



УДК 575.4: 577.4: 591.1: 594

СТРЕССОРНЫЕ БЕЛКИ И СОЛЕНОСТЬ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

В.Я. Бергер^{1*} и Ю.И. Подлипаева²

¹Зоологический институт Российской академии наук, Университетская наб. 1, 199134 Санкт-Петербург, Россия;
e-mail: berger.vic@gmail.

²Институт цитологии Российской академии наук, Тихорецкий пр. 4, 194064 Санкт-Петербург, Россия;
e-mail: podlipaeva@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Статья содержит материалы доклада, прочитанного на конференции «Фактор солёности в биологических науках» (Санкт-Петербург, 2012 г). В её основу положены как литературные данные, так и результаты работы авторов по изучению состава и содержания стрессовых белков в процессе солёностных адаптаций водных организмов.

Ключевые слова: солёность, стрессовые белки, адаптации.

STRESS PROTEINS AND ENVIRONMENTAL SALINITY

V.Ja. Berger* and Yu.I. Podlipaeva

¹Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya Emb. 1, 199134 Saint Petersburg, Russia;
e-mail: berger.vic@gmail

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky Pr. 4, 194064 Saint Petersburg, Russia;
e-mail: podlipaeva@gmail.com

ABSTRACT

The paper contains materials of presentation delivered at the Conference “Salinity factor in biological sciences” (Saint Petersburg, 2012). It is based on literature and original experimental data. The question of the influence of salinity changes on stress protein content is discussed.

Key words: salinity, stress proteins, adaptations.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование адаптаций к различным абиотическим факторам – одно из важнейших направлений биологии. В последние десятилетия особенно большое внимание при изучении адаптаций уделяется стрессорным белкам, обычно имену-

емым белками теплового шока (БТШ) или *heat shock proteins* (HSP). По мере того, как механизмы действия этих белков исследовались все более и более детально, их стали называть *молекулярными шаперонами* (Ellis, 1987; Ellis and van der Vies, 1991) от французского *chaperoner* – помощник, сопровождающий. Принято считать, что история открытия и изучения стрессорных белков началась, когда было обнаружено (Ritossa, 1962),

* Автор-корреспондент / Corresponding author

что при перемещении личинок дрозофилы или ее изолированных слюнных желез из 25° в 37 °С в нескольких локусах политенных хромосом образовывались новые пуфы. Через некоторое время, достигнув максимальных размеров, они начинали медленно уменьшаться. Подобное явление было описано годом позже, когда изменения пуфов политенных хромосом насекомых были зарегистрированы как ответ на изменения осмолярности среды и (или) концентрации ионов натрия, калия, кальция и магния (Kroger, 1963). При этом ни тот, ни другой автор не выделили никаких стрессорных белков. Это было сделано значительно позже (Tissieres et al., 1974), когда у подвергавшихся нагреву дрозофил с помощью электрофореза продуктов генов из различных пуфов выявили несколько групп стрессорных белков. С этого момента и начался бурный рост интереса к этим белкам. В настоящее время количество работ, так или иначе связанных с их изучением, измеряется десятками тысяч (Маргулис и Гужова, 2009).

Не ставя перед собой задачу сделать детальный обзор работ о роли стрессорных белков в адаптации биологических систем различного уровня организации к абиотическим факторам среды, остановимся на следующих основных моментах. Во-первых, рассмотрим, каковы основные методы исследования стрессорных белков, а также каковы их структура и функция. Во-вторых, выясним, какие факторы среды индуцируют их появление и накопление в клетках. И, наконец, попытаемся ответить на вопрос о том, принимают ли стрессорные белки участие в соленостных адаптациях различных представителей биоты.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРЕССОРНЫХ БЕЛКОВ

Не останавливаясь на деталях, отметим, что среди разнообразных методов исследования стрессорных белков наиболее часто используются следующие два. Первый основан на использовании меченных предшественников синтеза белка, т.е. различных аминокислот. Клетки или ткани инкубируют с мечеными аминокислотами, включающимися во вновь синтезированные белки. После электрофореза и окраски на общий белок гели экспонируют с рентгеновской пленкой, на которой против вновь синтезированных белков появляется метка. По количеству меток

можно судить о том, в каком количестве и с какой скоростью осуществляется синтез исследуемых белков.

Результаты использования этого метода наиболее наглядно демонстрирует работа, выполненная на моллюсках четырех видов из рода *Tegula*, обитающих на побережье Калифорнийского залива (Tomanek and Somero, 1999, 2000). Исследованные моллюски различаются вертикальным распределением на литорали и по-разному относятся к изменениям температуры. Максимально высоко, на границе между литоралью и супралиторалью, обитают моллюски вида *Tegula rugosa*, которые при длительной осушке могут в летний период нагреваться до 40 °С. В среднем горизонте литорали обитают моллюски вида *T. funebris*, которые во время отлива могут нагреваться до 32.5 °С. Моллюски видов *T. brunnea* и *T. montereyi* обитают в нижнем горизонте литорали и на границе с сублиторальной зоной. Температура воды в местах их обитания обычно не превышает 10–18 °С и лишь изредка и на относительно короткое время может подниматься до 25 °С.

В ходе экспериментов моллюсков всех четырех видов акклиматизировали в течение месяца к температуре воды 13 и 23 °С. Затем их переносили в воду различной температуры (от 13 до 42 °С), после чего указанным выше методом исследовали интенсивность синтеза двух белков теплового шока hsp70 и hsp38, имеющих молекулярную массу соответственно 70 и 38 кДа. Полученные данные (рис. 1) показали, что моллюски исследованных видов различаются между собой по таким показателям, как температура воды, при которой начинался (T_{on}), достигал максимума (T_{peak}) и прекращался (T_{off}) синтез этих белков. По всем этим характеристикам исследованные моллюски располагались в следующий ряд, соответствующий их экологическим особенностям:

$T. brunnea = T. montereyi < T. funebris < T. rugosa.$

Помимо этого, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что температурные условия, при которых включался, достигал максимума и выключался синтез обоих стрессорных белков, могут сдвигаться в результате акклимации, что свидетельствует о том, что, наряду с генетическими различиями исследованных видов, их температурные адаптации имеют и фенотипическую составляющую.

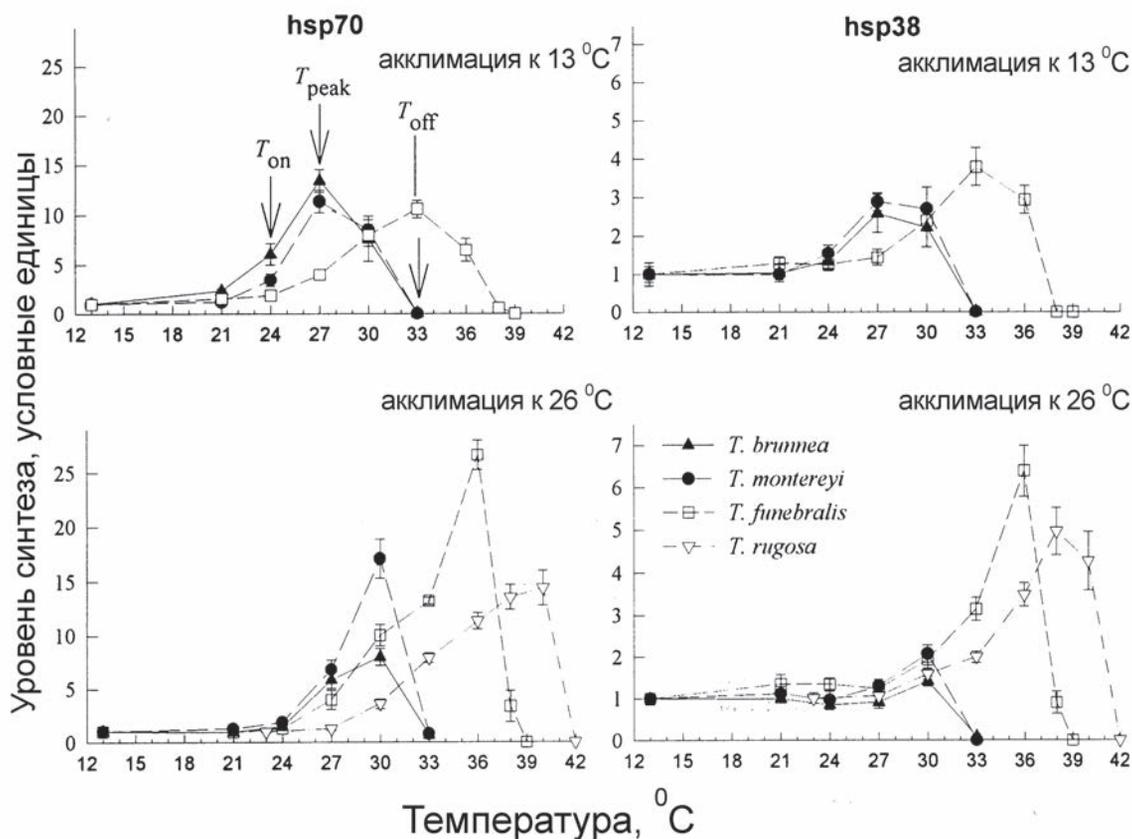


Рис. 1. Динамика синтеза hsp70 и hsp38 в изолированных жабрах моллюсков четырех видов рода *Tegula* (с изменениями по: Tomanek and Somero, 1999).

Fig. 1. Induction profiles for synthesis of hsp70 and hsp38 in isolated gills of four species of snails belonging to the genus *Tegula* (modified after Tomanek and Somero, 1999).

Вторым из наиболее распространенных методов исследования стрессовых белков служит так называемый *иммуноблоттинг* или *вестернблоттинг*. С его помощью выявляются малейшие (пикограммы: 10^{-12} г) изменения содержания белка. Метод основан на электрофорезе белков, их последующем переносе на нитроцеллюлозную мембрану и инкубации со специфическими антителами. В настоящее время при наличии специализированных компаний, производящих специфические антитела к стрессовым белкам, использование этого метода становится относительно недорогим, что и привело к все большему его распространению. Результаты, получаемые с помощью этого метода, будут проиллюстрированы позже, когда пойдет речь о собственных исследованиях авторов статьи.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИИ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ

Подавляющее большинство работ, так или иначе касающихся стрессорных белков, выполнено на белках теплового шока. Многочисленными исследованиями установлено, что существует несколько семейств этих белков, различающихся по молекулярной массе: от 15–30 до 80–110 кДа (обзоры Marimoto et al., 1994; Feder and Hofmann, 1999; Маргулис и Гужова, 2000, 2009; Hochachka and Somero, 2002; Ермилова, 2007 и др.). Белки теплового шока весьма консервативны. Наиболее консервативен hsp70. Так, например, гомология между этим белком у дрозофилы и человека достигает 73%. Спектр белков теплового шока или,

говоря иначе, представленность БТШ с разной молекулярной массой, в значительной степени зависят от вида исследуемого объекта и от того, какой фактор индуцирует экспрессию этих белков.

К семейству стрессорных белков с молекулярной массой около 70 кДа принадлежат как конститутивные белки, постоянно присутствующие в клетках, так и индуцибельные белки, синтезируемые при стрессорных воздействиях. Структура белков этого семейства наиболее изучена среди других стрессорных белков. На *N*-концевом участке молекулы hsp70 расположен домен, связывающий АТФ. Этот домен имеется у всех членов данного семейства. Он эволюционно консервативен. Здесь же расположен участок взаимодействия с ионами кальция и белками помощниками (кошаперонами). У некоторых стрессорных белков на *N*-конце имеется сайт, обеспечивающий их проникновение в митохондрии, эндоплазматический ретикулум и ядро клетки. *C*-концевой участок молекулы hsp70 отличается значительной вариабельностью. Эта часть молекулы стрессорных белков данного семейства обеспечивает распознавание субстрата, узнавая гидрофобные участки молекулы белка, и связь с поврежденными и (или) синтезированными *de novo* полипептидами.

Последнее обстоятельство крайне важно. Дело в том, что молекулы нативных белков имеют такую структуру, при которой их гидрофобные части прикрыты со всех сторон гидрофильной оболочкой. Молекулы вновь синтезированных, стрессповрежденных или мутантных белков имеют на поверхности гидрофобные группы аминокислот. По ним стрессорные белки и распознают денатурированные белковые молекулы или молекулы вновь синтезированных белков, еще не имеющих нативной конформации. Основная функция, которую осуществляют стрессорные белки (молекулярные шапероны), как раз и заключается в том, чтобы «вылечить» поврежденные стрессорным воздействием белки с ненативной структурой или вновь синтезированные белки, еще не имеющие нативной структуры молекул. В зависимости от того, удастся выполнить эту задачу или нет, таким белкам уготована разная судьба: либо их структура будет восстановлена, либо они будут уничтожены. В последнем случае такие белковые молекулы подвергаются протеолизу с помощью белка убиквитина и протеолитических ферментов (рис. 2).

Межмолекулярные взаимодействия образующихся полипептидов, приводящие к образованию их нефункциональных агрегатов, могут вызывать повреждение или гибель клеток. Таким образом, одна из ролей шаперонов заключается в том, чтобы предотвращать неадекватные взаимодействия между взаимно притягательными, геометрически комплиментарными поверхностями молекул белка.

Наиболее убедительными доказательствами в пользу предположения о том, что индуктором синтеза стрессорных белков является появление денатурированных и (или) неверно синтезированных белков (Pelham, 1986), служат результаты экспериментов с ооцитами лягушки, в которые путем микроинъекции вводили денатурированные белки и гены hsp. Показано (Anantham et al., 1986), что индукцию этих генов вызывала только инъекция полипептидов с измененной структурой. Микроинъекция нативных белков такой реакции не вызывала. Эти факты не только подтвердили справедливость гипотезы Пелхэма (Pelham, 1986), но и послужили фундаментом современных представлений о том, что стрессорные белки выполняют роль молекулярных шаперонов, сопровождающих белковые молекулы и обеспечивающих сохранение их структуры и способности функционировать.

Согласно имеющимся представлениям молекулярные шапероны действуют по крайней мере двумя различными путями.

1. Шапероны семейства hsp70 (вместе с hsp90, кошапероном HdJ-1 и АТФ) прикрепляются к несвернутым белкам в области гидрофобного сайта, защищая таким образом эти участки молекул от взаимодействия с другими нескрученными протеинами и предотвращая их агрегацию. После использования энергии, поступающей со стороны АТФ, шапероны отсоединяются хотя бы временно от полипептида, который получает возможность скручиваться в нативную молекулу. Связывание и освобождение могут повторяться неоднократно. При этом в каждом таком цикле расходуется АТФ. Если же белок уже образовал агрегат, то шапероны не могут его спасти, восстановив нативную конформацию.

2. Другие молекулярные шапероны (hsp60 и грр и др.), образующие многофункциональные комплексы из большого числа индивидуальных субъединиц, транспортируют белковые молекулы

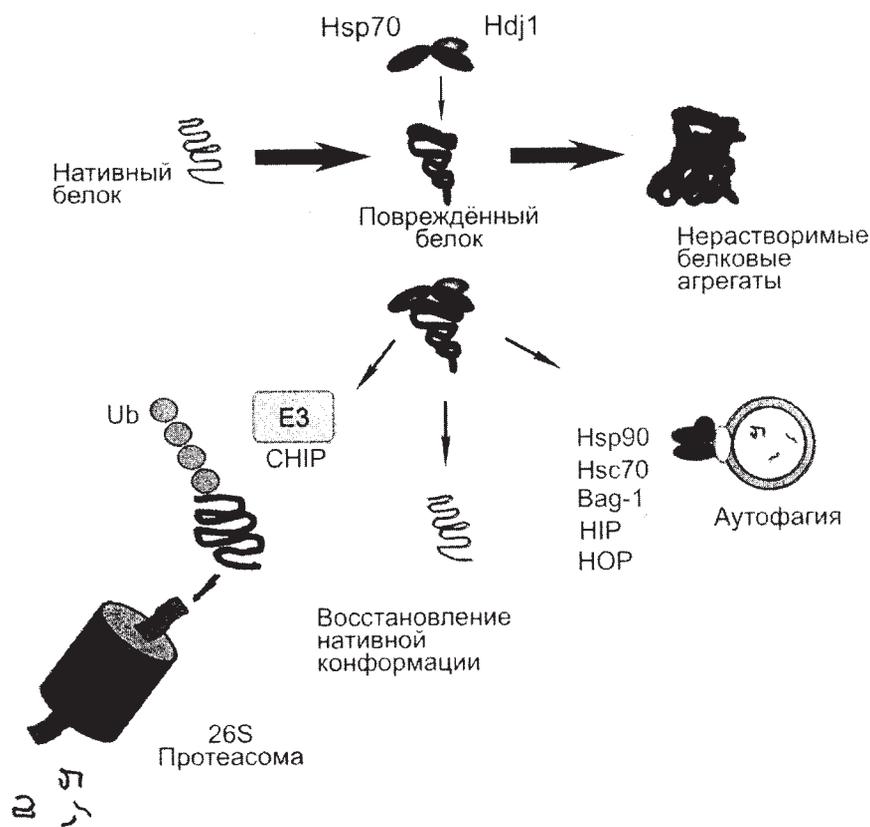


Рис. 2. Схема работы hsp70 в эукариотической клетке по восстановлению активной структуры поврежденных и вновь синтезированных полипептидов или удалению белков, не подлежащих восстановлению (Маргулис и Гужова, 2009).

Fig. 2. A model for hsp70 activity either to restore the active structure of damaged and newly synthesized polypeptides or to remove proteins which are not liable to restoration.

в клеточные компартменты. Там, в относительной изоляции от других несвернутых протеинов, происходит свертывание белковой молекулы. Несвернутый протеин приобретает разные конформации до тех пор, пока не достигнет термодинамически устойчивой конформации нативного белка. Отсутствие других протеинов в окружающей среде устраняет опасность случайных агрегаций. При этом, как и в первом случае, требуется энергия, получаемая в результате расщепления молекул АТФ.

Обсуждение представлений о структуре и функции стрессовых белков будет неполным, если не рассмотреть вопроса о том, как регулируется экспрессия этих белков в клетке.

Хотя в этом вопросе до сих пор нет достаточной ясности, но согласно имеющимся данным в общих чертах ситуация выглядит следующим образом (рис. 3).

В обычной (нестрессовой) ситуации hsp70 содержится в цитоплазме в виде мультишаперонного комплекса вместе с hsp90 и hsp40, ассоциированного

с хит-шок-фактором (HSF-1). При стрессорном воздействии, когда начинают появляться денатурированные белки, этот комплекс диссоциирует на три молекулярных шаперона (hsp40, hsp70 и hsp90) и HSF-1. Шапероны присоединяются к поврежденным белкам, предотвращая образование белковых агрегатов и сохраняя возможность восстановления их нативной конформации. Мономеры HSF-1 мигрируют в ядро, где в виде тримеров соединяются с хит-шок-элементами (HSE) молекулы ДНК. Фосфорилирование этих тримеров приводит к транскрипции соответствующих генов, кодирующих синтез стрессорных белков. В результате концентрация последних начинает увеличиваться. Как только их уровень становится избыточным, свободные молекулы через систему обратной связи блокируют транскрипцию генов hsp. Свободные стрессорные белки диффундируют в цитоплазму, где происходит восстановление мультишаперонных комплексов, и все возвращается к исходному состоянию.

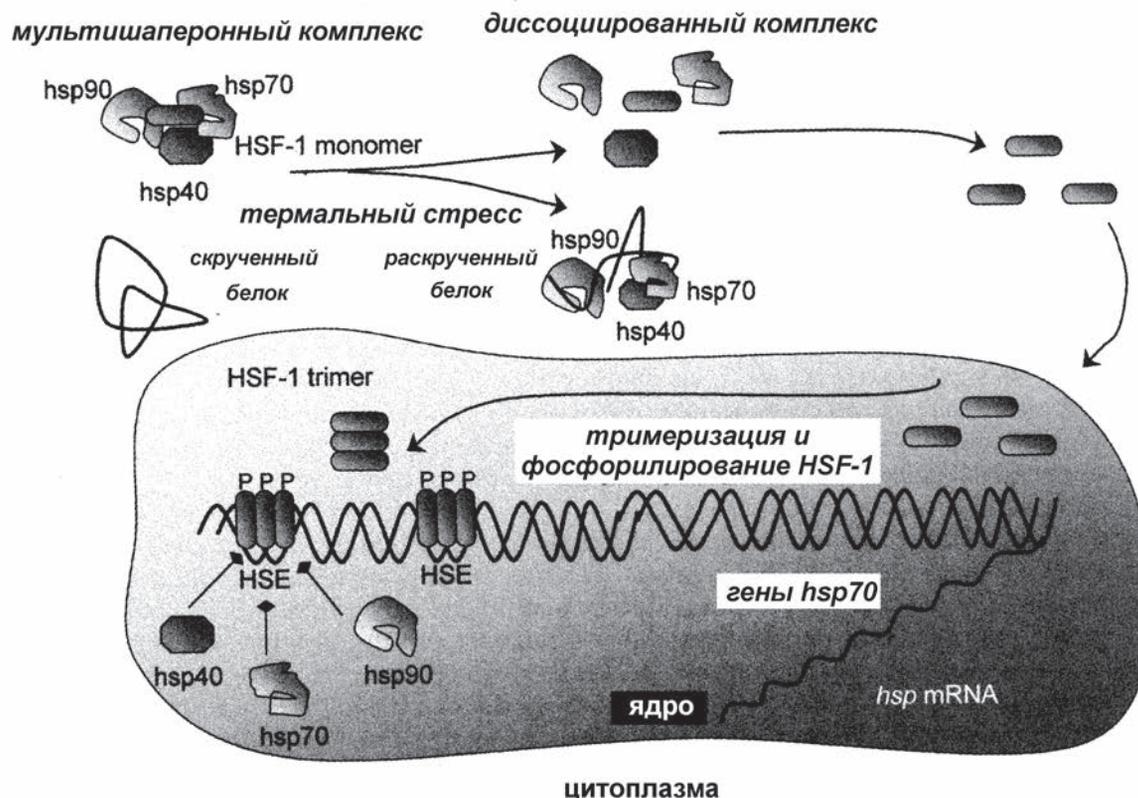


Рис. 3. Схема регуляции экспрессии hsp70 (с изменениями по: Morimoto and Santoro, 1998).

Fig. 3. A model for regulation of hsp70 expression (modified after Morimoto and Santoro, 1998).

ФАКТОРЫ, ИНДУЦИРУЮЩИЕ СИНТЕЗ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ

Как уже отмечалось выше, наиболее изученным фактором экспрессии стрессорных белков является тепловой шок, т.е. нагрев клеток, тканей или всего организма до температуры, превышающей таковую среды обитания. В силу этого стрессорные белки чаще всего именуется *белками теплового шока*. Они появляются через 1–3 часа после начала нагрева, а их повышенное содержание в клетках сохраняется в течение длительного периода: нескольких суток (Morimoto et al., 1994; Маргулис и Гужова, 2000; Podlipaeva, 2001 и др.). Однако нагрев – не единственный фактор, индуцирующий синтез этих белков. Имеющиеся литературные данные свидетельствует о том, что индукторами стрессорных белков являются

и многие другие факторы (Feder and Hofmann, 1998; Маргулис и Гужова, 2000; Hochachka and Somero, 2002 и др.). К их числу относятся самые разные агенты: факторы, меняющие структуру белков (повышенная температура, органические растворители, тяжелые металлы, радиация, окислительный стресс, магнитное поле и др.); патогенные факторы (амфетамин и различные вирусы); индукторы дифференцировки (например, форболовый эфир); ингибиторы пролиферации (например, простогландины) и ее индукторы (инсулин, гормон роста, интерлейкин-2) и многие другие. Все эти факторы, независимо от механизма действия, вызывают появление в клетке белков с ненативной структурой вследствие денатурации либо нарушения процессов синтеза и последующей упаковки белковых молекул.

СТРЕССОРНЫЕ БЕЛКИ И СОЛЕННОСТНЫЕ АДАПТАЦИИ

Сравнение количества исследований, характеризующих индукцию стрессорных белков в ответ на действие нагрева и осмотического фактора, показывает, что первые превосходят вторые примерно на три порядка. Но дело даже не в том, что работ второго направления мало. До сих пор не удается дать четкий ответ о том, вызывается ли появление в клетках стрессорных белков изменениями осмолярности внешней среды или солёности воды и концентрации различных осмотически активных веществ (ионов и органических осмолитов). Причина такой ситуации заключается в том, что данные разных источников информации весьма противоречивы.

Имеются данные, безусловно, указывающие на изменения уровня стрессорных белков в ответ на изменения солёности окружающей среды. Перечислим некоторые из них.

В работах, выполненных на археях, бактериях и растениях, было обнаружено накопление стрессорных белков при засолении среды обитания и (или) изменениях осмолярности культуральной жидкости (Pareek et al., 1997; Martin et al., 1999; Hochachka and Somero, 2002).

В клетках изолированных жабр рыб *Gillichthys mirabilis* наблюдались изменения экспрессии hsp70, вызванные осмотическим шоком (Kultz, 1996).

Органические осмолиты, добавленные в среду инкубации клеток почки млекопитающих, вызывали слабую индукцию hsp70 (Petronini et al., 1993). Более выраженной была индукция стрессорных белков в клетках культуры тканей почки млекопитающих (Cohen et al., 1991) и фибробластов цыпленка (Petronini, 1987) в ответ на изменения концентрации неорганических ионов.

В клетках простейших при изменении солёности индуцируется тот же белок hsp70, что и при нагреве. У пресноводных амёб *Amoeba proteus* после длительной (14 суток) акклимации к слегка повышенной (2‰) солёности уровень конститутивных hsp70 в клетках повышался по сравнению с амёбами, содержащимися в пресной воде (контроль). Такая же закономерность наблюдалась и у пресноводных инфузорий *Paramecium jenningsi* (Плеханов и др., 2006).

Эвригалинные инфузории *Paramecium nephridiatum* характеризуются ярко выраженным от-

ветом своей шаперонной системы на изменения солёности среды, причем этот ответ носит асимметричный характер в отношении расхода / синтеза hsp70 после солёностного шока в зависимости от направления изменений солёности. Перенос инфузорий из воды солёностью 10‰ в пресную воду вызывал заметную индукцию hsp70, тогда как их перенос из пресной воды в солёную характеризовался, наоборот, некоторым снижением уровня hsp70 по сравнению с контролем (Смуров и др. 2007). В немногочисленных экспериментах на морских моллюсках было обнаружено, что у *Potamocorbula amurensis* (залив Сан Франциско, Калифорния) уровень стрессорного белка 70кДа был значительно ниже при солёности 0.3‰, чем при 27‰ (Werner and Hinton, 2000). Показано также (Werner, 2004), что у этих моллюсков снижение солёности среды угнетало индукцию hsp70, вызванную повышением температуры.

Мидии *Mytilus edulis* из Северного моря (29‰) имели более высокий уровень hsp70 в тканях, чем у моллюсков того же вида из Балтики, где они обитали при более низкой солёности (6‰) (Brown et al., 1995).

Существуют, однако, примеры отсутствия изменений уровня содержания hsp70 в ответ на изменения солёности окружающей среды. Так, в экспериментах с инфузориями *Tetrachymena pyriformis*, акклимированными к 0, 2 и 10‰, показано (Подлипаева и др., 2008), что конститутивный уровень hsp70 во всех случаях был практически одинаков.

Изменения солёности не вызывали индукцию стрессорных белков у этих инфузорий, занимающих по своим экологическим характеристикам промежуточное положение между пресноводными *Paramecium jenningsi* и эвригалинными *P. nephridiatum*.

Не была обнаружена индукция стрессорных белков при переносе сцифистом сцифомедузы *Aurelia aurita* из воды солёностью 19–21‰ в морскую воду более низкой (5‰) и высокой (35‰) солёности, хотя в ответ на изменения температуры они выявлялись (Black and Bloom, 1984).

И, наконец, у мидий *Mytilus galloprovincialis* из Средиземного моря уровень содержания белков семейства БТШ70 не претерпевал изменений при помещении моллюсков в воду различной солёности (Li et al., 2009).

Наиболее вероятным объяснением того, что в ряде перечисленных выше исследований не было

обнаружено индукции стрессовых белков при изменениях солености среды, являются, на наш взгляд, два следующих обстоятельства.

Во-первых, в ряде работ сравнивалось содержание стрессорных белков у организмов, обитающих в водоемах (или частях водоемов), отличающихся по солености воды. В этом случае исследованные организмы были приспособлены к существованию при той или иной солености. Не удивительно, что подобные условия среды обитания не вызывали у них стресса и соответствующей реакции со стороны системы, регулирующей содержание стрессорных белков.

Во-вторых, в отдельных работах, где не было зарегистрировано изменение содержания стрессорных белков в ответ на изменения солености среды (Black and Bloom, 1984; Li et al., 2009), были осуществлены так называемые *острые опыты*. Исследуемые организмы не подвергались длительным действиям измененной солености. Продолжительность воздействия не принималась во внимание, несмотря на то, что она в ряде случаев имеет определяющее значение. Об этом уже упоминалось выше при обсуждении данных о динамике содержания белков теплового шока в клетках моллюсков рода *Tegula* (см. рис. 1). Кроме того, значимость продолжительности акклимации к различным абиотическим факторам среды, в том числе и солености, при изучении фенотипических адаптаций показана многочисленными исследованиями. Принято считать, что для завершения функциональных преобразований в ответ на изменения факторов среды в пределах толерантного диапазона требуется, как правило, от нескольких суток до одного месяца (Schlieper, 1960; Хлебович и Бергер, 1975; Хлебович, 1981, 2012; Бергер, 1986; Berger and Kharazova, 1997 и др.). Исходя из этого, есть все основания предполагать, что в тех случаях, когда авторами ставились только «острые» опыты, полученные результаты не дают достаточных оснований для утверждения о том, что исследованные организмы не реагируют на изменения солености изменениями содержания стрессорных белков.

Справедливость последнего предположения подтверждается результатами экспериментов авторов на эвригаллиных моллюсках *Mytilus edulis* из Белого моря (Подлипаева и Бергер, в печати). В этой работе анализировалось содержание белка теплового шока 70 кДа в жаберном эпителии

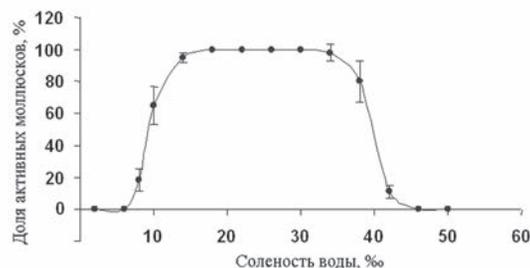


Рис. 4. Изменение числа активных моллюсков в воде различной солености (Подлипаева и Бергер, в печати). На рисунке приведены средние арифметические величины и 95%-ные доверительные интервалы.

Fig. 4. Changes of active molluscs in water of different salinity (Podlipaeva and Berger, in press). The figures give the mean arithmetic values and 95% confidence intervals.

мидии из Белого моря как при длительной акклимации моллюсков к изменениям солености, так и при кратковременных соленостных воздействиях.

Работа была начата с определения диапазона соленостной толерантности мидий. Для этого исследовалось изменение количества подопытных моллюсков, сохраняющих фильтрационную активность в воде различной солености. Показано, что диапазон солености, в котором все моллюски были активны, достаточно широк: от 14 до 35‰ (рис. 4).

Методом иммуноблоттинга с помощью антител к белку hsp70 в клетках жаберного эпителия контрольных (24–26‰) мидий были выявлены конститутивные стрессорные белки с молекулярной массой около 70 и 40 кДа (рис. 5, дорожка 1), что согласуется с данными о наличии аналогичных конститутивных стрессорных белков у моллюсков рода *Tegula* (см. рис. 1).

При длительной (11–14 суток) акклимации мидий как к пониженной (14‰), так и к повышенной солености (35‰), не выходящей за пределы диапазона их соленостной толерантности (рис. 4), было обнаружено повышение содержания hsp70 в клетках жаберного эпителия (рис. 5, дорожки 2, 3). Результаты этих опытов свидетельствуют об участии стрессовых белков hsp70 в соленостных адаптациях осмоконформеров, к каковым принадлежит мидия.

Кроме того, в воду различной солености (14, 24–26 (контроль) и 35‰) помещали изолированные жабры моллюсков на 1, 3 и 24 ч. При этом отмечалось повышение уровня hsp70 после пре-

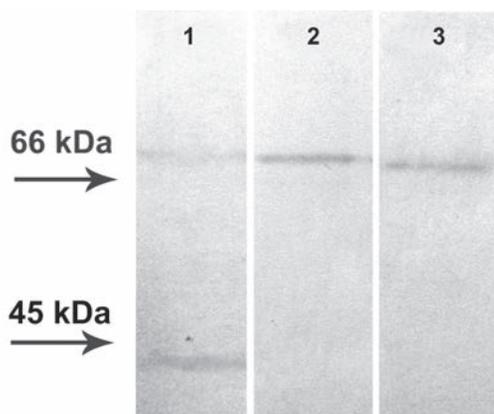


Рис. 5. Белки теплового шока в клетках жаберного эпителия мидий *Mytilus edulis* у контрольных моллюсков и у моллюсков после длительной акклимации (Подлипаева и Бергер, в печати). Дорожки: 1 – контрольные моллюски, содержавшиеся при солёности 24–26‰; 2 и 3 – 14 суток акклимации к воде солёностью 14 и 35‰ соответственно.

Fig. 5. Heat shock proteins in gill epithelium cells of *Mytilus edulis* in control mussels and in mussels after long-term acclimation (Podlipaeva and Berger, in press). Lanes: 1 – control mussels, maintained in control salinity (24–26‰); 2 and 3 – 14 days acclimation in 14 and 35‰ respectively.

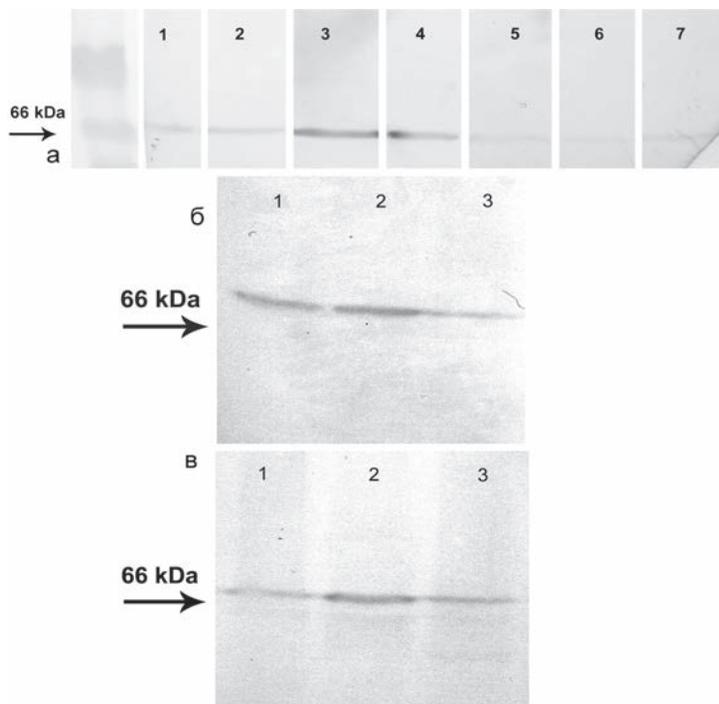


Рис. 6. Белки теплового шока в клетках жаберного эпителия мидий *Mytilus edulis* после пребывания жаберных препаратов в контрольных условиях и при стрессовых солёностях. Эксперименты 2010 (а) и 2011 (б и в) гг. (Подлипаева и Бергер, в печати). а – дорожки: 1 – изолированные жабры мидий после пребывания 24 ч в воде контрольной солёности (24–26‰); 2–4 – изолированные жабры мидий, после пребывания в воде солёностью 14‰ в течение 1, 3 или 24 ч соответственно; 5–7 – изолированные жабры мидий после пребывания в воде солёностью 35‰ в течение 1, 3 и 24 ч соответственно; б – 3 ч в воде контрольной солёности 24–26‰ (дорожка 1), в воде солёностью 14‰ (дорожка 2) и в воде солёностью 35‰ (дорожка 3); в – 24 ч в воде контрольной солёности 24–26‰ (дорожка 1), в воде солёностью 14‰ (дорожка 2) и в воде солёностью 35‰ (дорожка 3).

Fig. 6. Heat shock proteins in the cells of gill epithelium of *Mytilus edulis* after maintaining their isolated gills in control conditions and in stress salinities. Experiments of 2010 (a) and 2011 (b and c) yy. (Podlipaeva and Berger, in press) a – Lanes: 1 – isolated mussel gills after 24 hrs maintenance in control (24–26‰) salinity; 2–4 – isolated mussel gills after their maintenance in 14‰ during 1, 3 and 24 hrs, respectively; 5–7 – isolated mussel gills after their maintenance in 35‰ during 1, 3 and 24 hrs, respectively б – 3 hrs in control salinity 24 – 26‰ (lane 1), in 14‰ (lane 2), in 35‰ (lane 3) c – 24 hrs in control salinity 24–26‰ (lane 1), in 14‰ (lane 2), in 35‰ (lane 3).

бывания жаберных препаратов в воде солёностью 14‰ в течение 3 и 24 ч (рис. 6, а, дорожки 1, 3, 4). При меньшем сроке (1 ч) воздействия воды той же солёности эффекта не было (рис. 6, а, дорожки 1 и 2). При солёности 35‰ увеличения содержания hsp70 в клетках жаберного эпителия не наблюдалось. Отмечено даже некоторое понижение уровня hsp70 по сравнению с контролем, особенно заметное после 3-часового солёностного шока (рис. 6, а, дорожки 1 и б). Эти опыты проводили в 2010 г. При их повторении в 2011 г. были получены аналогичные результаты (рис. 6, б, в).

Результаты экспериментов, выполненных на изолированных жаберных препаратах, подвергавшихся действию различной солёности, позволяют сделать по крайней мере два вывода. Во-первых, о том, что шаперонная система исследованных моллюсков реагирует на изменения солёности среды и способна функционировать автономно у изолированных жаберных препаратов. Этим лишним раз подтверждается автономность адаптаций клеток моллюсков и других осмоконформеров к изменениям солёности среды, которая присуща

различным клеточным механизмам: регуляции содержания неорганических ионов, волюморегуляции клеток и системе адаптивных преобразований синтеза РНК и белка (Наточин и Бергер, 1979; Бергер, 1986; Berger and Kharazova, 1997).

Во-вторых, полученные данные свидетельствуют о том, что адаптивные изменения содержания стрессорных белков в клетках мидии в зависимости от градиента солености происходят за разное время. На них требовалось не менее 3 ч при помещении изолированных жаберных препаратов мидий в воду соленостью 14‰. При повышенной солености (35‰) эффекта не было и при больших экспозициях (24 ч), хотя при длительной акклимации (11–14 суток) моллюсков к такой солености содержание hsp70 увеличивалось.

Эти данные наших экспериментов и сделанные на их основании выводы соответствуют результатам работы А.Д. Харазовой (1999), выполненной ранее на изолированных жабрах мидии. Ею обнаружено, что индукция hsp70 при изменениях солености среды происходила за разное время в зависимости от того, насколько соленость среды отличалась от контроля (25‰). При ее снижении до минимальных значений (5‰) индукция стрессорных белков имела место уже через 1 ч. При солености 18, 14 и 10‰ hsp70 не выявлялись на ранних сроках (от 1 до 6 ч) этих воздействий. Они были обнаружены через 24 ч при 18‰, через 12 ч при 14‰ и через 8 ч при 10‰. В 10%-ном и 14%-ном этаноле такая реакция наблюдалась уже через 1 ч.

Исходя из этих данных, можно ко всему прочему сделать вывод о том, что изменения солености являются относительно мягким воздействием по сравнению с такими стрессорами, как повышенная температура, этанол и многие другие внешние воздействия. Возможно, это является одной из причин того, что в ряде работ, перечисленных выше, не была обнаружена индукция стрессорных белков при изменениях солености.

Таким образом, можно сделать общий вывод о том, что системы регуляции уровня стрессорных белков в клетке участвуют в адаптации к меняющейся солености. Однако в этом случае клеточные реакции часто бывают неоднозначными в зависимости от особенностей исследуемого объекта, а также сроков и величины отклонения измененной солености от нормы. Очевидно, что для проверки правомочности этого заключения необходимы дополнительные данные.

ЛИТЕРАТУРА

- Бергер В.Я. 1986.** Адаптации морских моллюсков к изменениям солености среды. Ленинград: Наука, 214 с.
- Ермилова Е.В. 2007.** Молекулярные аспекты адаптации прокариот. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский университет, 299 с.
- Маргулис Б.А., Гужова И.В. 2000.** Белки стресса в эукариотической клетке. *Цитология*. **42**: 323–342.
- Маргулис Б.А., Гужова И.В. 2009.** Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс. *Цитология*. **51**: 219–228.
- Наточин Ю.В. и Бергер В.Я. 1979.** Ионный состав клеток моллюсков – эволюционный и экологический аспекты. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. **15**: 295–302.
- Плеханов А.Ю., Смулов С.О., Подлипаева Ю.И., Иванова Л.О. и Гудков А.В. 2006.** Белок теплового шока пресноводных простейших и его участие в адаптации к изменениям солености среды обитания. *Цитология*. **48**: 530–534.
- Подлипаева Ю.И. и Бергер В.Я.** Изменения содержания белков теплового шока семейства 70 кДа в клетках жаберного эпителия моллюсков *Mytilus edulis* L. в зависимости от солености среды. *Цитология* (в печати).
- Подлипаева Ю.И., Смулов А.О. и Гудков А.В. 2008.** Изменения уровня содержания белка теплового шока семейства 70 кДа у инфузорий *Tetrahymina pyriformis* в процессе адаптации к изменениям солености среды. *Цитология*. **50**: 619–622.
- Смулов А.О., Подлипаева Ю.И. и Гудков А.В. 2007.** Белок теплового шока семейства Hsp 70 у эвригалинной инфузории *Paramecium nephridiatum* и его участие в адаптации к изменениям солености среды обитания. *Цитология*. **49**: 292–295.
- Харазова А.Д. 1999.** Цитологические основы адаптации морских моллюсков к изменениям солености: Автореферат диссертации доктора биологических наук. СПбГУ. 33с.
- Хлебович В.В. 1981.** Акклимация животных организмов. Ленинград: Наука, 133 с.
- Хлебович В.В. 2012.** Экология особи (очерки фенотипических адаптаций животных). Санкт-Петербург: ЗИН РАН, 143 с.
- Хлебович В.В. и Бергер В.Я. 1975.** Некоторые аспекты изучения фенотипических адаптаций. *Журнал общей биологии*. **36**: 11–25.
- Anantham J., Goldberg A.L. and Voellmy R. 1986.** Abnormal proteins serve as eucaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*. **232**: 522–524.
- Berger V.Ja. and Kharazova A. D. 1997.** Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*. **7**: 1–12.

- Black R.E. and Bloom L. 1984.** Heat shock proteins in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa). *Journ. Exp. Zool.* **230**: 303–307.
- Cohen D.A., Wasserman J. and Gullans S. 1991.** Immediate early gene and HSP70 expression in hyperosmotic stress in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* **261**: 594–601.
- Ellis J. 1987.** Proteins as molecular chaperones. *Nature.* **328**: 378–379.
- Ellis R.G. and van der Vies S.M. 1991.** Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 321–347.
- Feder M.E. and Hofmann G.E. 1999.** Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* **61**: 243–282.
- Hochachka P.V. and Somero G.N. 2002.** Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. *Univ. Press, Oxford*, 466 p.
- Kroger H. 1963.** Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells. *Nature.* **200**: 1234–1235.
- Kultz D. 1996.** Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cells. *Am. J. Physiol.* **271**: 1181–1193.
- Li H., Toubiana M., Monford P. and Roch P. 2009.** Influence of temperature, salinity and *E. coli* tissue content of immune gene expression in mussel: results from a 2005–2008 survey. *Develop. Compar. Immunol.* **33**: 974–979.
- Martin D.D., Ciulla R.A. and Roberts F.A. 1999.** Osmoadaptation in Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1815–1823.
- Morimoto R.I., Tissieres A. and Georgopoulos C. 1994.** Heat Shock Proteins: Structure, Function and Regulation. Cold Spring Harbor Lab. Pres., New York, 534 p.
- Morimoto R.I. and Santoro M.G. 1998.** Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotech.* **16**: 833–838.
- Pareek A., Singla S.L., Kush A.K. and Grover A. 1997.** Distribution patterns of HSP90 in rice. *Plant. Sci.* **125**: 221–223.
- Pelham H.R.B. 1986.** Speculation on the function of major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell.* **46**: 959–961.
- Petronini P., Tramacere M., Mazzini A., Piedimonte G., Silvotti L. and Borghetti A. 1987.** Hyperosmolarity-induced stress proteins in chick embryo fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* **172**: 450–462.
- Petronini P.G., De Angelis W., Borghetti A. and Wheeler K. 1993.** Effect of betaine on HSP70 expression and cell survival during adaptation to osmotic stress. *Biochem. J.* **293**: 553–558.
- Podlipaeva Y.I. 2001.** Heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. *Protistology.* **2**: 123–129.
- Ritossa F. 1962.** A new puffing pattern induced by heat-shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* **18**: 571–573.
- Schlieper C. 1960.** Genotypische und phänotypische Temperatur und Salzgehalts Adaptationen bei marinen Bodenvertebraten der Nord und Ostsee. *Kieler Meeresforsch.* **16**: 180–185.
- Tissieres A., Mitchell H.K. and Tracy U.M. 1974.** Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* **84**: 389–398.
- Tomanek L. and Somero G.N. 1999.** Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: Implication for limits of thermotolerance and biogeography. *J. Exp. Biol.* **202**: 2925–2936.
- Tomanek L. and Somero G.N. 2000.** Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different tidal heights. *Physiol. Biochem. Zool.* **73**: 249–256.
- Werner I. 2004.** The influence of salinity on heat shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Mar. Environ. Res.* **58**: 803–807.
- Werner I. and Hinton D.E. 2000.** Spatial profiles of hsp70 proteins in Asian Clam *Potamocorbula amurensis* in Northern San Francisco Bay may be linked to natural rather than anthropogenic stressors. *Mar. Environ. Res.* **50**: 379–384.