

УДК 577.112.7

Д.С.Прокофьева (4 курс, каф. ФХОМ), И.В.Гужова, к.б.н., с.н.с. ИЦ РАН

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 В MYTILUS EDULIS, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ГИПЕРТЕРМИИ И ПОНИЖЕННОЙ СОЛЕННОСТИ

Клеточный ответ на неблагоприятные внешние воздействия включает временное увеличение экспрессии белков, которые известны как белки теплового шока или БТШ. Все БТШ характеризуются наличием шаперонной активности и протективного действия по отношению к живой клетке. Шаперонная активность – это способность узнавать и связывать поврежденные или вновь синтезированные белки и полипептиды.

Наиболее консервативным и хорошо изученным белком семейства БТШ является БТШ70. В нормальных условиях его функция как АТФ-зависимого молекулярного шаперона заключается в организации укладки вновь синтезированных полипептидов, сборки мультибелковых комплексов, транспорта белков через клеточные мембраны. В стрессовых условиях усиленная экспрессия БТШ70 повышает способность клеток противостоять растущему количеству неправильно уложенных или денатурированных белков.

Как и у остальных членов семейства БТШ, у БТШ70 была обнаружена важная особенность, которая заключается в том, что увеличение количества этого белка в клетке в ответ на незначительное воздействие способно защитить клетку от последующего «летального» стимула. Специалисты полагают, что это свойство может стать основой новых терапевтических стратегий, направленных на предупреждение или лечение заболеваний человека.

Совсем недавно у исследователей появился интерес к цитопротективной роли, которую БТШ играют в моллюсках. Эти животные известны тем, что они регулярно подвергаются действию разнообразных стрессорных стимулов окружающей среды и обладают высокой устойчивостью к ним. В связи с этим возникают определенные предположения. Возможно, мидии обладают какой-то уникальной системой защиты от стресса или присущие всем живым организмам механизмы адаптации у них каким-то образом модифицированы. Некоторые моллюски, преимущественно устрицы и мидии, используются в качестве индикаторов для биомониторинга, и возможная польза от использования БТШ70 в этом же качестве также установлена. Очень заманчиво было бы объединить эти два утверждения и начать использовать БТШ70 в качестве биомаркера загрязнений окружающей среды в составе организмов, также высокочувствительных к этим загрязнениям. Чтобы достигнуть «союза» между мидиями и БТШ70 необходимо провести многочисленные исследования характера изменения его экспрессии в этих моллюсках под воздействием разнообразных стимулов.

Объектом нашего исследования стала обыкновенная съедобная мидия (*Mytilus edulis*), обитающая на сублиторали. Она является одним из наиболее широко распространенных видов двустворчатых моллюсков. Обыкновенная мидия - эвригалинная форма, т.е. выносит значительные колебания солености и опреснение до 5 ‰. Мидия также очень эвритермна, т.е. может выносить значительные колебания температуры.

Мидии - активные фильтраторы. Популяция мидиевой банки может профильтровать за сутки до 280 кубометров воды. В связи с этим из всех тканей мы решили подвергнуть особо пристальному вниманию жабры мидий, так как именно эта ткань преимущественно контактирует с морской водой, пропуская ее через себя, следовательно, на любое изменение характеристик этой воды жабры должны были отреагировать в первую очередь.

Для проведения опыта по гипертермии мидии помещали в морскую воду, нагретую до температуры 25⁰С, на 1 час, а затем возвращали в воду с исходной температурой в 10⁰С, которая является оптимальной температурой воды для мидий в это время года. Пробы отбирали по прошествии определенных промежутков времени после воздействия. Для приготовления проб использовали следующие ткани: жабры, нога, аддуктор.

Опыты по изменению солености состояли в том, что мидии помещали в воду со значениями солености 10‰ и 14‰ на сроки 1, 4, 8, 12, 24, 48 часов. По прошествии указанных промежутков времени часть животных возвращали в условия нормальной солености (25‰) на 2 и 5 часов. Ткани брали на анализ на всех этих точках, то есть через 1, 4, 8, 12, 24, 48 часов пребывания моллюсков в условиях пониженной солености и через 2 и 5 часов пребывания мидий в нормальных условиях после снятия стресса. В опыте с соленостью 10‰ на точках 8 и 24 часа пребывания мидий при пониженной солености помимо жабр, как было сделано в остальных опытах по изменению солености, отбирали на исследование такие ткани как нога, аддуктор, мантия и гепатопанкреас.

Каждую пробу готовили из трех отдельных животных и выравнивали по общему белку. Затем проводили разделение белков в 11% полиакриламидном геле в присутствии додецила сульфата натрия с последующим иммуноблоттингом. Полученные блоты проявляли в темной комнате с помощью метода усиленной хемилюминесценции.

В ходе проделанной работы были получены следующие результаты. Тепловое воздействие привело к увеличению количества БТШ70 в жабрах мидий, в то время как в остальных анализируемых тканях уровень БТШ70 не изменился. Кроме того, в жабрах прослеживалась тенденция к накоплению БТШ70 во времени.

В опытах с изменением солености наблюдалась одинаковая картина для обоих значений солености. Снижение солености приводило к уменьшению количества БТШ70. Однако после определенного времени пребывания мидий в воде с нормальной соленостью уровень БТШ70 приближался к контрольному. Выше изложенное относится только к жабрам. В остальных тканях уровень БТШ70 не изменялся.

Были подтверждены данные, полученные нашими коллегами на другом подвиде этих моллюсков [1], о том, что эти животные? подобно всем остальным эукариотическим организмам? отвечают на гипертермию повышением количества БТШ70. Увеличение количества изучаемого белка только в жабрах возможно наблюдалось из-за того, что они оказались наиболее чувствительными к изменениям окружающей среды, к тому же, выбранная для стресса температура скорее всего не была оптимальной (была ниже, чем требовалось).

Характер изменения содержания БТШ70 в опытах с соленостью может быть объяснен с точки зрения предположения, выдвинутого нашими зарубежными коллегами [2]. Их гипотеза заключается в существовании даун-регуляции в отношении БТШ70 со стороны соленостного стимула.

Исследования проводили на базе биостанции «Картеш» Зоологического института, которая находится на мысе Картеш, губа Чула, Кандалакшский залив Белого моря.

Работа была выполнена при содействии заведующего лабораторией защитных механизмов клетки НИИ Цитологии РАН Б.А. Маргулиса, начальника Беломорской биостанции ЗИН РАН В.Я. Бергера, заведующей кафедрой цитологии и гистологии СПбГУ А.Д.Харазовой.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Piano A., Valbonesi P., Fabbri E. 2004. Cell Stress & Chaperones, 9 (2), 134-142.
2. Lyons et al. 2003. Marine Environmental Reseach, 56, 585-597.