

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА СЕМЕЙСТВА 70 кДа В КЛЕТКАХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ И АМФИЗОЙНЫХ АМЕБОИДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

© Ю. И. Подлипаева, А. В. Гудков

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: podlipaeva@rambler.ru, pelgood@rambler.ru

Методом иммуноблотинга определяли уровень содержания конститутивной формы белков теплового шока семейства 70 кДа (Hsp70) у различных амeboидных организмов. Изучены клетки 9 штаммов, относящихся к представителям рода *Acanthamoeba*, — 8 амфизойных (факультативно паразитических) и свободноживущего (выделенного из верхнего горизонта почв Арктики). Исследовано также 15 штаммов одного из свободноживущих пресноводных лобозных амeб различного географического происхождения, разного возраста и разной видовой принадлежности, из которых 14 относятся к роду *Amoeba* и 1 штамм *Trichamoeba* sp. В клетках всех 15 штаммов лобозных амeб показано присутствие Hsp70, тогда как у амфизойных акантамеб Hsp70 выявлен только в клетках 2 штаммов из 8. Во всех этих случаях положение зоны, окрашенной с помощью моноклональных анти-Hsp70-антител, соответствует полипептиду с мол. массой 70 кДа. В клетках представителя современной тундровой фауны акантамеб также обнаружен относительно высокий конститутивный уровень Hsp, но при этом окрашенная зона занимает положение, соответствующее белку с мол. массой около 60 кДа — такое же, как у ископаемого тундрового штамма *Acanthamoeba*, исследованного нами ранее.

Ключевые слова: белки теплового шока, Hsp70, амфизойные акантамебы, лобозные амeбы, *Acanthamoeba*, *Amoeba*.

Различного рода защитные клеточные механизмы в большинстве своем активируются в ответ на стрессовые воздействия. Одним из таких базовых механизмов является синтез стрессовых белков или белков теплового шока (HspT), принадлежащих, в частности, к семейству 70 кДа (Hsp70). Эти белки характеризуются весьма низкой видоспецифичностью и высокой степенью консерватизма. Одним из основных свойств Hsp является шаперонная активность, что делает их универсальными цитопротекторами (Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000, 2009).

Помимо индуцибельных в цитоплазме клеток самых различных организмов присутствуют также и конститутивные формы Hsp70. Имеются данные, указывающие на то, что уровень содержания Hsp70 в клетках является признаком, положительно коррелирующим с температурными условиями обитания организмов (Lyashko et al., 1994), причем для пойкилотермных животных данное положение было определено как «общее правило»: чем выше температура среды обитания, тем выше уровень содержания Hsp70-подобных белков в клетках организмов (Ulmasov et al., 1992).

Ранее нами было показано, что конститутивные Hsp70 присутствуют в клетках различных типов свободноживущих протистов — инфузорий и амeб (Podlipaeva, 2001; Плеханов и др., 2006; Подлипаева и др., 2008). Изучение адаптаций инфузорий рода *Paramecium* к изменениям солёности среды обитания показало наличие более высокого конститутивного уровня Hsp70 в клетках эвригалинных видов, чем в клетках стеногалинных представителей того же рода (Смуров и др., 2007). Высказано пред-

положение о том, что именно с этим связана возможность существования эвригалинных инфузорий в среде с различной солёностью (Смуров и др., 2007; Подлипаева и др., 2008). Иными словами, значительное содержание Hsp70 в клетках инфузорий может служить для них своего рода преадаптацией к возможным резким изменениям условий окружающей среды.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что высокий конститутивный уровень Hsp70 у патогенных акантамеб *Acanthamoeba culbertsoni* положительно коррелирует с их повышенной толерантностью к стрессовым воздействиям, в том числе температурным (Pérez-Serrano et al., 2000). Однако в целом амeboидные протисты в контексте высказанных выше положений в отличие от инфузорий исследованы явно недостаточно. Поэтому в задачу настоящей работы входило дальнейшее изучение и сравнительный анализ данных по уровню содержания Hsp70 в первую очередь в нормальных (не стрессовых) условиях в клетках различных видов и штаммов амeб, как сходных, так и существенно различающихся по своей биологии и систематической принадлежности.

Материал и методика

В работе использовали 15 штаммов свободноживущих (пресноводных) лобозных амeб различного географического происхождения, принадлежащих к видам *Amoeba proteus*, *A. amazonas*, *A. borokensis*, *A. indica*, *Amoeba* sp. и *Trichamoeba* sp., из коллекции Лаборатории цитоло-

Т а б л и ц а 1

Виды и штаммы свободноживущих лобозных амёб, использованные в работе

| Виды и штаммы | Происхождение и история штамма |
|------------------------------|---|
| <i>Amoeba proteus</i> Da | Поступил в коллекцию в 1970 г. от M. J. Ord (Саутгэмптонский университет, Великобритания), выделен J. A. Dawson в Floral Park (Нью-Йорк, США) не позднее 1950 г. |
| <i>A. proteus</i> B | Поступил в коллекцию в 1959 г. от M. Müller (Медицинский университет, Будапешт, Венгрия), куда попал из коллекции штаммов, поддерживаемых в 1950-х годах в лаборатории J. F. Danielli (Королевский колледж, Лондон) |
| <i>A. proteus</i> tD | Поступил в коллекцию в 1963 г. из Королевского колледжа (Лондон), исходно рассматривался как самостоятельный вид <i>A. discoides</i> ; систематический статус см.: Jeon, Lorch, 1973; Page, 1988 |
| <i>A. proteus</i> tP | Поступил в коллекцию в 1975 г. от M. J. Ord (Саутгэмптонский университет, Великобритания) |
| <i>A. proteus</i> Val | Выделен в 1989 г. из оз. Сисъярви (о-в Валаам, Карелия) |
| <i>A. proteus</i> Binucl | Поступил в коллекцию не позднее 1977 г., происхождение штамма неизвестно |
| <i>A. proteus</i> Lesch | Поступил в коллекцию не позднее 1977 г. как самостоятельный вид <i>A. lescherae</i> , происхождение штамма неизвестно; систематический статус см.: Page, 1988; Сопина, 2000 |
| <i>A. proteus</i> Kan | Выделен в 1989 г. из оз. Каневское (о-в Валаам, Карелия) |
| <i>A. proteus</i> Neapol | Выделен в 2005 г. в окр. Неаполя (Италия), реклонирован, электронно-микроскопическая идентификация не проводилась |
| <i>A. proteus</i> Obsc | Происхождение штамма неизвестно |
| <i>A. amazonas</i> Amaz | Поступил в коллекцию от D. M. Prescott в 1969 г. как штамм <i>A. proteus</i> , выделен D. M. Prescott из р. Амазонки (Бразилия); систематический статус см.: Friz, 1992 |
| <i>A. indica</i> Ind | Поступил в коллекцию от F. C. Page в 1985 г. (Кембриджская коллекция водорослей и простейших (ССАР), Кембридж, Великобритания), выделен из водоема в г. Бомбее (Индия) в 1971 г.; систематический статус: исходно фигурирует как самостоятельный вид, однако необходимое формальное описание вида отсутствует (см.: Page, 1988; Friz, 1992; Сопина, 2000) |
| <i>A. borokensis</i> Bor | Выделен в 1974 г. из пруда в пос. Борок (Ярославская обл., Россия) как штамм <i>A. proteus</i> ; систематический статус см.: Kalinina et al., 1986 |
| <i>Amoeba</i> sp. Belomor | Выделен в 1986 г. из пресноводного озера на о-ве Средний (Чупинская губа Кандалакшского зал., Белое море); штамм отличается от всех известных видов рода <i>Amoeba</i> (см.: Friz, 1992; Сопина, 2000), однако формальная систематическая идентификация не проводилась |
| <i>Trichamoeba</i> sp. As102 | Выделен в 1971 г. из небольшой реки в Азербайджане как штамм <i>A. proteus</i> , значительно отличается от этого вида (Сопина, 2000); предположительно относится к самостоятельному виду рода <i>Trichamoeba</i> (Ivanova et al., 2004), формально систематический статус остается неопределенным |

гии одноклеточных организмов Института цитологии РАН (табл. 1). Амёб культивировали на модифицированном минеральном растворе Прескотта и Кэрриера по стандартной методике (Prescott, Carrier, 1964) при комнатной температуре.

8 штаммов амфизойных (способных вести как свободноживущий, так и паразитический образ жизни) акантамёб *Acanthamoeba* spp. было получено из коллекции Института паразитологии Академии наук Чешской Республики (от проф. Iva Duková). Штаммы 4465, 4337, 3668 (Duková et al., 1999), 4774, 4628 и 4690 (Iva Duková, неопубликованные данные) были выделены в Чешской Республике из различных внутренних органов плотвы *Rutilus rutilus*, щуки *Esox lucius* и окуны *Perca fluviatilis*, а штаммы P121 и P128 были изолированы в 2005 г. в Перу с жабр рыб *Calophrysus macropterus* и *Amblydoras hancockii* (табл. 2).

Свободноживущие тундровые акантамёбы, выделенные из верхнего горизонта почв Восточного сектора Арктики, представлены в настоящей работе штаммом Am61, полученным из Лаборатории криологии почв Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (Пушино). Накопительные культуры создавали непосредственно в полевых условиях на агаризованной среде Прескотта и Джеймса (Page, 1988), затем в лаборатории из них выделяли индивидуальные цисты, из которых получали монокультуры трофозоитов. Амёб клонировали и поддерживали в лаборатории в чашках Петри при комнатной температуре.

Для осуществления наиболее полного сравнения уровней содержания Hsp70 в клетках различных акантамёб в работе использовали также клетки штамма Am8, подробно изученного нами ранее (Подлипаева и др., 2006).

Таблица 2

Амфизойные штаммы *Acanthamoeba*, использованные в работе

| Штаммы | Место и дата выделения | Организм-хозяин, орган |
|--------|-------------------------------------|---|
| 4465 | Р. Влтава, Южная Чехия, 1990 | Окунь <i>Perca fluviatilis</i> , мозг |
| 4337 | Р. Мальше, Южная Чехия, 1990 | Голавль <i>Leuciscus cephalus</i> , мозг |
| 3668 | Р. Скалице, Центральная Чехия, 1990 | Сом <i>Silurus glanis</i> , селезенка |
| 4690 | Чешская Республика, 1991 | Плотва <i>Rutilus rutilus</i> , мозг |
| 4774 | То же | Щука <i>Esox lucius</i> , почки |
| 4628 | » » | Окунь <i>Perca fluviatilis</i> , мозг |
| P121 | Перу, 2004 | Сомик <i>Calophysus macropterus</i> , жабры |
| P128 | То же | Сомик <i>Amblydoras hancockii</i> , жабры |

Экспериментальные культуры клеток штамма Am61 подвергали нагреву при 40 °С в течение 1 ч (тепловой шок) или охлаждению при 4 °С в течение 1 ч (холодовой шок). Сразу после этого клетки со средой собирали в пробирки объемом 2 мл и центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин. После центрифугирования осажденные клетки хранили некоторое время в холодильнике при –20 °С. Перед опытом клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1), гомогенат подвергали центрифугированию при 13 000 об/мин в течение 20 мин. Далее супернатант отделяли от осадка, в супернатанте определяли содержание белка по методу Лоури (Lowry et al., 1951) и готовили пробы для SDS-электрофореза. Таким же образом готовили материал для проведения электрофореза из клеток амфизойных акантамеб, не подвергавшихся шоковым воздействиям. Подготовку образцов клеток лобозных амев различных штаммов производили по описанной ранее методике (Podlipaeva, 2001).

Для приготовления электрофорезных проб после центрифугирования гомогенатов одноклеточных организмов три части супернатанта смешивали с одной частью 4-кратного буфера Лэммли (1 % SDS, 5 % β-меркаптоэтанола и 10 % глицерина). Пробу перемешивали, 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-глицериновой системе (Laemmli, 1970). Электрофорез проводили в пластине геля размерами 120×90×0.8 мм сначала 1–1.5 ч при силе тока 10–12 мА, а потом 2–2.5 ч при 20–25 мА. Сразу после окончания электрофореза проводили электроблоттинг (Towbin et al., 1979) в течение ночи при напряжении 6В. Hsp выявляли после обработки нитроцеллюлозы моноклональными антителами SPA 822 против Hsp70 мыши (Stressgen technologies, Канада), специфичными как к конститутивной, так и к индуцибельной форме белка семейства 70 кДа. Зоны связывания белков с анти-Hsp70-антителами окрашивали на нитроцеллюлозе при помощи вторых биотинированных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Sigma Chemical Company, США) в результате проведения ферментативной реакции. Для определения молекулярной массы выявляе-

мых полипептидов использовали маркеры (14–220 кДа) High Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham Biosciences, Великобритания) и бычий сывороточный альбумин (66 кДа).

Результаты

Лобозные пресноводные амевы. У подавляющего большинства представителей этой группы простейших обнаружен конститутивный Hsp70, который выявляется на блотах при довольно низких нагрузках — 5–7 (рис. 1, а, б, в) и 11–12 (рис. 1, г) мкг общего белка на стартовый гель. Все исследованные штаммы вида *Amoeba proteus* и амевы близких видов — *A. amazonas*, *A. indica* и *A. borokensis* — мало отличаются друг от друга по уровню содержания Hsp70 и по положению окрашенной зоны на блотах, которая примерно соответствует полипептиду с мол. массой 70–72 кДа. Лишь самый молодой штамм коллекции (Nearol, выделен из природы в 2005 г.) демонстрирует несколько более низкий уровень содержания белка (рис. 1, б). В то же время, чтобы добиться хоть сколько-нибудь заметного окрашивания зоны 70 кДа для клеток амев штамма Belomor, пришлось увеличить нагрузку общего белка на стартовый гель сначала до 12 (рис. 1, в), а затем до 15 (рис. 1, г) мкг. При этом выявляе-

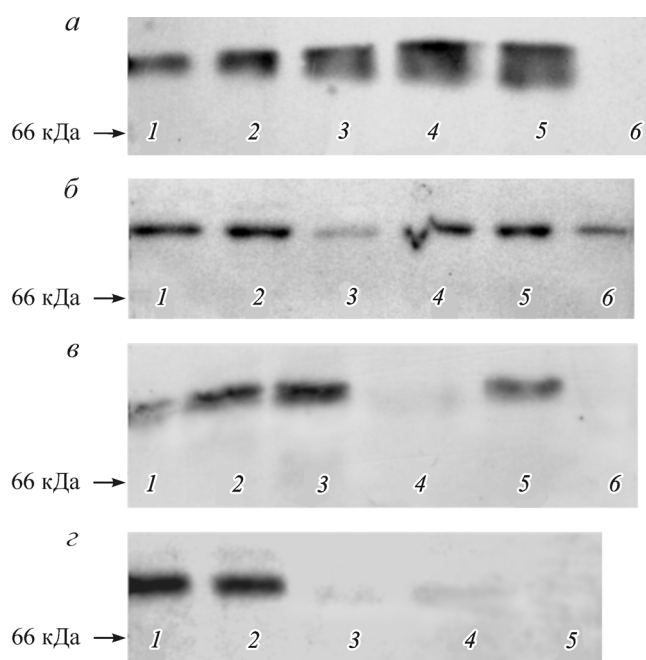


Рис. 1. Белок теплового шока семейства 70 кДа (Hsp70) в интактных клетках различных штаммов лобозных пресноводных амев.

а — дорожки: 1 — *Amoeba proteus* штамм В, 2 — *A. proteus* штамм Val, 3 — *A. proteus* штамм Da, 4 — *A. amazonas* штамм Amaz, 5 — *A. indica* штамм Ind, 6 — *Amoeba* sp. штамм Belomor (на каждой дорожке стартового геля 5–7 мкг белка). б — дорожки: 1 — *A. proteus* штамм Val, 2 — *A. proteus* штамм tP, 3 — *A. proteus* штамм Nearol, 4 — *A. proteus* штамм Obsc, 5 — *A. proteus* штамм Lesch, 6 — *A. proteus* штамм Binucl (на каждой дорожке стартового геля 7 мкг белка). в — дорожки: 1 — *A. proteus* штамм Da, 2 — *A. proteus* штамм Kan, 3 — *A. proteus* штамм tD, 4 — *Amoeba* sp. штамм Belomor, 5 — *A. borokensis* штамм Bor, 6 — *Trichamoeba* sp. штамм As102 (на каждой дорожке стартового геля 11–13 мкг белка). г — дорожки: 1 — *A. proteus* штамм Da, 2 — *A. proteus* штамм B, 3, 4 — *Amoeba* sp. штамм Belomor, 5 — *Trichamoeba* sp. штамм As102 (на дорожках 1–3, 5–7 мкг, на дорожке 4 — 15 мкг белка).

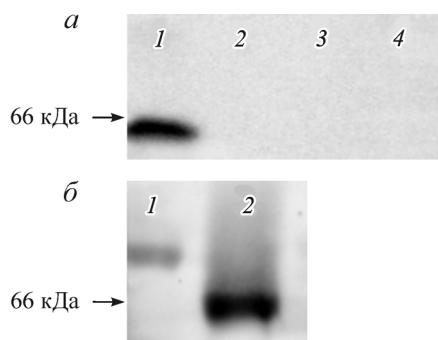


Рис. 2. Белок Hsp70 в интактных клетках различных штаммов амфизойных акантамеб и ископаемого штамма Am8.

а — дорожки: 1 — штамм Am8, 2 — штамм 4337, 3—4 — штамм 4465 (на дорожках 1—3 20 мкг стартового геля, на дорожке 4 30 мкг белка). *б* — дорожки: 1 — штамм 4465, 2 — штамм Am8 (на дорожке 1 40 мкг стартового геля, на дорожке 2 20 мкг белка).

мая слабо окрашенная зона занимает на блоте чуть более низкую позицию, чем у остальных изученных штаммов рода *Amoeba*. Наконец, у амев штамма AS102 нам вообще не удалось выявить зону, соответствующую 70 кДа. Однако мы пока затрудняемся сказать, связано это с недостаточной нагрузкой белка на стартовый гель или отсутствием этого белка является характерной особенностью данного штамма, у которого они предположительно представлены только тяжелыми изоформами белка с мол. массой около 97 кДа.

Амфизойные акантамебы. Заметное содержание Hsp70 удалось выявить только у 2 штаммов — 4465 и 4628 — из 8 исследованных штаммов амфизойных *Acanthamoeba* spp. Правда, у штамма 4465 Hsp70 был выявлен лишь при увеличении нагрузки общего белка на стартовый гель до 40 мкг (рис. 2, *а*, дорожки 3, 4, рис. 2, *б*, дорожка 1). У штамма 4628 конститутивный Hsp70 был обнаружен при нанесении на стартовый гель менее 20 мкг белка (рис. 3, *б*, дорожка 3). Следует отметить, что у обоих этих штаммов позиция окрашенной зоны на блотах соответствует таковой Hsp70 штаммов лобозных амев рода *Amoeba*. В клетках амфизойных акантамеб штаммов 4690, 3668 и P128 при нагрузке общего белка на стартовый гель до 30—35 мкг, а у штаммов 4337, 4774 и P121 при нагрузке белка до 20—25 мкг Hsp70 не выявляется (рис. 2, *а*, до-

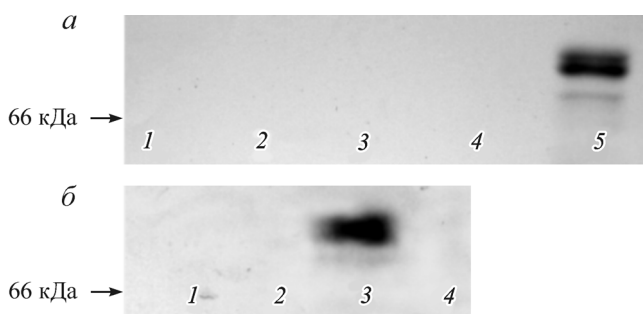


Рис. 3. Белок Hsp70 в интактных клетках различных штаммов амфизойных акантамеб.

а — дорожки: 1 — штамм 4690, 2 — штамм P121, 3 — штамм P128, 4 — штамм 4774, 5 — штамм 4628 (на каждой дорожке стартового геля 30—35 мкг белка). *б* — дорожки: 1 — штамм 3668, 2 — штамм P128, 3 — штамм, 4 — штамм 4774 (на дорожках 1 и 2 35 мкг стартового геля, на дорожке 3 15 мкг белка, на дорожке 4 25 мкг белка).

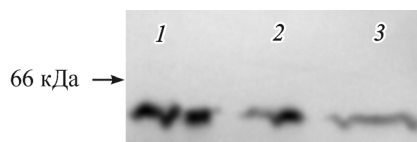


Рис. 4. Белок Hsp70 в интактных клетках свободноживущих тундровых акантамеб штамма Am61 в клетках этого же штамма после теплового (2) или холодного (3) шока.

Дорожки: 1 — интактные клетки (контроль); 2, 3 — акантамебы сразу после теплового (40 °С, 1 ч) или холодного (4 °С, 1 ч) шока соответственно; на каждой дорожке стартового геля 10—12 мкг белка).

рожка 2; 3, а, дорожки 1—4; 3, б, дорожки 1, 2, 4). Из-за ограниченного количества материала, которым мы располагали на данном этапе исследования, нам не удалось провести опыты с дальнейшим увеличением нагрузки белка на стартовый гель.

Тундровые акантамебы. Имевшийся в нашем распоряжении штамм свободноживущих тундровых акантамеб Am61 характеризуется высоким уровнем содержания конститутивного Hsp70 — соответствующая окрашенная зона на блоте выявляется уже при нагрузке 10—12 мкг белка на стартовый гель (рис. 4, *дорожка 1*).

Акантамебы этого штамма были подвергнуты тепловому и холодному шокам при 40 и 4 °С соответственно. В обоих случаях наблюдается некоторый расход Hsp70, более заметный после проведения холодного шока (рис. 4, *дорожки 1—3*). Позиция окрашенной зоны на блоте оказывается несколько ниже маркера мол. массы 66 кДа.

Обсуждение

Большинство штаммов пресноводных лобозных амев из коллекции Лаборатории цитологии одноклеточных организмов ИЦ РАН характеризуется довольно высоким содержанием Hsp70 в условиях отсутствия стресса. При нанесении на стартовый гель 5—7 мкг белка штаммов B, Val, Da, Amaz и Ind (рис. 1, *а*), tP, Obsc, Lesch, Binucl и Neapol (рис. 1, *б*) и 11—13 мкг белка штаммов Kap, tD и Vog (рис. 1, *в*) на блотах во всех случаях выявлялась окрашенная зона, соответствующая мол. массе около 70 кДа. В результате проведенного анализа нам не удалось выявить корреляцию между уровнем содержания конститутивного Hsp70 и какими-либо индивидуальными характеристиками перечисленных выше штаммов амев — ни с географическим положением и температурными условиями места природной изоляции штамма, ни с возрастом штамма (в данном случае — временем культивирования штамма в лаборатории). Важно отметить, что все эти штаммы принадлежат либо к виду *Amoeba proteus*, либо к близким к нему видам этого рода — *A. amazonas*, *A. indica* и *A. borokensis*. Весьма существенно отличаются от этой группы штаммы Belomor и As102. Ранее по результатам анализа изозимных спектров некоторых ферментов клеток штамма Belomor уже высказывалось сомнение в принадлежности амев этого штамма к роду *Amoeba* (Friz, 1992; Сопина, 1999, 2000). Что касается штамма As102, то его принадлежность к представителям рода *Amoeba* также неоднократно подвергалась сомнению, причем на основании изучения как изозимных спектров некоторых ферментов (Сопина, 2000), так и ультраструктуры клеток этого штамма (Ivanova et al., 2004). Имеющиеся данные говорят в пользу принадлежности амев штамма As102 к

новому виду рода *Trichamoeba*. Уровень содержания конститутивного Hsp70 в клетках штамма As102 очень невысок, а особенности распределения его различных изоформ подлежат дальнейшему изучению. В заключение этого раздела следует добавить, что, несмотря на общие для всех штаммов коллекции пресноводных лобозных амев условия содержания и кормления, именно штаммы Velo-тог и As102 наиболее неустойчивы при культивировании, постоянно требуют повышенного внимания, более частой пересадки и смены среды. Возможно, в какой-то степени это отражает связь уровня содержания конститутивного Hsp70 в клетках пресноводных лобозных амев и их адаптивных возможностей.

Выявленные нами различия в содержании конститутивного Hsp семейства 70 кДа в клетках амфизойных акантамеб, возможно, в какой-то степени коррелируют со степенью их патогенности для организма-хозяина (в данном случае — рыб), как это предполагается для паразитических видов акантамеб (Pérez-Serrano et al., 2000), однако этот вопрос требует проведения специальных исследований.

У современных свободноживущих акантамеб, изолированных из тундровой почвы (штамм Am61), Hsp, выявленные анти-Hsp70-антителами, располагаются на блоте ниже маркера 66 кДа, что отличает их от пресноводных амев группы «proteus» и от амфизойных акантамеб штаммов 4465 и 4628, у которых Hsp имеет мол. массу около 70 кДа. Ранее нами было показано, что и у ископаемых тундровых акантамеб (штамм Am8) соответствующая зона также располагалась на блоте в позиции ниже 66 кДа (Подлипаева и др., 2006). Как ископаемые акантамебы штамма Am8, так и современные акантамебы штамма Am61 характеризуются отсутствием типичного HSR (heat shock response), т. е. «классической» индукции Hsp70 в ответ на шоковое воздействие. У обоих штаммов — ископаемого (Подлипаева и др., 2006) и современного (рис. 4, дорожки 1—3) — мы наблюдаем расход Hsp70 после теплового и холодного шоков. Отсутствие HSR может быть связано с высоким конститутивным уровнем Hsp70 в клетке, как это имеет место у некоторых антарктических рыб (Place, Hoffman, 2005). Зародышам и личинкам «живых ископаемых» — мечехвостов — также свойствен высокий уровень Hsp70 в нестрессовых условиях, который, по-видимому, обуславливает адаптацию мечехвостов к существенным температурным колебаниям, характерным для их местообитания; отмечено также отсутствие у них типичного ответа на стрессовые температурные воздействия (Botton et al., 2006).

Полученные нами данные не согласуются с упомянутым ранее «правилом» о наличии положительной корреляции между температурными условиями обитания экотермных животных и конститутивным уровнем содержания Hsp70 в их клетках (Ulmasov et al., 1992). По нашему мнению, конститутивный уровень Hsp70 в клетках тем выше, чем в более экстремальных условиях в природе обитает организм. Видимо, следует рассматривать не только экстремально высокие температуры, как у пустынных ящериц (Ulmasov et al., 1992), но и экстремально низкие, как например у антарктических глубоководных нототениевых рыб (Place, Hoffman, 2005) или тундровых акантамеб.

Авторы выражают благодарность проф. Iva Dyková (Institute of Parasitology, Czech Republic Academy of Sciences) за предоставление культур амфизойных акантамеб.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01003).

Список литературы

- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотических клетках. Цитология. 42 (4) : 323—342.
- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2009. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс. Цитология. 51 (3) : 219—228.
- 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 солёности среды обитания. Цитология. 48 (6) : 530—534.
- Подлипаева Ю. И., Смуров А. О., Гудков А. В. 2008. Изменение уровня содержания белка теплового шока семейства 70 кДа у инфузории *Tetrahymena pyriformis* в процессе адаптации к изменению солёности среды. Цитология. 50 (7) : 619—622.
- Подлипаева Ю. И., Шмакова Л. А., Гилчичинский Д. А., Гудков А. В. 2006. Белок теплового шока семейства Hsp70 у некоторых современных амев (Amoebidae) и у акантамеб, полученных из цист, выделенных из многолетнемерзлых пород. Цитология. 48 (8) : 691—694.
- 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 солёности среды. Цитология. 49 (4) : 292—295.
- Сопина В. А. 1999. Электрофоретические спектры кислой фосфатазы амев *Chaos* и *Polychaos*. Цитология. 41 (2) : 210—217.
- Сопина В. А. 2000. Электрофоретические формы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, кислой фосфатазы и эстераз у амев рода *Amoeba*. Цитология. 42 (12) : 1134—1143.
- Botton M. L., Pogorzelska M., Smoral L., Shehata A., Hamilton M. G. 2006. Thermal biology of horseshoe crab embryos and larvae: a role for heat shock proteins. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 336 (1) : 65—73.
- Dyková I., Lom J., Schroeder-Diedrich J. M., Booton G. C., Byers T. J. 1999. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. J. Parasitol. 85 : 1106—1113.
- 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.
- Friz C. T. 1992. Taxonomic analysis of seven species of family Amoebidae by isozymic characterization of electrophoretic patterns and the descriptions of a new genus and new species: *Metamoeba* n. gen., *Amoeba amazonas* n. sp. Arch. Protistenk. 142 : 29—40.
- Ivanova L. O., Podlipaeva Yu. I., Goodkov A. V. 2004. New data on the old cell cultures from the collection of strains of free-living freshwater amoebae. Mol. Biol. Cell. 15 (Suppl.) : 503a.
- Jeon K. W., Lorch I. J. 1973. Strain specificity in *Amoeba proteus*. In: The biology of *Amoeba*. New York: Acad. Press. 549—568.
- Kalinina L. V., Afon'kin S. Yu., Gromov D. B., Khrebtukova I. A., Page F. C. 1986. *Amoeba borokensis* n. sp., a rapidly dividing organism especially suitable for experimental purposes. Arch. Protistenk. 132 : 343—361.
- 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.
- Lyashko V. N., Vikulova V. K., Chernicov V. G., Ivanov V. I., Ulmasov Kh. A., Zatssepina O. G., Evgen'ev M. B. 1994. Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 12 492—12 495.
- Page F. C. 1988. A new key to Freshwater and Soils Gymnamoebae. Ambleside, Freshwater Biol. Ass. 122 p.

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

Place S. P., Hofmann G. E. 2005. Constitutive expression of stress-inducible heat shock protein gene, Hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biol.* 28 : 261—267.

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.

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.

Ulmasov Kh. A., Shammakov S., Karaev K., Evgen'ev M. 1992. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89 : 1666—1670.

Поступила 3 VI 2009

HEAT SHOCK PROTEINS OF 70 KDA FAMILY IN THE CELLS OF FREE LIVING AND AMPHIZOIC AMOEBOID ORGANISMS

Yu. I. Podlipaeva, A. V. Goodkov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: podlipaeva@rambler-ru, pelgood@rambler.ru

The content of constitutive form of 70 kDa family heat shock protein (Hsp70) was determined by the method of immunoblotting. 9 strains of representatives of the genus *Acanthamoeba* including 8 amphizoic (facultative parasitic) strains and one free-living (isolated from upper horizons of Arctic soils) were studied. We also examined 15 strains of free-living freshwater amoebae of various geographic origin, age and species. 14 of them belonging to the genus *Amoeba* and one to the genus *Trichamoeba*. The presence of Hsp70 was demonstrated in the cells of all 25 freshwater amoeba strains, whereas it was shown only for 2 of amphizoic acanthamoebae strains. In all these cases, the position of zone at the blot, revealed by monoclonal anti-HSP70 antibodies, corresponded to polypeptide with molecular mass about 70 kDa. We also found rather high level of constitutive Hsp70 in the cells of contemporary free-living tundra soil representative. However, in this case, the stained zone occupied the position corresponding to MW about 60 kDa which was just the same as earlier obtained for the ancient tundra acanthamoebae strain from permafrost.

Key words: heat shock proteins, HSP70, amphizoic acanthamoebae, large fresh-water amoebae, *Acanthamoeba*, *Amoeba*.