

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., **В. Н. Тоцкий**, д-р биол. наук, проф.,
зав. каф., **Е. В. Деркач**, магистр

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Используя метод компьютерной денситометрии, проводили сравнительный качественно-количественный анализ экспрессии карбоксиэстераз в онтогенезе дрозофилы после их электрофоретического разделения в полиакриламидном геле и выявления активности по способности расщеплять сложные эфиры низших и высших карбоновых кислот. Установлено, что максимум экспрессии нафтилацетазной активности совпадает с имагинальной фазой развития плодовой мухи, тогда как пик активации липаз сопряжён с куколочной стадией онтогенеза. Показаны генетически зависимые индивидуальные и половые различия в проявлении активности карбоксиэстераз у репродуктивно-способных особей дрозофилы. Приведены популяционно-статистические показатели уровня экспрессии карбоксиэстераз в онтогенезе лабораторной линии дрозофилы дикого типа.

Ключевые слова: карбоксиэстеразы, онтогенез, дрозофила.

Индивидуальное развитие организмов сопровождается радикальными изменениями в активности многих ферментных систем [1, 2]. При этом причиной наблюдаемых явлений могут быть те или иные перестройки и сдвиги как на уровне генотипа, так и на паратипическом уровне [3].

Как отмечается в ряде работ [4–6], многие протеолитические и эстеразные ферменты (КФ 3.4; КФ 3.1.1.1 – 10), выполняя в организме важную роль поддержания физиологического баланса свободных и связанных органических кислот, могут вполне адекватно отражать онтогенетические преобразования и демонстрировать адаптационные возможности организма при переходе от одной фазы развития к другой [7]. К сожалению, гидролитические ферменты, и в частности карбоксиэстеразы, в онтогенезе многих видов животных не исследованы, что затрудняет обобщение и систематизацию научных данных. Всё же имеются единичные сообщения о возрастных различиях активности эстераз у отдельных видов рыб [8–10], термитов [11], мух [12] и некоторых других беспозвоночных [13]. При этом, чаще всего онтогенетическая динамика исследуемых ферментов в цитируемых работах представлена фрагментарно и не отражает особенностей всех стадий развития от яйца до взрослой особи.

С учётом этого в данной работе ставится цель изучить динамику экспрессии карбоксиэстераз в онтогенезе лабораторной линии дикого

типа *Drosophila melanogaster*. Поскольку в ранее опубликованной статье [14] было установлено, что на стадии эмбрионального развития дрозофилы выявляется лишь следовая активность исследуемых ферментов, в настоящей работе внимание сосредоточено на постэмбриональном развитии мух.

В задачи исследования входило: 1) обнаружить индивидуальные особенности в экспрессии ацилэстераз и липаз у дрозофилы; 2) изучить многообразие форм карбоксиэстераз на стадиях личинки, куколки и имаго; 3) выявить половые различия в экспрессии изоформ ацилэстераз репродуктивно-способных особей; 4) провести сравнительный анализ экспрессии ацилэстераз и липаз на разных стадиях постэмбрионального развития насекомого.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследований служили 3-суточные личинки, куколки и имаго единой искусственной популяции *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типа. Мух содержали на стандартной питательной среде [15] при постоянной температуре (25 °С).

Для получения экстрактов тканей отдельно взятых личинок, куколок, самцов и самок имаго (предварительно наркотизированных диэтиловым эфиром) исследуемый материал гомогенизировали в эппендорфах в течение 2 минут в 20 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0, содержащего 1 % тритона X-100. Гомогенаты центрифугировали при 12 000 g в течение 15 минут при +4 °С, после чего к 20 мкл надосадочной жидкости добавляли по 10 мкл 0,01 % раствора бромфенолового синего, содержащего 60 % сахарозы.

Приготовленные таким образом биологические пробы (14 вариантов экстрактов личинок, 14 — экстрактов куколок, 7 — экстрактов самцов имаго, 7 — экстрактов самок имаго) подвергали электрофорезу в системе щелочного (pH 8,3) вертикально-пластинчатого 10 % полиакриламидного геля. После электрофореза каждый гелевый блок соответствующей пары рабочих пластин разрезали пополам с целью дальнейшего сравнения экспрессии нафтилацетазной и липазной активностей у одних и тех же особей. Каждую половину геля отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и замачивали на 15 минут в 25 мл 0,1 М трис-глицинового буфера pH 7,4. Одни из половинок двух параллельных гелевых блоков помещали в среду того же буфера объемом 25 мл с добавкой 12 мг α -нафтилацетата, 12 мг β -нафтилацетата и 25 мг синего прочного В; другие — заливали 25 мл 0,2 % твина 85, приготовленного на трис-глициновом буфере, содержащем 0,4 % CaCl_2 . Гели в среде с нафтилацетатами инкубировали 1 час, в среде с сорбитан-триолеатом — 2 часа при температуре 25 °С. Ферментативный гидролиз нафтоловых эфиров останавливали, заливая гели дистиллятом, доведенным до температуры кипения. Реакцию расщепления твина прекращали, обрабатывая гели в течение 15 минут 25 мл 1 % раствора уксуснокислого свинца. Образующийся в геле в местах локализации липаз осадок "свинцового мыла" выявляли с помощью 1 % раствора сульфида натрия (объем — 25 мл), выдерживая в нём гель 15 минут.

После тщательного промывания соответствующие друг другу половинки гелевых блоков совмещали и денситометрировали, используя специальную компьютерную программу "АнаИС". Уровень экспрессивности изучаемых ферментов оценивали по показателям оптической плотности каждой изоформы карбоксиэстеразы в расчёте на количество биологического материала, полученного от одной особи. Статистическую обработку первичных данных проводили согласно [16]. В работе использованы реактивы зарубежных фирм "Reanal" (Венгрия), "Chemapol" (Чехия), "Serva" (Германия). Аналитический электрофорез осуществляли с помощью прибора "VE-4" российского производства.

Выявление карбоксиэстераз в полиакриламидном геле с использованием синтетических эфиров низших и высших карбоновых кислот проводили в соответствии с классическими гистохимическими методами Гомори [17] и Чейна [18].

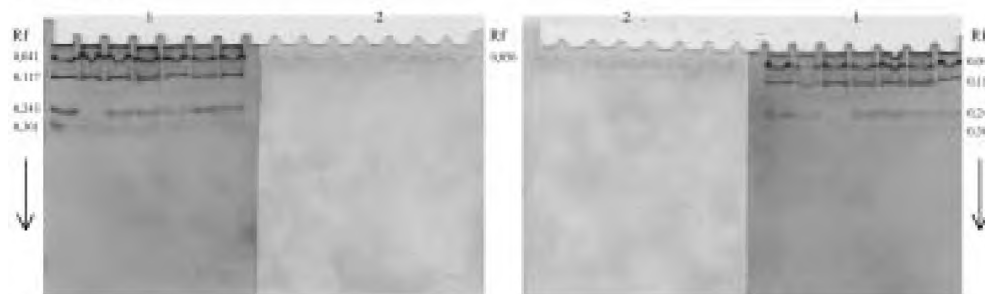
Результаты исследования и обсуждение

Анализ уровня экспрессии различных молекулярных форм карбоксиэстераз, проявляющих как нафтилацетазную, так и липазную активность, показал, что на всех стадиях постэмбрионального развития у особей дрозофилы наблюдаются индивидуальные различия, особенно характерные для фракций ферментов с R_f 0,230 и 0,250 (рис. 1–2, табл. 1). На стадии имаго, кроме того, ярко выражены половые различия, связанные с более высоким уровнем экспрессии карбоксиэстеразы 1 (R_f 0,250) у самцов по сравнению с таковым у самок. Так, средний показатель экспрессии этого фермента, представленный в условных единицах оптической плотности, у особей мужского пола оказался в 2 раза более высоким по сравнению с тем же параметром у самок. В связи с этим есть основания полагать, что более высокий уровень экспрессии данного фермента у самцов связан с дополнительной локализацией его в тканях репродуктивного аппарата [19].

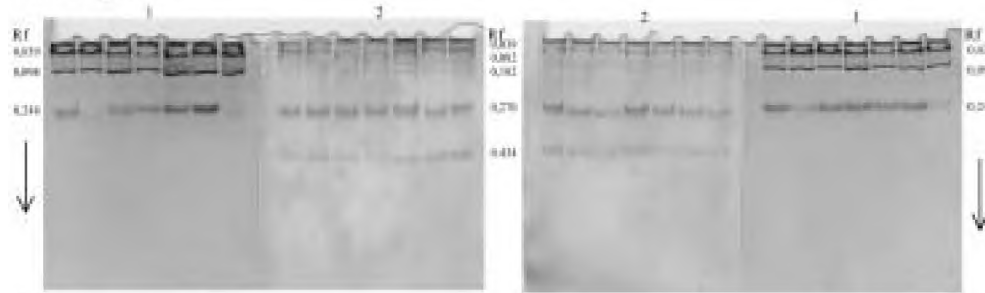
Результаты данного исследования указывают на то, что наличие, а также уровень экспрессии изучаемых карбоксиэстераз в тканях находятся в определённой зависимости от стадии постэмбрионального развития дрозофилы. Следует подчеркнуть, что набор молекулярных форм карбоксиэстераз, проявляющих как α -фильность, так и β -фильность по отношению к нафтол-производным уксусной кислоты, в ходе онтогенеза не изменяется. Тем не менее, от стадии личинки к стадии куколки и далее к стадии взрослой мухи наблюдается постепенное нарастание уровня экспрессии отдельных форм эстераз (например, эстеразы 4, эстеразы 3, эстеразы 1). В отличие от этого, стадия личинки характеризуется крайне слабой выраженностью экспрессии липаз. Их изоформы представлены всего лишь двумя электрофоретически слабоподвижными вариантами (R_f 0,056 и 0,117). Слабая активность липолитических ферментов у личинок скорее всего связана с тем, что на этой фазе развития насекомого не только не используется жиры в качестве источника питания, но и не реализует ассимилируемые им липиды как энергетический ресурс [20, 21]. Более того, поскольку на электрофореграммах локализация эстеразных и липазных полос у ли-

чинок практически совпадает, можно предположить, что функцию липаз на этой стадии развития мух выполняют эстераза 4 и эстераза 3. Есть данные [14], что по физико-химическим свойствам эти ферменты более всего соответствуют ацетилхолинэстеразе и С-эстеразе.

I. Стадия личинки



II. Стадия куколки



III. Стадия имаго: личинка

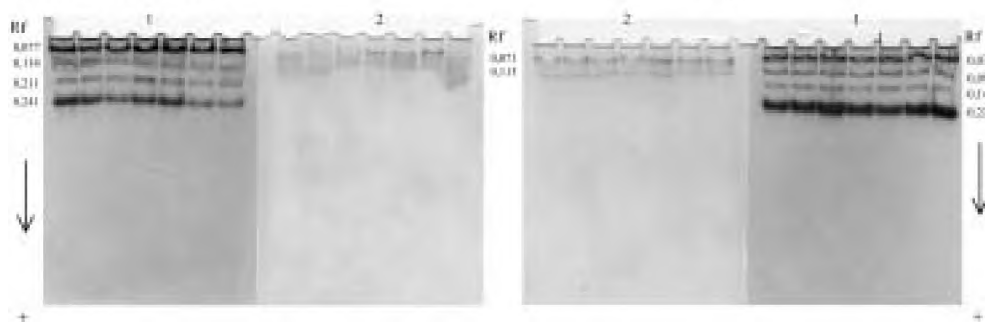


Рис. 1. Качественные изменения экспрессии карбоксиэстераз в онтогенезе *Drosophila melanogaster* Meigen: 1 — нафтилацетазная активность; 2 — липазная активность. Стрелками указано направление движения ферментов в геле

Примечательно то, что на стадии личинки карбоксиэстераза 1, проявляющая β -нафтилацетазную активность, совершенно не обладает способностью расщеплять твин 85. Судя по результатам данного исследования, максимально выраженные онтогенетические преобразования в системе карбоксиэстераз происходят на куколочной стадии развития дрозофилы.

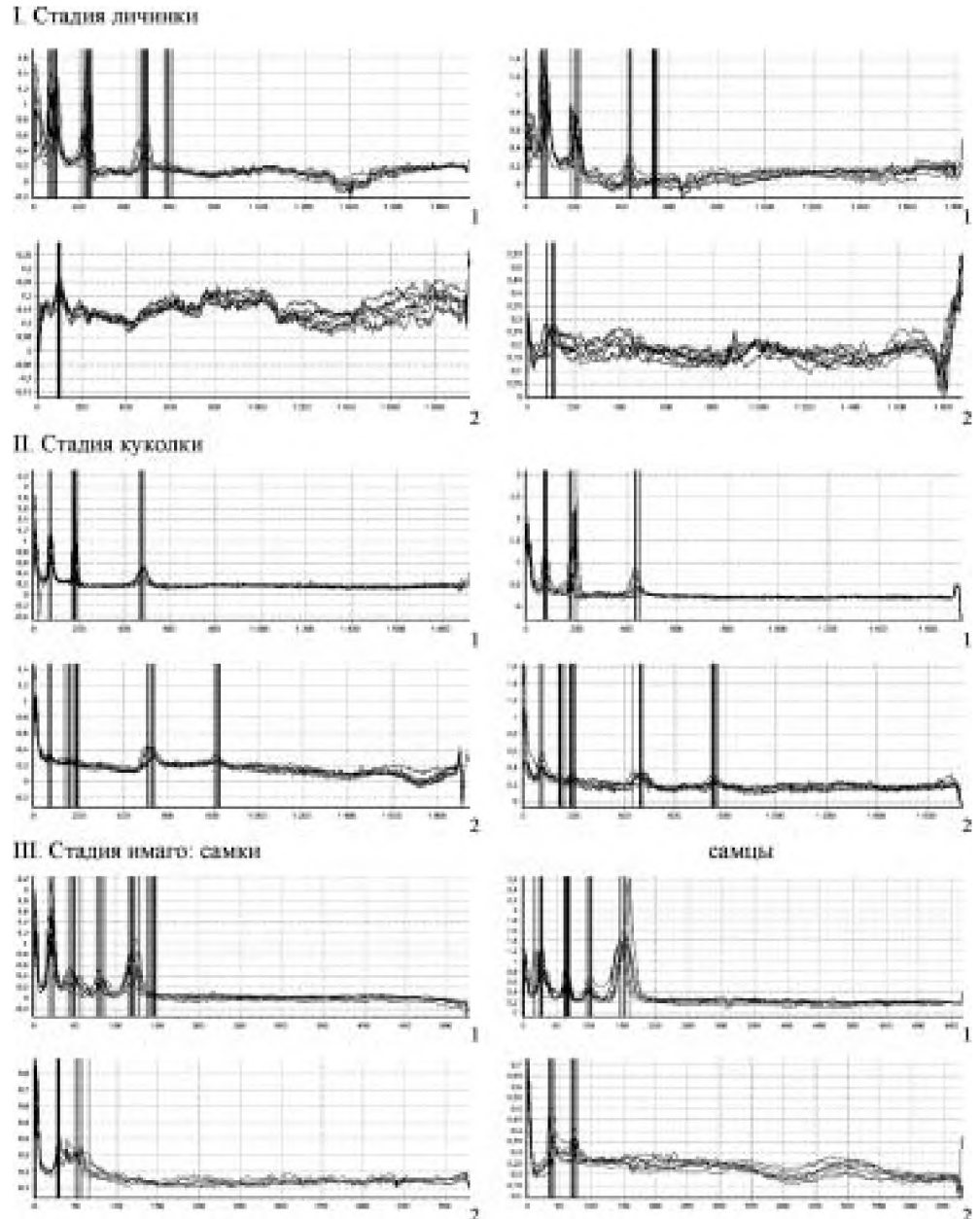


Рис. 2. Количественные изменения экспрессии карбоксиэстераз в онтогенезе *Drosophila melanogaster* Meigen: На денситограммах: по оси x — расстояние от линии старта до линии фронта на гелевом блоке (пиксели); по оси y — оптическая плотность фракций, соответствующих локализации карбоксиэстераз в гелевом блоке (условные единицы). 1 — нафтилацетазная активность; 2 — липазная активность

Таблица 1

Онтогенетические изменения экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* Meigen

Стадии развития	Изоформы карбоксиэстераз, Rf (M ± m; n = 7 – 14)	Экспрессия карбоксиэстераз, Od (M ± m; n = 7 – 14)		
		Нафтилацетазная	Липазная	
I. Личиночная	0,041 ± 0,002	1,300 ± 0,040	—	
	0,056 ± 0,003	—	0,252 ± 0,008	
	0,117 ± 0,003	0,924 ± 0,103	0,190 ± 0,006	
	0,243 ± 0,004	0,359 ± 0,062	—	
	0,301 ± 0,003	0,129 ± 0,020	—	
II. Куколичная	0,039 ± 0,001	0,972 ± 0,062	0,388 ± 0,023	
	0,082 ± 0,005	—	0,267 ± 0,007	
	0,098 ± 0,003	1,666 ± 0,176	—	
	0,102 ± 0,002	—	0,299 ± 0,007	
	0,248 ± 0,002	0,500 ± 0,048	—	
	0,270 ± 0,003	—	0,350 ± 0,013	
III. Имагинальная	самки	0,077 ± 0,001	1,397 ± 0,150	—
		0,086 ± 0,001	—	0,345 ± 0,035
		0,114 ± 0,002	0,409 ± 0,038	—
		0,120 ± 0,004	—	0,318 ± 0,015
		0,157 ± 0,003	0,349 ± 0,034	—
		0,211 ± 0,003	0,718 ± 0,091	—
	0,241 ± 0,003	0,063 ± 0,008	—	
	самцы	0,036 ± 0,002	1,142 ± 0,083	—
		0,056 ± 0,002	—	0,370 ± 0,022
		0,096 ± 0,001	0,674 ± 0,035	—
		0,106 ± 0,002	—	0,361 ± 0,009
		0,149 ± 0,001	0,509 ± 0,038	—
0,229 ± 0,003		1,560 ± 0,181	—	

Примечание: приведенные в таблице данные по экспрессии ферментов отражают средние показатели оптической плотности (Od, условные единицы) фракций в гелевом блоке, соответствующих локализации изоформ карбоксиэстераз; — — активность исследуемого фермента не выявлена.

Наряду с хорошо выраженной липолитической активностью двух медленноподвижных форм α-фильных эстераз, имеет место экспрессия β-фильного фермента, с нафтилацетазной активностью которого ассоциирована способность гидролизовать эфиры высших карбоновых кис-

лот. Кроме того, только на этой стадии онтогенеза экспрессируется истинная липаза, не обладающая нафтилацетатной активностью. Этот фермент среди тестируемых карбоксиэстераз дрозофилы стоит на первом месте по электрофоретической подвижности ($R_f = 0,434$). Функция *in vivo* этой липазы, а также β -эстеразы 1, обладающей липазной активностью, скорее всего связана с реализацией на стадии куколки депонированных в клетках жирового тела липидов, поскольку с переходом к следующей фазе развития полностью утрачивается способность какой-либо из указанных форм карбоксиэстераз гидролизовать эфир олеиновой кислоты. Так же, как у личинок и куколок, у самцов и самок имаго одновременно эстеразной и липазной активностью обладают две медленно подвижные α -фильные формы карбоксиэстераз, однако степень их активности по отношению к твину менее выражена по сравнению с таковой на стадии куколки.

В отличие от выраженных половых различий в проявлении β -эстеразной активности, различия в экспрессии липаз у самцов и самок едва заметны: средние показатели оптической плотности соответствующих фракций ферментов у этих особей практически совпадают (рис. 2, табл. 1). Среднестатистические данные, отражающие онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстеразы 1, как наиболее показательного фермента, представлены на рис. 3.

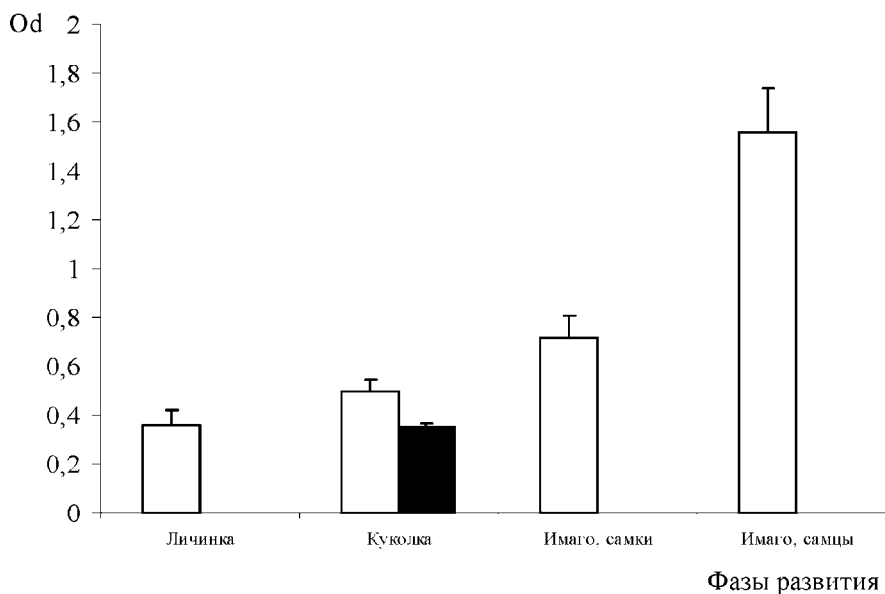


Рис. 3. Онтогенетические изменения экспрессии β -фильной карбоксиэстеразы у *Drosophila melanogaster* Meigen: Представлены показатели оптической плотности (Od, условные единицы) фракций, соответствующих локализации ферментов в гелевом блоке. □ — нафтилацетатная активность, ■ — липазная активность

Как видно из рисунка, на куколичной стадии изучаемый фермент проявляет двойственную функцию: с одной стороны гидролизует β -нафтилацетат, с другой — твин. При этом он ведёт себя как эстеро-

липаза, в отличие от других форм карбоксиэстеразы, проявляющих на стадиях личинки и имаго исключительно β -нафтилацетазную активность. Не исключено, что наблюдаемая бифункциональность описываемого фермента может оказаться артефактом, поскольку проявление липазной активности может быть сопряжено с особым энзимом, электрофоретические характеристики которого близки или полностью совпадают с таковыми β -нафтилацетазы. Это же может относиться и к другим изоформам карбоксиэстераз, проявляющих липазную активность. Поэтому для окончательного заключения необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

Выводы

1. Генетически однородная по внешним фенотипическим признакам лабораторная линия дрозофилы дикого типа (линия Normal) характеризуется разной экспрессивностью карбоксиэстеразы на стадиях личинки, куколки и имаго. При этом наблюдаются специфические изменения липазной и нафтилацетазной активностей карбоксиэстераз с максимальной экспрессией на стадиях куколки и имаго.

2. Индивидуальные и половые различия у имаго наиболее характерны для карбоксиэстеразы 1, обладающей β -нафтилацетазной активностью.

3. На стадии куколки наряду с β -нафтилацетазой, ассоциированной с липолитической активностью, экспрессируется липаза, не обладающая способностью расщеплять нафтилацетаты.

4. Совпадение либо близкое расположение зон проявления нафтилацетазной и липазной активностей в гелевых блоках может быть связано как с групповой субстратной специфичностью одних и тех же форм карбоксиэстераз, так и с наличием разных ферментов со сходными электрофоретическими характеристиками.

Литература

1. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и соавт. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
2. Корочкин Л. И. Молекулярно-генетические механизмы регуляции тканеспецифической экспрессии генов *est S* у дрозофилы // Мол. биология. — 2000. — Т. 34, № 5. — С. 736–742.
3. Cooke P. H., Oakeshott J. G. Amino acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1989. — V. 86. — P. 1426–1430.
4. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791–1799.
5. Тоцкий В. Н., Есеркепова Е. В., Джан Зе Ук. Ген-энзимная система эстеразы-6 и устойчивость дрозофилы к повышенной температуре // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 3. — С. 342–348.
6. Андриевський О. М. Фізико-хімічні властивості гідроксидної пептидгідролази травної системи дрозофіли // Вісник ОНУ, 2002. — Т. 7. — Вип. 1. — С. 5–14.
7. Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений. — Киев: Урожай, 1993. — 528 с.

8. Бурлаков А. Б., Макеева А. П., Рябов И. Н. Изоферментный состав гибридных и гиногенетических форм некоторых карповых рыб на ранних стадиях онтогенеза. — В кн.: Биохимическая генетика рыб. — Л., 1973. — 211 с.
9. Щеглова Н. В., Иллосов Ю. И. К вопросу об эстеразах у карпа (*Cyprinus carpio* L.). — В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб. — Л., 1979. — 184 с.
10. Иваненков В. В. Эстераза-2 в развитии вьюна (*Misgurnus fossilis*). Гетерогенность яиц вьюна по экспрессии аллельных генов эстеразы-2. — В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб. — Л., 1979. — 184 с.
11. *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.
12. Григорьева Г. М., Лежнёва Т. И. и соавт. Молекулярные формы ацетилхолинэстеразы мозга трёх видов мух рода *Delia*. Видовое разнообразие. // *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* — 1992. — Т. 28, № 3. — С. 401-404.
13. Язловецкий И. Г., Лулу Е. И., Каплан П. Б., Аймерт К. М. Характеристика кишечных липаз и новые сведения о механизме питания личинок златоглазки обыкновенной *Chrysopa carnea* // *Журн. эволюцион. биохим. и физиол.* — 1993. — Т. 29, № 2. — С. 139-145.
14. Андрієвський А. М., Кучеров В. А., Тоцький В. Н. Методические проблемы изучения полиморфизма карбоксиэстераз в онтогенезе *Drosophila melanogaster* // *Вісник ОНУ*, 2004. — Т. 9. — Вип. 1. — С. 15-24.
15. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
16. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.
17. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
18. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
19. Балакирев Е. С., Ф. Дж. Айала. Нуклеотидная изменчивость β-эстеразных генов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // *Успехи совр. биол.*, 2004. — Т. 124, № 4. — С. 378-389.
20. Харсун А. И. Биохимия насекомых. — Кишинёв: Картя Молдовеняскэ, 1976. — 336 с.
21. Тыщенко В. П. Физиология насекомых. — М.: Высшая школа, 1986. — 303 с.

О. М. Андрієвський, В. О. Кучеров, В. М. Тоцький, К. В. Деркач

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ОНТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Резюме

Використовуючи метод комп'ютерної денситометрії, проводили порівняльний якісно-кількісний аналіз експресії карбоксиестераз в онтогенезі дрозофіли після їх електрофоретичного поділу в поліакриламідному гелі і прояву активності стосовно складних ефірів нижчих та вищих карбонових кислот. Встановлено, що максимум експресії нафтилацетазної активності співпадає з імагінальною фазою розвитку плодової мухи, тоді як пік активності ліпаз виявляється на стадії лялечки. З'ясовано генетично залежні індивідуальні та статеві відмінності прояву активності карбоксиестераз у репродуктивно-здатних особин дрозофіли. Наведено популяційно-статистичні показники рівня експресії карбоксиестераз в онтогенезі лабораторної лінії дрозофіли дикого типу.

Ключові слова: карбоксиестерази, онтогенез, дрозофіла.

A. M. Andrievsky, V. A. Kucherov, V. N. Totsky, E. V. Derkach

Odessa National I.I. Mechnikov University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**ONTOGENETIC PECULIARITIES OF THE CARBOXYLESTERASE
EXPRESSION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Summary

Using the method of computer densitometry we carried out a comparative qualitative and quantitative analysis of the ontogenetically dependent expression of the drosophila carboxylesterases after their electrophoretic separation in polyacrylamide gel, and investigated an appearance of the activity with respect to the esters of the lower and higher carbonic acids. It was established that the maximum expression of the naphthylacetate activity coincides with imago phase of the drosophila cycle, whereas the peak of lipase activity is connected to the chrysalis ontogenetic phase. Genetically dependent individual and genetal differences in carboxylesterase activity level for the reproductive capable drosophilae were shown. The population statistic indicators of the carboxylesterase expression level in ontogenesis of the laboratory line of the drosophila wild type are given.

Keywords: carboxylesterases, ontogenesis, drosophila.