

Streszczenie

Małe białka szoku cieplnego (sHSPs) należą do białek opiekuńczych występujących we wszystkich organizmach żywych. Białka te odgrywają istotną rolę zarówno w czasie rozwoju osobniczego jak i utrzymaniu homeostazy białkowej. Mutacje w genach kodujących sHSPs są przyczyną wielu chorób dziedzicznych wpływających na funkcję mięśni i układu nerwowego.

Hsp67Bc muszek owocowych jest sHSP, zidentyfikowanym jako najbliższy funkcjonalny ortolog ludzkiego HSPB8, kojarzonego z autofagią i dziedzicznym syndromem CMT (Charkot-Marie-Tooth). Analiza immunocytochemiczna wykazała nerwową lokalizację tego białka w embrionach *D.melanogaster*, w postaci skupisk komórek w centralnej części łańcuszka brzuszego. W stadiach larwalnych białko Hsp67Bc obserwuje się zarówno w nerwach jak i mięśniach somatycznych. W mięśniach Hsp67Bc lokalizuje w linii Z i prążku A sarkomeru, a białko jest również obserwowane w sąsiedztwie NMJ i na powierzchni jąder komórkowych.

W celu zbadania wpływu mutacji wywołujących CMT na funkcję mięśni, wygenerowano kompatybilne z systemem indukcji GAL4-UAS linie zawierające GFP-Hsp67Bc z wprowadzonymi mutacjami punktowymi odpowiadającymi mutacjom powodującym CMT. Wprowadzenie Hsp67Bc^{R126E} poskutkowało lokalizacją części białka w jądrach komórkowych i obniżoną kurczliwością mięśni. Sarkomeryczne rozmieszczenie białka przypominało typ dziki. Analiza ultrastruktury ujawniła wyraźne zaburzenia linii Z, oraz nadmierne odkładanie się glikogenu i uszkodzenie grzebieni mitochondrialnych.

Druga substytucja, Hsp67Bc^{R126N}, spowodowała pojawienie się dużych niejednorodnych agregatów i miejscowe zagęszczenia sarkomerów. Zaburzenia morfologii linii Z nie były w tym przypadku tak wyraźne jak w Hsp67Bc^{R126E}. Nie zaobserwowano też uszkodzenia mitochondriów. Testy behawioralne i kurczliwości potwierdziły mniejszą toksyczność Hsp67Bc^{R126N} w stosunku do Hsp67Bc^{R126E}. Stwierdzono obecność Hsp67Bc^{R126N} w sąsiedztwie NMJ.

Wyciszenie Hsp67Bc w mięśniach i układzie nerwowym nie wykazało poważnych defektów morfologicznych. Szczegółowa analiza wykazała zmienioną

morfologię NMJ. Wyciszenie Hsp67Bc spowodowało zwiększenie liczby rozgałęzień i liczby kolbek synaptycznych. Ponadto mięśniowo specyficzny 'knock-down' wywołał też zmniejszenie średnicy kolbek synaptycznych. Obie mutacje ekspresjonowane w mięśniach miały wpływ na morfologię NMJ. Hsp67Bc^{R126E} spowodowało obniżenie liczby kolbek synaptycznych i rozgałęzień. W przypadku Hsp67Bc^{R126N} widoczne jest zatarcie granic pomiędzy pojedynczymi kolbkami i zwiększona liczba kolbek synaptycznych i rozgałęzień.

Substytucje konserwatywnej ewolucyjnie reszty aminokwasowej w Hsp67Bc powodują znacznie różniące się od siebie fenotypy, co sugeruje zaburzenie innych mechanizmów/funkcji zmutowanego sHSP. Zmiany morfologii NMJ pod wpływem poziomu białka i jego mutacji, wskazują na udział Hsp67Bc w regulacji polimorfizmu NMJ.

2.12.2019
J. Kłosa

Abstract

Small heat shock proteins (sHSPs) are molecular chaperones, widely spread among all living organisms. They play substantial role both during ontogenic development and in maintenance of protein homeostasis. Mutations in sHSPs coding genes underlie number of inherited diseases affecting function of muscle and nervous system.

Drosophila melanogaster Hsp67Bc gene encodes sHSP identified as nearest functional orthologue of human HSPB8, known for its role in autophagy and implication in CMT syndrome. Immunostaining analysis showed neural localization of the protein in fruit fly embryos. The strongest signal is visible in ventral cord (central nervous system) of late stage embryos, in centrally localized cell clusters. In larval stages Hsp67Bc shows both somatic muscle and neural localization. In muscle sarcomeric localization includes Z-disk and A-band, whereas the cytoplasmic fraction of Hsp67Bc accumulates at neuro-muscular junctions (NMJ) and the periphery of nuclei.

To investigate the impact of CMT-causing mutations on muscle function inducible, GFP-tagged Hsp67Bc was used, with mutated positive residue known to cause CMT and other pathological conditions. Hsp67Bc^{R126E} substitution resulted in nuclear localization of the protein and reduced contractility of muscle fibers. Distribution of the mutated form remained 'wild type'-like, but ultrastructure analysis revealed severe Z line distractions, accompanied by glycogen accumulations and damage of mitochondrial cristae.

Second substitution, Hsp67BC^{R126N}, enhanced formation of large heterogenic aggregates and resulted in local sarcomere compaction. Z line distortions were less severe than in Hsp67Bc^{R126E} mutant, and mitochondria were not affected. Behavioral

mobility tests confirmed lower toxicity of Hsp67Bc^{R126N} in muscle. Intriguingly aggregate prone form of Hsp67Bc kept its ability to localize at the NMJ sites.

Both muscle and neural knock-down did not show any major morphological defects in tissues. Detailed analysis in both cases revealed altered morphology of NMJ. Hsp67Bc knock-down showed increased complexity of arborization and elevated number of synaptic boutons. Moreover, muscle specific knock-down displayed decrease in synaptic bouton size. Both mutants expressed in muscles had impact on NMJ morphology. Hsp67Bc^{R126E} caused decrease in number of synaptic boutons and NMJ arborization. Hsp67Bc^{R126N} affected synaptic bouton separation and increased synaptic bouton number and NMJ arborization.

Altogether, substitution of evolutionary conserved amino-acid residue in Hsp67Bc with differently charged amino-acids lead to different phenotypes, suggesting distinct mechanisms underlying pathological changes caused by different R126 substitutions. Also, both protein levels and mutations affect NMJ morphology, indicating regulatory function of Hsp67Bc in NMJ polymorphism.

2.12.2017

Jędrzejewska