

СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ В КЛЕТКАХ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ *PORPHYRA PURPUREA* (RHODOPHYTA)

© Ю. И. Подлипаева,¹ С. Фульда,² А. В. Гудков¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия,
и ² Институт биологических наук Университета Ростока, Германия;
электронный адрес: pelgood1@gmail.com, podlipaeva@gmail.com

Методами иммуноблотинга с двумя способами визуализации (окраска щелочной фосфатазой и ECL) показано присутствие стрессовых белков в клетках талломов красной водоросли *Porphyra purpurea* из пролива Каттегат Балтийского моря. При обработке блотов анти-Hsp70-антителами у контрольных организмов выявляется слабоокрашенная (слабосветящаяся) зона, соответствующая белку с мол. массой 70 кДа, а также зона, соответствующая полипептиду с мол. массой приблизительно 40 кДа (условно «Hsp40»). У водорослей, подвергнутых тепловому шоку при 28 °С в течение 1 ч, после проведения хемилюминесцентной реакции отмечаются «расход» белка 70 кДа и заметная индукция «Hsp40», особенно сильно выраженная через 24 ч после теплового шока.

Ключевые слова: *Porphyra*, Rhodophyta, белки теплового шока, стрессовые белки, Hsp70.

Белки теплового шока (heat shock proteins — Hsp) — стрессовые белки, в настоящее время активно изучаются у целого ряда организмов, среди которых преобладают прокариоты или высшие эукариоты (животные и растения). Наиболее полно изучены стрессовые белки с мол. массой 70 кДа (Hsp70), являющиеся высококонсервативными белками с низкой видовой специфичностью и выраженной шаперонной активностью. Они присутствуют в клетках растений и животных как в конститутивной, так и в индуцибельной формах и локализуются в различных клеточных компартментах — цитоплазме, митохондриях, хлоропластах и эндоплазматическом ретикулуме (Lindquist, 1986; Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000; Бергер, Подлипаева, 2013). Именно цитоплазматические Hsp70 несут основную шаперонную функцию в клетке и отвечают за реакцию на стресс (heat shock response — Hsr).

О стрессовых белках красных водорослей (Rhodophyta) до настоящего времени известно очень мало. Это при том, что некоторые из этих водорослей, в частности порфира (*Porphyra* spp.), — широко распространенные организмы, являющиеся важным экологическим компонентом, определяющим конфигурацию биотопов многих мелких животных, протистов и бактерий, так или иначе использующих талломы *Porphyra* в качестве среды обитания. Кроме того, некоторые виды порфиры съедобны и во многих странах их традиционно употребляют в пищу. Поэтому внимание исследователей сосредоточено на прочтении геномов этих водорослей (Nakamura et al., 2013), на повышении их урожайности путем создания более устойчивых и жизнеспособных «гибридов», толерантных к различным стрессам (Blouin, 2011), а также на анализе веществ, обуславливающих высокую устойчивость некоторых видов порфиры к стрессам (Jia et al., 2013).

Основное внимание исследователей при изучении белков теплового шока у красных водорослей традиционно уделяется подсемейству DnaK Hsp70 — белкам бактериального происхождения из хлоропластов и митохондрий. Им посвящен целый ряд работ, в том числе произведено секвенирование генов этих белков у разных представителей Rhodophyta (Reith, Munholland, 1991; Renner, Waters, 2007). В то же время существует на удивление мало данных относительно цитоплазматического Hsp70 у этих же организмов. Был лишь отмечен некоторый его дефицит у водорослей по сравнению с покрытосеменными растениями (Renner, Waters, 2007). Нам не удалось найти каких-либо сведений, указывающих на корреляцию между экспрессией гена и содержанием белка Hsp70 в клетках, так же как и работ, касающихся функционирования шаперонной системы красных водорослей, в том числе литоральных, регулярно подвергающихся стрессам различной природы.

Исследование цитоплазматических стрессовых белков у красных водорослей имеет также существенное значение с точки зрения фундаментальной биологии. Представителей Rhodophyta по уровню их организации традиционно объединяют с другими низшими эукариотами, в частности одноклеточными, в единое царство Protista (Cavalier-Smith, 2010; Adl et al., 2012). При этом уникальные биохимические характеристики красных водорослей, отсутствие жгутиковых клеток на всех стадиях жизненного цикла, а также данные секвенирования ДНК указывают на их очень раннее происхождение, независимое от предковых форм эукариот (Moreira et al., 2000).

Наши работы, посвященные изучению Hsp70 у представителей ряда таксонов Protista — лобозных амёб, акантамёб и инфузорий, — позволили установить некоторые особенности функционирования их шаперонных систем и

предположить, что низшие эукариоты представляют собой как бы полигон, на котором происходило формирование и становление механизмов адаптации и защитных систем эукариотической клетки (Podlipaeva, 2001; Подлипаева и др., 2008; Смуров и др., 2010; Goodkov et al., 2010). В этом контексте изучение цитоплазматического Hsp70 у представителей Rhodophyta очень важно как с точки зрения расширения спектра изучаемых макротаксонов низших эукариот, далеко отстоящих друг от друга в филогенетическом отношении, так и с точки зрения выявления возможной специфики функционирования шаперонных систем у эволюционно древних, рано дивергировавших групп Protista.

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы методом иммуноблотинга с двумя различными способами визуализации (окраска щелочной фосфатазой и ECL) выявить белки теплового шока в интактных клетках талломов *Porphyra purpurea* и водорослей, подвергнутых стрессовому воздействию (тепловой шок).

Материал и методика

В работе использовали свежие талломы водорослей *Porphyra purpurea*, собранные в районе пролива Каттегат Балтийского моря при температуре 10 °С и солености 28 ‰.

Для получения белкового экстракта небольшие кусочки талломов (примерно 5×5 мм) помещали в пробирку, наполненную стеклянными шариками, и добавляли 150 мкл экстрагирующего буфера (см.: Podlipaeva, 2001). Пробирку встряхивали в шейкере дважды по 10 с, после чего полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 10 000 об/мин и 4 °С. Супернатант переносили в эппендорфы и готовили пробы для проведения белкового электрофореза по стандартной методике (Laemmli, 1970), предварительно определив концентрацию белка в аликвоте каждой пробы методом Брэдфорд (Bradford, 1976).

Для проведения теплового шока талломы порфиры, находившиеся в кювете с морской водой (28 ‰), помещали на 1 ч в термостат при 28 °С. Гомогенаты и пробы для электрофореза приготавливали немедленно после проведения теплового шока, через 4 и 24 ч после шока, чтобы определить динамику развития Hsp в клетках водоросли.

SDS-электрофорез в 10%-ном ПААГ проводили в устройстве для электрофореза Mini-PROEAN 3 BIO-RAD. Гели после электрофореза окрашивали Кумасси. Этот же прибор впоследствии использовали для проведения электроблотинга.

Для определения молекулярной массы выявляемых полипептидов использовали маркеры ColourBurst electrophoresis marker (m. w. 8000—220 000 Da; Sigma-Aldrich, США). Мембраны обрабатывали антителами, выработанными против Hsp70 (SPA-822, Enzo Life Sciences, США—Швейцария), затем вторичными антителами, конъюгированными либо со щелочной фосфатазой (Sigma Chemical Company, США) для получения цветной ферментативной реакции (AP), либо антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma Chemical Company, США) для дальнейшего выявления иммобилизованных на мембране и помеченных белковых зон (ECL). В последнем случае мембраны обрабатывали люминесцирующим раствором (9 мкМ р-кумаровой кислоты в ДМСО, 17.5 мкМ люминола в 0.1 М Трис-HCl-буфере, pH 8.5, и 90 мкМ перекиси водорода) в течение 1—5 мин. Пленку (Fudji) экспонировали 1—5 мин, затем

сканировали. Интенсивность свечения зон на пленке измеряли в отн. ед. при помощи денситометра BIO-RAD GS-800 (Германия).

В качестве контроля присутствия Hsp70 на блотах и пленках использовали пробу, приготовленную из клеток жабры беломорской мидии *Mytilus edulis*, содержащих Hsp70 как конститутивно, так и в стрессовых условиях (Подлипаева, Бергер, 2012).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен спектр общего белка таллома *Porphyra purpurea* после электрофореза в 10%-ном ПААГ. Обращает на себя внимание отсутствие в геле после электрофореза видимых окрашенных белковых зон с мол. массой 70 кДа и выше. По-видимому, их количество в клетках таллома порфиры так невелико, что данный метод оказывается недостаточно чувствительным для их выявления при выбранной нагрузке на стартовый гель. Мажорные зоны располагаются в районе 58—60 кДа. Кроме того, отчетливо выявляется белок с мол. массой 35—40 кДа, количество которого в клетках таллома порфиры явно возрастает по сравнению с контролем по прошествии 24 ч после теплового шока (рис. 1; ср. дорожки 3 и 6).

Методом иммуноблотинга с окраской AP (рис. 2, а) и ECL (рис. 2, б) в клетках интактных (контрольных) талломов *P. purpurea* выявлено присутствие белка с мол. массой 70 кДа (рис. 2, б, дорожка 2), а также наличие белка с мол. массой 35—40 кДа, называемого здесь условно Hsp40 (рис. 2, а, дорожка 3; 2, б, дорожки 2—4). По данным денситометрии (см. таблицу), содержание Hsp70, конститутивно присутствующего в клетках порфиры, составляет 926.7 отн. ед., что более чем в 2 раза превышает содержание конститутивного «Hsp40» — 445.3 отн. ед.

После теплового шока, которому были подвергнуты водоросли (нагрев до 28 °С в течение 1 ч), наблюдается заметная индукция «Hsp40» (рис. 2, а, дорожка 3); особенно значительно уровень данного белка повышается через 24 ч после теплового шока (рис. 2, б, дорожка 4).

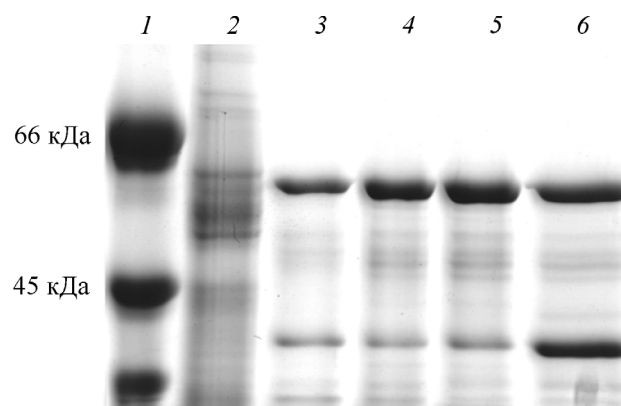


Рис. 1. Спектр общих белков клеток таллома порфиры *Porphyra purpurea* и жабры мидии *Mytilus edulis* в нормальных условиях и через разные промежутки времени после теплового шока.

Дорожки: 1 — маркеры молекулярных масс; 2 — жабры мидии, контроль; 3 — порфира, контроль; 4—6 — порфира сразу после, через 4 и 24 ч после теплового шока соответственно (10 % ПААГ, окраска Кумасси, на старте каждой дорожки геля 10 мкг белка).

Содержание белков теплового шока в клетках таллома *Porphyra purpurea* в контроле и после теплового шока при разных условиях проведения ECL

Белок	Уровень белка (отн. ед.) при разном времени экспозиции и обработки мембраны, мин		
	1 + 1	5 + 5	5 + 1
Hsp70, контроль	926.7	—	—
Hsp40, контроль	445.3	697.4	670.9
Hsp40, 4 ч после шока	656.9	1045.8	972.0
Hsp40, 24 ч после шока	5503.5	6576.2	9905.5

Примечание. По данным денситометрии хемилюминесцентной реакции.

Содержание Hsp70 в клетках таллома порфиры после теплового шока, напротив, настолько падает, что не визуализируется на пленке и не улавливается на денситограммах. По результатам трех измерений (см. таблицу) соотношение среднего количества «Hsp40» в контроле к количеству «Hsp40», регистрируемому через 4 и 24 ч после теплового шока, составляет 1 : 1.44 : 11.93.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что шаперонная система *P. purpurea* характеризуется относительно низким уровнем содержания конститутивного Hsp70 в клетках и довольно медленным (24 ч) развитием реакции на стресс (Hsr), причем основным участником этого ответа оказывается белок с мол. массой 35—40 кДа.

К настоящему времени в ряде работ показано, что белки с мол. массами 35, 38 и 40 кДа конститутивно присутствуют и наряду с Hsp70 принимают участие в Hsr в клетках некоторых прокариотических и высших эукарио-

тических организмов, в частности морских моллюсков *Mytilus edulis* (Подлипаева, Бергер, 2012), трех видов рода *Tegula* (Tomanek, Somero, 2002) и термофильной бактерии *Rhodothermus obamensis* (Takai et al., 1998). Известно также, что Hsp40 конститутивно присутствует в составе мультишаперонного комплекса (вместе с Hsp70 и Hsp90), ассоциированного с фактором теплового шока HSF-1. При стрессовом воздействии, когда начинают появляться денатурированные белки, этот комплекс диссоциирует на три молекулярных шаперона (Hsp40, Hsp70 и Hsp90) и HSF-1 (Marimoto, Santoro, 1998; Hochachka, Somero, 2002). Однако какие-либо сведения о присутствии индуцибельной формы белка теплового шока с мол. массой около 40 кДа в клетках представителей того или иного макротаксона Protista нам неизвестны.

Полученные в настоящей работе данные указывают на имеющуюся у красных водорослей хорошо выраженную специфику функционирования шаперонной системы, что, безусловно, требует дальнейшего тщательного изучения.

Приносим глубокую благодарность д. б. н. И. А. Гамалей за ценные замечания при подготовке рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта RUS-09/038 (IB/BMBF, Германия).

Список литературы

- Бергер В. Я., Подлипаева Ю. И. 2013. Стрессорные белки и соленость внешней среды. Тр. Зоол. ин-та РАН. Приложение 3. (Пятьдесят лет концепции критической солености). СПб.: Изд-во ЗИН РАН. 22—32. (Berger V. Ja., Podlipaeva Yu. I. 2013. Stress proteins and environmental salinity. Proc. Zool. Inst. RAS. Suppl. 3. SPb.: Publ. Zool. Inst. RAS. 22—32.)
- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотической клетке. Цитология. 42 (4) : 323—342. (Margulis B. A., Guzhova I. V. 2000. Stress proteins in eukaryotic cells. Tsitologiya. 42 (4) : 323—342.)
- Подлипаева Ю. И., Бергер В. Я. 2012. Изменения содержания белков теплового шока семейства 70 кДа в клетках жаберного эпителия моллюсков *Mytilus edulis* L. в зависимости от солености среды. Цитология. 54 (7) : 580—584. (Podlipaeva Yu. I., Berger V. Ja., 2012. The effect of environmental salinity on the level of heat shock proteins in gill epithelium of *Mytilus edulis* L. mussel. Cell Tissue Biol. 6 (5) : 498—502.)
- 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 солености среды. Цитология. 50 (7) : 619—

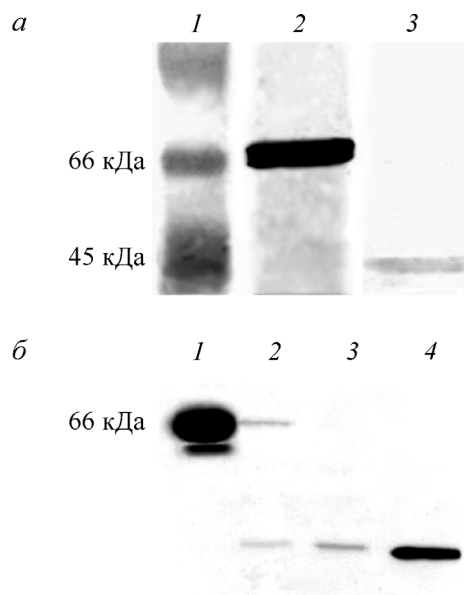


Рис. 2. Белки теплового шока мидии и порфиры в нормальных условиях и после теплового шока.

Метод иммуноблотинга, окраска щелочной фосфатазой (а) и ECL (б).

а — дорожки: 1 — маркеры молекулярных масс; 2 — Hsp70 в клетках жабры *Mytilus edulis*, контроль; 3 — «Hsp40» в клетках порфиры через 24 ч после проведения теплового шока при 28 °С в течение 1 ч. б — дорожки: 1 — Hsp70 в клетках жабры *M. edulis*, контроль; 2 — Hsp70 и «Hsp40» в клетках порфиры, контроль; 3, 4 — «Hsp40» в клетках порфиры через 4 и 24 ч после теплового шока соответственно.

622. (Podlipaeva Yu. I., Smurov A. O., Goodkov A. V. 2008. Expression of heat-shock protein 70 kDa in *Tetrahymena pyriformis* during cell adaptation to salinity changes in the medium. *Cell Tissue Biol.* 2 (4) : 373—375.)
- Смуров А. О., Подлипаева Ю. И., Скарлато С. О., Гудков А. В. 2010. Связь между степенью солеустойчивости инфузорий и конститутивным уровнем содержания Hsp70 в клетках. *Цитология.* 52 (12) : 1041—1044. (Smurov A. O., Podlipaeva Yu. I., Skarlato S. O., Goodkov A. V. 2010. Correlations between salinity-persistence of ciliate species and their constitutive heat shock protein of 70 kDa contents. *Tsitologiya.* 52 (12) : 1041—1044.)
- Adl S. M., Simpson A. G. B., Lane Ch.E., Lukes J., Bass D., Bowser S. S. et al. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59 : 429—493.
- Blouin N. A., Brodie J. A., Grossman A. C., Xu Pu, Brawley S. H. 2011. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress. *Trends Plant Sci.* 16 : 29—37.
- Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Cavalier-Smith T. 2010. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett.* 6 : 342—345.
- 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.
- Goodkov A. V., Smurov A. O., Podlipaeva Yu. I. 2010. Free-living protists as a model for studying heat shock proteins in the cell. In: *Handbook of molecular chaperones: roles, structures and mechanisms.* New York: Nova Sci. Publ., Inc. 293—312.
- Hochachka P. V., Somero G. N. 2002. *Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution.* Oxford: Univ. Press. 466 p.
- Jia Z., Niu J., Huan L., Wu X., Wang G., Hou Z. 2013. Cyclophilin participates in responding to stress situations in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 49 : 194—201.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 681—685.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 1151—1191.
- Marimoto R. I., Santoro M. G. 1998. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotech.* 16 : 833—838.
- Moreira D., Le Guyader H., Phillippe H. 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature.* 405 : 69—72.
- Nakamura Y., Sasaki N., Kobayashi M., Ojima N., Yasuike M. et al. 2013. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, *Susabi-nori (Pyropia yezoensis)*. *PLoS ONE.* 8 : e57122. doi : 10.1371/journal.pone.0057122.
- Podlipaeva Y. I. 2001. Heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. *Protistology.* 2 : 123—129.
- Reith M., Munholland J. 1991. An hsp70 homolog is encoded on the plastid genome of the red alga, *Porphyra umbilicalis*. *FEBS Lett.* 294 : 116—120.
- Renner T., Waters E. 2007. Comparative genomic analysis of the Hsp70s from five diverse photosynthetic eukaryotes. *Cell Stress Chaperones.* 12 : 172—185.
- Takai K., Nunoura T., Sako Y., Uchida A. 1998. Acquired thermotolerance and temperature-induced protein accumulation in the extremely thermophilic bacterium *Rhodothermus obamensis*. *J. Bacteriol.* 180 : 2770—2774.
- Tomanek L., Somero G. N. 2002. Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation of hsp gene expression. *J. Exp. Biol.* 205 : 677—685.

Поступила 21 III 2014

STRESS PROTEINS IN THE CELLS OF *PORPHYRA PURPUREA* (RHODOPHYTA) THALLUSYu. I. Podlipaeva,^{1,*} S. Fulda,² A. V. Goodkov¹¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, and ² University of Rostock, Institute of Biosciences, Germany;

* e-mail: podlipaeva@gmail.com

Heat shock proteins have been revealed for the first time by the methods of Western blotting using alkaline phosphatase and ECL in the cells of *Porphyra purpurea* from Kattegat area of the Baltic Sea in normal and experimental stress conditions. It was demonstrated with application of monoclonal anti-Hsp70 antibodies that a slight band about 70 kDa is present constitutively at the film; additionally the polypeptide of about 40 kDa («Hsp40») has been detected. After heat shock at 28 °C during 1 hr significant «expenditure» of Hsp70 was observed, as well as the pronounced induction of «Hsp40»; the induction was expressed especially strongly in 24 hr after the stress application.

Key words: stress proteins, heat shock proteins, *Porphyra*, Rhodophyta.