

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА Hsp67Bc В ОРГАНИЗМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© Д. А. Малькеева,<sup>1, 2, \*</sup> Е. В. Киселева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090,  
и <sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090;  
\* электронный адрес: malkeyeva@bionet.nsc.ru

Белки теплового шока (Hsp) — универсальное для живых организмов средство защиты от воздействия неблагоприятных факторов среды. Выделяют шесть семейств Hsp, различающихся по строению и выполняемым функциям, однако их общей ролью в клетке является поддержание белковых компонентов в рабочем состоянии. Наиболее разнообразным по оказываемому на жизнедеятельность организма влиянию является семейство малых белков теплового шока (sHsp), свойства множества представителей которого глубоко изучены на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*, удобном модельном объекте. В настоящей работе представлены и обсуждаются данные о роли белка Hsp67Bc *D. melanogaster*, являющегося ближайшим функциональным ортологом sHsp HSPB8 человека.

Ключевые слова: малые белки теплового шока, Hsp67Bc, *Drosophila melanogaster*.

Принятые сокращения: Hsp — белки теплового шока, sHsp — малые белки теплового шока, ПЖ — продолжительность жизни, LC3 — microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, BAG — Bcl-2-associated athanogene.

Hsp — класс белков, вырабатываемых клеткой в ответ на воздействие неблагоприятных факторов (повышенной температуры, окислительного стресса и т. д.). Основными функциями Hsp являются придание полипептидам нативной конформации, предотвращение агрегации денатурировавших белков, разрушение белковых агрегатов и протеолиз. Hsp крайне консервативны и обнаружены у представителей всех царств живых организмов (Lindquist, 1986; Schlesinger, 1990). На основании молекулярной массы и гомологии последовательностей Hsp разделяют на 6 семейств: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 и sHsp (Morgow, Tanguay, 2015).

Белки семейства sHsp имеют молекулярную массу от 12 до 42 кДа и характеризуются наличием консервативного  $\alpha$ -кристаллинового домена, ответственного за димеризацию. Основной функцией sHsp является предотвращение агрегации поврежденных белков. Семейство sHsp крайне гетерогенно. Количество его представителей различно не только между царствами, но и между видами живых организмов. Так, у млекопитающих известно 10 sHsp (HSPB1—HSPB10), тогда как у растений их число варьирует от 19 до 36 в зависимости от вида (Basha et al., 2012; Waters, 2013). У *D. melanogaster* известно 12 sHsp с мол. массой от 16.9 до 26.6 кДа, имеющих различную локализацию в клетке (см. таблицу) (Morgow, Tanguay, 2015). Наиболее известны и хорошо изучены Hsp22, Hsp23, Hsp26 и Hsp27 (Sarkar et al., 2011). Hsp22 оказывает значительное влияние на продолжительность жизни (ПЖ) *D. melanogaster*: отсутствие экспрессии *hsp22* сокращает ПЖ мух на 40 % (Morgow et al., 2004). Также показано, что у *D. melanogaster*, отбирившихся по

принципу увеличенной ПЖ, уровень мРНК Hsp22 в 2—10 раз выше, чем у остальных (Kurapati et al., 2000). Это связывают с расположением Hsp22 в митохондриях — чувствительных к стрессу органеллах, где происходит окислительное фосфорилирование и по этой причине повышен риск повреждения белков активными формами кислорода. Согласно распространенной свободнорадикальной теории процесс старения ускоряется вследствие нарушения функций митохондрий (Bratic, Larsson, 2013). Считается, что Hsp22 защищает компоненты митондрий благодаря своим шаперонным свойствам, что способствует увеличению ПЖ (Morgow et al., 2004). Цитозольный Hsp23 помимо общих для всех sHsp функций играет важную роль в устойчивости *D. melanogaster* к гипоксии и восстановлении после холодового оцепенения (Azad et al., 2009; Colinet et al., 2010). Hsp27 расположен в ядре и играет важную роль в защите организма *D. melanogaster* от грибковых и бактериальных инфекций (Chen et al., 2010). В последние годы активно изучается Hsp67Bc, являющийся функциональным ортологом HSPB8 человека (Carr et al., 2010) и обладающий рядом важных для жизнедеятельности организма функций.

### Ген *hsp67Bc*

Ген *hsp67Bc* является одним из семи генов sHsp, расположенных в локусе 67B левого плеча третьей хромосомы *D. melanogaster*, и находится в районе 67B2 (Ayme, Tissieres, 1985; Pauli, Tonka, 1987). В нормальных условиях (24—25 °C) *hsp67Bc* экспрессируется в ходе эмбриогене-

Малые белки теплового шока (sHsp) *Drosophila melanogaster*

Название	Хромосома, локус	Молекулярная масса, кДа	Внутриклеточная локализация
CG14207	X, 18D	21.8/ 20.8/ 17.1/ 17.2 (в зависимости от транскрипта)	Цитозоль
CG43851	2L, 23A	16.9	Не определена
CG13133	2L, 31A	24.5	Цитозоль
L(2)efl (CG4533)	2R, 59F	21.3/ 17.2 (в зависимости от транскрипта)	»
CG7409	3L, 66A	18.0	»
CG4461	3L, 67B	23.8	»
Hsp67Ba (CG4167)	3L, 67B	26.6	»
Hsp26 (CG4183)	3L, 67B	23.0	»
Hsp67Bc (CG4190)	3L, 67B	22.2	»
Hsp22 (CG4460)	3L, 67B	19.8	Митохондрии
Hsp23 (CG4463)	3L, 67B	20.6	Цитозоль
Hsp27 (CG4466)	3L, 67B	23.6	Ядро

неза *D. melanogaster*, на стадии окукливания и у имаго. Экспрессия гена начинается в желточных ядрах приблизительно через 7 ч после откладки яйца, что соответствует стадии 11—12 эмбрионального развития (Pauli, Tonka, 1987; Fisher et al., 2012). На стадиях 13—16 *hsp67Bc* экспрессируется в клетках формирующегося мозга, брюшной нервной цепочки и зачатков сенсорной нервной системы эмбриона (Fisher et al., 2012). У личинок *D. melanogaster* мРНК Hsp67Bc почти не обнаруживается до позднего третьего возраста, когда личинка готовится перейти на стадию куколки (Pauli, Tonka, 1987). Максимум транскрипция гена *hsp67Bc* достигает на стадии ранней куколки, после чего концентрация его мРНК убывает (Pauli, Tonka, 1987). У взрослых *D. melanogaster*, по данным FlyAtlas (Chintapalli et al., 2007), *hsp67Bc* наиболее интенсивно экспрессируется в мозге и мальпигиевых сосудах. С возрастом экспрессия этого гена возрастает (Landis et al., 2004).

При воздействии повышенной температуры экспрессия *hsp67Bc* многократно увеличивается. На культуре клеток S2 *Drosophila* показано, что во время теплового шока (15 мин при 40 °C) уровень его мРНК повышается в 10 раз по сравнению с нормальной температурой (25 °C), а через 1 ч после теплового воздействия — еще в 10 раз (Vos, 2009). Экспрессия *hsp67Bc* в ответ на действие повышенной температуры запускается фактором теплового шока (heat shock factor, Hsf), который связывается с его промотором (Birch-Machin et al., 2005). Такой механизм активации присущ и некоторым другим генам sHsp — *hsp22*, *hsp23*, *hsp26*, *hsp27* и *hsp67Ba* (Birch-Machin et al., 2005).

### Структура и функции белка Hsp67Bc

Белок Hsp67Bc состоит из 199 аминокислот и имеет мол. массу 22.18 кДа (The UniProt Consortium, 2015). Как и все sHSP, он содержит  $\alpha$ -кристаллиновый домен (Nakamoto, Vigh, 2007).

Как упоминалось выше, экспрессия гена *hsp67Bc* специфична в основном для нервной ткани и варьирует в зависимости от стадии развития *D. melanogaster*. Показано,

что белок Hsp67Bc участвует в формировании щетинок — периферических сенсорных органов, строение и расположение которых эволюционно консервативно (Held, 1991; Takahashi et al., 2010). Нокдаун *hsp67Bc* посредством РНК-интерференции приводит к нарушению их строения (Takahashi et al., 2010). Возможно, это связано с тем, что *hsp67Bc* экспрессируется в нервной ткани развивающихся *D. melanogaster*, а щетинки являются частью периферической нервной системы. Предполагается, что расположение щетинок у имаго и нейробластов у эмбриона определяется одним и тем же механизмом (Held, 1991). Таким образом, Hsp67Bc может играть важную роль в формировании и функционировании нервной системы *D. melanogaster*.

Белок Hsp67Bc *D. melanogaster* идентифицирован как функциональный ортолог HSPB8 человека, одной из функций которого является активация процесса макроаутофагии (Carra et al., 2010). Макроаутофагия — один из трех типов аутофагии (другие два — микроаутофагия и шаперонзависимая аутофагия), процесса дегградации компонентов цитоплазмы, при котором белки, белковые агрегаты и целые органеллы направляются в лизосомы для дальнейшей переработки. Аутофагия происходит как в нормальных условиях для поддержания метаболизма, так и при голодании, гипоксии и других неблагоприятных состояниях (Juenemann, Reits, 2012). Процесс макроаутофагии начинается с формирования вокруг предназначенного для дегградации участка цитоплазмы мембранной структуры — фагофора. Замкнувшись, фагофор образует имеющую две мембраны аутофагосому, которая затем сливается с лизосомой. Внутренняя мембрана аутофагосомы растворяется (на этом этапе органелла называется аутолизосомой), после чего происходит дегградация ее содержимого (рис. 1) (Kelekar, 2005). В клетках человека HSPB8 в комплексе с модулятором шаперонной активности BAG3 (Bcl-2-associated athanogene 3) локализуется в Z-полосах мышц и, как было упомянуто выше, участвует в стимуляции макроаутофагии. У *D. melanogaster* единственным представителем BAG-белков является Starvin, выполняющий функции BAG3. Hsp67Bc повторяет функции HSPB8, взаимодействуя с BAG3 человека и локализуясь в комплексе с белком Starvin

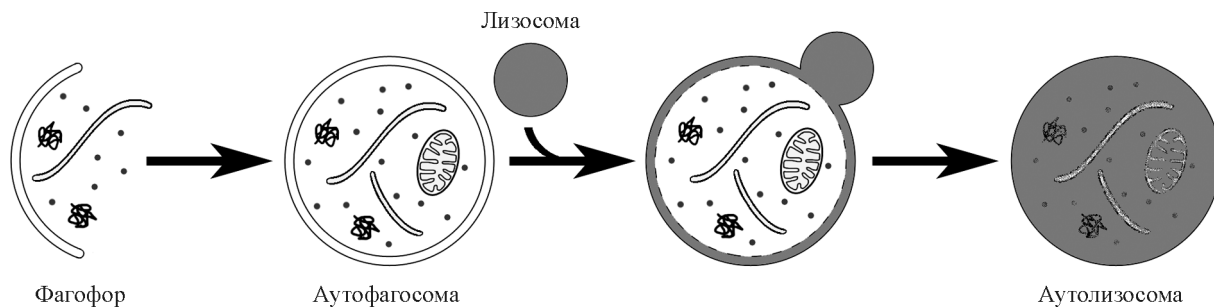


Рис. 1. Схема процесса макроаутофагии.

На начальном этапе вокруг подлежащих деградации элементов цитоплазмы формируется двухслойная мембранная структура — фагофор, который, замыкаясь, образует двухмембранную структуру — аутофагосому. Внешняя мембрана аутофагосомы сливается с лизосомой, в результате чего образуется аутолизосома, в которой внутренняя мембрана и содержимое аутофагосомы расщепляются лизосомальными гидролазами.

в Z-полосах мышц *D. melanogaster* (Carra et al., 2010). Комплекс Hsp67Bc—Starvin индуцирует липидирование LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), что переводит его из цитозольной формы LC3-I в связанную с образующимся фагофором форму LC3-II (Carra et al., 2010). Переход LC3-I в LC3-II является маркером макроаутофагии (Kabeya et al., 2000). Котранфекция Starvin и Hsp67Bc активирует макроаутофагический путь деградации субклеточных структур, что выявлено визуализацией связанного с GFP белка LC3 в клетках S2 *D. melanogaster*. Похожее действие оказывает комплекс BAG3 и HSPB8. Степень индукции макроаутофагии при таких условиях сравнима с действием рапамицина — известного стимулятора макроаутофагического пути (Carra et al.,

2010). Таким образом, комплекс Hsp67Bc—Starvin *D. melanogaster* является ортологом комплекса HSPB8—BAG3 человека и выполняет функцию модулятора макроаутофагии.

Основной функцией белков семейства sHsp является предотвращение агрегации денатурировавших белков и поддержание их в форме, удобной для фолдинга АТФ-зависимыми Hsp, обладающими шаперонными свойствами, такими как комплекс Hsp70/Hsp40 (Vos, 2009). Эксперименты на клеточной культуре S2 *D. melanogaster* показали, что белок Hsp67Bc не способствует Hsp70-зависимому рефолдингу денатурировавшей люциферазы, однако лучше других белков семейства предотвращает агрегацию мутантных белков с полиглутаминовыми трактами (Vos, 2009; Carra et al., 2010). Белки с протяженными полиглутаминовыми трактами склонны к образованию агрегатов, что в нейронах вызывает повреждение плазматической мембраны и может привести к их гибели. С такими мутациями связаны нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Хантингтона и спиноцеребеллярная атаксия (Ashley, Warren, 1995; Vos, 2009). В клетках S2 повышенная экспрессия *hsp67Bc* в значительной степени способствовала снижению содержания агрегатов белка хантингтина с 119 и 128 глутаминовыми остатками. Кроме того, уровень растворимого хантингтина в таких клетках также понижался (Vos, 2009; Carra et al., 2010). Исследование *in vivo* на модели спиноцеребеллярной атаксии *D. melanogaster* также выявило способность Hsp67Bc снижать негативное воздействие белков с полиглутаминовыми трактами (Carra et al., 2010). В эксперименте использовали мух, экспрессирующих в глазах мутантную форму атаксина 3 с 78 глутаминовыми остатками, вызывающую деградацию омматидиев. Повышенная экспрессия *hsp67Bc* ослабляла дегенерацию глаз, в то время как его нокаунт путем РНК-интерференции значительно ухудшал фенотип (Carra et al., 2010). По-видимому, подобное влияние Hsp67Bc связано с его способностью ингибировать синтез белка и стимулировать макроаутофагию через фосфорилирование eIF2 $\alpha$  —  $\alpha$ -субъединицы эукариотического фактора инициации трансляции (Carra et al., 2010). Предполагаемая схема действия Hsp67Bc представлена на рис. 2.

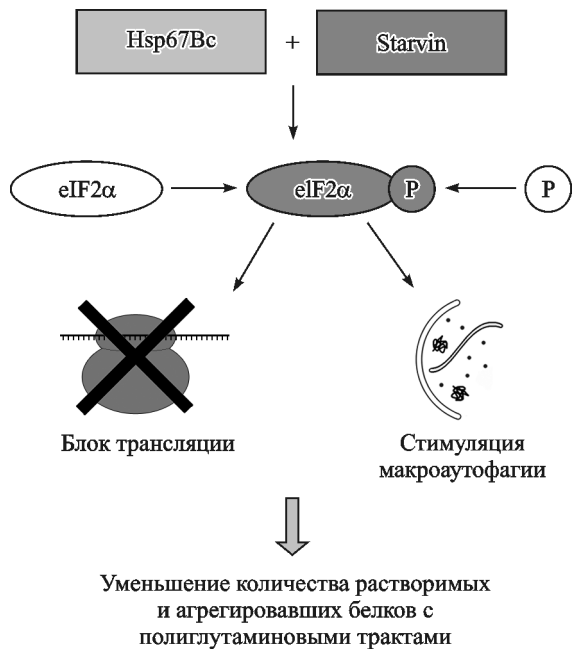


Рис. 2. Предполагаемая схема влияния белка Hsp67Bc на уровень трансляции и макроаутофагии (модифицировано из: Carra et al., 2010).

Hsp67Bc образует комплекс с белком Starvin и приводит к фосфорилированию (P)  $\alpha$ -субъединицы эукариотического фактора инициации трансляции 2 (eIF2 $\alpha$ ), переводя ее в неактивную форму. При этом блокируется трансляция и активизируется макроаутофагический путь деградации элементов цитоплазмы, в результате чего понижается уровень растворимых белков с полиглутаминовыми трактами, а их агрегаты удаляются посредством макроаутофагии.

Hsp67Bc оказывает влияние на ПЖ *D. melanogaster* при 22 °С. Показано, что ПЖ мух с повышенной экспрессией гена *hsp67Bc* под промотором UAS, вызванной драйвером *elav-GAL4* (*GAL4* встроен под промотором гена *elav* — *embryonic lethal abnormal vision*), выше по сравнению с диким типом на 5.8 %, а драйвером



eu-GAL4 (*GAL4* под промотором гена *eu* — *eyeless*) — на 16.3 % (Vos, 2009). Это свойство Hsp67Bc, скорее всего, обусловлено его способностью стимулировать удаление поврежденных белков из клеток путем макроаутофагии.

Таким образом, малый белок теплового шока Hsp67Bc играет важную роль в процессе формирования нервной системы *D. melanogaster* в ходе эмбриогенеза, а также в поддержании нормального функционирования организма взрослого насекомого. Hsp67Bc обладает нейропротекторными свойствами и оказывает положительное влияние на ПЖ мух за счет способности активизировать макроаутофагический путь деградации склонных к агрегации мутантных и поврежденных белков. Белок Hsp67Bc *D. melanogaster* имеет функциональный ортолог у человека — HSPB8, который также способен стимулировать макроаутофагию и ингибировать синтез белка. Более подробное изучение Hsp67Bc на *D. melanogaster*, являющейся удобным модельным объектом, может открыть новые пути в лечении и профилактике нейродегенеративных заболеваний человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-08993) и бюджетного проекта VI. 53.1.2.

### Список литературы

- Ashley C. T. Jr., Warren S. T. 1995. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu. Rev. Genet.* 29 : 703—728.
- Ayme A., Tissieres A. 1985. Locus 67B of *Drosophila melanogaster* contains seven, not four, closely related heat shock genes. *EMBO J.* 4 : 2949—2954.
- Azad P., Zhou D., Russo E., Haddad G. G. 2009. Distinct mechanisms underlying tolerance to intermittent and constant hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE.* 4 : e5371.
- Basha E., O'Neill H., Vierling E. 2012. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem. Sci.* 37 : 106—117.
- Birch-Machin I., Gao S., Huen D., McGirr R., White R. A., Russell S. 2005. Genomic analysis of heat-shock factor targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 6 : R63.
- Bratic A., Larsson N. G. 2013. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* 123 : 951—957.
- Carra S., Boncoraglio A., Kanon B., Brunsting J. F., Minnoia M., Rana A., Vos M. J., Seidel K., Sibon O. C., Kampinga H. H. 2010. Identification of the *Drosophila* ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases. *J. Biol. Chem.* 285 : 37 811—37 822.
- Chen J., Xie C., Tian L., Hong L., Wu X., Han J. 2010. Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 20 774—20 779.
- Chintapalli V. R., Wang J., Dow J. A. T. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease. *Nature Genetics.* 39 : 715—720.
- Colinet H., Lee S. F., Hoffmann A. 2010. Knocking down expression of *Hsp22* and *Hsp23* by RNA interference affects recovery from chill coma in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 213 : 4146—4150.
- Fisher B., Weiszmann R., Frise E., Hammonds A., Tomanek P., Beaton A., Berman B., Quan E., Shu S., Lewis S., Rubin G., Barale C., Laguertas E., Quinn J., Ghosh A., Hartenstein V., Ashburner M., Celniker S. 2012. BDGP insitu homepage <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>.
- Held L. I. Jr. 1991. Bristle patterning in *Drosophila*. *Bioessays.* 13 : 633—640.
- Juenemann K., Reits E. A. 2012. Alternative macroautophagic pathways. *Int. J. Cell Biol.* 2012 : 189794.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19 : 5720—5728.
- Kelekar A. 2005. Autophagy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066 : 259—271.
- Kurapati R., Passananti H. B., Rose M. R., Tower J. 2000. Increased hsp22 RNA levels in *Drosophila* lines genetically selected for increased longevity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55 : B552—B559.
- Landis G. N., Abdueva D., Skvortsov D., Yang J., Rabin B. E., Carrick J., Tavare S., Tower J. 2004. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 7663—7668.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 1151—1191.
- Morrow G., Battistini S., Zhang P., Tanguay R. M. 2004. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 279 : 43 382—43 385.
- Morrow G., Tanguay R. M. 2015. *Drosophila* small heat shock proteins: an update on their features and functions. In: The big book on small heat shock proteins. Switzerland: Springer Internat. Publ. S 579—606.
- Nakamoto H., Vigh L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol. Life Sci.* 64 : 294—306.
- Pauli D., Tonka C. H. 1987. A *Drosophila* heat shock gene from locus 67B is expressed during embryogenesis and pupation. *J. Mol. Biol.* 198 : 235—240.
- Sarkar S., Singh M. D., Yadav R., Arunkumar K. P., Pittman G. W. 2011. Heat shock proteins: molecules with assorted functions. *Front. Biol.* 6 : 312—327.
- Schlesinger M. J. 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265 : 12 111—12 114.
- Takahashi K. H., Rako L., Takano-Shimizu T., Hoffmann A. A., Lee S. F. 2010. Effects of small Hsp genes on developmental stability and microenvironmental canalization. *BMC Evol. Biol.* 10 : 284.
- The UniProt Consortium. 2015. UniProt: a hub of protein information. *Nucl. Acids Res.* 43 : D204—D212.
- Vos M. J. 2009. Small heat shock proteins: implications for neurodegeneration and longevity. The Netherlands. Thesis, University of Groningen. 140 p.
- Waters E. R. 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.* 64 : 391—403.

THE FUNCTIONAL ROLE OF SMALL HEAT SHOCK PROTEIN Hsp67Bc  
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER**D. A. Malkeyeva*<sup>1, 2, \*</sup> *E. V. Kiseleva*<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090,  
and <sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090;  
\* e-mail: malkeyeva@bionet.nsc.ru

Heat shock proteins are universal agents protecting all known organisms from environmental stresses. These proteins are classified into six families differing in their structure and function, yet having a common purpose of maintaining cellular proteins in operating condition. The small heat shock protein family has the most diversified set of effects on the organism's vital activity with a great number of its members' features studied thoroughly in a fruit fly *Drosophila melanogaster*, which is regarded as a convenient model object. In this review, we represent and discuss data on the role of *Drosophila melanogaster* Hsp67Bc protein, which was earlier identified as the closest functional ortholog of human HSPB8 small heat shock protein.

**Key words:** small heat shock proteins, Hsp67Bc, *Drosophila melanogaster*.

---