

БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА СЕМЕЙСТВА Hsp70 У ЭВРИГАЛИННОЙ ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM NEPHRIDIATUM* И ЕГО УЧАСТИЕ В АДАПТАЦИИ К ИЗМЕНЕНИЮ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ

© А. О. Смуров,¹ Ю. И. Подлипаева,² А. В. Гудков^{2,*}

¹ Зоологический институт РАН и ² Институт цитологии РАН;

* электронный адрес: pelgood@rambler.ru

Исследовали изменение уровня белка теплового шока в клетках эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum* в ответ на изменение солёности среды. Изучали два типа воздействия — «шок» и «адаптация». В первом случае инфузорию помещали в среду со стрессовой солёностью на 1 ч, затем переносили обратно в привычную для них среду на 2 ч; во втором — инфузорию помещали в среду со стрессовой солёностью на 3 ч. Показано, что парамеции, акклиматизированные к обитанию в пресной среде (0 ‰), имеют более высокий конститутивный уровень Hsp70, чем акклиматизированные к среде солёностью 10 ‰. При переносе простейших из пресной воды в солёную (шок) усиления синтеза белка не происходило, в то время как обратный перенос приводил к индукции Hsp70 в клетках. «Адаптация» при обоих направлениях изменения солёности приводила к индукции Hsp70. Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что возможность существования эвригалинных инфузорию в среде с различной солёностью может быть связана с присутствием у них более высокого конститутивного уровня Hsp70, чем у стеногалинных представителей того же рода.

Ключевые слова: солёностные адаптации, пресноводные инфузории, эвригалинные простейшие, *Paramecium nephridiatum*, *Paramecium jenningsi*, Hsp70.

Все виды рода *Paramecium* способны существовать в пресноводных биотопах. Кроме того, парамеции регулярно встречаются в олигогалинных участках эстуариев, иногда одни и те же виды были встречены одновременно как в полносолёных морских, так и в пресных водах. Среди многочисленных видов *Paramecium* только четыре вида, а именно *P. woodruffi*, *P. calkinsi*, *P. nephridiatum* и *P. duboscqui*, могут считаться эвригалинными (Smurov, Fokin, 2001). Эти виды часто встречались на побережьях северных морей (Фокин, Сабанеева, 1990; Фокин и др., 1995; Fokin, Chivilev, 1999; Fokin et al., 1999), хотя в научной литературе они упоминаются как редкие (Wichtermann, 1986). Соответственно можно априорно предположить разнообразие реакций в ответ на воздействие изменений солёности у пресноводных и эвригалинных видов парамеций.

Ранее нами было исследовано изменение концентрации Hsp70 у пресноводного вида *P. jenningsi* в ответ на солёностный стресс (Плеханов и др., 2006).

Целью настоящего исследования было выявление методом иммуноблоттинга белка теплового шока у эвригалинной парамеции *P. nephridiatum* при экспериментальном изменении солёности среды ее обитания, а также оценка уровня содержания Hsp70 в интактных клетках *P. nephridiatum* и сравнение их с уровнем Hsp70 в интактных клетках *P. jenningsi*, исследованных нами ранее (Плеханов и др., 2006).

Материал и методика

В работе была использована свободноживущая пресноводная инфузория *P. nephridiatum* (штамм SR98-1 из коллекции культур Лаборатории зоологии беспозвоночных БиНИИ СПбГУ). В ряде экспериментов использовали также инфузорию *P. jenningsi* (штамм SR1-10 из той же коллекции). Культивирование простейших осуществляли по стандартной методике — на салатной среде, инокулированной *Klebsiella aerogenes* (Sonneborn, 1970).

Для проведения опытов инфузории были акклиматизированы к пресной среде и к солёности 10 ‰. Необходимую солёность создавали добавлением в культуральную среду раствора искусственной морской соли, приготовленной по прописи О. И. Шубравого (1983). Срок акклиматизации организмов составлял не менее 2 мес при комнатной температуре (18—20 °С). Культуру инфузорию из каждой солёности акклиматизации делили на три равные части и осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин при 20 °С.

Часть клеток, акклиматизированных к пресной среде, помещали в воду с изменённой солёностью 10 ‰ на 1 ч; часть клеток, акклиматизированных к солёности 10 ‰, помещали в пресную воду, затем в обоих случаях клетки возвращали в среду с первоначальной солёностью. Такие клетки считали подвергнутыми солёностному шоку. В качестве контроля простейших помещали в воду с привычной для них солёностью на тот же срок.

Другую часть инфузорий подвергали аналогичному воздействию, с той разницей что клетки после перемещения в воду с другой соленостью по прошествии 1 ч воздействия не возвращали в первоначальную соленость и оставляли в ней до конца эксперимента. Такое воздействие было названо нами соленостной адаптацией.

Для осуществления теплового шока культуру простейших делили на две равные части, затем осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин при 20 °С и выдерживали при 38 °С в течение 20 мин.

Далее простейших, подвергнутых тепловому или соленостному шоку или соленостной адаптации, снова осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин при 20 °С и обрабатывали ацетоном для прекращения жизнедеятельности, преципитации белков и пермеабиллизации мембран. После центрифугирования в течение 10 мин при 10 000 g из эппендорфов с пробями удаляли ацетон и заменяли его водой. Клетки разрушали на ультразвуковом разрушителе (УЗДН-1), гомогенат подвергали центрифугированию при 13 000 g в течение 20 мин и из супернатанта готовили пробы для SDS-электрофореза. Для этого три части супернатанта смешивали с одной частью 4-кратного буфера Лэммли. Пробу перемешивали и инкубировали на водяной бане при 100 °С 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 × 90 × 0,8 мм сначала 1–1,5 ч при $I = 10–12$ мА, а потом 2–2,5 ч при 20–25 мА. Сразу после окончания электрофореза проводили электроблоттинг в течение ночи при $U = 6$ В (Towbin et al., 1979). Белок теплового шока выявлялся после обработки нитроцеллюлозы моноклональными анти-Hsp70 антителами SPA 822 (Stressgen technologies, Канада), специфичными как к конститутивной, так и к индуцибельной формам белка теплового шока семейства 70 кДа и обладающими перекрестной реакцией с широким спектром видов одно- и многоклеточных организмов. Зоны связывания белков с анти-Hsp70 антителами окрашивали на нитроцеллюлозе при помощи вторичных биотинилированных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Sigma Chemical Company, США) в результате проведения ферментативной реакции. Для определения молекулярной массы выявляемых полипептидов использовали маркеры молекулярных масс (14–220 кДа) High Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham Biosciences, Англия).

Результаты и обсуждение

Методом иммуноблоттинга в тотальном белковом экстракте инфузорий *P. nephridiatum* выявляется полипептидный антиген с мол. массой около 70 кДа как у интактных (контрольных) клеток после их длительной акклимации к пресной или соленой среде, так и у клеток, подвергнутых соленостному шоку (рис. 1–3).

Таким образом, обнаруженный нами антиген с мол. массой около 70 кДа может быть охарактеризован как ранний белок стресса, иммунологически родственный белкам семейства Hsp70 и, по всей видимости, являющийся его аналогом.

Кроме того, в клетках *P. nephridiatum*, акклимированных к солености 10 ‰, обнаруживается дополнительный

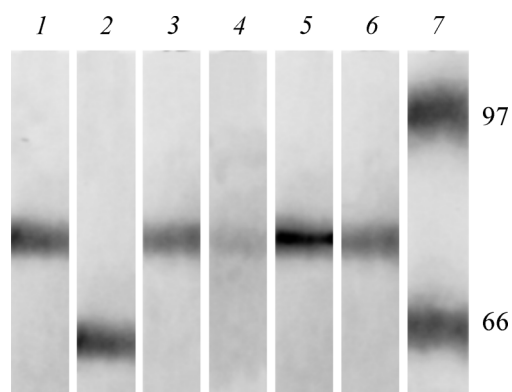


Рис. 1. Уровень экспрессии Hsp70 у эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum* в интактных (контрольных) клетках и после стрессовых воздействий двух типов — «шока» и «адаптации».

Дорожки: 1 — интактные инфузории, акклимированные к пресной среде (соленость 0 ‰); 2 — интактные инфузории, акклимированные к среде соленостью 10 ‰; 3 — клетки, акклимированные к среде соленостью 10 ‰, через 2 ч после соленостного шока при 0 ‰ в течение 1 ч («шок»); 4 — клетки, акклимированные к пресной среде (0 ‰), через 2 ч после проведения соленостного шока при 10 ‰ в течение 1 ч («шок»); 5 — клетки, акклимированные к пресной среде (0 ‰), через 3 ч после пребывания в стрессовой для них солености 10 ‰ («адаптация»); 6 — клетки, акклимированные к солености 10 ‰, через 3 ч пребывания в стрессовой для них пресной среде (0 ‰, «адаптация»); 7 — маркеры молекулярной массы.

полипептид с мол. массой около 60 кДа, который также перекрестно реагирует с антителами против Hsp70 (рис. 1, дорожка 2; рис. 2, дорожка 4; рис. 3, дорожка 2).

Согласно полученным данным, уровень Hsp70 у эвригалинных инфузорий, акклимированных к пресным условиям (рис. 1, дорожка 1; рис. 2, дорожка 3; рис. 3, дорожка 3), заметно превышает его уровень у инфузорий, акклимированных к солености 10 ‰ (рис. 1, дорожка 2; рис. 2, дорожка 4; рис. 3, дорожка 2).

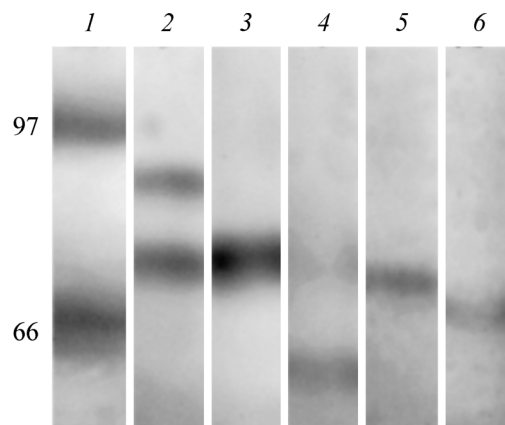


Рис. 2. Уровень экспрессии Hsp70 у эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum* после стрессового воздействия и у интактной пресноводной инфузории *P. jenningsi*.

Дорожки: 1 — маркеры молекулярной массы; 2 — интактные инфузории *P. jenningsi*, акклимированные к пресной среде (соленость 0 ‰); 3 — интактные инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к пресной среде (0 ‰); 4 — интактные инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к среде соленостью 10 ‰; 5 — клетки инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к среде соленостью 10 ‰, через 2 ч после проведения соленостного шока при 0 ‰ в течение 1 ч; 6 — клетки инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к среде соленостью 10 ‰, через 3 ч пребывания в стрессовой для них пресной среде (0 ‰).

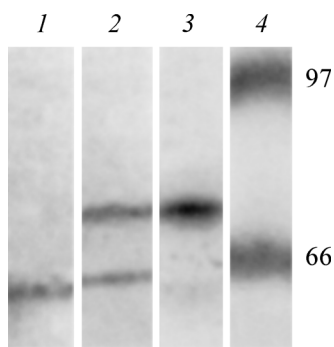


Рис. 3. Белок Hsp70 в клетках эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum*, акклимированных к среде соленостью 10‰ или 0‰ и подвергнутых тепловому стрессу.

Дорожки: 1 — инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к среде соленостью 0‰, после теплового стресса (37 °C, 20 мин); 2 — интактные инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к среде соленостью 10‰; 3 — интактные инфузории *P. nephridiatum*, акклимированные к пресной среде (0‰); 4 — маркеры молекулярной массы.

Соленостный шок вызывает у инфузорий, акклимированных к пресной и соленой средам, несимметричный ответ в отношении расхода—синтеза Hsp70, т. е. в случае переноса клеток из среды с соленостью 10‰ в пресную воду (рис. 1, дорожка 3) концентрация Hsp70 в клетках значительно выше, чем через такое же время после переноса из пресной воды в соленую (рис. 1, дорожка 4).

Уровень белка 70 кДа после переноса из среды соленостью 10‰ в пресную воду превышает таковой в контроле (рис. 1, дорожки 2, 3; рис. 2, дорожки 4, 5), в то время как зона Hsp70 у клеток после переноса из пресной воды в соленую выражена слабо и концентрация белка заметно меньше, чем в контроле (рис. 1, дорожки 1, 4).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что для эвригалинных парамеций длительная акклимация к пресной воде является более сильным стрессом, нежели акклимация к среде соленостью 10‰. По-видимому, в данном случае происходит активация их шаперонной системы, что маркируется выработкой более высокого конститутивного уровня Hsp70. Иными словами, эти инфузории оказываются в определенном смысле преадаптированными к дальнейшим резким изменениям солености окружающей среды и реагируют на них, используя уже накопленный в клетке пул белков теплового шока. Это выражается, в частности, в понижении высокого уровня Hsp70 после переноса инфузорий, акклимированных к пресной воде, в среду соленостью 10‰.

«Адаптация» инфузорий к новой солености представляет собой более продолжительный вариант соленостного шока и во всех случаях (при обоих направлениях изменения солености) приводит к индукции Hsp70 в клетках эвригалинной инфузории *P. nephridiatum* (рис. 1, дорожки 1, 5 и дорожки 2, 6; рис. 2, дорожки 4, 6).

Белок с мол. массой около 60 кДа в значительном количестве, больше, чем белок с мол. массой около 70 кДа, присутствует у интактных клеток, акклимированных к среде соленостью 10‰ (рис. 1, дорожка 2; рис. 2, дорожка 4; рис. 3, дорожка 2) и практически отсутствует у интактных клеток, акклимированных к пресной среде (рис. 1, дорожка 1; рис. 2, дорожка 3; рис. 3, дорожка 3). Оба воздействия на такие клетки («шок» и «адаптация») приводят к расходу этого белка (см. рис. 1, 2).

Согласно данным, полученным нами ранее у пресноводной инфузории *P. jenningsi*, уровень экспрессии Hsp70 у клеток, подвергнутых соленостному стрессу, был заметно выше, чем у контрольных инфузорий, акклимированных к пресной среде (Плеханов и др., 2006). Сравнение конститутивных уровней Hsp70 у пресноводной (стеногалинной) *P. jenningsi* и у эвригалинной *P. nephridiatum* показывает, что у *P. nephridiatum*, акклимированной к пресной среде, этот уровень выше, чем у *P. jenningsi* из пресной среды (рис. 2, дорожки 2, 3). Динамика экспрессии выявляемого анти-Hsp 70 антителами белка массой около 90 кДа (рис. 2, дорожка 2) и его роль в адаптации *P. jenningsi* к изменению солености среды подлежат дальнейшему изучению и анализу.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что возможность существования эвригалинных инфузорий в среде с различной соленостью может определяться присутствием у них более высокого конститутивного уровня Hsp70, чем у стеногалинных представителей того же рода.

Авторы выражают глубокую признательность Б. А. Маргулису и И. В. Гужовой за консультации при выборе первичных антител против Hsp70.

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

Список литературы

- Плеханов А. Ю., Смуров А. О., Подлипаева 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.
- Фокин С. И., Сабанеева Е. В. 1990. Эвригалинные парамеции (Ciliophora, Peniculina) побережий Баренцева и Белого морей и их эндобионты. В кн.: Экология, репродукция и защита биоресурсов морей Северной Европы. Мурманск. 139—141.
- Фокин С. И., Хлебович В. В., Смуров А. О. 1995. Эвригалинные парамеции Белого моря как объекты для изучения клеточных адаптаций к изменению солености. В кн.: Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря. Кандалакша. 93—94.
- 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.
- Fokin S. I., Chivilev S. M. 1999. Brackish water *Paramecium* sp. and *Paramecium polycaryium*. Morphometrical analysis and some biological peculiarities. Acta protozool. 38 : 105—107.
- Fokin S. I., Stoeck T., Schmidt H. J. 1999. Rediscovery of *Paramecium nephridiatum* Gelei, 1925 and its characteristics. J. Eukariot. Microbiol. 46 : 416—426.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Smurov A. O., Fokin S. I. 2001. Use of salinity tolerance data for investigation of phylogeny of *Paramecium* (Ciliophora, Peniculia). Protistology. 2 : 130—138.
- 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.
- Wichtermann R. 1986. The biology of *Paramecium* 2nd ed. New York: Plenum Press.

HEAT SHOCK PROTEIN OF 70 kDa IN *PARAMECIUM NEPHRIDIATUM*
AND ITS ROLE IN ADAPTATION TO ENVIRONMENTAL SALINITY CHANGES

A. O. Smurov,¹ Yu. I. Podlipaeva,² A. V. Goodkov², *

¹ Zoological Institute RAS, and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: pelgood@rambler.ru

The level of Hsp70 was studied in the cells of eurihaline ciliate *Paramecium nephridiatum* after the environmental salinity changes. Two types of treatment were applied. «Shock»: ciliates were placed for 1 h to the medium with stress salinity, then transferred back to the medium, they were acclimated to, for 2 h; «adaptation»: ciliates were placed for 3 h into stress salinity. It has been shown, that ciliates, acclimated to fresh water (0 ‰) have the higher constitutive level of Hsp70, than those, acclimated to 10 ‰. Transfer from fresh water to 10 ‰ does not cause the increase of Hsp70 synthesis in protists, whereas the reciprocal transfer results in induction of Hsp70 in the cells. «Adaptation» results in induction of Hsp70 in both «directions» of salinity changes. The results obtained allow to presume that the possibility to survive in the media of various salinity in eurihaline ciliates is somehow determined by the higher initial level of Hsp70 in their cells, than in stenohaline representatives of the same genus.

Key words: salinity adaptation, freshwater ciliates, eurihaline ciliates, *Paramecium nephridiatum*, *Paramecium jenningsi*, heat shock proteins.