

УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

С. Л. ПАСТЕРНАК, аспирант

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: uruz-pas@mail.ru

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ЭСТЕРАЗ У *DROSOPHILA SIMULANS*

С помощью реакции одновременного азосочетания, используя метод компьютерной денситометрии, определяли экспрессивность электрофоретически разделённых молекулярных форм эстераз (ацетилхолинэстераза, эстераза С и эстераза 6) личинок, куколок, а также самок и самцов имаго лабораторной популяции *Drosophila simulans*. Показаны особенности экспрессии изучаемых форм эстераз на каждой стадии онтогенеза, обнаружены половые различия в их экспрессии и удельной активности.

Ключевые слова: эстеразы, экспрессия, онтогенез, *Drosophila simulans*.

Крайне важным для понимания механизмов адаптации животных является изучение онтогенетических особенностей экспрессии отдельных ферментных систем. При этом их экспрессия зависит от характерного для каждой стадии онтогенеза уровня содержания многочисленных транскрипционных факторов, специфически связывающихся с регуляторными участками соответствующих генов. Мутации в таких регуляторных участках и в генах, кодирующих сами транскрипционные факторы, влияют на экспрессию соответствующих структурных генов в разных тканях на разных стадиях онтогенеза и являются наиболее значимыми для эволюции [1, 9].

Не менее важным для исследователя-эволюциониста является изучение половых различий по каким-либо биохимическим признакам, так как они являются результатом действия естественного отбора и играют важную роль в адаптивной эволюции у двуполых организмов. Среди адаптаций, отражающих половые различия, наиболее глубоко исследо-

© С. Л. Пастернак

ванными оказались морфологические и этологические, тогда как биохимические механизмы адаптации, несмотря на их важность, остаются слабо изученными [4].

Для адаптации организма одной из важных ферментных систем является система эстераз (К.Ф. 3. 1. 1). Эти ферменты катализируют реакции гидролиза сложных эфиров, образованных карбоновыми кислотами (коротко- или длинноцепочечными) и алифатическими или ароматическими спиртами. У дрозофил эстеразы представлены множеством молекулярных форм, из которых наиболее выражены три – ацетилхолинэстераза (*AChE*), принимающая участие в передаче нервного импульса [12], эстераза *C* (*Est C*, α -*Est* 5), принимающая участие в детоксикации ксенобиотиков [15] и эстераза 6 (*Est* 6, β -эстераза), участвующая в репродукции насекомого [16].

В предыдущих исследованиях [3–5] онтогенетические и половые различия в экспрессии эстеролитических ферментов были подробно изучены на модельном объекте *Drosophila melanogaster*. Однако, исследования, проведенные на одном виде мух, не давали возможности ответить на вопрос: являются ли наблюдаемые различия признаками всего рода *Drosophila*. В связи с этим целью настоящего исследования было изучить онтогенетические изменения, а также половые различия в экспрессии эстераз у другого вида дрозофилы — *Drosophila simulans*.

При этом решали следующие задачи: 1) установить уровни экспрессии и удельной активности изучаемых эстераз на стадиях личинки, куколки и имаго; 2) выявить половой диморфизм в уровне экспрессии и удельной активности эстераз у *D. simulans*.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили 2–3-суточные личинки и куколки, а также половозрелые самцы и самки *Drosophila simulans* (Sturtevant, 1919), взятые из искусственно созданной популяции. Мух содержали на стандартной четырёхкомпонентной питательной среде при температуре +25 °C [10].

Для получения экстрактов тканей отдельно взятых личинок, куколок и имаго, предварительно наркотизированных эфиром, гомогенизировали в 10 мкл 0,1 М глицин-*NaOH* буфера (*pH* 9,0), содержащего 1% тритона X-100. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин на холоде, после чего к 10 мкл супернатанта добавляли по 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60% растворе сахарозы.

Образцы подвергали электрофоретическому разделению в системе вертикально-пластинчатого щелочного (pH 8,3) 7% полиакриламидного геля. Электрофорез проходил в течение 4 ч при температуре +10 °C и силе тока 50 мА в расчёте на два гелевых блока. После электрофореза гелевые пластины отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и замачивали на 10 мин в 25 мл 0,1 М трис-глицинового буфера (pH 7,4). Для выявления эстераз гелевые блоки помещали в инкубационную среду того же буфера (объём 50 мл) с добавкой 12 мг β -нафтилацетата, 12 мг α -нафтилпропионата и 25 мг соли диазония — синего прочного RR. Субстраты и диазоний предварительно растворяли в 100 мкл диметилформамида. Инкубацию проводили в течение 30 мин при температуре +25 °C. После этого, ферментативную реакцию останавливали, обрабатывая гели кипящей дистиллированной водой. Гели сканировали при высоком разрешении и денситометрировали, используя специальную компьютерную программу «TotalLab». Уровень экспрессии эстераз определяли по площадям пиков на денситограмме (S) в расчёте на количество биологического материала, полученного от одной особи. При этом соблюдалась прямая пропорциональность в зависимости между площадью каждого пика и количеством образовавшегося продукта реакции (азокрасителя) в зоне локализации фермента в гелевом блоке [6]. Для расчёта удельной активности изучаемых ферментов определяли содержание общего белка в образцах. Удельную активность находили, используя формулу:

$$YA = \frac{S}{k \cdot t \cdot [P]},$$

где S — количество продукта реакции (площадь соответствующего пика на денситограмме в относительных единицах в расчёте на экстракт, полученный из одной особи), $[P]$ — содержание общего белка (мг) в экстракте суммарных тканей отдельно взятой особи, найденное по методу Lowry *et al.* [14], t — время, за которое проходила ферментативная реакция (30 мин), k — коэффициент перевода относительных единиц измерения площадей пиков в миллимоли конечного продукта реакции (0,033). Коэффициент рассчитывали по калибровочному графику, отражающему зависимость площадей пиков на денситограмме от известных количеств продукта реакции (в миллимолях). За одну единицу ферментативной активности принимали количество фермента, приводящего к образованию одного миллимоля продукта реакции за 1 мин инкубации при +25 °C. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы «Excel».

Результаты исследования и обсуждение

На всех стадиях индивидуального развития у *Drosophila simulans* наиболее интенсивно экспрессируются три основные формы эстераз, способные расщеплять нафтилацетаты и нафтилпропионаты. Каждая из них обладает довольно стабильным показателем относительной электрофоретической подвижности (R_f) и чётко обособлена от других соседних фракций. Один из ферментов обладает наименьшей электрофоретической подвижностью ($R_f = 0,120$) и проявляет смешанную активность (рис. 1), гидролизуя как α -нафтилпропионат, так и β -нафтилацетат (на электрофореграмме наблюдается красно-коричневая окраска продукта реакции). Согласно литературным данным [2], этот фермент представляет собой ацетилхолинэстеразу. Эстераза с $R_f = 0,200$ обладает исключительно α -фильностью и является эстеразой С. Она относится к группе α -эстераз. Продукт реакции азосочетания α -нафтола с солью диазония приобретает тёмно-коричневую окраску. Наконец, третий, лидирующий по показателю электрофоретической подвижности фермент ($R_f = 0,285 - 0,300$) — эстераза б — проявляет исключительную β -специфичность, гидролизуя β -нафтилацетат, когда в инкубационной среде в той же концентрации содержится и α -субстрат. При этом конечный продукт реакции приобретает красную окраску.

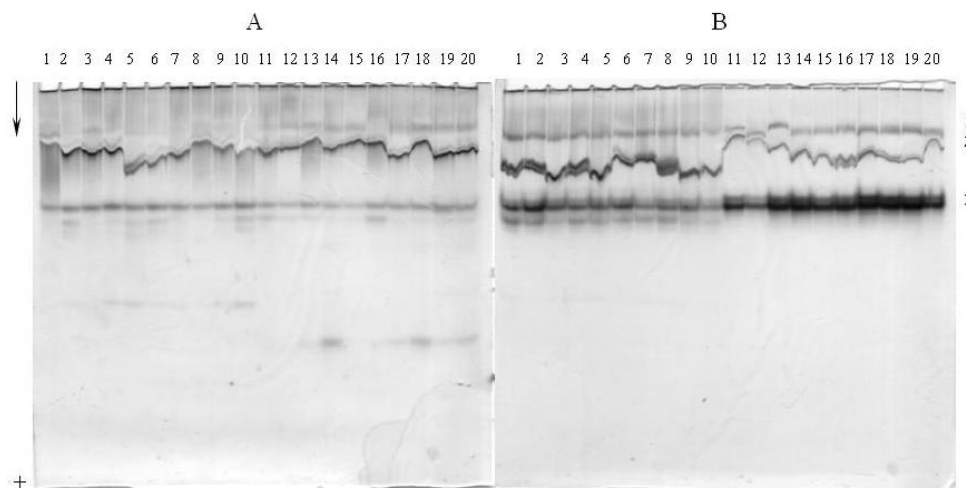


Рис. 1. Электрофоретический спектр карбоксиэстераз в онтогенезе *Drosophila simulans*: Гель А: треки 1–10 — личинки, 11–20 — куколки; гель В: треки 1–10 — имаго самки, 11–20 — имаго самцы. Ферменты: 1 — ацетилхолинэстераза, 2 — эстераза С, 3 — эстераза б

Что касается экспрессии изучаемых эстераз, то её уровень находится в определенной зависимости от фазы развития насекомого. Так, при переходе от стадии личинки к стадии куколки незначительно снижается уровень экспрессии эстеразы 6. Экспрессивность ацетилхолинэстеразы и эстеразы С достоверно не изменяется (рис. 2). Существенные изменения в уровнях экспрессии отдельных эстераз наблюдаются при переходе к имагинальной стадии развития: экспрессивность ацетилхолинэстеразы возрастает в 2,5–3,5 раза, β -эстеразы — в 5–12 раз, в зависимости от пола взрослой особи.

В то же время отмечается ярко-выраженный половой диморфизм по экспрессивности эстеразы С: при переходе от куколки к имаго у самцов уровень её экспрессии снижается, а у самок — повышается. Этот факт интересен в первую очередь тем, что отсутствуют какие-либо литературные данные, объясняющие этот феномен.

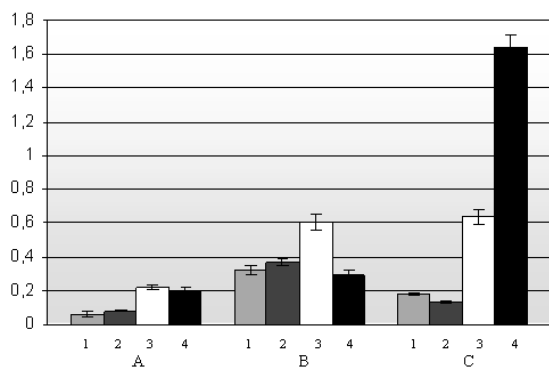


Рис. 2. Экспрессивность эстераз в онтогенезе *Drosophila simulans*:

По вертикали: уровень экспрессии в относительных единицах на одну особь. По горизонтали: А — ацетилхолинэстераза, В — эстераза С, С — эстераза 6 (суммарная экспрессия двух аллозимов). 1 — личинки, 2 — куколки, 3 — самки имаго, 4 — самцы имаго

Половой диморфизм наблюдается также по экспрессивности эстеразы 6: у самцов изучаемой популяции уровень её экспрессии в 2,5 раза выше, чем у самок. Это, по всей видимости, объясняется тем, что эстераза 6 в большом количестве содержится в семенниках, а также в семявыносящей луковице самцов [7]. Сходные различия в экспрессии данного фермента были обнаружены и у *Drosophila melanogaster* [4], в связи с

чем было высказано предположение [8, 16], что эстераза 6 самцов этого вида плодовых мушек, попадая в половые пути самки, функционирует в комплексе с другими белками самца, содержащимися в эйякуляте. При этом она формирует условия, наиболее благоприятствующие процессу оплодотворения.

В исследуемой популяции эстераза 6 представлена двумя формами — аллозимами *S* и *F*, имеющими различные показатели относительной электрофоретической подвижности (*Rf* 0,285 и 0,300 соответственно) и уровни экспрессии (рис. 3).

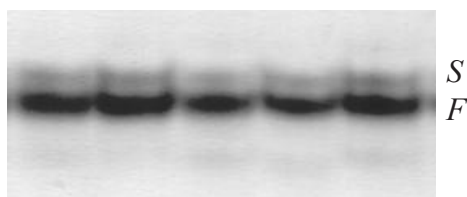


Рис. 3. Аллозимный спектр эстеразы 6 у имаго *Drosophila simulans*

S- и *F*-аллозимы эстеразы 6 у *D. simulans* отличаются двумя, влияющими на подвижность, аминокислотными заменами — по 237 и 487 позициям [13]. У *S*-аллозима в этих позициях находятся, соответственно, аспарагин и валин, а у *F*-аллозима — тирозин и аспарагиновая кислота. Судя по аллозимному составу, определяющему фенотип каждой отдельно взятой особи по признаку экспрессии эстеразы 6, потенциально возможны следующие генотипы по локусу *Est-6*, представленному двумя аллелями (*S* и *F*): *SS* — гомозиготы, *SF* — гетерозиготы и *FF* — гомозиготы. Однако, в изучаемой нами популяции на момент проведения экспериментальной части работы отсутствовали (или встречались крайне редко) имаго, гомозиготные по локусу *Est 6*; в выборке из 80 особей (40 самок и 40 самцов) все особи оказались гетерозиготными. Это может свидетельствовать о том, что гомозиготы как по *F*-, так и по *S*-аллелю практически нежизнеспособны и не доживают до стадии имаго. При этом интересно, что исследованные личинки и куколки экспрессировали только *F*-аллозим. Объяснить это возможно двояко: 1) гомозиготы по *F*-аллелю гибнут незадолго до вылета имаго; 2) исследованные личинки и куколки, также как имаго, являются гетерозиготами, но *S*-аллозим на этих стадиях либо не экспрессируется, либо обладает следовой активностью и не выявляется на электрофореграмме. Поскольку выборка достаточно большая (20 личинок, 20 куколок, 80 имаго с равным соотношением

самцов и самок), второе объяснение более вероятно. Надо полагать, что гомозиготы и по *F*- и по *S*-аллелю в данной популяции не доживают и до стадии личинки.

Интересно то, что по данным других авторов [17], в лабораторных популяциях *D. simulans*, созданных из различных природных популяций (из Южной и Северной Америки, Северной Африки) встречаются либо только гомозиготы по обоим аллелям, либо и гомо- и гетерозиготы. Таким образом, наблюдаемый нами феномен невыживаемости гомозигот по локусу *Est-6* характерен, по всей видимости, только для данной лабораторной популяции. Возможно, это каким-то образом связано с генным окружением *Est-6* у мух изучаемой популяции. Несомненно, это явление требует дополнительных исследований.

Что касается ацетилхолинэстеразы, то выраженного полового диморфизма по признаку её экспрессии не обнаружено.

По удельной активности в расчёте на суммарный белок изучаемые формы эстераз на разных стадиях онтогенеза также значительно различаются (табл. 1).

Таблица 1

**Удельная активность отдельных эстераз в онтогенезе
Drosophila simulans ($M \pm m$; $n = 10$)**

Стадия онтогенеза	Молекулярные формы эстераз		
	<i>AChE</i>	<i>Est C</i>	<i>Est-6</i>
Личинки	$1,502 \pm 0,419$	$8,736 \pm 0,764$	$4,914 \pm 0,355$
Куколки	$1,063 \pm 0,120$	$4,918 \pm 0,239^*$	$1,738 \pm 0,133^*$
Имаго, самки	$1,932 \pm 0,149$	$5,270 \pm 0,404$	$5,620 \pm 0,369$
Имаго, самцы	$5,770 \pm 0,462^{**}$	$8,369 \pm 0,866^{**}$	$47,330 \pm 2,136^{**}$

Примечание: Данные отражают удельную активность эстераз, выраженную в относительных единицах в расчёте на 1 мг суммарного белка (за одну единицу ферментативной активности принимали количество фермента, приводящего к образованию одного миллимоля продукта реакции за 1 мин инкубации при +25 °C). * — различия между куколками и личинками достоверны при $P < 0,05$; ** — различия между самцами и самками имаго достоверны при $P < 0,05$.

Данные по удельной активности отличаются от таковых по экспрессии. При переходе от личиночной стадии к куколочной достоверно снижается удельная активность эстеразы С и эстеразы 6. При переходе на имагинальную стадию, активность ацетилхолинэстеразы и эстеразы 6 возрастает. В случае же эстеразы С наблюдается обратная, по сравнению с изменением экспрессии, картина: при переходе к имагинальной стадии её удельная активность у самок достоверно не изменяется, а у самцов – возрастает (табл. 1). Эта разница между экспрессией и удельной активностью объясняется значительно бóльшим средним содержанием белка в экстракте самок, чем в экстракте самцов – в 3,3 раза. Такая разница в содержании белка имеет место, по-видимому, из-за наличия в вителляриях яичников половозрелых самок богатых белком яйцевых фолликулов (ооцитов с сопровождающими их питающими и фолликулярными клетками), а также созревающих яиц [11].

По показателям удельной активности половой диморфизм на стадии имаго наблюдается по всем изучаемым ферментам. В этом случае у самцов активность всех трёх эстераз представлена более высоким уровнем. Особенно это касается эстеразы 6 (в 8,4 раза выше, чем у самок). Как было сказано выше, это объясняется накоплением большого количества фермента в половой системе самцов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровни экспрессии и удельной активности изучаемых эстераз находятся у *Drosophila simulans* в строгой зависимости от стадии индивидуального развития и пола насекомого.

Выводы

1. Максимальное значение экспрессивности и удельной активности изучаемых эстераз *Drosophila simulans* проявляются на стадии имаго.
2. При переходе от личинки к куколке уровень экспрессии ацетилхолинэстеразы и эстеразы С достоверно не изменяется, при этом значительно снижается экспрессивность эстеразы 6.
3. Минимальная удельная активность эстеразы С и эстеразы 6 наблюдается на стадии куколки.
4. У самцов уровень экспрессии эстеразы 6 значительно выше, а эстеразы С – ниже, чем у самок. По экспрессивности ацетилхолинэстеразы полового диморфизма не обнаружено.
5. У самцов *D. simulans* удельная активность изучаемых эстераз в 1,6–8,4 раза выше, чем у самок.

Список использованной литературы

1. Айала Ф. Роль регуляторных генов в адаптивной эволюции / Ф. Айала, Д. Макдональд // Вопросы общей генетики. — М.: Наука, 1981. — 106 с.
2. Андриевский А. М. Влияние химических реагентов на проявление активности карбоксиэстераз *Drosophila melanogaster* / А. М. Андриевский // Мат. II Междунар. конф. «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». — Одесса: Печатный дом, 2010. — С. 8–16.
3. Андриевский А. М. Онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* / А. М. Андриевский, В. А. Кучеров, В. Н. Тоцкий, Е. В. Деркач // Вісник ОНУ, 2005. — Т. 10. — Вип. 5. — С. 26–35.
4. Андриевский А. М. Половой диморфизм по экспрессии гидролаз эфиров карбоновых кислот в популяции *Drosophila melanogaster* / А. М. Андриевский // Вісник ОНУ, 2004. — Т. 9. — Вип. 1. — С. 7–16.
5. Андриевский А. М. Система карбоксиэстераз *Drosophila melanogaster* в онтогенезе / А. М. Андриевский, В. А. Кучеров, В. Н. Тоцкий // Вісник ОНУ, 2007. — Т. 12. — Вип. 5. — С. 7–18.
6. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических молекул / Э. Гааль, Г. Медьеш, Л. Верецкеи. — М.: Мир, 1982. — 446 с.
7. Коротков Д. В. Суммарная активность эстеразы 6 в гениталиях самцов у межлинейных гибридов *Drosophila melanogaster* / Д. В. Коротков, Л. З. Кайданов, Л. И. Корочкин // Генетика. — 1988. — Т. 24, № 8. — С. 1512–1514.
8. Корочкин Л. И. Клонирование, экспрессия, регуляция тканеспецифических генов у дрозофилы / Л. И. Корочкин // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 8. — С. 1029–1042.
9. Марков А. Эволюция человека. В 2-х кн. Кн. 1. Обезьяны, кости и гены / А. Марков. — М.: Астрель, 2012. — 464 с.
10. Медведев Н. Н. Практическая генетика / Н. Н. Медведев. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
11. Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле / Под ред. В. В. Хвостова, Л. И. Корочкина, М. Д. Голубовского. — Новосибирск: Наука, 1977. — 278 с.

12. Hall M. C. L. The *Ace* locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader / M. C. L. Hall, P. Spierer // The EMBO Journal. — 1986. — Vol. 5, N. 11. — P. 2949–2954.
13. Karotam J. Nucleotide variation at the hypervariable esterase 6 isozyme locus of *Drosophila simulans* / J. Karotam, T. M. Boyce, J. G. Oakeshott // Mol. Biol. Evol. — 1995. — Vol. 12, N. 1. — P. 113–122.
14. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N. 1. — P. 265–275.
15. Ogita Z. Genetical relationship between ali-esterase activity and insecticide-resistance in *Drosophila melanogaster*. Genetical and biochemical studies in negatively correlated cross-resistance in *Drosophila melanogaster*. IV. / Z. Ogita // Botyu-Kagaku (Scientific Insect Control), 1961. — Vol. 26. — P. 93–97.
16. Richmond R. C. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster* / R. C. Richmond, D. G. Gilbert, K. B. Sheehan, M. H. Gromko, F. M. Butterworth // Science. — 1980. — Vol. 207, N. 4438. — P. 1483–1485.
17. Wright T. R. F. A homologous gene-enzyme system, esterase 6, in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* / T. R. F. Wright, R. J. Macintyre // Genetics. — 1963. — Vol. 48. — P. 1717–1726.

Статья поступила в редакцию 4.04.2012

С. Л. Пастернак

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
вул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: uruz-pas@mail.ru

ОНТОГЕНЕТИЧНІ ТА СТАТЕВІ ВІДМІННОСТІ В ЕКСПРЕСІЇ ДЕЯКИХ ЕСТЕРАЗ У *DROSOPHILA SIMULANS*

Резюме

За допомогою реакції одночасного азосполучення, використовуючи метод комп'ютерної денситометрії, визначали ступінь вираженості електрофоретично розділених молекулярних форм естераз (ацетилхолінестерази, естерази С і естерази б) личинок, лялечок, а також самок і самців

імаго лабораторної популяції *Drosophila simulans*. Показані особливості експресії досліджуваних форм естераз на кожній стадії онтогенезу, виявлені статеві відмінності в експресії і питомій активності цих ферментів.

Ключові слова: естерази, експресія, онтогенез, *Drosophila simulans*.

S. L. Pasternak

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Genetics and Molecular biology,
2, Dvoryanskaya Str., Odessa, 65082, Ukraine, e-mail: uruz-pas@mail.ru

ONTOGENETIC AND SEX DIFFERENCES IN EXPRESSION OF SOME ESTERASES OF *DROSOPHILA SIMULANS*

Summary

Using reaction of the simultaneous azo-coupling, the expression levels of electrophoretically separated molecular forms of esterases (acetylcholinesterase, esterase C, and esterase 6) in larvae, pupae, and imago of laboratory population *Drosophila simulans* have been determined. The expression features of the investigated esterase forms at each stage of ontogenesis have been shown; sex differences in the expression and specific activity have been described.

Key words: esterases, expression, ontogenesis, *Drosophila simulans*.