

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

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2022

Работа выполнена в секторе структурной биологии клетки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

Научные **Киселева Елена Владимировна**

руководители: к.б.н., ведущий научный сотрудник сектора структурной биологии клетки ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Фёдорова Светлана Александровна

к.б.н., ведущий научный сотрудник, и.о. зав. сектором генетики клеточного цикла ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные **Пасюкова Елена Генриховна**

оппоненты: д.б.н., профессор, зав. лабораторией геномной изменчивости ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва

Похолкова Галина Витальевна

д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ведущее

учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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). HSP индуцируются в ответ не только на тепловой шок, но также на широкий спектр других стрессовых факторов – 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 *D. melanogaster* показали, что нокадаун 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 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 исследования. Впервые изучен вклад гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc D. melanogaster* в формирование у мух ответа на воздействие температурного стресса на организменном уровне. Обнаружено, что *Hsp67Bc* играет важную роль в устойчивости мух к пониженной температуре и вовлечён в процесс макроаутофагии на стадии созревания аутофагосом.

Теоретическая и практическая значимость работы. 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. Основная часть результатов исследования получена автором самостоятельно.

Апробация результатов. Результаты исследования были представлены на следующих научных конференциях: VIII Всероссийский с международным участием конгресс молодых учёных-биологов «Симбиоз – Россия 2015» (Новосибирск, Россия, 2015), The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (Новосибирск, Россия, 2016), Международная конференция Хромосома 2018 (Новосибирск, Россия, 2018), 3rd International Conference “Smart Bio” (Каунас, Литва, 2019), Stress Signalling, Quality Control, Phase Separation, Aging and Disease in Proteostasis (Gordon Research Conference) (Барга, Италия, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано четыре работы в рецензируемых российских и зарубежных журналах, входящих в список ВАК.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные исходные линии и генотипы *D. melanogaster*. В работе были использованы следующие линии мух: d06009, несущая *P*-элемент в 115 п.н. до старта транскрипции гена *Hsp67Bc* (использовалась для получения линии мух с делецией *Hsp67Bc* и контрольной к ней); $y^1 w^1$; *Ki P{Δ2-3}99B*, кодирующая транспозазу; w^{1118} ; №1104, несущая драйвер GAL4 под промотором гена *glass*; две линии, несущие ген *ATXN3* человека с 27 (№33609) или с 78 (№8150) повторами CAG под промотором *UAS*. Дрозофилы содержались на стандартном кукурузно-изюмном корме.

Молекулярные методы

Выделение нуклеиновых кислот и синтез комплементарной ДНК. Выделение ДНК из целых мух, голов имаго или из мозга личинок и куколок описано в статьях Malkeyeva et al. (2020) и Malkeyeva et al. (2022a); РНК была выделена при помощи реагента ЛИРА (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Комплементарная ДНК была синтезирована с использованием обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Классическая ПЦР проводилась с использованием набора BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе BIS Thermocycler 111-02 (ООО «БИС-Н», Россия), количественная ПЦР – с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR

Blue(2×) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе LightCycler 96 (Roche) по протоколам, описанным в статьях Malkeyeva et al. (2020, 2022a).

Секвенирование ДНК. Секвенирование было проведено с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, США) по протоколу, описанному в статье Malkeyeva et al. (2020).

Методы изучения ответа на различные типы стресса

Оценка жизнеспособности и плодовитости взрослых *D. melanogaster* в нормальных условиях и при воздействии повышенной температуры. Для этих экспериментов имаго дрозофил отбирали в день выхода из куколки и подвергали одному из четырёх типов температурной обработки – постоянному содержанию при нормальной температуре (24–25 °С), постоянному содержанию при 29 °С, тепловому воздействию (37 °С, 2 ч) в возрасте 1 дня с последующим содержанием при нормальной температуре или тепловому воздействию (37 °С, 2 ч) в возрасте 7 дней с последующим содержанием при нормальной температуре. Мухи содержались в указанных условиях до гибели всех особей, с пересадкой на свежий корм каждые 1–2 дня. При этом измерялись их продолжительность жизни (ПЖ) и плодовитость (отношение числа отложенных за день яиц к числу самок, находившихся в пробирке).

Исследование воздействия повышенной и пониженной температуры на личинок и куколок *D. melanogaster*. Блуждающие личинки третьего возраста, белые предкуколки, 12-ч куколки и 48-ч куколки подвергались тепловому (37 °С, 2 ч) или холодovому (2, 4 или 12 ч при 0 °С) воздействию, после чего возвращались в нормальные условия (24–25 °С). Далее были посчитаны доли индивидов, успешно завершивших метаморфоз, в отношении к изначальному количеству отобранных для эксперимента дрозофил.

Оценка скорости восстановления, выживаемости и плодовитости взрослых мух после холодовой комы. В возрасте 4 дней имаго дрозофил подвергались воздействию холода (2, 4 или 12 ч при 0 °С), после чего возвращались в нормальные условия (24–25 °С) для восстановления. Каждые 5 мин (в случае 2- и 4-ч воздействия холода) или 10 мин (12-ч пребывание при 0 °С) подсчитывался процент восстановившихся после холодовой комы мух. Через 48 ч после окончания воздействия холода были посчитаны доли выживших мух по отношению к изначальному количеству участвовавших в эксперименте насекомых. В течение 7 дней после окончания холодового воздействия измерялась плодовитость самок.

Белковое голодание. Взрослые *D. melanogaster* в возрасте ≤ 2 ч после выхода из куколки были перенесены в пробирки с безбелковым кормом,

содержащим сахарозу (100 г/л), агар-агар (5 г/л) и метил-4-гидроксibenзоат (0,78 г/л). Корм сменялся каждый второй день.

Цитологические методы.

Препараты, полученные цитологическими методами, анализировались в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Образцы мозга 5-дневных взрослых самок дрозофил были выделены в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (Медиген, Россия), рН 7,4, после чего зафиксированы в модифицированном фиксаторе Карнуа и гибридизованы с РНК-зондом W2, комплементарным 16S рРНК бактерий *Wolbachia*, по методике, описанной в статье Strunov et al. (2013). Образцы затем были окрашены DAPI и проанализированы с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Zeiss, Германия).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Приготовление образцов мозга 5-дневных взрослых самок *D. melanogaster* производилось согласно методике Terasaki et al. (2001) и Strunov, Kiseleva (2016). Ультратонкие срезы исследовались с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) или JEM-100SX (JEOL, Япония). Подсчёт площади сечения аутофагосом и аутолизосом осуществлялся в программе ImageJ 1.49v (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Окрашивание LysoTracker Red. На пятый и пятнадцатый дни белкового голодания яичники голодавших и содержащихся на стандартном корме самок мух были диссектированы в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (Медиген, Россия), рН 7,4 и окрашены LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies, США) и DAPI по протоколу, описанному в статье Malkeyeva et al. (2022a).

Статистический анализ полученных данных.

Анализ данных проводился с использованием теста Шапиро — Уилка, логрангового критерия (Log-rank test), критерия Колмогорова — Смирнова для накопленных частот, *t*-критерия Стьюдента, *U*-критерия Манна — Уитни и критерия хи-квадрат. Различия считались статистически значимыми при значениях $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линии *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc*. Делеция в гене *Hsp67Bc* была получена методом неточного вырезания *P*-элемента, расположенного в 115 п.н. до старта транскрипции этого гена (рис. 1). В ходе скрещиваний были получены 278 линий мух с вырезавшимся *P*-элементом, из которых одна (*Hsp67Bc*-0) имела почти полную делецию гена *Hsp67Bc*, не затрагивающую другие гены. Путём секвенирования было установлено, что

присутствовали лишь последние 132 п.н. кодирующей части гена *Hsp67Bc*, в норме имеющего длину 987 п.н. Одна из линий с точно вырезанным *P*-элементом (*Hsp67Bc*-2) была выбрана в качестве контрольной.

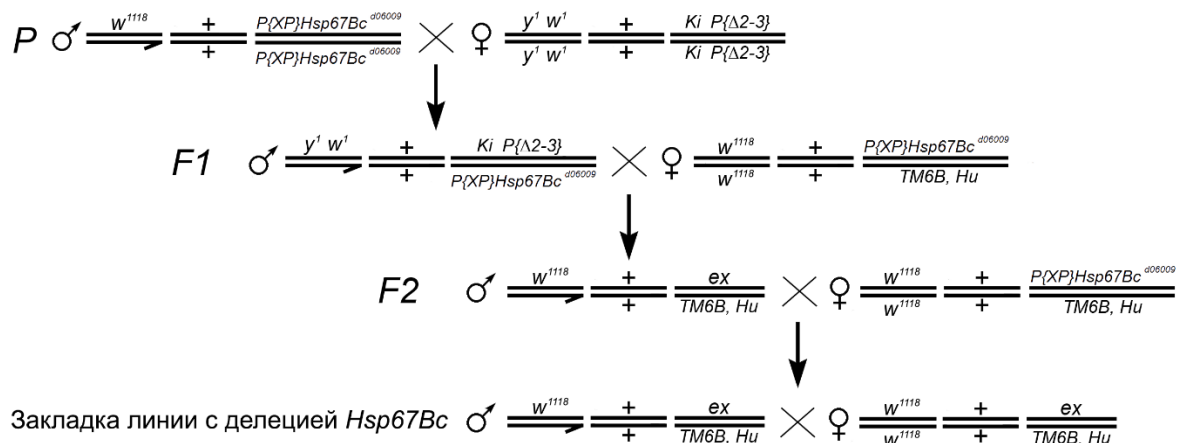


Рисунок 1. Схема скрещиваний для получения линии *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc* путём неточного вырезания *P*-элемента *XP*, расположенного в 115 п.н. до старта транскрипции *Hsp67Bc* на третьей хромосоме.

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 продолжительность жизни (ПЖ) мутантных мух в нормальных условиях (24–25 °С) была достоверно выше на 35% в случае самцов и на 34% в случае самок (рис. 2). 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 – 9,9 яиц в день на самку мутантной линии, по сравнению с 10,5 яиц на самку контрольной линии. Причиной снижения плодовитости нуль-аллельных по *Hsp67Bc* самок по сравнению с контролем, возможно, является меньшее количество овариол в их яичниках – 15–16, в сравнении с 17–18 у контрольных. Это согласуется с данными других исследователей о том, что число откладываемых *D. melanogaster* яиц находится в прямой зависимости от количества овариол (Yamamoto et al., 2021).

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, а *Hsp67Bc* активируется в ответ на

стрессовое воздействие разного рода (<https://flybase.org>; Vos et al., 2016), мы исследовали влияние делеции этого гена на жизнеспособность мух в различных стрессовых условиях. Сначала мы исследовали влияние делеции *Hsp67Bc* на устойчивость мух к повышенной температуре. Экспрессия этого гена наиболее высока на стадиях блуждающей личинки третьего возраста, белой предкуколки, 12-ч куколки и 48-ч куколки (<https://flybase.org>). В связи с этим в эксперименты, помимо имаго, были вовлечены *D. melanogaster* на этих стадиях развития.

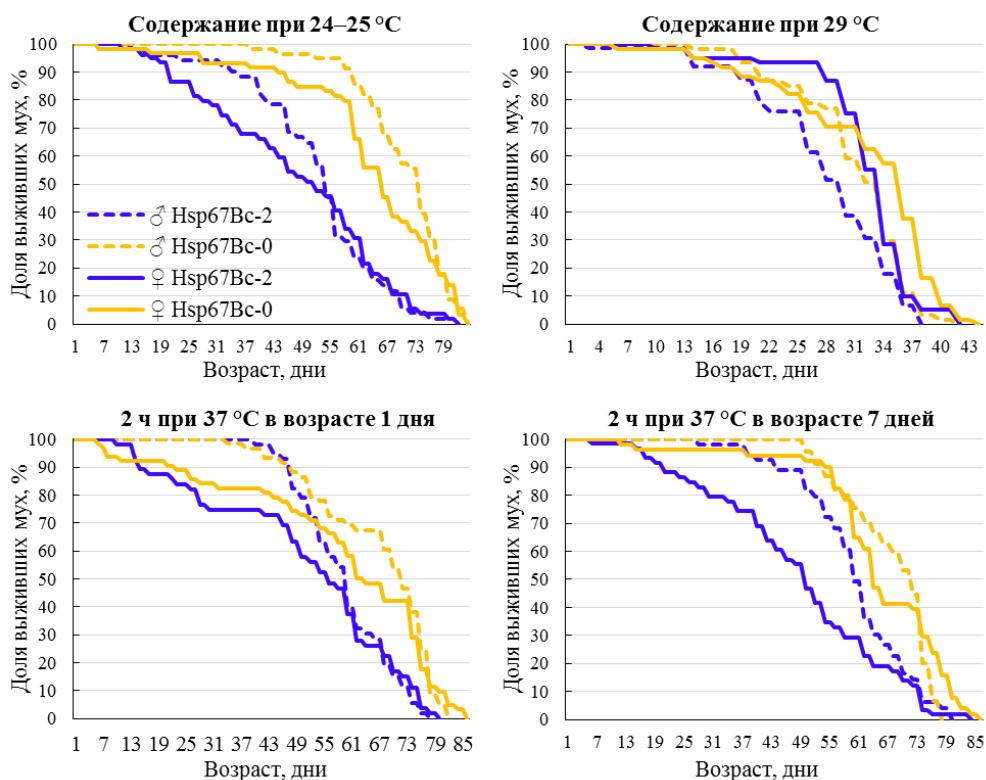


Рисунок 2. Кривые выживаемости взрослых самцов и самок *D. melanogaster* контрольной линии (*Hsp67Bc-2*) и линии с делецией в гене *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) в нормальных условиях и включающих содержание при повышенной температуре.

Процент куколок, выживших до стадии имаго после кратковременного теплового воздействия (37 °С, 2 ч), не отличался между контрольной и мутантной линиями и составлял от $95,0 \pm 2,9\%$ до 100%. Достоверные различия наблюдались между выживаемостью личинок до стадии имаго, при этом линия *Hsp67Bc-0* продемонстрировала лучшую выживаемость по сравнению с контролем: $88,9 \pm 3,1\%$ у личинок *Hsp67Bc-0*, $76,6 \pm 8,3\%$ у контроля ($p = 0,044$).

Как и в нормальных условиях, нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* имаго имели более высокую ПЖ по сравнению с мухами контрольной линии после кратковременного теплового шока (2 ч при 37 °С на 1-й или 7-й день жизни) (рис. 2). ПЖ самцов, содержащихся при 29 °С, также была выше у *Hsp67Bc-0*, чем у

контроля, но не различалась у самок. Величина различий ПЖ между линиями, однако, заметно сократилась (рис. 2). Кратковременный тепловой шок оказал на ПЖ контрольных и мутантных мух различное воздействие. Этот тип стресса увеличил ПЖ самцов и самок контрольной линии по сравнению с их ПЖ при постоянном содержании в нормальных условиях на 1,5–14,5%, однако снизил ПЖ мух нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии на 4,2–7,8% (рис. 2). Данное наблюдение может свидетельствовать о том, что, несмотря на увеличение ПЖ мух и в нормальных условиях, и при повышенной температуре (29 °С), делеция гена *Hsp67Bc* имеет негативные последствия для сопротивляемости *D. melanogaster* краткосрочному воздействию высокой температуры (37 °С).

Средняя плодовитость самок за всё время измерений достоверно не отличалась между контрольной и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линиями во всех трёх группах, однако была несколько ниже у мутантных мух, подвергавшихся тепловому шоку.

Устойчивость мух с делецией гена *Hsp67Bc* к пониженной температуре
Восстановление *D. melanogaster* после холодовой комы. Измерение скорости восстановления двигательной активности после холодовой комы является широко применяемым методом оценки устойчивости насекомых, в том числе *D. melanogaster*, к холоду (Andersen, Overgaard, 2019; Colinet et al., 2010a,b,c). Мухи контрольной линии в среднем 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. Дрозофилы нуль-аллельной по *Hsp67Bc* линии продемонстрировали замедленное на 5–15 мин по сравнению с контрольной линией восстановление двигательной активности после прекращения воздействия холода (рис. 3).

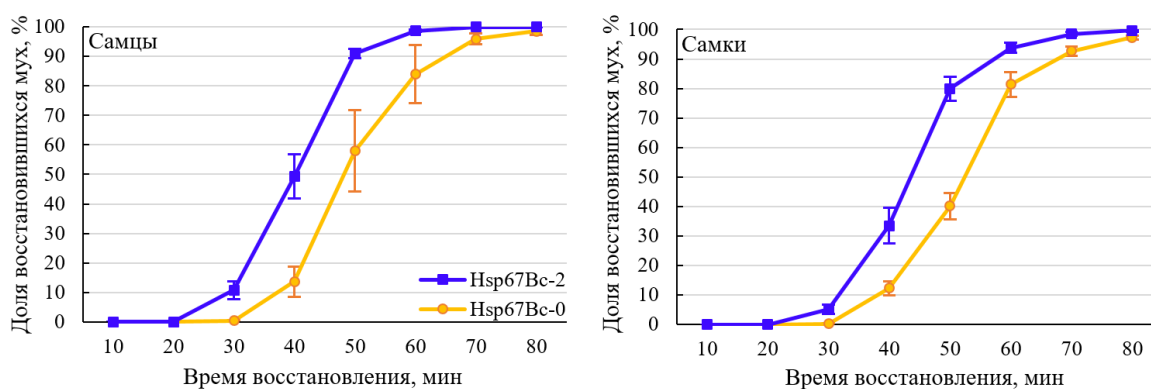


Рисунок 3. Кривые восстановления взрослых мух контрольной (*Hsp67Bc*-2) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc*-0) линий после 12-часовой холодовой комы при 0 °С. Доверительные интервалы соответствуют стандартной ошибке среднего.

Выживаемость мух на различных стадиях развития после воздействия холода. Для этих экспериментов были выбраны 4-дневные имаго и личинки и куколки на стадиях развития, исследованных при оценке выживаемости при повышенной температуре. Длительность температурной обработки составляла 2, 4 или 12 ч. 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 (рис. 4). Через 48 ч после окончания воздействия холода она составляла не менее 98% у самцов обеих линий, тогда как выживаемость самок была ниже. Кроме того, она была в 1,6–3 раза снижена у самок мутантной линии *Hsp67Bc-0* по сравнению с контрольной. Выживаемость личинок и куколок до стадии имаго после воздействия холода статистически достоверно отличалась лишь в случае белых предкуколок после 4 ч воздействия холода (выше у мутантных мух, $p = 0,008$, рис. 4).

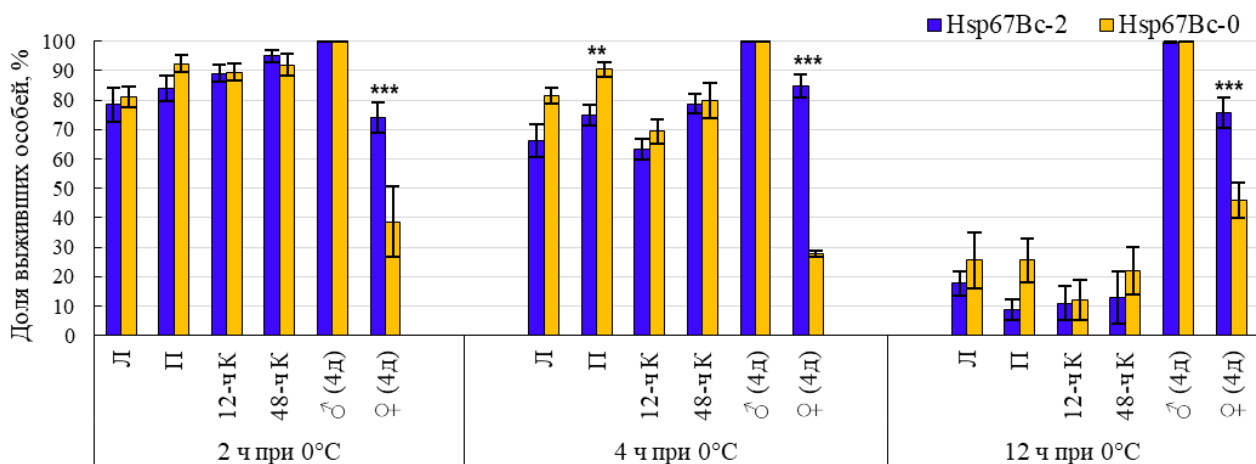


Рисунок 4. Выживаемость (%) личинок, куколок и имаго *D. melanogaster* контрольной (*Hsp67Bc-2*) и нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) линий после содержания при пониженной температуре (0 °C) разной длительности. Л – блуждающие личинки третьего возраста, П – белые предкуколки, 12-ч К – 12-ч куколки, 48-ч К – 48-ч куколки, ♂(4д) – 4-дневные самцы, ♀(4д) – 4-дневные самки. ** $0,001 < p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Для личинок регистрировалась выживаемость не только до стадии имаго, но и до стадии куколки. Этот показатель был значительно ниже у личинок мутантной линии *Hsp67Bc-0* после 2 и 4 ч пребывания на холоде по сравнению с контролем (от $95,9 \pm 1,3\%$ до $96,4 \pm 2,1\%$ у *Hsp67Bc-0* и от $98,4 \pm 1,1\%$ до 100% у контроля). 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 холодового стресса. Так, от 20% до почти 100% индивидов развивались как минимум до стадии куколки P12 (Bainbridge, Bownes,

1981), когда взрослое насекомое почти полностью сформировано. При этом перед гибелью почти все личинки контрольной линии развивались до куколки, тогда как до 29% личинок мутантной линии погибали до окукливания.

Влияние пониженной температуры на плодовитость *D. melanogaster*.

После 12-ч холодовой комы плодовитость самок обеих линий значительно снизилась по сравнению с плодовитостью самок, содержащихся в нормальных условиях (в семь раз в контрольной линии и более чем в восемь раз – в мутантной). Достоверных различий между линиями, однако, не наблюдалось.

Уровни экспрессии гена *Hsp67Bc* во время холодового стресса и восстановления после него. Количественная ПЦР показала, что в нормальных условиях экспрессия *Hsp67Bc* 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). После холодового стресса, однако, уровень экспрессии *Hsp67Bc* не изменился ни у личинок, ни у предкуколок, тогда как у взрослых мух он возрос в 2,5–6,1 раза. Это может свидетельствовать о том, что у личинок и куколок продукт гена *Hsp67Bc* выполняет не связанную с защитой от холода функцию, что подтверждается лишь небольшими различиями в выживаемости контрольных и нуль-аллельных по *Hsp67Bc* личинок и куколок.

У имаго *D. melanogaster* во время пребывания в 12-ч холодовой коме уровень экспрессии гена *Hsp67Bc* достоверно не отличался от такового в нормальных условиях (рис. 5). При этом экспрессия этого гена у самок была в 2,5 раза ниже, чем у самцов ($p = 0,005$). Во время восстановления после холодовой комы экспрессия *Hsp67Bc* значительно возросла у самцов уже через 25 мин, а у самок – через 40 мин после прекращения воздействия холода, т.е. у самок её повышение происходило с запозданием. Максимум и у самцов, и у самок уровень РНК *Hsp67Bc* достиг к 90 мин восстановления, что соответствует времени восстановления двигательной активности 100% мух контрольной линии *Hsp67Bc-2* после холодовой комы (рис. 3 и 5). Паттерн изменения экспрессии *Hsp67Bc*, таким образом, коррелирует с кривыми восстановления мух (рис. 3), что, предположительно, указывает на важную роль *Hsp67Bc* в процессах устранения полученных при воздействии холода внутриклеточных повреждений.

Скорость восстановления после холодовой комы зависит от скорости восстановления функций 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. Как известно, *D. melanogaster* зимуют на стадии имаго, и самцы становятся стерильными при температуре ниже 13 °C (Izquierdo, 1991). Поэтому для поддержания природных популяций *D. melanogaster* в условиях умеренного климата необходимо выживание оплодотворённых самок, способных откладывать жизнеспособные яйца после окончания воздействия низких температур. Соответственно, наличие нормально функционирующего гена *Hsp67Bc* должно способствовать лучшему выживанию природных популяций этого вида в условиях умеренного климата.

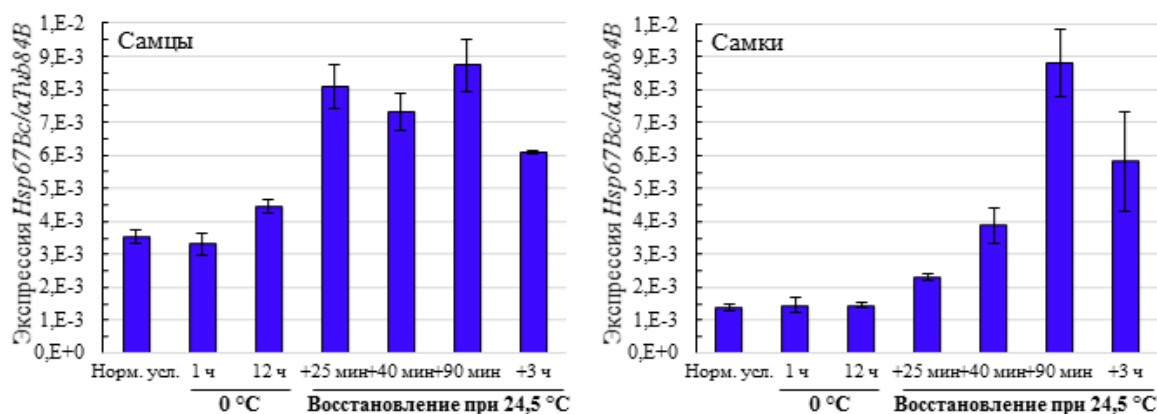


Рисунок 5. Динамика экспрессии гена *Hsp67Bc* у *D. melanogaster* контрольной линии *Hsp67Bc-2* в нормальных условиях (24–25 °C, Норм. усл.), а также в течение 12-ч холодового воздействия (через 1 ч и 12 ч после помещения в условия 0 °C) и во время восстановления после него (+25 мин, +40 мин, +90 мин и +3 ч). Уровни экспрессии *Hsp67Bc* нормированы на уровни экспрессии гена α *Tub84B*.

Влияние делеции гена *Hsp67Bc* на степень дегенерации глаз мух, экспрессирующих мутантный *ATXN3*. На *D. melanogaster* было показано, что повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* снижает, а нокдаун – повышает – степень агрегации белков с увеличенным количеством полиглутаминовых повторов, являющейся причиной нейродегенеративных заболеваний (Carra et al., 2010; Vos et al., 2016). Известной моделью для изучения агрегации таких белков являются глаза *D. melanogaster* с эктопической экспрессией генов, кодирующих эти белки (Carra et al., 2010; Vos et al., 2016). Мы индуцировали экспрессию гена *ATXN3* человека с 27 (нормальный ген) и 78 повторами CAG (мутантный ген, приводящий у человека к развитию болезни Мачадо – Джозефа) в глазных имагинальных дисках мух контрольной и ноль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линий с помощью системы GAL4-UAS. При экспрессии нормального *ATXN3* на фоне нормального гена *Hsp67Bc* или на фоне делеции *Hsp67Bc* нарушений в морфологии или пигментации глаз у имаго не наблюдалось (рис. 6). Экспрессия

мутантного аллеля *ATXN3* приводила к характерному нарушению морфологии и пигментации глаз. Как и предполагалось, у мух с делецией *Hsp67Bc* наблюдалась более выраженная дегенерация глаз по сравнению с контрольными (рис. 6). Полученные результаты согласуются с литературными данными и подтверждают, что важной функцией продукта гена *Hsp67Bc* является предотвращение агрегации мутантных белков и, таким образом, участие в поддержании нормального протеостаза в клетках.

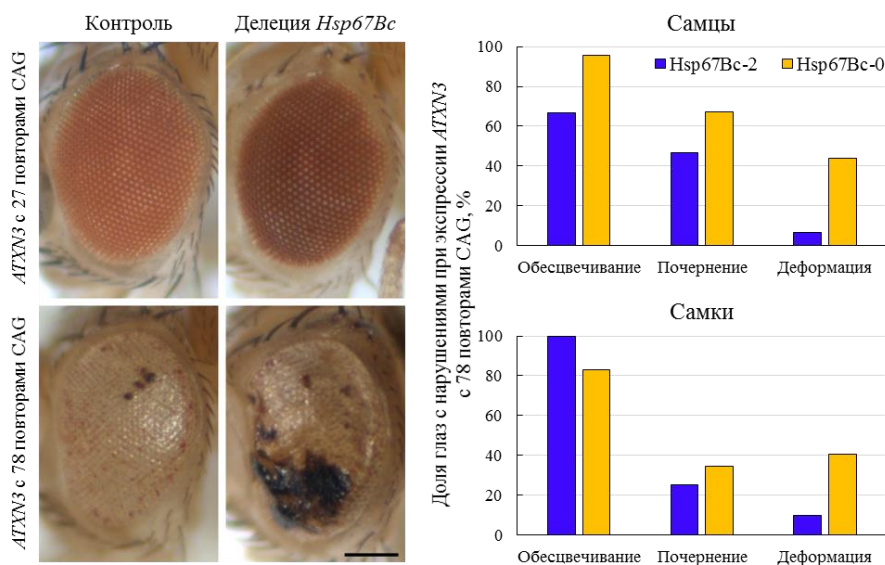


Рисунок 6. Нарушения морфологии глаз мух контрольной (*Hsp67Bc-2*) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) линий, вызванные эктопической экспрессией мутантного гена *ATXN3* человека; масштабный отрезок – 500 мкм.

Влияние делеции гена *Hsp67Bc* на макроаутофагию в яичниках и нейронах мозга мух. Как было показано ранее на культуре клеток *S2 Drosophila*, повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* усиливает интенсивность макроаутофагии (Carrá et al., 2010). Интенсивность макроаутофагии в клетках мух увеличивается при голодании, в том числе белковом (Barth et al., 2011), а также в присутствии бактерий *Wolbachia* патогенного штамма *wMelPop* (Voronin et al., 2012).

Для выявления макроаутофагии в яичниках контрольных (*Hsp67Bc-2*) и мутантных (*Hsp67Bc-0*) мух использовалась окраска LysoTracker (LTR), который маркирует органеллы с кислым содержимым – лизосомы и аутолизосомы (Scott et al., 2004; Klionsky et al., 2007). Было посчитано количество LTR-положительных (LTR⁺) гермариев у мух, содержащихся на стандартном или безбелковом корме в течение 5 и 15 дней. По сравнению с контрольной линией, в яичниках самок *Hsp67Bc-0*, содержащихся на корме обоих типов, наблюдалось большее количество LTR⁺ гермариев. У мух *Hsp67Bc-0* наблюдалось увеличение количества LTR⁺ гермариев в 1,2–1,5 раза.

Аутофагия бактерий *Wolbachia* в нейронах взрослых *D. melanogaster*. При помощи количественной ПЦР был измерен титр *Wolbachia* штамма *wMelPop*

в мозге контрольных и нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух на трёх стадиях развития – блуждающей личинки третьего возраста, 12-ч куколки и 5-дневных имаго. Достоверных различий в титре бактерий между линиями обнаружено не было ни на одной из исследованных стадий развития. Далее с помощью метода FISH было исследовано распределение бактерий в мозге взрослых самок. Различий в характере распределения *Wolbachia* между мутантной и контрольной линиями также не было выявлено.

Так как мы не обнаружили достоверных различий в содержании *Wolbachia* в мозге дрозофил нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* и контрольной линий посредством количественной ПЦР, мы воспользовались методом ПЭМ для подсчёта количества *Wolbachia*, аутофагосом и аутолизосом на срезах нейронов этих мух. Исследования проводились на взрослых самках, так как по результатам количественной ПЦР на стадии имаго титр бактерий был значительно выше, чем на стадиях личинки и куколки. Бактерии *Wolbachia*, наблюдаемые в цитоплазме нейронов мозга мух обеих линий, имели нормальную морфологию. *Wolbachia* также наблюдались в аутолизосомах на срезах нейронов *D. melanogaster* обеих линий (рис. 7), что подтверждает выведение *Wolbachia* из клеток хозяина путём макроаутофагии. Доля бактерий *Wolbachia*, элиминирующихся посредством макроаутофагии, была одинаковой в мозге мух обеих линий, однако содержание аутофагосом и аутолизосом было немного выше в нейронах нуль-аллельной по гену *Hsp67Bc* линии по сравнению с контрольной. Последнее наблюдение, наряду с отмеченным ранее увеличенным содержанием LTR⁺ гермаринов у мух линии *Hsp67Bc-0*, указывает на усиление интенсивности макроаутофагии в мозге и яичниках этих мух. Возможно, именно с этим связано увеличение ПЖ нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух при нормальной температуре (24–25 °С). Известно несколько генов *D. melanogaster*, снижение экспрессии которых приводит к увеличению ПЖ (например, *InR*, *chico*, *mth*). Продукты всех упомянутых генов вовлечены в регуляцию интенсивности процесса макроаутофагии, и снижение их экспрессии стимулирует макроаутофагию (Clancy et al., 2001; Wang et al., 2015; Graze et al., 2018; Yamamoto et al., 2021). Было также показано, что умеренное усиление макроаутофагии в ряде тканей продлевает ПЖ *D. melanogaster*, тогда как сильная и повсеместная её стимуляция – сокращает (Vjedov et al., 2020). Наблюдавшееся нами у нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух небольшое увеличение числа аутофагосом и аутолизосом, свидетельствующее о небольшом усилении макроаутофагии, могло быть причиной их увеличенной ПЖ.

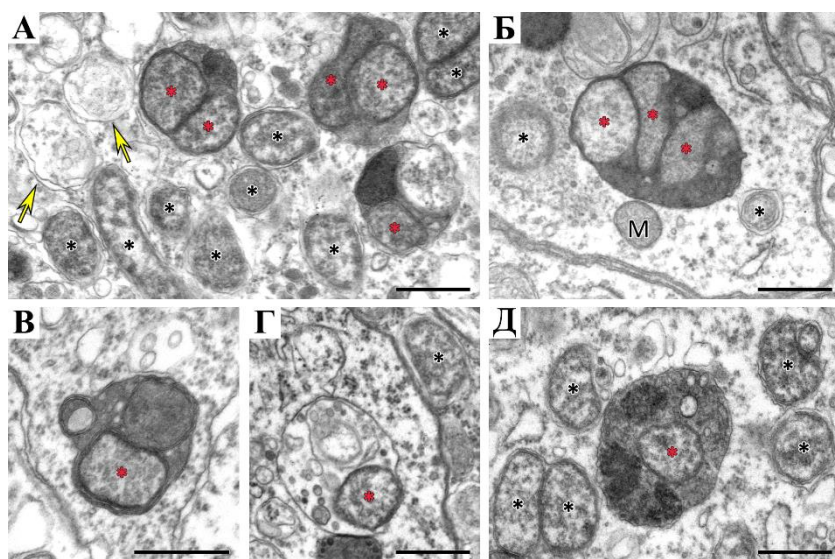


Рисунок 7. Элиминация бактерий *Wolbachia* из нейронов мозга самок мух контрольной (*Hsp67Bc-2*, панели А и Б) и нуль-аллельной по *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*, панели В–Д) линий посредством макроаутофагии. Красные звёздочки – *Wolbachia* в аутолизосомах; чёрные звёздочки – *Wolbachia* в цитоплазме нейронов; М – митохондрия; жёлтые стрелки указывают на аутофагосомы. Масштабные отрезки – 0,5 мкм.

На ультратонких срезах нейронов контрольных и мутантных самок также были оценены морфология, содержимое и размеры аутофагосом и аутолизосом. Аутолизосомы были условно разделены на три категории – содержащие на срезе «интактный», «частично переработанный» и «полностью переработанный» материал (рис. 8). Результаты морфологического и морфометрического анализов показали, что у нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух аутолизосомы были крупнее по сравнению с контрольной линией, при этом наиболее выраженные различия в площади сечения выявлялись у аутолизосом с интактным содержимым. Кроме того, процент аутолизосом с «полностью переработанным» содержимым в мутантной линии мух был ниже, чем в контрольной. Это предполагает нарушение процесса созревания аутофагосом на этапе, когда с аутофагосомами сливаются эндосомы и лизосомы. Ранее на культурах клеток мыши RGC5 и NSC34 было показано, что человеческий ортолог *Hsp67Bc* – *HSPB8* – необходим для слияния лизосом с аутофагосомами (Kwok et al., 2011; Li et al., 2017). Мы полагаем, что в отсутствие продукта гена *Hsp67Bc* в нейронах мозга *D. melanogaster* 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.

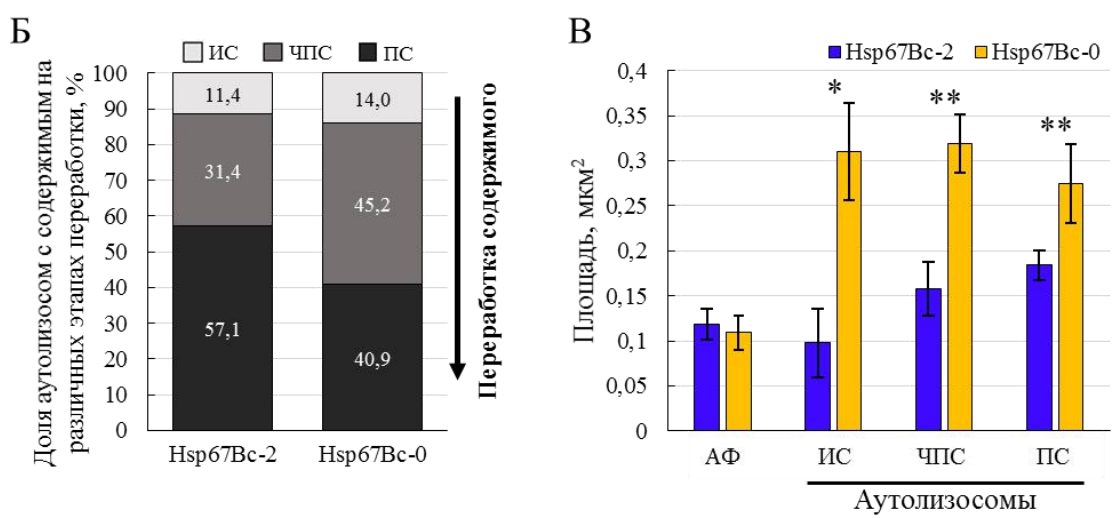
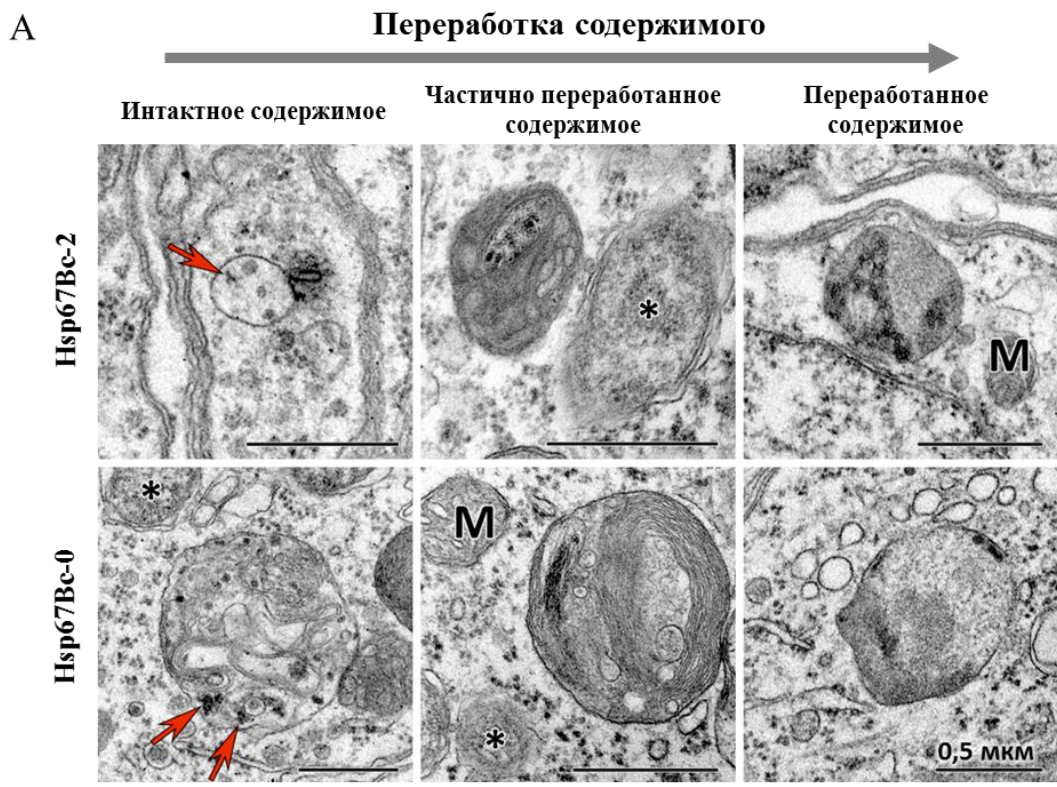


Рисунок 8. Морфология и размер аутолизосом на ультратонких срезах нейронов мозга нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* (*Hsp67Bc-0*) и контрольных (*Hsp67Bc-2*) самок *D. melanogaster*. А – микрофотографии аутолизосом с содержимым на различных стадиях переработки; красные стрелки указывают на непереваренные рибосомы в аутолизосомах с интактным содержимым; звёздочками обозначены бактерии *Wolbachia* в цитоплазме нейронов; М – митохондрии; масштабные отрезки – 0,5 мкм. Б – доли (%) аутолизосом, содержащих материал на различных стадиях деградации: ИС – «интактное» содержимое, ЧПС – «частично переработанное» содержимое, ПС – «полностью переработанное» содержимое. В – медианы площадей сечения аутофагических вакуолей в контрольной и мутантной линиях; АФ – аутофагосомы; доверительные интервалы соответствуют стандартным ошибкам среднего; * $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белки теплового шока являются универсальным для всех изученных живых организмов инструментом противодействия негативным факторам среды. В данной работе с использованием генетических, молекулярных и цитологических методов было определено влияние делеции гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc* на устойчивость *D. melanogaster* к различным типам стресса. Впервые была получена линия мух с почти полной делецией гена *Hsp67Bc*, которая в гомозиготе оказалась жизнеспособной и фертильной в нормальных условиях. ПЖ нуль-аллельных мух при нормальной температуре на 35% выше, чем у контрольных, однако мухи с делецией *Hsp67Bc* дольше восстанавливают двигательную активность после холодовой комы при 0 °С, а самки имеют сниженную выживаемость. Динамика экспрессии *Hsp67Bc* 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 холоду именно взрослых оплодотворённых самок. Другим ключевым процессом, в котором задействован *Hsp67Bc*, является макроаутофагия. Нами было показано, что у нуль-аллельных по *Hsp67Bc* мух наблюдается некоторое увеличение количества аутофагических вакуолей в нейронах ЦНС 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 ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

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. – 2022a. – 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 // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2022b. – Vol. 26. – № 2. – P. 169–178.