



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

Малькеева Дина Александровна

1.5.22. – клеточная биология

1.5.7. – генетика

Научные руководители: к.б.н. Киселева Е. В.,
к.б.н. Фёдорова С. А.

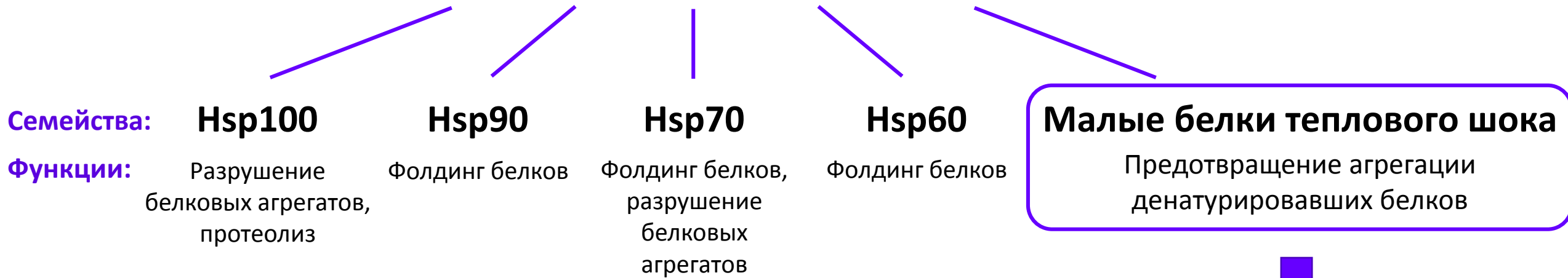
Новосибирск, 2022



Белки теплового шока

Встречаются в клетках всех живых организмов, включая человека.

Активируются в ответ на стрессовое воздействие (Lindquist, 1986; Morrow, Tanguay, 2015).



Hsp67Bc

- Функции:**
1. предотвращение агрегации белков с полиглутаминовыми трактами, являющейся причиной нейродегенеративных заболеваний;
 2. на культурах клеток дрозофилы и человека показано, что повышение экспрессии гена *Hsp67Bc* увеличивает число органелл, содержащих LC3-II (Carra et al., 2010)

Цель: 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*.

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.

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

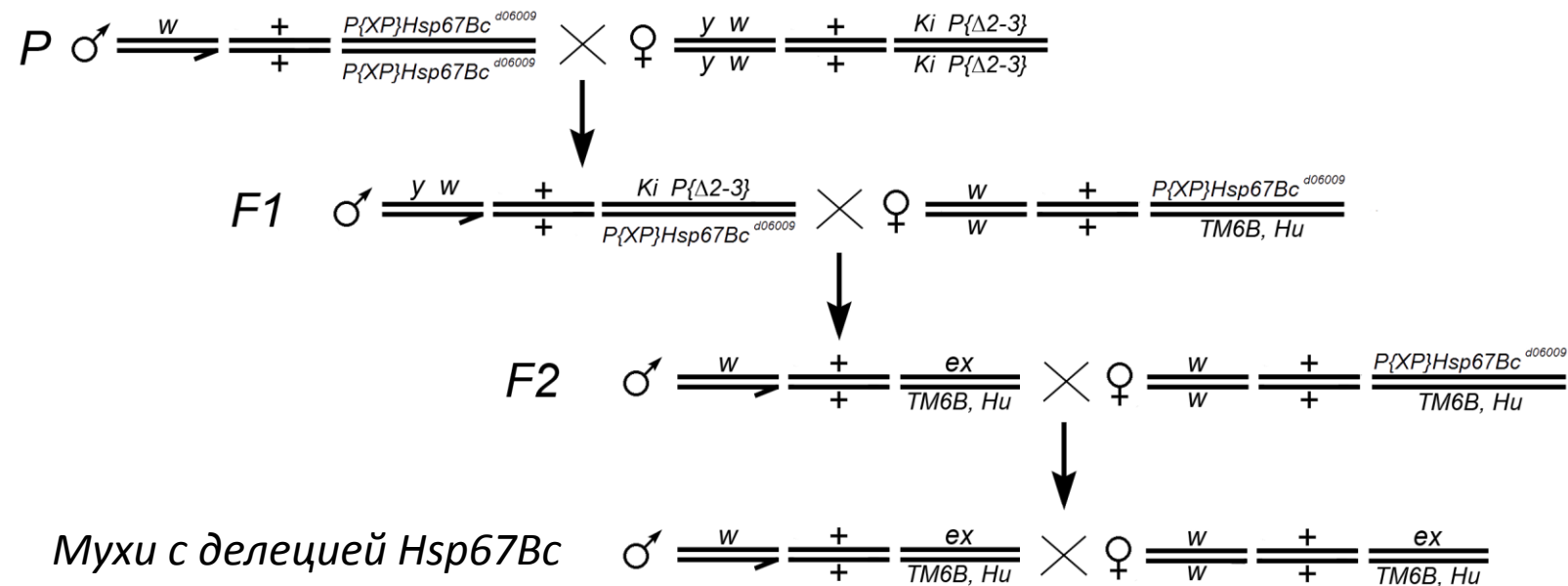


Схема скрещиваний для получения линии *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc* путём неточного вырезания *P*-элемента, а также контрольной к ней линии с точно вырезанным *P*-элементом

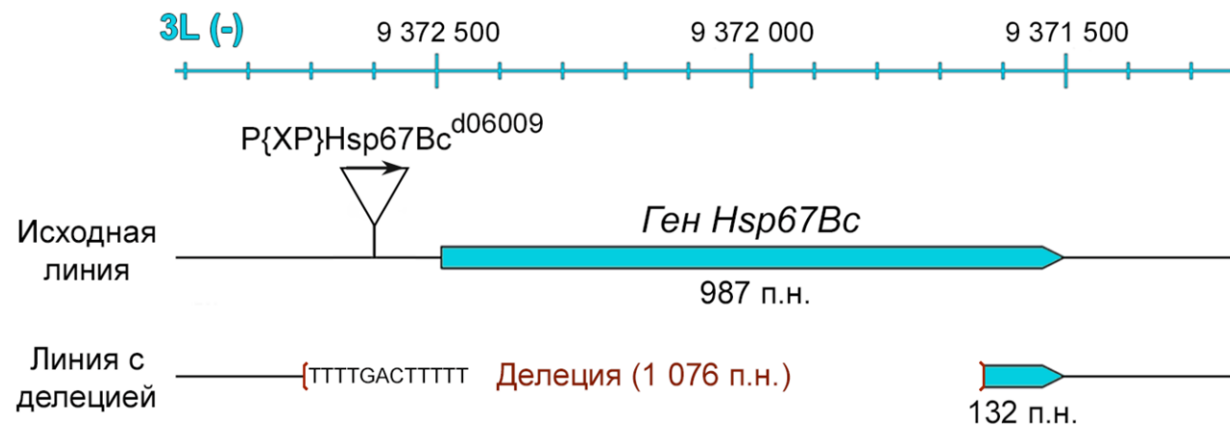


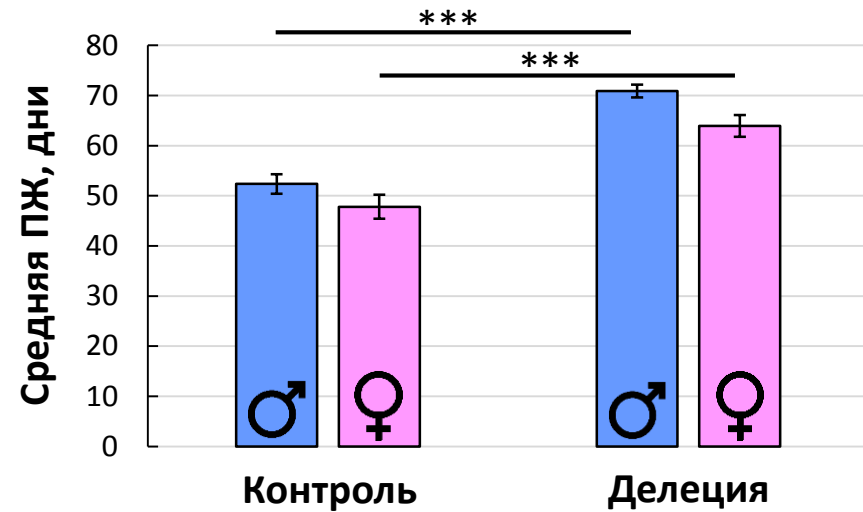
Схема расположения полученной делеции в гене *Hsp67Bc*

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



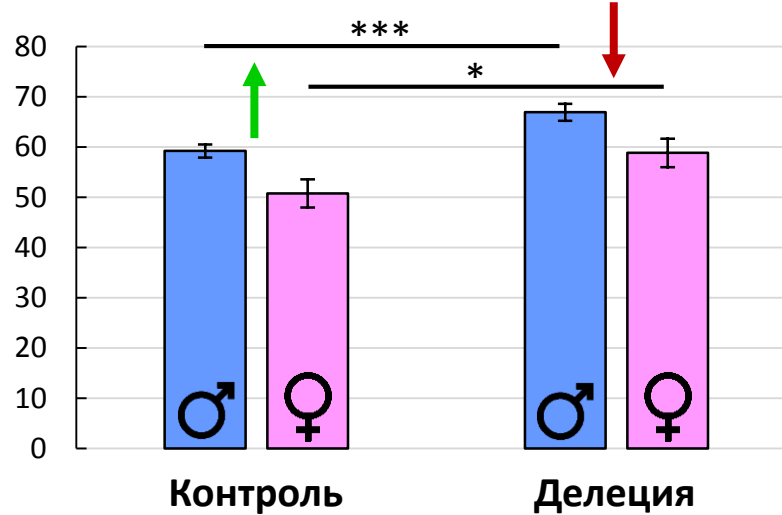
Средняя продолжительность жизни мух

Содержание при 24–25 °C

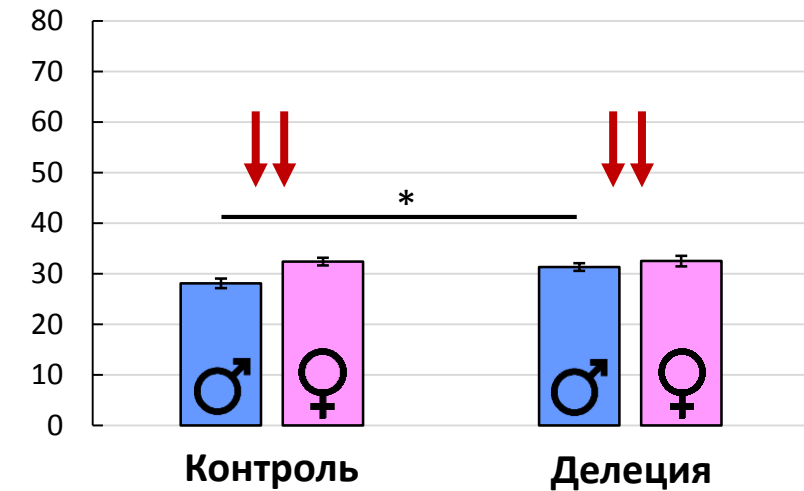


(нормальная температура)

2 ч при 37 °C в возрасте 1 дня



Содержание при 29 °C



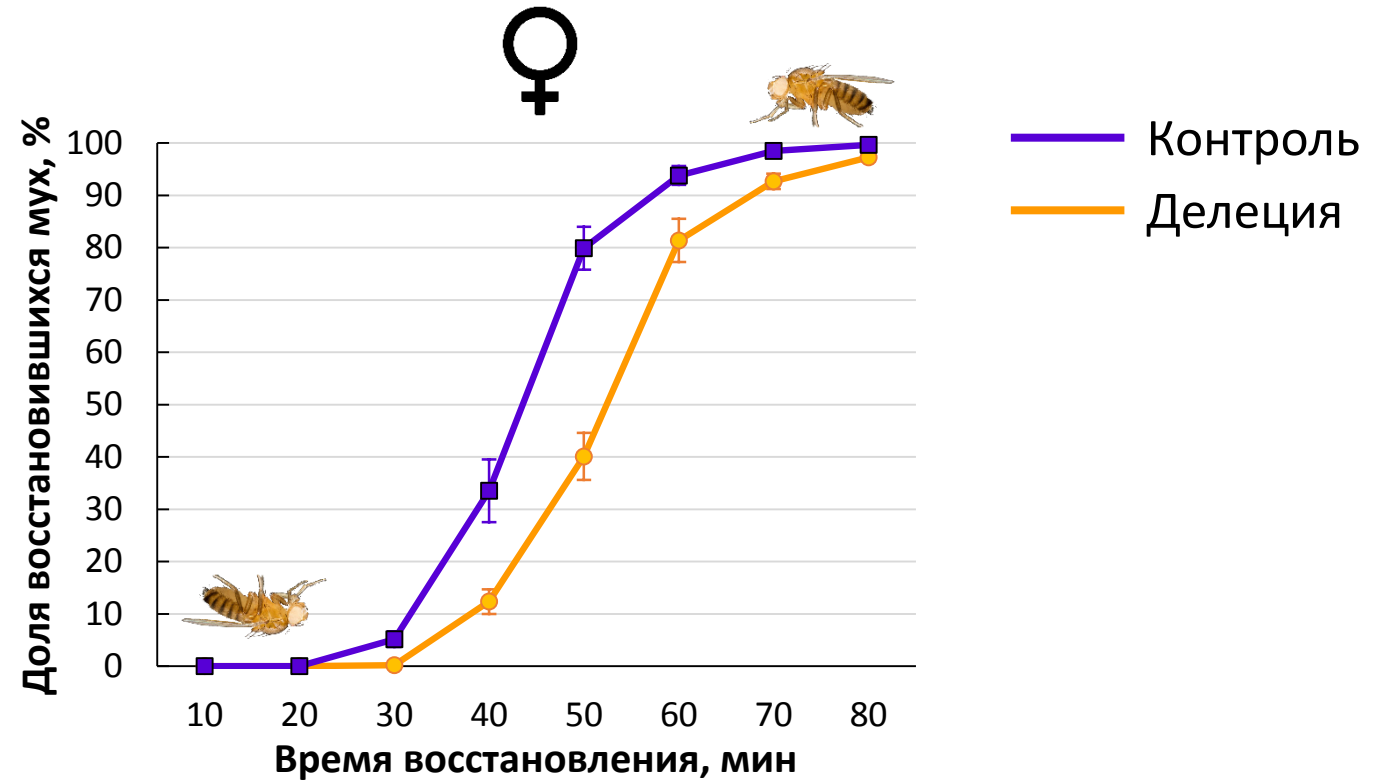
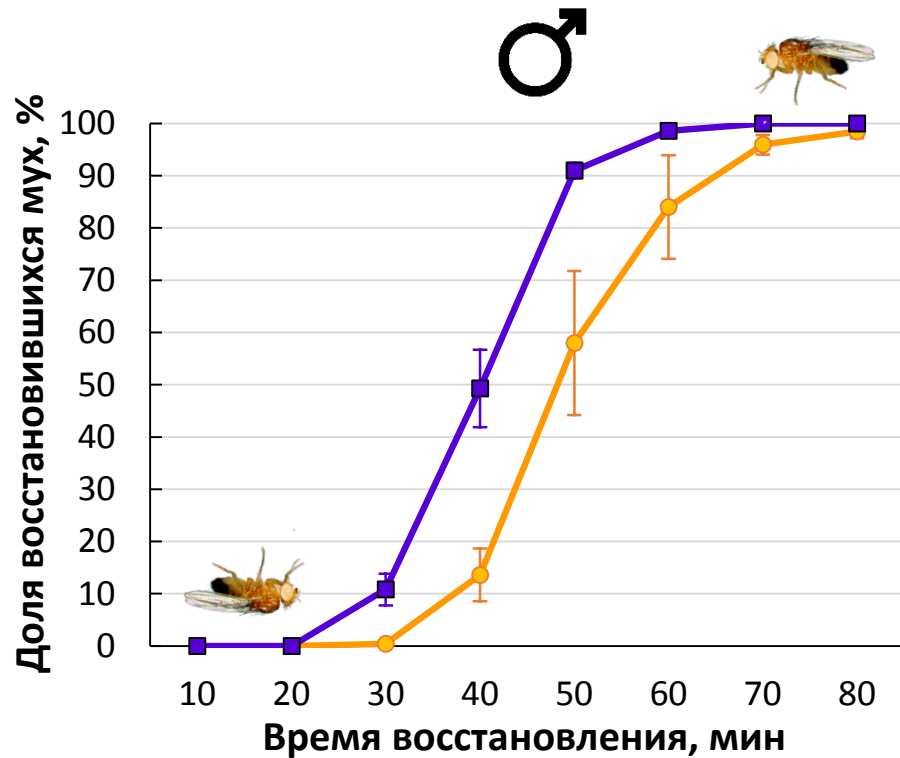
* $0,01 < p \leq 0,050$; *** $p \leq 0,001$

Делеция гена *Hsp67Bc* имеет негативные последствия для сопротивляемости *D. melanogaster* краткосрочному воздействию высокой температуры.

Скорость восстановления мух с делецией гена *Hsp67Vc* после холодовой комы



Восстановление взрослых мух после холодовой комы (0 °C, 12 ч)

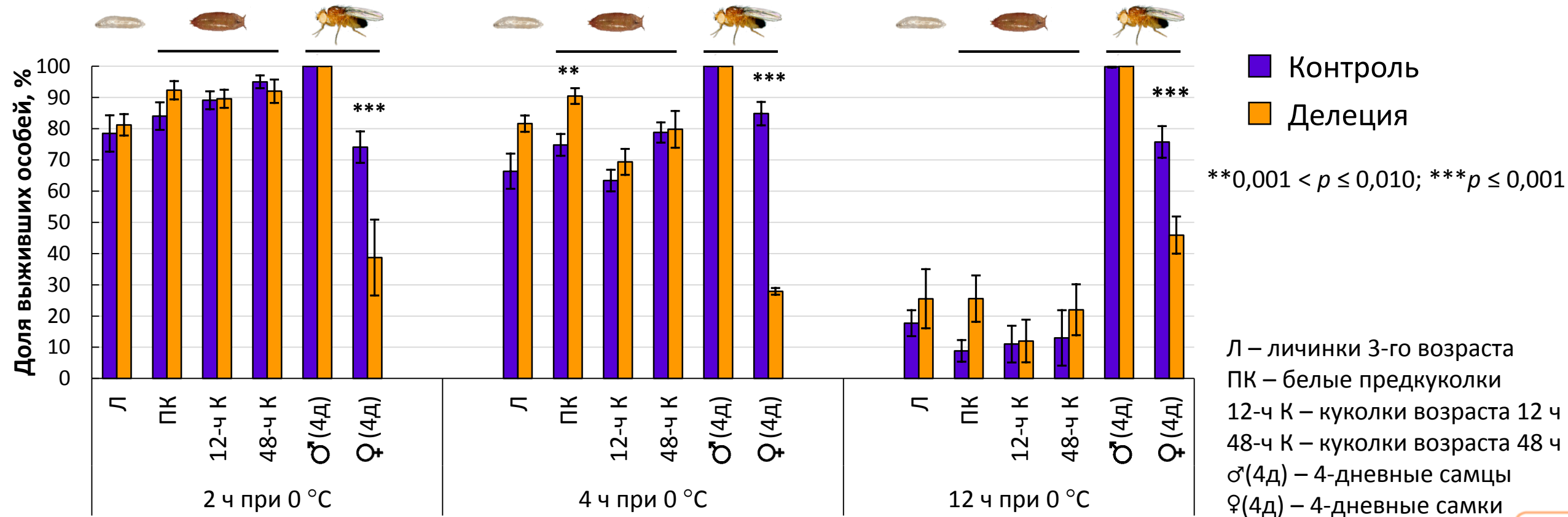


Скорость восстановления после холодовой комы взрослых нуль-аллельных по гену *Hsp67Vc* мух ниже, чем контрольных.

Устойчивость мух с делецией гена *Hsp67Bc* к пониженной температуре

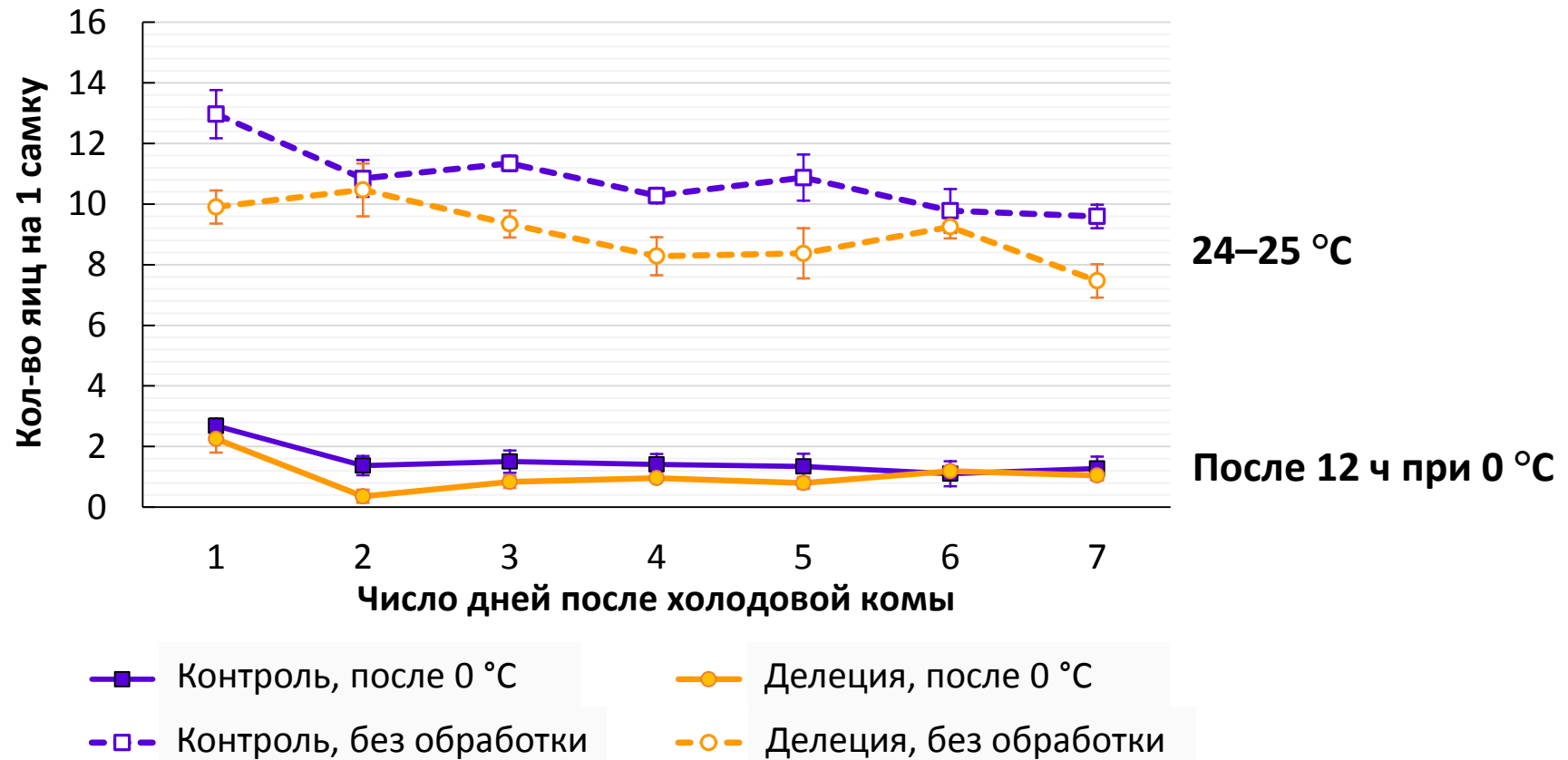


Выживаемость мух на разных стадиях развития после воздействия холода



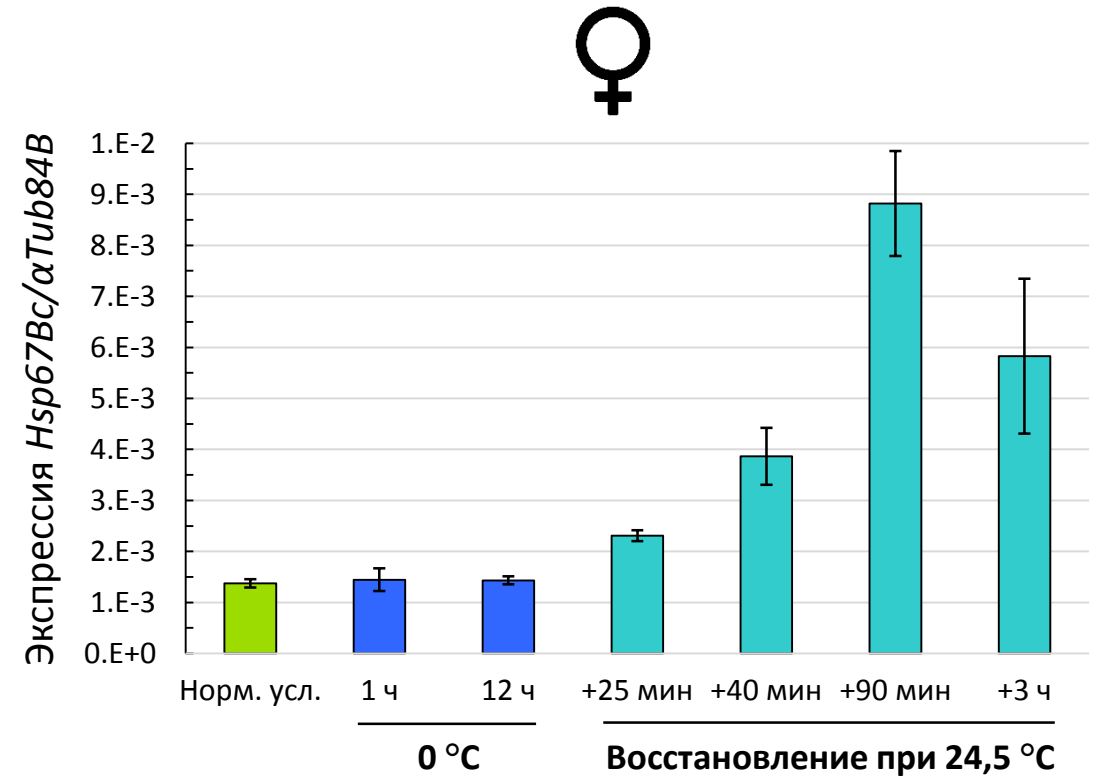
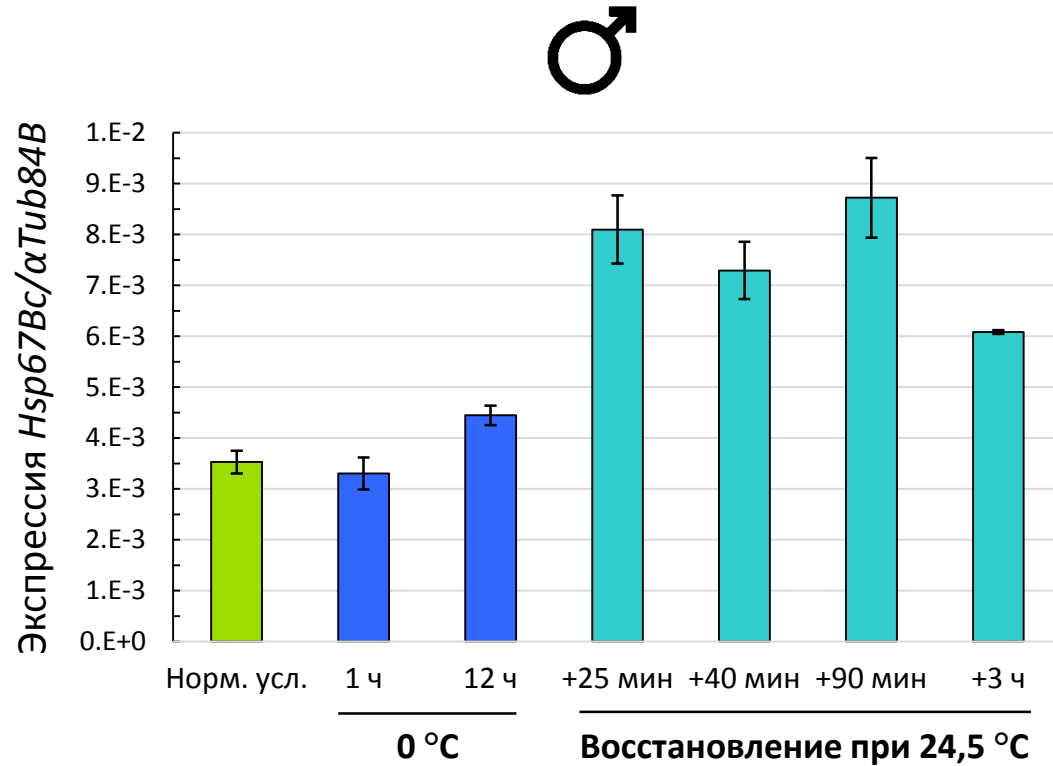
После воздействия пониженной температуры различной длительности выживаемость взрослых самок нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух ниже, чем контрольных.

Изменение плодовитости мух после воздействия холода



Воздействие холода приводит к более значительному снижению плодовитости самок мух с делецией гена *Hsp67Bc*, чем контрольных.

Динамика экспрессии гена *Hsp67Bc* у мух контрольной линии в нормальных условиях и после воздействия холода



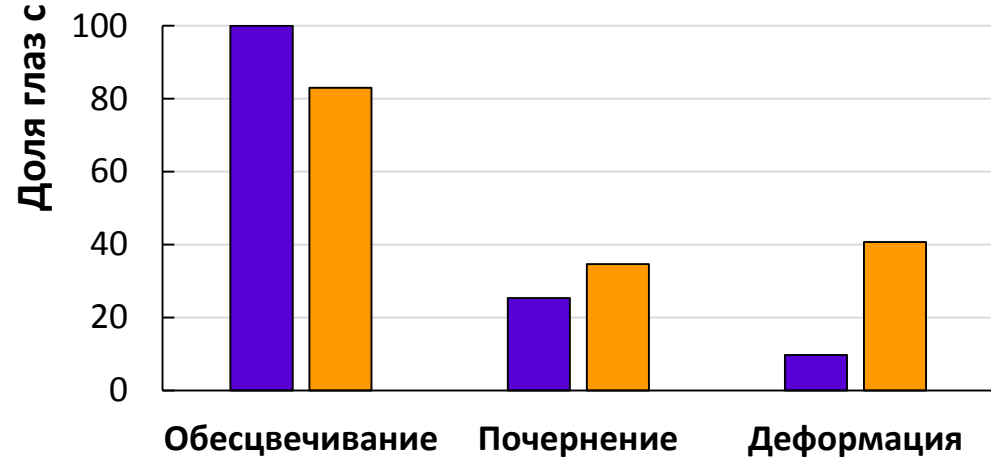
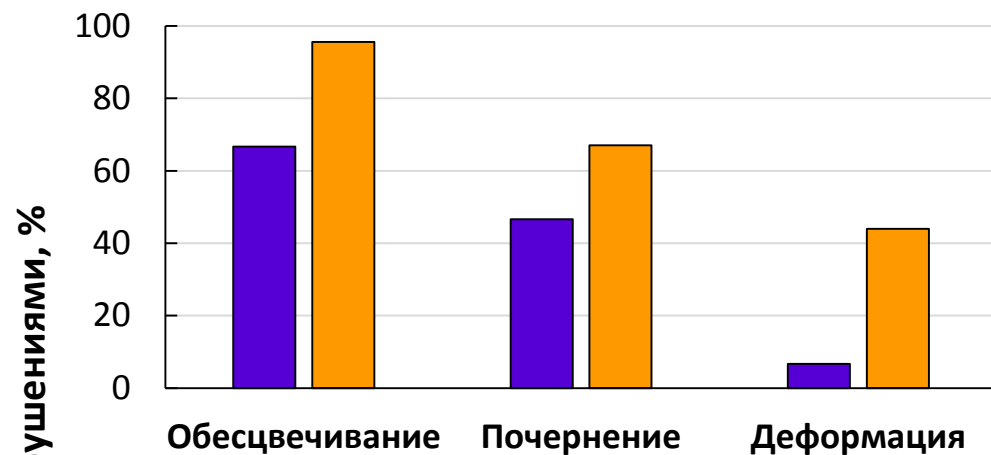
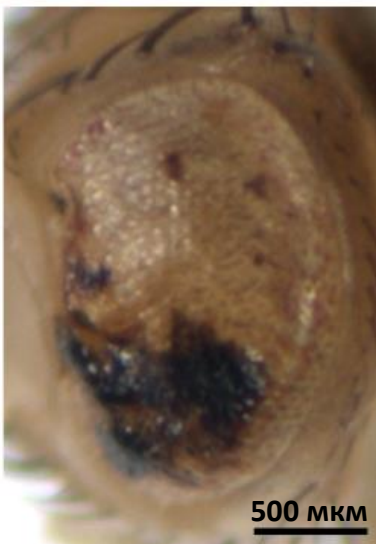
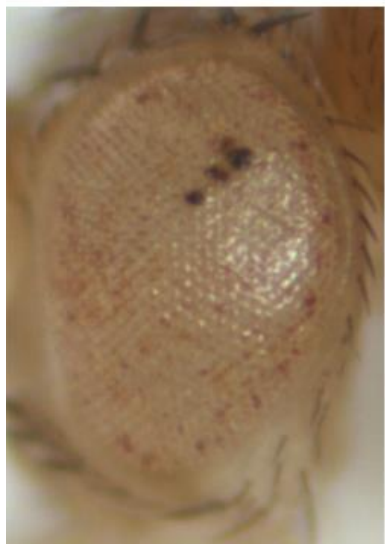
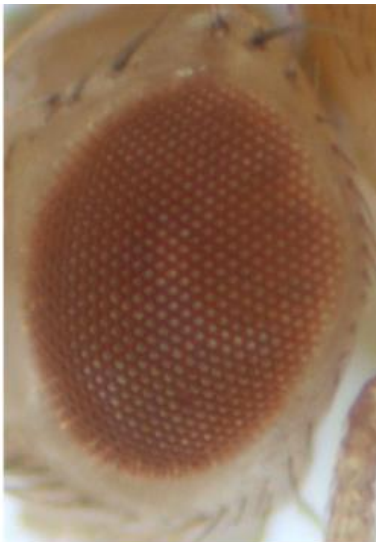
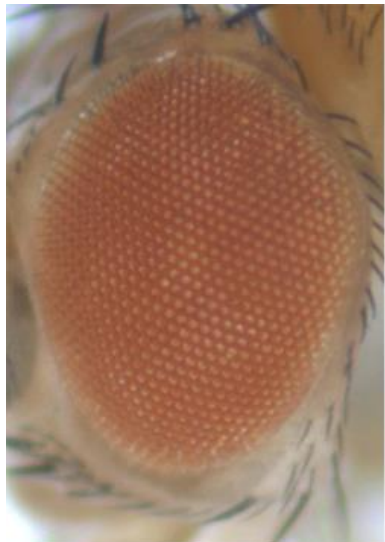
Паттерн изменения экспрессии *Hsp67Bc* коррелирует с кривыми восстановления двигательной активности мух, что указывает на важную роль *Hsp67Bc* в процессах устранения полученных при воздействии холода внутриклеточных повреждений.

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



Контроль

Делеция *Hsp67Bc*

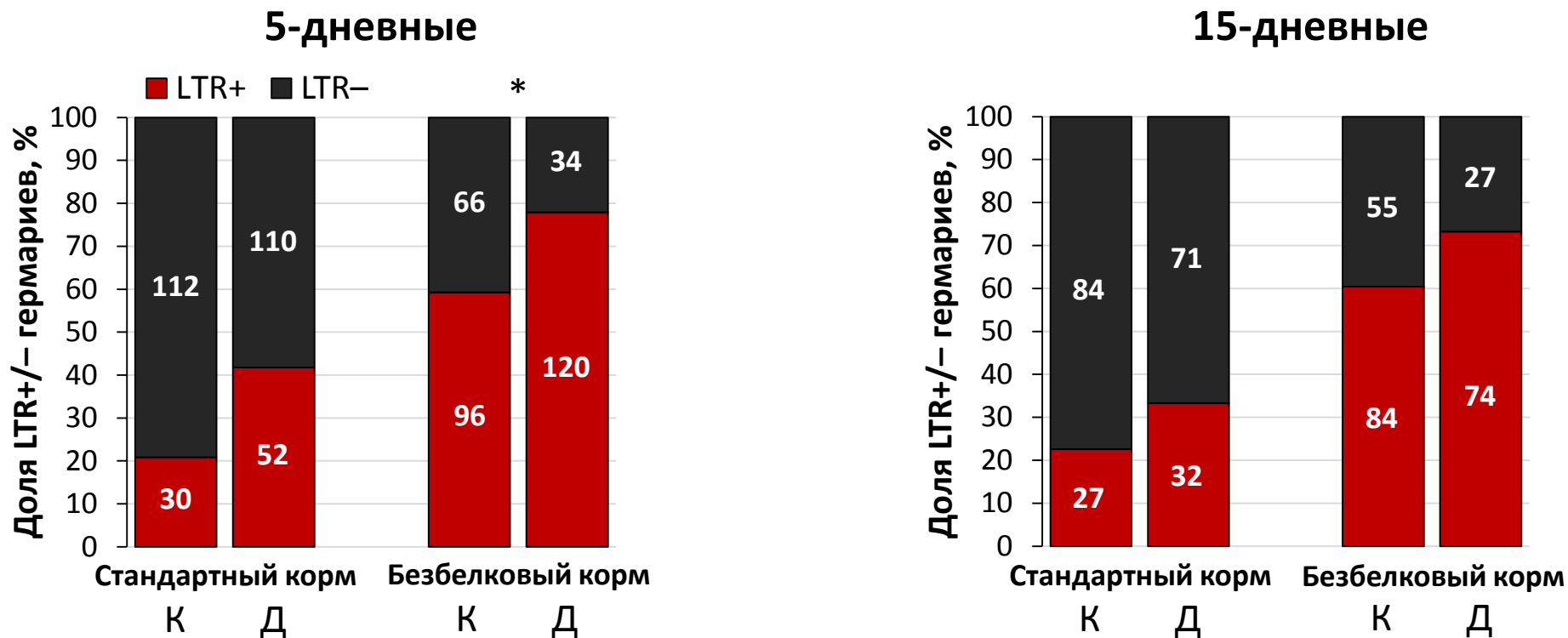


Дегенерация омматидиев в глазах нуль-аллельных мух, экспрессирующих мутантный ген *ATXN3*, увеличена по сравнению с контрольной линией

Влияние делеции гена *Hsr67Bc* на макроаутофагию в яйчниках мух при белковом голодании



Доля лизотрекер-положительных гермариев



К – контроль

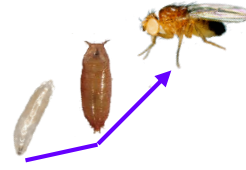
Д – делеция

* $0,01 < p \leq 0,050$

У нуль-аллельных мух наблюдалось увеличение количества LTR⁺ гермариев в 1,2–1,5 раза.

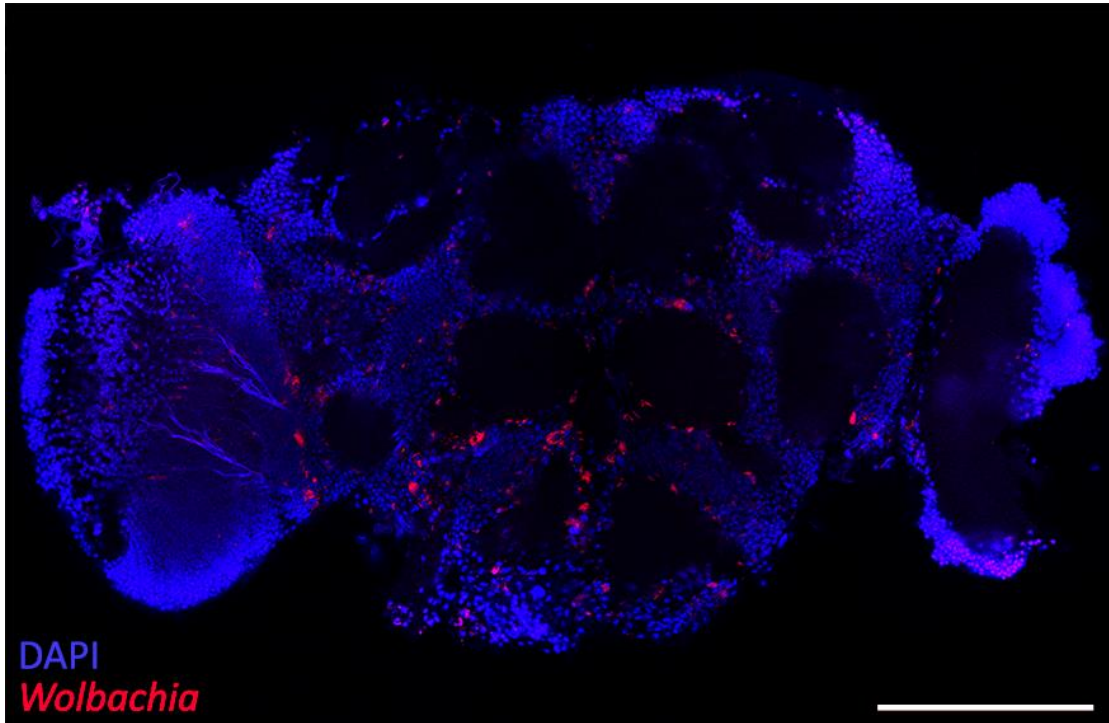
Распределение бактерий *Wolbachia* штамма wMelPop в мозге взрослых мух с делецией в гене *Hsp67Bc*

Количество *Wolbachia*, измеренное методом количественной ПЦР, не отличалось между мутантной и контрольной линиями ни на одной из стадий развития. Максимальным количество бактерий было у имаго.

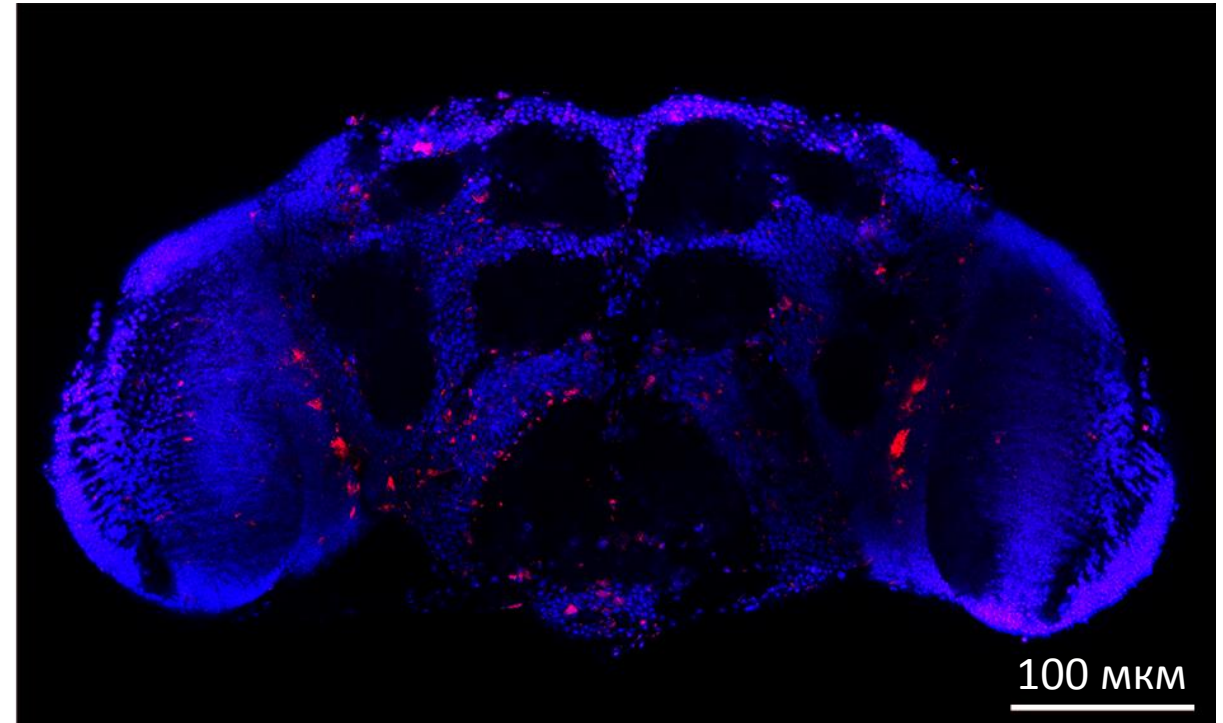


Флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием РНК-зонда, специфичного к 16S рРНК *Wolbachia*

Контроль



Делеция

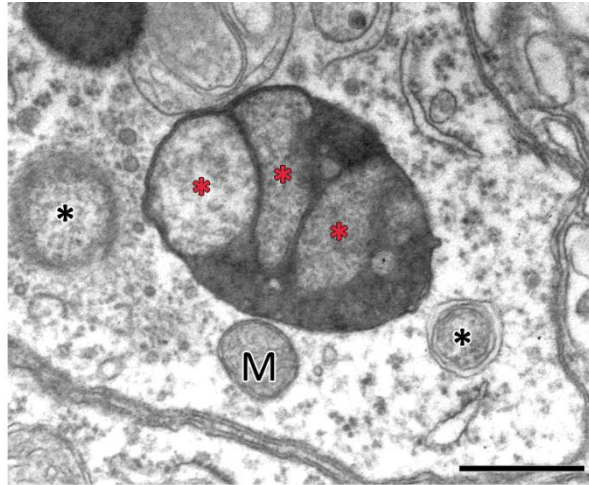
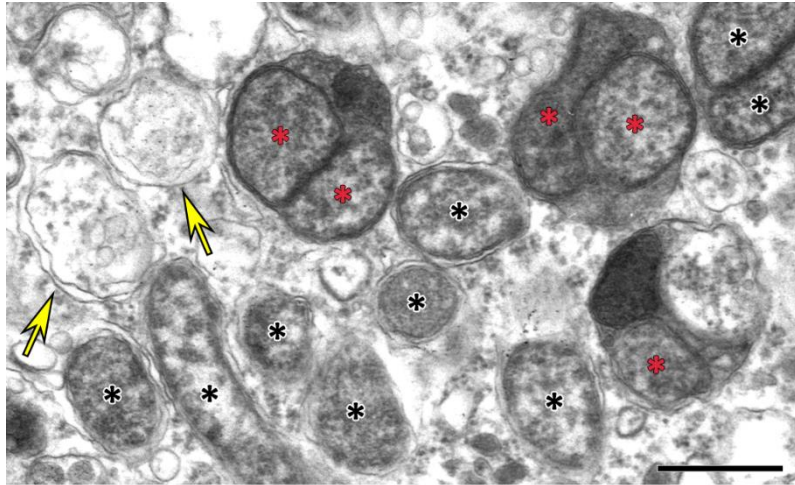


Различий в характере распределения *Wolbachia* между мутантной и контрольной линиями выявлено не было.

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

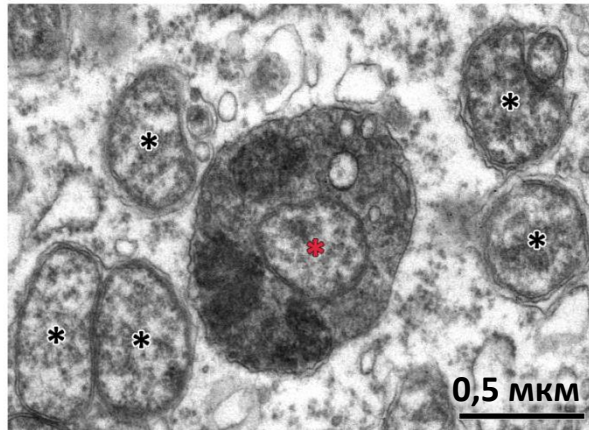
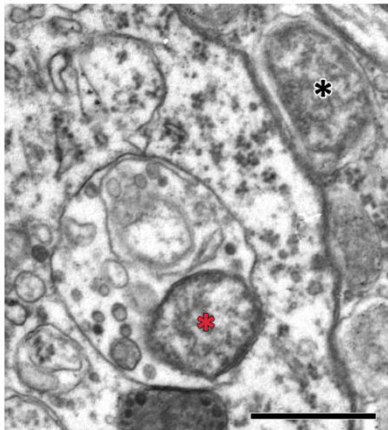


Контроль



Бактерии *Wolbachia* обнаруживаются внутри аутолизосом в нейронах как нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc*, так и контрольных мух.

Делеция



* – бактерии в цитоплазме нейронов

* – бактерии в аутофагических вакуолях

М – митохондрия

Жёлтые стрелки указывают на аутофагосомы

Делеция гена *Hsp67Bc* не оказывает влияния на элиминацию бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop из клеток мозга *D. melanogaster* посредством макроаутофагии.



Влияние делеции гена *Hsr67Bc* на морфологию аутолизосом в нейронах мозга мух, инфицированных *Wolbachia*

Переработка содержимого

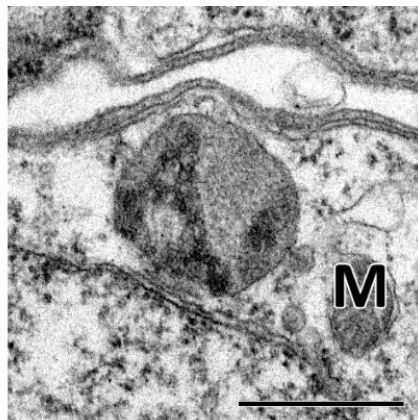
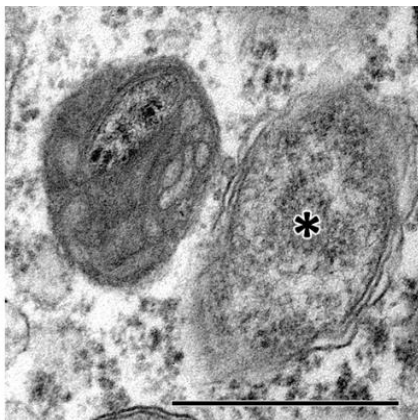
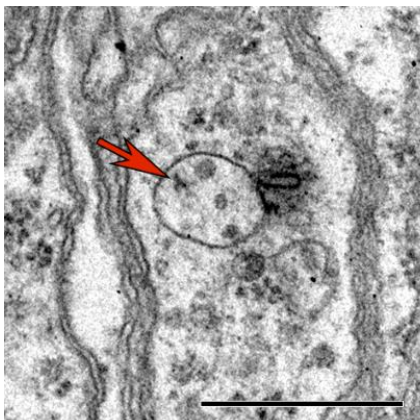


«Интактное» содержимое

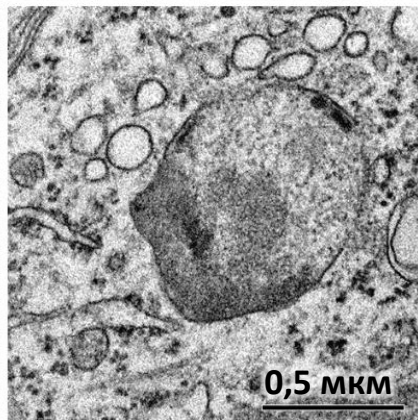
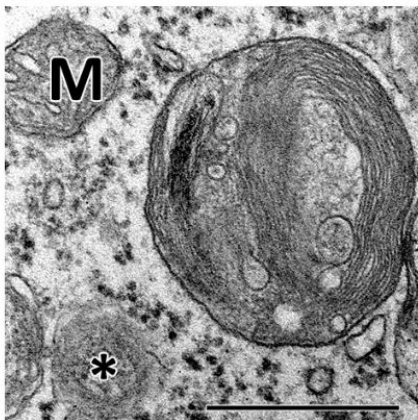
«Частично переработанное»
содержимое

«Переработанное»
содержимое

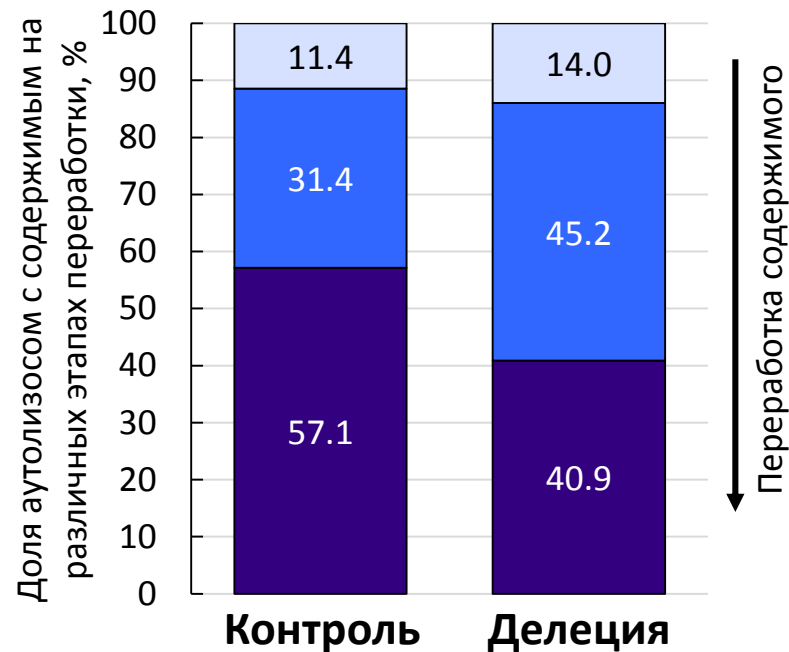
Контроль



Делеция



0,5 мкм



- «Интактное» содержимое
- «Частично переработанное» содержимое
- «Переработанное» содержимое

Процент аутолизосом с «полностью переработанным» содержимым в мутантной линии мух ниже, чем в контрольной.

* – бактерии в цитоплазме нейронов;

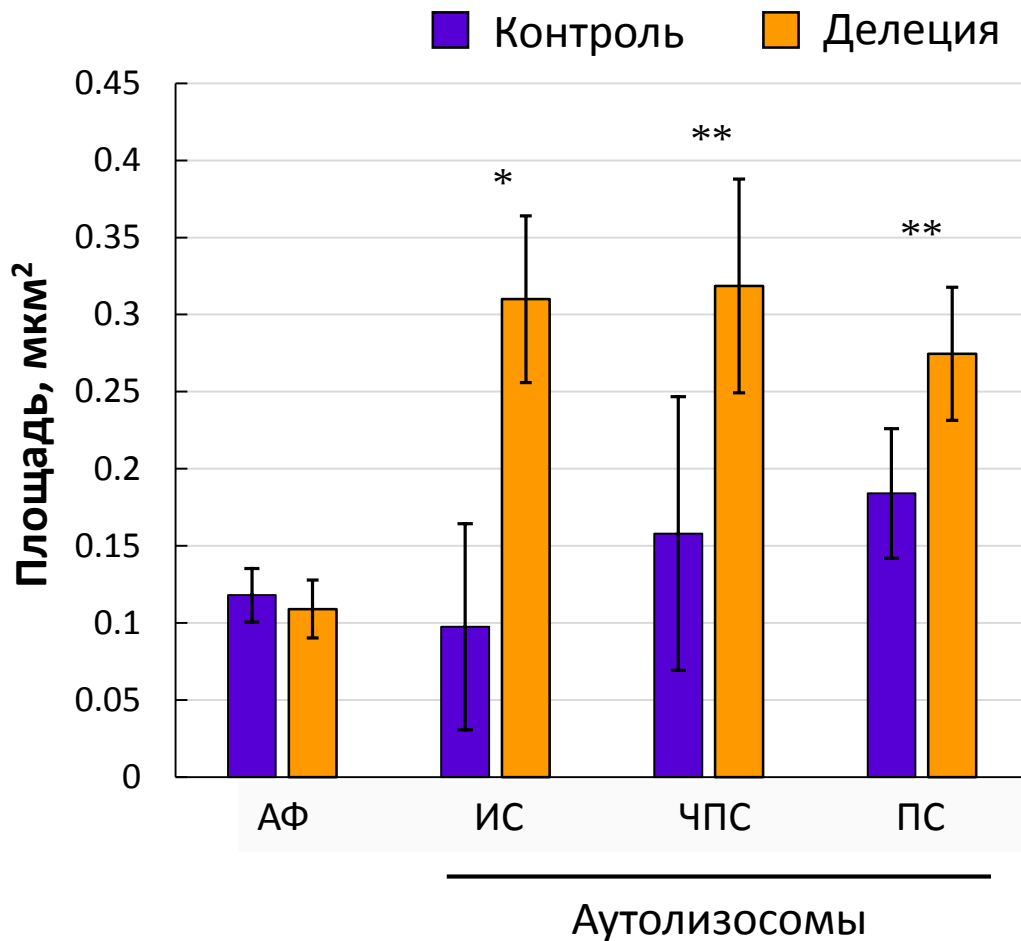
М – митохондрии

Красные стрелки указывают на интактные рибосомы

Различия размеров аутофагосом и аутолизосом в нейронах мозга мутантных и контрольных мух, инфицированных *Wolbachia*



* $0,01 < p \leq 0,050$; ** $0,001 < p \leq 0,010$



Аф – аутофагосомы
 ИС – «интактное содержимое»
 ЧПС – «частично переработанное» содержимое
 ПС – «переработанное» содержимое

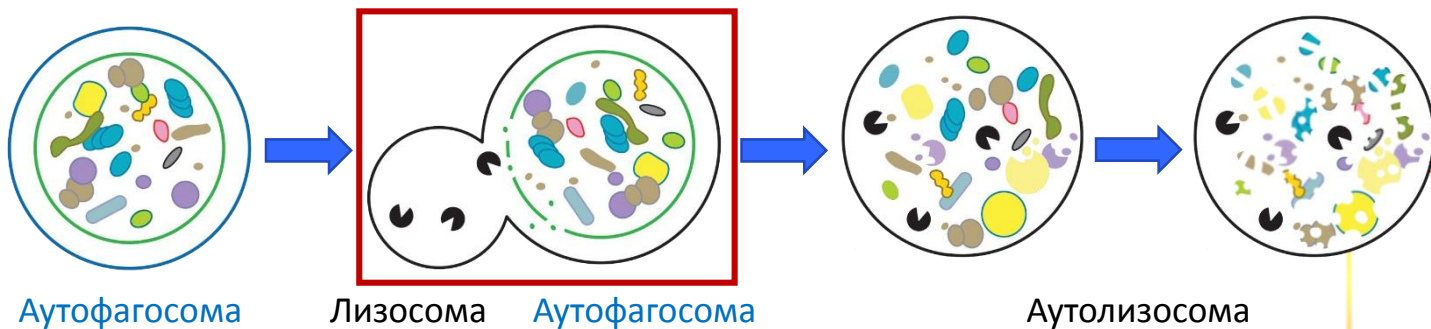
У нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* мух аутолизосомы крупнее по сравнению с контрольной линией, наиболее выраженные различия – у аутолизосом с интактным содержимым



Сниженный в линии с делецией *Hsp67Bc* процент аутолизосом с «полностью переработанным» содержимым

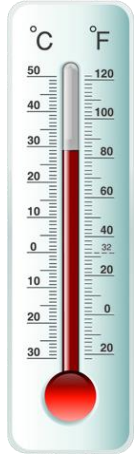


Нарушение процесса созревания аутофагосом

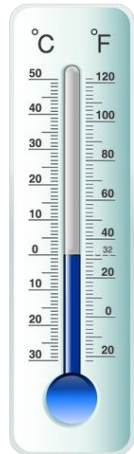




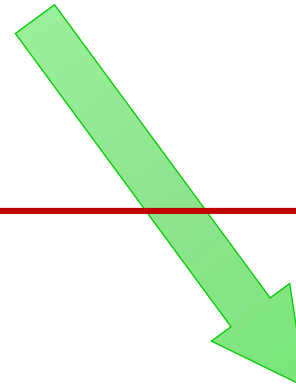
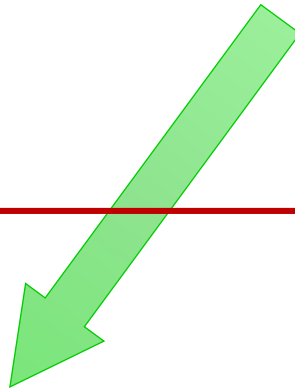
Hsp67Bc *D. melanogaster*



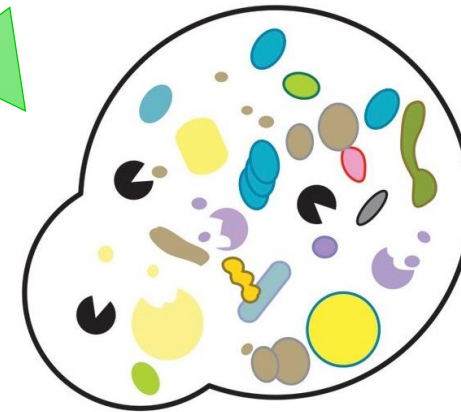
Повышенная
температура



Пониженная
температура



Впервые



Созревание аутофагосом

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 и до 11% при повышенной температуре (29 °C) и не оказывает влияния на плодовитость мух.
2. Отсутствие гена *Hsp67Bc* оказывает слабый негативный эффект на устойчивость дрозophil к кратковременному тепловому стрессу: продолжительность жизни нуль-аллельных мух снижена по сравнению с постоянным содержанием при нормальной температуре (24–25 °C), тогда как у контрольной линии она повышена; при этом выживаемость личинок и куколок, а также плодовитость мух с делецией гена *Hsp67Bc* достоверно не снижалась.
3. Впервые показано, что *Hsp67Bc* необходим для устойчивости *D. melanogaster* к кратковременному и длительному воздействию пониженной температуры (0 °C). Нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* имаго характеризуются замедленным восстановлением после холодовой комы при 0 °C и пониженной выживаемостью.
4. Ген *Hsp67Bc* необходим для предотвращения агрегации белков с удлинённым полиглутаминовым трактом: на модели глаза дрозофилы с эктопической экспрессией гена, кодирующего мутантный Ataxin-3 человека с удлинённым полиглутаминовым трактом, показано, что отсутствие гена *Hsp67Bc* усиливает фенотипические проявления, характерные для дегенерации глаза *D. melanogaster*.
5. Впервые показано, что делеция гена *Hsp67Bc* приводит к увеличению количества аутофагических вакуолей в яичниках мух 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*.

Положения, выносимые на защиту

1. Делеция гена *Hsp67Bc*, кодирующего малый белок теплового шока, замедляет процесс восстановления и снижает выживаемость *D. melanogaster* после холодовой комы (2, 4 и 12 ч при 0 °C).
2. Нокаут гена *Hsp67Bc* на фоне эктопической экспрессии трансгена, кодирующего белок Ataxin-3 человека с удлинённым полиглутаминовым трактом, усиливает процесс дегенерации клеток глаз мух.
3. Делеция гена *Hsp67Bc* *D. melanogaster* нарушает процесс макроаутофагии на стадии созревания аутофагосом в нейронах центральной нервной системы имаго в присутствии бактерий *Wolbachia*.

Публикации по теме диссертации

- Статьи:**
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. **(импакт-фактор РИНЦ 0,734)**
 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. **(IF 3,312; Q3)**
 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. **(IF 3,612; Q1)**
 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. **(импакт-фактор РИНЦ 1,157; Q4)**

Конференции:

- Д. А. Малькеева, М. В. Жукова, Е. В. Киселева. Зависимость численности симбиотических бактерий *Wolbachia* в мозге *Drosophila melanogaster* от уровня экспрессии хозяином гена белка теплового шока *hsp67Bc* – Материалы VIII Всероссийского с международным участием конгресса молодых учёных-биологов «Симбиоз – Россия 2015», стр. 85. Новосибирский государственный университет, 5-9 октября 2015 г., г. Новосибирск
- D.A. Malkeyeva, E.V. Kiseleva. The density of *Wolbachia* strain wMelPop in *Drosophila melanogaster* brain is inversely related to the level of *hsp67Bc* gene expression – The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, P. 177. Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September, 2016
- Малькеева Д.А., Фёдорова С.А., Киселева Е.В. Воздействие малого белка теплового шока Hsp67Bc на приспособленность *Drosophila melanogaster* в нормальных и стрессовых условиях – Материалы Международной конференции Хромосома 2018, стр. 141-142. 20 - 24 августа 2018, Новосибирск, Россия
- Dina Malkeyeva, Svetlana A. Fedorova, Elena Kiseleva. The Effect Of Small Heat Shock Protein Hsp67Bc On The Fitness Of *Drosophila Melanogaster* Under Stressful Conditions – 3rd International Conference “Smart Bio”, P. 332. Kaunas, Lithuania, May 2 – 4 2019
- Dina Malkeyeva, Svetlana A. Fedorova, Elena Kiseleva. Hsp67Bc Small Heat Shock Protein Plays a Significant Role in *Drosophila melanogaster* Cold Stress Tolerance – Stress Signalling, Quality Control, Phase Separation, Aging and Disease in Proteostasis (Gordon Research Conference). Barga, Italy, June 23 – 28 2019