

УДК 57.084.1:[577.112:593.422]

**ЭКСПРЕССИЯ СИЛИКАТЕИНОВ НА МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ПРИММОРФ БАЙКАЛЬСКОЙ ГУБКИ
LUBOMIRSKIA BAICALENSIS**

Черногор Л.И., Кондратов И.Г., Кулакова Н.В., Деникина Н.Н., Беликов С.И.
ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, e-mail: lchernogor@mail.ru

Проведен анализ влияния индукции силикатом натрия модельной клеточной культуры примморф байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* на экспрессию силикатеинов и морфогенез спикул. Клеточную культуру примморф истощали по содержанию кремния путем культивирования на искусственной байкальской воде в течение месяца. Экспрессию генов белков, регулирующих метаболизм кремния, индуцировали добавлением силиката натрия до конечной концентрации 70 мкМ. Уровень экспрессии генов силикатеинов анализировали методом ПЦР в реальном режиме времени в первый, второй, третий и шестой дни после индукции. В качестве референсных генов для нормализации данных использовали β-актин (ACTB) и фактор элонгации 1 α (eEF1a1). Контрольными образцами служили пробы взрослой губки и образцы примморф, культивированных на натуральной и искусственной байкальской воде до индукции. Динамику образования и рост кремниевых спикул анализировали методами микроскопии. Образцы примморф, индуцированных добавлением силиката натрия, на фоне массового развития спикул не продемонстрировали значительного увеличения уровня экспрессии генов силикатеинов по сравнению с другими образцами (расхождение 1,7–2 относительных единиц). Такие значения не могут считаться статистически значимыми изменениями в степени экспрессии и лежат в пределах погрешности, что говорит о практически полном отсутствии индукции синтеза мРНК силикатеинов силикатом натрия. Этот факт свидетельствует о пассивности силикатеинов на начальных этапах метаболизма кремния и необходимости поиска других соединений, влияющих на отложение биогенного кремнезема в спикулах губок.

Ключевые слова: примморфы, кремниевые спикулы, экспрессия силикатеинов, *Lubomirskia baicalensis*

EXPRESSION OF SILICATEINS ON THE MODEL CELL CULTURE OF PRIMMORPHS FROM BAIKALIAN SPONGE LIBOMIRSKIA BAICALENSIS

Chernogor L.I., Kondratov I.G., Kulakova N.V., Denikina N.N., Belikov S.I.
Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Irkutsk, e-mail: lchernogor@mail.ru

The analysis of sodium silicate induction of the model cell culture of primmorph from baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis* on the expression of silicateins and morphogenesis of the spicules was performed. Cell culture of primmorph was cultured in reduced level of silicon in artificial Baikalian water for a month. Gene expression of proteins that regulate the silica metabolism was induced by the addition of sodium silicate to final concentration of 70 μM. The expression level of silicatein genes was analyzed in real-time PCR in the first, second, third, and sixth days after the induction. The β-actin (ACTB) and elongation factor 1 α (eEF1a1) were used as reference genes for the normalization of data. Control specimens were samples of adult sponge and primmorphs that were cultured on natural and artificial Baikalian water without induction. The dynamics of the formation and growth of silicon spicules were analyzed by microscopy. Samples of primmorph induced by the addition of sodium silicate, on the background of the mass forming of spicules, have not shown the significant increase in the silicatein expression level in compare with other samples (discrepancy in 1,7–2 relative units). Such values are not statistically significant changes in the level of expression and lie within the error, indicating the absence of induction of silicatein mRNA synthesis by sodium silicate. This fact indicates passivity silicateins in the initial stages of silicon metabolism and the need of finding other compounds that affect the deposition of biogenic silica in sponge spicules.

Keywords: primmorphs, silica spicules, expression of silicateins, *Lubomirskia baicalensis*

Процесс отложения биогенного кремнезема (гидратированный кварц (SiO₂·nH₂O) n) широко распространен в природе как у простейших, так и у многоклеточных организмов [13]. Одним из наиболее ярких представителей животных, формирующих кремниевый скелет, являются губки классов Hexactinellida и Demospongiae. Структурными элементами скелета губок являются спикулы – цилиндрические белково-кварцевые образования видоспецифичной формы, скрепленные аналогом коллагена – спон-

гином [14]. Основными белковыми компонентами спикул губок класса Demospongiae являются силикатеины [9]. Результаты исследований влияния силикатеинов на процесс полимеризации кремниевой кислоты *in vitro*, а также разнообразия генов силикатеинов у губок и их дифференциальной экспрессии *in vivo* позволили выдвинуть гипотезу о ключевой роли этих белков в процессе спикулогенеза [3, 8, 10, 12]. Однако, поскольку интерпретация данных, полученных в экспериментах *in vivo*,

значительно затруднена, а анализ *in vitro* не позволяет корректно оценить степень участия силикатеинов в формировании спикул в живом организме губки, было принято решение использовать в качестве модели трехмерную клеточную культуру губок – примморф [6]. Примморфы являются промежуточным звеном между единичной клеткой и полноценной губкой и могут служить удобной моделью *ex vivo* для решения многих проблем физиологии, клеточной и молекулярной биологии [6, 11].

У пресноводной губки *Lubomirskia baicalensis* (Demospongiae) к настоящему времени идентифицированы четыре силикатеина альфа и определены последовательности их генов [1]. Кроме того, нами разработаны условия получения и длительного культивирования клеточной культуры примморф *ex vivo* [4].

Цель работы – оценить влияние индукции силикатом натрия клеточной культуры примморф байкальской губки *L. baicalensis* на экспрессию генов силикатеинов в процессе спикулогенеза.

Материалы и методы исследования

Губки *L. baicalensis* собирали в ноябре 2013 г. с помощью водолазного снаряжения в оз. Байкал на глубинах от 10 до 20 м в районе п. Листвянка и Большие Коты. Образцы губок транспортировали при температуре 3–4°C. Примморфы получали по ранее разработанной методике [4]. Полученные примморфы культивировали в 24-луночных пластиковых планшетах (Nalge Nunc International) в натуральной байкальской воде (НБВ) и искусственной байкальской воде (ИБВ) при 3–6°C и естественном световом режиме с доступом кислорода в течение 1 месяца [4]. Затем часть культивированных на ИБВ прим-

морф индуцировали добавлением силиката натрия до конечной концентрации 70 мкМ. После индукции в первый, второй, третий и шестой дни примморфы размером 3–5 мм в диаметре отбирали в количестве 20 штук в 5 повторах для последующей экстракции РНК. В качестве контроля отбирали примморфы, культивированные на НБВ и ИБВ без индукции силикатом натрия. За динамикой образования и ростом кремниевых спикул вели ежедневное прижизненное наблюдение с помощью светового флуоресцентного микроскопа AxioCam MRM (Zeiss, Германия), для детального рассмотрения спикул использовали сканирующий электронный микроскоп SEM 525M (Philips, Holland) по опубликованной методике [5]. Кроме того, ежедневно на предметных слайдах готовили препараты спикул, количество которых определяли с помощью калиброванных окуляров с увеличением 200× с помощью оптического микроскопа (XDS-1B, COIC), просматривая не менее 10 полей зрения, в соответствии с ранее описанными методами [7]. Дополнительно были сделаны снимки с помощью цифрового фотоаппарата Panasonic DMC-FZ3. В ходе данного эксперимента было обработано более 500 штук примморф, размером 2–5 мм в диаметре.

Суммарную РНК из примморф и взрослой губки выделяли с использованием Trizol (Life Science, США), обрабатывали ДНКазой 1, свободной от РНКаз (Thermo Fisher Scientific) и проводили реакцию обратной транскрипции с набором First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителей. Полученные образцы кДНК использовали в качестве матриц при проведении ПЦР в реальном времени с неспецифической детекцией iQ SYBR Green Supermix (BioRad, USA) на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). Референсными последовательностями в анализе были housekeeping-гены: β-актин (ACTB) и фактор элонгации 1α (eEF1a1). Пары праймеров для детекции генов силикатеина, ACTB и eEF1a1 разработали на основе ранее опубликованных последовательностей (GenBank: AJ968947; AJ968946; AJ968945; AJ872183) и собственных данных:

Silf 5'AGTCACAGGGTCAGTGTGG / Silr 5'CATCACCACCACTGCAACC;
qActf 5'ACTGGGACGACATGGAGAAG / qActr 5'TGGCTAGGGTGTGAAGGTC;
qEflaf 5'GCAGCTAATCGTTGGTGTCA / qEflar 5'GTAGGTCGGTGCTCTCTCG.

Они позволяют амплифицировать фрагменты генов силикатеинов, ACTB и eEF1a1 длиной 159, 162 и 188 п.н. соответственно.

Результаты исследования и их обсуждение

Долгоживущая культура примморф губок является важным инструментом в анализе белков и генов, вовлеченных в процесс метаболизма интересующих исследователя соединений. Она позволяет проводить в контролируемых условиях индукцию синтеза мРНК, кодирующих целевые белки, с одновременным контролем морфологических параметров. Объектом настоящего исследования служила культура примморф пресноводной эндемичной байкальской

губки *L. baicalensis* (Porifera, Demospongiae, Lubomirskiidae), являющаяся хорошим модельным объектом для прикладных исследований, в частности изучения метаболизма кремния, благодаря своим культуральным характеристикам.

После диссоциации клеток губки *L. baicalensis* в течение первого дня отдельные клетки собирались вместе и формировалась клеточная культура примморф *ex vivo*. Примморфы образовывали конгломераты неправильной формы с неровной поверхностью, которые постепенно становились сферическими. Через 1–2 дня молодые примморфы имели сферическую форму до 2 мм в диаметре и ровный гладкий эпителий (рис. 1).

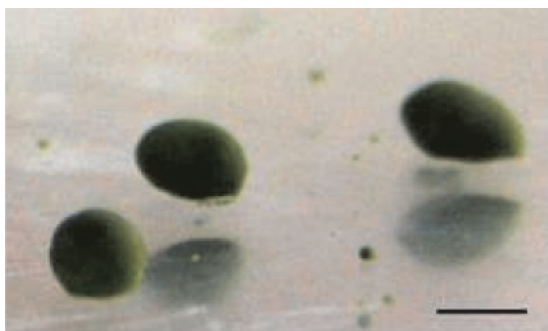


Рис. 1. Культура приморф, полученная из байкальской губки *L. baicalensis*. Масштаб изображения 1 мм

При культивировании приморф на НБВ отмечен интенсивный рост спикул в течение всего эксперимента. Количество спикул составило 40–50 на 10 полей зрения в каждом образце (рис. 2, А).

С целью получения максимально обогащенной по кремнию культуры для изучения индуцированного спикулогенеза часть приморф культивировали на ИБВ в течение месяца. При этом активного образования молодых спикул не отмечали, на 10 полей зрения обнаруживали 2–10 спикул (рис. 2, Б). После добавления силиката натрия на 2 день наблюдали образование и рост ювенильных спикул. На шестой день после индукции на 10 полей зрения определили до 100 и более спикул для каждого образца (рис. 2, В).

Молодые спикулы были тонкими, хрупкими и гладкими, а затем по мере роста на них образовывались шипики. Спикулы в контрольном образце взрослой губки *L. baicalensis* незначительно отличались от спикул, образовавшихся в приморфах, они также были изогнуты и покрыты шипиками (рис. 3 А, Б).

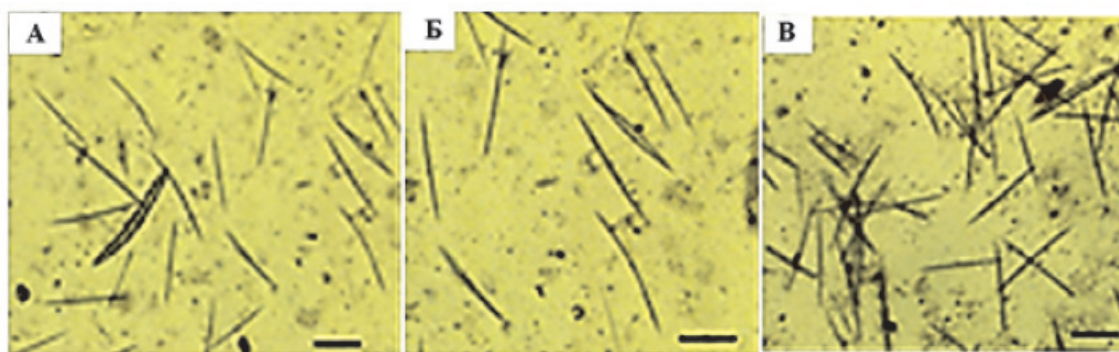


Рис. 2. Световая микроскопия образования кремниевых спикул при культивировании клеточной культуры приморф на 6 день на различных средах: А – образование спикул на НБВ; В – образование спикул на ИБВ; С – образование спикул при индукции силикатом натрия. Масштаб изображения 60 μm

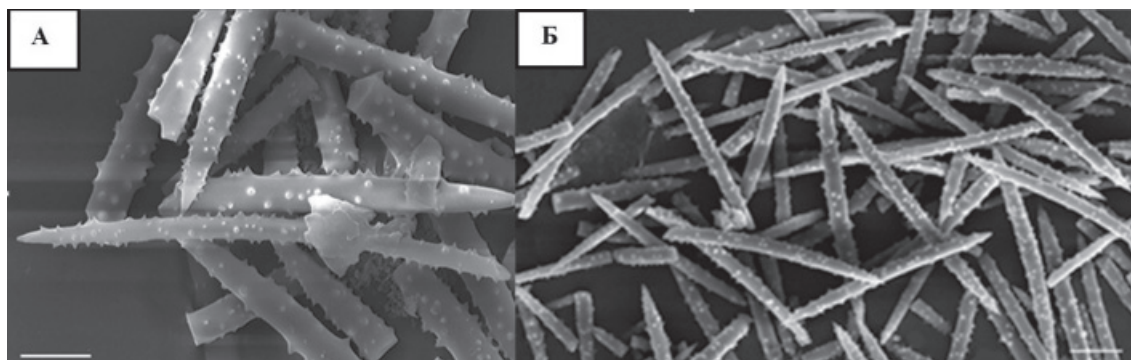


Рис. 3. СЭМ микроскопия кремниевых спикул из взрослой губки *L. baicalensis* (А) и приморф после индукции силикатом натрия (Б). Масштаб изображения: 20 μm

Для анализа влияния увеличения концентрации солей кремниевой кислоты на уровень экспрессии генов силикатеинов с помощью PCR в реальном времени использовали образец взрослой губки (контрольный базовый уровень *in vivo*), образцы культивированных на НБВ примморф (контрольный базовый уровень *ex vivo*), примморф, культивированных на ИБВ (экспериментальный истощенный уровень *ex vivo*), и примморф, индуцированных силикатом натрия на первый, второй, третий и шестой дни индукции (экспериментальные уровни индукции *ex vivo*). Несмотря на то, что интенсивность образования спикул во всех образцах существенно отличалась, различия в количестве специфичной мРНК силикатеинов отмечены не были. Образцы примморф, индуцированных добавлением силиката натрия, не продемонстрировали роста дельта St для генов силикатеинов по сравнению с другими образцами на фоне массового развития спикул. Определение уровня экспрессии генов силикатеинов относительно референс-генов актина и фактора элонгации eEF1a1 осуществляли для каждого препарата кДНК по методу дельта дельта St. Уровень экспрессии мРНК силикатеинов претерпевал незначительные изменения и составлял 1,7–2 относительных единиц. Такие значения не могут считаться статистически значимыми изменениями в уровне экспрессии, так как лежат в пределах погрешности, что говорит о практически полном отсутствии индукции синтеза мРНК силикатеинов при индукции спикулогенеза силикатом натрия.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что уровень экспрессии генов силикатеинов в байкальских губках напрямую не зависит от увеличения концентрации солей кремниевой кислоты, которое стимулирует образование кремнистых спикул. По-видимому, силикатеины непосредственно не связаны с отложением биогенного кремнезема и не принимают активного участия в начальных этапах метаболизма кремния. Можно предположить, что гены силикатеинов активизируются на более поздних стадиях спикулогенеза, а начало процесса контролируют другие белки, которые либо остаются в теле клетки и не детектируются в составе спикул, либо откладываются затем в спикулах в виде комплекса с кремнеземом [2]. Поиск таких белков или других биологически активных соединений, отвечающих за отложение

биогенного кремнезема, остается насущной задачей.

Работа выполнена в рамках проекта VI.50.1.4 «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры», № гос. рег. 01201353444 при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-00482.

Список литературы

1. Калужная О.В., Беликова А.С., Подольская Е.П., Красько А.Г., Muller W.E.G., Беликов С.И. Идентификация силикатеинов пресноводной губки *Baicalospongia baicalensis* // Молекулярная биология. – 2007. – т. 41. – № 4. – С. 616–623.
2. Кондратов И.Г., Соловаров И.С., Деникина Н.Н., Лопатовская О.Г., Беликов С.И. Выделение и идентификация нового белка из спикул пресноводной губки *Lubomirskia bacillifera* // Известия ИГУ. Серия 'Биология. Экология'. – 2012. – т. 5. – № 4. – С. 147–151.
3. Cha J.N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S.C., Chmelka B.F., Stucky G.D., Morse D.E. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol. 96, № 2. – P. 361–365.
4. Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I., Ereskovsky A.V. Long-term cultivation of primmorphs from freshwater Baikal sponges *Lubomirskia baicalensis* // Marine Biotechnology. – 2011. – Vol. 13, № 4. – P. 782–792.
5. Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I., Ereskovsky A.V. Formation of spicules during the long-term cultivation of primmorphs from the freshwater Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // Organic Chem Current Res, 2011; available at: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0401.S2-001>
6. Custodio M.R., Prokic I., Steffen R., Koziol C., Borojevic R., Brummer F., Nickel M., Müller W.E.G. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death // Mech Ageing Dev. – 1998. – Vol. – 105. – P. 45–59.
7. Jones W.C. Spicule dimensions as taxonomic criteria in the identification of haplosclerid sponges from the shores of Anglesey // Zoological Journal of the Linnean Society. – 1984. – Vol. 80. – P. 239–259.
8. Mohri K., Nakatsukasa M., Masuda Y., Agata K., Funayama N. Toward Understanding the morphogenesis of siliceous spicules in freshwater sponge: differential mRNA expression of spicule-type-specific silicatein genes in *Ephydatia fluviatilis* // Dev Dyn. – 2008. – Vol. 237. – P. 3024–3039.
9. Morse D.E. Silicon biotechnology: harnessing biological silica production to construct new materials // Trends Biotechnology. – 1999. – Vol. 17. – P. 230–232.
10. Müller W. E.G., Boreiko A., Wang X., Belikov S.I., Wiens M., Grebenjuk V.A., Schlosmacher U., Schroder H.C. Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demosponges: Protein analysis and phylogenetic relationship // Gene. – 2007. – Vol. 395. – P. 62–71.
11. Pomponi S.A. Biology of the Porifera: cell culture // Can J Zool. – 2006. – Vol. 84. – P. 167–174.
12. Schröder H.C., Perović-Ottstadt S., Rothenberger M., Wiens M., Schwertner H., Batel R., Korzhev M., Müller I.M., Müller W.E.G. Silica transport in the demosponge *Suberites domuncula*: fluorescence emission analysis using the PDMPO probe and cloning of a potential transporter // Biochem J. – 2004. – Vol. 381. – P. 665–673.

13. Simpson T.L.; Volcani B.E. Silicon and siliceous structures in biological systems; Springer-Verlag: New York, 1981. 404 p.

14. Simpson T.L. The cell biology of sponges. Springer-Verlag, New York, NY, 1984. 627 p.

References

1. Kaluzhnaya O.V., Belikova A.S., Podolskaya E.P., Krasko A.G., Müller W.E.G., Belikov S.I. *Molekularnaya Biologiya*, 2007, vol. 41, pp. 616–623.

2. Kondratov I.G., Solovarov I.S., Denikina N.N., Lopatovskaya O.G., Belikov S.I. *Proceedings IGU.Seriya 'Biologiya. Ekologiya'*, 2012, vol. 5, pp. 147–151.

3. Cha J.N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S.C., Chmelka B.F., Stucky G.D., Morse D.E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, vol. 96, pp. 361–365.

4. Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I., Ereskovsky A.V. *Marine Biotechnology*, 2011, vol. 13, pp. 782–792.

5. Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I., Ereskovsky A.V., *Organic Chem Current Res*. 2011, available at: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0401.S2-001>

6. Custodio M.R., Prokic I., Steffen R., Koziol C., Borovic R., Brummer F., Nickel M., Müller W.E.G. *Mech Ageing Dev*, 1998, vol. 105, pp. 45–59.

7. Jones W.C. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1984, vol. 80, pp. 239–259.

8. Mohri K., Nakatsukasa M., Masuda Y., Agata K., Funayama N. *Dev Dyn*, 2008, vol. 237, pp. 3024–3039.

9. Morse D.E. *Trends Biotechnology*, 1999, vol. 17, pp. 230–232.

10. Müller W. E.G., Boreiko A., Wang X., Belikov S. I., Wiens M., Grebenjuk V.A., Schlosmacher U., Schroder H. C. *Gene*, 2007, vol. 395, pp. 62–71.

11. Pomponi S.A. *Can J Zool*, 2006, vol. 84, pp. 167–174.

12. Schröder H.C., Perović-Ottstadt S., Rothenberger M., Wiens M., Schwertner H., Batel R., Korzhev M., Müller I.M., Müller W.E.G. *Biochem J*, 2004, vol. 381, pp. 665–673.

13. Simpson T.L.; Volcani B.E. Springer-Verlag: New York, 1981. 404 p.

14. Simpson T.L. Springer-Verlag, New York, NY, 1984. 627 p.

Рецензенты:

Огарков О.Б., д.м.н., зав. лабораторией эпидемически и социально значимых инфекций, ФГБНУ НЦ «Проблем здоровья семьи и репродукции человека» ФАНО, г. Иркутск;

Астафьев В.А., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории эпидемически и социально значимых инфекций, ФГБНУ НЦ «Проблем здоровья семьи и репродукции человека» ФАНО, г. Иркутск.

Работа поступила в редакцию 28.11.2014.