

УДК 575.224.2:577.15:595.773.4

А. М. Андриевский, канд. биол. наук, доц., докторант, **И. А. Чернов**, асп.
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КАРБОКСИЭСТЕРАЗНОЙ СИСТЕМЫ У ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПА

С помощью реакции одновременного азосочетания определяли степень выраженности электрофоретически разделённых основных молекулярных форм карбоксиэстераз плодовой мухи. Материалом для анализа служили буферно-тритоновые экстракты тканей отдельно взятых самцов и самок, отобранных из общей лабораторной популяции дрозофилы дикого типа. Показаны индивидуальные особенности экспрессии изоформ карбоксиэстераз на уровне искусственной популяции; обнаружен половой диморфизм в проявлении активности отдельных форм изучаемых ферментов; составлены вариационные ряды изменчивости экспрессии исследуемых гидролаз, а также рассчитаны их популяционно-статистические показатели.

Ключевые слова: карбоксиэстеразы, изменчивость, дрозофила.

Важной характеристикой как природных, так и искусственных популяций является их гетерогенность, которая обуславливает адаптивные возможности организмов и лежит в основе элементарных эволюционных процессов. Популяционно-генетические исследования вносят большой вклад в решение таких важных проблем, как генетическая устойчивость популяций, популяционный мониторинг, видообразование и рациональное природопользование. Обычно объектом таких исследований является проявление того или иного признака в фенотипе, отражающего такие характеристики живого организма как вес, рост, длина, окраска и т. д. Не меньший интерес представляют признаки, которые проявляются на молекулярно-генетическом или клеточном уровне и также могут быть полиморфными. В частных случаях это активность ферментов, скорость биохимических реакций в организме, строение молекул белков и нуклеиновых кислот и т. п. Так, имеются данные по изучению полиморфизма эстераз у украинского карпа (*Cyprinus carpio* L.) [1], мидии (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) [2], атлантического лосося (*Salmo salar* L.) [3], европейского (*Thymallus thymallus* L.) и сибирского (*Th. arcticus* Pall.) хариуса [4], тихоокеанской нерки (*Oncorhynchus nerka* Wald.) [5], амурской летней кеты (*Oncorhynchus keta*) и горбуши (*O. gorbusha*) [6], 9 видов камбал подсемейства *Pleuronectinae* [7], суслика крапчатого (*Spermophilus suslicus* Guld.) [8]. К сожалению, в большинстве случаев авторы говорят о полиморфизме отдельных ферментов эстеразной системы, но не обращают внимания на изменчивость системы эстераз в целом.

Особенностью данной работы является использование в качестве объекта исследования всего спектра карбоксиэстераз целого организма, а не отдельных его органов или тканей (как в вышеперечисленных работах). Такой подход позволяет выявить в целом уровень тестируемых ферментов, что даёт возможность установить гетерогенность исследуемой популяции одновременно по нескольким биохимическим показателям.

В связи с этим, целью настоящего исследования являлось выявление индивидуальных различий в уровне экспрессивности изоформ карбоксиэстераз у отдельных особей *Drosophila melanogaster* искусственной популяции дикого типа местного происхождения.

В задачи исследования входило:

1. Проведение сравнительного анализа уровня экспрессии отдельных форм карбоксиэстераз у самцов и самок имаго исследуемой популяции.
2. Построение вариационных рядов изменчивости экспрессии карбоксиэстераз на популяционном уровне.

Материалы и методы исследования

Экспериментальным материалом служили половозрелые самцы и самки единой лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* (Meigen) дикого типа, соответствующего линии *Normal*. Исходные родительские формы используемой линии были отобраны из природной Одесской популяции, после чего линию в течении многих лет поддерживали в лабораторных условиях на простой питательной среде [9] при температуре 25 °С.

Каждое новое поколение дрозофилы получали путём родственного скрещивания потомков, исключая репродуктивное перекрывание разных поколений.

Перед приготовлением биологических проб синхронизированных (трёхдневных) мух наркотизировали диэтиловым эфиром и разделяли по полу. Гомогенат тканей каждой отдельно взятой особи готовили в эппендорфе с помощью металлического пестика в объёме 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0, содержащего 1 % тритона X-100. Полученные гомогенаты (30 проб в расчёте на один эксперимент) сразу же центрифугировали в течение 15 мин при 12 000 об./мин на холоде (+4 °С). К отобраным экстрактам добавляли по 5 мкл 0,1 % раствора бромфенолового синего, содержащего 60 % сахарозы. Приготовленные таким образом образцы подвергали электрофоретическому разделению в системе вертикально-пластинчатого щелочного (pH 8,3–8,9) 10 % полиакриламидного геля. При силе тока 40 мА в расчёте на два гелевых блока электрофорез проходил за 5 часов. После проведения электрофореза гелевые блоки отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и замачивали на 15 минут в 50 мл 0,1 М фосфат-фосфатного буфера pH 7,4. Далее инкубировали в 50 мл того же буфера с добавкой 25 мг α-нафтилацетата, 25 мг β-нафтилацетата и 50 мг синего прочного RR (субстраты и диазоний

предварительно растворяли в 100 мкл диметилформамида). Инкубация гелей в субстратной среде длилась 20 мин, после чего реакционную смесь декантировали, а гели многократно промывали дистиллированной водой, сканировали и анализировали путём компьютерной денситометрии, используя специальную программу "АнаИС". Об уровне экспрессивности изоформ изучаемых ферментов судили по интенсивности окрашивания азокрасителем индивидуальных зон геля, совпадающих с местами специфического расположения карбоксиэстераз на момент завершения электрофореза.

Статистическую обработку полученных данных на основании анализа 190 особей (102 самца и 88 самок) проводили согласно [10]. В работе использовали реактивы фирм "Reanal" (Венгрия) и "Chemapol" (Чехия), а также установку для электрофореза "VE-4" российского производства (г. Москва, МГУ, "Helikon").

Результаты исследования и обсуждение

В результате опытов установлено, что в тканях *D. melanogaster* содержится 4 основные достаточно легко экстрагирующиеся формы карбоксиэстераз. Как видно из приведенных на рис. 1 типичных электрофореграмм, каждая из выявляемых форм обладает довольно стабильным показателем относительной электрофоретической подвижности (R_f) и чётко обособлена от других соседних фракций. При этом значение R_f можно рассматривать как постоянную характеристику каждой отдельной формы карбоксиэстеразы: 0,285 (0,280) — первой (1а и 1б соответственно); 0,210 — второй; 0,140 — третьей; 0,047 — четвёртой. Приведенные показатели практически совпадают у самцов и самок исследуемой популяции и, вероятно, отражают отсутствие половых различий в посттрансляционной модификации молекул ферментов каждого типа. Вместе с тем у проанализированных нами особей (как у самок, так и у самцов) наблюдаются существенные индивидуальные различия экспрессии каждой изоформы карбоксиэстеразы. Наглядно это демонстрируется представленными на рис. 2 денситограммами, каждая из которых соответствует определённому треку конкретного гелевого блока. Судя по показателям оптической плотности ферментных пиков, наиболее активной как у самцов, так и у самок, является α -фильная эстераза 4 (0,047), интенсивно расщепляющая α -нафтилацетат. Этот же фермент характеризуется и наименьшей изменчивостью в проявлении активности у отдельных особей популяции. Напротив, карбоксиэстеразы 3 (0,140) и 2 (0,210) демонстрируют довольно большую амплитуду колебаний их активности на популяционном уровне и в большей степени отражают индивидуальные особенности молекулярного фенотипа представителей обоих полов.

В то же время, ни одна из числа описываемых α -фильных эстераз у особей данной популяции не представлена аллозимами либо изоформами. Возможно, это связано с тем, что используемая в качестве объекта исследования лабораторная популяция дрозофил в течение многих поколений, находясь в стационарных условиях содержания, подве-

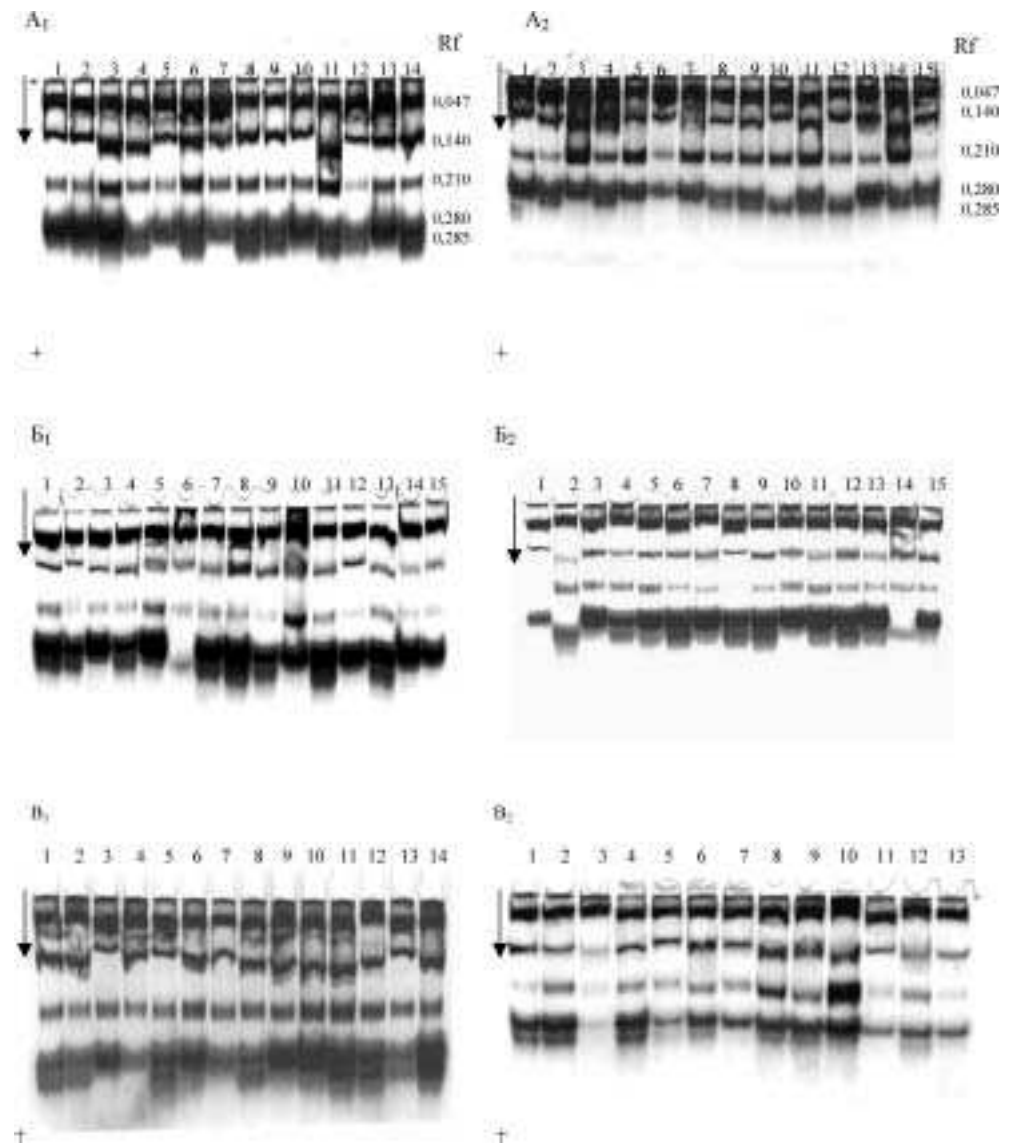
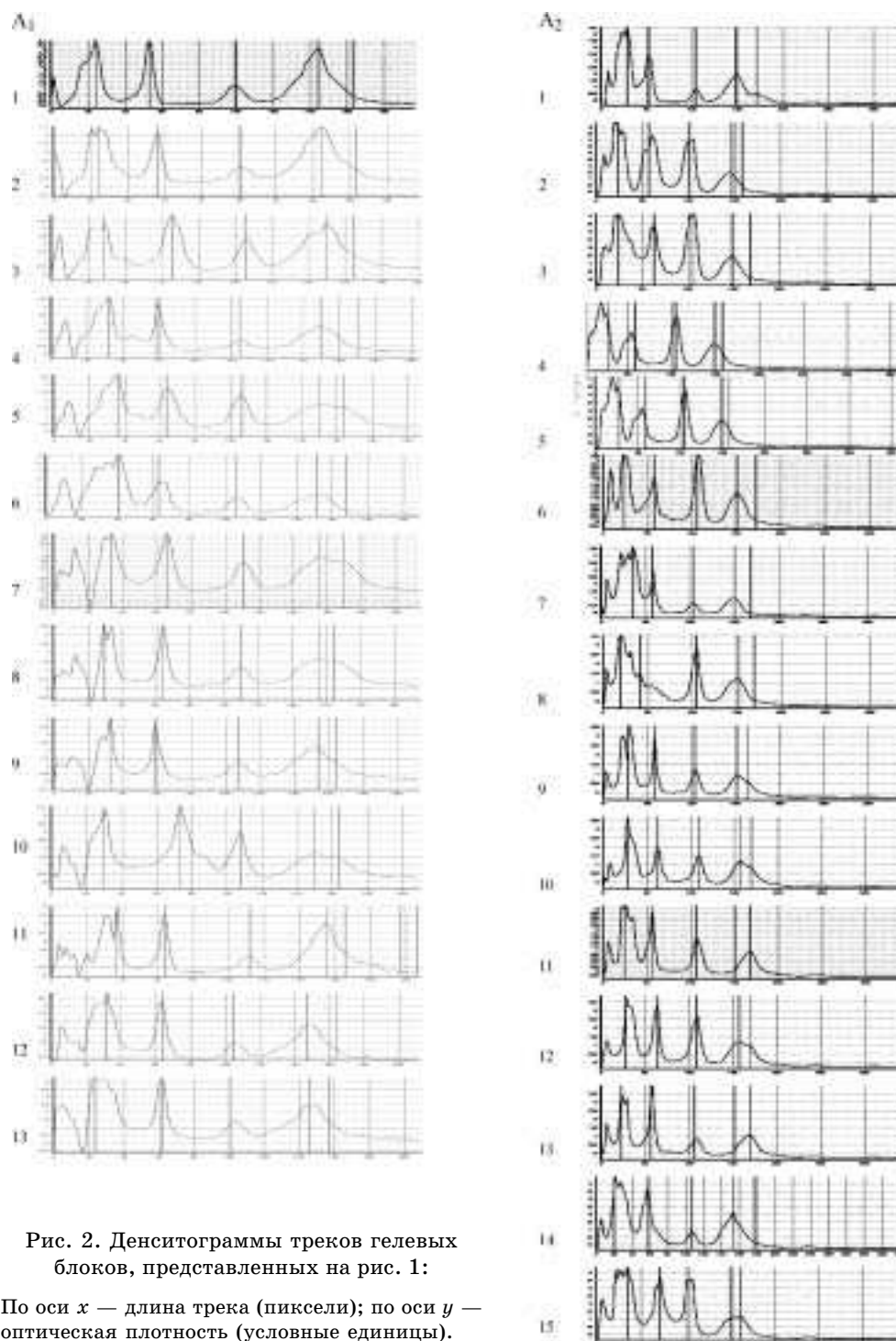


Рис. 1. Электрофоретические спектры карбоксиэстераз тканей самцов (A₁, B₁, B₁) и самок (A₂, B₂, B₂) имаго лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типа:

Цифры над электрофореграммами означают порядковые номера слотов; стрелками указано направление движения ферментов в гелевом блоке.



ргалась действию стабилизирующего отбора, элиминирующего обладателей иных молекулярных вариантов α -фильных карбоксиэстераз.

Вопрос о том, могут ли существовать изоформы данной группы ферментов, возможно, прояснится после исследования природных популяций и сравнительного анализа генотипической структуры их биотипов. Наконец, возможно и то, что взятые из природы родоначальные формы искусственной популяции оказались гомозиготными по аллелям генов, контролирующих наблюдаемые биохимические признаки. Что касается колебаний экспрессии α -карбоксиэстераз у отдельных особей, то причиной их могут быть как различия в активности регуляторных генов, контролирующих работу генов α -фильных эстераз, так и процессы посттрансляционной модификации конечных генопродуктов.

Ещё более гетерогенной исследуемая популяция оказалась по проявлению β -фильной карбоксиэстеразы. Как показано на рис. 1 и 2, у самцов и самок имаго дрозофилы этот фермент может быть представлен либо лёгкой молекулярной формой ($R_f = 0,285$), либо тяжёлой ($R_f = 0,280$), либо и той, и другой одновременно. Логично предположить, что в данной популяции по этому биохимическому признаку существуют два типа гомозигот и гетерозигота. При этом гены, кодирующие две довольно близкие по молекулярной массе формы β -карбоксиэстеразы, вероятно, являются аллельными. Это в свою очередь даёт право считать их аллозимами. Соответствующие гетерозиготе только два, а не три аллозимных варианта β -карбоксиэстеразы указывают на то, что молекулы этого фермента не обладают четвертичной структурой и представляют собой мономеры. Различия в степени выраженности экспрессии одного аллозима по сравнению с другим ($4,4 \pm 0,1$ и $3,3 \pm 0,4$ единицы — у самцов и $4,0 \pm 0,3$ и $3,4 \pm 0,4$ единицы — у самок) у разных генотипов, вероятно, связаны с активацией экспрессии аллеля, кодирующего более тяжёлую форму β -эстеразы, либо угнетением аллеля лёгкой формы того же фермента.

Индивидуальный анализ особей лабораторной популяции дрозофилы при большой выборке позволил построить вариационные кривые, отражающие изменчивость экспрессии каждого из изучаемых ферментов на популяционном уровне. Как видно из рис. 3, наименее вариабельной оказалась экспрессия α -фильной карбоксиэстеразы 4 ($R_f = 0,047$). Половых различий по этому ферменту практически не наблюдалось. В противоположность этому, по эстеразе 1, представленной двумя аллозимами ($R_f = 0,280$ и $0,285$), та же популяция оказалась довольно гетерогенной. При этом изменения экспрессивности аллозима 1б у самцов и самок наблюдались в диапазоне от 0,5 до 4–5 единиц, аллозима 1а — от 0,25 до 1,5 единиц. Среднестатистические показатели экспрессии по каждому из ферментов, характеризующие лабораторную популяцию дрозофил в целом, приведены в табл. 1. Исходя из представленных данных, максимальной экспрессией обладает α -фильная карбоксиэстераза 4 независимо от половой принадлежности. Что касается среднепопуляционного показателя активности β -фильной эстеразы 1б, то он не менее, чем на 8 % выше у самцов.

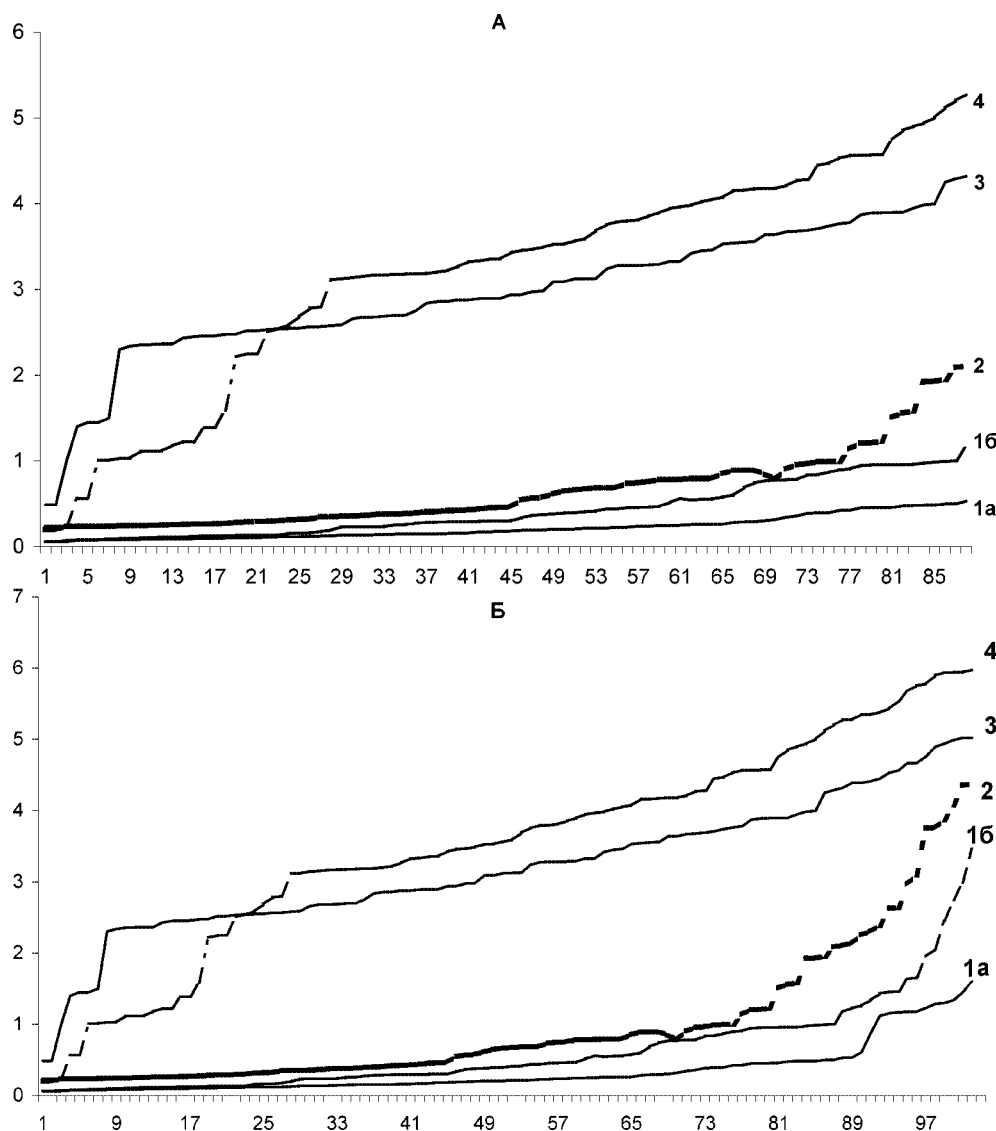


Рис. 3. Вариационные кривые экспрессии карбоксиэстераз у самок (А) и самцов (Б) имаго искусственной популяции *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типа:

1а — β -карбоксиэстераза; 1б — β -карбоксиэстераза; 2 — α -карбоксиэстераза; 3 — α -карбоксиэстераза; 4 — α -карбоксиэстераза. По оси x — порядковые номера особей; по оси y — оптическая плотность ферментных фракций (условные единицы).

Таким образом, полученные данные об изменчивости экспрессии ферментов карбоксиэстеразной системы в стабильной популяции дрозофилы дикого типа прямо указывают на её гетерогенность, тогда как средние показатели уровня активности каждого из исследуемых энзимов могут отражать физиолого-биохимическое состояние группы ре-

продуктивно-способных организмов, развивающихся в стационарных условиях.

Таблица 1

Статистические показатели экспрессивности карбоксиэстераз самок и самцов имаго искусственной популяции *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типа

Пол	Статистические показатели	Карбоксиэстеразы				
		1a	1b	2	3	4
♀	M	0.671	1.818	1.330	3.429	4.079
	m	0.170	0.255	0.225	0.479	0.331
♂	M	0.847	1.859	1.650	3.331	4.430
	m	0.156	0.379	0.304	0.481	0.185

Примечание: данные представлены в условных единицах оптической плотности соответствующих фракций, выявленных в гелевом блоке.

Выводы

1. В лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* дикого типа по признаку экспрессии ферментов карбоксиэстеразной системы наблюдается полиморфизм.
2. Наиболее выражена изменчивость β -карбоксиэстеразы, представленной двумя аллозимами.
3. Различия в экспрессии молекулярных форм эстеразы 1 у самцов и самок могут служить биохимическим признаком полового диморфизма.

Литература

1. Костенко С. Г. Полиморфизм белков украинского карпа и амурского сазана // Тез. 2-го Всесоюз. совещ. "Генетика, селекция, гибридизация рыб". — М.: Наука. — 1981. — С. 148–149.
2. Дехта В. А. Аллозимный полиморфизм и экологическая изменчивость мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Азовского моря: Дисс ... канд. биол. наук: — Кубанский государственный аграрный университет. — 2001. — 156 с.
3. Шубин П. М., Захаров А. Б., Монгалева Н. П. Электрофоретические исследования белков у печёрской популяции атлантического лосося (*Salmo salar* L.) // Печёрский лосось. Сыктывкар. — М.: Наука. — 1979. — С. 82–94.
4. Шубин П. Н., Захаров А. Б., Шубин Ю. П. Генетическая изменчивость супероксиддисмутазы в популяциях европейского (*Thymallus thymallus* L.) и сибирского (*Th. arcticus* Pull.) хариуса // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 3. — С. 405–408.
5. Кирпичников В. С., Муске Г. А. Функциональные различия между аллозимами у тихоокеанской нерки (*Oncorhynchus nerka* Wald.). В кн.: Материалы 16 межд. конф. по группам крови и биохимическому полиморфизму животных. — Л.: Наука, 1979. — С. 228–234.
6. Куликова Н. И., Салменкова Е. А. Электрофоретическое исследование мышечных белков амурской летней кеты (*Oncorhynchus keta*) и горбуши (*O. gorbuscha*). В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб. — Л.: Наука. — 1979. — С. 125–128.

7. Коваль Е. З., Богданов Л. В. Биохимический полиморфизм девяти видов камбал подсемейства Pleuronectinae в заливе Петра Великого. В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб. — Л.: Наука, 1979. — С. 99–105.
8. Андриевский А. М., Олейник Ю. Н., Кучеров В. А., Асманская А. С. Спектр тканевых карбоксиэстераз в онтогенезе суслика крапчатого (*Spermophilus suslicus* Guld.) // Тез. докл. конф. "Генетика в современном обществе", Харьков: Наука. — 2004. — С. 12.
9. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
10. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 150 с.

О. М. Андрієвський, І. А. Чернов

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

МІНЛИВІСТЬ КАРБОКСИЕСТЕРАЗНОЇ СИСТЕМИ У ЛАБОРАТОРНОЇ ПОПУЛЯЦІЇ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПУ

Резюме

Встановлювали ступінь вираженості електрофоретично розділених основних молекулярних форм карбоксиестераз плодової мухи. Матеріалом для аналізу слугували буферно-трионові екстракти тканин окремо взятих самців та самиць, відібраних із загальної лабораторної популяції дрозофіли дикого типу. Показано індивідуальні особливості експресії ізоформ карбоксиестераз на рівні штучної популяції; виявлено статевий диморфізм у прояві активності окремих форм досліджуваних ферментів; складено варіаційні ряди мінливості експресії досліджуваних гідролаз, а також розраховано їх популяційно-статистичні показники.

Ключові слова: карбоксиестерази, мінливість, дрозофіла.

A. M. Andrievsky, I. A. Chernov

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

VARIABILITY OF CARBOXYESTERASE SYSTEM IN LABORATORY POPULATION OF A WILD-TYPE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Summary

Using the reaction of the simultaneous azo coupling, we have determined the degree of intensity of electrophoretically separated principal molecular forms of the drosophila carboxyesterases. Buffer-triton tissue extracts of separately treated males and females that were selected from common laboratory population of a wild-type drosophila have served as a material for our analysis. The individual peculiarities in expression of the carboxyesterases isoforms at the level of artificial population have been described; sexual dimorphism in activity of some form of the studied ferments has been detected; the variation series of the variability in expression of investigated hydrolases have been made up, and their population-statistical indicators have been calculated.

Keywords: carboxyesterases, variability, drosophila.