

ORIGINAL ARTICLE

**A Comparative Analysis of *hsp70* mRNA and HSP70 Protein Expression
in Two Distant Populations of the Baikal Amphipod *Eulimnogammarus
verrucosus* (Gerstf., 1858)**

Madyarova E.V.¹, Lubyaga J.A.¹, Gurkov A.N.¹,
Vereshchagina K.P.¹, Kondrat'eva E.M.¹, Shchapova E.P.¹,
Timofeyev M.A.¹, Luckenbach T.², Bedulina D. S.¹

¹ Irkutsk State University. 664003 Irkutsk, K. Marx str., 1, Russia

² Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, 04318 Leipzig, Permoser Straße 15, Germany.

*Tel.: +7(3952) 600 893

*E-Mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Received August 20, 2013

Basal levels of *hsp70* (mRNA) and HSP70 (protein) were measured in representatives from two distant populations of the amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf.) endemic to Lake Baikal using quantitative PCR (qPCR) and Western blotting upon lab acclimation. In addition, *hsp70* mRNA and HSP70 protein levels in animals subjected to gradual temperature increase were measured. In contrast to *hsp70* mRNA levels that were similar in both populations basal HSP70 protein levels were higher in representatives of the southern population than compared to the northern population. Changes in *hsp70* mRNA levels at increased temperature tended to be more pronounced in the southern population compared to the northern one, whereas HSP70 protein changed only slightly in both populations. The data indicate differences in the phenotypic plasticity of the *hsp*/HSP70 stress response in different populations of this species.

Key words: Amphipods, Baikal, *Eulimnogammarus verrucosus*, gene expression, *hsp70*

ORIGINAL ARTICLE

Сравнительный Анализ Экспрессии Генов и Накопления БТШ70 у
Представителей Двух Разных Популяций Байкальского Вида
Eulimnogammarus verrucosus (Gerstf., 1858)

Мадьярова Е.В.¹, Лубяга Ю.А.¹, Гурков А.Н.¹, Верещагина
К.П.¹, Кондратьева Е.М.¹, Щапова Е.П.¹, Тимофеев М.А.¹,
Люкенбах Т.², Бедулина Д. С.¹

¹ ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», 664003 г. Иркутск, РФ, ул. К. Маркса, 1

² Центр экологических исследований им. Гельмгольца - UFZ, 04318 г. Лейпциг, ул. Пермозештрассе, 15, Германия

*Tel.: +7(3952) 600 893

*E-Mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Поступила в редакцию 20 августа 2013 г.

С помощью количественной ПЦР в реальном времени и денатурирующего электрофореза с последующим вестерн-блоттингом был определен базальный уровень и содержание БТШ70 у представителей двух удаленных популяций эндемичного вида амфипод озера Байкал *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858). Произведена оценка динамики накопления БТШ70, а так же экспрессии гена *btsh70* в условии градиентного повышения температуры. Обнаружены отличия в базальном содержании БТШ70 у исследуемых популяций: базальное содержание белка БТШ70 у представителей южной популяции вида достоверно превышает уровень белка представителей северной популяции. Характер динамики экспрессии *btsh70* также отличался у обеих исследованных популяций. Показанные различия свидетельствуют о наличии внутривидовой фенотипической пластичности стресс-ответа у *E. verrucosus*.

Key words: Амфиподы, Байкал, *Eulimnogammarus verrucosus*, Экспрессия гена

Одним из актуальных научных направлений в биологии является изучение адаптаций живых организмов к условиям окружающей среды. Важную роль в процессе адаптации к различным факторам играют белки теплового шока (БТШ). Гены белков теплового шока (*btsh*) и синтез их продуктов индуцируются не только теплом, но и рядом других повреждающих факторов

физического и химического происхождения (ультрафиолетом, тяжелыми металлами и др.) Наиболее консервативны гены *btsh70*. Аминокислотные последовательности БТШ70 у человека и *E. coli* гомологичны на 50%, а ряд доменов – на 96% (Schlesinger, 1990). Такой консерватизм БТШ у всех изученных организмов свидетельствует об исключительно важной роли

этих белков в защите клеток от повреждений во время и после стресса и указывает на важную роль этих белков в процессе адаптации.

Изучение роли БТШ70 в молекулярных механизмах адаптации на организменном уровне, а также на уровне популяций представляет интерес с точки зрения эволюции в целом и видообразования в частности.

Ранее, у нескольких видов ящериц, обитающих в разных температурных условиях, были найдены популяционные различия на уровне синтеза БТШ70 (Ulmasov ., 1992).

Одним из наиболее перспективных объектов исследования фенотипической пластичности стресс-ответа являются эндемичные обитатели озера Байкал. Самые многочисленные представители фауны озера Байкал амфиподы, представленные в озере 350 видами и подвидами. Амфиподы озера представляют собой универсальную модельную систему для изучения механизмов адаптации к меняющимся условиям среды.

Проведенные ранее исследования показали различия в механизмах экспрессии и синтеза БТШ70 в реакции на стрессовое воздействие у ряда байкальских амфипод (Тимофеев, 2010, Vedulina et al., 2013). Однако исследований вариабельности стресс-ответа у разных популяций одного вида, до этого не проводили.

Целью данной работы явилась оценка влияния градиентного повышения температуры на экспрессию генов и накопление БТШ70 у представителей удаленных популяций эндемичного вида байкальских амфипод.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования были выбраны амфиподы вида *Eulimnogammarus*

verrucosus (Gerstf., 1858). *E. verrucosus* - типичный обитатель литорали, встречается повсеместно под камнями, начиная с глубины в несколько сантиметров вплоть до 10 - 15 метров. Из ранее опубликованных материалов известно, что *E. verrucosus* холодолюбивый вид, предпочитающий температуру 5-6 °С, с диапазоном метаболической стабильности от 4 до 11 °С (Аксенов-Грибанов и др., 2013) Исследуемые популяции вида достаточно удалены друг от друга, находятся на разных широтах (Северобайкальск 109.313409,55.625964, Большие Коты 105.074681,51.904787), температура в литоральной зоне этих мест отличается. (Ладейщиков 1982).

В исследованиях использовали амфипод собранных в пос. Большие Коты (Южный Байкал - южная популяция) и в прибрежной зоне г. Северобайкальск (Северный Байкал - северная популяция). Предварительно акклиматизированных амфипод экспонировали в аэрируемых аквариумах (объем 1,5-2 литра), помещенных в термостат при постепенном градиентном повышении температуры со скоростью 1 °С в час. Каждые 4 часа (при температурах 10 °С, 14 °С, 18 °С и 22 °С) фиксировали рачков для последующих молекулярно-биохимических анализов. Непосредственно перед началом и в ходе эксперимента часть особей, не подверженных температурному воздействию, была зафиксирована в качестве контроля. Работы проводили в ходе одного сезона (июль 2012 г).

Для выделения РНК использовали животных весом от 200 до 500 мг, которых гомогенизировали с использованием 0,5-1 мл Qiazol Reagent (Qiagen, USA) в гомогенизаторе

MM400 (Retsch, Germany). К смеси добавляли 200 мкл хлороформа, аккуратно перемешивали и центрифугировали. Верхнюю фазу переносили на MaXtract гель (Qiagen, USA), для лучшего отделения РНК от геномной ДНК по прилагаемому к MaXtract гелю протоколу. Далее из водной фазы была изолирована РНК согласно протоколу для miRNeasy набору с добавочным шагом, который удаляет ДНКазы из смеси (Qiagen, USA). РНК элюировали с колонок 30 мкл воды.

Для обратной транскрипции использовали 5 мкг РНК, на которой синтезировали кДНК, с использованием Oligo(dT)18 праймера (Fermentas, USA, #SO131) и обратной транскриптазы H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas, USA, #EP0452) по инструкции фирмы производителя.

Экспрессию гена *btsh70* оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems). Реакцию проводили в объеме 12.5 мкл с использованием набора SensiMix SYBR Low-ROX (Bioline) с финальной концентрацией 3 mM MgCl₂ и 250 нМ каждого праймера. Для амплификации гена-мишени (*btsh70*) и референтных генов (*β-actin*, *gapdh*, *Ef1a*) использовали специфичные праймеры: для гена *β-actin* прямой – GCTGCGGTGTTTCATCTCATCTC, обратный TTCGTCTGGACTTGGCTGGTC; для гена *gapdh* прямой – TTGCCGCCCTCAGCCTTG, обратный – CTCAGGTGGTCGCCGTC AAC; для гена *Ef1a* прямой – CTCGGTGTGTCATCTTGTTG, обратный – GGCTGATTGTGCTGTGCTGATC; для гена *hsp70* прямой – CCAAGATGAAGGAGACTGCTGATG, обратный – CGCCGTGGGTTCGTTGATAATC. Количественная ПЦР проводилась при следующих условиях: 94 °C

4 мин; 35 циклов 95 °C 20 сек, 60 °C 20 сек и 72 °C 20 сек. Экспрессию гена *btsh70* измеряли методом сравнения параметра относительной экспрессии ΔΔCt (Vandesompele *et al.*, 2002).

Для определения содержания БТШ70 проводили денатурирующий электрофорез с последующим вестерн-блоттингом. Вестерн-блоттинг осуществляли методом полусухого переноса на PVDF мембрану (GE Healthcare, UK) (Towbin., 1979). Мембраны по очереди выдерживали от 30 мин. до 1 часа в растворе моноклональных антител к БТШ70 (Sigma-Aldrich, # H5147, разведение 1:5000) и 4 часа в растворе вторичных антител конъюгированных с щелочной фосфотазой (antimouse IgG:AP Conj., Stressgen # SAB-101, разведение 1:1000). Для определения актина использовали антитела (Sigma-Aldrich, # A2668, разведение 1:1000) и вторичные антитела (Sigma, # A9919, разведение 1:1000) с последующей цветной реакцией с 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфатом (BCIP) и нитроголубым тетразолием (NBT), осуществляемой щелочной фосфатазой, с образованием темно-синей окраски. Обработанные таким образом мембраны отмывали дистиллированной водой, высушивали, сканировали и подвергали денситометрическому анализу при помощи программы ImageJ (Ferreira, Rasband, 2012,). Уровень БТШ70 в каждом образце был нормализован по актину.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1А представлены результаты оценки экспрессии гена *btsh70* у особей не подвергшихся воздействию постепенного повышения температуры. Видно, что уровень экспрессии генов у представителей обеих

популяций одинаков.

При градиентном повышении температуры среды достоверных отличий в уровне экспрессии генов у представителей северной популяции обнаружено не было, о чем свидетельствуют данные представленные на рисунке 1Б.

Иную картину можно наблюдать у представителей южной популяции. На рисунке 1Б можно увидеть, что при достижении температуры 14 °С уровень экспрессии *btsh70* достоверно отличается от начальных значений

При оценке базальных уровней БТШ70 были обнаружены выраженные межпопуляционные различия. Как видно из рисунка 2А базальный уровень БТШ70 у особей южной популяции вида выше, чем у особей северной популяции.

При измерении уровня БТШ70 в ходе эксперимента на постепенное повышение температуры также были обнаружены различия между представителями обеих популяций.

Показано, что у представителей северной популяции вида при достижении температуры 10 °С уровень БТШ70 статистически достоверно отличается от начальных значений. У представителей южной популяции достоверных отличий от начальных значений не было.

Полученные нами данные о различии в базальном уровне содержания БТШ70 у представителей двух популяций *E. verrucosus* соотносятся с литературными данными.

Так ранее рядом работ показана связь между температурными условиями обитания животных и БТШ70 (Hofman, 2005). У южных видов пустынных ящериц при нормальных условиях наблюдалась повышенная экспрессия генов *btsh70*, нежели у северных видов (Зацепина, 2009). Подобные работы также были произведены на моллюсках (Sagarin and Somero, 2006; Dutton, Hoffman, 2009; Dong et al., 2008), дрозофилах (Garbuz et al., 2002), лягушках (Ulmasov et al., 1992) и других организмах.

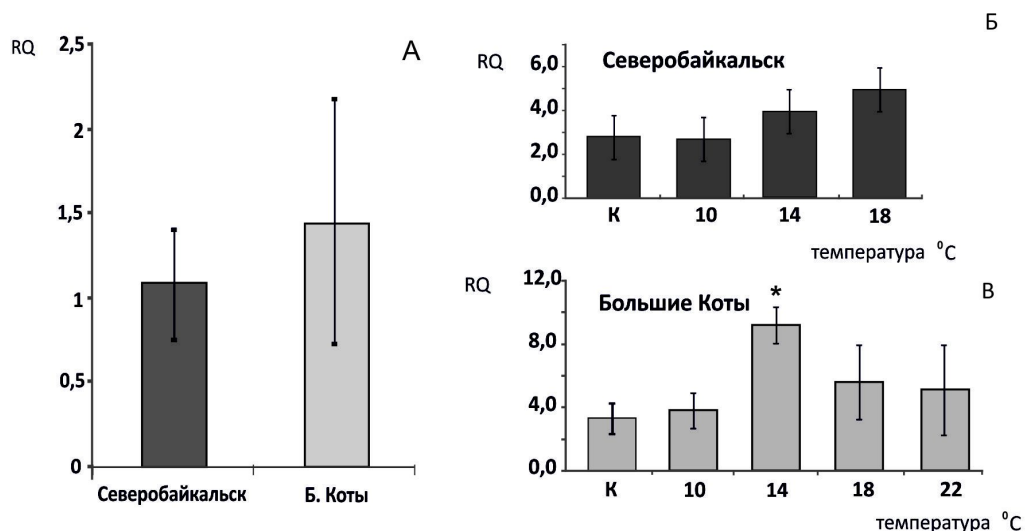


Рисунок 1. Экспрессия гена *btsh70* *E. verrucosus*. А – контроль, Б – при градиентном повышении температуры среды на 1 °С в час у представителей южной популяции (Большие Коты), В - при градиентном повышении температуры среды на 1 °С у представителей северной популяции (Северобайкальск). RQ – относительный уровень экспрессии генов. * - статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$

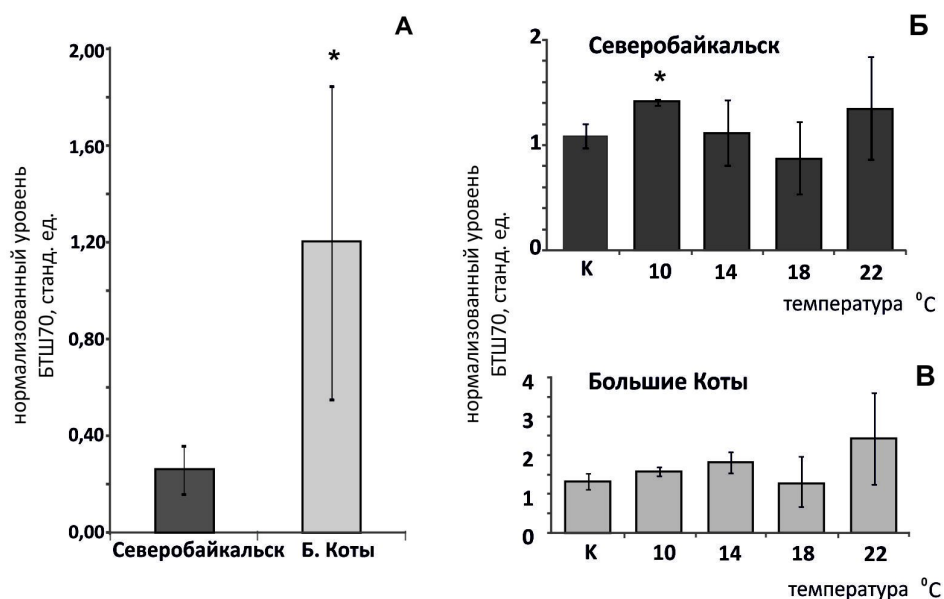


Рисунок 2. Уровень белка БТШ70 *E. verrucosus* А – в базальный уровень БТШ70, Б - при градиентном повышении температуры среды на 1 °С у представителей северной популяции (Северобайкальск), в - при градиентном повышении температуры среды на 1 °С у представителей южной популяции (Большие Коты). * - статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$

Можно заключить, что базальный уровень белка и характер динамики экспрессии генов *btsh70* отличался у рачков обеих исследованных популяций. Показанные различия свидетельствуют о наличии внутривидовой фенотипической пластичности стресс-ответа у *E. verrucosus*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторский коллектив выражает благодарность к.б.н. Протопоповой М.В. за дизайн праймеров и отработку метода. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ (12-04-31767 мол_а, 12-04-90039 Бел_а, 12-04-98062-р_сибирь_а, 11-04-91321-СИГ_а), грантов Президента РФ МК-5466.2012.4, МД-2063.2012.4, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной

России», а также программы стратегического развития ИГУ.

ЛИТЕРАТУРА

- Bedulina D.S., Evgen'ev M.B., Timofeyev M.A., *et al* (2013) 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*, **22**, 1416–1430.
- Dong Y., Ji T., Dong S., (2007) Stress Responses to Rapid Temperature Changes of the Juvenile Sea Cucumber (*Apostichopus japonicas* Selenka). *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, **6:3**, 275-280.
- Garbuz D.G., Molodtsov V.B., Velikodvorskaia V.V.,

- et al, 2002. Evolution of the Response to Heat Shock in Genus *Drosophila*. *Russian Journal of Genetics*, **38**, 925-936.
- Ferreira T., Rasband W. (2012) ImageJ User Guide. 198 p
- Hofmann G.E., (2005) Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integr. Comp. Biol.*, **45**, 247–255.
- Sagarin R. D., Somero G. N., 2006. Complex patterns of expression of heat-shock protein 70 across the southern biogeographical ranges of the intertidal mussel *Mytilus californianus* and snail *Nucella ostrina*. *J. Biogeogr.*, **33**, 622–630.
- Schlesinger M. J. (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem.*, **21**, 12111-12114
- Towbin H, Staehelin T, Gordon T (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS USA*, **76**, 4350–4354
- Ulmasov K .A, Shammakov S, Karavaev K, Evgen'ev M.B. (1992) Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. *PNAS USA*, **89**, 1666 1670.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., et al (2002) Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3(7)**: research 0034.1–0034.11.
- Аксёнов-Грибанов Д.В., Лубяга Ю.А., Шахтанова Н.С. (2012) Определение температурного оптимума эндемичного байкальского вида амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) по изменениям показателей клеточного метаболизма. *Журнал стресс-физиологии и биохимии*, **8**, 289-301
- Зацепина О.Е. (2009) Молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов белков теплового шока при адаптации организмов к различным условиям обитания. Дис. ... Д-р. биол. Наук Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, 207 с
- Ладейщиков Н.П. (1982) Особенности климата крупных озер (На примере Байкала) / АН СССР.СО. Лимнол.ин-т; М: Наука, 137 с, Наука
- Тимофеев М.А. (2010) Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р. биол. Наук. ТГУ, Томск, 384с