

Аннотированный отчет
о выполнении 1 - 4 этапов Государственного контракта
№ 16.740.11.0607 от 31 мая 2011 г.,

выполняемого в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.1 «Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук»

Тема проекта: «Индукцированные изменения в протеоме эндемичных беспозвоночных озера Байкал - поиск перспективных маркеров стрессовых состояний гидробионтов».

Одним из перспективных подходов для оценки стрессовых состояний организмов является протеомный подход, позволяющий выделить группы белков, которые возможно будет применить в качестве эффективных стресс-маркеров. Преимуществом протеомного подхода является то, что он позволяет выявить как отдельные биомаркеры, специфичные для конкретного стрессового воздействия, так и целые их комплексы, включающие в себя взаимосвязанные метаболические пути. При использовании протеомных биомаркеров должны быть учтены особенности выбранных механизмов у биотест-объекта конкретной экосистемы.

Целью исследования является выявление изменений в протеоме байкальских эндемичных беспозвоночных, индуцированных воздействием стрессовых факторов среды, а также анализ перспектив их использования в качестве маркеров стрессовых состояний гидробионтов.

Объектами данного исследования выбраны представители наиболее многочисленной по видовому составу фаунистической группы Байкала - амфиподы (Amphipoda, Crustacea), которые представлены в озере более чем 250 эндемичными видами, обитающими в широком диапазоне условий среды. Помимо изучения влияния стрессовых воздействий на протеом у байкальских амфипод, целесообразно провести для сравнения изучение и палеарктических амфипод. Сравнительное исследование байкальских и палеарктических организмов необходимо для выявления специфических особенностей байкальских эндемиков, а также для более полного понимания того, как факторы окружающей среды и длительная изоляция могут воздействовать на формирование защитных систем у гидробионтов в целом.

Целью первого этапа исследования являлся выбор и обоснование принятого направления исследований, сбор и первичная обработка экспериментального материала.

В ходе выполнения работ по первому этапу был проведен обзор научно-технической литературы по теме проекта с последующим сопоставлением ожидаемых результатов с аналогичными результатами в мировой науке. Был осуществлен выбор и обоснование принятого направления исследования, составлен план экспериментальных работ. Был проведен комплекс экспериментов по инкубации выбранных тест-объектов в условиях «теплового шока» и последующего восстановления. Материал был зафиксирован методом глубокой заморозки в жидком азоте для последующей биохимической обработки. Была проведена первичная обработка зафиксированного материала для определения оптимальных параметров выделения и очистки белковых образцов амфипод с учетом дальнейшего их разделения методами одно- и двумерного электрофореза. Была проведена оценка влияния методов выделения и очистки белка амфипод на связывания специфических антител с БТШ70 амфипод. Была выбрана оптимальная методика очистки и выделения белков амфипод для последующего

протеомного анализа, включающего одно- и двумерное электрофоретическое разделение и Вестерн-блоттинг.

Целью второго этапа исследования была оценка влияния гипертермии на качественный состав белков у байкальских и палеарктических беспозвоночных.

Для получения данных о качественном составе белков использовали методику одномерного электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). При сопоставлении белковых спектров исследованных видов амфипод отмечено, что для изученных представителей байкальской фауны *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. maackii* характерно наличие белков с молекулярной массой близкой к 80-90 кДа. Данные белки так же представлены у палеарктического вида *G. lacustris*, однако слабо выражены у европейских видов *G. tigrinus*. В целом наибольшие отличия белковых спектров амфипод (в том числе между байкальскими видами) наблюдаются в зоне низкомолекулярных белков.

Различия в белковых спектрах амфипод до и после их экспозиции при повышенных температурах (14, 16 и 18°C), затрагивают белки с молекулярной массой 80-90 кДа. При этом у особей видов *E. verrucosus* и *E. vittatus* при акклимации к 18°C наблюдается снижение содержания, у *E. cyaneus* заметных отличий до и после акклимации к 18 °C не наблюдалась, а у *G. fasciatus* гипертермия вызывает увеличение содержания указанных белков. Полученные результаты, вероятно, свидетельствуют о возможной роли белков с молекулярной массой 80-90 кДа в терморезистентности изученных видов, поскольку отношение к температуре у этих видов различное.

Целью третьего этапа исследования была оценка влияния гипертермии на содержание белков теплового шока (БТШ) у байкальских и палеарктических беспозвоночных.

Для идентификации БТШ использовали такой метод как Вестерн-блоттинг. Белковые пробы для переноса на мембрану предварительно разделяли одномерным электрофорезом.

Как показали результаты межвидовой оценки данных по 16 видам амфипод, для амфипод характерно разное содержание БТШ70 у разных видов амфипод. Для нмБТШ отмечали различия в содержании белка. Кроме того для реликтового байкальского *G. fasciatus* было отмечено отличие в молекулярной массе данного белка по сравнению со всеми остальными исследованными видами. На основании анализа полученных результатов сделано заключение, что различия в уровнях конститутивного синтеза БТШ обоих семейств, несомненно, связаны с адаптивными способностями видов. Наиболее адаптивные виды характеризуются наибольшими уровнями БТШ, даже не находясь в стрессовых условиях. Виды менее адаптивные характеризуются меньшим или минимальными количеством конститутивно-синтезируемых БТШ.

При воздействии температурного стресса (постепенное повышение температуры среды на 1°C в час) происходит изменение содержания БТШ у исследованных байкальских амфипод *E. verrucosus* и *G. fasciatus*, а так же у байкальских гастропод *V. fragilis* и *T. ciliata*. Основная тенденция изменения БТШ при экспозиции амфипод и гастропод – увеличение содержания белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ. В то же время отмечены видовая специфичность изменения содержания БТШ.

Показано, что время начала синтеза БТШ70 при воздействии гипертермии не зависит от терморезистентности амфипод, однако динамика накопления этого белка отражает степень устойчивости выбранных видов к температуре. У исследованных видов байкальских эндемичных гастропод происходит уже в самом начале воздействия (при достижении температуры 9°C).

Целью четвертого этапа исследования была оценка влияния гипертермии (при помощи двумерных белковых профилей) на качественный и количественный состав белков у байкальских и палеарктических беспозвоночных.

В работе показан существенный межвидовой полиморфизм белковых профилей, как в норме, так и при воздействии теплового шока и восстановления. У термочувствительного *E. verrucosus* тепловой шок вел преимущественно к снижению содержания, и даже к исчезновению белковых пятен в отличие от термоустойчивого *E. cyaneus*, что может свидетельствовать о большей степени тепловой деградации и, следовательно, большей температурной чувствительности протеома этого вида, чем у родственного ему термотолерантного *E. cyaneus*.

Обнаруженные в ходе исследования межвидовые различия могут быть интересны для понимания эволюции белковых механизмов термотолерантности на примере близкородственных видов байкальских амфипод. Полученные в ходе исследования белковые паттерны могут служить показателями стрессового состояния амфипод, в частности, снижение, или даже исчезновение крупных белковых пятен может быть рассмотрено в качестве маркера острого температурного воздействия для термочувствительного *E. verrucosus*.

Ряд белков, подвергшихся изменению в условиях стресса, были идентифицированы при помощи методов масс-спектрометрии (Maldi-Tof). Идентифицированные белки играют важную роль в клетке во время стрессового ответа на неблагоприятные воздействия, обеспечивая структурный (белки цитоскелета) и функциональный (белки энергетического обмена) гомеостаз клетки. Молекулярные шапероны обеспечивают правильное сворачивание белковой глобулы и предотвращают протеолитическую деградацию клеточных белков. Белки сигнальной трансдукции и апоптоза (в т.ч. пептидазы) играют важную роль в регуляции клеточного цикла. Таким образом, полученный комплекс белков может служить эффективным биомаркером стрессовых состояний амфипод.

По материалам исследования опубликовано 7 печатных работ, среди которых 3 статьи в рецензируемых научных журналах. Отдельные материалы проекта также были включены в диссертационную работу одного из исполнителей проекта.

Перечень опубликованных научных работ:

1. Павличенко В.В. Стресс-реакции пресноводных амфипод в условиях гипотермии и при интоксикации ксенобиотиками/ В.В. Павличенко. - Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Иркутск, 2012. – 21 с.
2. Bedulina D. S, Evgen'ev M. B., Timofeyev M. A, Protopopova M. V., Garbuz D. D., Pavlichenko V. V., Luckenbach T., Shatilina Zh. M., Axenov-Gribanov D. V., Gurkov A. N., Sokolova I. M., Zatsepina O. G Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal // Molecular ecology, 2013, 22, 1416–1430
3. Кондратьева Е.М., Гурков А.Н., Шахтанова Н.С., Аксёнов-Грибанов Д.В. Влияние постепенного повышения температуры на накопление белков теплового шока у байкальских и палеарктических амфипод // Вестник Иркутского университета/ФГБОУ

ВПО «ИГУ» [редкол.: О.А. Эдельштейн, Г.В. Логунов]. – Иркутск: изд-во ИГУ, 2011. – Вып. 14. – С.2. 47 – 48.

4. Кондратьева Е.М. Применение метода 2D-электрофореза при изучении механизмов стресс-адаптации байкальских амфипод/ Д.С. Бедулина, М.А.Тимофеев // Вестник Иркутского университета/ФГБОУ ВПО «ИГУ» [редкол.: О.А. Эдельштейн, Г.В. Логунов]. – Иркутск: изд-во ИГУ, 2012. – Вып.15. – С.34-35.

5. Бедулина Д. С., Зацепина О. Г., Протопопова М. В., Павличенко В. В., Гарбуз Д. Г., Шатилина Ж. М., Аксенов-Грибанов Д. В., Гурков А.Н., Верещагина К.П., Кондратьева Е.М., Тимофеев М.А., Евгеньев М.Б. Молекулярные механизмы экспрессии и синтеза Бтш70 у двух видов байкальских амфипод, отличающихся по уровню термотолерантности // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 22-27 сентября 2012 г.). - Борок, 2012.- С. 39-43.

6. Protopopova M.V. et al. Inducibility of HSp70 protein but not transcript expression correlates with toxic resistance levels of fresh-water amphipods upon cadmium exposure / Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Shahtanova N.S., Luckenbach T./“Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten der Programme “Michail LomonosovII” und “Immanuel Kant II”- 2011/2012, Moskau, 28-29 April 2012». - 2012. – P. 130 – 132

7. Аксенов – Грибанов Д. В. и др. Определение температурного оптимума эндемичных байкальских и палеарктических амфипод по изменениям показателей клеточного метаболизма /Д. В. Аксенов – Грибанов, Н. С. Шаханова, Ю. А. Лубяга, К. П. Верещагина, А. Н. Гурков, Ж. М. Шатилина, Е. П. Щапова, М. А. Тимофеев // Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 22 - 27 апреля 2013 года). Сборник тезисов. – Пушино, 2013. – С. 507-508.