

**Белки теплового шока в механизмах стресс-адаптации  
у байкальских амфипод  
и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars:  
II. Семейство низкомолекулярные (малые) БТШ**

Ж. М. ШАТИЛИНА<sup>1,2</sup>, Д. С. БЕДУЛИНА<sup>2</sup>, М. В. ПРОТОПОПОВА<sup>2</sup>, В. В. ПАВЛИЧЕНКО<sup>2</sup>,  
Т. П. ПОБЕЖИМОВА<sup>3</sup>, О. И. ГРАБЕЛЬНЫХ<sup>3</sup>, М. А. ТИМОФЕЕВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Байкальский исследовательский центр  
664003, Иркутск, ул. К. Маркса, 5-10  
E-mail: zhasha@mail.ru

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет  
664003, Иркутск, ул. К. Маркса, 2

<sup>3</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

**АННОТАЦИЯ**

Определяли степень участия белков теплового шока семейства низкомолекулярные (малые) БТШ (нмБТШ) в механизмах термо- и токсикорезистентности у пресноводных организмов. Исследовали четыре эндемичных вида оз. Байкал – *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.), *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), *E. vittatus* (Dyb.), *Ommatogammarus flavus* (Dyb) и представителя палеарктической фауны *Gammarus lacustris* Sars. Воздействие температурного фактора оценивали в ходе экспозиции амфипод при температурах 20, 25, 30 °С, токсического фактора – в ходе экспозиции в растворах хлорида кадмия с концентрациями 50, 10, 5, 0,5 и 0,05 мг/л. Отмечена общая для всех исследованных видов тенденция к увеличению содержания белков семейства нмБТШ, при этом наблюдались видоспецифичные особенности характера синтеза исследуемого белка. Сделан вывод об участии нмБТШ в механизмах термо- и токсикорезистентности у исследованных видов амфипод.

**Ключевые слова:** стресс-резистентность, белки теплового шока (БТШ), низкомолекулярные БТШ амфиподы, Байкал, эндемики.

Воздействие стрессовых факторов вызывает активацию защитных механизмов, которые помогают организмам адаптироваться к неблагоприятным условиям. Одним из та-

ких механизмов, действующих на клеточном уровне, является синтез белков теплового шока (БТШ). Существует несколько семейств БТШ, выделенных на основании их молекулярной массы и функций. Одной из самых разнообразных групп БТШ является семейство низкомолекулярных (малых) БТШ (нмБТШ). Семейство нмБТШ объединяет белки с молекулярной массой от 12 до 43 килодальтон (кДа). Общей чертой для всех нмБТШ является наличие у них  $\alpha$ -кристаллинового

Шатилина Жанна Михайловна  
Бедулина Дарья Сергеевна  
Протопопова Марина Владимировна  
Павличенко Василий Валерьевич  
Побежимова Тамара Павловна  
Грабельных Ольга Ивановна  
Тимофеев Максим Анатольевич

домена – аминокислотной последовательности, состоящей из 80–100 остатков, который располагается, как правило, на С-концевой части белка [1, 2].  $\alpha$ -Кристаллиновый домен получил свое название благодаря тому, что он родственен  $\alpha$ -кристаллину хрусталика глаза позвоночных животных. Впервые это обнаружили Ingolia и Craig [3]. На данный момент нмБТШ обнаружены не только в клетках хрусталика млекопитающих, но и в других клетках и тканях. Мономеры нмБТШ склонны к образованию устойчивых димеров, которые в свою очередь могут ассоциировать с образованием крупных олигомеров разной структуры и состава с молекулярной массой от 100 до 1000 кДа. В условиях стресса размер этих комплексов может возрастать до 5000 кДа [4].

мБТШ выполняют функции молекулярных шаперонов [2]. Они взаимодействуют с частично денатурированными белками, предотвращая их агрегацию, и при определенных условиях переносят эти белки к шаперонам, которые обладают АТФ-азной активностью [5], однако и сами нмБТШ обладают шапероновой активностью [6–8]. Описано функционирование нмБТШ при различных патологиях и дегенеративных состояниях [9, 10]. Также нмБТШ участвуют в регуляции апоптоза [4, 11, 12].

Практически все нмБТШ могут фосфорилироваться под действием различных протеин-киназ [4]. Фосфорилирование, как правило, приводит к диссоциации крупных олигомеров нмБТШ [13–15], что может способствовать формированию гетероолигомеров этих белков [16] и тем самым влиять на их шапероновую активность.

Синтез нмБТШ индуцируется различными воздействиями, такими как изменение температуры среды, окислительный стресс, тяжелые металлы [2, 17–20].

Цель данного исследования – определение степени участия нмБТШ в механизмах термо- и токсикорезистентности у ряда байкальских эндемичных амфипод и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали четыре эндемичных вида амфипод оз. Байкал – *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.), *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), *E. vittatus* (Dyb.), *Ommatogammarus flavus* (Dyb), которых сравнивали с представителем палеарктической фауны *Gammarus lacustris* Sars.

Сбор амфипод проводили с использованием гидробиологического сачка, глубоководный вид отлавливали с помощью глубоководных ловушек. Байкальских амфипод отлавливали в прибрежной зоне оз. Байкал в районе пос. Листвянка (Южный Байкал), а также в районе пос. Большие Коты, *G. lacustris* – в озере в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал). Перед экспериментами проводили преакклимацию амфипод в лабораторных условиях: отдельно по видам в аэрируемых аквариумах при температуре 6–7 °С не менее 1–2 сут. При данных условиях у рачков наблюдают равномерный рост и высокую двигательную активность. Во всех экспериментах использовали здоровых и активно плавающих рачков.

В работе оценивали стрессовое воздействие температурного и токсического факторов. Оценку температурного воздействия проводили экспонированием амфипод в термостатируемых камерах при различных температурах в диапазоне 20–30 °С в зависимости от отношения того или иного вида к повышенной температуре. Влияние токсического стресса оценивали экспонированием амфипод в растворах хлорида кадмия с концентрациями 50, 10, 5, 0,5 и 0,05 мг/л при температуре 6–7 °С. Для сравнения параллельно с экспериментальными группами проводили экспозицию рачков в нормальных условиях – с постоянной аэрацией при температуре 6–7 °С. Длительность экспериментов составляла от 30 мин до 12 сут. После экспериментов рачков замораживали в жидком азоте и проводили последующие анализы из недифференцируемых тканей.

Суммарный белок выделяли в 0,1 М Трис-HCl буфере (рН 7,6). Гомогенат центрифугировали 15 мин при 7000 g, осадок растворяли в буфере для образца (рН 6,8), содержащем 1 мМ ЭДТА, 1 % ДДС-Na, 20 % глицерин, 5 %  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,001 % бромфеноловый синий. Полученные белковые пробы хранили при температуре –20 °С. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури [30] при длине волны 750 нм.

Характер синтеза нмБТШ определяли с использованием денатурирующего электрофореза с ДДС-Na в 12,5 % полиакриламидном геле [31] и последующего Вестерн-блоттинга [32] с антителами к нмБТШ (Anti- $\alpha$ /A- $\alpha$ /B Crystallin Rabbit polyclonal antibodies, Stressgen Bioreagents). Полуколичественный анализ содержания белка на мембранах проводили с помощью программы Gel Explorer. Относительное количество белка выражали в условных единицах (усл. ед.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Экологическая характеристика объектов исследования.** Исследовали амфиподы Crustacea, Amphipoda. В Байкале данная группа насчитывает около 350 видов [21] и является одной из самых многочисленных групп животных. Амфиподы населяют все типы грунтов и глубины озера, при этом каждой зоне глубин и каждому виду грунта соответствует уникальный комплекс видов. Байкальские амфиподы в основном представлены стенобионтными формами, приспособленными к определенным условиям среды и остро реагирующими на их изменения [22]. Однако отмечены виды, по своим адаптационным способностям близкие к видам-космополитам, а в некоторых случаях и превышающие их [22].

Палеарктический *G. lacustris* обитает в мелководных континентальных водоемах. Экспериментально установлено, что среди исследованных видов он является наиболее устойчивым к воздействию стрессовых факторов [22]. *G. fasciatus* – литоральный вид, широко расселившийся по водоемам и водотокам России преимущественно в результате акклиматизационных работ, направленных на обогащение кормовой базы рыб [23], принадлежит к немногочисленной в Байкале группе эврибионтов *E. cyaneus*, также обитающей в литорали, распространен на 600 км за пределы Байкала по р. Ангаре [24, 25]. Эти два байкальских вида по показателям термопреферендума и резистентности к некоторым абиотическим факторам среды близки к *G. lacustris* [26]. *O. flavus* – эврибатный вид, преобладает в зоне ниже 100 м на илистом грунте, хотя отмечен на глубинах 2,5–1313 м [27, 28]. Стенобионтный вид, остро реагиру-

ет на изменения условий обитания [29]. *E. vittatus* – литоральный вид, основная зона обитания которого расположена ниже уреза воды. Распространен по всему Байкалу, а также в р. Ангаре. По резистентным способностям занимает промежуточное положение между *E. cyaneus* и *O. flavus* [22, 25]. Таким образом, выбранные виды амфипод представляют различные экологические группы, отличающиеся по резистентным характеристикам [22].

**Влияние повышенной температуры на содержание нмБТШ.** У амфипод *G. lacustris* отмечали конститутивный синтез нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа (рис. 1). Экспозиция амфипод при температуре 30 °С вызывала многократное увеличение содержания нмБТШ уже через 30 мин эксперимента. Максимальное содержание исследуемого белка отмечали у амфипод после 1 ч экспозиции, через 3 ч наблюдали незначительное снижение количества нмБТШ.

У особей вида *G. fasciatus* отмечен конститутивный синтез нмБТШ с молекулярной

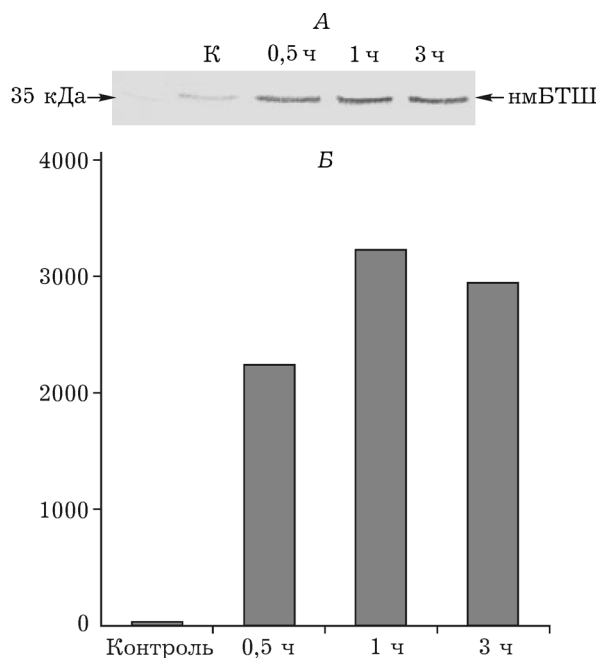


Рис. 1. Вестерн-блоттинг на нмБТШ амфипод вида *G. lacustris*, экспонированных при температуре 30 °С (А). Здесь и на следующих рисунках приведены маркеры молекулярной массы; изменение количества нмБТШ у амфипод вида *G. lacustris*, экспонированных при температуре 30 °С (здесь и далее в усл. ед.) (Б)

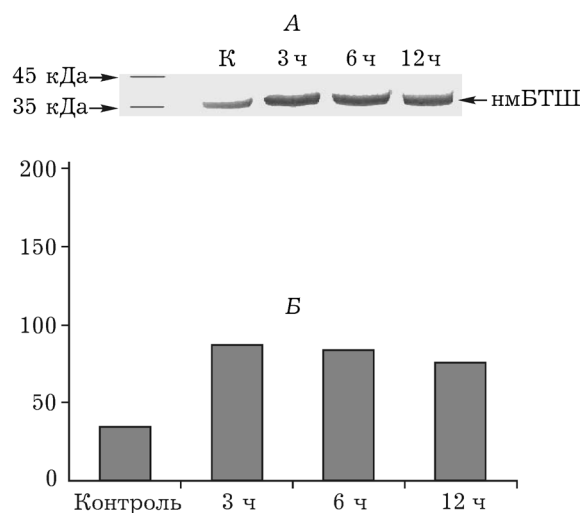


Рис. 2. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *G. fasciatus*, экспонированных при температуре 25 °С

массой 37 кДа. Воздействие температурного стресса 25 °С вызывало увеличение содержания данного белка уже через 3 ч экспозиции. Дальнейшее экспонирование (до 12 ч) не вызывало увеличения содержания исследуемого белка (рис. 2).

У амфипод *E. suapeus* отмечен конститутивный синтез нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа (рис. 3). Экспозиция амфипод при 25 °С вызывала незначительную индукцию синтеза нмБТШ через 1 и 24 ч.

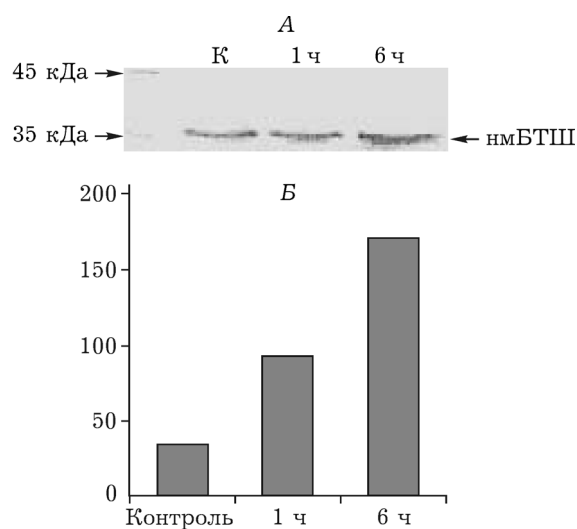


Рис. 4. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *E. vittatus*, экспонированных при температуре 25 °С

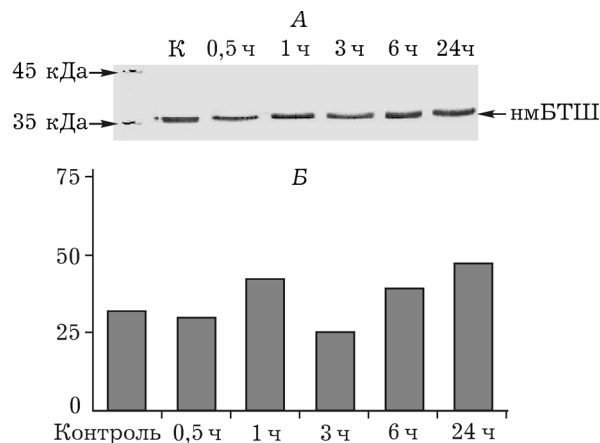


Рис. 3. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *E. suapeus*, экспонированных при температуре 25 °С

У амфипод *E. vittatus* присутствует конститутивный синтез нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа. Экспонирование амфипод при температуре 25 °С вызывало индукцию синтеза исследуемого нмБТШ уже через 1 ч, к окончанию эксперимента (6 ч) содержание исследуемого белка достигало максимального значения (рис. 4).

У амфипод *O. flavus* конститутивный синтез нмБТШ отсутствует (рис. 5). В детектируемых количествах белок с молекулярной массой 35 кДа отмечали через 3 ч экспозиции при 20 °С, после 9 ч его содержание увеличивалось, а после 12 ч – снижалось.

**Влияние токсического стресса на содержание нмБТШ.** У амфипод *G. lacustris*, экс-

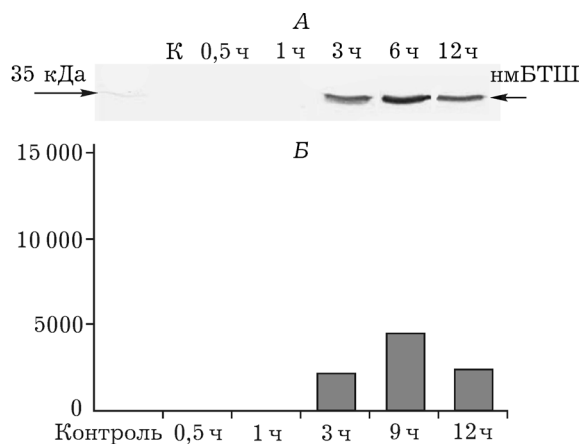


Рис. 5. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *O. flavus*, экспонированных при температуре 20 °С

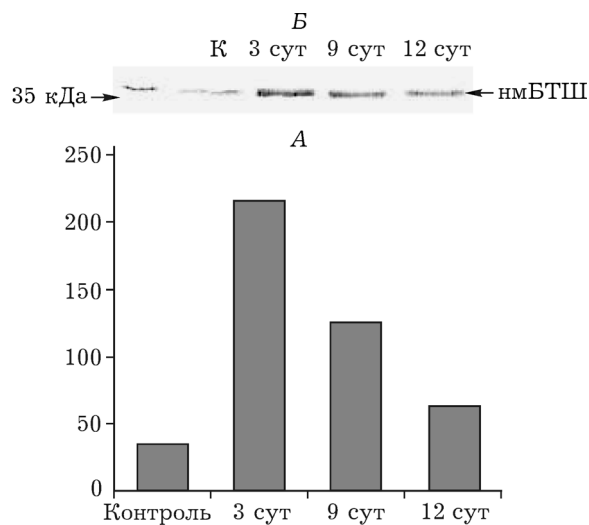


Рис. 6. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *G. lacustris*, экспонированных в растворе  $\text{CdCl}_2$  концентрации 0,05 мг/л

понируемых в растворе  $\text{CdCl}_2$  с концентрацией 0,05 мг/л, через 3 сут происходило увеличение содержания нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа (рис. 6). Через 9 и 12 сут экспозиции отмечали снижение количества исследуемого белка, однако его оставалось больше, чем у особей контрольной группы.

При экспонировании амфипод *G. fasciatus* в растворах  $\text{CdCl}_2$  с концентрацией 0,5 мг/л происходило увеличение содержания нмБТШ с молекулярной массой 37 кДа уже через 30 мин эксперимента (рис. 7). При дальнейшей экспозиции происходило изменение содержания исследуемого белка, максимальное его количество отмечали у животных, экспонированных в растворах хлористого кадмия в течение 24 ч.

Амфипод *E. cyaneus* экспонировали в растворах хлорида кадмия четырех концентраций: 50, 10, 5 и 0,5 мг/л. У рачков, экспонированных в растворах с концентрацией 0,5 мг/л (рис. 8, А), происходило увеличение содержания нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа через 1 ч эксперимента. Максимальное количество белка отмечали через 6 ч экспозиции, после чего до конца эксперимента происходило снижение содержания исследуемого белка до контрольного уровня. Экспозиция в растворах с концентрацией 5 мг/л (рис. 8, Б) вызывала увеличение содержания исследуемого белка уже через 30 мин, мак-

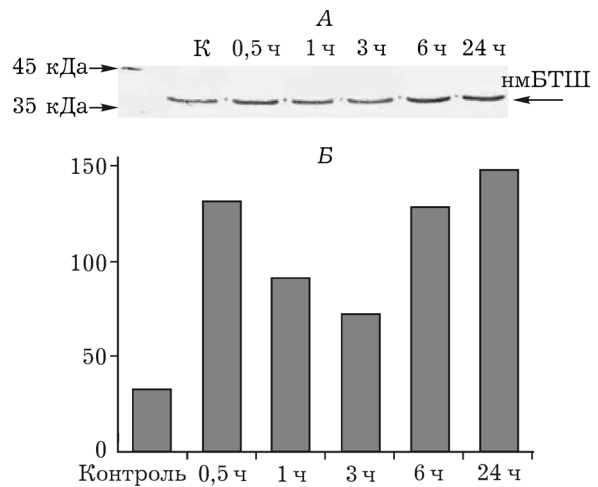


Рис. 7. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *G. fasciatus*, экспонированных в растворах  $\text{CdCl}_2$  0,5 мг/л

симальное количество белка отмечали через 12 ч эксперимента. При экспозиции рачков в растворах с концентрацией 10 мг/л (рис. 8, В) увеличение содержания нмБТШ происходило через 30 мин, после чего количество белка снижалось и вновь увеличивалось к 6 ч эксперимента. Максимальное количество белка отмечали через 12 ч экспозиции. У амфипод, экспонированных в растворах с концентрацией 50 мг/л (рис. 8, Г), увеличение содержания белка наблюдали через 30 мин, после чего происходило снижение содержания исследуемого белка до контрольного уровня.

Экспозиция амфипод *E. vittatus* в растворах хлорида кадмия с концентрацией 10 мг/л вызывала индукцию синтеза нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа (рис. 9). Увеличение содержания данного белка отмечали уже через 1 ч экспозиции, к окончанию эксперимента (24 ч) количество белка достигало максимального значения.

Экспозицию амфипод *O. flavus* проводили в растворах хлорида кадмия трех концентраций – 10, 5 и 0,05 мг/л (рис. 10). В детектируемых количествах белок с молекулярной массой 35 кДа отмечали через 1 сут экспозиции. При этом характер синтеза исследуемого нмБТШ зависел от концентрации растворов токсиканта, в которых экспонировали амфипод: максимальное количество отмечали у особей, экспонированных в растворах с наи-

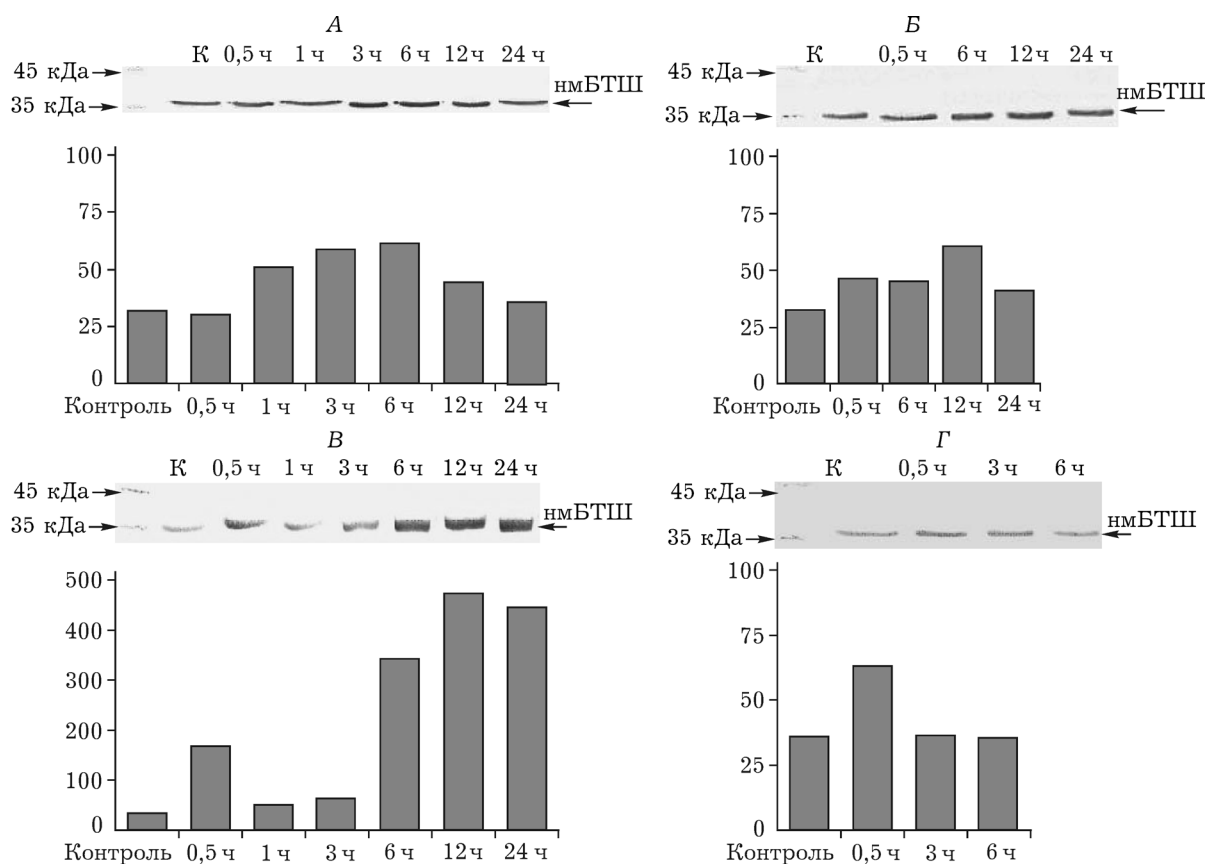


Рис. 8. Вестерн-блоттинг и изменение содержания нмБТШ амфипод вида *E. cyaneus*, экспонированных в растворах препарата CdCl<sub>2</sub> 0,5 мг/л (А); 5 мг/л (Б); 10 мг/л (В) и 50 мг/л (Г)

большей концентрацией токсиканта (10 мг/л), а минимальный – с наименьшей (0,05 мг/л).

Таким образом, показан конститутивный синтез нмБТШ у исследованных амфипод, за

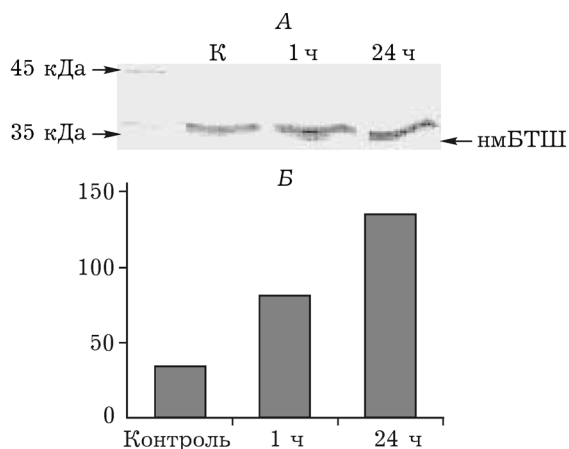


Рис. 9. Вестерн-блоттинг (А) и изменение количества нмБТШ (Б) у амфипод вида *E. vittatus*, экспонированных в растворах CdCl<sub>2</sub> 10 мг/л

исключением эндемичного глубоководного *O. flavus*. Известно, что количество нмБТШ в некоторых тканях гораздо выше, чем других молекулярных шаперонов [33, 34]. Денатурация белков происходит очень быстро, а восстановление их нативной структуры возможно только в начале процесса денатурации, поэтому важно, чтобы это состояние белка было стабилизировано. Сравнительно высокое содержание стабилизирующих белков, таких как нмБТШ, необходимо для того, чтобы они смогли быстро связать белки, только начавшие разрушаться, и переместить их к другим шаперонам, содержание которых в клетках гораздо ниже [35]. Отсутствие конститутивного синтеза нмБТШ в детектируемом количестве у *O. flavus*, вероятно, связано с тем, что амфиподы этого вида обитают в условиях, характеризующихся стабильными условиями среды (температура, кислород, химический состав воды и т. д.). Поэтому они не сталкиваются с частыми из-

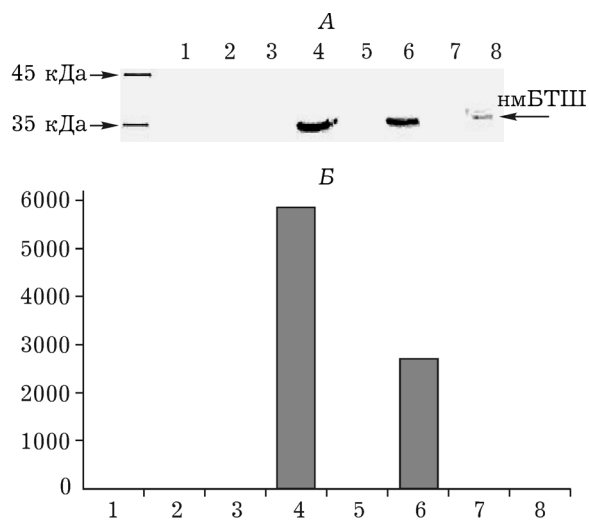


Рис. 10. Вестерн-блоттинг на нмБТШ амфипод вида *O. flavus*, экспонированных в растворах CdCl<sub>2</sub> трех концентраций (А): 1, 2 – контроль; 3 – 1 ч (10 мг/л); 4 – 24 ч (10 мг/л); 5 – 1 ч (5 мг/л); 6 – 24 ч (5 мг/л); 7 – 1 ч (0,05 мг/л); 8 – 24 ч (0,05 мг/л); изменение количества нмБТШ у амфипод вида *O. flavus*, экспонированных в растворах CdCl<sub>2</sub> трех концентраций (Б)

менениями условий обитания и у них нет необходимости быстро реагировать на стрессовое воздействие.

Температура, один из важнейших абиотических факторов, определяет границы существования живых организмов [36, 37]. Известно, что изменение температуры среды обитания вызывает у организмов ряд изменений на биохимическом уровне, в числе которых скорость обмена веществ и клеточные структуры. Нарушение структуры белков, как правило, приводит к нарушению их функциональной активности, поэтому чрезвычайно важно поддержание нативной структуры клеточных белков.

Защиту белков от повреждений, вызванных воздействием стрессовых факторов, обеспечивают белки теплового шока. Так, при воздействии стрессовых температур происходит индукция синтеза нмБТШ [38–40]. Увеличение содержания нмБТШ при воздействии температурного стресса показано у ряда организмов, в том числе у кораллов [41], дрозофилы [42, 43], креветок *Palaeomonetes pugio* [44] и др.

В нашем исследовании воздействие повышенных температур вызывало увеличение

содержания нмБТШ у всех исследованных видов, при этом отмечены видоспецифичные изменения содержания нмБТШ при воздействии стрессовых факторов, а также различия в молекулярной массе нмБТШ. Экспозиция при 30 °С амфипод *G. lacustris*, устойчивых к воздействию повышенных температур, вызывала быстрое многократное увеличение содержания нмБТШ. У *G. fasciatus*, одного из наиболее устойчивых из байкальских видов к воздействию высоких температур, экспозиция при 25 °С вызывала увеличение содержания белка, однако максимальный его уровень лишь в 2 раза превышал конститутивный. У амфипод *E. cyaneus*, как и у предыдущего вида, устойчивого к воздействию температур, воздействие температуры 25 °С вызывало незначительную индукцию исследуемого белка. У *E. vittatus*, более чувствительного к повышению температуры, чем вышеописанные виды, экспозиция при температуре 25 °С вызывала индукцию синтеза нмБТШ. У глубоководного *O. flavus* в детектируемых количествах конститутивный синтез нмБТШ не обнаружен. Через 3 ч воздействия повышенной температуры отмечено увеличение содержания нмБТШ.

Отмечены различия в молекулярной массе нмБТШ, синтезируемых у разных видов: у *G. lacustris*, *E. cyaneus*, *E. vittatus*, *O. flavus* синтезируется белок с молекулярной массой 35 кДа, у *G. fasciatus* – 37 кДа.

При анализе данных токсикологических экспериментов необходимо рассмотреть токсические свойства кадмия. Тяжелые металлы, к которым относится и кадмий, вызывают негативные последствия в живых организмах.

Тяжелые металлы не разлагаются и могут оставаться в экосистемах долгое время, кроме того, они имеют тенденцию накапливаться в организмах [45]. В клетки кадмий проникает через кальциевые каналы. Воздействие кадмия приводит к образованию в клетках активных форм кислорода (АФК) [46, 47], которые воздействуют на клеточные процессы, в частности на функционирование мембран [48]. АФК приводят к разнообразным повреждениям биомолекул, в том числе к нарушениям структуры клеточных белков [49].

Ранее показано участие нмБТШ в стрессовой реакции на воздействие кадмия у креветок *P. pugio* [44]. Показана индукция нмБТШ с молекулярной массой 22 кДа у мидии *Limnoperna fortunei*, экспонированной в растворах кадмия [50].

В нашей работе показано увеличение содержания белков семейства нмБТШ у всех исследованных видов. У амфипод *G. lacustris*, экспонированных в растворе  $\text{CdCl}_2$  с концентрацией 0,05 мг/л, через 3 сут происходило увеличение содержания нмБТШ, через 9 и 12 сут экспозиции отмечали снижение количества исследуемого белка. При экспонировании амфипод *G. fasciatus* в растворах  $\text{CdCl}_2$  с концентрацией 0,5 мг/л происходило увеличение содержания нмБТШ с молекулярной массой 37 кДа, максимальное количество белка отмечали у животных, экспонированных в растворах хлористого кадмия в течение 24 ч. Амфипод *E. cyaneus* экспонировали в растворах хлорида кадмия четырех концентраций: 50, 10, 5 и 0,5 мг/л. У рачков происходило увеличение содержания нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа, при этом максимальное увеличение количества белка отмечали у амфипод, экспонированных в растворах с концентрацией 10 мг/л. Экспозиция амфипод *E. vittatus* в растворах хлорида кадмия с концентрацией 10 мг/л вызывала индукцию синтеза нмБТШ с молекулярной массой 35 кДа. Экспозицию амфипод *O. flavus* проводили в растворах хлорида кадмия трех концентраций – 10, 5 и 0,05 мг/л. Отмечен дозозависимый характер синтеза исследуемого нмБТШ – максимальное количество отмечали у амфипод, экспонированных в растворах с максимальной концентрацией токсиканта (10 мг/л), а минимальный – с минимальной (0,05 мг/л).

Таким образом, у палеарктического *G. lacustris* воздействие исследуемых стрессов вызывает многократное увеличение нмБТШ. Это, вероятно, связано с тем, что амфиподы данного вида обитают в мелководных континентальных водоемах, характеризующихся частыми и резкими колебаниями условий, и вынуждены быстро реагировать на такие изменения. У литоральных байкальских видов (*G. fasciatus*, *E. cyaneus*, *E. vittatus*) воздействие повышенных температур вызыва-

ет незначительное увеличение нмБТШ. Это может быть связано с тем, что эти амфиподы обитают в условиях колебания температуры среды и приспособлены к повышенной температуре. Токсическое воздействие хлорида кадмия вызывает многократное увеличение нмБТШ у литоральных видов. Вероятно, это связано с тем, что данный токсикант, не типичный для Байкала, вызывает клеточные повреждения и необходимо увеличение содержания нмБТШ для восстановления структуры клеточных белков. У глубоководного *O. flavus* в ответ на воздействие исследованных стрессовых факторов наблюдается увеличение количества нмБТШ, однако это происходит через несколько часов после начала воздействия. Вероятно, данные амфиподы обитают в среде, характеризующейся стабильными условиями, и им необходимо время для активации механизмов резистентности.

Можно сделать заключение, что нмБТШ, несомненно, участвуют в механизмах термo- и токсикорезистентности у исследованных видов амфипод, однако степень участия нмБТШ в стрессовых реакциях неодинакова и имеет видоспецифичную зависимость.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-04-48099-а, 08-04-00928-а, 08-04-10065-к.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Caspers G. J., Leunissen J. A., de Jong W. W. Genealogy of the  $\alpha$ -crystallin-small heat-shock protein superfamily // *J. Mol. Ecol.* 1995. N 40. P. 238–248.
2. Sun Y., MacRae T. H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. N 62. P. 2460–2476.
3. Ingolia T. D., Craig E. A. Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. N 79. P. 2360–2364.
4. Панасенко О. О., Ким М. В., Гусев Н. Б. Структура и свойства малых белков теплового шока // *Успехи биол. химии.* 2003. № 43. С. 59–98.
5. Gusev N. B., Bogatcheva N. V., Marston S. B. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins // *Biochemistry (Moscow).* 2002. Vol. 67(5). P. 511–519.
6. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. N 89. P. 10449–10453.
7. Small heat shock proteins are molecular chaperones / U. Jakob [et al] // *J. Biol. Chem.* 1993. N 268. P. 1517–1520.



8. Derham B. K., Harding J. J. Alpha-crystallin as a molecular chaperone // *Prog. Retin. Eye Res.* 1999. N 4. P. 463–509.
9. Farnsworth P. N., Singh K. Self-complementary motifs (SCM) in  $\alpha$ -crystallin small heat shock proteins // *FEBS Letters*. 2000. N 482. P. 175–179.
10. Ito H., Inaguma Y., Kato K. Small heat shock proteins participate in the regulation of cellular aggregates of misfolded protein // *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2003. N 121. P. 27–32.
11. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression / A.-P. Arrigo [et al.] // *Methods*. 2005. Vol. 35(2). P. 126–138.
12. The small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3 M / C. Kamradt [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2005. N 280. P. 11059–11066.
13. Brophy C.M., Dickinson M., Woodrum D. J. Phosphorylation of the small heat shock-related protein, HSP20, in vascular smooth muscles is associated with changes in the macromolecular associations of HSP20 // *Biol. Chem.* 1999. N 274. P. 6324–6329.
- 13a. Brophy C.M., Lamb S., Graham A. The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein // *J. Vasc. Surg.* 1999. N 29. P. 326–333.
14. Regulation of the levels of small heat-shock proteins during differentiation of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells / H. Ito [et al.] // *Exp. Cell Res.* 2001. N 266. P. 213–221.
15. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor  $\alpha$  by phosphorylation / T. Roggalla [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. N 274. P. 18947–18956.
16. HSP22, a new member of the small heat shock protein superfamily, interacts with mimic of phosphorylated HSP27 (3DHSP27) / R. Benndorf [et al.] // *Ibid.* 2001. N 276. P. 26753–26761.
17. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human  $\alpha$ B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF $\alpha$ -induced cell death / P. Mehlen [et al.] // *EMBO J.* 1996. N 15. P. 2695–2706.
18. The molecular chaperone  $\alpha$ -crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K-ATPase against glycation and oxidative stress / B. K. Derham [et al.] // *Eur. J. Biochem.* 2003. N 270. P. 2605–2611.
19. The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions / E. Basha [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2004. N 279. P. 7566–7575.
20. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae* / M. Haslbeck [et al.] // *EMBO J.* 2004. N 23. P. 1–12.
21. Аннотированный список озера Байкал и его водосборного бассейна: В 2 т. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 2001. Т. 1. 832 с.
22. Тимофеев М. А. Сравнительная оценка отношения байкальских гаммарид и голарктического *Gammarus lacustris* к абиотическим факторам: дис. канд. биол. наук. Иркутск, 2000. 140 с.
23. Матафонов Д. В., Итигилова М. Ц., Камалтынов Р. М. Особенности экспансии *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) водоемов Восточного Забайкалья (на примере озера Арахлей) // *Сиб. экол. журн.* 2006. № 5. 595–601.
24. Базикалова А. Я. Об амфиподах реки Ангары // *Труды Байкальской лимнологической станции*. 1957. Т. XV. С. 377–387.
25. Бекман М. Ю., Деньгина Р. С. Население бентали и кормовые ресурсы рыб Байкала. Биологическая продуктивность водоемов Сибири. М., 1969. С. 42–47.
26. Timofeyev M. A. On the role of adaptive abilities in the distribution of endemic amphipods from Lake Baikal // *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie*. 2002. N 28. P. 1613–1615.
27. Базикалова А. Я. Амфиподы оз. Байкал // *Тр. Байкальской лимнологической станции АН СССР*. 1945. № 11. 440 с.
28. Базикалова А. Я. Материалы по изучению размножения байкальских амфипод // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1941. № 3. С. 407–425.
29. Тимофеев М. А., Кириченко К. А. Экспериментальная оценка роли абиотических факторов в ограничении распространения эндемиков за пределы озера Байкал на примере амфипод // *Сиб. экол. журн.* 2004. № 1. С. 41–50.
30. Protein measurement with the Folin reagent / O. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1951. N 193. P. 265–275.
31. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680–685.
32. Bers G., Garfin D. Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection // *Bio Techniques*. 1985. Vol. 3. P. 276–288.
33. Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and  $\alpha$ B-crystallin in rat and human heart / G. Lutsch [et al.] // *Circulation*. 1997. N 96. P. 3466–3476.
34. Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein B-crystallin to Z lines of myocardium / N. Golenhofen [et al.] // *Am. J. Physiol.* 1998. N 274. P. H1457–H1464.
35. Wang K., Spector A. Alpha-crystallin can act as a chaperone under condition of oxidative stress // *Eur. J. Biochem.* 2000. N 267. P. 4705–4712.
36. Willmer P., Stone G., Johnston I. Environmental physiology of animals. Oxford: Blackwell Science, 2000.
37. Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press, 2002.
38. Arrigo A.-P., Landry J. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1994. P. 335–373.
39. Structure and modifications of the junior chaperone  $\alpha$ -Crystallin / P. J. T. A. Groenen [et al.] // *Eur. J. Biochem.* 1994. N 225. P. 1–19.
40. De Jong W. W., Leunissen J. A. M., Voorter C. E. M. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family // *Mol. Biol. Evol.* 1993. N 10. P. 103–126.
41. A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastraea faveolata*) during heat stress / C. A. Downs [et al.] // *Mar. Biotechnol.* 2000. N 2. P. 533–544.
42. Bhole D., Allikian M. J., Tower J. Doxycycline-regulated over-expression of hsp22 has negative

- effects on stress resistance and life span in adult *Drosophila melanogaster* // Mechanisms of Ageing and Development. 2004. Vol. 125(9). P. 651–663.
43. Small heat shock proteins and adaptation of various *Drosophila* species to hyperthermia / V. Yu. Shilova [et al.] // Molecular Biology. 2007. Vol. 40(2). P. 235–239.
  44. Downs C. A., Fauth J. E., Woodley C. M. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system // Mar. Biotechnol. 2001. N 3. P. 380–397.
  45. Gagnaire B., Thomas-Guyon B., Renault T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes // Fish & Shellfish Immunology. 2004. N 16. P. 501–512.
  46. Brennan R. J., Schiestl R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast // Mutat. Res. 1996. N 356. P. 171–178.
  47. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions / S. J. Stohs [et al.] // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2000. N 19. P. 201–213.
  48. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica* / R. Chandrana [et al.] // CBP, Part C. 2005. N 140. P. 422 – 426.
  49. Aravind P., Prasad M. N. V. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte // Plant Physiol. Biochem. 2003. N 41. P. 391–397.
  50. Evaluation of a biomarker of Cd(II) exposure on *Limnoperna fortunei* / B. Mariano [et al.] // Environmental Pollution. 2006. Vol. 144(1). P. 280–288.

## Heat Shock Proteins in the Mechanisms of Stress Adaptation in Baikalian Amphipoda and Palaeartic *Gammarus lacustris* Sars: II. Low-Molecular (Small) HSP Family

Zh. M. SHATILINA<sup>1,2</sup>, D. S. BEDULINA<sup>2</sup>, M. V. PROTOPOPOVA<sup>2</sup>, V. V. PAVLICHENKO<sup>2</sup>,  
T. P. POBEZHIMOVA<sup>3</sup>, O. I. GRABEL'NYKH<sup>3</sup>, M. A. TIMOFEYEV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Baikal Research Center  
664003, Irkutsk, K. Marks str., 5-10  
E-mail: zhasha@mail.ru

<sup>2</sup> Irkutsk State University  
664003, Irkutsk, K. Marks str., 2

<sup>3</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, Lermontov str., 132

The degree of participation of the heat shock proteins of the low-molecular (small) HSP family (lmHSP) in the mechanisms of therm- and toxoresistivity in fresh-water organisms was investigated. Four endemic species of Lake Baikal were studied: *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.), *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), *E. vittatus* (Dyb.), *Ommatogammarus flavus* (Dyb.) and the representative of the palaeartic fauna *Gammarus lacustris* Sars. The effect of temperature factor was evaluated in course of exposure at temperatures 20, 25, 30 °C, the action of the toxic factor was evaluated by exposure in cadmium chloride solutions with the concentrations 50, 10, 5, 0.5 and 0.05 mg/l. A trend to increasing content of the proteins of lmHSP family was observed as a common feature of all the species investigated; however, species-specific peculiarities of the character of synthesis of the protein under investigation were observed. It was concluded that the lmHSP participate in the mechanisms of thermo- and toxoresistivity in the investigated amphipoda species.

**Key words:** stress resistivity, heat-shock proteins (HSP), low-molecular HSP amphipoda, Baikal, endemics.