

**БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА СЕМЕЙСТВА HSP70  
У НЕКОТОРЫХ СОВРЕМЕННЫХ АМЕБ (АМОЕВИДАЕ) И У АКАНТАМЕБ,  
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЦИСТ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД**

© Ю. И. Подлипавая,<sup>1</sup> Л. А. Шмакова,<sup>2</sup> Д. А. Гиличинский,<sup>2</sup> А. В. Гудков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Институт физико-химических  
и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино;

\* электронный адрес: pelgood@rambler.ru

Методом иммуноблотинга выявлен белок теплового шока, принадлежащий семейству HSP70, у трофозоитов амебы *Acanthamoeba* sp. (штамм Am8), выделенных в культуру после их эксцистирования из цист, обнаруженных в образцах многолетнемерзлых пород (возраст образцов 30—35 тыс. лет) и сохранивших в этих условиях свою жизнеспособность. Продемонстрирован необычно высокий конститутивный уровень этого белка в интактных клетках трофозоитов ископаемой акантамебы, существенно превышающий таковой в интактных клетках современных пресноводных амеб, принадлежащих к трем видам рода *Amoeba* (Amoebidae).

Ключевые слова: белки теплового шока, HSP70, *Acanthamoeba*, жизнеспособные амебы из многолетнемерзлых отложений, *Amoeba*.

Как известно, универсальным ответом клеток на различное рода стрессовые воздействия является синтез так называемых белков теплового шока (HSP), обладающих шаперонной активностью (Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000). У одноклеточных организмов, как и у других эукариот, одной из основных групп таких белков являются белки семейства HSP70 (Germot, Philippe, 1999). К настоящему времени HSP70 достаточно подробно изучены у паразитических простейших, в особенности у гетероксенных видов, для которых смена одного хозяина (беспозвоночного) на другого (теплокровного), безусловно, является серьезной стрессовой ситуацией и сопровождается классическим клеточным ответом на тепловой шок (Polla, 1991; Requena et al., 1992). В то же время изучение HSP70 у свободноживущих простейших, в частности амеб, зачастую оказывающихся в достаточно экстремальных условиях, по сути только начинается.

Род *Acanthamoeba* включает в себя свободноживущие организмы, среди которых немало амфизойных видов (Page, 1974, 1988; Taylor, 1977; Martinez, Visvesvara, 1997; Hughes et al., 2003; Dyková, Lom, 2004). Акантамебы имеют практически всесветное распространение (Page, 1988), и их развитию и размножению часто способствуют такие факторы окружающей среды, как повышенная температура и обилие органического материала (De Jonckhere, 1980). Многие виды рода *Acanthamoeba* были изолированы из биотопов с высокой степенью загрязненности (Daggett et al., 1982), а другие могут расти при температуре выше 50 °C (Rohr et al., 1998). Как показали недавние исследования, некоторые представители этого рода способны формировать криптобиотические стадии, сохраняющие жизнеспособность в многолетнемерзлых отложениях, возраст которых составляет более

30 тыс. лет (Шатилович и др., 2005). Совершенно очевидно, что способность акантамеб выживать в экстремальных и потенциально летальных условиях предполагает наличие у них соответствующих морфологических, физиологических и биохимических адаптивных приспособлений, в которых, возможно, определенную роль играют белки теплового шока, являющиеся, как известно, универсальными цитопротекторами.

Целью настоящего исследования было выявление методом иммуноблотинга белка теплового шока у трофозоитов амебы *Acanthamoeba* sp. (штамм Am8), выделенных в культуру после их эксцистирования из цист, сохранивших свою жизнеспособность в многолетнемерзлых отложениях позднего плейстоцена и голоцена. В нашу задачу входила также предварительная оценка уровня содержания стрессового белка в интактных клетках и сравнение его уровня с таковым у трофозоитов, подвергнутых тепловому и холодовому шоку. Кроме того, мы сравнили конститутивные уровни белков теплового шока у ископаемых акантамеб и ряда видов и штаммов современных свободноживущих пресноводных амеб рода *Amoeba* (Amoebidae).

### Материал и методика

Цисты исследованной в настоящей работе ископаемой амебы были выделены из образцов позднелепесточеновых и голоценовых многолетнемерзлых отложений и погребенных в них почв (обнажение Станчиковский яр, п-ов Чукотка, нижнее течение р. Малый Анюй, пос. Анюйск) возрастом 32—35 тыс. лет (Губин, 1994; Губин и др., 2001; Шатилович и др., 2005). В полевых

условиях образцы хранили при тех же температурах, что и в естественном залегании, доставку образцов в лабораторию осуществляли с соблюдением необходимого температурного режима и стерильности; в лаборатории образцы хранили в морозильных камерах при  $-20^{\circ}\text{C}$  (Gilichinsky, Wagener, 1994).

Сохранившие свою жизнеспособность цисты были обнаружены в накопительных культурах, полученных при размораживании образцов по методике, описанной ранее (Шатилович и др., 2005). Трофозоиты амёб, появившиеся в результате эксцистирования, были выделены в самостоятельную культуру (штамм Am8), которую вели в чашках Петри на агаризованной среде Прескотта и Джеймса под слоем жидкости (Serophyl-PreScott infusion) при комнатной температуре (Page, 1988); чашки Петри хранили в стерильном боксе. Морфологические особенности организации цист и трофозоитов однозначно свидетельствуют о принадлежности этой амёбы к представителям рода *Acanthamoeba*. Наибольшее сходство эти ископаемые организмы имеют с видом *A. polyphaga*, однако для окончательной их видовой идентификации требуется проведение некоторых дополнительных исследований.

В настоящей работе мы также использовали 4 штамма современных пресноводных амёб, принадлежащих к трем видам рода *Amoeba* (Amoebidae) — *A. proteus* (штаммы KAN и Da), *A. leningradensis* (штамм DG) и *A. borokensis* (штамм Bor) из Коллекции штаммов Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН (Podlipaeva, Farka, 1995).

Для создания шока культуры *Acanthamoeba* sp. штамма Am8, содержащиеся при комнатной температуре, подвергали нагреву при  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч (тепловой шок) или охлаждению при  $8^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч (холодовой шок). Сразу после шока клетки со средой собирали в пробирки объемом 2 мл и центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин. После центрифугирования осаждаемые клетки хранили некоторое время при  $-20^{\circ}\text{C}$ , перед опытом клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1), гомогенат подвергали центрифугированию при 13 000 об/мин в течение 20 мин. Далее супернатант отделяли от осадка и в супернатанте определяли содержание белка по методу Лоури (Lowry et al., 1953) и готовили пробы для SDS-электрофореза. Подготовку образцов из четырех штаммов амёб рода *Amoeba* производили по описанной ранее методике (Podlipaeva, 2001). Для приготовления электрофорезных проб три части супернатанта смешивали с одной частью 4-кратного буфера Лэммли (1 % SDS, 5 %  $\beta$ -меркаптоэтанола и 10 % глицерина). Пробу перемешивали, инкубировали на водяной бане при  $100^{\circ}\text{C}$  в течение 3—4 мин. Анализ белкового состава проб проводили методом SDS-электрофореза в 10%-ном ПААГ в Трис-глициновой системе (Laemmli, 1970). Электрофорез проводили в пластине геля размером  $120 \times 90 \times 0.8$  мм сначала 1.0—1.5 ч при силе тока 10—12 мА, а потом 2.0—2.5 ч при 20—25 мА. Сразу после окончания электрофореза проводили электроблоттинг в течение ночи при напряжении 6 В (Towbin et al., 1979). Белок теплового шока выявляли после обработки нитроцеллюлозы моноклональными антителами SPA 822 против HSP70 (Stressgen technologies, Канада), специфичными как к конститутивной, так и к индуцибельной форме белка теплового шока семейства 70 кДа. Зоны связывания белков с анти-HSP70 антителами окрашивались на нитроцеллюлозе при помощи вторичных биотинированных

антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Sigma Chemical Company) в результате проведения ферментативной реакции. Для определения молекулярной массы выявляемых полипептидов использовали маркеры молекулярной массы (14—220 кДа) High Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham Biosciences, Англия).

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты выявления белков теплового шока методом иммуноблоттинга у трофозоитов *Acanthamoeba* sp. штамма Am8, не подвергнутых стрессовым воздействиям (дорожка 4), а также после теплового (дорожка 3) и холодного (дорожка 2) шоков. Окрашенные зоны связывания с антителами против HSP70 располагаются во всех трех случаях несколько ниже позиции, которую занимает на блоте молекулярный маркер 66 кДа. Таким образом, можно предполагать, что данный белок принадлежит к семейству белков теплового шока 70 кДа и обладает мол. массой около 60 кДа. HSP60 был описан для нескольких современных видов рода *Acanthamoeba*, в том числе и для патогенных *A. castellanii* и *A. culbertsoni* (Pérez-Serrano et al., 2000).

Обращает на себя внимание высокий конститутивный уровень данного стрессового белка у ископаемых акантамеб — при одинаковой нагрузке общего белка в каждом кармане стартового геля (около 40 мкг) количество HSP60 в контроле даже по результатам визуальной оценки, безусловно, превышает его количество у амёб, подвергнутых холодному и особенно тепловому шоку. Создается впечатление, что когда клетки акантамеб подвергаются повреждающим воздействиям, происходит расходование стрессового белка, исходно уже присутствовавшего в клетке, причем влияние повышенной температуры, очевидно, оказывается более эффективным, нежели пониженной.

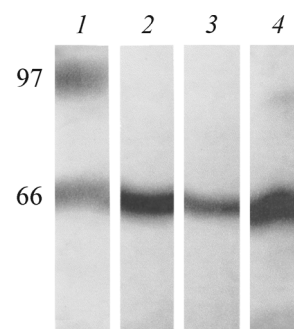


Рис. 1. Белок теплового шока семейства HSP70 в клетках интактных и подвергнутых шокосовым воздействиям трофозоитов *Acanthamoeba* sp. штамма Am8.

Дорожки: 1 — маркеры и их молекулярные массы (слева); 2 — трофозоиты после холодного шока ( $8^{\circ}\text{C}$ , 1 ч); 3 — трофозоиты после теплового шока ( $40^{\circ}\text{C}$ , 1 ч); 4 — интактные трофозоиты (контроль,  $22\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ). В каждом «кармане» стартового геля 40 мкг белка.

Fig. 1. Heat shock protein of HSP70-family in intact and stressed cells of *Acanthamoeba* sp. strain Am8.

Bands: 1 — molecular markers; 2 — trophozoites after cold shock ( $8^{\circ}\text{C}$ , 1 h); 3 — trophozoites after heat shock ( $40^{\circ}\text{C}$ , 1 h); 4 — intact trophozoites (control, room temperature  $22\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ). 40  $\mu\text{g}$  of total protein in each lane of the start gel.

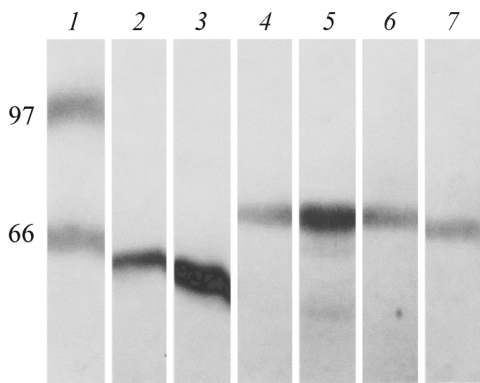


Рис. 2. Белок теплового шока семейства HSP70 в клетках трофозоитов *Acanthamoeba* sp. штамма Am8 и в клетках современных пресноводных амёб рода *Amoeba*.

Дорожки: 1 — маркеры и их молекулярные массы (слева); 2 — трофозоиты акантамеб после холодного шока (8° С, 1 ч); 3 — интактные трофозоиты (контроль, 22—25° С); 4, 5 — интактные амёбы вида *A. proteus* (штаммы Da и KAN соответственно); 6 — интактные амёбы вида *A. borokensis* (штамм Bor); 7 — интактные амёбы вида *A. leningradensis* (штамм DG). В каждом «кармане» стартового геля 20 мкг белка.

Fig. 2. Heat shock protein of HSP70-family in cells of *Acanthamoeba* sp., strain Am8 and in cells of contemporary freshwater amoebae of genus *Amoeba*.

Bands: 1 — molecular markers; 2 — acanthamebae trophozoites after cold shock (8° C, 1 h); 3 — intact trophozoites (control, room temperature 22—25° C); 4, 5 — intact *A. proteus* (strains Da and KAN, respectively); 6 — intact *A. borokensis* (strain Bor); 7 — intact *A. leningradensis* (strain DG). 20 µg of total protein in each lane of the start gel.

Ранее у акантамеб отмечался высокий конститутивный уровень стрессового белка HSP60, причем из трех видов рода *Acanthamoeba* — свободноживущего *Acanthamoeba rhyodes* и двух паразитических *A. castellanii* и *A. culbertsoni* — особенно высоким он оказался у наиболее патогенного из исследованных видов (*A. culbertsoni*). Кроме того, было показано, что высокий исходный конститутивный уровень белка теплового шока у акантамеб этого вида положительно коррелирует с его более высокой толерантностью к стрессовым воздействиям, в том числе температурным (Pérez-Serrano et al., 2000). Эти литературные данные хорошо согласуются с полученными нами результатами, особенно если принять во внимание, что, с одной стороны, акантамебы штамма Am8, по всей видимости, принадлежат к условно-патогенному виду *A. polyphaga*, а с другой — способны переживать в инцистированном и замороженном состоянии столь длительные периоды времени, т. е. обладать более низкой чувствительностью к холодному шоку (8 °С), чем к тепловому (40 °С) (рис. 1, дорожки 2, 3).

Результат сравнения конститутивных уровней белка теплового шока семейства HSP70 ископаемых акантамеб и современных свободноживущих пресноводных амёб рода *Amoeba* представлен на рис. 2. Оба штамма (Da и KAN) вида *A. proteus* и амёбы видов *A. borokensis* и *A. leningradensis* характеризуются наличием отчетливой зоны окрашивания после обработки блотов антителами против HSP70, причем эта зона располагается на блоте выше таковой акантамеб и соответствует примерно 72—73 кДа, что согласуется с данными, полученными ранее для одного из этих штаммов (Podliraeva, 2001), а также подтверждает сделанное нами ранее заключение о наличии высокого исходного уровня белка теплового шока

семейства 70 кДа в клетках различных видов свободноживущих пресноводных простейших (Плеханов и др., 2006). При сравнении контрольных образцов акантамеб с таковыми после проведения холодного шока, как и в первом опыте, у *Acanthamoeba* sp. штамма Am8 виден некоторый распад HSP60 после холодного шока (рис. 2, дорожка 2) по сравнению с контрольным образцом (рис. 2, дорожка 3). Общий уровень стрессового белка в клетках, не подвергнутых никаким шокосовым воздействиям, у акантамеб существенно выше, чем у каждого из четырех исследованных штаммов современных пресноводных амёб, принадлежащих к трем разным видам (рис. 2, дорожки 4—7).

В ближайшем будущем мы планируем провести сравнительный анализ уровней белков теплового шока в клетках ископаемых акантамеб и ныне живущих видов этого рода, обладающих разной степенью амфибийности и термотолерантности.

Авторы благодарны Б. А. Маргулису и И. В. Гужовой за ценные консультации при выборе антител и трактовке полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49811).

#### Список литературы

- Губин С. В. 1994. Позднеплейстоценовое почвообразование на Приморских низменностях севера Якутии. Почвоведение. 8 : 5—14.
- Губин С. В., Максимович С. В., Занина О. Г. 2001. Анализ состава семян растений из ископаемых нор сусликов лессово-ледовых отложений обнажения Зеленый Мыс как показатель местных условий обитания. Криосфера Земли. 5 : 76—82.
- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотических клетках. Цитология. 42 (4) : 323—342.
- Плеханов А. Ю., Смуров А. О., Подлираева Ю. И., Иванова Л. О., Гудков А. В. 2006. Белок теплового шока пресноводных простейших и его участие в адаптации к изменению солености среды обитания. Цитология. 48 (6) : 530—534.
- Шатилович А. В., Шмакова Л. А., Гудков А. В., Губин С. В., Гиличинский Д. А. 2005. Жизнеспособные Protozoa из вечномерзлых отложений и погребенных почв. Докл. РАН. 401 (5) : 715—717.
- Daggett P., Sawyer T. K., Nerad T. A. 1982. Distribution and possible interrelationships of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* from aquatic environments. Microb. Ecol. 8 : 371—457.
- De Jonckheere J. F. 1980. Growth characteristics, cytopathic effects in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* species. Appl. Environ. Microb. 39 : 681—686.
- Dyková I., Lom J. 2004. Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish. Folia Parasitol. 51 : 81—97.
- 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.
- Germot A., Philippe H. 1999. Critical analysis of eukaryotic phylogeny: a case study based on the HSP70 family. J. Eukaryot. Microbiol. 46 : 116—124.
- Giulichinsky D., Wagener S. 1994. Microbial life in permafrost. In: Viable microorganisms in permafrost. Pushchino. 7—20.
- Hughes R., Heaselgrave W., Kilvington S. 2003. *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47 : 3080—3084.

- Laemmli U. K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. F.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275.
- Martinez A. J., Visvesvara G. S.* 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. *Brain Pathol.* 7 : 583—681.
- Page F. C.* 1974. *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellulidae), and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta protozool.* 13 : 143—154.
- Page F. C.* 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Ambleside: Freshwater Biol. Ass. Publ.* 122 p.
- Pérez-Serrano J., Martínez J., Pérez B., Bernadina W. E., Rodríguez-Cabeiro F.* 2000. *In vitro* shock response to different stressors in free living and pathogenic *Acanthamoeba*. *Int. J. Parasitol.* 30 : 829—835.
- Podlipaeva Yu.* 2001. Heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. *Protistology.* 2 : 123—129.
- Podlipaeva Yu. I., Farka L. I.* 1995. List of the amoeba cultures in the living collection of the Laboratory of unicellular organisms, Institute of Cytology, St. Petersburg. *Zoosystematica Rossica.* 4 : 1—2.
- Polla B. S.* 1991. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Parasitol. Today.* 7 : A38—A41.
- Requena J. M., Jimenez-Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santaren J. F., Lopez M., Patarroyo E., Alonso C.* 1992. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53 : 201—211.
- Rohr U., Weber S., Michel R., Selenka F., Wilhelm M.* 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 1822—1826.
- Taylor P. W.* 1977. Isolation and experimental infection of free-living amoebae in freshwater fishes. *J. Parasitol.* 63 : 232—237.
- Towbin P., Staehlin T., Gordon J.* 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350—4354.

Поступила 4 IV 2006

HEAT SHOCK PROTEIN OF HSP70 FAMILY REVEALED IN SOME  
CONTEMPORARY FRESHWATER AMOEBIDS AND IN *ACANTHAMOEBA* SP.  
EXCYSTED FROM CYSTS ISOLATED FROM PERMAFROST SAMPLES

*Yu. I. Podlipaeva,<sup>1</sup> L. A. Shmakova,<sup>2</sup> D. A. Gilichinski,<sup>2</sup> A. V. Goodkov<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science RAS, Pushchino, Moscow Region;

\* e-mail: pelgood@rambler.ru

A heat shock protein of HSP70 family was revealed for the first time in trophozoites of *Acanthamoeba* sp. (strain Am8) excysted from cysts previously isolated from samples of permafrost aging 30 000—35 000 years. The constitutive level of this HSP, shown by immunoblotting in unstressed trophozoites of the ancient acanthamoebae, much surpassed that in unstressed cells of the three examined species of contemporary freshwater amoebae of the genus *Amoeba*.

**Key words:** heat shock proteins, HSP70, *Acanthamoeba*, viable amoebae from permafrost, *Amoeba*.