

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА СЕМЕЙСТВА 70 кДа У ИНФУЗОРИИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К ИЗМЕНЕНИЮ СОЛЕНОСТИ СРЕДЫ

© Ю. И. Подлипаева,<sup>1</sup> А. О. Смуро<sup>2</sup>, А. В. Гудков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург;  
\* электронный адрес: pelgood@rambler.ru

Исследовали изменение уровня белка теплового шока семейства 70 кДа (БТШ70) в клетках пресноводной инфузории *Tetrahymena pyriformis* в ответ на изменение солености среды. Показано, что простейшие, акклиматизированные в течение длительного времени к обитанию в средах с различной соленостью (0, 2 и 10 %), имеют примерно одинаковый конститутивный уровень содержания БТШ70 в клетках. Не выявлено у тетрахимен также ни отчетливой индукции, ни заметного расхода БТШ70 после стрессовых воздействий, вызванных изменением солености среды. Все это отличает *T. pyriformis* от двух других видов инфузорий, исследованных нами ранее, — *Paramecium nephridiatum* и *P. jenningsi*, для которых были показаны как индукция синтеза БТШ70 в случае соленостного стресса, так и снижение или увеличение конститутивного уровня содержания БТШ70 после акклиматизации инфузорий к новой солености среды. Предполагается, что обнаруженные различия в реакции шаперонной системы изученных видов простейших могут быть связаны с их различной солеустойчивостью (т. е. способностью выживать при разной солености среды): наименьшей у *P. jenningsi*, промежуточной у *T. pyriformis* и наибольшей у *P. nephridiatum*.

**Ключевые слова:** соленостные адаптации, пресноводные инфузории, эвригалинныи инфузории, *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium nephridiatum*, *Paramecium jenningsi*, белки теплового шока.

Одноклеточные, как и любые другие организмы, используют разнообразные биохимические и молекулярные механизмы, чтобы минимизировать повреждающие действия стрессов различной природы. Среди таких механизмов большое значение придается синтезу белков теплового шока (БТШ). У простейших были выявлены БТШ, принадлежащие к различным семействам, и одним из важнейших среди них считается белок из семейства 70 кДа (БТШ70). Этот белок характеризуется низкой видоспецифичностью и высокой степенью консерватизма (Маргулис, Гужова, 2000).

В наших предыдущих работах было показано наличие высокого конститутивного уровня БТШ70 в интактных клетках некоторых свободноживущих простейших, принадлежащих к различным макротаксонам, далеко отстоящим друг от друга филогенетически, — амебам и инфузориям (Подлипаева, 2001; Плеханов и др., 2006; Смуро<sup>2</sup> и др., 2007). Нам удалось продемонстрировать соответствие БТШ70, индуцируемого после теплового шока, стрессовому белку такой же молекулярной массы, который синтезировался в клетках простейших после соленостного шока (Плеханов и др., 2006). Нами также было показано, что соленостный шок вызывает у эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum*, акклиматированной к пресной и соленой средам, несимметричный ответ в отношении расхода (синтеза) БТШ70, а именно: в случае переноса клеток из соленой среды в пресную воду концентрация БТШ70 в клетках оказывается значительно выше, чем че-

рез такое же время после переноса из пресной среды в соленую (Смуро<sup>2</sup> и др., 2007). Кроме того, согласно полученным нами данным, уровень БТШ70 у эвригалинных инфузорий, акклиматизированных к пресным условиям, заметно превышает его уровень у инфузорий, акклиматизированных к соленой среде. Для пресноводных видов протистов — амебы *Amoeba proteus* и инфузории *Paramecium jenningsi* — уровень БТШ70 незначителен в клетках, выращенных в пресной среде, но повышается при соленостном шоке. Пресноводные амебы и инфузории, акклиматизированные к среде с повышенной соленостью, имеют более высокий конститутивный уровень БТШ70, чем акклиматизированные к пресной среде (Плеханов и др., 2006). Таким образом, были выявлены различия в реакциях шаперонной системы у пресноводных и эвригалинных протистов в ответ на изменение солености среды.

В настоящей работе мы исследовали содержание и характер экспрессии БТШ70 у инфузории *Tetrahymena pyriformis*, занимающей промежуточное положение по степени солеустойчивости между исследованными нами ранее видами инфузорий — пресноводной *Paramecium jenningsi* и эвригалинной *P. nephridiatum* (Smurov, Fokin, 2001). Для этого методом иммунооблотинга выявляли БТШ70 *T. pyriformis* при экспериментальном изменении солености среды ее обитания, оценивали уровень содержания БТШ70 в интактных клетках тетрахимен и сравнивали его с уровнем БТШ70 в интактных клетках исследованных нами ранее пресноводных и эвригалинных видов инфузорий.

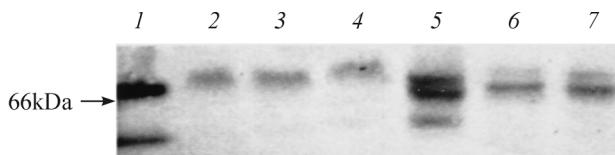


Рис. 1. Экспрессия BTSH70 у пресноводной инфузории *Tetrahymena pyriformis* в интактных (контрольных) клетках и после стрессового воздействия.

Дорожки: 1 — инфузории, акклиматизированные к пресной среде 0 % (интактные); 2 — инфузории, акклиматизированные к среде 2 % (интактные); 3, 4 — клетки, акклиматизированные к среде соленостью 2 %, через 2 (3) и 24 (4) ч после проведения соленостного шока при 10 % в течение 1 ч; 5 — инфузории, акклиматизированные к среде 10 % (интактные); 6, 7 — клетки, акклиматизированные к среде соленостью 10 %, через 2 (6) и 24 (7) ч после проведения соленостного шока при 2 % в течение 1 ч.

## Материал и методика

В работе была использована свободноживущая пресноводная инфузория *Tetrahymena pyriformis* (безмикронуклеусный штамм GL из коллекции культур Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН). Культивирование простейших осуществляли по стандартной методике (Sonnenborn, 1970).

Для проведения опытов инфузории были акклиматизированы к пресной воде и к средам соленостью 2 и 10 %. Необходимость акклиматации тетрахимен к среде соленостью 2 % объясняется тем, что клетки этого вида не способны выдержать прямой перенос из пресной воды в воду 10 %. Выбор значения солености акклиматизации 10 % дает возможность сравнить полученные данные по изменению уровня содержания BTSH70 в интактных клетках тетрахимен с полученными ранее результатами для *Paramecium nephridiatum*, которая также была акклиматирована к 10 % (Смурров и др., 2007).

Необходимую соленость создавали добавлением в культуральную среду раствора искусственной морской соли, приготовленной по прописи Шубравого (1983). Срок акклиматации *T. pyriformis* составлял не менее 2 мес при комнатной температуре (18—20 °C).

Культуры инфузорий из каждой солености, к которой они были акклиматированы, делили на 3 равные части и затем осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин при 20 °C. Для проведения соленостного шока часть клеток помещали на 1 ч в воду с измененной соленостью: в 10 % — клетки, акклиматизированные к 2 %, и в воду соленостью 2 % — клетки, акклиматизированные к 10 %. Затем инфузорий возвращали в воду с первоначаль-

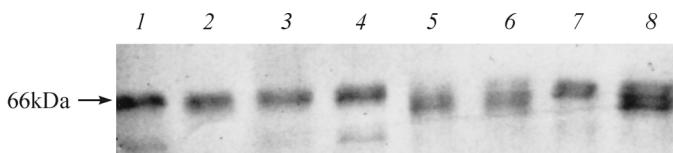


Рис. 2. Динамика экспрессии BTSH70 у пресноводной инфузории *Tetrahymena pyriformis* после стрессового воздействия.

Дорожки: 1 — инфузории, акклиматизированные к среде 2 % (интактные); 2 — клетки, акклиматизированные к среде соленостью 2 %, через 2 ч после соленостного шока при 10 % в течение 1 ч; 3, 4 — клетки, акклиматизированные к среде соленостью 2 %, через 4 (3) и 24 (4) ч после проведения соленостного шока при 10 % в течение 1 ч; 5 — инфузории, акклиматизированные к среде 10 % (интактные); 6—8 — клетки, акклиматизированные к среде соленостью 10 %, через 2 (6), 4 (7) и 24 (8) ч после проведения соленостного шока при 2 % в течение 1 ч.

ной соленостью. В качестве контроля простейших помещали в воду с привычной для них соленостью на тот же срок. Дальнейшая процедура подготовки клеток к SDS-электрофорезу (Laemmli, 1970) с последующим электроблоттингом (Towbin et al., 1979) была описана нами ранее (Смурров и др., 2007).

Белок теплового шока выявляли после обработки нитроцеллюлозы моноклональными анти-HSP70 антителами SPA 822 (Stressgen technologies, Канада), обладающими перекрестной реакцией с широким спектром видов одно- и многоклеточных организмов. Зоны связывания белков с анти-HSP70 антителами окрашивали на нитроцеллюлозе при помощи вторичных биотинированных 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, США).

## Результаты

У пресноводных инфузорий *T. pyriformis* в контролльных клетках, культивируемых при оптимальных для них условиях (в пресной воде, 0 %), на окрашенных блютах выявляются две зоны: одна — интенсивно окрашенная с мол. массой около 70 кДа (72 кДа) и другая — около 60 кДа (рис. 1, дорожка 1). Подобную же картину мы наблюдали у клеток эвригалинных инфузорий *P. nephridiatum*, акклиматизированных к 10 % (Смурров и др., 2007). У *T. pyriformis*, акклиматизированных к 2 %, в контролльных клетках выявляется окрашенная зона мол. массой несколько выше — 73 кДа (рис. 1, дорожка 2; 2, дорожка 1), которая так и остается практически неизменной через 2, 4 и 24 ч после воздействия на инфузорий соленостного шока при 10 % (рис. 1, дорожки 3, 4; 2, дорожки 2—4). Кроме того, необходимо отметить, что и в контроле, и в пробе, соответствующей точке «24 ч после шока», выявляется относительно слабо окрашенная зона, соответствующая белку с мол. массой около 65 кДа (рис. 1, дорожка 4; 2, дорожка 4).

*T. pyriformis*, акклиматизированные к среде соленостью 10 %, характеризуются наличием конститутивной формы BTSH с мол. массой 72 кДа — такой же, как у тетрахимен из пресной воды (рис. 1, дорожки 1, 5; 2, дорожка 5), и несколько более низкой, чем у тетрахимен, акклиматизированных к 2 % (рис. 2, дорожки 1, 5). После проведения соленостного шока при 2 % содержание этого белка слегка расходится через 2 ч после шока (рис. 1, дорожка 6; 2, дорожка 6). Через 4 ч после шока на блюте наблюдается появление белка с чуть более высокой мол. массой (73 кДа), который замещает белок, выявляемый в контроле и в пробе, полученной через 2 ч после шока (рис. 2, дорожка 7). И наконец, через 24 ч после шока на блюте отчетливо окрашиваются обе зоны — 72 и 73 кДа (рис. 1, дорожка 7; 2, дорожка 8). Белок с мол. массой около 65 кДа не обнаруживается.

## Обсуждение

Сравнение конститутивных уровней BTSH70 в клетках двух резко различных в отношении солеустойчивости (т. е. способности выживать при разной солености среды)

видов инфузорий — пресноводной *P. jenningsi* и эвригалинной *P. nephridiatum* — показало, что у последних, акклимированных к пресной среде, этот уровень выше, чем у первых, также акклимированных к пресной воде (Смуров и др., 2007), т. е. у эвригалинной инфузории акклимация к пресной воде индуцирует синтез БТШ70 и поддержание его уровня в большей степени, чем у сугубо пресноводного представителя того же рода в тех же условиях. Таким образом, в процессе акклимации такие инфузории оказываются в определенном смысле преадаптированными к резким изменениям солености окружающей среды и реагируют на них, используя уже накопленный в клетке пул белков теплового шока. Это выражается, в частности, в заметном понижении исходно высокого уровня БТШ70 у эвригалинных парамеций, акклимированных к пресной среде, после их переноса в 10 % (Смуров и др., 2007).

У пресноводных инфузорий *T. pyriformis* в зависимости от солености среды, в которой проходила их длительная акклимация (0, 2 или 10 %), наблюдаются незначительно различающиеся спектры БТШ, присутствующих в клетках конститутивно (рис. 1, дорожки 1, 2, 5). В то же время уровень их содержания в клетках тетрахимен, акклимированных к разным соленостям, примерно сопоставим друг с другом в отличие, например, от эвригалинных *P. nephridiatum*.

Нам не удалось выявить также сколько-нибудь заметную индукцию синтеза БТШ70 в клетках *T. pyriformis* после соленостных шоков в обоих направлениях изменения солености. В целом же можно отметить более мобильную реакцию шаперонной системы изученных видов парамеций по сравнению с *T. pyriformis* как в процессе длительной соленостной акклимации, так и в ответ на краткосрочное стрессовое воздействие.

Не исключено, что найденные нами особенности в распределении БТШ в клетках пресноводных инфузорий *T. pyriformis* могут быть связаны с тем, что использованный в работе штамм GL, во-первых, является безмикро-нуклеусным, а во-вторых, уже многие десятилетия непрерывно культивируется исключительно в стабильных лабораторных условиях, что может накладывать свой отпечаток на реактивность шаперонной системы тетрахимен.

Другое объяснение выявленных нами отличий *T. pyriformis* от двух других изученных видов инфузорий может быть связано с тем, что тетрахимена обладает промежуточной между *P. jenningsi* и *P. nephridiatum* степенью солеустойчивости и относится к числу так называемых мешатпресноводных видов (Smurov, Fokin, 2001). С учетом того, что повышение конститутивного уровня содержания

БТШ70 в клетках малосолеустойчивой *P. jenningsi* происходит при повышении солености среды обитания и, наоборот, для эвригалинной *P. nephridiatum* свойственно повышение уровня содержания БТШ70 в клетках при снижении солености среды, логично предположить, что существуют виды инфузорий с «промежуточным состоянием шаперонной системы». Этому состоянию соответственно должно быть свойственно приблизительное постоянство конститутивного уровня содержания БТШ70 в клетках независимо от значения солености акклимации, а также оно должно характеризоваться отсутствием выраженной реактивности шаперонной системы в ответ и на понижение, и на повышение солености среды. Именно такую картину мы и наблюдаем в случае метапресноводного вида *T. pyriformis*. Дальнейшие исследования с привлечением других видов инфузорий и простейших вообще, относящихся к различным экофизиологическим группам, позволят проверить справедливость высказанной нами гипотезы.

### Список литературы

- Маргулис Б. А., Гужкова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотических клетках. Цитология. 42 (4) : 323—342.  
 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.  
 Смуров А. О., Подлипаева Ю. И., Гудков А. В. 2007. Белок теплового шока семейства Hsp70 у эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum* и его участие в адаптации к изменению солености среды. Цитология. 49 (4) : 292—295.  
 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.  
 Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.  
 Podlipaeva Y. I. 2001. Heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. Protistology. 2 : 123—129.  
 Smurov A. O., Fokin S. I. 2001. Use of salinity tolerance data for investigation of systematic of *Paramecium* (Ciliophora, Penicilia). Protistology. 2 : 130—138.  
 Sonneborn T. M. 1970. Methods in *Paramecium* research. In: Methods in cell physiology. New York: Acad. Press. 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.

Поступила 7 XII 2007

### ALTERATIONS OF THE LEVEL OF 70 kDa FAMILY HEAT SHOCK PROTEIN IN THE CILIATE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* IN THE PROCESS OF THE CELLS ADAPTATION TO THE MEDIUM SALINITY CHANGES

Yu. I. Podlipaeva,<sup>1</sup> A. O. Smurov,<sup>2</sup> A. V. Goodkov<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> Zoological Institute RAS, St. Petersburg;  
 \* e-mail: pelgood@rambler.ru

Alterations of Hsp70 level were studied in the cells of freshwater ciliate *Tetrahymena pyriformis* after medium salinity changes. It is shown that ciliates, acclimated to fresh water (0 %) and to salt water of 2 and 10 % have similar constitutive levels of Hsp70 in their cells. Neither pronounced induction of Hsp70, was not decrea-

se of its level, revealed in ciliates after salinity stresses. These data differ from the results obtained while studying euryhaline ciliate *Paramecium nephridiatum* and strongly freshwater one *Paramecium jenningsi*. We presume that the differences in the mode of chaperone system reaction of these ciliates species might be connected with different extents of salinity persistence — the least in *P. jenningsi*, intermediate in *T. pyriformis* and the most pronounced in *P. nephridiatum*.

**Key words:** salinity adaptation, freshwater ciliates, euryhaline ciliates, *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium nephridiatum*, *Paramecium jenningsi*, heat shock proteins (Hsp70).