

УДК 575.22:577.152.311:595.773.4

С. Л. ПАСТЕРНАК, аспирантОдесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: biopaster@gmail.com**ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АЛЛОЗИМОВ
β-ЭСТЕРАЗЫ У ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ДРОЗОФИЛ**

Методом компьютерной денситометрии определяли уровни экспрессии электрофоретически разделённых аллозимов β-специфичной эстеразы (К.Ф. 3.1.1.1) у гомозиготных и гетерозиготных по локусу β-Est генотипов *Drosophila virilis*, *D. mercatorum* и *D. simulans*. В качестве субстрата применяли β-нафтилацетат. Об интенсивности экспрессии судили по количеству образовавшегося продукта реакции одновременного азосочетания β-нафтола с диазонием через 30 мин инкубации. Установлены достоверные различия в экспрессии S- и F-аллозимов *D. simulans*. Показан более высокий уровень суммарной активности аллозимов гетерозигот *D. virilis* и *D. mercatorum* по сравнению с таковой гомозигот, а также более высокий уровень активности гетеродимерного аллозима М по сравнению с гомодимерными аллозимами F и S. Обсуждается возможность возникновения эффекта гетерозиса по данному признаку.

Ключевые слова: аллозимы, β-эстераза, *Drosophila*.

У разных видов дрозофил β-специфичная эстераза (К.Ф. 3.1.1.1) представлена разным количеством изо- и аллозимов, которые обладают различным уровнем экспрессии и электрофоретической подвижностью. Но всех их объединяет общее свойство – при одновременном присутствии в инкубационной среде в системе *in vitro* α- и β-нафтолов карбоновых кислот они избирательно расщепляют только β-изомеры. Некоторые из изозимов (продукты паралогичных генов) невозможно выявить методом нативного электрофореза из-за их чрезвычайно низкой экспрессии. Например, из пяти изозимов β-эстеразы *Drosophila virilis* на электрофореграмме выявляется один [13], из двух изозимов *D. melanogaster* и *D. simulans* также выявляется лишь один [8, 9]. Однако, этот изозим представлен в популяциях несколькими аллозимами, которые хорошо обнаруживаются на электрофореграмме. Эти аллозимы кодируются разными аллелями одного локуса и различаются точечными аминокислотными заменами, влияющими на их заряд и, как следствие, на электрофоретическую подвижность. Кроме того, эти различия в аминокислотной последовательности могут влиять и на некоторые биохимические свойства, такие как, pH-оптимум проявления активности, устойчивость к температуре и уровень экспрессии [14]. Далее, β-эстеразы некоторых видов дрозофил представляют собой димерные ферменты [12], что обуславливает существование у одного изозима трёх аллозимов – двух гомодимерных и одного гетеродимерного (при условии, что соответствующий ген находится в популяции в двух аллельных состояниях) [4]. Последний образуется вследствие гибридизации продуктов двух кодоминантных аллелей.

Генотипические различия в экспрессии аллозимов β-специфичной эстеразы были подробно изучены на модельном объекте *Drosophila melanogaster* [2]. Было

высказано предположение о возможном эффекте гетерозиса по данному признаку. Однако, исследования, проведённые на одном виде мух, не давали возможности ответить на вопрос: являются ли наблюдаемые различия признаками всего рода *Drosophila*.

Целью исследования было сравнить уровни экспрессии аллозимов β -эстеразы у особой *Drosophila virilis*, *D. mercatorum* и *D. simulans*, относящихся к разным генотипическим классам. Задачи исследования: 1) для каждого вида дрозофил сравнить уровни экспрессии аллозимов гетерозигот между собой; 2) сравнить уровни суммарной экспрессии аллозимов гетерозигот с таковыми гомозигот.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили половозрелые имаго лабораторных популяций *Drosophila simulans* (Sturtevant, 1919), *D. virilis* (Sturtevant, 1916) (мухи получены из коллекции кафедры общей и молекулярной генетики Киевского национального университета имени Т. Г. Шевченко) и *D. mercatorum* (Patterson et Weeler, 1942) (мухи выделены из природной популяции *Drosophila melanogaster* «Приозёрная» (Чернобыльская зона отчуждения) Андриевским А. М.), культивируемые в Лаборатории физико-химических методов исследования ОНУ имени И. И. Мечникова на протяжении нескольких лет. Развитие мух проходило в условиях постоянной температуры (+25 °C) и круглосуточного затемнения на стандартной четырёхкомпонентной питательной среде [5].

Для получения экстрактов тканей отдельно взятых, случайным образом отобранных особей (40 особей *D. virilis* и *D. mercatorum* и 60 особей *D. simulans*), предварительно наркотизированных диэтиловым 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 40 % растворе сахарозы.

Образцы подвергали электрофоретическому разделению в системе вертикально-пластинчатого щелочного (pH 8,3) 7 % полиакриламидного геля. При этом для каждого вида мух ставился отдельный эксперимент. 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 аллозимов β -эстеразы гелевые блоки помещали в инкубационную среду того же буфера (объём 50 мл) с добавкой 25 мг β -нафтилацетата и 25 мг соли диазония – синего прочного В. Субстраты и диазоний предварительно растворяли в 200 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 определяли их плотность, используя специальную компьютерную программу «TotalLab». Об уровне экспрессии аллозимов судили по интенсивности окрашивания азокрасителем ферментной зоны с учётом её площади на денситограмме (S) в расчёте на количество биологического материала, полученного от одной особи. При этом соблюдалась прямопропорциональная зависимость между площадью каждого пика и количеством образовавшегося продукта реакции (азокрасителя) в зоне локализации фермента в гелевом блоке [3].

Полученные первичные данные подвергали статистической обработке, пользуясь компьютерной программой “Excel”. При работе с указанными объектами соблюдали все этические нормы, регламентирующие проведение экспериментов с использованием животных организмов.

Результаты исследования и их обсуждение

Гистохимическое выявление аллозимов β -эстеразы показало наличие у *Drosophila virilis* и *D. mercatorum* трёх, а у *D. simulans* – двух растворимых форм этого фермента. Все они хорошо проявляются на электрофореграммах при использовании в качестве субстрата β -нафтола уксусной кислоты, что даёт возможность безошибочно идентифицировать эти формы, как самостоятельные продукты аллелей локуса β -Est (аллозимы) (рис. 1). Это подтверждает и тот факт, что указанные формы обладают сходными свойствами: растворимостью, электрофоретической подвижностью, субстратной специфичностью и т. д. Всё это также свидетельствует о том, что у разных видов дрозофил исследуемые ферменты являются ортологами. Кроме β -эстеразы, у дрозофил β -нафтилацетат способна расщеплять также ацетилхолинэстераза, но она, будучи тетрамерным ферментом, имеет значительно меньшую величину Rf и легко идентифицируется на электрофореграмме. О том, что эта форма является именно ацетилхолинэстеразой, а не другим изоэнзимом β -эстеразы, свидетельствуют исследования влияния на него ингибиторов [1], в которых было показано специфическое ингибирование прозеринном, что является типичным свойством ацетилхолинэстераз [11].

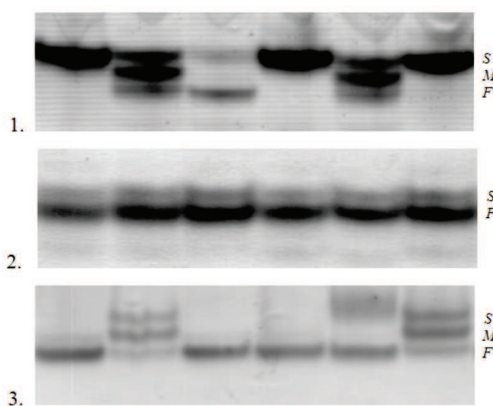


Рис. 1. Аллозимные спектры β -эстеразы дрозофил: 1 – *Drosophila mercatorum*; 2 – *Drosophila simulans*; 3 – *Drosophila virilis*. Справа указаны обозначения аллозимов.

Аллозимы S, M и F β -эстеразы *D. mercatorum* обладают показателями относительной электрофоретической подвижности (Rf) 0,220, 0,235 и 0,250 соответственно. Тот факт, что их три, говорит о том, что этот фермент, вероятно, представляет собой димер. Об этом свидетельствуют и данные литературы [10]. Два из них, F и S, являются гомодимерами и образуются в результате олигомеризации продуктов одного аллеля, а третий аллозим, M, является гетеродимером; он возникает у гетерозигот в результате гибридизации продуктов кодоминатных аллелей. То же

касается и аллозимов β -эстеразы *D. virilis*. Однако её аллозимы отличаются по показателю Rf – 0,180, 0,195 и 0,210 для S-, M- и F-аллозимов соответственно. Можно предположить, что в структуре данного белка *D. virilis* меньше отрицательно заряженных или больше положительно заряженных аминокислот, чем у его гомолога у *D. mercatorum*. У *D. simulans* β -эстераза представлена двумя аллозимами – S и F. Показатели их электрофоретической подвижности – 0,215 и 0,230 соответственно. Наличие только двух аллозимов говорит о том, что белок представляет собой мономер.

Исходя из данных аллозимного состава, можно сделать вывод о количестве возможных генотипических классов по локусу β -Est. В популяциях всех трёх изучаемых видов теоретически их должно быть три: FF, FS и SS. Однако в изучаемой популяции *D. simulans* полностью отсутствуют классы FF и SS. Этот феномен нами был подробно рассмотрен в ранней работе [6]. В лабораторной популяции *D. virilis* отсутствует (или крайне редок) генотипический класс SS. Из 60 проанализированных особей ни одна не обладала данным генотипом. Это говорит о том, что мухи указанного генотипа имеют низкий уровень жизнеспособности. Интересно также то, что на протяжении двух лет культивирования (2011 – 2012 годы) все особи *D. virilis* были гомозиготными по локусу β -Est и обладали генотипом FF и лишь в конце 2012 года появились гетерозиготные формы. Вероятно, произошла спонтанная мутация, которая в дальнейшем закрепились в изучаемой популяции. В популяции *D. mercatorum* генотип FF крайне редок (примерно, 1 на 60–80 особей). В данном исследовании экспрессию его аллозимов не рассматривали, чтобы избежать статистической недостоверности результатов. Таким образом, можно говорить о том, что для *D. virilis* аллель F, а для *D. mercatorum* – S являются условно доминантными.

Уровни экспрессии аллозимов β -эстеразы у гетерозигот изучаемых видов различаются. У *D. mercatorum* и *D. virilis* наибольшей активностью обладает аллозим M, а наименьшей – S (рис. 2).

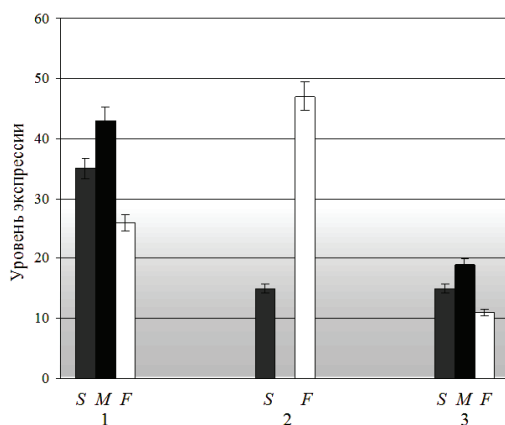


Рис. 2. Уровни экспрессии аллозимов β -эстеразы у гетерозиготных особей дрозофил: 1 – *Drosophila mercatorum*; 2 – *Drosophila simulans*; 3 – *Drosophila virilis*.

Уровень экспрессии представлен в относительных единицах оптической плотности денситометрических фракций.

То, что гетеродимерный фермент более активен, по сравнению с гомодимерными можно объяснить двояко: 1) его четвертичная структура способствует более эффективному связыванию субстрата, что увеличивает число оборотов каждой молекулы фермента; 2) эффективность каталитической реакции у гетеродимера значительно не отличается от таковой гомодимера, однако самих молекул первого больше из-за большей вероятности их образования. У *D. simulans* F-аллозим примерно в 3 раза более выражен чем S. Вероятно, его первичная структура обеспечивает такой фолдинг белковой молекулы, при котором обеспечивается большая скорость ферментативной реакции. Несколько менее вероятное объяснение – более высокий уровень экспрессии самого гена из-за изменения первичной структуры промоторной части β -Est, что обеспечивает большее количество генопродукта.

Суммарная активность аллозимов гетерозигот у *Drosophila mercatorum*, и *D. virilis* превышает таковую условно доминантных гомозигот в 1,4 раза (рис. 3). Вероятно, здесь имеет место явление гетерозиса. Ранее подобные результаты были получены на модельном объекте *Drosophila melanogaster* [2]. Суммарная экспрессивность S- и F-аллозимов β -специфичной эстеразы гетерозигот этого вида превышала индивидуальную выраженность соответствующих аллозимов у гомозигот в 1,5–2 раза. Это говорит о том, что наблюдаемое явление, очевидно, характерно для β -эстераз многих видов дрозофил.

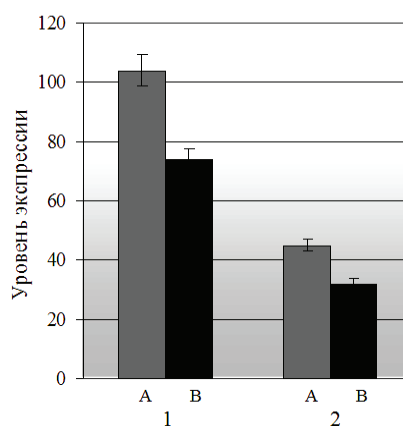


Рис. 3. Суммарная экспрессивность аллозимов β -эстеразы у гетерозиготных и гомозиготных особей дрозофил: 1 – *Drosophila mercatorum*; 2 – *Drosophila virilis*. А – гетерозиготы; В – гомозиготы. Уровень экспрессии представлен в относительных единицах оптической плотности денситометрических фракций.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что для многих видов рода *Drosophila* характерно явление гетерозиса по таким биохимическим признакам, как активность отдельных ферментов, в частности β -специфичной эстеразы. Несомненно, для более полного понимания биохимических механизмов гетерозиса необходимы исследования и других ферментов. Отчасти, на *Drosophila melanogaster* такие исследования уже проводились. Так, сотрудниками кафедры генетики и молекулярной биологии Одесского национального университета

имени И. И. Мечникова было показано, что активность алкогольдегидрогеназы, супероксиддисмутазы и гидроксидной пептидгидролазы у гетерозисных гибридов *D. melanogaster* значительно превышает таковую у особей инбредных линий [7]. Однако данные полученные для одного вида мух не дают полного понимания механизмов гетерозиса по данным признакам. В связи с этим, необходимо проведение аналогичных исследований на большем количестве видов дрозофил.

Выводы

1. Наибольшим уровнем экспрессии у гетерозигот *Drosophila mercatorum* и *D. virilis* обладает гетеродимерный М-аллозим β -эстеразы, а наименьшим – гомодимерный F-аллозим.
2. У гетерозигот *D. simulans* F-аллозим β -эстеразы в 3 раза более выражен чем S-аллозим.
3. Суммарная экспрессивность аллозимов β -эстеразы гетерозигот *Drosophila mercatorum* и *D. virilis* в 1,4 раза превышает индивидуальную выраженность условно доминантных аллозимов гомозигот, что отражает эффект гетерозиса.

Список использованной литературы

1. 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.
2. Андриевский А. М. Генотипические особенности экспрессии аллозимов β -специфичной гидролазы эфиров карбоновых кислот у *Drosophila melanogaster* дикого типа / А. М. Андриевский // Цитология и генетика. – 2008. – № 6. – С. 34–42.
3. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических молекул / Э. Гааль, Г. Медьеша, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 446 с.
4. Глазко В. И. Генетика изоферментов животных и растений / В. И. Глазко, И. А. Созинов. – Киев: Урожай, 1993. – 528 с.
5. Медведев Н. Н. Практическая генетика / Н. Н. Медведев. – М.: Наука, 1968. – 294 с.
6. Пастернак С. Л. Онтогенетические и половые различия в экспрессии отдельных эстераз у *Drosophila simulans* / С. Л. Пастернак // Вісник ОНУ. Біологія. – 2012. – Т. 17, Вип. 1–2 (26–27). – С. 33–43.
7. Тоцкий В. Н. Генетико-биохимические аспекты проблемы адаптации и адаптивного гетерозиса / В. Н. Тоцкий // Природа, проявление и прогнозирование гетерозиса. – 1992. – С. 24–32.
8. Balakirev E. S. Is esterase-P encoded by a cryptic pseudogene in *Drosophila melanogaster*? / E. S. Balakirev, F. J. Ayala // Genetics. – Vol. 144, N. 4. – P. 1511–1518.
9. Dumancic M. M. Characterization of the EstP protein in *Drosophila melanogaster* and its conservation in drosophilids / M. M. Dumancic, J. G. Oakeshott, R. J. Russell, M. J. Healy // Biochem. Genet. – 1997. – Vol. 35, N. 8. – P. 251–71.
10. Ferreira S. M. A study of esterase isozymes in *D. mercatorum* pararepleta (*Drosophila*, Diptera) / S. M. Ferreira, L. E. Magalhaes, S. A. Toledo, Ch. Mogolowkin-Cohen // Rev. Brasil. Genet. – 1981. – Vol. 4, N. 3. – P. 309–316.
11. Pakaski M. Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein / M. Pakaski, P. Kasa // Current drug targets. CNS and neurological disorders. – 2003. – Vol. 2, N. 3. – P. 163–171.
12. Pen J. Purification and properties of esterase-4 from *Drosophila mojavensis* / J. Pen, A. H. Rongen, J. Beintema // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – Protein Structure and Molecular Enzymology. – 1984. – Vol. 789, Issue 2. – P. 203–209.

13. Robin C. Birth and death of genes and functions in the beta-esterase cluster of *Drosophila* / C. Robin, L. M. Bardsley, C. Coppin, J. G. Oakeshott // *J. Mol. Evol.* – 2009. – Vol. 69, N. 1. – P. 10–21.
14. White M. M. Studies of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XVIII. Biochemical differences between the slow and fast allozymes / M. M. White, S. D. Mane, R. C. Richmond // *Mol. Biol. Evol.* – 1988. – Vol. 5, N. 1 – P. 41–62.

Статья поступила в редакцию 26.11.2012

С. Л. Пастернак

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра генетики і молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ГЕНОТИПОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ АЛОЗИМІВ β -ЕСТЕРАЗИ У ОКРЕМИХ ВИДІВ ДРОЗОФІЛ

Резюме

За допомогою метода комп'ютерної денситометрії визначали рівні експресії електрофоретично розділених алозимів β -специфічної естерази (К.Ф. 3.1.1.1) у гомозиготних і гетерозиготних за локусом β -Est генотипів *Drosophila virilis*, *D. mercatorum* та *D. simulans*. Як субстрат застосовували β -нафтілацетат. Про інтенсивність експресії судили за кількістю утвореного продукту реакції одночасного азопоеднання β -нафтолу з діазонієм через 30 хв інкубації. Встановлені достовірні відмінності в експресії S- і F-алозимів *D. simulans*. Показано вищий рівень сумарної активності алозимів гетерозигот *D. virilis* і *D. mercatorum* порівняно з такою гомозигот, а також вищий рівень активності гетеродімерного алозиму М порівняно з гомодімерними алозимами F і S. Обговорюється можливість виникнення ефекту гетерозису за цією ознакою.

Ключові слова: алозими, β -естераза, *Drosophila*.

S. L. Pasternak

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
2, Dvoryanskaya Str., Odessa, 65082, Ukraine

GENOTYPICAL PECULIARITIES OF THE β -ESTERASE ALLOZYMES EXPRESSION IN SOME SPECIES OF FRUIT FLIES

Summary

Using the method of computer densitometry we have determined the expression level of the electrophoretically separated allozymes of β -specific esterase (EC 3.1.1.1) in *Drosophila virilis*, *D. mercatorum* and *D. simulans* homozygotes and heterozygotes for β -Est locus. β -naphthylacetate was used as the substrate. Expression intensity estimated using the quantity of reaction product formed as a result of the simultaneous azocoupling reaction between β -naphthol and diazonium after 30 min of incubation. We have established the significant difference in the expression of *D. simulans* S- and F-allozymes. The higher level of summary activity of allozymes of the *D. virilis* and *D. mercatorum* heterozygotes comparing to homozygotes, and the higher level of activity of heterodimeric allozyme M comparing to homodimeric allozymes F and S have been demonstrated. The possibility of heterosis effect for this characteristic have been discussed.

Key words: allozymes, β -esterase, *Drosophila*.