условия (24–25 °C) для завершения метаморфоза. Нами затем были посчитаны доли выживших взрослых мух от изначального числа участвовавших в экспериментах особей (Рисунок 14, А). Средняя выживаемость до взрослой стадии не отличалась между куколками контрольной и мутантной линий и составляла от $95,0 \pm 2,9\%$ (12-ч куколки

мутантной линии Hsp67Bc-0) до 100% (48-ч куколки линии Hsp67Bc-0). Достоверные различия наблюдались между выживаемостью личинок мутантной и контрольной линий до стадии имаго, при этом нуль-аллельная по гену *Hsp67Bc* линия мух продемонстрировала лучшую выживаемость по сравнению с контролем: $88,9 \pm 3,1\%$ у личинок линии Hsp67Bc-0, $76,6 \pm 8,3\%$ у контроля ($p = 0,044$).

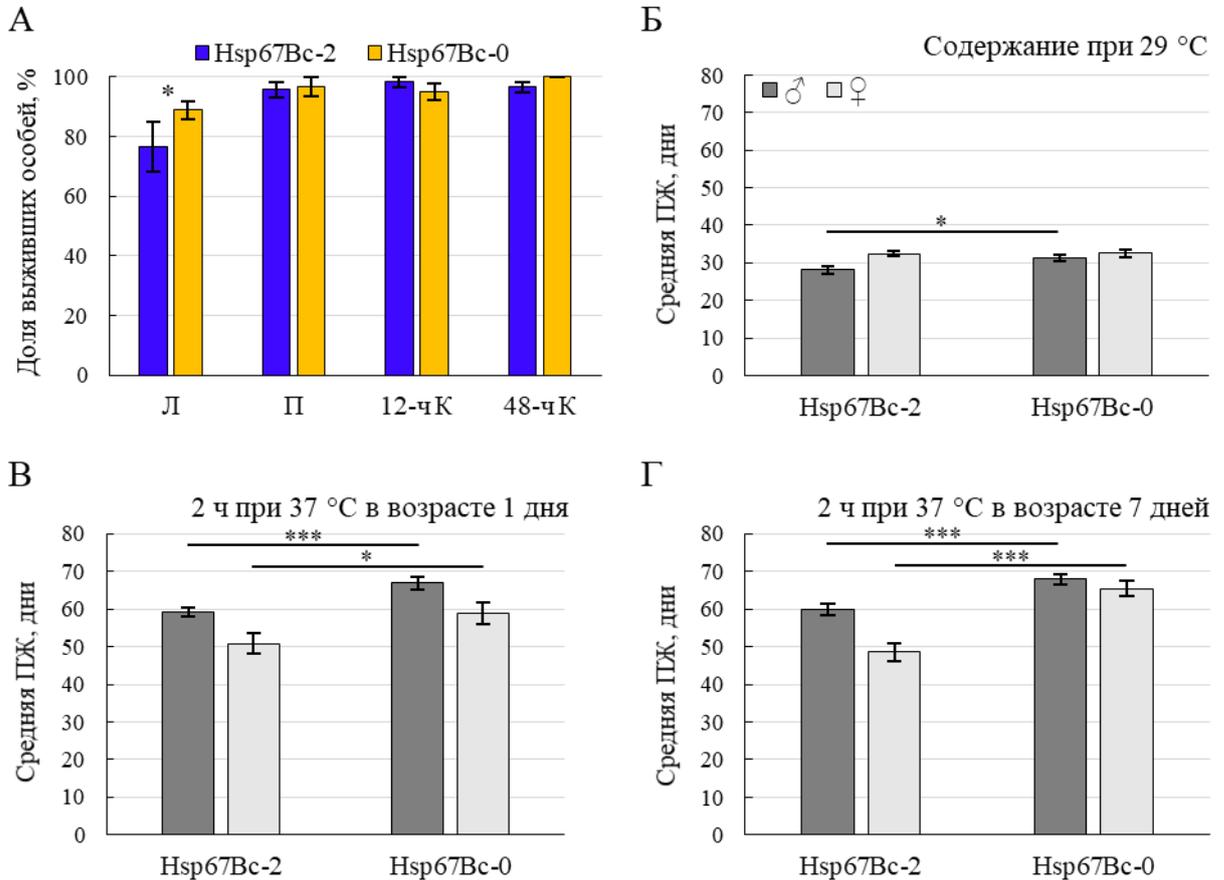


Рисунок 14. Выживаемость личинок, предкуколок и куколок после кратковременного теплового стресса (37 °С, 2 ч) и ПЖ взрослых *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc* в условиях температурных режимов, включающих содержание при повышенной температуре. А – доли (%) личинок (Л), белых предкуколок (П), 12-ч куколок (12-ч К) и 48-ч куколок (48-ч К) контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий, достигших стадии имаго после кратковременной термической обработки (37 °С, 2 ч). Б – средняя ПЖ самцов и самок линий Hsp67Bc-2 и Hsp67Bc-0 при постоянном содержании в условиях повышенной температуры (29 °С). В, Г – средняя ПЖ самцов и самок линий Hsp67Bc-2 и Hsp67Bc-0 при содержании в нормальных условиях (24–25 °С) после кратковременной термической обработки (37 °С, 2 ч) в возрасте 1 дня (В) или в возрасте 7 дней (Г). Обозначения пола мух совпадают на панелях Б–Г. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего. *Достоверные различия с $0,01 < p \leq 0,05$; ***достоверные различия с $p \leq 0,001$.

Взрослые мухи нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* и контрольной линий подвергались тепловому воздействию одного из двух типов – постоянному

содержанию при повышенной температуре (29 °С, I группа) или кратковременному тепловому шоку при температуре 37 °С (в течение 2 ч на 1-й (II группа) или 7-й (III группа) день жизни) с последующим пребыванием в нормальных условиях (24–25 °С). Возраст имаго, подвергавшихся тепловому шоку при 37 °С (1 и 7 дней), был выбран на основании имеющихся данных FlyBase о том, что уровень белка Hsp67Bc значительно ниже у 7-дневных *D. melanogaster* по сравнению с 1-дневными (<https://flybase.org>).

Для экспериментов всех трёх типов дрозофилы обеих линий были отобраны в день выхода из куколки и содержались в нормальных условиях в течение первого дня жизни. Затем I группа мух была перенесена в термостат на 29 °С, где содержалась до гибели всех особей, в то время как II группа – на 2 ч в термостат в условия 37 °С. По истечении 2 ч II группа животных была возвращена в нормальные условия (24–25 °С), где содержалась до гибели всех индивидов. Эксперимент с III группой мух проходил по подобной II группе схеме, с единственным отличием – тепловая обработка проводилась на 7-й день жизни имаго. И контрольные, и мутантные особи из II и III групп выживали после кратковременного теплового шока.

Как и в нормальных условиях (24–25 °С), нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* *D. melanogaster* имели более высокую ПЖ (Рисунок 14, Б–Г, Таблица 3) и выживаемость (Рисунок 15) по сравнению с мухами контрольной линии при всех режимах, за исключением самок в условиях постоянного содержания при 29 °С. Динамика выживаемости самцов линий Hsp67Bc-2 и Hsp67Bc-0 II и III групп отличалась с достоверностью $p < 0,001$ и $p = 0,010$, соответственно (Рисунок 15). Средняя ПЖ мутантных самцов II и III групп была на 13% выше, чем контрольных, и составила $67,0 \pm 1,7$ дня и $67,9 \pm 1,3$ дня, соответственно (Рисунок 14, В, Г; Таблица 3). ПЖ нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* самок II группы была на 16%, а III группы – на 35% выше, чем контрольных ($58,9 \pm 2,8$ дня и $65,4 \pm 2,0$ дня, соответственно); динамика выживаемости отличалась с достоверностью $p = 0,005$ во II группе и $p < 0,001$ в III группе (Рисунок 15). Постоянное содержание при 29 °С (I группа) укорачивало ПЖ всех мух приблизительно в 1,5–2 раза по сравнению с содержанием в нормальных условиях (24–25 °С). Как и в предыдущих экспериментах, ПЖ мутантных мух превосходила ПЖ контрольных, однако

различия между линиями значительно сократились (Рисунок 14, Б; Рисунок 13, Б). Так, средняя ПЖ самцов контрольной линии Hsp67Bc-2 при 29 °C составила $28,1 \pm 0,9$ дня ($31,3 \pm 0,8$ дня у мутантной линии Hsp67Bc-0, что на 11% выше, $p = 0,010$), самок – $32,4 \pm 0,7$ ($32,5 \pm 1,1$ дня у Hsp67Bc-0, различия недостоверны).

Кратковременный тепловой стресс повлиял на ПЖ и выживаемость мух обеих линий, но оказал различное воздействие. Этот тип стресса увеличил и ПЖ, и выживаемость самцов и самок контрольной линии по сравнению с постоянным содержанием в нормальных условиях (24–25 °C) на 1,5–14,5% (Таблица 3; Рисунок 15). В случае самцов Hsp67Bc-0 во II и III группах и самок Hsp67Bc-0 во II группе воздействие 37 °C в течение 2 ч уменьшило ПЖ мух этой линии на 4,2–7,8% по сравнению с постоянным содержанием в нормальных условиях (Таблица 3). Данное наблюдение может свидетельствовать о том, что, несмотря на увеличение ПЖ мух и в нормальных условиях, и при повышенной температуре (29 °C), делеция гена *Hsp67Bc* имеет негативные последствия для сопротивляемости *D. melanogaster* краткосрочному воздействию высокой температуры (37 °C).

Таблица 3. Средняя ПЖ *D. melanogaster* (дни), содержащихся в нормальных условиях (24–25 °C) и в условиях повышенной температуры (постоянно при 29 °C или 2 ч при 37 °C).

| | | Температурный режим | | | |
|---------------------------------|---|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| | | 24–25 °C (норм. усл.) | 29 °C (I группа) | 2 ч при 37 °C, 1-д., затем 24–25 °C (II группа) | 2 ч при 37 °C, 7-д., затем 24–25 °C (III группа) |
| Hsp67Bc-2 (контроль) | ♂ | $52,3 \pm 1,9$ | $28,1 \pm 0,9$ (↓↓ ^{**}) | $59,2 \pm 1,3$ (↑ [*]) | $59,9 \pm 1,5$ (↑ ^{**}) |
| | ♀ | $47,8 \pm 2,4$ | $32,4 \pm 0,7$ (↓↓ ^{**}) | $50,8 \pm 2,8$ (↑) | $48,5 \pm 2,4$ |
| Hsp67Bc-0 | ♂ | $70,9 \pm 1,3$ | $31,3 \pm 0,8$ (↓↓ ^{**}) | $67,0 \pm 1,7$ (↓) | $67,9 \pm 1,3$ (↓↓ ^{**}) |
| | ♀ | $63,9 \pm 2,2$ | $32,5 \pm 1,1$ (↓↓ ^{**}) | $58,9 \pm 2,8$ (↓) | $65,4 \pm 2,1$ |

Данные представляют собой среднее \pm стандартная ошибка среднего; стрелками обозначены отличия ПЖ при различных температурных режимах (I–III группы) по сравнению с содержанием в нормальных условиях (норм. усл.). ↑ – ПЖ увеличена, ↓ – ПЖ снижена, ↓↓ – ПЖ снижена более чем в 1,5 раза. * Различия с уровнем достоверности $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

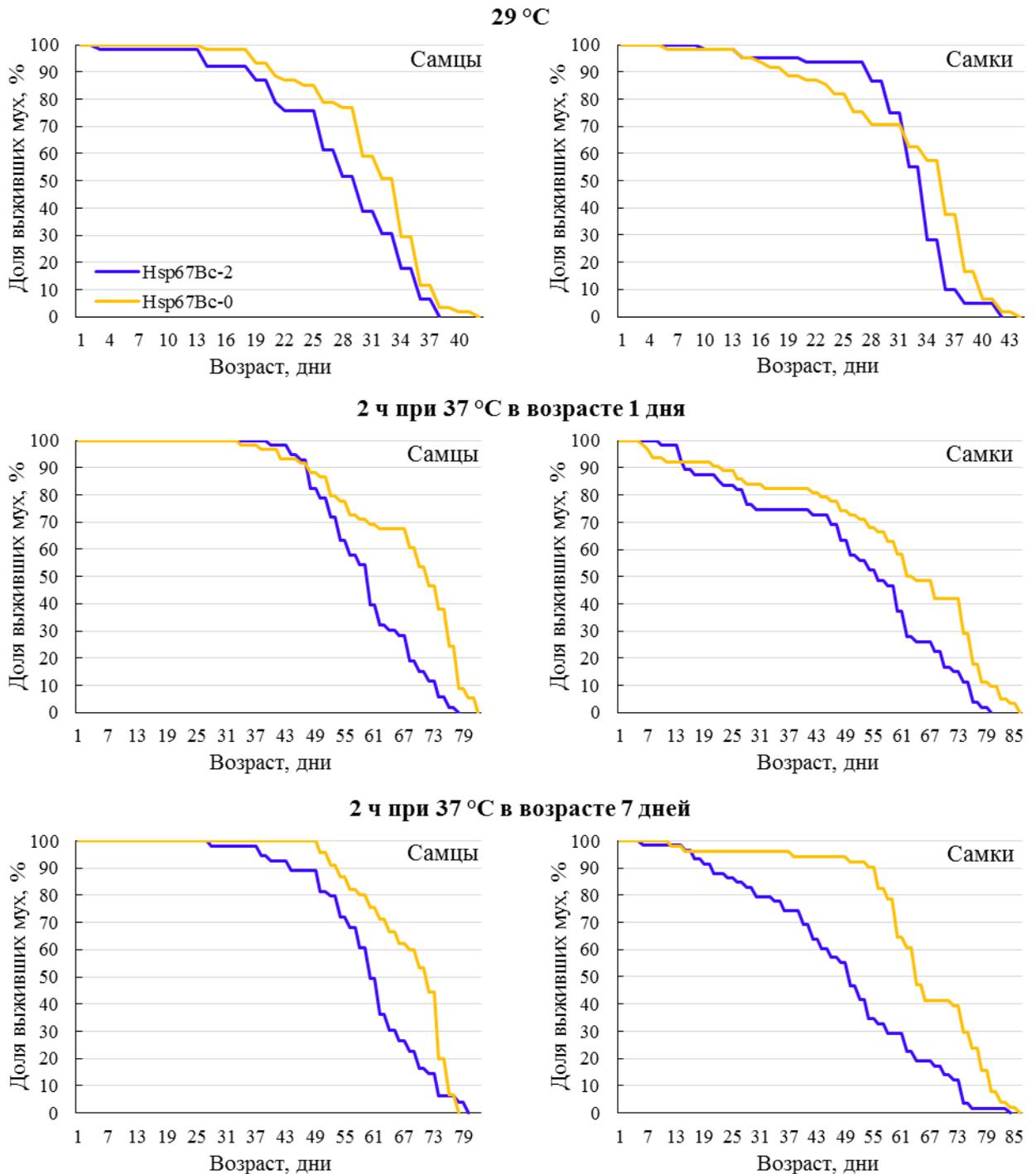


Рисунок 15. Кривые выживаемости взрослых самцов и самок *D. melanogaster* контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий, содержащихся в условиях повышенной температуры (29 °C) и в нормальных условиях (24–25 °C) после кратковременной тепловой обработки (37 °C, 2 ч) в возрасте 1 дня или 7 дней. Обозначения линий мух одинаковы на всех панелях рисунка.

3.3.1. Влияние повышенной температуры на плодовитость мух

Параллельно с выживаемостью мух нами анализировалась плодовитость самок как отношение количества отложенных за 24 ч яиц в каждой пробирке к числу самок,

содержавшихся в этой пробирке. Средняя плодовитость за всё время измерений достоверно не отличалась между контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линиями у самок всех трёх групп, однако мутантные самки имели незначительно сниженную плодовитость по сравнению с контролем во II и III группах. Так, во II группе она была снижена на 10,5% и составила 8,71 яиц на самку (9,73 в контрольной линии), в то время как в III группе этот показатель был ниже на 12,8% (9,77 яиц на самку у линии *Hsp67Bc-0* и 11,20 – у контроля). В обеих этих группах различия плодовитости между линиями превышали различия в нормальных условиях (24–25 °C).

Динамика откладки яиц самками обеих линий достоверно отличалась лишь в отдельные дни регистрации (Рисунок 16). Стоит отметить, что кратковременный тепловой стресс в возрасте 1 дня (II группа мух) оказал негативное влияние на плодовитость как контрольных, так и нуль-аллельных самок: на следующий день после тепловой обработки количество отложенных самками обеих линий яиц было значительно меньше по сравнению с таковым в нормальных условиях (постоянное содержание при 24–25 °C) (Рисунки 16, Б и 13, Г). При этом влияние теплового стресса было сильнее выражено в случае самок с делецией гена *Hsp67Bc*. Так, количество отложенных яиц, приходящихся на каждую самку контрольной линии, было ниже, чем в нормальных условиях, на 40%, тогда как для мутантной линии – на 72%. Возможно, тепловой шок (37 °C) оказал на 1-дневных нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* самок настолько сильное негативное воздействие, что в результате значительно снизились и плодовитость, и ПЖ.

Таким образом, отсутствие гена *Hsp67Bc* отрицательно сказывается на плодовитости самок мух после кратковременного воздействия повышенной температуры (37 °C, 2 ч). При этом прямое негативное влияние теплового шока на плодовитость более заметно у 1-дневных мух.

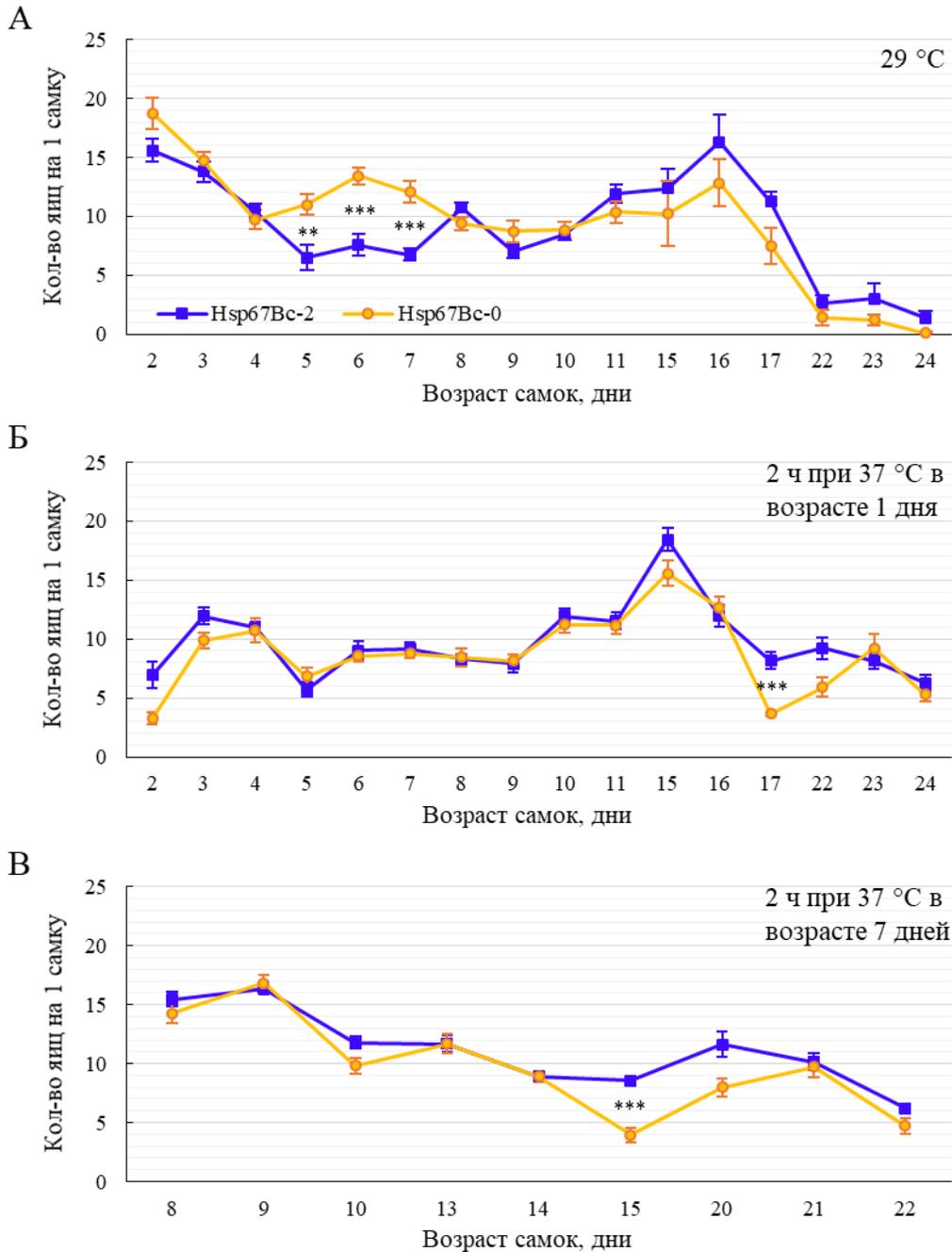


Рисунок 16. Плодовитость самок (среднее количество отложенных яиц на самку) контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий *D. melanogaster*, измерявшаяся в течение первого месяца жизни мух, содержащихся в условиях: А – 29 °C в течение жизни; Б – 24–25 °C после 2-ч пребывания при 37 °C в возрасте 1 дня; В – 24–25 °C после 2-ч пребывания при 37 °C в возрасте 7 дней. Обозначения линий мух одинаковы на всех панелях рисунка. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего. ** Достоверные различия с $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.4. Устойчивость мух с делецией гена *Hsp67Bc* к пониженной температуре

После изучения влияния делеции в гене *Hsp67Bc* на жизнеспособность мух при повышенной температуре (29 °C) и после теплового шока (2 ч при 37 °C) мы исследовали воздействие другого температурного стресса – пониженной температуры – на нуль-аллельных по этому гену мух. Широко применяемым методом оценки устойчивости насекомых, в том числе *D. melanogaster*, к холоду является измерение времени впадения в холодовую кому и восстановления после неё (Andersen, Overgaard, 2019; Colinet et al., 2010a,b,c). Нами была оценена скорость восстановления взрослых *D. melanogaster* после холодовой комы.

3.4.1. Восстановление взрослых *D. melanogaster* после холодовой комы

Краткосрочные последствия холодового стресса для мух с делецией гена *Hsp67Bc*, были исследованы в ходе экспериментов, включающих введение 4-дневных взрослых мух мутантной и контрольной линий в состояние холодовой комы при 0 °C на 2 ч (кратковременный стресс), 4 ч (стресс средней длительности) или 12 ч (продолжительный стресс) (Rajamohan, Sinclair, 2008), после чего насекомые были возвращены в условия комнатной температуры. Возраст насекомых был выбран на основании данных, полученных группой учёных, сравнивавших скорость восстановления после холодовой комы взрослых *D. melanogaster* разного возраста (Colinet et al., 2013). Colinet и др. установили, что с момента вылупления из куколки по третий день жизни темп восстановления мух после холодовой комы снижается и далее не меняется. Поэтому 4-дневный возраст мух в нашем эксперименте был выбран как оптимальный для выявления выраженных различий между скоростью восстановления контрольных и мутантных *D. melanogaster*.

Дрозофилы нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии *Hsp67Bc-0* продемонстрировали замедленное по сравнению с контрольной линией восстановление двигательной активности после прекращения воздействия холода (Рисунок 17). Динамика восстановления после холодовой комы значительно различалась у самок контрольной и мутантной линий при холодовом воздействии любой исследованной длительности во всех или в большинстве биологических повторов эксперимента ($1,34 \leq \lambda \leq 3,43$, $0,001 < p < 0,06$ в экспериментах с 2-ч

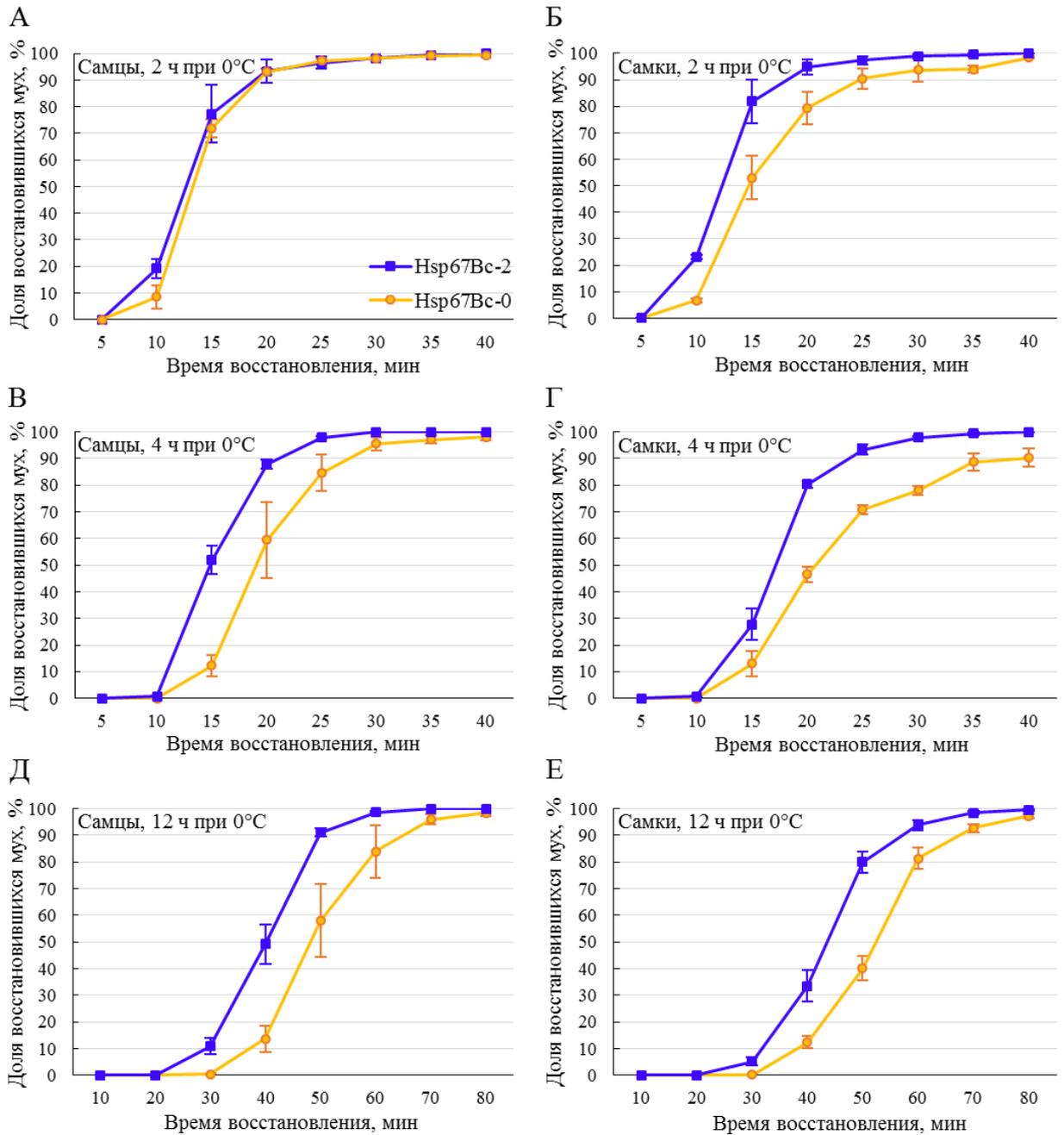


Рисунок 17. Кривые восстановления взрослых мух контрольной (*Hsp67Vc-2*) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Vc* (*Hsp67Vc-0*) линий после холодовой комы разной длительности (0 °C, 2, 4 или 12 ч). А, Б – динамика восстановления самцов (А) и самок (Б) после пребывания при 0 °C в течение 2 ч. В, Г – динамика восстановления самцов (В) и самок (Г) после пребывания при 0 °C в течение 4 ч. Д, Е – динамика восстановления самцов (Д) и самок (Е) после пребывания при 0 °C в течение 12 ч. Различия скорости восстановления между контрольной и мутантной линиями достоверны во всех экспериментах, кроме восстановления самцов после 2-ч холодовой комы. Обозначения линий одинаковы на всех панелях рисунка. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего.

продолжительностью холодовой комы; $\lambda \geq 1,94$, $p \leq 0,001$ в экспериментах с 4-ч холодовой комой; $\lambda \geq 1,80$, $p \leq 0,003$ в случае с 12 ч при 0 °С). Восстановление контрольных и нуль-аллельных по *Hsp67Bc* самцов после кратковременной 2-ч холодовой комы происходило с одинаковой скоростью; тем не менее, после двух других режимов содержания на холоде мутантные самцы продемонстрировали замедленное восстановление ($\lambda \geq 1,42$, $p \leq 0,036$). В среднем, все самцы и самки контрольной линии *Hsp67Bc-2* восстанавливали двигательную активность в течение 40 мин после окончания воздействия холода длительностью 2 и 4 ч и в течение 80 мин после 12-ч пребывания при 0 °С, причём самки восстанавливались немного медленнее самцов.

Таким образом, мухи с делецией гена *Hsp67Bc* восстанавливались после холодовой комы дольше, чем контрольные, с запаздыванием на 5–15 мин.

3.4.2. Выживаемость мух на различных стадиях развития после воздействия холода

Эксперименты по изучению восстановления взрослых 4-дневных *D. melanogaster* после холодовой комы при 0 °С выявили сниженную сопротивляемость холоду нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух. Поэтому далее нами была оценена выживаемость мух мутантной линии *Hsp67Bc-0* и контрольной линии *Hsp67Bc-2* на различных стадиях развития после воздействия пониженной температуры (0 °С). Кроме 4-дневных имаго нами были выбраны стадии личинок и куколок, исследовавшиеся в экспериментах по изучению воздействия повышенной температуры – блуждающие личинки третьего возраста, белые предкуколки, 12- и 48-ч куколки. Длительность температурной обработки, так же, как и в эксперименте по измерению скорости восстановления после холодовой комы, составляла 2, 4 или 12 ч.

После окончания 2-, 4- или 12-ч воздействия пониженной температуры мухи были возвращены в нормальные условия (24–25 °С) для восстановления и, в случае личинок и куколок, продолжения развития. Затем была подсчитана доля выживших индивидов – отношение числа имаго к изначальному количеству участвующих в эксперименте животных в случае личинок и куколок и отношение числа выживших взрослых мух через 48 ч после окончания теплового воздействия к изначальному их

количеству в случае имаго. Результаты эксперимента представлены на рисунке 18, А. Выживаемость личинок и куколок как контрольной, так и нуль-аллельной линий снижалась по мере увеличения длительности холодового воздействия, тогда как выживаемость взрослых мух не зависела от длительности температурного воздействия, но зависела от пола. Через 48 ч после окончания воздействия холода она составляла не менее 98% у самцов обеих линий, тогда как выживаемость самок была ниже и в 1,6–3 раза отличалась между контрольной и мутантной линиями. Процент выживших самок варьировал между $74,1 \pm 5,0\%$ (2 ч при 0 °С) и $84,8 \pm 3,8\%$ (4 ч при 0 °С) в линии *Hsp67Bc-2* и между лишь $27,9 \pm 1,1\%$ (4 ч при 0 °С) и $45,9 \pm 5,9\%$ (12 ч при 0 °С) в мутантной линии *Hsp67Bc-0* ($\chi^2 \geq 49,80$, $df = 1$, $p < 0,001$ для всех групп). Вызванная температурным стрессом гибель взрослых мух происходила в течение 48 ч после окончания воздействия пониженной температуры; по окончании этого периода гибели животных не наблюдалось.

Выживаемость личинок и куколок до стадии имаго после воздействия холода статистически достоверно отличалась лишь в случае белых предкуколок после 4 ч воздействия холода ($\chi^2 = 7,00$, $df = 1$, $p = 0,008$). При этом, в отличие от взрослых мух, нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* личинки и куколки имели тенденцию к увеличенной выживаемости (Рисунок 18, А). После 2-ч холодового стресса их выживаемость до стадии имаго принимала значения между таковыми самцов и контрольных самок – от $78,5 \pm 5,8\%$ у личинок контрольной линии до $95,0 \pm 2,0\%$ у 48-ч куколок контрольной линии (Рисунок 18, А). После воздействия холода средней длительности (4 ч) выживаемость личинок и куколок немного снизилась (она варьировала между $63,4 \pm 3,5\%$ у 12-ч куколок контрольной линии и $90,4 \pm 2,5\%$ у белых предкуколок мутантной линии). После 12 ч холодового воздействия выживаемость личинок и куколок до взрослой стадии резко сократилась по сравнению с кратковременным и 4-ч воздействием (Рисунок 18, А). Так, она варьировала между $8,8 \pm 3,5\%$ (контрольные белые предкуколки) и $25,5 \pm 7,4\%$ (мутантные белые предкуколки).

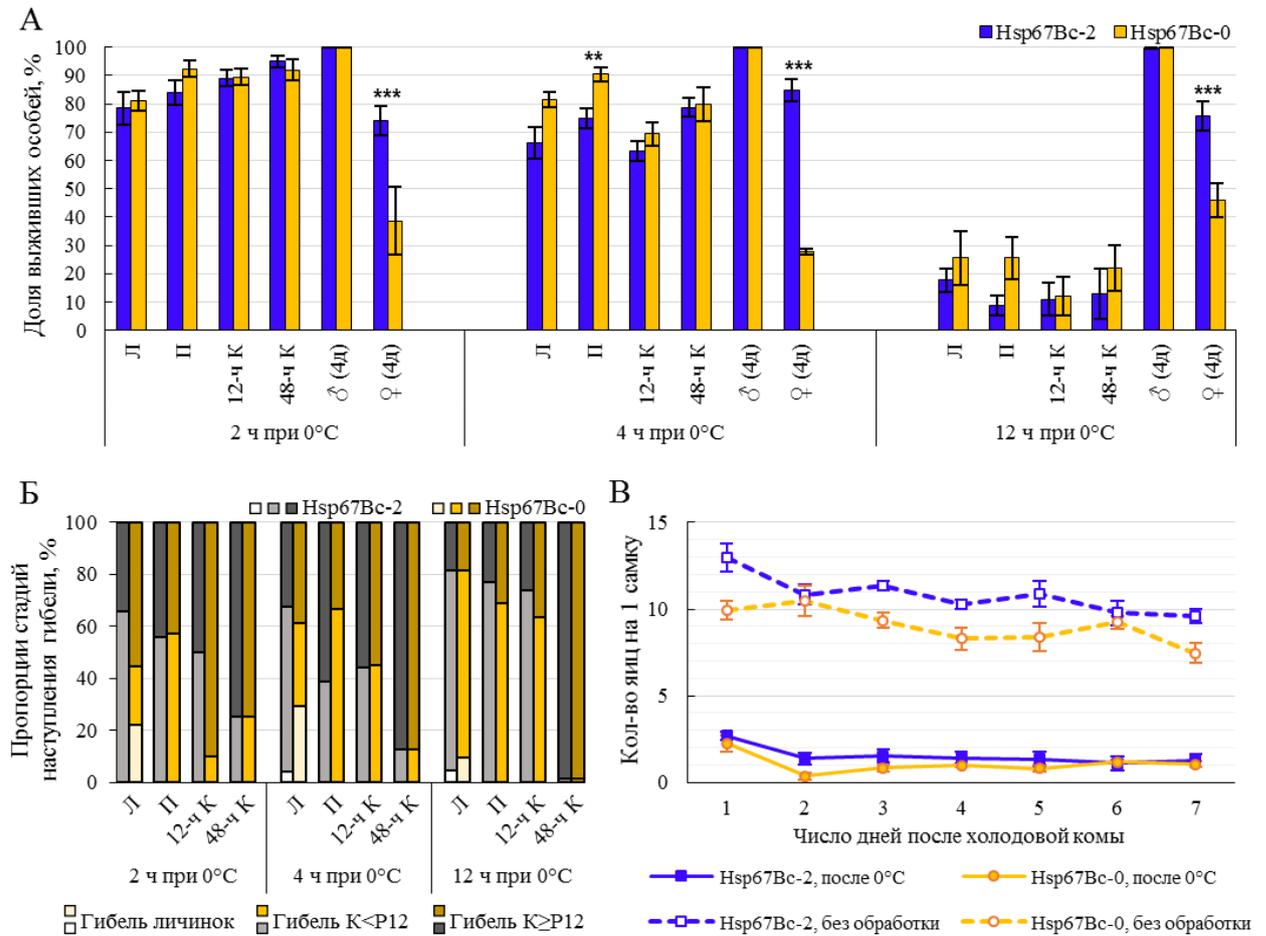


Рисунок 18. Выживаемость и плодовитость *D. melanogaster* контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий после содержания при пониженной температуре (0 °C) разной длительности. А – выживаемость (%) блуждающих личинок третьего возраста (Л), белых предкуколок (П), 12-ч куколок (12-ч К) и 48-ч куколок (48-ч К) до стадии имаго, а также выживаемость взрослых 4-дневных самок (♀(4д)) и самцов (♂(4д)) через 48 ч после воздействия холода различной длительности (2, 4 или 12 ч). Б – процентные соотношения стадий развития, на которых погибли личинки и куколки после обработки холодом длительностью 2, 4 и 12 ч; левые столбцы (в оттенках серого) – контрольная линия, правые столбцы (в оттенках золотого) – мутантная линия; белые и светло-золотые сегменты столбцов отражают долю мух, погибших на стадии личинки; серые и золотые сегменты – долю мух, погибших на стадии куколки ранее P12; темно-серые и темно-золотые – долю мух, погибших на стадии куколки, равной или позднее P12. В – плодовитость самок (среднее количество отложенных яиц на самку) при 24–25 °C после 12-ч холодовой комы (сплошные линии на графике) и при постоянном содержании в нормальных условиях (24–25 °C, без обработки, пунктирные линии), измерявшаяся каждый день в течение недели после окончания воздействия пониженной температуры. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего. **Достоверные различия с $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Для личинок регистрировалась выживаемость не только до стадии имаго, но и до стадии куколки. Этот показатель значительно отличался между контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линиями после 2 и 4 ч пребывания на холоде. После 2-ч холодого воздействия она составила 100% в контрольной линии *Hsp67Bc-2* и $96,4 \pm 2,1\%$ в мутантной ($\chi^2 = 5,95$, $df = 1$, $p = 0,015$); после 4 ч при 0°C выживаемость до стадии куколки была $98,4 \pm 1,1\%$ у личинок *Hsp67Bc-2* и $95,9 \pm 1,3\%$ у личинок *Hsp67Bc-0* ($\chi^2 = 6,39$, $df = 1$, $p = 0,011$). После 12-ч воздействия пониженной температуры достоверных различий между линиями не наблюдалось.

Стоит отметить, что гибель личинок и куколок наступала не только во время обработки холодом и сразу после его окончания, но и через некоторое время после окончания холодого стресса. На рисунке 18, Б показаны приблизительные стадии (блуждающая личинка третьего возраста, куколка $<P12$ (Bainbridge, Bownes, 1981) или $\geq P12$), на которых погибали личинки и куколки после окончания холодого стресса. Гибель животных была отложенной настолько, что, в зависимости от стадии, на которой происходило холодое воздействие, от 20% (личинки линии *Hsp67Bc-0* после 12-ч холодого воздействия) до почти 100% (48-ч куколки обеих линий после 12 ч при 0°C) индивидов развивались как минимум до стадии P12, когда взрослое насекомое почти полностью сформировано. Наблюдались значительные различия в достижении личинками перед гибелью стадии куколки между контрольной и мутантной линиями после 2-ч и 4-ч воздействия холода. Так, почти все личинки контрольной линии развивались до куколки, вне зависимости от длительности воздействия холода, тогда как до 29% личинок мутантной линии *Hsp67Bc-0* погибали до окукливания (Рисунок 18, Б).

Таким образом, после воздействия холода (0°C) нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* личинки *D. melanogaster* имели значительно сниженную по сравнению с контролем выживаемость до стадии куколки. Делеция *Hsp67Bc* также приводила к снижению выживаемости взрослых самок мух после даже кратковременного (2 ч) воздействия пониженной температуры (0°C). В то же время, отсутствие гена *Hsp67Bc* не оказало негативного влияния на выживаемость куколок и самцов дрозофил после воздействия холода.

3.4.3. Влияние пониженной температуры на плодовитость *D. melanogaster*

В нормальных условиях (24–25 °С, без обработки холодом) измерявшаяся каждый день в течение недели плодовитость нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* самок возраста 4–11 дней была ниже, чем у контрольной линии на 16,6% (в среднем за неделю измерений – $9,0 \pm 0,3$ яйца на самку линии *Hsp67Bc-0* и $10,8 \pm 0,3$ яйца на самку линии *Hsp67Bc-2*, $p < 0,001$). После 12-ч холодовой комы при 0 °С плодовитость самок обеих линий значительно снизилась (Рисунок 18, В). Так, среднее количество яиц, отложенных самками контрольной линии *Hsp67Bc-2* за 7-дневный период после прекращения воздействия холода, было приблизительно в семь раз меньше, чем в нормальных условиях, и составило $1,5 \pm 0,1$ яйца на самку в сутки. У мух с делецией этот показатель снизился ещё сильнее – более чем в восемь раз до $1,1 \pm 0,2$ яйца на самку в сутки, составив 69,5% от значения контрольной линии в тех же условиях. Таким образом, воздействие холода приводит к более значительному снижению плодовитости самок мух с делецией в гене *Hsp67Bc*, чем контрольных.

3.4.4. Уровни экспрессии генов некоторых белков теплового шока, *Frost* и *starvin* *D. melanogaster* на стадиях личинки, куколки и имаго во время холодового стресса и восстановления после него

Наличие продукта гена *Hsp67Bc* влияло на выживаемость и восстановление мух после воздействия холода в разной степени, в зависимости от стадии развития. В связи с этим нами было принято решение измерить экспрессию этого и некоторых других генов, продукты которых, в соответствии с литературными данными, могут быть вовлечены в обеспечение устойчивости мух к холоду, с целью найти возможных компенсаторов его функции.

Образцы РНК были выделены из мух контрольной и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линий через 1 ч после помещения в условия 0 °С, через 12 ч (окончание холодового стресса, 0 мин восстановления), а также через 25 мин, 40 мин, 90 мин и через 3 ч после прекращения воздействия холода. Временные промежутки во время фазы восстановления были выбраны на основании данных по восстановлению двигательной активности мух после холодовой комы (Рисунок 17, Д, Е). Так, приблизительно через 25 мин после прекращения воздействия холода первые

дрозофилы вставали на ноги; через 40 мин наблюдались наибольшие различия в проценте вышедших из состояния комы мух; через 90 мин все контрольные и большинство мутантных мух восстанавливались после холодовой комы; через 3 ч все дрозиды возвращались к нормальному поведению. Также были подготовлены образцы РНК мух, не подвергавшихся температурному воздействию и содержащиеся в условиях комнатной температуры (24–25 °С).

Сначала была измерена динамика уровня РНК *Hsp67Bc* у взрослых 4-дневных *D. melanogaster* контрольной линии *Hsp67Bc-2* во время воздействия холода (0 °С, 12 ч) и в течение периода восстановления после их переноса с 0 °С в условия комнатной температуры. Количественная ПЦР показала, что во время пребывания *D. melanogaster* в состоянии холодовой комы уровень экспрессии гена *Hsp67Bc* достоверно не отличался от такового в нормальных условиях (Рисунок 19). При этом экспрессия этого гена у самок была в 2,5 раза ниже, чем у самцов ($p = 0,005$). Во время восстановления после воздействия холода экспрессия *Hsp67Bc* значительно возросла у самцов уже через 25 мин, а у самок – через 40 мин пребывания при комнатной температуре. Максимум и у самцов, и у самок уровень РНК *Hsp67Bc* достиг к 90 мин восстановления, что соответствует времени восстановления 100% мух контрольной линии *Hsp67Bc-2* после холодовой комы (Рисунок 19). Так, у самцов он возрос в 2,5 раза ($p = 0,037$), а у самок – в 6,1 раза ($p = 0,011$). Несмотря на то, что через 90 мин после окончания воздействия холода экспрессия *Hsp67Bc* у самцов и самок была схожей, повышение её уровня у самок происходило с запозданием. Так, у самок уровень РНК возрастал экспоненциально (как показывают значения через 25, 40 и 90 мин после переноса мух в нормальные условия), в то время как у самцов уровень РНК был близок к максимальному уже через 25 мин после окончания холодового стресса (Рисунок 19). Через 3 ч после окончания воздействия холода уровень РНК *Hsp67Bc* понизился на 25–30% по сравнению с максимальным, что соответствовало у самцов 2-, а у самок – 4-кратному уровню РНК в нормальных условиях без холодовой обработки.

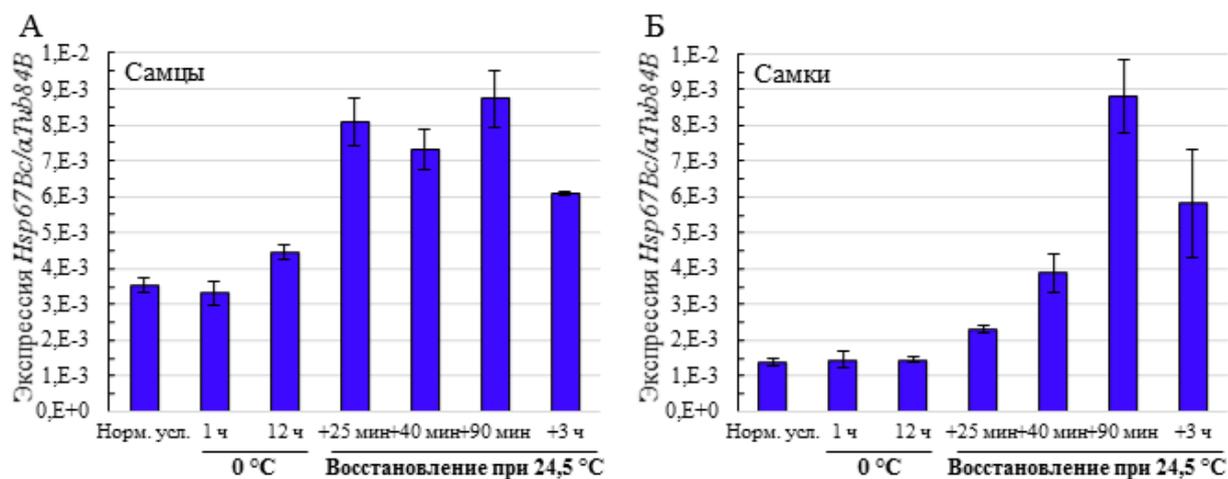


Рисунок 19. Динамика экспрессии гена *Hsp67Bc* у самцов (А) и самок (Б) *D. melanogaster* контрольной линии *Hsp67Bc-2* в нормальных условиях (24–25 °C, Норм. усл.), а также в течение (через 1 ч и 12 ч после помещения в условия 0 °C) и во время восстановления (+25 мин, +40 мин, +90 мин и +3 ч) после 12-ч холодого воздействия (0 °C). Уровни экспрессии *Hsp67Bc* нормированы на уровни экспрессии гена *αTub84B*.

Далее был измерен уровень экспрессии *Hsp67Bc* у блуждающих личинок третьего возраста и белых предкуколок, так как именно на этих стадиях развития наблюдались значительные различия в устойчивости дрозофил к холоду (Рисунок 18, А). Для измерения уровня экспрессии *Hsp67Bc* у личинок и белых предкуколок, а также других генов на всех исследованных стадиях развития *D. melanogaster* были взяты не все временные точки, на которых был измерен уровень *Hsp67Bc* у имаго. Так, были выбраны 0 мин восстановления (для выявления раннего ответа на прекращение воздействия холода) и 90 мин восстановления после холодого воздействия (время максимальной экспрессии *Hsp67Bc* у имаго), а также отсутствие температурного воздействия (нормальные условия, 24–25 °C). Длительность холодого воздействия в случае личинок и предкуколок была 4 ч, так как продолжительное воздействие холода приводило к гибели более 70% личинок и предкуколок и было сочтено слишком сильным. В то же время, 12-ч холодая кома имела такие же последствия для выживаемости взрослых мух, как и 2- и 4-ч стресс, но давала возможность детально измерить изменения в экспрессии *Hsp67Bc* непосредственно после выхода из комы, так как восстановление после холодной комы длилось дольше после 12 ч пребывания на льду, чем после 2 и 4 ч.

В контрольной линии экспрессия *Hsp67Bc* у личинок и предкуколок была выше, чем у имаго, во всех исследованных образцах. Она была максимальной у

белых предкуколок (в 2,8 раза выше, чем у личинок) и значительно снижалась к стадии имаго (в 60 раз у самцов и в 150 раз у самок), что соответствует данным FlyBase (<https://flybase.org>). После холодового стресса, однако, уровень экспрессии *Hsp67Bc* не изменился ни у личинок, ни у предкуколок (Рисунок 20), тогда как он возрастал в 2,5–6,1 раза у взрослых мух. Это может свидетельствовать о том, что, в отличие от имаго, у личинок и куколок продукт гена *Hsp67Bc* выполняет не связанную с защитой от холодового стресса функцию; поэтому его отсутствие не играет важной роли в выживаемости дрозофил после воздействия пониженной температуры на этих стадиях развития, что подтверждается лишь небольшими различиями в выживаемости личинок и куколок контрольной и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линий (Рисунок 18, А). В связи с этим нами был осуществлён поиск возможных компенсаторов функций *Hsp67Bc* среди продуктов генов, которые могут быть вовлечены в формировании защиты от холодового стресса.

Так как впадение в холодую кому вызвано деполяризацией мембран клеток ЦНС и мышц (Andersen, Overgaard, 2019), было принято решение измерить экспрессию не только генов, для продуктов которых ранее было показано участие в ответе на холод, но и генов *HSP*, экспрессирующихся в мышцах и ЦНС *D. melanogaster*. Дополнительно к *Hsp67Bc* из генов *HSP* мы выбрали *Hsp70*, а также четыре гена, кодирующих белки из семейства sHsp – *Hsp22*, *Hsp23*, *lethal (2) essential for life (l(2)efl)* и *Hsp67Ba*. *Hsp70* – важный шаперон, экспрессия гена которого у *Drosophila* возрастает при тепловом и холодовом стрессе (Goto, Kimura, 1998; Parsell et al., 1993). Гены *Hsp22* и *Hsp23* были выбраны, так как, согласно литературным данным, их продукты участвуют в обеспечении устойчивости к холоду (Colinet et al., 2010a). Экспрессия *l(2)efl* высока в мышцах личинок и имаго дрозофил, и повышается в ответ на воздействие холода (<https://flybase.org>). Ген *Hsp67Ba* экспрессируется в ЦНС личинок и куколок *D. melanogaster* и в мышцах личинок мух (<https://flybase.org>). Помимо генов *HSP*, в эксперименте была измерена экспрессия генов *starvin (stv)* и *Frost (Fst)*. Белок *Stv* взаимодействует с *Hsp67Bc*, и экспрессия *stv* повышается в ответ на воздействие холода (Carra et al., 2010; Colinet, Hoffmann, 2010). Экспрессия гена *Fst* также усиливается во время холодового стресса (Colinet et al., 2010c). Уровни экспрессии выбранных генов были измерены в тех же образцах

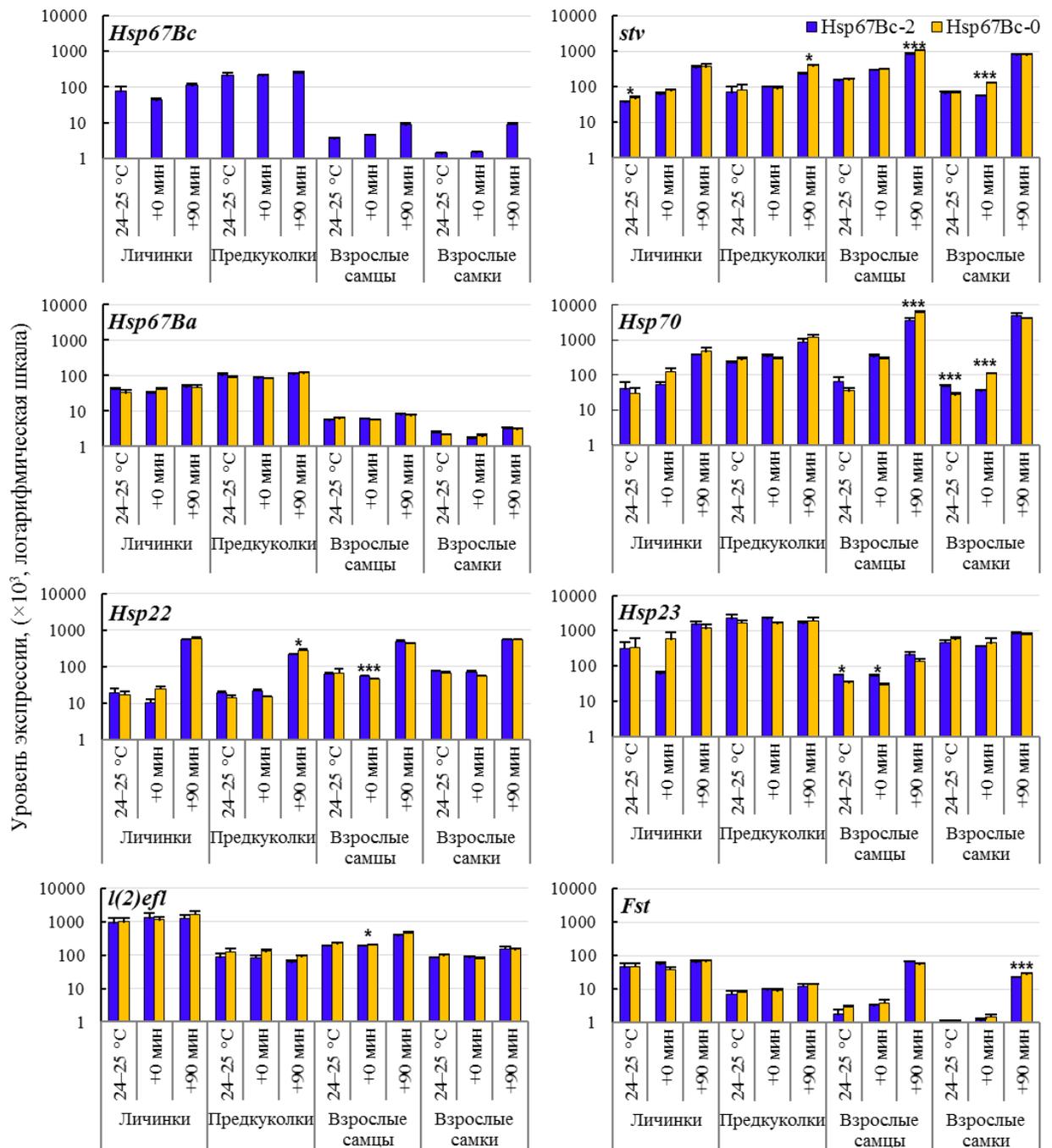


Рисунок 20. Уровни экспрессии генов *Hsp67Bc*, *stv*, *Fst*, а также избранных генов *HSP* у *D. melanogaster* контрольной (*Hsp67Bc-2*) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) линий на стадиях развития блуждающей личинки третьего возраста (Л), белой предкуколки (П) и имаго в нормальных условиях (24–25 °C) и во время восстановления после холодового стресса (0 °C): непосредственно (+0 мин.) и через 90 мин (+90 мин) после окончания воздействия холода. Уровни экспрессии генов представлены как средние отношения к уровням экспрессии гена $\alpha Tub84B \pm$ стандартная ошибка среднего $\times 10^3$ на логарифмической шкале. *Достоверные различия с $0,01 < p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

РНК *D. melanogaster*, что и уровень *Hsp67Bc* (личинки третьего возраста, белые предкуколки и 4-дневные самцы и самки) в условиях комнатной температуры (24–25 °С, без обработки), непосредственно после пребывания при 0 °С (0 мин восстановления) и через 90 мин после окончания воздействия холода.

В нормальных условиях уровни экспрессии большинства изученных генов не отличались между контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линиями на всех стадиях развития мух. Исключениями были *stv* (экспрессия повышена в 1,33 раза у мутантных личинок *Hsp67Bc-0*, $p = 0,020$), *Hsp70* (экспрессия понижена в 1,7 раза у взрослых самок *Hsp67Bc-0*, $p < 0,001$) и *Hsp23* (экспрессия понижена в 1,6 раза у взрослых самцов *Hsp67Bc-0*, $p = 0,017$) (Таблица 4). Заметные, но статистически не значимые различия в экспрессии наблюдались и для некоторых других генов.

Как и в случае с уровнем экспрессии *Hsp67Bc* у имаго (Рисунок 19), межполовые различия наблюдались также в экспрессии некоторых других исследованных генов. К примеру, и в контрольной, и в мутантной линиях уровни РНК *stv*, *l(2)efl*, *Hsp67Ba* и *Fst* были достоверно выше или имели тенденцию к повышению у самцов по сравнению с самками. У самок лишь экспрессия гена *Hsp23* была значительно повышена по сравнению с самцами (в 7,9 раз выше в контрольной и в 16,4 раза выше в мутантной линии, $p < 0,001$). Эти тенденции в основном сохранялись после воздействия холода (Рисунок 20). Непосредственно после окончания холодого стресса экспрессия гена *Hsp70* была в 10 раз выше у контрольных самцов по сравнению с самками ($p < 0,001$), подобная тенденция наблюдалась в линии с делецией *Hsp67Bc* (различия в 2,7 раза, $p = 0,062$). Можно предположить, что наблюдавшиеся нами межполовые различия в уровнях экспрессии генов стрессового ответа после воздействия холода являются причиной более длительного по сравнению с самцами восстановления самок обеих линий после холодовой комы.

Так же, как в случае с уровнем экспрессии *Hsp67Bc*, экспрессия большинства исследованных генов повысилась через 90 мин после окончания воздействия холода (Рисунок 20 и Таблица 5). При этом у мутантных самок уровни экспрессии *stv* и *Hsp70* были, соответственно, в 2,4 и в 3,1 раза выше, чем у контрольных, непосредственно после окончания холодого воздействия ($p < 0,001$). Тем не менее,

Таблица 4. Уровни тотальной РНК исследованных генов у *D. melanogaster* мутантной (*Hsp67Bc-0*) и контрольной (*Hsp67Bc-2*) линий на различных стадиях развития в нормальных условиях (24,5 °С) относительно *αTub84B*.

| ×10 ⁻² | Личинки 3-го возраста | | | Белые предкуколки | | | Взрослые самцы | | | Взрослые самки | | |
|-------------------|-----------------------|------------------|-------|-------------------|------------------|-------|------------------|------------------|-------|------------------|------------------|--------|
| | <i>Hsp67Bc-2</i> | <i>Hsp67Bc-0</i> | 0 / 2 | <i>Hsp67Bc-2</i> | <i>Hsp67Bc-0</i> | 0 / 2 | <i>Hsp67Bc-2</i> | <i>Hsp67Bc-0</i> | 0 / 2 | <i>Hsp67Bc-2</i> | <i>Hsp67Bc-0</i> | 0 / 2 |
| <i>Hsp67Bc</i> | 7,57±2,70 | - | - | 21,04±3,35 | - | - | 0,35±0,02 | - | - | 0,14±0,01 | - | - |
| <i>Stv</i> | 3,67±0,14 | 4,87±0,46 | 1,33* | 7,13±2,76 | 8,42±2,93 | 1,18 | 14,98±1,18 | 16,13±1,05 | 1,08 | 6,68±0,87 | 6,81±0,50 | 1,02 |
| <i>Hsp67Ba</i> | 4,09±0,52 | 3,34±0,51 | 0,82 | 10,32±1,09 | 8,88±0,59 | 0,86 | 0,56±0,02 | 0,62±0,05 | 1,11 | 0,25±0,02 | 0,22±0,01 | 0,88 |
| <i>Hsp70</i> | 3,99±2,15 | 3,00±1,17 | 0,75 | 22,67±2,13 | 27,91±2,49 | 1,23 | 6,55±2,12 | 3,57±0,58 | 0,55 | 4,75±0,47 | 2,75±0,28 | 0,58** |
| <i>Hsp22</i> | 1,88±0,66 | 1,66±0,43 | 0,89 | 1,95±0,22 | 1,45±0,25 | 0,74 | 6,43±0,25 | 6,87±1,79 | 1,07 | 7,38±0,54 | 6,76±0,50 | 0,92 |
| <i>Hsp23</i> | 31,19±14,97 | 33,42±27,63 | 1,07 | 222,58±65,64 | 168,52±27,24 | 0,76 | 5,65±0,14 | 3,44±0,08 | 0,61* | 46,02±7,61 | 57,35±7,44 | 1,25 |
| <i>l(2)efl</i> | 92,54±35,85 | 99,64±27,24 | 1,08 | 8,69±2,34 | 12,70±3,19 | 1,46 | 18,64±0,92 | 22,52±1,31 | 1,21 | 8,66±0,11 | 9,73±0,57 | 1,12 |
| <i>Fst</i> | 4,55±1,13 | 4,69±1,05 | 1,03 | 0,71±0,17 | 0,81±0,06 | 1,13 | 0,18±0,06 | 0,29±0,03 | 1,62 | 0,11±0,00 | 0,11±0,01 | 0,99 |

Во всех ячейках, кроме «0 / 2» результаты представлены как (среднее ± стандартная ошибка среднего)×10². В колонках «0 / 2» представлены отношения уровня РНК мух с делецией *Hsp67Bc* к уровню контрольных мух. * Различия с уровнем достоверности 0,01 < p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,001.

Таблица 5. Изменения экспрессии исследованных генов во время восстановления после воздействия холода (через 0 мин и 90 мин после окончания пребывания при 0 °С) у нуль-аллельных по *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) и контрольных (*Hsp67Bc-2*) *D. melanogaster* на разных стадиях развития.

| | | Личинки 3-го возраста | | Белые предкуколки | | Взрослые самцы | | Взрослые самки | |
|------------------|----------------|-----------------------|---------|-------------------|---------|----------------|----------|----------------|----------|
| | | +0 мин | +90 мин | +0 мин | +90 мин | +0 мин | +90 мин | +0 мин | +90 мин |
| Hsp67Bc-2 | <i>Hsp67Bc</i> | 0,67 | 1,75 | 1,00 | 1,18 | 1,26** | 2,45* | 1,04 | 6,09* |
| | <i>Stv</i> | 1,68 | 9,29** | 1,60 | 3,63* | 1,97** | 5,49** | 0,85 | 11,60* |
| | <i>Hsp67Ba</i> | 0,78 | 1,19 | 0,84 | 1,10 | 1,06 | 1,42* | 0,68* | 1,30 |
| | <i>Hsp70</i> | 1,80 | 12,68** | 1,45 | 3,51 | 6,11** | 63,90 | 0,74 | 98,85* |
| | <i>Hsp22</i> | 0,67 | 35,24** | 1,12 | 11,65* | 0,86* | 7,41* | 0,94 | 7,06** |
| | <i>Hsp23</i> | 0,35 | 8,41** | 1,08 | 0,78 | 0,91 | 3,56* | 0,82* | 1,81** |
| | <i>l(2)efl</i> | 1,50 | 1,51 | 1,00 | 0,76 | 1,00 | 2,07 | 0,99 | 1,77** |
| | <i>Fst</i> | 1,42 | 1,87 | 1,48 | 1,91 | 1,91* | 36,40* | 1,01 | 20,50** |
| Hsp67Bc-0 | <i>Hsp67Bc</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Stv</i> | 1,63** | 7,49* | 1,20 | 5,14 | 1,96** | 6,79** | 1,96* | 11,37** |
| | <i>Hsp67Ba</i> | 1,25 | 1,42 | 0,93 | 1,36* | 0,93 | 1,24 | 0,89 | 1,40** |
| | <i>Hsp70</i> | 4,28* | 16,50* | 1,04 | 4,13* | 8,36** | 170,09** | 4,02** | 147,74** |
| | <i>Hsp22</i> | 1,50 | 36,20** | 1,04 | 20,17 | 0,74 | 7,16** | 0,82 | 7,96* |
| | <i>Hsp23</i> | 2,48 | 7,65 | 0,99 | 1,14 | 0,84 | 3,96** | 0,68 | 1,38* |
| | <i>l(2)efl</i> | 1,24 | 1,73 | 1,09 | 0,78 | 0,90 | 2,00** | 0,79 | 1,54** |
| | <i>Fst</i> | 0,83 | 1,55 | 1,08 | 1,91 | 1,15 | 18,22** | 1,31* | 24,66* |

Данные представляют собой средние значения, нормированные на уровни РНК в нормальных условиях (24,5°C, без воздействия холода). *Различия экспрессии по сравнению с нормальными условиями с уровнем достоверности $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

через 90 мин после окончания стресса уровень экспрессии *stv* у контрольных самок выровнялся по сравнению с таковым у мутантных.

Через 90 мин после окончания воздействия холода наблюдалась максимальная экспрессия всех изученных генов (Рисунок 20 и Таблица 5). У взрослых насекомых сильнее других возросла экспрессия генов *Hsp70* и *Fst*, у личинок – *Hsp22*. Среди всех генов наиболее значительно выросла экспрессия *Hsp70*: в 64 раза у контрольных самцов ($p = 0,065$), в 170 раз у самцов линии *Hsp67Bc-0* ($p < 0,001$), в 99 раз у самок *Hsp67Bc-2* ($p = 0,032$) и в 148 раз у самок *Hsp67Bc-0* ($p < 0,001$). Многократное усиление экспрессии *Hsp70* хорошо согласуется с литературными данными (Königer, Grath, 2018; MacMillan et al., 2016), а его более выраженная

экспрессия на фоне делеции *Hsp67Bc* позволяет нам предположить его потенциальную компенсаторную роль в ответе на холодовой стресс при отсутствии *Hsp67Bc*. Стоит отметить, что воздействие холода по-разному повлияло на экспрессию большинства генов, в зависимости от стадии развития мух (Рисунок 20 и Таблица 5).

Статистически значимые различия были обнаружены в уровнях РНК *stv*, *Hsp70*, *Hsp22* и *Fst* контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий через 90 мин восстановления после окончания воздействия холода – экспрессия всех этих генов была выше у мух мутантной линии (Рисунок 20). Содержание РНК *Hsp70* было выше в 1,7 раза у взрослых самцов ($p < 0,001$), *Fst* – в 1,2 раза выше у взрослых самок ($p < 0,001$), *stv* – в 1,3 раза у взрослых самцов ($p < 0,001$) и в 1,7 раза у предкуколок ($p = 0,024$), а *Hsp22* – в 1,3 раза выше у предкуколок ($p = 0,043$). На основании этих результатов можно предположить, что повышение экспрессии некоторых индуцируемых холодом генов у мух мутантной линии является частью механизма компенсации функций продуктов отсутствующего гена *Hsp67Bc*. Возможно, именно этот компенсаторный механизм позволяет нуль-аллельным по гену *Hsp67Bc* особям выживать после холодовой комы.

3.5. Влияние делеции гена *Hsp67Bc* на степень дегенерации глаз мух, экспрессирующих мутантный *ATXN3*

Из литературных данных известно, что повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* в культуре клеток S2 *Drosophila* и *in vivo* у *D. melanogaster* снижает степень агрегации белков с удлинённым полиглутаминовым трактом, являющейся причиной развития нейродегенеративных заболеваний (Carra et al., 2010; Vos et al., 2016). Нокаунт же *Hsp67Bc* с помощью РНК-интерференции – наоборот – повышает агрегацию таких белков (Vos et al., 2016). Известной моделью для изучения агрегации белков с удлинённым полиглутаминовым трактом являются глаза *D. melanogaster*, в которых произведён запуск экспрессии генов, кодирующих такие белки (Carra et al., 2010; Vos et al., 2016). Удобной эта модель является по следующим причинам. Во-первых, функционирование глаз не является необходимым условием для выживания дрозофил в лабораторных условиях, и локальный синтез «токсичных» белков в этих органах не приводит к гибели организма (Xu et al., 2015). Во-вторых, заболевания,

вызванные агрегацией белков с полиглутаминовыми трактами, поражают в первую очередь нейроны, а глаза мух относятся к периферической нервной системе (Xu et al., 2015). В-третьих, о степени агрегации белков легко судить по наличию и выраженности нарушений морфологии глаз мух (Marsh, Thompson, 2006; Xu et al., 2015; Vos et al., 2016).

С целью изучения влияния делеции гена *Hsp67Bc* на агрегацию белков с удлинённым полиглутаминовым трактом мы провели подобный эксперимент. Мы индуцировали экспрессию гена *ATXN3* человека с 27 (нормальный ген) и 78 повторами CAG (мутантный ген, являющийся причиной развития болезни Мачадо – Джозефа) в глазных имагинальных дисках дрозофил контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий с помощью системы GAL4-UAS. Экспрессия нормального и мутантного аллелей *ATXN3* человека, расположенных под промотором *UAS*, запускалась продуктом гена *GAL4*, расположенного под промотором гена *glass* (драйвер *GMR-GAL4*). Этот ген транскрибируется в глазо-антеннальном имагинальном диске у личинок третьего возраста и в глазах и некоторых нейронах у имаго, что позволяет инициировать экспрессию *ATXN3* в глазах мух (<https://flybase.org>). Для проведения экспериментов мы получили *D. melanogaster* со следующими комбинациями генов:

1. нормальный ген *ATXN3* под промотором *UAS* и ген *Hsp67Bc* дикого типа (генотип *GMR-GAL4 / UAS-hATXN3.fl-Q27.myc; Sb / Tb*);
2. нормальный ген *ATXN3* и делеция в гене *Hsp67Bc* (генотип *GMR-GAL4 / UAS-hATXN3.fl-Q27.myc; Hsp67Bc-0 / Hsp67Bc-0*);
3. мутантный *ATXN3* и ген *Hsp67Bc* дикого типа (*GMR-GAL4 / UAS-hATXN3.tr-Q78; Sb / Tb*);
4. мутантный *ATXN3* и делеция в гене *Hsp67Bc* (*GMR-GAL4 / UAS-hATXN3.tr-Q78; Hsp67Bc-0 / Hsp67Bc-0*).

При экспрессии *ATXN3* человека с 27 повторами CAG на фоне нормального гена *Hsp67Bc* или на фоне делеции *Hsp67Bc* нарушений в морфологии или пигментации глаз у имаго не наблюдалось (Рисунок 21, А). Эктопическая экспрессия мутантного аллеля *ATXN3* с 78 повторами CAG приводила к характерному нарушению морфологии и пигментации глаз (Рисунок 21, А). Подобные нарушения характерны для нейродегенеративных процессов (Carra et al., 2010; Crippa et al., 2016;

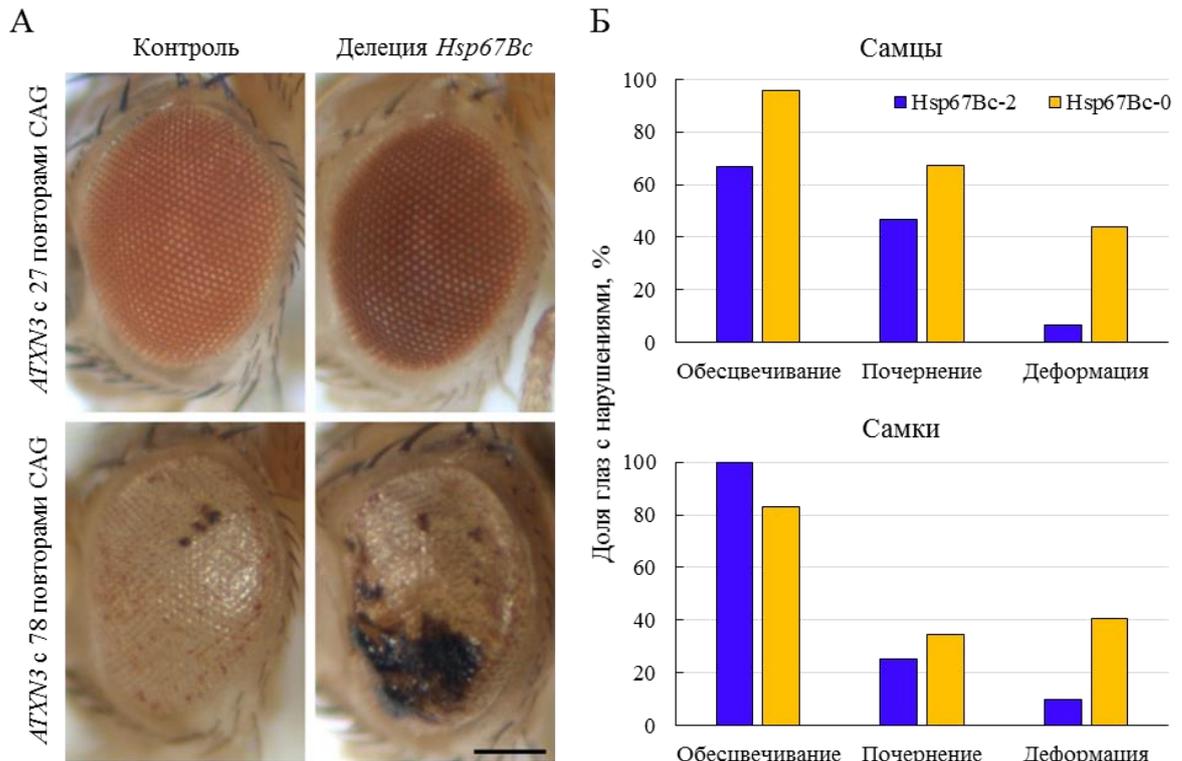


Рисунок 21. Нарушения морфологии глаз *D. melanogaster* контрольной (*Hsp67Bc*-2) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc*-0) линий, вызванные эктопической экспрессией мутантного гена *ATXN3* человека. А – глаза контрольных и нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух, экспрессирующих ген *ATXN3* человека с 27 (нормальный) или 78 (мутантный) повторами CAG; масштабный отрезок соответствует 500 мкм. Б – частоты встречаемости нарушений морфологии глаз.

Vos et al., 2016). Как и предполагалось, у мух с эктопической экспрессией *ATXN3* с 78 повторами CAG на фоне делеции *Hsp67Bc* наблюдалась более выраженная дегенерация глаз по сравнению с контрольной линией (Рисунок 21). В 67,0% случаев у самцов и 34,6% – у самок мух с делецией *Hsp67Bc* глаза имели почерневшие участки, тогда как у мух с нормальным геном *Hsp67Bc* этот показатель составил 46,7% и 25,4% для самцов и самок, соответственно (Рисунок 21, Б). Весьма значительно *D. melanogaster* с делецией *Hsp67Bc* и геном *Hsp67Bc* дикого типа различались в проценте деформированных глаз, имеющих вогнутые участки: у мух с делецией эти показатели составили 44,0% (самцы) и 40,7% (самки), тогда как у мух с геном *Hsp67Bc* дикого типа – 6,7% у самцов и 9,7% у самок (Рисунок 21, Б).

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными (Carra et al., 2010; Vos et al., 2016) и подтверждают, что важной функцией продукта гена *Hsp67Bc* является предотвращение агрегации мутантных белков и, таким образом, участие в поддержании нормального протеостаза в клетках.

3.6. Влияние делеции гена *Hsp67Bc* на макроаутофагию в яичниках и нейронах мозга мух

Известно, что поддержание протеостаза в клетках осуществляется тремя путями – посредством рефолдинга неправильно свёрнутых белков с участием молекулярных шаперонов, в том числе HSP, через протеасомную деградацию повреждённых белков и посредством аутофагии повреждённых и агрегировавших белков (Chen et al., 2011). Основной путь деградации большинства растворимых не поддающихся рефолдингу белков у эукариот включает их убиквитинирование и направление в протеасомы (Chen et al., 2011). Агрегировавшие белки, в том числе мутантные белки, вызывающие нейродегенеративные заболевания, удаляются из цитоплазмы в основном посредством макроаутофагии, так как для деградации с помощью протеасом или шаперон-зависимой аутофагии белкам необходимо быть в растворимой форме (Lamark, Johansen, 2012; Zhang, Calderwood, 2011).

Как было показано ранее на культуре клеток *Drosophila* S2, повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* усиливает интенсивность макроаутофагии (Carga et al., 2010). Посредством макроаутофагии происходит удаление из клеток не только белковых агрегатов, но и бактерий, в том числе широко распространённых среди членистоногих и нематод симбиотических бактерий *Wolbachia* (Deehan et al., 2021; Voronin et al., 2012; Yano et al., 2008). Было показано, что интенсивность макроаутофагии в клетках *D. melanogaster* увеличивается в присутствии бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop (Voronin et al., 2012), а также при голодании, в том числе белковом (Barth et al., 2011).

Для более подробного изучения роли продукта гена *Hsp67Bc* в регуляции процесса макроаутофагии мы исследовали, как его делеция отразится на интенсивности макроаутофагии в яичниках при белковом голодании и в нейронах мозга мух в присутствии симбиотических бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop. В случае, если *Hsp67Bc* играет важную роль в стимуляции макроаутофагии, у нуль-аллельных по гену этого белка *D. melanogaster* ожидалось снижение уровня макроаутофагии по сравнению с контролем в яичниках при белковом голодании, а также увеличение количества бактерий *Wolbachia* в мозге.

3.6.1. Влияние делеции гена *Hsp67Bc* на макроаутофагию в яичниках мух при белковом голодании

Голодание, в том числе белковое, стимулирует макроаутофагию в яичниках мух на двух стадиях оогенеза – в гермари и в среднем оогенезе (Hou et al., 2008; Barth et al., 2011), что приводит далее к замедлению оогенеза и увеличению количества яйцевых камер, элиминирующихся из оогенеза путём апоптоза (Barth et al., 2011). В настоящей работе были изучены яичники контрольных и нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух, содержащихся на стандартном и безбелковом корме в течение 5 (Рисунок 22) и 15 (Рисунок 23) дней. Для выявления макроаутофагии мы использовали окраску с помощью LysoTracker (LTR), который маркирует органеллы с кислым содержимым – лизосомы и аутолизосомы (Scott et al., 2004; Klionsky et al., 2007). В исследованных яичниках было посчитано количество LTR-положительных (LTR⁺) гермариов (Рисунок 24).

По сравнению с контрольной линией, в яичниках нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* самок, содержащихся как на стандартном, так и на безбелковом корме, наблюдалось большее количество LTR⁺ гермариов. В раннем оогенезе у мух с делецией *Hsp67Bc* наблюдалось увеличение количества LTR⁺ гермариов в 1,2–1,5 раза (Рисунок 24). Так, у 5-дневных мутантных мух линии *Hsp67Bc-0*, содержащихся на стандартном корме, 32,1% гермариов были LTR⁺, тогда как у мух контрольной линии их число составило 21,1% ($p = 0,066$). В яичниках 5-дневных мух линии *Hsp67Bc-0*, содержащихся на безбелковом корме, доля LTR⁺ гермариов достигла 77,9%, в то время как в яичниках мух контрольной линии *Hsp67Bc-2* их доля составила 59,3% ($p = 0,045$). У 15-дневных мух линии *Hsp67Bc-0*, содержащихся на стандартном корме, доля LTR⁺ гермариов составила 31,1% (24,3% у контроля, $p = 0,348$); в яичниках 15-дневных мух, содержащихся на безбелковом корме, процент LTR⁺ гермариов составил 73,3% в случае мутантной линии *Hsp67Bc-0* и 60,4% у контроля ($p = 0,226$). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в условиях белкового голодания отсутствие продукта гена *Hsp67Bc* способствует не снижению, но некоторому усилению интенсивности процесса макроаутофагии в гермариях.

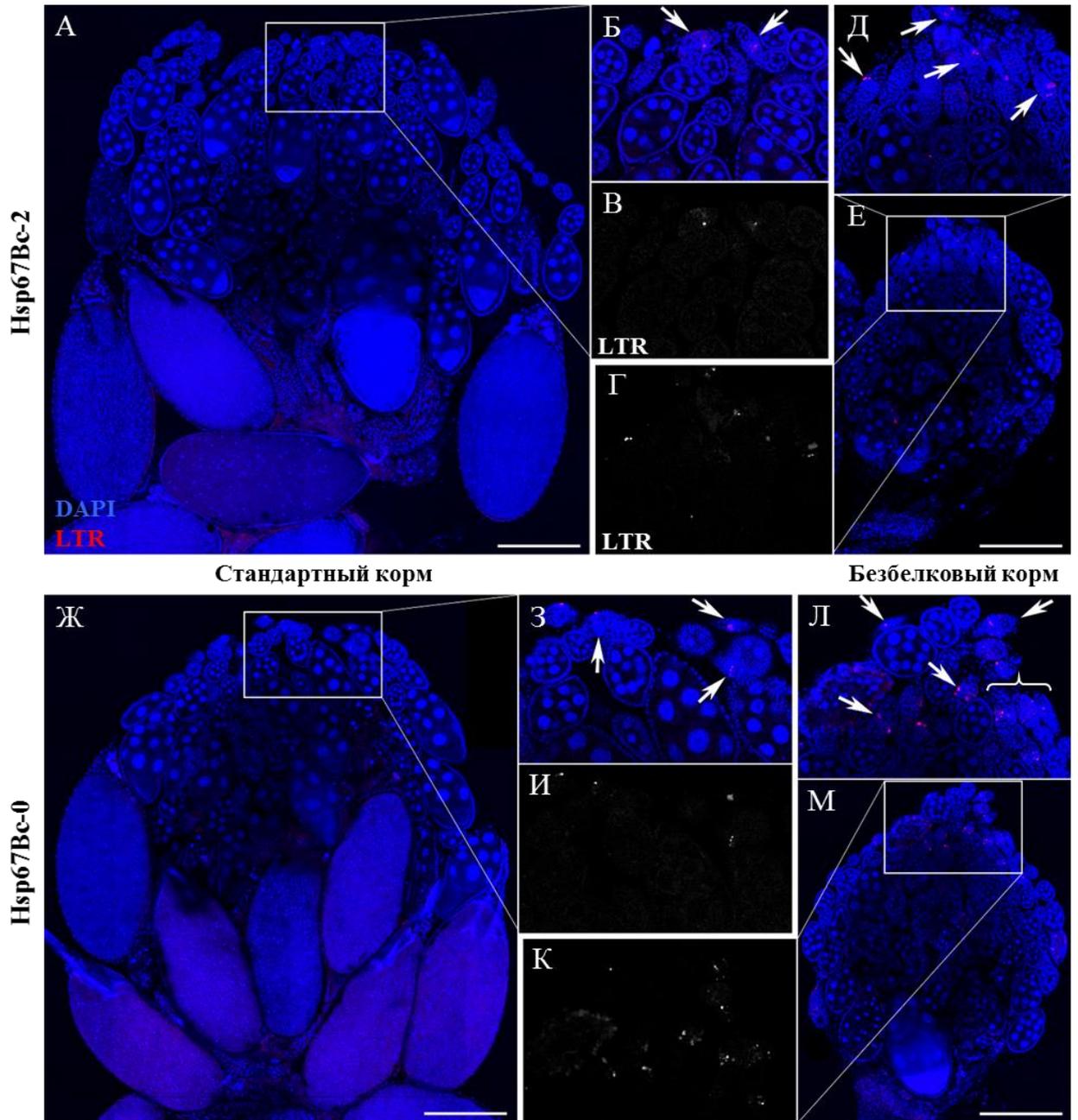


Рисунок 22. LTR-положительные органеллы в яичниках *D. melanogaster* контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий, содержащихся на стандартном и безбелковом корме в течение 5 дней. А–В – общий вид (А) и фрагмент (Б, В) яичника самки линии Hsp67Bc-2 после содержания на стандартном корме; прямоугольником на панели А обведён участок яичника, содержащий наибольшее количество LTR-положительных гермариов и представленный в увеличенном масштабе на панелях Б (каналы DAPI и LTR) и В (канал LTR). Г–Е – общий вид яичника самки линии Hsp67Bc-2 после содержания на безбелковом корме (Е) и его фрагмент (Г – каналы DAPI и LTR, Д – канал LTR), соответствующий обведённому прямоугольником на панели Е участку. Ж–М – то же, что А–Е, для линии Hsp67Bc-0. Масштабные отрезки соответствуют 200 мкм; стрелки указывают на LTR-положительные гермариии; из-за большого количества LTR-положительных гермариов на панели Л часть из них не обозначена, а три обозначены фигурной скобкой.

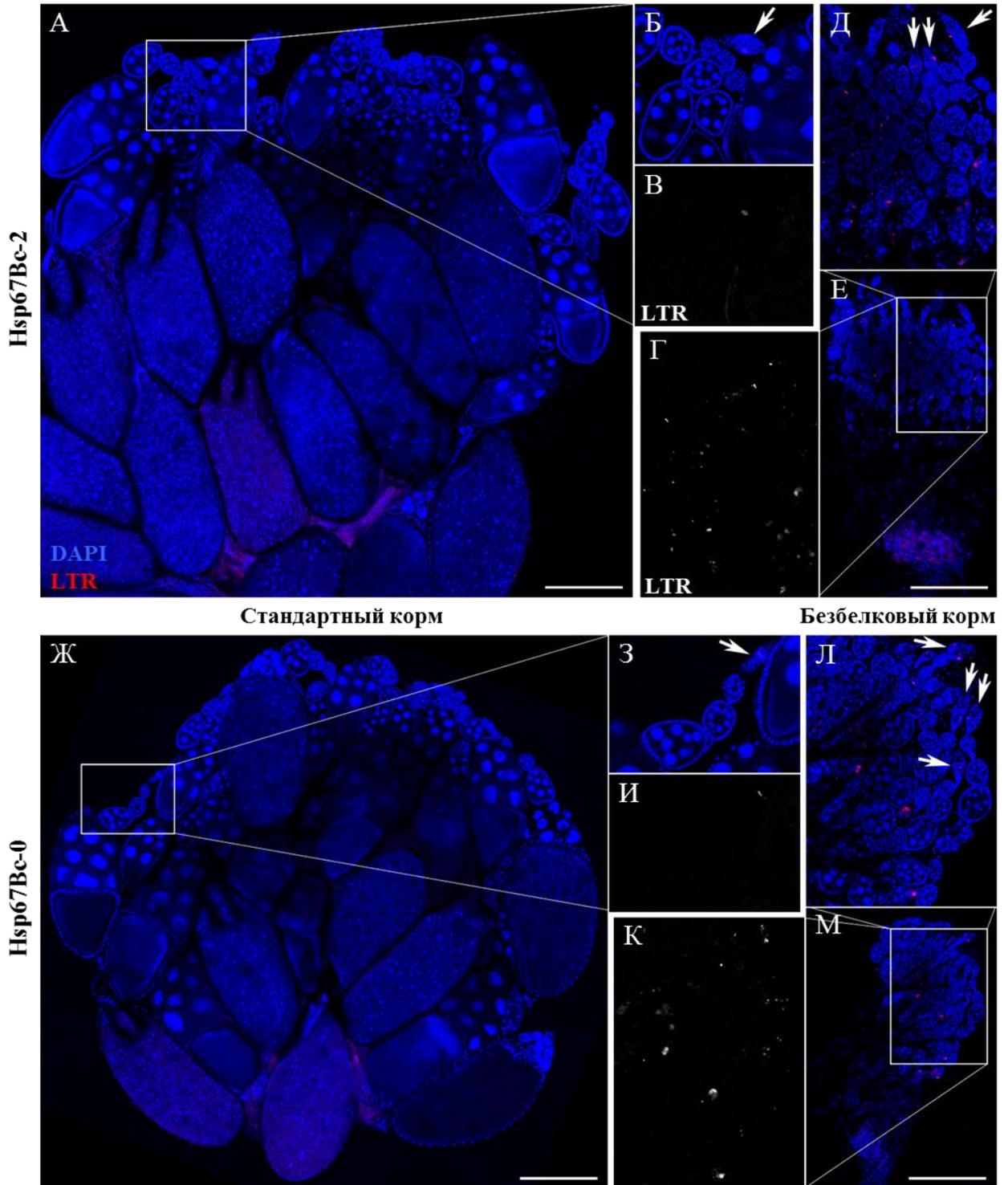


Рисунок 23. LTR-положительные органеллы в яичниках мух контрольной (*Hsp67Bc-2*) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) линий, содержащихся на стандартном и безбелковом корме в течение 15 дней. А–В – общий вид (А) и соответствующий обведённому прямоугольником участку на панели А фрагмент (Б – каналы DAPI и LTR, В – канал LTR) яичника самки линии *Hsp67Bc-2* после содержания на стандартном корме. Г–Е – общий вид яичника самки линии *Hsp67Bc-2* после содержания на безбелковом корме (Е) и его фрагмент (Г – каналы DAPI и LTR, Д – канал LTR), соответствующий участку, обведённому прямоугольником на панели Е. Ж–М – то же, что А–Е, для линии *Hsp67Bc-0*. Стрелки указывают на LTR-положительные германии; масштабные отрезки соответствуют 200 мкм.

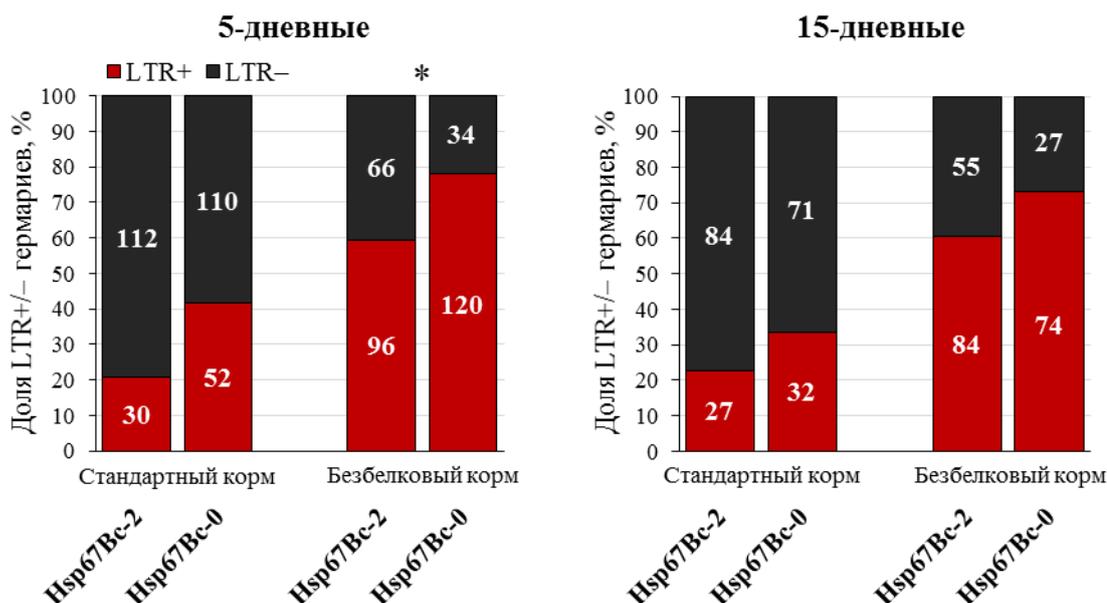


Рисунок 24. Различия в соотношениях LTR-положительных (LTR+) и LTR-отрицательных (LTR-) гермариев в яичниках контрольных (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельных по *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) самок. Числа внутри столбцов на диаграммах обозначают количества проанализированных гермариев каждого типа; *Достоверные различия с $0,01 < p \leq 0,05$.

3.6.2. Содержание бактерий *Wolbachia* штамма wMelPop в мозге личинок, куколок и взрослых мух с делецией в гене *Hsp67Bc*

При голодании макроаутофагия в яичниках *D. melanogaster* регулируется через компоненты сигнального пути TOR (target of rapamycin) (Barth et al., 2011; Neufeld, 2010; Nezis et al., 2009). Ранее на инфицированных патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop *D. melanogaster* и на заражённых другими штаммами этой бактерии паразитических нематодах *B. malayi* и культуре клеток комаров *Ae. albopictus* было показано, что макроаутофагия эндосимбиотических бактерий *Wolbachia* может регулироваться таким же образом (Voronin et al., 2012). Мы сравнили численность бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop в тканях нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линии Hsp67Bc-0 и контрольной линии Hsp67Bc-2. Инфицирование было произведено на последней стадии скрещиваний, представленных на рисунке 11. Бактерии штамма wMelPop отличаются усиленной по сравнению с непатогенными штаммами *Wolbachia* пролиферацией в тканях хозяев, в особенности в мозге (Min, Benzer, 1997; Strunov et al., 2013), поэтому для анализа численности бактерий нами был выбран мозг *D. melanogaster*.

При помощи количественной ПЦР был измерен титр *Wolbachia* в мозге *D. melanogaster* с делецией гена *Hsp67Bc* и контрольных мух на трёх стадиях развития – блуждающей личинки третьего возраста, 12-ч куколки и 5-дневных имаго. Титр бактерий измерялся как отношение количества копий гена поверхностного белка *Wolbachia* (*wsp*) к количеству копий гена альфа-тубулина (*αTubulin84B*) *D. melanogaster*. Оба гена представлены в геномах своих носителей одной копией, что позволило довольно точно оценить соотношение количества симбионтов и количества клеток мозга хозяина, исходя из соотношения концентрации продуктов реакции. Результаты количественной ПЦР показали, что содержание бактерий *wMelPop* в мозге мух на стадиях личинки третьего возраста и куколки значительно меньше, чем на стадии имаго (Рисунок 25). Эти данные согласуются с наблюдениями Strunov et al. (2013) о том, что численность *Wolbachia* этого штамма значительно возрастает от стадии личинки третьего возраста к стадии имаго. Количественная ПЦР показала, что в контрольной линии *Hsp67Bc-2* титр бактерий составил у личинок $0,50 \pm 0,13$ единиц на клетку мозга (ед/кл), у куколок – $0,64 \pm 0,13$, а у имаго возрос до $9,78 \pm 1,18$. В нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линии *Hsp67Bc-0* на личиночной стадии титр *Wolbachia* составил $0,54 \pm 0,06$ ед/кл, у куколок – $0,80 \pm 0,08$, у взрослых – $8,80 \pm 0,42$ ед/кл. Достоверных различий в титре бактерий между мутантной по *Hsp67Bc* и контрольной линиями *D. melanogaster* обнаружено не было ни на одной из исследованных стадий развития (личинки: $p = 0,588$; куколки: $p = 0,233$; имаго: $p = 0,489$).

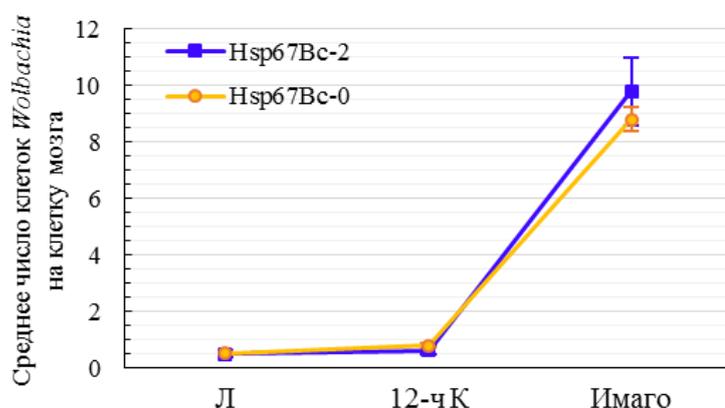


Рисунок 25. Средний титр бактерий *Wolbachia* штамма *wMelPop* в мозге *D. melanogaster* с делецией гена *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) и контрольных мух (*Hsp67Bc-2*) на стадиях развития блуждающей личинки третьего возраста (Л), 12-ч куколки (12-ч К) и имаго (5-дневные взрослые самки), измеренный с помощью количественной ПЦР. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего.

Далее с помощью метода FISH было исследовано распределение бактерий в мозге взрослых самок. Различий в характере распределения *Wolbachia* между нуль-аллельной по *Hsp67Bc* и контрольной линиями выявлено не было (Рисунок 26, А, Б).

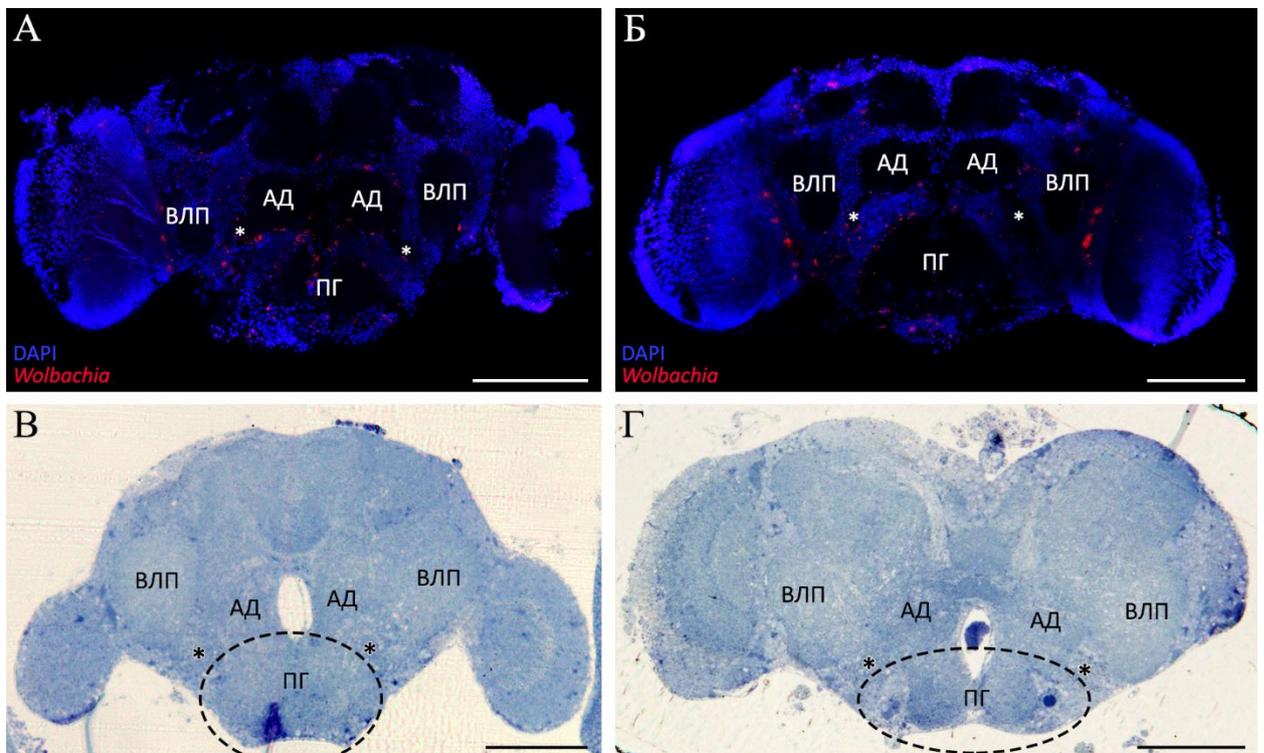


Рисунок 26. Оптические и полутонкие срезы мозга контрольных и нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* 5-дневных самок *D. melanogaster*, инфицированных бактериями *Wolbachia*. ВЛП – вентролатеральный протоцеребрум, АД – антеннальная доля, * – антеннальный механосенсорный и моторный центр, ПГ – подглоточный ганглий. А, Б – оптические срезы мозга дрозофилы (флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием РНК-зонда, специфичного к 16S рРНК *Wolbachia*); А – мозг дрозофилы контрольной линии *Hsp67Bc-2*; Б – мозг дрозофилы линии *Hsp67Bc-0* с делецией в гене *Hsp67Bc*. В, Г – окрашенные метиленовым синим полутонкие срезы подготовленных для ПЭМ образцов мозга мух контрольной (В) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (Г) линий; пунктиром обозначены области, изучавшиеся с помощью метода ПЭМ на ультратонких срезах этих образцов. Масштабные отрезки соответствуют 100 мкм.

3.6.3. Аутофагия бактерий *Wolbachia* в нейронах взрослых *D. melanogaster*

Так как мы не обнаружили достоверных различий в содержании бактерий *Wolbachia* штамма *wMelPop* в мозге личинок, куколок и взрослых дрозофил нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* и контрольной линий посредством количественной ПЦР, мы воспользовались методом ПЭМ для подсчёта количества *Wolbachia*, а также аутофагосом и аутолизосом на срезах нейронов этих мух. Исследования проводились на взрослых самках, так как на стадии имаго титр бактерий был

значительно выше, чем на стадиях личинки и куколки, как было нами показано ранее (см. Рисунок 25). Для анализа был выбран участок мозга, включающий кору подглоточного ганглия и прилежащие к ней области антеннального механосенсорного и моторного центра (Рисунок 26), так как в этом районе по результатам FISH наблюдалось множество бактерий *Wolbachia*, а также большое количество тел нейронов (Рисунок 26, А, Б). Перед получением ультратонких срезов для исследования методом ПЭМ были получены и проанализированы полутонкие срезы мозга мух с целью поиска нужного для анализа участка (Рисунок 26, В, Г). На ультратонких срезах при подсчёте учитывались наблюдаемые размеры аутофагосом и аутолизосом (аутофагических вакуолей). В сумме были проанализированы срезы 208 нейронов в контрольной и 202 нейронов в мутантной линии. Все присутствующие на срезах аутофагические вакуоли были разделены на две группы: (1) «крупные», имевшие диаметр больше диаметра бактерии *Wolbachia* на срезе, и (2) «мелкие», диаметр которых был меньше или равен диаметру *Wolbachia* на срезе. Так как в «мелких» аутофагических вакуолях не могла быть идентифицирована целая бактерия, такие органеллы не учитывались при оценке параметров, связанных с макроаутофагией *Wolbachia*. Диаметр *Wolbachia* на срезах был не менее 0,4 мкм, поэтому аутофагосомы и аутолизосомы $\leq 0,4$ мкм в диаметре на срезе мы относили к «мелким», $> 0,4$ мкм – к «крупным». Примеры представлены на рисунке 27.

Бактерии *Wolbachia*, наблюдаемые в цитоплазме нейронов мозга мух как контрольной, так и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий, имели нормальную морфологию (Рисунок 28, А, Д). Сами нейроны отличались по количеству бактерий на ультратонких срезах: на срезах большинства нейронов бактерий не обнаруживалось (Рисунок 28, Б, Е), срезы цитоплазмы инфицированных нейронов могли содержать несколько бактерий (Рисунок 28, В, Ж) или их большие скопления, характерные для штамма *Wolbachia* wMelPop (Рисунок 28, Г, З). Бактерии *Wolbachia* также наблюдались в аутолизосомах на срезах нейронов *D. melanogaster* обеих линий (Рисунок 29), что подтверждает выведение *Wolbachia* из клеток хозяина путём макроаутофагии.

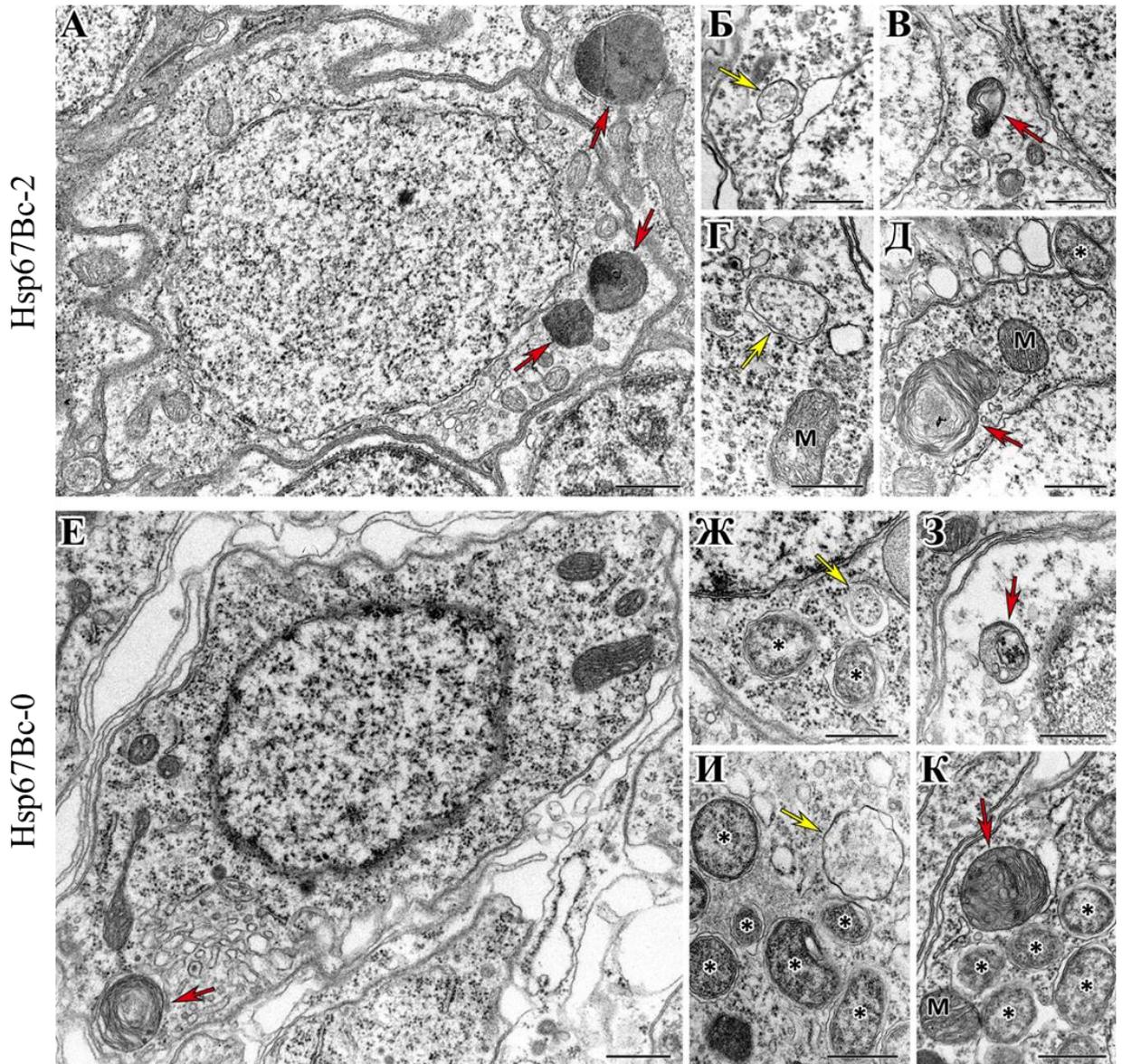


Рисунок 27. Микрофотографии ультратонких срезов аутофагосом (имеют двойную мембрану, обозначены жёлтыми стрелками) и аутолизосом (имеют одинарную мембрану, обозначены красными стрелками) малого ($\leq 0,4$ мкм в диаметре на срезе) и крупного ($> 0,4$ мкм в диаметре на срезе) размера в нейронах самок *D. melanogaster* контрольной (А–Д) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Е–К) линий. * – бактерии *Wolbachia*; М – митохондрии. А – срез нейрона мозга контрольной самки с двумя крупными аутолизосомами; Б – участок цитоплазмы нейрона с аутофагосомой малого размера; В – участок цитоплазмы с аутолизосомой малого размера; Г – срез цитоплазмы нейрона с крупной аутофагосомой и митохондрией; Д – участок цитоплазмы нейрона с крупной аутолизосомой и митохондрией, в цитоплазме соседнего нейрона видна *Wolbachia*. Е – срез нейрона мозга нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* самки с одной крупной аутолизосомой; Ж – участок цитоплазмы с аутофагосомой малого размера и двумя бактериями *Wolbachia*; З – срез цитоплазмы нейрона с аутолизосомой малого размера; И – участок цитоплазмы с крупной аутофагосомой и несколькими бактериями *Wolbachia*; К – срез крупной аутолизосомы, митохондрии и нескольких *Wolbachia*. Масштабные отрезки соответствуют 0,5 мкм.

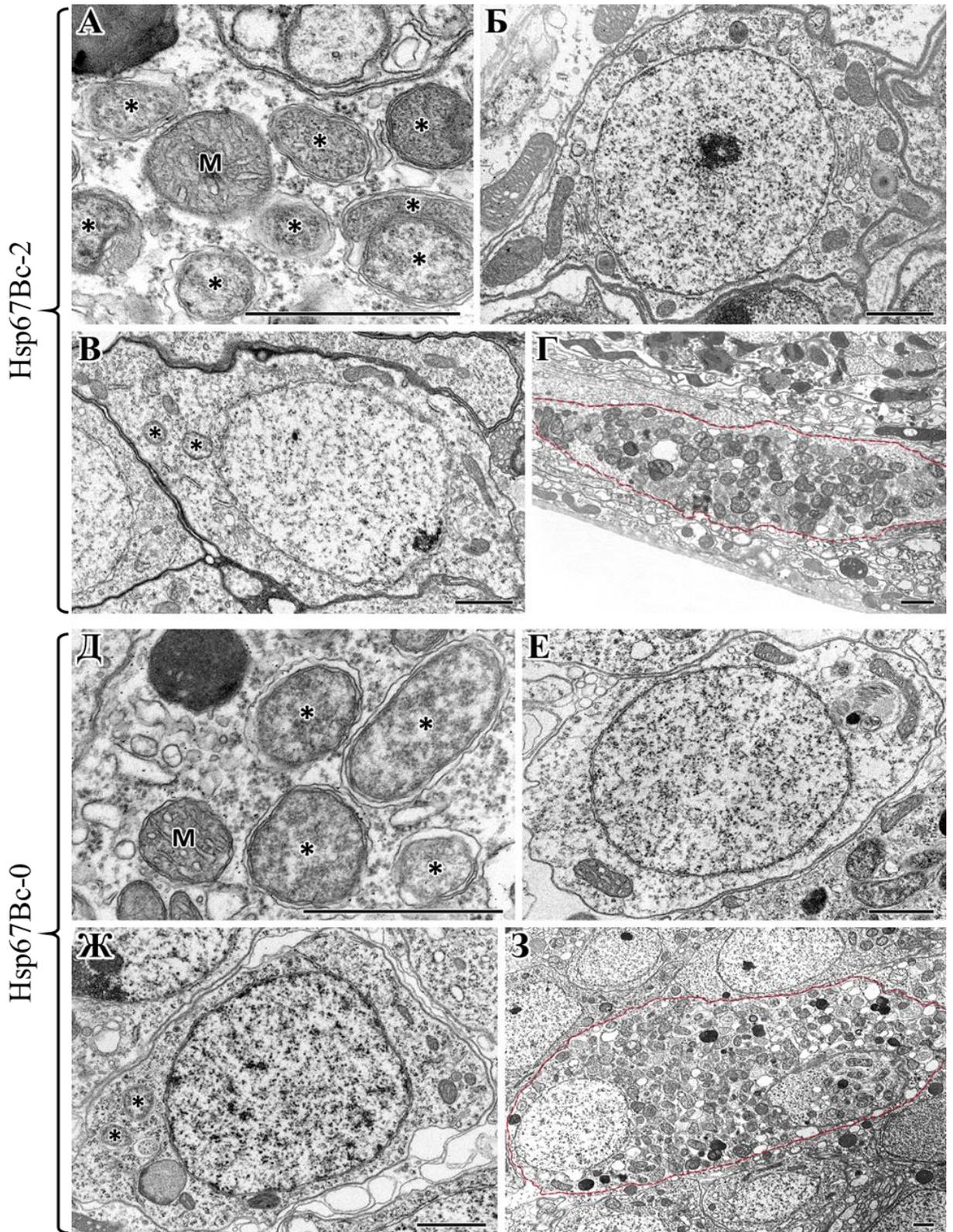


Рисунок 28. Микрофотографии ультратонких срезов нейронов мозга инфицированных бактериями *Wolbachia* мух контрольной (А–Г) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Д–З) линий. * – бактерии *Wolbachia*; М – митохондрии. А, Д – *Wolbachia* в цитоплазме нейронов; Б, Е – неинфицированные нейроны; В, Ж – нейроны с небольшим количеством бактерий на срезе; Г, З – нейроны с множеством *Wolbachia* в цитоплазме, нейроны обведены пунктиром. Масштабные отрезки соответствуют 1 мкм.

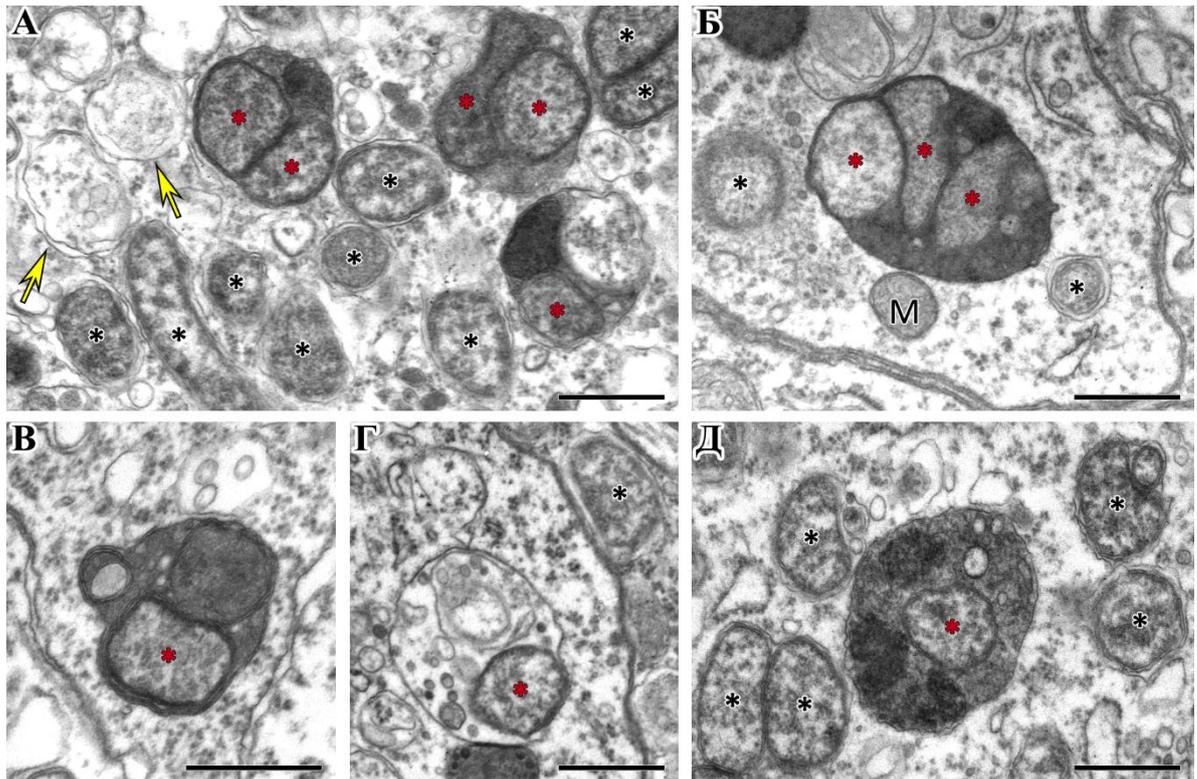


Рисунок 29. Элиминация бактерий *Wolbachia* из нейронов самок мух *D. melanogaster* контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий посредством макроаутофагии. Красные звёздочки – бактерии *Wolbachia* в аутолизосомах; чёрные звёздочки – свободные *Wolbachia* в цитоплазме нейронов; М – митохондрия. А – бактерии в аутолизосомах и цитоплазме нейрона дрозофилы контрольной линии Hsp67Bc-2, жёлтые стрелки указывают на аутофагосомы. Б – *Wolbachia* в аутолизосоме и цитоплазме нейрона мухи линии Hsp67Bc-2. В – бактерия *Wolbachia* в аутолизосоме в нейроне самки мутантной линии Hsp67Bc-0. Г, Д – бактерии в аутолизосомах и в цитоплазме нейронов дрозофилы линии Hsp67Bc-0. Масштабные отрезки соответствуют 0,5 мкм.

Количественно на ультратонких срезах были оценены: (I) процент инфицированных бактериями *Wolbachia* нейронов в указанной области мозга, (II) среднее количество бактерий в них, (III) процент нейронов, содержащих аутофагосомы и аутолизосомы, (IV) среднее количество аутофагосом и аутолизосом, приходящихся на каждый нейрон, (V) процент крупных аутолизосом (см. Рисунок 27), содержащих *Wolbachia*, и (VI) процент *Wolbachia* (от общего их числа), заключённых в аутолизосомы. Достоверных различий по выбранным параметрам между исследуемыми линиями обнаружено не было. Результаты анализа приведены ниже (Рисунок 30, А). У мутантной линии Hsp67Bc-0 процент инфицированных нейронов в исследованной области мозга был несколько выше, чем у контрольной ($11,7 \pm 3,5\%$ по сравнению с $8,5 \pm 1,7\%$ у линии Hsp67Bc-2, $p = 0,815$), однако

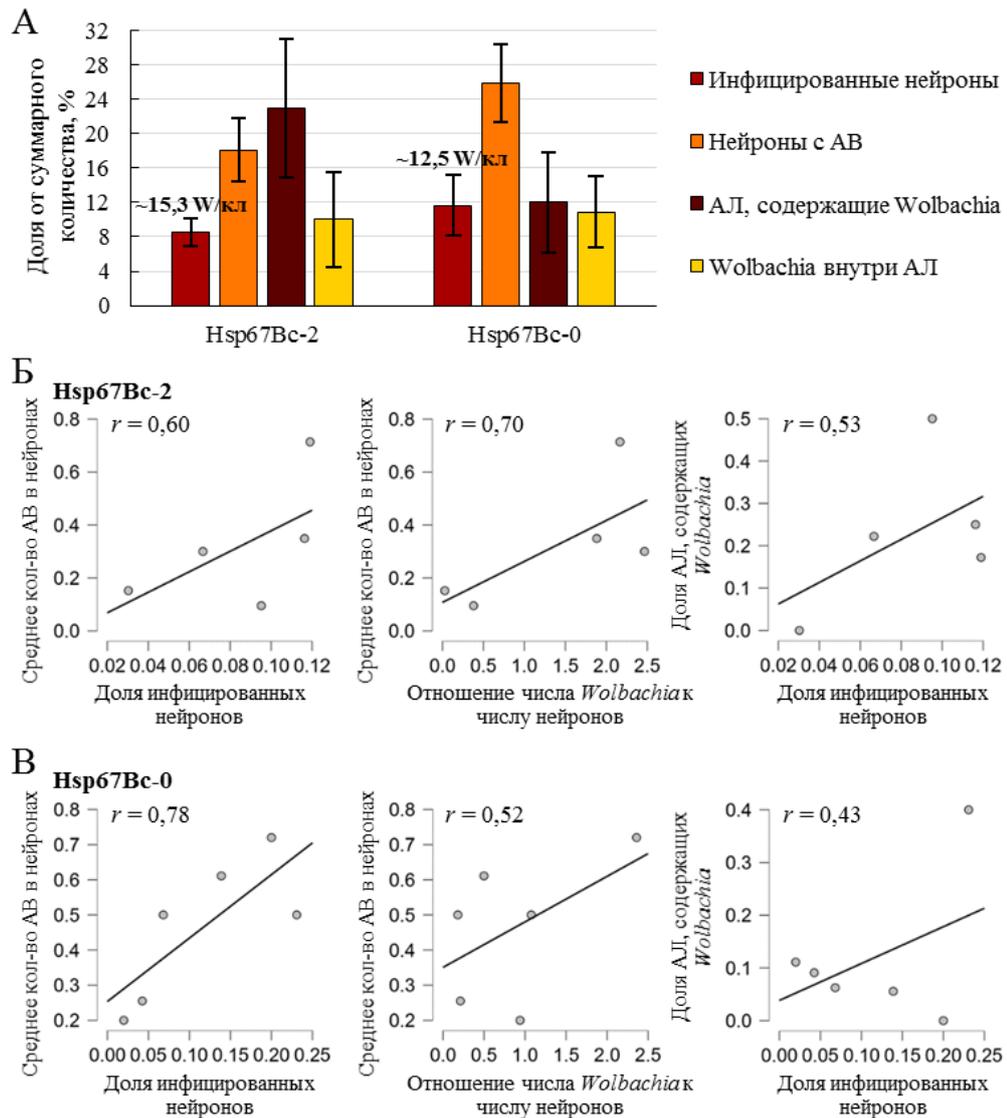


Рисунок 30. Результаты количественного и корреляционного анализа инфицированности бактериями *Wolbachia* и интенсивности макроавтофагии на срезах нейронов мозга самок контрольной (Hsp67Bc-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (Hsp67Bc-0) линий мух. Обозначения: АЛ – аутолизосомы, АВ – аутофагические вакуоли (аутофагосомы и аутолизосомы в совокупности), W/кл – количество бактерий *Wolbachia*, приходящихся на инфицированную клетку (нейрон). А – доля инфицированных нейронов и среднее количество бактерий в них, доля нейронов, содержащих аутофагосомы и аутолизосомы, процент крупных аутолизосом, содержащих *Wolbachia*, и процент *Wolbachia*, заключённых в аутолизосомы, в участке мозга, включающем кору подглоточного ганглия и прилежащие к ней области антеннального механосенсорного и моторного центра. Б, В – корреляция между признаками, представленными на гистограмме на панели А, в образцах мозга контрольной (Б) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (В) линий мух.

среднее количество бактерий в инфицированных нейронах было несколько меньше, чем у контроля ($12,5 \pm 7,0$ у линии Hsp67Bc-0 по сравнению с $15,3 \pm 6,4$ у Hsp67Bc-2, $p = 0,773$), что свидетельствует о меньшей «заселённости» нейронов бактериями при большей распространённости *Wolbachia* по выбранной нами области мозга

мутантных по гену *Hsp67Bc* дрозофил. По-видимому, эта особенность способствовала выравниванию итогового титра бактерий при исследовании количества *Wolbachia* методом количественной ПЦР. Несмотря на отсутствие продукта гена *Hsp67Bc*, доля нейронов, содержащих аутофагосомы и аутолизосомы, была несколько выше в образцах мозга мух линии *Hsp67Bc-0* ($25,9 \pm 5,0\%$, по сравнению с $18,1 \pm 3,7\%$ у контрольной линии *Hsp67Bc-2*, $p = 0,121$). Кроме того, среднее количество аутофагосом и аутолизосом в нейронах нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии было больше, чем у контрольной ($0,46 \pm 0,08$, в сравнении с $0,32 \pm 0,11$, $p = 0,327$). Доля *Wolbachia*, заключённых в аутолизосомы, была приблизительно одинакова в нейронах мозга мух обеих линий ($10,9 \pm 4,1\%$ у *Hsp67Bc-0* и $10,1 \pm 5,5\%$ у контрольной линии, $p = 0,733$).

Таким образом, содержание аутофагических вакуолей было немного выше в нейронах нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии по сравнению с контрольной, однако доля бактерий *Wolbachia*, элиминирующихся посредством макроаутофагии, была одинаковой в мозге мух обеих линий. Следует также отметить, что наблюдались достоверно не значимые различия между отношением количества аутофагосом к количеству аутолизосом в мутантной и контрольной линиях. Так, доля аутофагосом от общего числа аутофагических вакуолей составила в среднем $9,5\%$ в нейронах контрольной линии и $19,6\%$ – в образцах нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* ($p = 0,116$). Этот феномен может указывать на некоторую задержку перехода к стадии слияния аутофагосом с лизосомами, приводящего к образованию аутолизосом.

Корреляционный анализ данных выявил положительную зависимость между количеством инфицированных нейронов и средним числом аутофагических вакуолей в нейронах мозга мух обеих линий – среднюю у контрольной ($r = 0,596$, $p = 0,289$) (Рисунок 30, Б) и сильную у нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии ($r = 0,777$, $p = 0,069$) (Рисунок 30, В). Средняя положительная корреляция у мух обеих линий была обнаружена также между средним количеством аутофагических вакуолей и средним содержанием *Wolbachia* в нейронах и между процентом инфицированных нейронов и долей аутолизосом, содержащих бактерии (см. рисунок 30, Б, В). Эти результаты указывают на то, что пролиферация *Wolbachia*

стимулирует макроаутофагию в клетках хозяина, и согласуются с данными Voronin et al (2012).

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что делеция гена *Hsp67Bc* не оказывает влияния на элиминацию бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop из клеток мозга посредством макроаутофагии ни на одной из исследованных стадий онтогенеза *D. melanogaster*. Кроме того, количество аутофагосом и аутолизосом в образцах мозга взрослых нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух достоверно не уменьшается по сравнению с контролем.

3.6.4. Влияние делеции гена *Hsp67Bc* на морфологию аутофагосом и аутолизосом в нейронах мозга мух, инфицированных *Wolbachia*

Так как делеция гена *Hsp67Bc* достоверно не повлияла на количество аутофагических вакуолей в нейронах инфицированных *Wolbachia* мух, мы детально изучили морфологию этих органелл. Для анализа морфологии выбирались аутофагосомы и аутолизосомы на исследованных ранее (параграф 3.6.3) ультратонких срезах мозга мух, однако в целях увеличения выборки поиск аутофагических вакуолей осуществлялся на всём срезе. Всего было проанализировано 13 аутофагосом и 70 аутолизосом в контрольной линии и 18 аутофагосом и 93 аутолизосомы в нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии мух.

Сначала мы изучили морфологию, содержимое и площади среза аутофагосом. Аутофагосомы в образцах мозга обеих линий были окружены двойной мембраной и имели схожие размеры – $0,118 \pm 0,017$ мкм² в контрольной и $0,109 \pm 0,019$ мкм² в мутантной линии. Затем мы оценили те же параметры аутолизосом. Аутолизосомы характеризовались тем, что были окружены одной мембраной, и могли быть условно разделены на три категории (Рисунок 31, А):

1. содержащие «интактный» материал с чётко различимыми структурами;
2. содержащие «частично переработанный» материал, включавший как чётко различимые, так и аморфные структуры;
3. содержащие «полностью переработанный» аморфный материал.

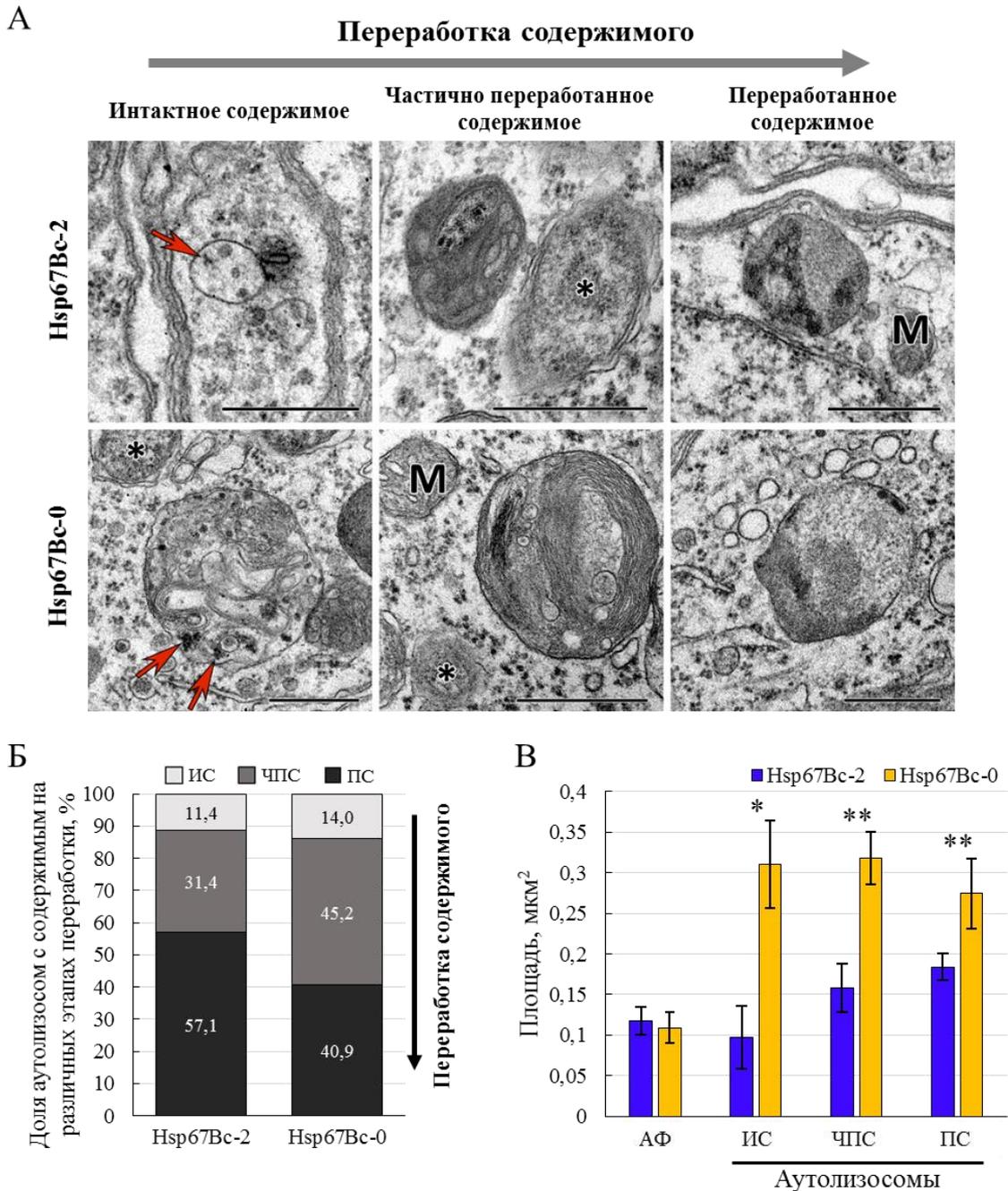


Рисунок 31. Морфология и размер аутолизосом с содержимым различной степени переработки на ультратонких срезах нейронов мозга нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) и контрольных (*Hsp67Bc-2*) самок *D. melanogaster*. А – микрофотографии аутолизосом с содержимым на различных стадиях переработки; красные стрелки указывают на непереваренные рибосомы, различимые в аутолизосомах с интактным содержимым; звёздочками обозначены бактерии *Wolbachia* в цитоплазме нейронов; М – митохондрии; масштабные отрезки соответствуют 0,5 мкм. Б – доли (%) аутолизосом, содержащих материал на различных стадиях деградации: ИС – «интактное» содержимое, ЧПС – «частично переработанное» содержимое, ПС – «полностью переработанное» содержимое. В – сравнение площадей сечения аутофагических вакуолей с содержимым на различных стадиях переработки в контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линиях мух; АФ – аутофагосомы; столбцы представляют медианы, доверительные интервалы соответствуют стандартным ошибкам среднего; * $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$.

В образцах мозга контрольной линии *Hsp67Bc-2* пропорции аутолизосом с «интактным», «частично переработанным» и «полностью переработанным» содержимым были следующими: 11,4%, 31,4% и 57,1%, соответственно (Рисунок 31, Б). В образцах мутантной линии *Hsp67Bc-0* – 14,0%, 45,2% и 40,9% (Рисунок 31, Б), с заметно меньшей долей аутолизосом с полностью переваренным материалом. Кроме того, средняя площадь сечения аутолизосом, содержащих материал всех трёх типов, в образцах мозга нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии мух была приблизительно в 1,6 раза больше, чем в контрольной ($p = 0,016$). Различия между линиями мух были наибольшими в случае с аутолизосомами с «интактным» содержимым (в 3,2 раза, $p = 0,048$): в образцах контрольной линии *Hsp67Bc-2* площадь сечения таких аутолизосом составила $0,098 \pm 0,067$ мкм², что близко к наблюдавшимся размерам аутофагосом, тогда как на срезах мутантной линии *Hsp67Bc-0* этот показатель составил $0,310 \pm 0,054$ мкм² (в 2,8 раза больше размера аутофагосом в этой линии) (Рисунок 31, В). Площадь сечения аутолизосом с «частично переработанным» содержимым различалась несколько меньше – в 2 раза крупнее у мутантов, $p = 0,002$ – и была несколько (статистически не достоверно) больше по сравнению с таковой аутолизосом с интактным содержимым в образцах обеих линий (Рисунок 31, В). Наименьшие различия в размерах между линиями отмечались у аутолизосом с «полностью переработанным» содержимым – в 1,5 раза $p = 0,001$ (Рисунок 31, В).

Таким образом, на срезах нейронов мозга нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух аутолизосомы были крупнее по сравнению с контрольной линией; при этом процент аутолизосом с «полностью переработанным» содержимым в мутантной линии мух был ниже, чем в контрольной. Это предполагает нарушение процесса созревания аутофагосом.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез белков теплового шока является универсальным механизмом ответа на воздействие разнообразных стрессоров (Lindquist, 1986). К функциям этих белков относятся фолдинг новосинтезированных и денатурировавших пептидов, связывание белков с неправильной конформацией для предотвращения их агрегации и мечение повреждённых белков для деградации (Sarkar et al., 2011). *Hsp67Bc* *D. melanogaster* относится к семейству малых белков теплового шока и участвует в регуляции процесса макроаутофагии (Carra et al., 2010; Morrow, Tanguay, 2015; Vos et al., 2016). В настоящей работе было детально изучено его влияние на процесс макроаутофагии и на устойчивость *D. melanogaster* к различным типам стресса. Для этого была получена линия мух, несущая почти полную делецию гена *Hsp67Bc* в гомозиготе. Затем был проведён сравнительный анализ устойчивости нуль-аллельной и контрольной линий к температурному воздействию, а также анализ процесса макроаутофагии в условиях белкового голодания и в присутствии патогенного штамма симбиотической бактерии *Wolbachia*.

4.1. *Hsp67Bc* и температурный стресс

Так как было известно, что экспрессия гена *Hsp67Bc*, как и множества других генов *HSP*, многократно возрастает в ответ на воздействие повышенной температуры (Vos et al., 2016), нами в первую очередь было исследовано влияние повышенной температуры на нуль-аллельных по *Hsp67Bc* мух. Выяснилось, что в отсутствие *Hsp67Bc* ПЖ дрозофил после кратковременного воздействия повышенной температуры (2 ч при 37 °C) в возрасте 1 и 7 дней после вылета из куколки сократилась по сравнению с содержанием в нормальных условиях (Рисунки 13, В и 14, В, Г). На контрольную линию мух тепловой стресс оказал обратное влияние, увеличив их ПЖ по сравнению с нормальными условиями (Рисунки 13, В и 14, В, Г). Обычно мягкий или кратковременный тепловой (или другой) стресс, перенесённый имаго *Drosophila* в раннем возрасте, продлевает их ПЖ (Hercus et al., 2003; Le Bourg, 2011; Sarup et al., 2014), как в случае с контрольной линией мух в наших экспериментах. Наблюдавшийся обратный эффект в случае линии с делецией *Hsp67Bc* указывает на снижение их устойчивости к кратковременному тепловому

воздействию. *Hsp67Bc*, однако, не является ключевым для выживания дрозophil после кратковременного теплового стресса, так как мухи с делецией гена *Hsp67Bc* выживали после тепловой обработки (Рисунок 14).

Тем не менее, обнаружилось, что *Hsp67Bc* играет важную роль в сопротивлении холоду имаго дрозophil и, в меньшей степени, блуждающих личинок третьего возраста. Взрослые мухи с делецией этого гена медленнее восстанавливаются после холодовой комы (Рисунок 17), самки хуже выживают после пребывания на холоде (2, 4 и 12 ч при 0 °C) (Рисунок 18, А). На выживаемости личинок и куколок отсутствие *Hsp67Bc* отразилось слабее. Различия в ответе на холодое воздействие у мух на разных стадиях развития могут объясняться отличиями в их физиологии и выполнением *Hsp67Bc* различных функций в ходе онтогенеза мух. На это указывают и отличия в уровнях экспрессии гена *Hsp67Bc* у личинок, куколок и имаго, зарегистрированные в контрольной линии.

Уровень РНК *Hsp67Bc*, измеренный в личинках третьего возраста в нормальных условиях (24–25 °C, без обработки), был более чем в 20 раз выше, чем в имаго, однако достоверно не изменился в ответ на воздействие холода (Рисунок 20). Выживаемость нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* личинок до стадии имаго после холодовой обработки также достоверно не отличалась от контроля, но мутантные личинки имели сниженную выживаемость до стадии куколки (Рисунок 18, А). Эти данные указывают на то, что продукт гена *Hsp67Bc* может играть некоторую роль в обеспечении устойчивости личинок к холоду, но, вероятно, это не является основной его функцией в организме личинок.

Аналогично личинкам третьего возраста, в белых предкуколках был зарегистрирован высокий уровень *Hsp67Bc* (в 2,8 раза выше, чем у личинок), не реагирующий на холодую обработку (Рисунок 20). При этом достоверных отличий выживаемости между контрольными и нуль-аллельными по гену *Hsp67Bc* куколками трёх возрастов (≤ 1 ч, 12 и 48 ч) практически не наблюдалось (Рисунок 18, А). На стадии куколки *D. melanogaster* не способны питаться, и энергия, наряду с необходимыми для метаморфоза веществами, поставляется в результате аутофагической гибели клеток, в процессе которой удаляется большинство личиночных клеток (Aguila et al., 2007). Скорость метаболизма на стадии ранней куколки падает и остаётся на низком уровне в течение последующих 24 ч (Merkey et

al., 2011). При этом Merkey с соавторами (2011), продемонстрировали, что скорость метаболизма не зависит от температуры в течение первых 2/3 развития куколки. Так, в течение первых 48 ч развития куколок выработка CO₂ не отличалась между индивидами, содержащимися при 18, 25 и 29 °C (Merkey et al., 2011). На фоне этих процессов повреждения, вносимые холодным стрессом (снижение скорости метаболизма, нарушение ионного и осмотического баланса, в крайней степени приводящие к клеточной гибели) либо не влияют существенно на метаморфоз, либо несут отдалённые последствия. Такие последствия проявлялись в наших экспериментах в отложенной на несколько суток после холодового воздействия гибели куколок. Вопрос, какую именно функцию продукт гена *Hsp67Bc* выполняет на стадии куколки в нормальных условиях, остаётся открытым. Во время метаморфоза продукт гена *Hsp67Bc* может совместно со своим кошапероном *Stv* участвовать в деградации белков путём селективной аутофагии при содействии шаперонов (Arndt et al., 2010) или же, напротив, в фолдинге белков вместе с другими шаперонами, в том числе малыми белками теплового шока. Очевидно, эти функции пересекаются с функциями других белков, так как нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* мухи жизнеспособны и фертильны.

Стадия имаго характеризуется половым диморфизмом в восстановлении после холодной комы: и контрольные, и мутантные самки восстанавливались медленнее самцов даже после самого короткого воздействия холода (Рисунок 17). Мутантные самки показали также и наиболее выраженное снижение выживаемости среди всех изученных стадий развития дрозофил – в 1,6–3,0 раза ниже, чем у контрольных самок (Рисунок 18, А). В отличие от личинок и куколок, экспрессия *Hsp67Bc* у имаго значительно усиливалась в ответ на воздействие холода, хотя и была многократно ниже, чем на тех стадиях. При этом, у самцов в нормальных условиях уровень РНК *Hsp67Bc* был выше, чем у самок. Непосредственно после прекращения воздействия холода он немного повысился и достиг максимального, 2,5-кратного, увеличения через 90 мин после окончания холодного стресса, когда 100% мух восстанавливались после комы (Рисунок 19). У самок экспрессия этого гена возрастала с «запаздыванием», однако через 90 мин после окончания воздействия холода увеличилась в 6 раз по сравнению с нормальными условиями, «догнав» уровень экспрессии у самцов на тот же момент (Рисунок 19). Этот паттерн

изменения экспрессии коррелирует с кривыми восстановления самцов и самок после 12-ч холодовой комы (Рисунок 17), что указывает на важную роль *Hsp67Bc* в процессах устранения полученных при воздействии холода внутриклеточных повреждений. Скорость восстановления двигательной активности после холодовой комы зависит от двух процессов – восстановления функции ЦНС и мембранного потенциала мышечных клеток (Andersen, Overgaard, 2019). Ген *Hsp67Bc* экспрессируется в ЦНС и мальпигиевых сосудах *D. melanogaster* (<https://flybase.org>), но белок *Hsp67Bc* обнаруживается и в мышцах мух (Carra et al., 2010), поэтому делеция этого гена может ослаблять оба процесса. При этом, по-видимому, ген *Hsp67Bc* более важен для восстановления самок после холодовой комы, и в его отсутствие у мутантных мух замедляются процессы репарации и снижается выживаемость. Также стоит отметить наличие полового диморфизма в экспрессии некоторых генов, кодирующих белки, вовлечённые в ответ на воздействие холода, как в контрольной линии, так и в мутантной (Таблица 4, Рисунок 20). К примеру, непосредственно после окончания воздействия холода экспрессия *l(2)efl*, *Hsp70*, *stv* и *Fst* была выше у самцов, чем у самок. Этот феномен может вносить вклад в более высокую скорость восстановления самцов после холодовой комы.

Таким образом, устойчивость *D. melanogaster* к воздействию холода зависит от стадии развития и пола мух, что может быть обусловлено различиями морфологии и метаболома. Известно, что *D. melanogaster* зимуют на стадии имаго, при этом самцы становятся стерильными при температуре ниже 13 °C (Izquierdo, 1991). Izquierdo предполагает, что только имаго являются достаточно устойчивыми для выживания в условиях длительного воздействия низкой температуры, тогда как, к примеру, эмбрионы не развиваются во взрослых насекомых при длительности воздействия пониженной температуры более 80 суток (Izquierdo, 1991). В связи с этим, для поддержания природных популяций *D. melanogaster* в условиях умеренного климата необходимо выживание оплодотворённых самок и их способность откладывать жизнеспособные яйца после окончания воздействия низких температур. Результаты наших экспериментов показали, что выживаемость личинок и куколок дрозофил и контрольной, и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий после длительного воздействия пониженной температуры (0 °C, 12 ч) в 3–4 раза ниже, чем у имаго. Это подтверждает низкую вероятность выживания личинок

и куколок в зимний период в условиях умеренного климата. Выживаемость взрослых нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* самок также была значительно снижена после холодового воздействия по сравнению с контролем Рисунок 18, А). Кроме того, несмотря на то, что и контрольные, и мутантные самки откладывали гораздо меньшее количество яиц после 12-ч холодовой комы по сравнению с нормальными условиями содержания (24–25 °С), самки с делецией этого гена оказались более чувствительными к воздействию пониженной температуры (Рисунок 18, В). Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что продукт гена *Hsp67Bc* играет важную роль в обеспечении устойчивости взрослых *D. melanogaster* к воздействию пониженной температуры. Соответственно, наличие нормально функционирующего гена *Hsp67Bc* должно способствовать лучшему выживанию природных популяций этого вида в условиях умеренного климата.

4.2. *Hsp67Bc* и макроаутофагия

Помимо участия *Hsp67Bc* в формировании ответа на температурное воздействие мы выявили его вовлечённость в регуляцию созревания аутофагосом в процессе макроаутофагии. Об этом свидетельствовало наблюдавшееся нами значительное увеличение размеров аутолизосом на ультратонких срезах нейронов мозга нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* дрозофил по сравнению с контрольной линией (Рисунок 31, В). Такое явление могло быть вызвано несколькими факторами: (1) нарушения/изменения в процессе созревания аутофагосом; (2) дисфункция ферментов лизосом, приводящая к необходимости слияния большего количества лизосом с аутофагосомами для эффективной переработки содержимого аутофагосом; (3) нарушение процесса аутофагической реформации лизосом. Мы предполагаем, что факторы (2) и (3) не могли вызвать наблюдавшегося увеличения размеров аутолизосом по следующим причинам. Дисфункция ферментов лизосом проявляется в фенотипе лизосомных болезней накопления (*lysosomal storage diseases*), при котором в цитоплазме клеток обнаруживается большое количество аутолизосом с переработанным и частично переработанным содержимым, что в итоге приводит к гибели клетки (Alroy, Lyons, 2014; Festa et al., 2018; Mauvezin et al., 2015; Xu et al., 2021). В нейронах нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух присутствовали аутолизосомы, содержащие материал на всех стадиях переработки.

Аутофагическая реформация лизосом – это процесс экстракции небольших везикул – протолизосом – из аутолизосом, который происходит на конечной стадии аутофагии и необходим для гомеостаза лизосом (Chen, Yu, 2017). Нарушение этого процесса приводит к росту числа аутофагических вакуолей и увеличению размеров аутолизосом (Schulze et al., 2013; McGrath et al., 2021). У нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух аутолизосомы с полностью переработанным содержимым имели меньший размер по сравнению с аутолизосомами, содержащими интактный и частично переработанный материал (Рисунок 31, В), что указывает на наличие аутофагической реформации лизосом. В нейронах мутантных мух не аутофагосомы, но аутолизосомы с содержимым на всех стадиях переработки имели увеличенный по сравнению с контролем размер, что подразумевает нарушение на стадии созревания аутофагосом, когда с аутофагосомами сливаются эндосомы и лизосомы (Zhao, Zhang, 2019). Ранее было показано, что человеческий ортолог *Hsp67Bc* – *HSPB8* – вовлечён в регуляцию слияния лизосом с аутофагосомами. К примеру, повышение экспрессии *HSPB8* в ганглиозных клетках RGC5 в условиях повышенного содержания глюкозы способствовало слиянию лизосом с аутофагосомами, тогда как сайленсинг *HSPB8* приводил к нарушениям этого процесса (Li et al., 2017). Кроме того, в обработанных хлорокином (ингибитором процесса макроаутофагии и слияния лизосом с аутофагосомами) клетках RGC5 блокировка процесса макроаутофагии ослаблялась повышением экспрессии гена *HSPB8*, в то время как сайленсинг *HSPB8* имел обратное воздействие (Li et al., 2017). В другом исследовании повышение экспрессии *HSPB8* дикого типа в гибридных клетках нейробластомы и моторных нейронов мыши NSC34 увеличивало колокализацию маркеров аутофагии с лизосомными, что означало усиленное формирование аутолизосом, тогда как повышение экспрессии мутантного *HSPB8* приводило к тому, что аутофагосомы колокализовались с белковыми агрегатами, но не сливались с лизосомами (Kwok et al., 2011). Авторы обоих исследований пришли к заключению, что *HSPB8* необходим для слияния лизосом с аутофагосомами (Kwok et al., 2011; Li et al., 2017). Наши данные согласуются с приведёнными выше. Наиболее выраженные различия в площади сечения аутолизосом между контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линиями мух выявлялись у аутолизосом с интактным содержимым (Рисунок 31, В), что указывает на то, что

изменения происходят после формирования аутофагосом, но до переработки материала. Кроме того, в нейронах нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух процент аутофагосом от общего числа аутофагических вакуолей был несколько выше, чем в контроле. Этот феномен может указывать на небольшую задержку перехода к слиянию аутофагосом с лизосомами, приводящего к образованию аутолизосом.

Мы предполагаем, что в отсутствие продукта гена *Hsp67Bc* специфичность слияния аутофагосом с эндосомами или скорость слияния лизосом с аутофагосомами может быть снижена. Это может приводить к слиянию с аутофагосомами большего числа эндосом, в результате чего формируются более крупные аутолизосомы. На переработку содержимого таких аутолизосом может потребоваться дополнительное время, что отражается в увеличении процента аутолизосом с частично переработанным материалом. Тем не менее, процесс переваривания содержимого аутолизосом проходит до полной его переработки.

Кроме увеличения размеров аутолизосом на ультратонких срезах нейронов мозга инфицированных бактериями *Wolbachia* мух с делецией *Hsp67Bc* наблюдалось некоторое увеличение числа аутофагических вакуолей. В яичниках содержавшихся на безбелковом корме мутантных дрозофил обнаруживалось несколько большее по сравнению с контролем количество LTR-положительных гермариев, что также может указывать на рост числа аутофагических вакуолей в этом органе. Оба эти феномена могут свидетельствовать об усилении макроаутофагии в мозге и яичниках нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух по сравнению с контролем. Мы ожидали, что делеция гена *Hsp67Bc* приведёт, наоборот, к снижению уровня макроаутофагии, так как ранее на культуре клеток S2 *Drosophila* было показано, что повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* также приводит к усилению макроаутофагии (Carra et al., 2010). Подобно отсутствию *Hsp67Bc*, к повышению интенсивности макроаутофагии приводила замена аргинина-126 на аспарагин в α -кристаллиновом домене *Hsp67Bc* дрозофилы (Jabłońska et al., 2018). Эта мутация имитирует болезнь Шарко — Мари — Тута человека, вызванную похожей мутацией в белке HSPB8, нарушающей его связывание с BAG3 — человеческим ортологом Stv (Jabłońska et al., 2018). Jabłońska с соавторами показали, что в присутствии мутантного *Hsp67Bc* в мышцах личинок *D. melanogaster* усиливались агрегация белков и формирование аутофагосом. Из наших и литературных данных следует, что как отсутствие, так и определённые

мутации в гене *Hsp67Bc* могут приводить к усилению интенсивности макроаутофагии в тканях *D. melanogaster*.

Возможно, именно с зарегистрированным нами повышением уровня макроаутофагии в мозге и яичниках связано увеличение ПЖ нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух, содержащихся при нормальной температуре (24–25 °C). Из литературных данных известно несколько генов *D. melanogaster*, снижение экспрессии которых приводит к увеличению ПЖ. К ним, например, относятся *InR*, *chico*, *methuselah (mth)* (Clancy et al., 2001; Lin et al., 1998; Tatar et al., 2001). Продукты всех упомянутых генов вовлечены в регуляцию интенсивности процесса макроаутофагии путём влияния на киназу TOR (Clancy et al., 2001; Wang et al., 2015; Graze et al., 2018; Yamamoto et al., 2021), и снижение их экспрессии оказывает на макроаутофагию стимулирующее воздействие. Усиление макроаутофагии посредством умеренного ограничения потребления пищи и ингибирования киназы TOR оказывает на ПЖ животных из различных таксонов такое же воздействие (Karahi et al., 2004; Masoro, 2000). Кроме того, было показано, что увеличение ПЖ нуль-аллельных по гену *chico* *D. melanogaster* возможно лишь при интактной макроаутофагии (Vjedov et al., 2020). Vjedov с соавторами (2020) показали, что умеренное усиление макроаутофагии в ряде тканей продлевает ПЖ *D. melanogaster*, тогда как сильная и повсеместная её стимуляция сокращает ПЖ мух. Таким образом, наблюдавшееся в настоящей работе увеличение ПЖ мух, несущих делецию в гене *Hsp67Bc*, может быть следствием небольшого усиления макроаутофагии в их тканях.

Таким образом, отсутствие продукта гена *Hsp67Bc* *D. melanogaster* приводит к (1) нарушению процесса созревания аутофагосом, в результате чего образуются более крупные аутолизосомы, и (2) небольшому усилению макроаутофагии, которое, возможно, является причиной увеличения ПЖ мух.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белки теплового шока являются универсальным для всех изученных живых организмов инструментом противодействия негативным факторам среды. В настоящей работе при помощи генетических, молекулярных и цитологических методов была исследована роль гена *Hsp67Bc* *D. melanogaster*, кодирующего малоизученный белок теплового шока, в устойчивости к различным типам стрессового воздействия. Впервые была получена линия мух с почти полной делецией гена *Hsp67Bc*, которая в гомозиготе оказалась жизнеспособной и фертильной при нормальной температуре (24–25 °C). Кроме того, средняя продолжительность жизни нуль-аллельных по *Hsp67Bc* дрозофил была на 35% выше, чем контрольных мух, несущих ген *Hsp67Bc* дикого типа. Тем не менее, мы обнаружили, что делеция гена *Hsp67Bc* имеет негативные последствия для мух при понижении температуры. Мы впервые показали, что взрослые мухи с делецией *Hsp67Bc* дольше восстанавливают двигательную активность после холодовой комы при 0 °C, а самки, кроме того, демонстрируют сниженную выживаемость. Экспрессия *Hsp67Bc* возрастает после окончания воздействия холода, достигая максимума через 1,5 ч, и снижается через 3 ч, что позволяет предположить, что *Hsp67Bc* участвует в устранении повреждений, полученных клетками при воздействии пониженной температуры. Следует отметить, что для выживания в условиях умеренного климата важна устойчивость к пониженной температуре взрослых оплодотворённых самок, так как *D. melanogaster* зимуют именно на стадии имаго, а самцы становятся стерильными при длительном воздействии холода.

Другим ключевым процессом, в котором задействован *Hsp67Bc*, является макроаутофагия. При помощи цитологических методов нами было показано, что у нуль-аллельных по *Hsp67Bc* мух наблюдается некоторое увеличение количества аутофагических вакуолей в нейронах центральной нервной системы в присутствии *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop, а также в яичниках при содержании на стандартном и безбелковом корме. Это может указывать на небольшое усиление макроаутофагии в этих органах, что потенциально является причиной увеличения продолжительности жизни *D. melanogaster* с делецией *Hsp67Bc*. Помимо увеличения количества аутофагических вакуолей, нами впервые было выявлено

увеличение размера аутолизосом в нейронах мух с делецией *Hsp67Bc*, что свидетельствует о нарушении этапа связывания лизосом с аутофагосомами.

Таким образом, из результатов настоящей работы следует, что *Hsp67Bc* участвует в регуляции процесса макроаутофагии на стадии созревания аутофагосом и играет важную роль в обеспечении устойчивости дрозофил к воздействию пониженной температуры. Полученные данные значительно расширяют понимание функций этого малого белка теплового шока в организме *D. melanogaster*.

ВЫВОДЫ

1. Делеция гена *Hsp67Bc*, полученная методом неточного вырезания *P*-элемента, приводит к увеличению средней продолжительности жизни *D. melanogaster* на 34–35% в нормальных условиях (24–25 °С) и до 11% при повышенной температуре (29 °С) и не оказывает влияния на плодовитость мух.

2. После кратковременного теплового стресса (37 °С, 2 ч) выживаемость личинок и куколок, а также плодовитость самок, нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc*, достоверно не снижается.

3. Впервые показано, что *Hsp67Bc* необходим для устойчивости *D. melanogaster* к кратковременному и длительному воздействию пониженной температуры (0 °С). Нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* имаго характеризуются замедленным восстановлением после холодовой комы при 0 °С и пониженной выживаемостью.

4. На модели глаза дрозофилы с эктопической экспрессией гена, кодирующего мутантный Ataxin-3 человека с удлинённым полиглутаминовым трактом, показано, что отсутствие гена *Hsp67Bc* увеличивает деградацию фасеток, что характерно для дегенерации глаза *D. melanogaster*.

5. У нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух увеличивается количество аутофагических вакуолей в яичниках в условиях белкового голодания и в нейронах центральной нервной системы в присутствии бактерий *Wolbachia*.

6. На ультраструктурном уровне впервые показано, что *Hsp67Bc* играет важную роль в процессе макроаутофагии на стадии созревания аутофагосом в нейронах центральной нервной системы в присутствии бактерий *Wolbachia*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2007. – 127 с.
2. Aguila J.R., Suszko J., Gibbs A.G., Hoshizaki D.K. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster* // J. Exp. Biol. – 2007. – Vol. 210. – № 6. – P. 956–963.
3. Alroy J., Lyons J.A. Lysosomal Storage Diseases // J. Inborn Errors Metab. Screen. – 2014. – Vol. 2. – P. 232640981351766.
4. Amano A., Nakagawa I., Yoshimori T. Autophagy in Innate Immunity against Intracellular Bacteria // J. Biochem. – 2006. – Vol. 140. – № 2. – P. 161–166.
5. Andersen M.K., Overgaard J. The central nervous system and muscular system play different roles for chill coma onset and recovery in insects // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. Elsevier, – 2019. – Vol. 233. – № March. – P. 10–16.
6. Arakaki N., Miyoshi T., Noda H. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta) // Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci. – 2001. – Vol. 268. – № 1471. – P. 1011–1016.
7. Arndt V., Dick N., Tawo R., Dreiseidler M., Wenzel D., Hesse M., Fürst D.O., Saftig P., Saint R., Fleischmann B.K., Hoch M., Höhfeld J. Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance // Curr. Biol. – 2010. – Vol. 20. – № 2. – P. 143–148.
8. Ashburner M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila* // Chromosoma. – 1970. – Vol. 31. – № 3. – P. 356–376.
9. Ashley C.T., Warren S.T. TRINUCLEOTIDE REPEAT EXPANSION AND HUMAN DISEASE // Annu. Rev. Genet. Annual Reviews, – 1995. – Vol. 29. – № 1. – P. 703–728.
10. Avellaneda M.J., Franke K.B., Sunderlikova V., Bukau B., Mogk A., Tans S.J. Processive extrusion of polypeptide loops by a Hsp100 disaggregase // Nature. Springer US, – 2020. – Vol. 578. – № 7794. – P. 317–320.
11. Ayme A., Tissières A. Locus 67B of *Drosophila melanogaster* contains seven, not four, closely related heat shock genes. // EMBO J. – 1985. – Vol. 4. – № 11. – P. 2949–2954.

12. Azad P., Zhou D., Russo E., Haddad G.G. Distinct Mechanisms Underlying Tolerance to Intermittent and Constant Hypoxia in *Drosophila melanogaster* // PLoS One / ed. Reitsma P.H. – 2009. – Vol. 4. – № 4. – P. e5371.
13. Bainbridge S.P., Bownes M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster* // J. Embryol. Exp. Morphol. – 1981. – Vol. Vol.66. – № 1967. – P. 57–80.
14. Bar-Lavan Y., Shemesh N., Ben-Zvi A. Chaperone families and interactions in metazoa // Essays Biochem. / ed. van Oosten-Hawle P. – 2016. – Vol. 60. – № 2. – P. 237–253.
15. Barth J.M.I., Szabad J., Hafen E., Köhler K. Autophagy in *Drosophila* ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis // Cell Death Differ. – 2011. – Vol. 18. – № 6. – P. 915–924.
16. Basha E., O'Neill H., Vierling E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions // Trends Biochem. Sci. – 2012. – Vol. 37. – № 3. – P. 106–117.
17. Bastock R., St Johnston D. *Drosophila* oogenesis // Curr. Biol. – 2008. – Vol. 18. – № 23. – P. R1082–R1087.
18. Benjamini Y., Krieger A.M., Yekutieli D. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate // Biometrika. – 2006. – Vol. 93. – № 3. – P. 491–507.
19. Berendes H.D. Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes // Chromosoma. – 1968. – Vol. 24. – № 4.
20. Berendes H.D. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei* // Chromosoma. – 1965. – Vol. 17. – № 1.
21. Bjedov I., Cochemé H.M., Foley A., Wieser D., Woodling N.S., Castillo-Quan J.I., Norvaisas P., Lujan C., Regan J.C., Toivonen J.M., Murphy M.P., Thornton J., Kinghorn K.J., Neufeld T.P., Cabreiro F., Partridge L. Fine-tuning autophagy maximises lifespan and is associated with changes in mitochondrial gene expression in *Drosophila* // PLOS Genet. / ed. Larsson N.-G. Public Library of Science, – 2020. – Vol. 16. – № 11. – P. e1009083.
22. Bland J.M., Altman D.G. The logrank test // BMJ. – 2004. – Vol. 328. – № 7447. – P. 1073.
23. Brooks D., Naeem F., Stetsiv M., Goetting S.C., Bawa S., Green N., Clark C., Bashirullah A., Geisbrecht E.R. *Drosophila* NUAKE functions with Starvin/BAG3 in

autophagic protein turnover // PLOS Genet. / ed. Cox G.A. Public Library of Science, – 2020. – Vol. 16. – № 4. – P. e1008700.

24. Carbajal M.E., Valet J.P., Charest P.M., Tanguay R.M. Purification of *Drosophila* hsp 83 and immunoelectron microscopic localization. // Eur. J. Cell Biol. – 1990. – Vol. 52. – № 1. – P. 147–156.

25. Carra S., Boncoraglio A., Kanon B., Brunsting J.F., Minoia M., Rana A., Vos M.J., Seidel K., Sibon O.C.M., Kampinga H.H. Identification of the *Drosophila* Ortholog of HSPB8 // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – № 48. – P. 37811–37822.

26. Chen B., Retzlaff M., Roos T., Frydman J. Cellular strategies of protein quality control. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, – 2011. – Vol. 3. – № 8. – P. a004374.

27. Chen J., Xie C., Tian L., Hong L., Wu X., Han J. Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 107. – № 48. – P. 20774–20779.

28. Chen K.Y., Lu J., Liu A.Y.-C. The Activation of Trans-Acting Factors in Response to Hypo- and Hyper-Osmotic Stress in Mammalian Cells. – 2000. – P. 141–155.

29. Chen Y., Yu L. Recent progress in autophagic lysosome reformation // Traffic. – 2017. – Vol. 18. – № 6. – P. 358–361.

30. Chrostek E., Marialva M.S.P., Esteves S.S., Weinert L.A., Martinez J., Jiggins F.M., Teixeira L. *Wolbachia* Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis // PLoS Genet. / ed. Malik H.S. – 2013. – Vol. 9. – № 12. – P. e1003896.

31. Chrostek E., Teixeira L. Mutualism Breakdown by Amplification of *Wolbachia* Genes // PLOS Biol. / ed. Malik H.S. Public Library of Science, – 2015. – Vol. 13. – № 2. – P. e1002065.

32. Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., Partridge L. Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate Protein // Science (80-.). – 2001. – Vol. 292. – № 5514. – P. 104–106.

33. Clark M.E., Anderson C.L., Cande J., Karr T.L. Widespread Prevalence of *Wolbachia* in Laboratory Stocks and the Implications for *Drosophila* Research // Genetics. – 2005. – Vol. 170. – № 4. – P. 1667–1675.

34. Colinet H., Hoffmann A. Gene and protein expression of *Drosophila* Starvin during cold stress and recovery from chill coma // *Insect Biochem. Mol. Biol.* Elsevier Ltd, – 2010. – Vol. 40. – № 5. – P. 425–428.
35. Colinet H., Lee S.F., Hoffmann A. Knocking down expression of Hsp22 and Hsp23 by RNA interference affects recovery from chill coma in *Drosophila melanogaster* // *J. Exp. Biol.* – 2010a. – Vol. 213. – № 24. – P. 4146–4150.
36. Colinet H., Lee S.F., Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster* // *FEBS J.* – 2010b. – Vol. 277. – № 1. – P. 174–185.
37. Colinet H., Lee S.F., Hoffmann A. Functional Characterization of the Frost Gene in *Drosophila melanogaster*: Importance for Recovery from Chill Coma // *PLoS One* / ed. Dworkin I. – 2010c. – Vol. 5. – № 6. – P. e10925.
38. Colinet H., Siaussat D., Bozzolan F., Bowler K. Rapid decline of cold tolerance at young age is associated with expression of stress genes in *Drosophila melanogaster*. // *J. Exp. Biol.* – 2013. – Vol. 216. – № Pt 2. – P. 253–259.
39. Corces V., Holmgren R., Freund R., Morimoto R., Meselson M. Four heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* coded within a 12-kilobase region in chromosome subdivision 67B. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1980. – Vol. 77. – № 9. – P. 5390–5393.
40. Crippa V., Cicardi M.E., Ramesh N., Seguin S.J., Ganassi M., Bigi I., Diacci C., Zelotti E., Baratashvili M., Gregory J.M., Dobson C.M., Cereda C., Pandey U.B., Poletti A., Carra S. The chaperone HSPB8 reduces the accumulation of truncated TDP-43 species in cells and protects against TDP-43-mediated toxicity // *Hum. Mol. Genet.* – 2016. – Vol. 25. – № 18. – P. 3908–3924.
41. Csizmadia T., Juhász G. Crinophagy mechanisms and its potential role in human health and disease // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier B.V., – 2020. – Vol. 172. – P. 239–255.
42. Csizmadia T., Lőrincz P., Hegedűs K., Széplaki S., Lőw P., Juhász G. Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila* // *J. Cell Biol.* Rockefeller University Press, – 2018. – Vol. 217. – № 1. – P. 361–374.
43. Deehan M., Lin W., Blum B., Emili A., Frydman H. Intracellular Density of *Wolbachia* Is Mediated by Host Autophagy and the Bacterial Cytoplasmic Incompatibility

Gene *cifB* in a Cell Type-Dependent Manner in *Drosophila melanogaster* // MBio / ed. Teixeira L., McFall-Ngai M.J. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1–19.

44. Drummond-Barbosa D., Spradling A.C. Stem Cells and Their Progeny Respond to Nutritional Changes during *Drosophila* Oogenesis // Dev. Biol. United States, – 2001. – Vol. 231. – № 1. – P. 265–278.

45. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – Vol. 51. – № 6. – P. 2145–2165.

46. Duran E.C., Weaver C.L., Lucius A.L. Comparative Analysis of the Structure and Function of AAA+ Motors ClpA, ClpB, and Hsp104: Common Threads and Disparate Functions // Front. Mol. Biosci. – 2017. – Vol. 4. – № AUG. – P. 1–19.

47. Ellis J. Proteins as molecular chaperones // Nature. – 1987. – Vol. 328. – № 6129. – P. 378–379.

48. Eskelinen E.-L. Maturation of Autophagic Vacuoles in Mammalian Cells // Autophagy. Taylor and Francis Inc., – 2005. – Vol. 1. – № 1. – P. 1–10.

49. Fan F., Duan Y., Yang F., Trexler C., Wang H., Huang L., Li Y., Tang H., Wang G., Fang X., Liu J., Jia N., Chen J., Ouyang K. Deletion of heat shock protein 60 in adult mouse cardiomyocytes perturbs mitochondrial protein homeostasis and causes heart failure // Cell Death Differ. Springer US, – 2020. – Vol. 27. – № 2. – P. 587–600.

50. Feder M.E., Hofmann G.E. HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology // Annu. Rev. Physiol. – 1999. – Vol. 61. – № 1. – P. 243–282.

51. Festa B.P., Chen Z., Berquez M., Debaix H., Tokonami N., Prange J.A., Hoek G. Van De, Alessio C., Raimondi A., Nevo N., Giles R.H., Devuyst O., Luciani A. Impaired autophagy bridges lysosomal storage disease and epithelial dysfunction in the kidney // Nat. Commun. Springer US, – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 161.

52. Fu X. Insights into How Small Heat Shock Proteins Bind a Great Diversity of Substrate Proteins: A Super-Transformer Model // The Big Book on Small Heat Shock

Proteins / ed. Tanguay R.M., Hightower L.E. Cham: Springer International Publishing, – 2015. – P. 101–117.

53. Galluzzi L., Pietrocola F., Levine B., Kroemer G. Metabolic Control of Autophagy // Cell. Elsevier Inc., – 2014. – Vol. 159. – № 6. – P. 1263–1276.

54. Goto S.G., Kimura M.T. Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila* // J. Insect Physiol. – 1998. – Vol. 44. – № 12. – P. 1233–1239.

55. Graze R.M., Tzeng R.-Y., Howard T.S., Arbeitman M.N. Perturbation of IIS/TOR signaling alters the landscape of sex-differential gene expression in *Drosophila* // BMC Genomics. BMC Genomics, – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 893.

56. Groppe D.M., Urbach T.P., Kutas M. Mass univariate analysis of event-related brain potentials/fields I: A critical tutorial review // Psychophysiology. Blackwell Publishing Inc., – 2011. – Vol. 48. – № 12. – P. 1711–1725.

57. Hao X., Zhang S., Timakov B., Zhang P. The Hsp27 gene is not required for *Drosophila* development but its activity is associated with starvation resistance // Cell Stress Chaperones. – 2007. – Vol. 12. – № 4. – P. 364.

58. Haslbeck M., Vierling E. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. // J. Mol. Biol. Elsevier Ltd, – 2015. – Vol. 427. – № 7. – P. 1537–1548.

59. Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity // J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., – 2019. – Vol. 294. – № 6. – P. 2121–2132.

60. Hayer-Hartl M. From chaperonins to Rubisco assembly and metabolic repair // Protein Sci. – 2017. – Vol. 26. – № 12. – P. 2324–2333.

61. He C., Klionsky D.J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy // Annu. Rev. Genet. – 2009. – Vol. 43. – № 1. – P. 67–93.

62. Heddi A., Grenier A.-M., Khatchadourian C., Charles H., Nardon P. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1999. – Vol. 96. – № 12. – P. 6814 LP – 6819.

63. Hemmingsen S.M. What is a chaperonin? // Nature. – 1992. – Vol. 357. – № 6380. – P. 650–650.

64. Hercus M.J., Loeschcke V., Rattan S.I.S.S. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress // *Biogerontology*. Netherlands, – 2003. – Vol. 4. – № 3. – P. 149–156.
65. Hodson S., Marshall J.J.T., Burston S.G. Mapping the road to recovery: The ClpB/Hsp104 molecular chaperone // *J. Struct. Biol.* Elsevier Inc., – 2012. – Vol. 179. – № 2. – P. 161–171.
66. Horwich A.L. Protein folding in the cell: an inside story // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17. – № 10. – P. 1211–1216.
67. Hosler J.S., Burns J.E., Esch H.E. Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill-coma // *J. Insect Physiol.* – 2000. – Vol. 46. – № 5. – P. 621–627.
68. Hou Y.-C.C., Chittaranjan S., Barbosa S.G., McCall K., Gorski S.M. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis // *J. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 182. – № 6. – P. 1127–1139.
69. Huang L.-H., Wang H.-S., Kang L. Different evolutionary lineages of large and small heat shock proteins in eukaryotes // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18. – № 10. – P. 1074–1076.
70. Izquierdo J.I. How does *Drosophila melanogaster* overwinter? // *Entomol. Exp. Appl.* – 1991. – Vol. 59. – № 1. – P. 51–58.
71. Jabłońska J., Dubińska-Magiera M., Jagla T., Jagla K., Daczewska M. *Drosophila Hsp67Bc* hot-spot variants alter muscle structure and function // *Cell. Mol. Life Sci.* Springer International Publishing, – 2018. – Vol. 75. – № 23. – P. 4341–4356.
72. Jagla T., Dubińska-Magiera M., Poovathumkadavil P., Daczewska M., Jagla K. Developmental Expression and Functions of the Small Heat Shock Proteins in *Drosophila* // *Int. J. Mol. Sci.* MDPI AG, – 2018. – Vol. 19. – № 11. – P. 3441.
73. Juenemann K., Reits E.A. Alternative Macroautophagic Pathways // *Int. J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–8.
74. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19. – № 21. – P. 5720–5728.

75. Kakkar V., Meister-Broekema M., Minoia M., Carra S., Kampinga H.H. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response // *Dis. Model. Mech. Company of Biologists Ltd*, – 2014. – Vol. 7. – № 4. – P. 421–434.
76. Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A., Cheetham M.E., Chen B., Hightower L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins // *Cell Stress Chaperones*. – 2009. – Vol. 14. – № 1. – P. 105–111.
77. Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14. – № 10. – P. 885–890.
78. Kim M., Park H.L., Park H.-W., Ro S.-H., Nam S.G., Reed J.M., Guan J.-L., Lee J.H. *Drosophila* Fip200 is an essential regulator of autophagy that attenuates both growth and aging // *Autophagy*. – 2013. – Vol. 9. – № 8. – P. 1201–1213.
79. Kirchner P., Bourdenx M., Madrigal-Matute J., Tiano S., Diaz A., Bartholdy B.A., Will B., Cuervo A.M. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs // *PLOS Biol.* / ed. Simonsen A. Public Library of Science, – 2019. – Vol. 17. – № 5. – P. e3000301.
80. Klionsky D.J., Cuervo A.M., Seglen P.O. Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human // *Autophagy*. – 2007. – Vol. 3. – № 3. – P. 181–206.
81. Klionsky D.J., Eskelinen E.-L., Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused // *Autophagy*. – 2014. – Vol. 10. – № 4. – P. 549–551.
82. Königer A., Grath S. Transcriptome Analysis Reveals Candidate Genes for Cold Tolerance in *Drosophila ananassae* // *Genes (Basel)*. – 2018. – Vol. 9. – № 12. – P. 624.
83. Koumoto Y., Shimada T., Kondo M., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Chloroplasts Have a Novel Cpn10 in Addition to Cpn20 as Co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – № 32. – P. 29688–29694.
84. Kouroku Y., Fujita E., Tanida I., Ueno T., Isoai A., Kumagai H., Ogawa S., Kaufman R.J., Kominami E., Momoi T. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14. – № 2. – P. 230–239.

85. Kremer B., Goldberg P., Andrew S.E., Theilmann J., Telenius H., Zeisler J., Squitieri F., Lin B., Bassett A., Almqvist E., Bird T.D., Hayden M.R. A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: The Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats // *N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society*, – 1994. – Vol. 330. – № 20. – P. 1401–1406.
86. Kumar C.M.S., Mande S.C., Mahajan G. Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors // *Cell Stress Chaperones. Cell Stress and Chaperones*, – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 555–574.
87. Kwok A.S., Phadwal K., Turner B.J., Oliver P.L., Raw A., Simon A.K., Talbot K., Agashe V.R. HspB8 mutation causing hereditary distal motor neuropathy impairs lysosomal delivery of autophagosomes // *J. Neurochem.* – 2011. – Vol. 119. – № 6. – P. 1155–1161.
88. Lamark T., Johansen T. Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy // *Int. J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–21.
89. Larburu N., Adams C.J., Chen C.-S., Nowak P.R., Ali M.M.U. Mechanism of Hsp70 specialized interactions in protein translocation and the unfolded protein response // *Open Biol. Royal Society Publishing*, – 2020. – Vol. 10. – № 8. – P. 200089.
90. Le Bourg É. Using *Drosophila melanogaster* to study the positive effects of mild stress on aging // *Exp. Gerontol. Elsevier Inc.*, – 2011. – Vol. 46. – № 5. – P. 345–348.
91. Leenders H.J., Berendes H.D. The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in *Drosophila* // *Chromosoma*. – 1972. – Vol. 37. – № 4.
92. Lescat L., Véron V., Mourot B., Péron S., Chenais N., Dias K., Riera-Heredia N., Beaumatin F., Pinel K., Priault M., Panserat S., Salin B., Guiguen Y., Bobe J., Herpin A., Seiliez I. Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish // *Mol. Biol. Evol.* / ed. Chang B. Oxford University Press, – 2020. – Vol. 37. – № 10. – P. 2887–2899.
93. Li J., Buchner J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery // *Biomedical Journal*. – 2013. – Vol. 36. – № 3. – P. 106–117.

94. Li X.-C., Hu Q.-K., Chen L., Liu S., Su S., Tao H., Zhang L.-N., Sun T., He L.-J. HSPB8 Promotes the Fusion of Autophagosome and Lysosome during Autophagy in Diabetic Neurons // *Int. J. Med. Sci.* – 2017. – Vol. 14. – № 13. – P. 1335–1341.
95. Lin J.H., Walter P., Yen T.S.B. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2008. – Vol. 3. – № 1. – P. 399–425.
96. Lin Y.-J., Seroude L., Benzer S. Extended Life-Span and Stress Resistance in the *Drosophila* Mutant *methuselah* // *Science* (80-.). – 1998. – Vol. 282. – № 5390. – P. 943–946.
97. Lindquist S. THE HEAT-SHOCK RESPONSE // *Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews*, – 1986. – Vol. 55. – № 1. – P. 1151–1191.
98. Lopez T., Dalton K., Frydman J. The Mechanism and Function of Group II Chaperonins // *J. Mol. Biol. Academic Press*, – 2015. – Vol. 427. – № 18. – P. 2919–2930.
99. Lőrincz P., Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion // *J. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 432. – № 8. – P. 2462–2482.
100. Lőrincz P., Mauvezin C., Juhász G. Exploring Autophagy in *Drosophila* // *Cells*. – 2017. – Vol. 6. – № 3. – P. 22.
101. Macario A.J.L., Grippo T.M., de Macario E.C. Genetic disorders involving molecular-chaperone genes: A perspective // *Genet. Med.* – 2005. – Vol. 7. – № 1. – P. 3–12.
102. MacMillan H.A., Knee J.M., Dennis A.B., Udaka H., Marshall K.E., Merritt T.J.S., Sinclair B.J. Cold acclimation wholly reorganizes the *Drosophila melanogaster* transcriptome and metabolome // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 28999.
103. Malkeyeva D.A., Kiseleva E.V. THE FUNCTIONAL ROLE OF SMALL HEAT SHOCK PROTEIN Hsp67Bc IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* // *Tsitologiya*. – 2016. – Vol. 58. – № 4. – P. 272–276.
104. Malmendal A., Overgaard J., Bundy J.G., Sørensen J.G., Nielsen N.C., Loeschcke V., Holmstrup M. Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila* // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – № 1. – P. R205–R212.
105. Marsh J.L., Thompson L.M. *Drosophila* in the Study of Neurodegenerative Disease // *Neuron*. – 2006. – Vol. 52. – № 1. – P. 169–178.

106. Masoro E.J. Caloric restriction and aging: an update // *Exp. Gerontol.* – 2000. – Vol. 35. – № 3. – P. 299–305.
107. Mauvezin C., Nagy P., Juhász G., Neufeld T.P. Autophagosome–lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 7007.
108. McGrath M.J., Eramo M.J., Gurung R., Sriratana A., Gehrig S.M., Lynch G.S., Lourdes S.R., Koentgen F., Feeney S.J., Lazarou M., McLean C.A., Mitchell C.A. Defective lysosome reformation during autophagy causes skeletal muscle disease. // *J. Clin. Invest.* – 2021. – Vol. 131. – № 1.
109. Merkey A.B., Wong C.K., Hoshizaki D.K., Gibbs A.G. Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol. Elsevier Ltd*, – 2011. – Vol. 57. – № 10. – P. 1437–1445.
110. Min K.-T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997. – Vol. 94. – № 20. – P. 10792–10796.
111. Mogk A., Kummer E., Bukau B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation // *Front. Mol. Biosci.* – 2015. – Vol. 2. – № MAY. – P. 1–10.
112. Mogk A., Ruger-Herreros C., Bukau B. Cellular Functions and Mechanisms of Action of Small Heat Shock Proteins // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2019. – Vol. 73. – № 1. – P. 89–110.
113. Mokry D.Z., Abrahão J., Ramos C.H.I. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates // *An. Acad. Bras. Cienc.* – 2015. – Vol. 87. – № 2 suppl. – P. 1273–1292.
114. Morcillo G., Diez J.L., Carbajal M.E., Tanguay R.M. HSP90 associates with specific heat shock puffs (hsr ω) in polytene chromosomes of *Drosophila* and *Chironomus* // *Chromosoma.* – 1993. – Vol. 102. – № 9. – P. 648–659.
115. Morrow G., Heikkila J.J., Tanguay R.M. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* // *Cell Stress Chaperones.* – 2006. – Vol. 11. – № 1. – P. 51.

116. Morrow G., Tanguay R.M. *Drosophila* Small Heat Shock Proteins: An Update on Their Features and Functions / ed. Tanguay R.M., Hightower L.E. Cham: Springer International Publishing, – 2015. – Vol. 8. – P. 579–606.
117. Nagy P., Varga Á., Pircs K., Hegedűs K., Juhász G. Myc-Driven Overgrowth Requires Unfolded Protein Response-Mediated Induction of Autophagy and Antioxidant Responses in *Drosophila melanogaster* // PLoS Genet. / ed. Edgar B. – 2013. – Vol. 9. – № 8. – P. e1003664.
118. Nath S., Dancourt J., Shteyn V., Puente G., Fong W.M., Nag S., Bewersdorf J., Yamamoto A., Antonny B., Melia T.J. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3 // Nat. Cell Biol. Nature Publishing Group, – 2014. – Vol. 16. – № 5. – P. 415–424.
119. Neufeld T.P. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds // Curr. Opin. Cell Biol. – 2010. – Vol. 22. – № 2. – P. 157–168.
120. Newman C.E., Toxopeus J., Udaka H., Ahn S., Martynowicz D.M., Graether S.P., Sinclair B.J., Percival-Smith A. CRISPR-induced null alleles show that Frost protects *Drosophila melanogaster* reproduction after cold exposure // J. Exp. Biol. – 2017. – Vol. 220. – № 18. – P. 3344–3354.
121. Nezis I.P., Lamark T., Velentzas A.D., Rusten T.E., Bjørkøy G., Johansen T., Papassideri I.S., Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Stenmark H., Brech A. Cell death during *Drosophila melanogaster* early oogenesis is mediated through autophagy // Autophagy. United States, – 2009. – Vol. 5. – № 3. – P. 298–302.
122. Nishimura T., Tooze S.A. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation // Cell Discov. Springer Nature, – 2020. – Vol. 6. – № 1. – P. 32.
123. O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M., Karr T.L., Robertson H.M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 89. – № 7. – P. 2699–2702.
124. Oku M., Sakai Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries // BioEssays. – 2018. – Vol. 40. – № 6. – P. 1800008.

125. Overgaard J., MacMillan H.A. The Integrative Physiology of Insect Chill Tolerance // *Annu. Rev. Physiol.* – 2017. – Vol. 79. – № 1. – P. 187–208.
126. Pandey U.B., Nichols C.D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery // *Pharmacol. Rev.* 2011/03/17 / ed. Barker E.L. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, – 2011. – Vol. 63. – № 2. – P. 411–436.
127. Parsell D.A., Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. // *Annu. Rev. Genet. United States*, – 1993. – Vol. 27. – P. 437–496.
128. Parsell D.A., Taulien J., Lindquist S. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci. England*, – 1993. – Vol. 339. – № 1289. – P. 276–279.
129. Parzych K.R., Klionsky D.J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20. – № 3. – P. 460–473.
130. Paul A., Rao S., Mathur S. The α -Crystallin Domain Containing Genes: Identification, Phylogeny and Expression Profiling in Abiotic Stress, Phytohormone Response and Development in Tomato (*Solanum lycopersicum*) // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7.
131. Pauli D., Tonka C.-H. A *Drosophila* heat shock gene from locus 67B is expressed during embryogenesis and pupation // *J. Mol. Biol.* – 1987. – Vol. 198. – № 2. – P. 235–240.
132. Pelham H.R.B. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila Hsp 70* heat-shock gene // *Cell.* – 1982. – Vol. 30. – № 2. – P. 517–528.
133. Ponton F., Chapuis M.P., Pernice M., Sword G.A., Simpson S.J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* Elsevier Ltd, – 2011. – Vol. 57. – № 6. – P. 840–850.
134. Rajamohan A., Sinclair B.J. Short-term hardening effects on survival of acute and chronic cold exposure by *Drosophila melanogaster* larvae // *J. Insect Physiol.* – 2008. – Vol. 54. – № 4. – P. 708–718.

135. Raut S., Mallik B., Parichha A., Amrutha V., Sahi C., Kumar V. RNAi-Mediated Reverse Genetic Screen Identified *Drosophila* Chaperones Regulating Eye and Neuromuscular Junction Morphology // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. – 2017. – Vol. 7. – № 7. – P. 2023–2038.
136. Rich J.T., Neely J.G., Paniello R.C., Voelker C.C.J., Nussenbaum B., Wang E.W. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves // *Otolaryngol. Neck Surg.* Mosby Inc., – 2010. – Vol. 143. – № 3. – P. 331–336.
137. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* // *Experientia*. – 1962. – Vol. 18. – № 12. – P. 571–573.
138. Ritossa F.M. Behaviour of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila* // *Exp. Cell Res.* – 1964. – Vol. 36. – № 3. – P. 515–523.
139. Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. The Hsp70 chaperone network // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, – 2019. – Vol. 20. – № 11. – P. 665–680.
140. Rubin T., Huynh J.-R. Mosaic Analysis in the *Drosophila melanogaster* Ovary. – 2015. – P. 29–55.
141. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 14. – № 10. – P. 630–642.
142. Saji H., Iizuka R., Yoshida T., Abe T., Kidokoro S., Ishii N., Yohda M. Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7 // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 2008. – Vol. 71. – № 2. – P. 771–782.
143. Sarikaya D.P., Belay A.A., Ahuja A., Dorta A., Green D.A., Extavour C.G. The roles of cell size and cell number in determining ovariole number in *Drosophila* // *Dev. Biol.* Elsevier Inc., – 2012. – Vol. 363. – № 1. – P. 279–289.
144. Sarkar S., Singh M.D., Yadav R., Arunkumar K.P., Pittman G.W. Heat shock proteins: Molecules with assorted functions // *Front. Biol. (Beijing)*. – 2011. – Vol. 6. – № 4. – P. 312.
145. Sarup P., Sørensen P., Loeschcke V. The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat

shock proteins extend lifespan // *Exp. Gerontol.* Elsevier Inc., – 2014. – Vol. 50. – № 1. – P. 34–39.

146. Schulze R.J., Weller S.G., Schroeder B., Krueger E.W., Chi S., Casey C.A., McNiven M.A. Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. // *J. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 203. – № 2. – P. 315–326.

147. Sinclair B.J., Roberts S.P. Acclimation, shock and hardening in the cold // *J. Therm. Biol.* – 2005. – Vol. 30. – № 8. – P. 557–562.

148. Slatko B.E., Taylor M.J., Foster J.M. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target // *Symbiosis.* – 2010. – Vol. 51. – № 1. – P. 55–65.

149. Sood R., Porter A.C., Ma K., Quilliam L.A., Wek R.C. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 346 Pt 2. – P. 281–293.

150. Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins // *Ecol. Lett.* – 2003. – Vol. 6. – № 11. – P. 1025–1037.

151. Sorger P.K., Pelham H.R. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6. – № 10. – P. 3035–3041.

152. Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. *WOLBACHIA PIPIENTIS*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. – 1999.

153. Strunov A., Kiseleva E. *Drosophila melanogaster* brain invasion: pathogenic *Wolbachia* in central nervous system of the fly // *Insect Sci.* – 2016. – Vol. 23. – № 2. – P. 253–264.

154. Strunov A., Kiseleva E., Gottlieb Y. Spatial and temporal distribution of pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop in *Drosophila melanogaster* central nervous system under different temperature conditions // *J. Invertebr. Pathol.* Elsevier Inc., – 2013. – Vol. 114. – № 1. – P. 22–30.

155. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 and Autophagy. – 2008. – P. 77–88.

156. Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.-P., Yin C.-M., Garofalo R.S. A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function // *Science* (80-.). – 2001. – Vol. 292. – № 5514. – P. 107–110.

157. Taylor M.J., Bandi C., Hoerauf A. *Wolbachia*. Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. – 2005. – P. 245–284.
158. Telonis-Scott M., van Heerwaarden B., Johnson T.K., Hoffmann A.A., Sgrò C.M. New levels of transcriptome complexity at upper thermal limits in wild *Drosophila* revealed by exon expression analysis // *Genetics*. – 2013. – Vol. 195. – № 3. – P. 809–830.
159. Terasaki M., Runft L.L., Hand A.R. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. // *Mol. Biol. Cell*. – 2001. – Vol. 12. – № 4. – P. 1103–1116.
160. Tissières A., Mitchell H.K., Tracy U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs // *J. Mol. Biol.* – 1974. – Vol. 84. – № 3. – P. 389–398.
161. Tower J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging // *Exp. Gerontol.* – 2011. – Vol. 46. – № 5. – P. 355–362.
162. Tracy K., Baehrecke E.H. The Role of Autophagy in *Drosophila* Metamorphosis // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2013. – Vol. 103. – P. 101–125.
163. Truitt A.M., Kapun M., Kaur R., Miller W.J. *Wolbachia* modifies thermal preference in *Drosophila melanogaster* // *Environ. Microbiol.* Blackwell Publishing Ltd, – 2019. – Vol. 21. – № 9. – P. 3259–3268.
164. Voronin D., Cook D.A.N., Steven A., Taylor M.J. Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 109. – № 25. – P. E1638–E1646.
165. Vos M.J., Carra S., Kanon B., Bosveld F., Klauke K., Sibon O.C.M., Kampinga H.H. Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan // *Aging Cell*. – 2016. – Vol. 15. – № 2. – P. 217–226.
166. Wang J., Wang Z., Zhang Z., Hua Q., Wang M., Shi C., Xue L., Zhang R., Xie X. Methuselah regulates longevity via dTOR: a pathway revealed by small-molecule ligands: Figure 1 // *J. Mol. Cell Biol. United States*, – 2015. – Vol. 7. – № 3. – P. 280–282.
167. Wang L., Colodner K.J., Feany M.B. Protein Misfolding and Oxidative Stress Promote Glial-Mediated Neurodegeneration in an Alexander Disease Model // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. – № 8. – P. 2868–2877.

168. Weckman A., Di Ieva A., Rotondo F., Syro L. V., Ortiz L.D., Kovacs K., Cusimano M.D. Autophagy in the endocrine glands // *J. Mol. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 52. – № 2. – P. R151–R163.
169. Weeks A.R., Breeuwer J.A.J. *Wolbachia* –induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites // *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* – 2001. – Vol. 268. – № 1482. – P. 2245–2251.
170. Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – Vol. 6. – № 10. – P. 741–751.
171. Xiao C., Hull D., Qiu S., Yeung J., Zheng J., Barwell T., Robertson R.M., Seroude L. Expression of Heat Shock Protein 70 Is Insufficient To Extend *Drosophila melanogaster* Longevity // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. Genetics Society of America, – 2019. – Vol. 9. – № 12. – P. 4197–4207.
172. Xu T., Nicolson S., Sandow J.J., Dayan S., Jiang X., Manning J.A., Webb A.I., Kumar S., Denton D. Cp1/cathepsin L is required for autolysosomal clearance in *Drosophila*. // *Autophagy*. United States, – 2021. – Vol. 17. – № 10. – P. 2734–2749.
173. Xu Z., Tito A.J., Rui Y.-N., Zhang S. Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. // *Exp. Neurol.* – 2015. – Vol. 274. – № Pt A. – P. 25–41.
174. Yamamoto R., Palmer M., Koski H., Curtis-Joseph N., Tatar M. Aging modulated by the *Drosophila* insulin receptor through distinct structure-defined mechanisms // *Genetics* / ed. Long A. – 2021. – Vol. 217. – № 2.
175. Yano T., Mita S., Ohmori H., Oshima Y., Fujimoto Y., Ueda R., Takada H., Goldman W.E., Fukase K., Silverman N., Yoshimori T., Kurata S. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in *Drosophila* // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – № 8. – P. 908–916.
176. Zhang S., Zhou H., Yu F., Bai C., Zhao Q., He J., Liu C. Structural insight into the cooperation of chloroplast chaperonin subunits // *BMC Biol.* – 2016. – Vol. 14. – № 1. – P. 29.
177. Zhang Y., Calderwood S.K. Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: A mini-review // *Int. J. Hyperth.* – 2011. – Vol. 27. – № 5. – P. 409–414.
178. Zhao Y.G., Zhang H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes // *J. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 218. – № 3. – P. 757–770.

179. Zug R., Hammerstein P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected // PLoS One / ed. Cordaux R. – 2012. – Vol. 7. – № 6. – P. e38544.

180. Żwirowski S., Kłosowska A., Obuchowski I., Nillegoda N.B., Piróg A., Ziętkiewicz S., Bukau B., Mogk A., Liberek K. Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding // EMBO J. EMBO, – 2017. – Vol. 36. – № 6. – P. 783–796.