

УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

А. М. Андриевский, канд. биол. наук, доц., докторант, **В. А. Кучеров**, мл. науч. сотр., **Е. П. Кундиева**, асп.
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, E-mail: andriev_scar@mail.ru

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПА

Используя метод щелочного электрофореза в полиакриламидном геле, разделяли множественные молекулярные формы карбоксиэстераз самцов и самок дрозофилы. Уровень экспрессии каждой формы ферментов определяли путём денситометрирования гелевых блоков, содержащих фиксированные диазонием продукты гидролиза нафтоловых эфиров низших карбоновых кислот. Установлены существенные различия в активности карбоксиэстераз самок и самцов имаго. Дана качественно-количественная оценка изучаемому биохимическому признаку полового диморфизма.

Ключевые слова: дрозофила, половой диморфизм, карбоксиэстеразы.

Многочисленные данные указывают на то, что половой диморфизм, проявляющийся в разной степени выраженности признаков и свойств у животных организмов, является результатом отбора и имеет большое адаптивное значение [1–5]. Среди организменных адаптаций, отражающих половые различия, наиболее глубоко исследованными оказались морфологические и этологические, тогда как биохимические механизмы адаптации, несмотря на их важность, остаются слабо изученными [5–8].

К сожалению, в большинстве случаев при описании диморфных признаков или свойств даётся их качественная характеристика, которая не позволяет судить о степени выраженности признака у самок и самцов. Так, имеются сообщения о половых различиях в проявлении активности некоторых эстераз у термитов и отдельных видов рыб [9–11]. Обнаруженные у дрозофил *virilis* и *melanogaster* половые различия по проявлению активности некоторых эстераз (в частности, β -эстеразы) оказались обусловленными их тканевой специфичностью у самцов [5, 12–15].

В данной работе преследовали цель сравнить количественные показатели активности основных форм карбоксиэстераз репродуктивно способных самок и самцов *Drosophila melanogaster* дикого

типа, образующих единую популяцию и находящихся в стандартных условиях существования.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования служили 3-суточные половозрелые самцы и самки имаго *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типа, которых содержали в стандартных условиях на простой питательной среде [16] при температуре 25°C. После наркотизации диэтиловым эфиром отдельно взятые экземпляры гомогенизировали в эпепдорфах в объёме 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера, содержащего 1% тритона X-100. Экстракты ферментов получали путём центрифугирования гомогенатов тканей на холоде при 10 000 g в течение 15 мин. Полученные надосадочные жидкости смешивали с 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60% растворе сахарозы и сразу же подвергали электрофоретическому разделению в условиях щелочного (pH 8,9) вертикально-пластинчатого 10% полиакриламидного геля. После разделения компонентов экстракта, активность карбоксиэстераз определяли с помощью синтетических субстратов: α -нафтилацетата и β -нафтилацетата, а также применяли дополнительные субстратоподобные высокомолекулярные соединения — сорбитан-моноолеат (твин 80) и сорбитан-триолеат (твин 85) в комбинации с β -нафтилацетатом. Твины как субстраты липаз в данном случае использовали с целью выявления и соответствующего учёта возможной субстратной конкуренции с β -нафтилацетатом при гидролизе его β -фильными изоформами карбоксиэстераз. Об уровне активности молекулярных форм исследуемых ферментов судили по интенсивности окрашивания фракций в гелевом блоке после проведения гистохимической реакции одновременного азосочетания нафтаола с диазонием синим прочным В в нейтральной инкубационной среде.

Через 60 мин инкубации ферменты инактивировали термической обработкой, гели отмывали дистиллированной водой и денситометрировали, определяя оптическую плотность (ΔDo , условные единицы) каждой фракции.

Для расчётов показателей удельной активности ($\Delta Do/\bar{m}$ и $\Delta Do/[\bar{P}]$) каждой изоформы карбоксиэстеразы по индивидуальным данным 25 особей соответствующего пола находили среднюю массу \bar{m} ($\bar{x} \pm s_x$), а также определяли средний показатель $[\bar{P}]$ ($\bar{x} \pm s_x$), отражающий содержание общего белка в индивидуальных экстрактах самцов и самок; при этом использовали метод *Lowry et al.* [17]. Коэффициенты половых отличий (Kd) находили путём деления больших показателей относительной и удельной активности самцов или самок на меньшие показатели. Статистическую обработку полученных данных проводили, пользуясь компьютерной программой "Excel" и специальным руководством [18].

Подробное описание методических приёмов, использованных в данном исследовании, представлено в работах [19–20].

Результаты исследования и обсуждение

Как следует из результатов электрофоретического анализа, водорастворимые фракции карбоксиэстераз как самок, так и самцов представлены 4–5 изоформами ферментов в зависимости от генотипа анализируемых особей. Отражённые на электрофореграммах (рис. 1–3) изоформы эстераз хорошо идентифицируются в виду того, что проявляют избирательную активность по отношению к α - и β -нафтилацетатам. Одни из них лучше гидролизуют β -производные, другие — α -производные нафтаола. Качественно-количественные различия в экспрессии индивидуальных изоформ карбоксиэстераз самоцов и самок имаго дрозофилы наглядно демонстрируют денситограммы соответствующих гелевых блоков, изображённых на рис. 1–3.

Проведение компьютерной денситометрии позволило определить параметры оптической плотности каждой отдельно выявленной фракции, что в целом характеризует уровень её активности по отношению к тому или иному субстрату. В табл. 1 приведены средние данные, отражающие уровень экспрессии и активности 4 (5) основных изоформ карбоксиэстераз в расчёте на одну особь определённого пола, на 1 мг массы одной самки или самца, а также на 1 мг экстрагирующегося белка, полученного от одной особи. Ввиду того, что самки, как по параметрам массы тела ($\bar{m} = 1,4 \pm 0,042$ мг), так и по содержанию общего экстрагирующегося белка ($[\bar{P}] = 10,1 \pm 0,425$ мг на 1 мл экстракта), существенно отличаются от самцов ($\bar{m} = 0,6 \pm 0,036$ мг; $[\bar{P}] = 3,7 \pm 0,141$ мг/мл), половые различия, выраженные в показателях удельной активности, оказались более значительными. Об этом свидетельствуют и коэффициенты половых различий (Kd) для каждой соответствующей изоформы карбоксиэстеразы.

Как видно из приведенной таблицы, половые различия менее всего заметны по экспрессии карбоксиэстераз 2, 3 и 4. Так, уровень общей (в расчёте на 1 особь) активности изоформы 2, определяемой по гидролизу α -нафтилацетата, у самок оказался всего лишь в 1,2 раза выше уровня активности соответствующей карбоксиэстеразы у самцов. В то же время при гидролизе β -нафтилацетата в присутствии твина 80 половых различий по этой форме фермента не обнаружено. Что касается уровней удельной (в расчёте на единицу массы или белка) активности, то их соотношение между самками и самцами определяется коэффициентами половых различий в интервале от 1,9 до 2,8 в зависимости от условий проявления активности карбоксиэстеразы. Сходная зависимость удельной активности от пола имагинальных особей характерна и для изоформы номер 3. В этом случае показатели Kd представлены в интервале от 2,3 до 4,5.

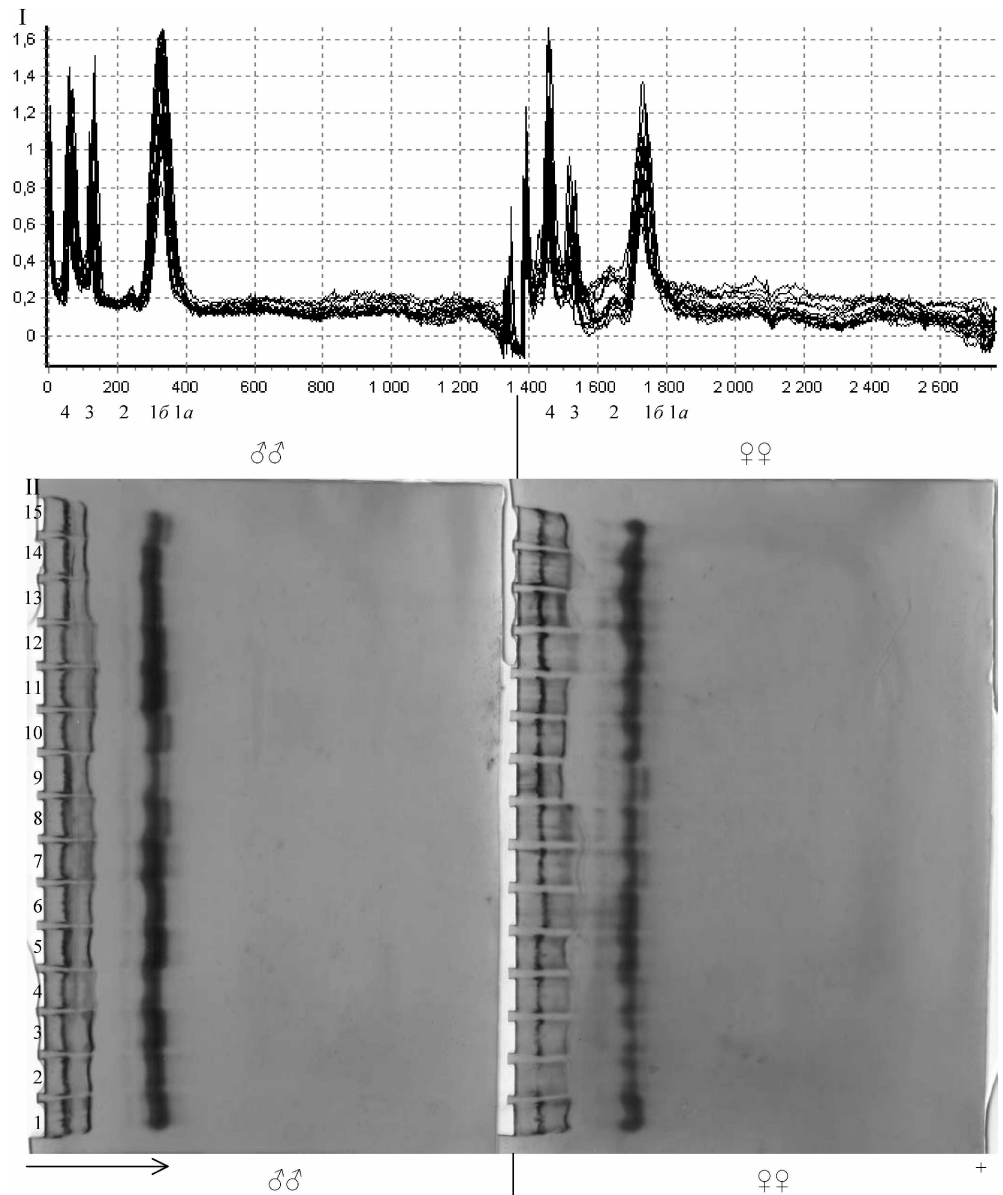


Рис. 1. Различия экспрессии карбоксиэстераз у имаго *Drosophila melanogaster* дикого типа, выявляемые по α - и β -нафтилацетатам:

I — денситограммы (на графике изображены 15 линий изменения оптической плотности, характеризующих экспрессию ферментов у 15 самцов и 15 самок), II — электрофореграммы; 1–15 — номера слотов, стрелкой указано направление движения изоформ в гелевом блоке; 1a (б)–4 — порядковые номера изоформ; на денситограммах по оси x — длины треков двух сравниваемых гелевых пластинок (пиксели), по оси y — оптическая плотность (ΔDo , условные единицы)

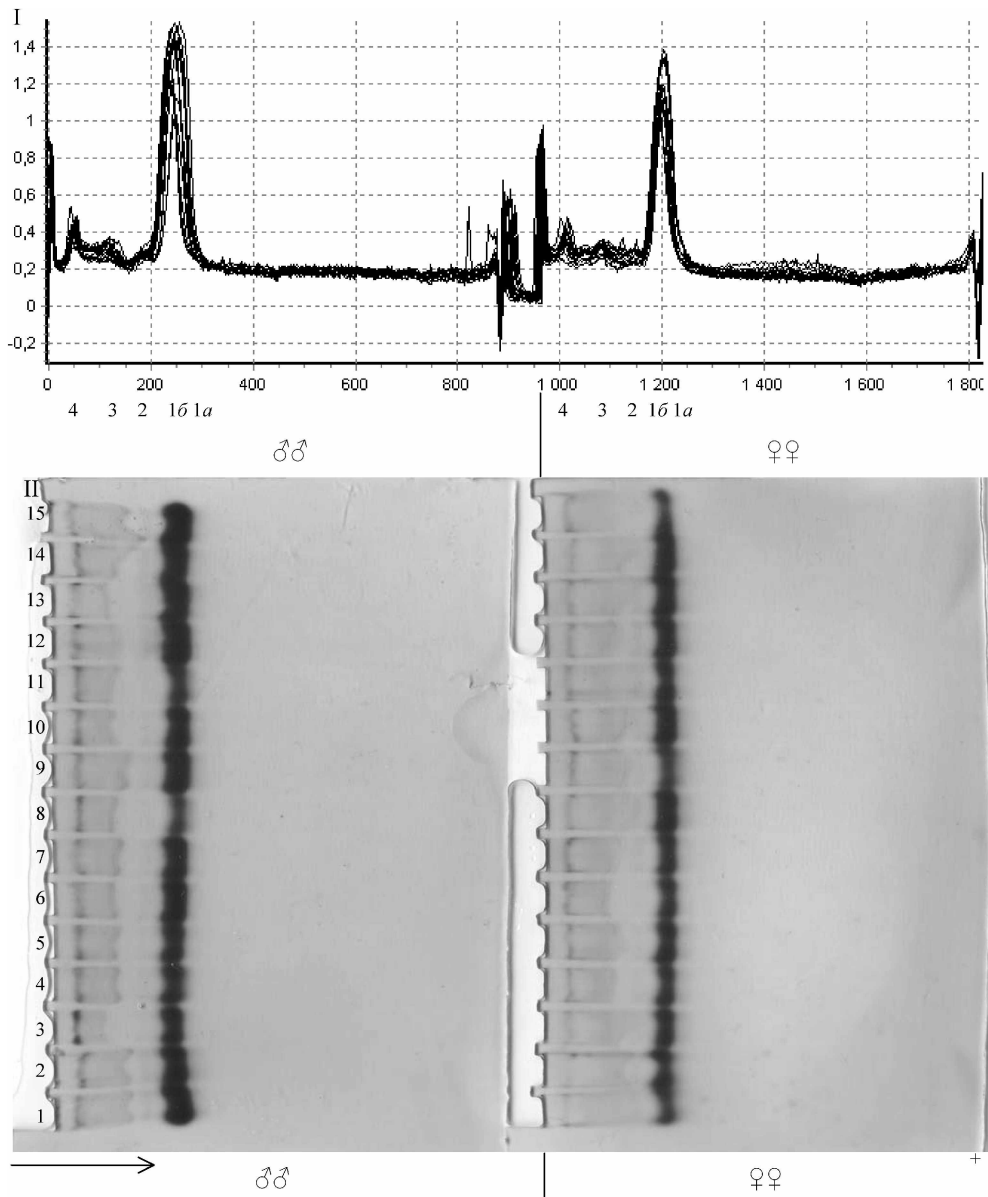


Рис. 2. Различия экспрессии карбоксиэстераз у имаго *Drosophila melanogaster* дикого типа, выявляемые по β -нафтилацетату в присутствии сорбитан-моноолеата:

Обозначения те же, что и на рис. 1

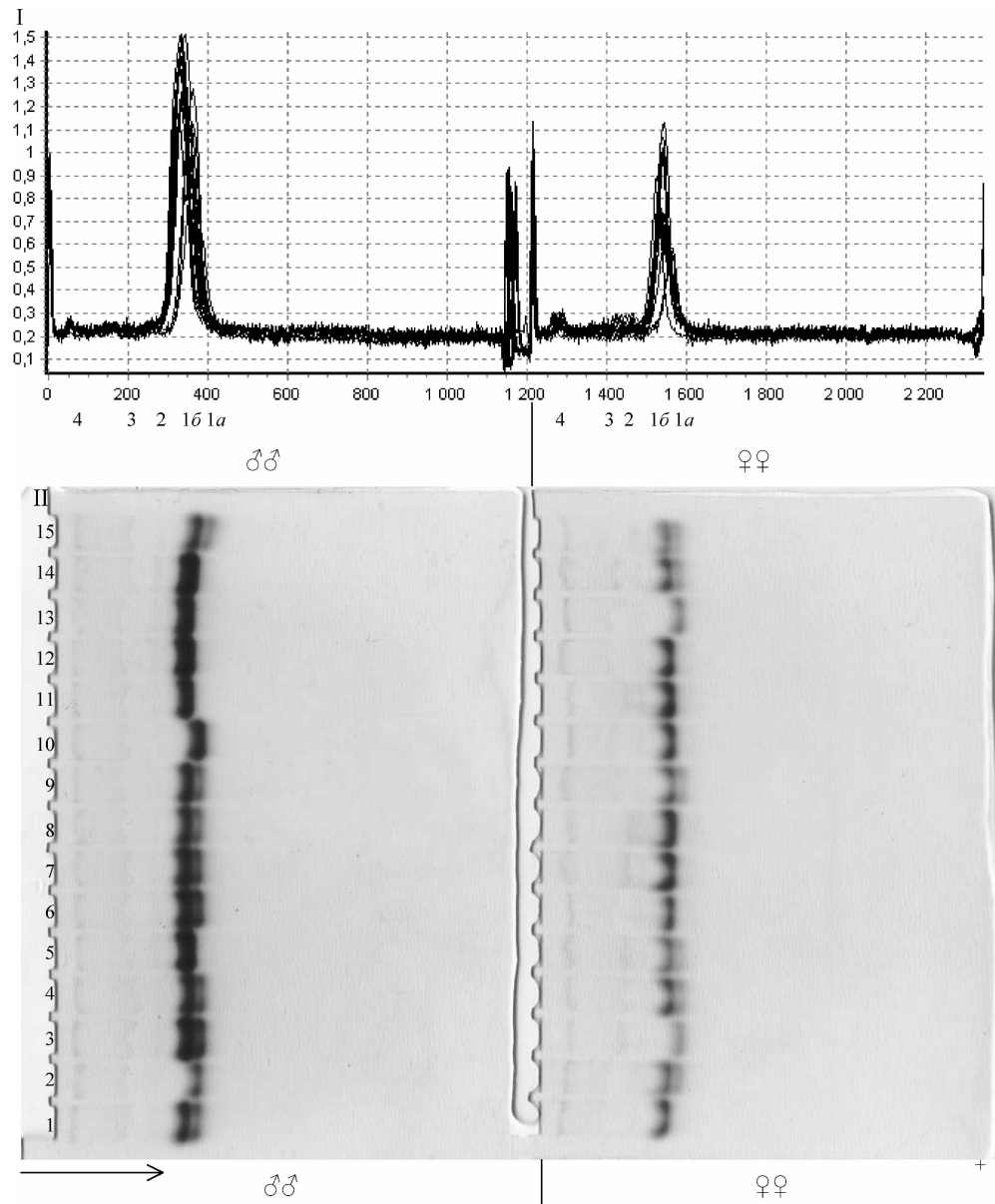


Рис. 3. Различия экспрессии карбоксиэстераз у имаго *Drosophila melanogaster* дикого типа, выявляемые по β -нафтилацетату в присутствии сорбитан-триолеата:

Обозначения те же, что и на рис. 1

Таблица 1

Сравнительная характеристика экспрессии и активности изоформ карбоксиэстераз самцов и самок имаго *Drosophila melanogaster* дикого типа

| Имаго ($m \pm s_{\bar{x}}; n = 3 - 10$ (1a), 13 - 15 (1б), 14 - 15 (2), 15 (3), 15 (4) для каждого из вариантов А, Б, В) | | | | | | | | | | Kd |
|---|----------------|------------------|----------------|-----------------|-------|----------------|------------------|----------------|-----------------|---------------|
| Самцы | | | | | Самки | | | | | |
| А. Субстраты: α -нафтилацетат - β -нафтилацетат | | | | | | | | | | |
| If | Rf | ΔDo_{ex} | ΔDo_m | $\Delta Do [P]$ | If | Rf | ΔDo_{ex} | ΔDo_m | $\Delta Do [P]$ | |
| 1a | 0,270 ± 0,0620 | 0,553 = 0,062 | 0,922 = 0,103* | 0,149 ± 0,017* | 1a | 0,273 ± 0,0330 | 0,445 ± 0,053 | 0,318 ± 0,038* | 0,044 ± 0,005* | 1,2; 2,9; 3,4 |
| 1б | 0,246 ± 0,0013 | 1,350 = 0,064* | 2,250 = 0,107* | 0,365 ± 0,017* | 1б | 0,251 ± 0,0020 | 0,945 ± 0,061* | 0,675 ± 0,044* | 0,094 ± 0,006* | 1,4; 3,3; 3,9 |
| 2 | 0,178 ± 0,0014 | 0,210 = 0,006* | 0,350 = 0,010* | 0,057 ± 0,002* | 2 | 0,188 ± 0,0020 | 0,253 ± 0,026* | 0,181 ± 0,019* | 0,025 ± 0,003* | 1,2; 1,9; 2,3 |
| 3 | 0,097 ± 0,0012 | 0,971 ± 0,076* | 1,618 ± 0,127* | 0,262 ± 0,021* | 3 | 0,107 ± 0,0020 | 0,590 ± 0,056* | 0,421 ± 0,040* | 0,058 ± 0,006* | 1,6; 3,8; 4,5 |
| 4 | 0,050 ± 0,0011 | 1,110 = 0,052 | 1,850 = 0,087* | 0,300 ± 0,014* | 4 | 0,051 ± 0,0013 | 1,040 ± 0,088 | 0,743 ± 0,063* | 0,103 ± 0,009* | 1,1; 2,5; 2,9 |
| Б. Субстраты: β -нафтилацетат + сорбитан-моноолеат | | | | | | | | | | |
| 1a | — | — | — | — | 1a | — | — | — | — | — |
| 1б | 0,272 ± 0,0020 | 1,371 = 0,040* | 2,285 = 0,067* | 0,371 ± 0,011* | 1б | 0,278 ± 0,0010 | 1,180 ± 0,034* | 0,843 ± 0,024* | 0,117 ± 0,003* | 1,2; 2,7; 3,2 |
| 2 | 0,209 ± 0,0023 | 0,288 = 0,006 | 0,480 = 0,010* | 0,078 ± 0,002* | 2 | 0,210 ± 0,0030 | 0,281 ± 0,010 | 0,201 ± 0,007* | 0,028 ± 0,001* | 1,0; 2,4; 2,8 |
| 3 | 0,134 ± 0,0038 | 0,324 = 0,008 | 0,540 = 0,013* | 0,088 ± 0,002* | 3 | 0,133 ± 0,0050 | 0,310 ± 0,011 | 0,221 ± 0,008* | 0,031 ± 0,001* | 1,0; 2,4; 2,8 |
| 4 | 0,053 ± 0,0010 | 0,435 = 0,013* | 0,725 = 0,022* | 0,118 ± 0,004* | 4 | 0,055 ± 0,0020 | 0,376 ± 0,020* | 0,269 ± 0,014* | 0,037 ± 0,002* | 1,2; 2,7; 3,2 |

Половые различия активности карбоксиэстераз у дрозофилы

| В. Субстраты: β -нафтилацетат + сорбитан-триолат | | | | | | | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| 1a | 0.320 ± 0.0030 | 0.945 ± 0.061* | 1.575 ± 0.102* | 0.255 ± 0.016* | 1a | 0.313 ± 0.0020 | 0.493 ± 0.022* | 0.352 ± 0.016* | 0.049 ± 0.002* | 1.9; 4.5; 5.2 |
| 1б | 0.293 ± 0.0020 | 1.348 ± 0.040* | 2.247 ± 0.067* | 0.364 ± 0.011* | 1б | 0.288 ± 0.0012 | 0.870 ± 0.043* | 0.621 ± 0.031* | 0.086 ± 0.004* | 1.5; 3.6; 4.2 |
| 2 | 0.219 ± 0.0020 | 0.249 ± 0.005 | 0.415 ± 0.008* | 0.067 ± 0.001* | 2 | 0.209 ± 0.0041 | 0.257 ± 0.008 | 0.184 ± 0.006* | 0.025 ± 0.001* | 1.0; 2.3; 2.7 |
| 3 | 0.147 ± 0.0020 | 0.245 ± 0.004 | 0.408 ± 0.007* | 0.066 ± 0.001* | 3 | 0.149 ± 0.0042 | 0.249 ± 0.005 | 0.178 ± 0.004* | 0.025 ± 0.001* | 1.0; 2.3; 2.6 |
| 4 | 0.044 ± 0.0010 | 0.260 ± 0.003* | 0.433 ± 0.005* | 0.070 ± 0.001* | 4 | 0.060 ± 0.0021 | 0.285 ± 0.006* | 0.204 ± 0.004* | 0.028 ± 0.001* | 1.1; 2.1; 2.5 |

Примечание: I_f — изоформы и их порядковые номера; R_f — относительная электрофоретическая подвижность; $\Delta Do/ex$ — относительная экспрессия, выраженная через оптическую плотность (условные единицы), в расчёте на одну особь; $\Delta Do/m$ — удельная активность в расчёте на 1 мг массы одной особи, $\Delta Do/[\bar{P}]$ — удельная активность в расчёте на 1 мг общего белка, содержащегося в экстракте тканей одной особи; Kd — коэффициент отличия; * — различия по сравниваемым параметрам — относительной экспрессии и удельной активности — у самцов и самок достоверны при $P < 0,05$; — отсутствие изоформы и её параметров

Карбоксиэстераза 4 более выражено проявляется у самок, и это имеет место только в случае расщепления β -нафтилацетата.

Наибольший интерес, с нашей точки зрения, вызывает активность β -фильной карбоксиэстеразы 1, представленной аллозимными вариантами *a* и *b*. Независимо от подбора субстратов, используемых для выявления изоформ карбоксиэстераз, этот фермент всегда проявляет большую активность у самцов имаго дрозофилы, особенно в расчёте на единицу массы одной особи или единицу общего протеина, экстрагируемого из одной мухи. При этом коэффициенты половых различий (табл. 1), найденные по результатам всех вариантов экспериментов, колеблются в диапазоне от 1,2 до 5,2.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые в эксперименте различия в активности отдельных изоформ карбоксиэстераз (особенно, по β -фильному ферменту) являются неслучайными и могут рассматриваться как стабильные биохимические характеристики изучаемого вида.

Выводы

1. По показателям относительной и удельной активности большинства изоформ карбоксиэстераз самки имаго *Drosophila melanogaster* дикого типа значительно уступают самцам. При этом коэффициенты различий составляют 1,2–5,2.

2. Наиболее показательным признаком полового диморфизма является экспрессия β -фильной карбоксиэстеразы.

Литература

1. Геодакян В. А. Эволюционная роль половых хромосом (новая концепция) // Генетика. — 1998. — Т. 34, № 8. — С. 1171–1184.
2. Геодакян В. А. Половые хромосомы: для чего они? (Новая концепция) // Докл. Российской Академии наук. — 1996. — Т. 346, № 4. — С. 565–569.
3. Антипин М. И., Ракицкая Т. А., Имашева А. Г. Стабильность развития и изменчивость морфологических признаков в природной популяции *Drosophila melanogaster*: сезонная динамика 1999 г. // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 1. — С. 66–72.
4. Лобков В. А. Крапчатый суслик Северо-Западного Причерноморья: биология, функционирование популяций. — О.: Астропринт, 1999. — 272 с.
5. Голубцов А. С. Внутрипопуляционная изменчивость животных и белковый полиморфизм. — М.: Наука, 1988. — 168 с.
6. Эрман Л., Парсонс П. Генетика поведения и эволюция. — М.: Мир, 1984. — 562 с.
7. Тинберген Н. Поведение животных. — М.: Мир, 1985. — 192 с.
8. Зорина Э. А., Полетаева И. И., Резникова Ж. И. Основы этологии и генетики поведения. — М.: МГУ, 1999. — 383 с.
9. Ruvolo-Takasusuki Maria Claudia C., Collet Thais. Characterization of *Nasutitermes globiceps* (Isoptera: Termitidae) esterases // Biochem. Genet. — 2000. — V. 38, N 11–12. — P. 367–375.
10. Щеглова Н. В., Илясов Ю. И. К вопросу об эстеразах у карпа (*Cyprinus carpio* L.) // В кн. "Биохимическая и популяционная генетика рыб". Материалы совещания. — Л., 1979. — 184 с.
11. Алексеев Ф. Е., Алексеева Е. И., Титова Н. В. Полиморфная система мышечных эстераз, экологическая структура поселений и исследование структуры вида у макроруса

- (*Macrurus rupestris* Guhn.) // Биохимическая и популяционная генетика рыб: Материалы совещания. — Л., 1979. — 184 с.
12. Тоцкий В. Н., Есеркепова Е. В., Джан З. У. Ген-энзимная система эстеразы-6 и устойчивость дрозофилы к повышенной температуре // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 3. — С. 342–348.
 13. Корочкин Л. И. Клонирование, экспрессия, регуляция тканеспецифических генов у дрозофилы // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 8. — С. 1029–1042.
 14. Балакирев Е. С., Айала Ф. Дж. Нуклеотидная изменчивость β -эстеразных генов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Успехи соврем. биологии. — 2004. — Т. 124, № 4. — С. 378–389.
 15. Андриевский А. М., Кучеров В. А., Тоцкий В. Н., Деркач Е. В. Онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10. — Вип. 5. — С. 26–35.
 16. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
 17. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, N 1. — P. 265–275.
 18. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.
 19. Андриевский А. М., Кучеров В. А., Тоцкий В. Н. Методические проблемы изучения полиморфизма карбоксиэстераз в онтогенезе *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ. — 2004. — Т. 9. — Вип. 1. — С. 15–24.
 20. Андриевский А. М., Кучеров В. А. Выделение и идентификация карбоксиэстераз *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ. — 2004. — Т. 9. — Вип. 5. — С. 11–22.

О. М. Андриевський, В. О. Кучеров, О. П. Кундієва

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра генетики та молекулярної біології
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, E-mail: andriev_scar@mail.ru

СТАТЕВІ ВІДМІННОСТІ АКТИВНОСТІ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПУ

Резюме

Використовуючи метод лужного електрофорезу в поліакриламідному гелі, розділяли множинні молекулярні форми карбоксиестераз самців і самок дрозофіли. Рівень експресії кожної форми ферментів визначали шляхом денситометрування гелевих блоків, що містили фіксовані діазонієм продукти гідролізу нафтолових ефірів нижчих карбонових кислот. Встановлено істотні розходження в активності карбоксиестераз самок і самців імаго. Дано якісно-кількісну оцінку досліджуваній біохімічній ознаці статевого диморфізму.

Ключові слова: дрозофіла, статевий диморфізм, карбоксиестерази.

A. M. Andrievsky, V. A. Koocherov, H. P. Koondieva

Odessa National I. I. Mechnikov University,

Department of Genetics and Molecular Biology,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine, E-mail: andriev_scar@mail.ru

**SEXUAL DIFFERENCES IN ACTIVITY OF THE
CARBOXYESTERASES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*
OF THE WILD TYPE**

Summary

Using the method of the alkaline electrophoresis in the polyacrylamid gel we divided various molecular forms of the carboxyesterases of the drosophila males and females. The level of expression of each form has been determined with the help of densitometry of gel blocks that contain products of the hydrolysis of the naphthol ethers of the elementary carbonaceous acids fixed by diazonium. Some essential differences in activity of the carboxyesterases in imago males and females have been found. Quantitative — qualitative estimate of the studied biochemical characteristics of the sexual dimorphism has been made.

Keywords: drosophila, sexual dimorphism, carboxyesterases.