

СВЯЗЬ МЕЖДУ СТЕПЕНЬЮ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ИНFUЗОРИЙ И КОНСТИТУТИВНЫМ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ Hsp70 В КЛЕТКАХ

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

¹ Зоологический институт РАН и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: ¹alexsmurov112004@mail.ru, *pelgood@rambler.ru

Работа посвящена обобщению полученных нами ранее данных о конститутивном уровне содержания белка теплового шока семейства 70 кДа (Hsp70) в клетках свободноживущих инфузорий, принадлежащих к различным экологическим группам, акклиматизированных к пресной и соленой средам: пресноводных *Paramecium jenningsi*, метапресноводных *Tetrahymena pyriformis* и эвригалинных *P. nephridiatum*. Показано, что конститутивный уровень содержания Hsp70 в клетках исследованных нами видов инфузорий коррелирует со степенью их солеустойчивости: он более низкий в пресной среде, чем в соленой, у *P. jenningsi*, более высокий в пресной среде, чем в соленой, у *P. nephridiatum* и практически неизменный у *T. pyriformis* в обеих средах. Обсуждается экологическая значимость величины конститутивного уровня содержания белков теплового шока в клетках инфузорий в контексте их соленостных адаптаций.

Ключевые слова: соленостные адаптации, инфузории, *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium nephridiatum*, *Paramecium jenningsi*, белки теплового шока (Hsp70).

Клетки всех живых организмов в ответ на действие стрессовых факторов отвечают усилением синтеза так называемых белков теплового шока или стресса (Hsp). Гены этих белков активируются не только в условиях стресса, но и в ходе обычных процессов клеточной жизнедеятельности, пролиферации, дифференцировки и апоптоза, накапливаются внутри клеток и секретируются ими во внеклеточное пространство (Маргулис, Гужова, 2000, 2009). Одноклеточные, так же как и многоклеточные организмы, используют белки теплового шока, чтобы минимизировать повреждающие действия стрессов различной природы. У простейших были выявлены Hsp, принадлежащие в зависимости от их молекулярной массы к различным семействам, и важнейшими из них являются белки семейства 70 кДа (Hsp70).

В наших предыдущих исследованиях было показано, что пресноводные и эвригалинные инфузории реагируют изменением уровня содержания Hsp70 в клетке в ответ на изменение солёности среды (Плеханов и др., 2006; Смуров и др., 2007; Подлипаева и др., 2008). Исследованные виды, принадлежащие к разным экологическим группам, в ответ на резкое изменение солёности среды реагируют сначала уменьшением, а затем увеличением содержания Hsp70 в клетках. Временная динамика этого процесса оказывается сходной с таковой при тепловом стрессе у тех же видов инфузорий, подвергнутых тепловому шоку (Плеханов и др., 2006). В то же время были обнаружены следующие различия между динамикой изменения содержания Hsp70 в клетках у пресноводных и эвригалинных простейших: а) пресноводные виды в ответ на повышение и понижение солёности среды быстро увеличивают уровень содержания Hsp70 в клетке; б) эвригалинные организмы в случае повышения солёности среды не изменяют

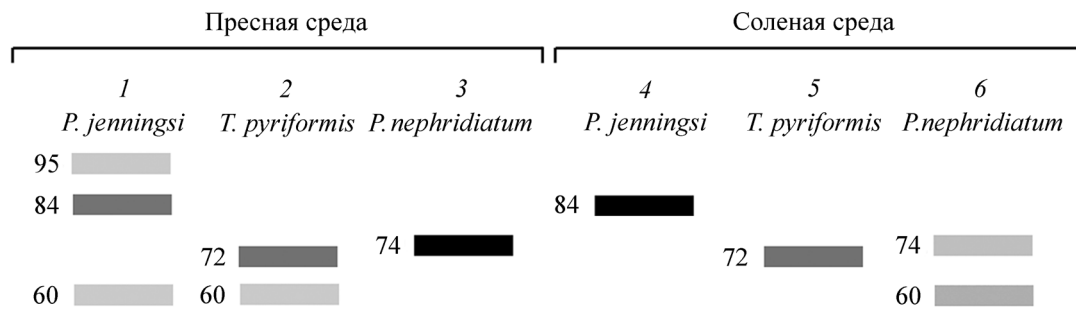
внутриклеточную концентрацию Hsp70; в) в случае понижения солёности среды эвригалинные простейшие, так же как и пресноводные, увеличивают уровень содержания Hsp70 в клетке.

У всех изученных нами ранее видов ресничных простейших было показано наличие относительно высокого конститутивного уровня Hsp70 в интактных клетках, причем оказалось, что он несколько различается в клетках одного и того же клона инфузорий, акклиматизированных к пресной и соленой средам.

В задачу настоящей работы входило обобщить представленные в наших предыдущих публикациях данные о конститутивном уровне содержания Hsp70 в интактных клетках пресноводных, метапресноводных и эвригалинных видов инфузорий, акклиматизированных к пресной и соленой средам, с тем чтобы выявить стратегию реакции шаперонной системы клеток ресничных простейших на изменение солёности среды в связи с их различной солеустойчивостью.

Свободноживущие инфузории, обладающие различной степенью солеустойчивости

В водных условиях обитания выделяют четыре экологические группировки видов протистов по их отношению к солёности среды (Smurov, Fokin, 2001; Kudryavtseva et al., 2007). Первая группа — стенопресноводные виды — включает в себя организмы, способные существовать при солёностях, не превышающих 2.5—3 ‰. Ко второй группе относятся виды, способные существовать в среде с солёностью от 0 до 6—8 ‰ — это пресновод-



Обобщенная схема уровней экспрессии белков семейства Hsp70 в интактных клетках трех видов инфузорий, относящихся к различным экологическим группам в отношении их солеустойчивости, акклимированных к пресной и соленой средам.

Колонки: 1 — *Paramecium jenningsi*, акклимированные к пресной среде (0 ‰); 2 — *Tetrahymena pyriformis*, акклимированные к пресной среде (0 ‰); 3 — *P. nephridiatum*, акклимированные к пресной среде (0 ‰); 4 — *P. jenningsi*, акклимированные к соленой среде (2 ‰); 5 — *T. pyriformis*, акклимированные к соленой среде (10 ‰); 6 — *P. nephridiatum*, акклимированные к соленой среде (10 ‰). Схема представляет результаты наших предыдущих исследований (Плеханов и др., 2006; Смуров и др., 2007; Подлипаева и др., 2008).

ные организмы. Виды третьей группы — метапресноводные — способны существовать в более соленой воде — до 12—16 ‰. Наконец, четвертая группа включает в себя формы, которые следует называть истинно эвригалинными, они могут создавать прямой перенос из полносоленой морской воды непосредственно в пресную воду.

В наших работах использовали следующие виды свободноживущих инфузорий — *Paramecium jenningsi* (штамм SR1-10) и *P. nephridiatum* (штамм SR98-1) из коллекции культур Лаборатории зоологии беспозвоночных БиНИИ С.-Петербургского государственного университета, а также *Tetrahymena pyriformis* (безмикронуклеусный штамм GL) из коллекции Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН. Культивирование простейших осуществляли по стандартной методике — на салатной среде, инокулированной бактериями *Klebsiella aerogenes*, при комнатной температуре (Sonneborn, 1970).

P. jenningsi способна выживать в пределах солёности среды от пресной воды до 6 ‰ (Smurov, Fokin, 2001), *T. pyriformis* — в пределах солёности среды от пресной воды до 15 ‰ (Подлипаева и др., 2008), *P. nephridiatum* — в пределах солёности среды от пресной воды до 40 ‰ (Smurov, Fokin, 2001), что обуславливает их принадлежность к числу пресноводных, метапресноводных и эвригалинных видов соответственно (Smurov, Fokin, 2001).

В экспериментах использовали только клетки, предварительно акклимированные к среде солёностью 0, 2 или 10 ‰ (Плеханов и др., 2006; Смуров и др., 2007; Подлипаева и др., 2008), что позволяет непосредственно сравнивать полученные данные по изменению уровня содержания Hsp70 в интактных клетках всех исследованных нами видов. Срок акклимации организмов в каждом случае составлял не менее 2 мес при комнатной температуре (18—20 °C). Необходимую солёность создавали добавлением в культуральную среду раствора искусственной морской соли, приготовленной по прописи Шубравого (1983).

Содержание Hsp70 в клетках свободноживущих инфузорий

В тотальном белковом экстракте инфузории *P. jenningsi*, культивированной в пресной воде, выявляется полипептидный антиген с мол. массой около 84 кДа (см. ри-

сунк, колонка 1). При помощи высокочувствительного метода ECL в клетках этого вида обнаруживаются минорные полипептиды с мол. массами около 95 и 60 кДа, которые также перекрестно реагируют с антителами против Hsp70 (см. рисунок, колонка 1).

У инфузорий *T. pyriformis* в клетках, культивированных при тех же условиях, выявляются две зоны: одна — более интенсивно окрашенная — с мол. массой 72 кДа и другая — около 60 кДа (см. рисунок, колонка 2). Аналогичный полипептидный антиген с мол. массой около 74 кДа отчетливо выявляется также в тотальном белковом экстракте *P. nephridiatum*, акклимированных к пресной среде (см. рисунок, колонка 3).

У инфузорий, акклимированных к соленой среде, в тотальном белковом экстракте выявляются те же основные полипептидные антигены.

P. jenningsi, акклимированные к солёности 2 ‰, демонстрируют относительно более высокий уровень содержания конститутивного Hsp70, чем акклимированные к пресной среде (см. рисунок, колонка 4).

T. pyriformis, акклимированные к среде солёностью 10 ‰, характеризуются наличием такой же конститутивной формы белка теплового шока с мол. массой 72 кДа, как у клеток из пресной воды (см. рисунок, колонка 5), причем уровень содержания Hsp70 в клетках практически не отличается от такового в пресной среде.

У *P. nephridiatum*, акклимированных к среде солёностью 10 ‰, конститутивный уровень содержания белка с мол. массой 74 кДа относительно ниже, чем у клеток из пресной среды. Кроме того, в этих инфузориях обнаруживается полипептид с мол. массой около 60 кДа, который также перекрестно реагирует с использованными нами антителами против Hsp70. Этот белок в количестве даже несколько большем, чем белок с мол. массой 74 кДа, присутствует в клетках, акклимированных к 10 ‰ (см. рисунок, колонка 6), но практически отсутствует у клеток, акклимированных к пресной среде.

Известно, что белок теплового шока имеет две основные функции: первую — как так называемых housekeeping протеин, а вторую — как белок, исправляющий повреждения других белков в клетках после стресса. На самом деле конститутивный и индуцибельный белки теплового шока могут играть и ту, и другую роль (Menge et al., 2002). Например, в условиях, благоприятствующих быстрому росту организма и высокой синтетической активности, может наблюдаться повышенный уровень со-

держания конститутивного Hsp70 для поддержки процесса синтеза белков. Если организм подвергнуть тепловому стрессу, который может повредить ряд клеточных белков, то конститутивный Hsp способен расходоваться на их защиту от повреждения. В этом случае синтез индуцибельной формы Hsp70 не нужен. Низкая скорость синтеза белков может приводить к низкому уровню содержания конститутивного Hsp70, и при стрессе организму необходим синтез индуцибельного Hsp70. Таким образом, общий уровень Hsp70 может отражать как потенциал роста организмов (общую синтетическую способность клеток), так и текущий уровень стресса, которому подвергся организм.

Исследователями также были выявлены специфические различия в уровнях экспрессии как конститутивного, так и индуцибельного белков Hsp70 и Hsp90 кДа в различных тканях морских организмов, подвергнутых как тепловому, так и солеустойчивому шоку (Spees et al., 2002; Chang, 2005).

Современные исследования изменения уровня содержания Hsp70 в клетках беспозвоночных организмов из естественных популяций показали, что незначительные колебания температуры среды не приводят к его изменению (Feder, Hofmann 1999). Для заметного изменения уровня содержания конститутивного Hsp70 в клетках необходимы долговременные тренды температуры среды (Menge et al., 2002).

Кроме того, было показано, что существует положительная корреляция между уровнем содержания Hsp70 в клетках насекомых и характерной температурой экологической ниши этих видов при нормальной температуре среды (Evgen'ev et al., 2007).

Сходные данные были получены при исследовании температурных адаптаций гидробионтов. Было показано, что имеется высокая корреляция между температурой среды обитания и уровнем содержания Hsp70 в жабрах у средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*. При этом наблюдаются выраженные сезонные изменения количества белка, следующие за изменением температуры среды обитания (Hamer et al., 2004).

В наших исследованиях в отличие от вышеупомянутых работ, которые проводились в основном на животных, взятых непосредственно из природы, инфузорий помещали в контролируемые экспериментальные условия. Кроме того, инфузории являются одноклеточными организмами, и на них, следовательно, не распространяются оговорки, связанные с тканевой специфичностью многоклеточных. Все эти обстоятельства позволяют наиболее объективно оценить экологическую значимость конститутивного уровня содержания Hsp70 в клетках в связи с их различной солеустойчивостью.

Наши исследования показали, что конститутивный уровень содержания Hsp70 в клетках исследованных видов инфузорий коррелирует со степенью их солеустойчивости: он более низкий в пресной среде, чем в соленой, у пресноводного вида *P. jenningsi*, более высокий в пресной среде, чем в соленой, у эвригалинной *P. nephridiatum* и практически неизменный у метапресноводной *T. pyriformis* в обеих средах.

Не исключено, что конститутивный уровень содержания Hsp70 в клетках ресничных простейших, даже принадлежащих к близким видам одного рода, но относящихся к различным экологическим группам в отношении их солеустойчивости, в определенном отношении отражает условия, в которых эти виды сформировались: *P. jenningsi* — в стужо пресных водоемах, тогда как *P. nephridiatum* — в солоноватых водах эстуарий или морских водоемах. Наличие разных солеустойчивых границ у всех исследованных видов дает возможность предположить, что они преадаптированы к изменениям солености в соответствующих границах, несмотря на то что все они могут обитать в одной и той же среде — пресной воде. Таким образом, по нашему мнению, при оценке экологической значимости конститутивного уровня содержания Hsp у гидробионтов надо исходить не только из текущих условий их существования, но также учитывать «память» шаперонной системы. Удобным способом ее выявления служат эксперименты с применением предварительной акклимации организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01003) и BMBF (Германия, проект RUS 09/038).

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 солености 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 *Tetrahymena pyriformis* в процессе адаптации клеток к изменению солености среды. Цитология. 50 (7) : 619—622.
- 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.
- Chang E. S. 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. Integ. Comp. Biol. 45 : 43—50.
- Evgen'ev M. B., Garbuz D. G., Shilova V. Y., Zatssepina O. G. 2007. Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. J. Biosci. 32 : 489—499.
- 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.
- Hamer B., Hamer D. P., Muller W. E., Batel R. 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. Environ. Int. 30 : 873—882.
- Kudryavtseva A. V., Smurov A. O., Goodkov A. V. 2007. Salinity tolerance of lobose amoebae and ciliates. Protistology. 5 : 46—47.
- Menge B. A., Olson A. M., Danilohoff E. P. 2002. Environmental stress, bottom-up effects, and community dynamics: integrating molecular-physiological and ecological approaches. Integ. Comp. Biol. 42 : 892—908.
- Smurov A. O., Fokin S. I. 2001. Use of salinity tolerance data for investigation of phylogeny of *Paramecium* (Ciliophora, Penicillia). Protistology. 2 : 130—138.
- Sonneborn T. M. 1970. Methods in *Paramecium* research. Meth. Cell Physiol. 4 : 241—339.

Spees J. L., Chang S. A., Snyder M. J., Chang E. S. 2002. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: equivalent temperature shifts elicit unique gene expression

patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. Cell Stress Chaperones. 7 : 97—106.

Поступила 15 VI 2010

CORRELATIONS BETWEEN SALINITY-PERSISTENCE OF CILIATE SPECIES AND THEIR CONSTITUTIVE HEAT SHOCK PROTEIN OF 70 kDa CONTENTS

A. O. Smurov,¹ Yu. I. Podlipaeva,² S. O. Skarlato,² A. V. Goodkov,^{2, *}

¹ Zoological Institute RAS and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: ¹ alexsmurov112004@mail.ru, * pelgood@rambler.ru

Our own studies of alterations in the level of constitutive heat shock protein of 70 kDa family (Hsp70) in freshwater (*Paramecium jenningsi*), meta-freshwater (*Tetrahymena pyriformis*) and euryhaline (*P. nephridiatum*) ciliates acclimated to salt-water and fresh-water medium were reviewed. It has been shown that the level of constitutive Hsp70 content correlates with the salinity-resistance of ciliate species: in *P. jenningsi* it was lower in freshwater, than in marine water, in euryhaline *P. nephridiatum* it was higher in freshwater, than in marine water, and was more or less stable in *T. pyriformis*, the ciliate that occupies intermediate position between two mentioned above species according its salinity-resistance. The ecological importance of constitutive heat shock protein level is discussed in the context of salinity adaptations studies.

Key words: salinity adaptations, freshwater ciliates, euryhaline ciliates, *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium nephridiatum*, *Paramecium jenningsi*, constitutive heat shock protein level (Hsp70).