

## БЕЛОК ТЕПОВОГО ШОКА ПРЭСНОВОДНЫХ ПРОСТЕЙШИХ И ЕГО УЧАСТИЕ В АДАПТАЦИИ К ИЗМЕНЕНИЮ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

© А. Ю. Плеханов,<sup>1</sup> А. О. Смуров,<sup>2, 3</sup> Ю. И. Подлипаева,<sup>4</sup>  
Л. О. Иванова,<sup>3</sup> А. В. Гудков<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup> С.-Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, Гатчина, Ленинградская обл.,

<sup>2</sup> Зоологический институт РАН, <sup>3</sup> Биологический научно-исследовательский институт

С.-Петербургского государственного университета и <sup>4</sup> Институт цитологии РАН,

Санкт-Петербург; электронный адрес: pelgood@rambler.ru

Исследовали изменение уровня белка теплового шока (БТШ) в клетках пресноводных простейших — амёбы *Amoeba proteus* и инфузории *Paramecium jenningsi* — в ответ на изменение солёности среды. Стрессовым воздействием на клетки считали смену одной солёности на другую. Методом иммуноблоттинга в тотальном белковом экстракте интактных и подвергнутых солёностному стрессу клеток амёб и инфузорий был выявлен полипептидный антиген, перекрестно реагирующий с антителами к БТШ70 крупного рогатого скота. Тот же полипептидный антиген выявляется в клетках *A. proteus*, подвергнутых тепловому шоку; это позволяет предполагать, что выявленный при солёностном шоке полипептид является БТШ, родственным БТШ70 позвоночных. Обитание в среде с солёностью 2 ‰ для пресноводных простейших можно рассматривать как неблагоприятное, что маркируется повышенным содержанием БТШ у простейших, акклиматизированных к повышенной солёности. Такие акклиматизированные простейшие при стрессовом воздействии преимущественно расходуют накопленный БТШ70. Сделано заключение о том, что пресноводные простейшие, обитающие в условиях повышенной солёности, по-видимому, преадаптированы к изменению факторов среды.

Ключевые слова: солёностные адаптации, пресноводные простейшие, *Amoeba proteus*, *Paramecium jenningsi*, белки теплового шока.

Известно, что клетки всех живых организмов в ответ на действие стрессовых факторов реагируют синтезом так называемых белков теплового шока (БТШ или HSP — heat shock proteins) (Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000). Основная функция БТШ — цитопротекторная. Они способствуют адаптации организмов и их клеток к неблагоприятным воздействиям. БТШ представлены рядом семейств, различающихся по молекулярной массе, нуклеотидной последовательности генов, которыми они кодируются, и выполняемым функциям. Наиболее изученными являются БТШ с мол. массой 70 кДа — это так называемые БТШ70 (HSP70), обладающие весьма низкой видоспецифичностью (Маргулис, Гужова, 2000).

У одноклеточных организмов по сравнению с бактериями и многоклеточными животными БТШ70 изучены еще мало, причем эти исследования касаются главным образом различных паразитов, обитающих в теле теплокровных хозяев (Joshi et al., 1992; Requena et al., 1992; Wallace et al., 1992; Field et al., 2000; Perez-Serrano et al., 2000; Triana et al., 2000; Lloyd et al., 2002; Bakatselou et al., 2003; Varadharajan et al., 2004, и др.). Значительно меньше внимания уделяется БТШ70 свободноживущих простейших. К настоящему времени имеется лишь небольшое число публикаций, посвященных БТШ70 у отдельных видов свободноживущих инфузорий (Fink, Ze-

uthen, 1980; McMullin, Hallberg, 1987; La Terza et al., 2001; Hori, Fujishima, 2003), жгутиконосцев (Drzymalla et al., 1996; Barque et al., 2000) и амёб (Kalinina et al., 1988; Podlipaeva, 2001).

Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев функции БТШ70 у простейших изучаются в связи с адаптацией этих организмов к изменениям температуры окружающей среды. Однако поскольку БТШ являются универсальными цитопротекторами, логично предполагать их участие (в частности, участие БТШ70) в адаптации к различным иным неблагоприятным воздействиям. В частности, большой интерес в этом отношении представляет приспособление пресноводных простейших к изменению солёности водной среды, в которой они обитают.

Подобные работы в настоящее время проводятся почти исключительно на многоклеточных организмах, и актуальность настоящего исследования определяется, в частности, особенностью организации простейших, которые представляют собой одновременно и клетку, и полноценный организм. Следовательно, реакцию простейших на стресс можно рассматривать как модель более простую, чем многоклеточный организм, и не опосредованную спецификой функционирования клеток различных тканей. Известно, что уровень БТШ шока в клетках разных тканей одного организма, подвергнутого

соленостному стрессу, может быть различным (Deane, Wool, 2004).

Целью настоящего исследования было получение данных об изменении концентрации белка, иммунологически родственного БТШ70 позвоночных животных, в клетках свободноживущих пресноводных амёб и инфузорий при изменении солёности среды их обитания.

### Материал и методика

В работе были использованы свободноживущие пресноводные виды простейших: лобозные амёбы *Amoeba proteus* (штамм Val из коллекции Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН) и инфузории *Paramecium jenningsi* (штамм SR1-10 из коллекции культуры Лаборатории зоологии беспозвоночных БиНИИ СПбГУ). Культивирование простейших осуществляли по стандартным методикам: инфузорий — на салатной среде, инокулированной *Klebsiella aerogenes* (Sonneborn, 1970), амёб — на модифицированном минеральном растворе Прескотта и Кэрриера (Prescott, Carrier, 1964). Амёб кормили инфузориями *Tetrahymena pyriformis* (штамм GL из коллекции Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН). Для проведения опытов часть инфузорий и амёб, в норме содержащихся в пресной воде, была акклиматизирована к 2 ‰. Необходимую солёность среды создавали добавлением в культуральную среду раствора искусственной морской соли, приготовленной по прописи Шубравого (1983). Срок акклиматизации организмов составлял не менее 2 мес при комнатной температуре (18—20 °С).

Для обоих видов простейших определяли величину толерантного диапазона. Был составлен ряд тестовых солёностей от пресной воды (0 ‰) до среды солёностью 10 ‰ с интервалом 0.5 ‰. Максимальную солёность, при которой амёбы или инфузории могли поддерживаться в культуре неограниченно долго, принимали за значение толерантной границы (Smirnov, Fokin, 1998). В результате проведенных исследований были определены солёностные толерантные границы для *P. jenningsi* и *A. proteus*, акклиматизированных к пресной среде, которые составляли 3.25 и 2.5 ‰ соответственно. Для клеток, акклиматизированных к 2 ‰, солёностные толерантные границы составляли: для *P. jenningsi* — 6 ‰, для *A. proteus* — 3.5 ‰.

Стрессовым солёностным воздействием считался перенос клеток из одной солёности в другую: из 0 в 2 ‰, и наоборот. Разницу в 2 ‰ можно считать для простейших обоих видов шоковой, так как, с одной стороны, она не является для них летальной, находясь внутри их исходного солёностного толерантного диапазона, а с другой — вызывает физиологическую перестройку организма, которую можно тестировать по расширению толерантного диапазона простейших после окончания их акклиматизации.

Для осуществления солёностного шока в культуре амёб, выращенной при 0 ‰, изменяли солёность среды до величины 2 ‰ и выдерживали при изменённой солёности в течение 2 ч. Напротив, в культуре амёб, акклиматизированных к солёности 2 ‰, среду заменяли на пресную и также выдерживали в течение 2 ч. В качестве контроля использовали культуры амёб, равные по плотности опытным культурам.

Для осуществления солёностного шока у инфузорий две аликвоты культуры инфузорий, выращенных в пре-

сной среде, подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 400 g для осаждения клеток. К осажённым клеткам добавляли воду с солёностью 2 ‰ (опыт) или снова пресную воду (контроль). В таком состоянии инфузорий выдерживали в течение 1 ч. Аналогично поступали с инфузориями, акклиматизированными к солёности 2 ‰.

Для подтверждения принадлежности выявляемых после солевых шоков полипептидов к БТШ культуры амёб, выращенные как в пресной среде, так и при солёности 2 ‰, подвергали тепловому шоку (37 °С, 1 ч).

По окончании эксперимента клетки простейших осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин и обрабатывали ацетоном с целью прекращения жизнедеятельности, преципитации белков и пермеабилзации мембран. Промытый ацетоном материал осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин и подсушивали до исчезновения запаха ацетона. Затем к пробам добавляли буфер для разведения проб по Лэммли (Laemmli, 1970) и прогревали их на кипящей водяной бане в течение 2 мин. Подготовленные таким образом пробы подвергали электрофорезу в 13%-ном полиакриламидном геле в системе с додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) по Лэммли (Laemmli, 1970).

По завершении электрофореза разделённые белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Synpor или Amersham ECL) методом электроблоттинга (Towbin et al., 1979) или осуществляли поверхностный блоттинг (Plekhanov, 1996). Реперы молекулярной массы окрашивали на мембране 0.5%-ным раствором амидо-черного 10В в 10%-ной уксусной кислоте, приготовленной на 40%-ном этаноле, и дифференцировали в 5%-ной уксусной кислоте с добавлением анионообменной смолы Сферон-ДЭАЭ (Sklárny Kavaier, Вотице, Чехия).

В качестве реперов молекулярной массы использовали фосфорилзу В (94 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), яичный альбумин (45 кДа) и карбоангидразу (30 аДа); все — производства Sigma (США). Зависимость длины пробега репера от его молекулярной массы аппроксимировали к линейной методом наименьших квадратов и полученное линейное уравнение использовали для определения относительной молекулярной массы БТШ простейших.

Белки, иммунологически родственные БТШ70 позвоночных, выявляли иммунохимически. Для этого после сорбции белков остаточную сорбционную способность нитроцеллюлозной мембраны исчерпывали инкубацией ее в молоке («Петмол», жирность 0.5 ‰), затем мембрану выдерживали в растворе антител против БТШ70 из мышц быка (антитела предоставлены Б. А. Маргулисом, Институт цитологии РАН), приготовленном в разведении 1 : 150 на физиологическом фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение ночи при комнатной температуре. Далее мембрану промывали в PBS и выдерживали в растворе белка А золотистого стафилококка, меченного пероксидазой хрена (в качестве вторичных антител) (НИИЭМ им. Пастера, разведение 1 : 2), приготовленном на ФБР, в течение 1 ч при 37 °С. По окончании инкубации мембрану промывали в PBS 3 раза по 10 мин, ополаскивали водой, после чего выявляли пероксидазную активность бензидином или методом усиленной хемиллюминесценции (ECL), который обладает большей чувствительностью.

В случае применения метода усиленной хемиллюминесценции мембрану выдерживали в течение 1 мин в

коммерческой смеси реактивов ECL (Amersham) и накладывали на листовую фотопленку (Amersham) через тонкую полиэтиленовую пленку. Время экспозиции подбирали в интервале от 15 с до 15 мин. Фотопленку проявляли в стандартном проявителе для черно-белых фотобумаг и фиксировали в 20%-ном  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . После осуществления ECL блот дважды ополаскивали водой и дополнительно проявляли бензидином.

Для проявления бензидином мембрану с сорбированным на ней иммунопероксидазным комплексом выдерживали в растворе, содержащем 0.05 % бензидина, 0.03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.002 М лимонной кислоты и 0.004 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН 5) (Plekhanov, 1996). Бензидин добавляли, используя 5%-ный спиртовой раствор с нагреванием его до прозрачности и последующим охлаждением до комнатной температуры. После проявления зон мембрану промывали горячей дистиллированной водой для остановки проявления.

В случае инфузорий *P. jenningsi* для выявления белков, иммунологически родственных БТШ70 позвоночных, вместо электрофореза применяли технику дот-блоттинга. С этой целью осажденных центрифугированием и промытых ацетоном простейших растворяли в минимальном объеме 1%-ного ДДС-На, содержащего 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ФМСФ; затем 1—2 мкл полученного экстракта наносили в точку на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану высушивали и искомым антиген выявляли иммунохимически, как описано выше.

## Результаты и обсуждение

Методом иммуноблоттинга в тотальном белковом экстракте амёб *A. proteus* выявляется полипептидный антиген с мол. массой около 84 кДа, перекрестно реагирующий с антителами к БТШ70 крупного рогатого скота (рис. 1; 2, б).

В тотальном белковом экстракте инфузории *P. jenningsi* выявляется полипептидный антиген с той же молекулярной массой, что и у *A. proteus*, который также перекрестно реагирует с антителами к БТШ70 крупного рогатого скота (рис. 2, в; 3). Кроме того, в клетках *P. jenningsi* при помощи высокочувствительного метода ECL обнаруживаются дополнительные минорные полипептиды с мол. массами около 95 и 60 кДа, которые также перекрестно реагируют с антителами против БТШ70 (рис. 2, в). Являются ли эти минорные полипептиды нативными или артефактными, покажут дальнейшие исследования.

Ранее (Podlipaeva, 2001) уже сообщалось о наличии у амёбы *A. proteus* (штамм Да из коллекции Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН) полипептидного антигена, перекрестно реагирующего с поликлональными некоммерческими кроличьими антителами, также полученными от Б. А. Маргулиса (Лаборатория защитных механизмов клетки Института цитологии РАН) и выработанными против БТШ70 крупного рогатого скота. Позиция, занимаемая выявленным полипептидом на блоте относительно молекулярного маркера 66 кДа, позволила сделать вывод о том, что данный белок принадлежит к семейству БТШ70 и является белком теплового шока на основании его сходства к нуклеотидам по результатам аффинной хроматографии, однако точного определения и расчета его молекулярной массы не проводили (Podlipaeva, 2001).

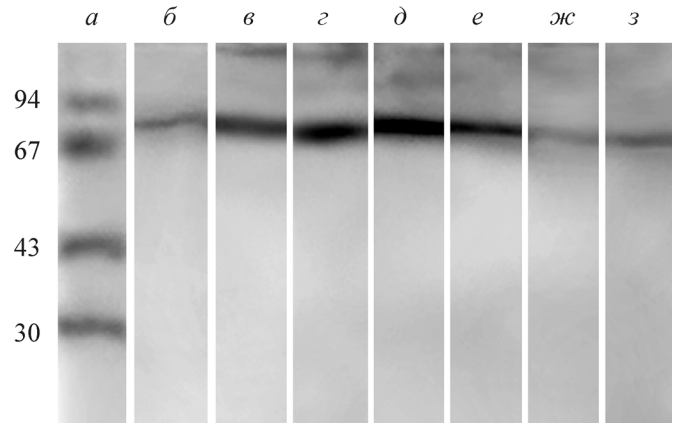


Рис. 1. БТШ в клетках амёб *Amoeba proteus* штамма Val, культивируемых в среде с разной соленостью, подвергнутых соленостному и тепловому шокам.

Иммуноблоттинг после электрофореза в 13%-ном ПААГ. а — маркеры молекулярной массы; б — контрольная культура амёб, 0 ‰; в — амёбы из пресной среды, подвергнутые тепловому шоку (37 °С, 1 ч), через 3 ч после воздействия; г — амёбы из пресной среды, подвергнутые соленостному шоку (2 ‰, 2 ч), через 3 ч после воздействия; д — культура амёб, акклиматизированных к 2 ‰, не подвергавшаяся шоковым воздействиям; е — культура амёб, акклиматизированных к 2 ‰, подвергнутая тепловому шоку (37 °С, 1 ч), сразу после воздействия; ж — культура амёб, акклиматизированных к 2 ‰, подвергнутая тепловому шоку (37 °С, 1 ч), через 3 ч после воздействия; з — культура амёб, акклиматизированных к 2 ‰, подвергнутая соленостному шоку (0 ‰, 2 ч), через 3 ч после воздействия.

Отметим также, что у пресноводных инфузорий *Tetrahymena* был обнаружен белок, названный БТШ90 (HSP90), обладающий мол. массой 82—85 кДа и являющийся белком теплового шока (Frankel et al., 2001). В первичной структуре этого белка не было обнаружено сколько-нибудь высокой гомологии с БТШ70 позвоночных, в то время как в настоящей работе речь идет о белке, имеющем общие антигенные детерминанты с БТШ70 позвоночных, что может указывать на наличие существенной гомологии в первичной структуре последних. По-видимому, БТШ90 и БТШ70 простейших являются различными полипептидами.

При повышении солености среды от 0 до 2 ‰ концентрация обнаруженного нами антигена спустя 3 ч после воздействия у амёб заметно возрастала (рис. 1, г). Очевидно, что речь, как и в случае БТШ70 позвоночных, идет о продукте «раннего» гена, экспрессия которого темпорально (и, по-видимому, функционально) предшествует основным изменениям в синтезе белков, что в свою очередь составляет основу явления физиологической адаптации (акклимации) к изменившимся условиям среды.

При тепловом шоке у амёб, выращенных в пресной среде, повышается уровень того же самого антигена, что и при соленостном шоке (рис. 1, в). Таким образом, обнаруженный нами антиген может быть охарактеризован как ранний белок стресса, иммунологически родственный БТШ70 позвоночных и, по всей видимости, являющийся его аналогом.

Амёбы, акклиматизированные к солености 2 ‰, демонстрируют высокий конститутивный уровень обнаруженного нами антигена (рис. 1, д). Повышенное содержание БТШ в солености, близкой к границе толерантного диапазона данного штамма (2.5 ‰), с одной стороны, подтверждает повреждающий характер этих условий среды,

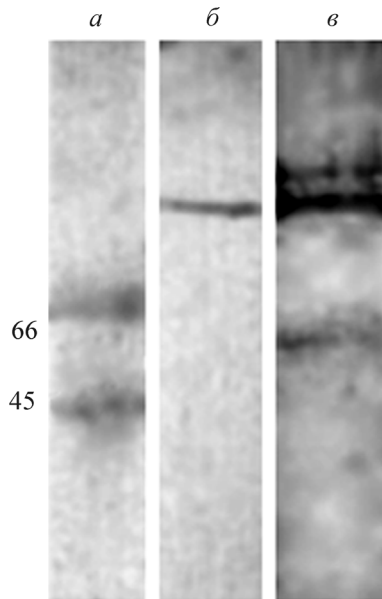


Рис. 2. БТШ в клетках амёб *Amoeba proteus* штамма Val и инфузорий *Paramecium jenningsi* штамма SR1, культивируемых в пресной среде.

Иммуноблоттинг после электрофореза в 13%-ном ПААГ. а — маркеры молекулярной массы, б — амёбы, в — инфузории.

а с другой — согласуется с ранее полученными данными по температурному воздействию на амёб другого штамма того же вида (Podlipaeva, 2001).

Любопытно, что при дополнительном стрессовом воздействии (перенос клеток, акклимированных к этой солености, в пресную среду (рис. 1, з), а также тепловой шок (рис. 1, е, ж)) уровень БТШ70 снижается. Это может означать, что накопленный белок расходуется при стрессовом воздействии. Иными словами, пресноводные амёбы, акклимированные к повышенной солености, преадаптированы к возможному стрессовому воздействию, а свойства их шаперонной системы в процессе адаптации изменяются.

Аналогичная картина выявляется методом дот-блоттинга и у пресноводных инфузорий *P. jenningsi*: уровень БТШ70 незначителен в клетках, выращенных в пресной среде (рис. 3, а), и повышается при соленостном шоке (рис. 3, в). Напротив, инфузории, акклимированные к солености 2 ‰, демонстрируют высокий конститутивный уровень БТШ70 (рис. 3, б), который снижается (расходуется) при стрессовом воздействии (соленостном шоке) (рис. 3, з).

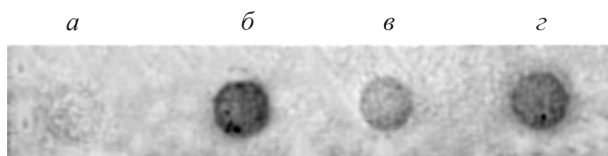


Рис. 3. БТШ в клетках инфузорий *Paramecium jenningsi* штамма SR1, культивируемых в среде с разной соленостью и подвергнутых соленостным шокам.

Иммунохимическая окраска дот-блотов тотального белкового экстракта инфузорий. а — контрольная культура инфузорий, 0 ‰; б — культура инфузорий, акклимированных к 2 ‰; в — соленостный шок 0 → 2 ‰; з — соленостный шок 2 → 0 ‰.

Ранее в ходе исследований температурных адаптаций у амёб *A. proteus* уже было выявлено, что эти простейшие обладают заметным конститутивным уровнем БТШ70 (Podlipaeva, 2001), и автор предлагает рассматривать это как преадаптацию к изменению температуры среды обитания.

Таким образом, преадаптация пресноводных простейших, акклимированных в среде с повышенной соленостью к возможным изменениям факторов среды, по-видимому, является общим правилом. Дальнейшие исследования с привлечением пресноводных простейших из других таксономических групп позволят проверить справедливость этой гипотезы.

Авторы выражают глубокую признательность Б. А. Маргулису за предоставление антител против БТШ70.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49811 и 03-04-48062).

### Список литературы

- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотических клетках. Цитология. 42 (4) : 323—342.
- Шубравый О. И. 1983. Аквариум с искусственной морской водой для содержания примитивного многоклеточного организма *Trichoplax* и других мелких беспозвоночных. Зоол. журн. 62 (4) : 618—621.
- Bakatselou C., Beste D., Kadri A. O., Somanath S., Clarka C. G. 2003. Analysis of genes of mitochondrial origin in the genus *Entamoeba*. J. Eukar. Microbiol. 50 : 210—214.
- Barque J. P., Schedler P., Floch E., Bonaly J. 2000. In *Euglena gracilis*, a heat-shock protein related to hsc73 is constitutive and stress inducible. Arch. Biochem. Biophys. 378 : 1—5.
- Deane E. E., Wool N. Y. 2004. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). Amer. J. Physiol. 287 : R1054—R1063.
- Drzymalla C., Schroda M., Beck C. F. 1996. Light-inducible gene HSP70B encodes a chloroplast-localized heat shock protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. 31 : 1185—1194.
- Feder M. E., Hofmann G. E. 1999. Heat-shock proteins molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Ann. Rev. Physiol. 61 : 243—282.
- Field J., Van Dellen K., Ghosh S. K., Samuelson J. 2000. Responses of *Entamoeba invadens* to heat shock and encystations are related. J. Eukar. Microbiol. 47 : 511—514.
- Fink K., Zeuthen E. 1980. Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. Exp. Cell Res. 128 : 23—30.
- Frankel J., Williams N. F., Nelsen E. M., Keeling P. J. 2001. An evaluation of Hsp90 as a mediator of cortical patterning in *Tetrahymena*. J. Eukar. Microbiol. 48 : 147—160.
- Hori M., Fujishima M. 2003. The endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* enhances heat-shock gene expression in the host *Paramecium caudatum*. J. Eukar. Microbiol. 50 : 293—298.
- Joshi B., Biswas S., Sharma Y. D. 1992. Effect of heat-shock on *Plasmodium falciparum* viability, growth and expression of the heat-shock protein «PFHSP70-I» gene. FEBS Lett. 312 : 91—94.
- Kalinina L. V., Khrebtukova I. A., Podgornaya O. L., Wasik A., Sikora J. 1988. Heat shock proteins in *Amoeba*. Eur. J. Protistol. 24 : 64—68.
- La Terza A., Papa G., Miceli C., Luporini P. 2001. Divergence between two antarctic species of the ciliate *Euplotes*, *E. focardii* and *E. nobilii*, in the expression of heat-shock protein 70 genes. Mol. Ecol. 10 : 1061—1067.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.

Lloyd D., Ralphs James R., Harris Janine C. 2002. *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology*. 148 : 727—733.

McMullin Th. W., Hallberg R. L. 1987. A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 4414—4423.

Perez-Serrano J., Martinez J., Perez B., Bernadina W. E., Rodriguez-Caabeiro F. 2000. *In vitro* shock response to different stressors in free living and pathogenic *Acanthamoeba*. *Int. J. Parasitol.* 30 : 829—835.

Plekhanov A. Y. 1996. Immunoreplica from the gel surface: rapid and sensitive blot plus intact gel. *Anal. Biochem.* 239 : 110—111.

Podlipaeva Y. I. 2001. Heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. *Protistology*. 2 : 123—129.

Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: *Methods in cell physiology*. New York; London: Acad. Press. 1 : 85—95.

Requena J. M., Jimenez-Ruiz H., Soto M., Assiego R., Santaren J. F., Lopez A., Pataroyo E., Alonso C. 1992. Regulation of HSP70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growing phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53 : 201—211.

Smurov A. O., Fokin S. I. 1998. Resistance of *Paramecium caudatum* infected with endonuclear bacteria *Holospora* against salinity impact. *Proc. Zool. Inst.* 276 : 175—178.

Sonneborn T. M. 1970. *Methods in Paramecium research*. *Meth. Cell Physiol.* 4 : 241—339.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350—4354.

Triana O., Galanti N., Olea H., Wernstedt L. H., Medina C., Toro G. C. 2000. Chromatin and histones from *Giardia lamblia*: a new puzzle in primitive eukaryotes. *J. Cell. Biochem.* 82 : 573—582.

Varadharajan S., Chandrashekar B. K. S., Rangarajan P. N., Govindarajan P. 2004. Localization of ferredoxin in *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* 384 : 429—436.

Wallace G. R., Ball A. E., MacFarlane J., el Safi S. H., Miles M. A., Kelly J. M. 1992. Mapping of visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infection and Immunity.* 60 : 2688—2693.

Поступила 29 XI 2005

#### HEAT SHOCK PROTEINS OF FRESHWATER PROTISTS AND THEIR INVOLVEMENT IN ADAPTATION TO CHANGES IN THE ENVIRONMENTAL SALINITY

A. Yu. Plekhanov,<sup>1</sup> A. O. Smurov,<sup>2,3</sup> Yu. I. Podlipaeva,<sup>4</sup> L. O. Ivanova,<sup>3</sup> A. V. Goodkov<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg Nuclear Physics Institute RAS, <sup>2</sup> Zoological Institute RAS,

<sup>3</sup> Biological Research Institute, St. Petersburg State University, and

<sup>4</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

e-mail: pelgood@rambler.ru

Changes in the level of heat shock proteins (HSP) in cells of freshwater protists, amoebae *Amoeba proteus* and ciliates *Paramecium jenningsi*, in response to changes in the environmental salinity were investigated. Changes in salinity levels were considered as a stress factor. The immunoblotting method revealed a polypeptide antigen cross-reacting with antibodies against bovine HSP70 in total protein extracts of both intact cells and cells subjected to salinity stress. The same polypeptide antigen was revealed in *A. proteus* cells subjected to heat shock. Therefore, it may be supposed that the polypeptide revealed after salinity shock is a heat shock protein related to the vertebrate HSP70. Under the impact of stress factor, well acclimated protists mostly spend their own previously accumulated HSP70. A conclusion is made that freshwater protists, living under conditions of increased salinity, appear to be preadapted to changes in environmental factors.

**Key words:** salinity adaptation, freshwater protists, *Amoeba proteus*, *Paramecium jenningsi*, heat shock proteins.