

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АЛЛОЗИМОВ β -СПЕЦИФИЧНОЙ ГИДРОЛАЗЫ ЭФИРОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПА



Методом компьютерной денситометрии определяли уровень экспрессии электрофоретически разделенных аллозимов *S* и *F* β -специфичной эстеразы (К.Ф. 3.1.1.2) у монозиготных и гетерозиготных по локусу β -*Est* генотипов *Drosophila melanogaster* (самцов и самок) дикого типа. В качестве субстратов применяли α -нафтилацетат, β -нафтилацетат и α -нафтилпропионат. Об интенсивности экспрессии эстераз судили по количеству образующихся продуктов реакции одновременного азосочетания нафтаола с диазоием за 4, 24, 44 и 64 мин инкубации. Установлены достоверные различия в экспрессии *S*- и *F*-аллозимов, зависящие от структуры локуса β -*Est* генотипически различающихся особей. Во всех вариантах экспериментов показан более высокий уровень суммарной активности *S*- и *F*-аллозимов β -эстеразы гетерозигот по сравнению с отдельной активностью *F*- и *S*-аллозимов соответствующих гомозигот независимо от половой принадлежности мух. Проведена сравнительная оценка временной динамики экспрессии *in vitro* аллозимов гомозиготных доминантов (β -*Est*^S/ β -*Est*^S), гетерозигот (β -*Est*^S/ β -*Est*^S) и гомозиготных рецессивов (β -*Est*^F/ β -*Est*^F). Рассматриваются возможные механизмы возникновения гетерозиса по признаку экспрессии *S*- и *F*-аллозимов β -эстеразы с позиций теории биохимического обогащения гетерозиготных генотипов.

Введение. Исследованию явления гетерозиса посвящены многочисленные работы [1–4], однако в подавляющем большинстве случаев в них анализируются качественные либо количественные изменения морфологических или физиологических показателей [5]. Проявление гетерозиса по биохимическим признакам до настоящего времени остается малоизученной проблемой генетики: к сожалению, не только не раскрыты биохимические причины и механизмы, обеспечивающие гибридную силу, но нет и достаточного количества глубоко проанализированных примеров, подтверждающих существование гетерозиса на биохимическом и молекулярно-генетическом уровнях [6].

В ранней работе [7] была сделана удачная попытка осуществить гибридизацию *in vitro* различных по структуре мономеров эстеразы 5 *Drosophila pseudoobscura* с целью сравнения активности полученного гетеротетрамера с активностью гомотетрамерного белка. В результате подобной реконструкции авторам удалось обнаружить более высокую эстеразную активность у гибридного фермента.

Полагают, что скрещивание различных гомозиготных по конкретным локусам особей приводит к образованию гетерозигот, содержащих разные аллозимы или различные по четвертичной структуре изоэзимы, что сопровождается проявлением признаков гетерозиса. Подобная точка зрения на гетерозис является современным развитием учения о гетерозиготности и известна как теория биохимического обогащения [4].

Сходное явление обнаружено также при изучении ферментативной экспрессии димерной кислой фосфатазы и тетрамерных алкогольдегидрогеназ [8–10] у дрозофилы: гибридные ферменты обладали большей ферментативной активностью по сравнению с ферментами, образованными из одинаковых субъединиц. Очевидно такой механизм, приводящий к усилению биохимического признака у гетерозиготных особей, имеет место в том случае, если различные генопродукты одного либо разных локусов принимают участие в образовании сложных белков-олигомеров. Если же функциональный белок является мономером, то связанный с его экспрессией гетерозис можно объяснить, скорее всего, усилением его биосинтеза у гетерозиготного организма при условии того, что в геноме отсутствуют другие подоб-

ные гены, активирующиеся только у гетерозигот и отвечающие за образование более активных белковых генопродуктов. На общую интенсификацию биосинтетических процессов у гетерозигот косвенно указывают результаты определения у них степени политенизации хромосом [11, 12], а также уровня синтеза различных фракций РНК [13]. Как известно, политения приводит к существенному повышению дозы генов, следствием чего может быть увеличение концентрации соответствующих генопродуктов, в частности ферментов. Однако причина более высокой степени политенизации хромосом у гибридных особей остается неясной.

В настоящей работе мы преследовали цель изучить особенности экспрессии аллозимов β -специфичной эстеразы (К.Ф. 3.1.1.2) самцов и самок имаго дрозофилы, относящихся к разным генотипическим классам, а также установить возможное явление гетерозиса по изучаемому биохимическому признаку.

Материалы и методы. В качестве экспериментального материала использовали трехсуточных половозрелых самцов и самок имаго плодовой мушки (*Drosophila melanogaster* Meigen, линия Одесская 1) дикого типа, отбираемых в течение восьми поколений из единой популяции, которая на протяжении многих лет поддерживалась в лабораторных условиях (простая питательная среда, 25 °С [14]) и воспроизводилась путем нетесного инбридинга.

Подготовленных к опыту самцов и самок после наркотизации диэтиловым эфиром гомогенизировали поштучно в 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0, содержащего 1 % тритона X-100. Гомогенаты центрифугировали на холоде (4 °С) в течение 15 мин при 10 000 g, после чего полученные экстракты объемом 10 мкл смешивали с 5 мкл 0,01 % раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60%-ном растворе сахарозы, и подвергали электрофоретическому разделению в системе щелочного (pH 8,3–8,9) вертикально-пластинчатого (140 × 120 × 1 мм) 10%-ного полиакриламидного геля. По окончании электрофореза гели тщательно промывали в дистиллированной воде для полного удаления компонентов электролита и на 10 мин оставляли в среде 0,1 М трис-глицинового буфера pH 7,4.

В каждом конкретном варианте опытов в качестве субстратов β -эстеразы использовали α -нафтилацетат, β -нафтилацетат и α -нафтилпропионат, взятые в количестве 50 мг в расчете на 50 мл инкубационной среды. Чтобы осуществить реакцию одновременного азосочетания перед внесением в инкубационный буфер (0,1 М, трис-глициновый, pH 7,4) субстратов, в нем растворяли 50 мг соли диазония — прочного синего ВВ. И субстраты, и диазоний предварительно растворяли в 100 мкл диметилформамида. Реакции ферментативного гидролиза используемых эфиров проводили при 25 °С.

В процессе инкубации ферментов, находящихся в структуре геля, регистрировали интенсивность образования азокрасителя за 4, 24, 44 и 64 мин взаимодействия эстераз с субстратами. Для этого через 4 мин с момента добавления субстратного раствора, а далее через каждые 20 мин гели сканировали при высоком уровне разрешения (300 dpi); созданные компьютерно-цифровые сканограммы сохраняли в формате BMP.

Каждую полученную серию сканограмм денситометрировали, определяя оптическую плотность (ΔDo , относительные единицы) соответствующей аллозимной фракции, содержащей продукты азосочетания. С этой целью применяли специальную лицензионную компьютерную программу «АнаИС» (Поджарский, Рыбалка, 2004 г.). Относительную экспрессию каждого аллозима выражали в условных единицах оптической плотности в расчете на одного

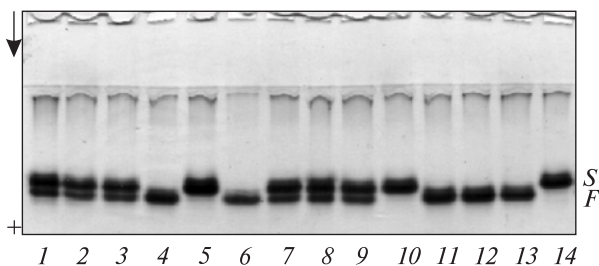


Рис. 1. Спектр аллозимов β -специфичной эстеразы у генотипически различающихся самцов имаго *Drosophila melanogaster*: 1, 2, 3, 7–9 – S- и F-аллозимы гетерозигот; 4, 6, 11–13 – F-аллозимы рецессивных гомозигот; 5, 10, 14 – S-аллозимы доминантных гомозигот. Субстраты – α -нафтилацетат + β -нафтилацетат. Инкубация 20 мин. Стрелкой указано направление движения аллозимов в ходе электрофореза

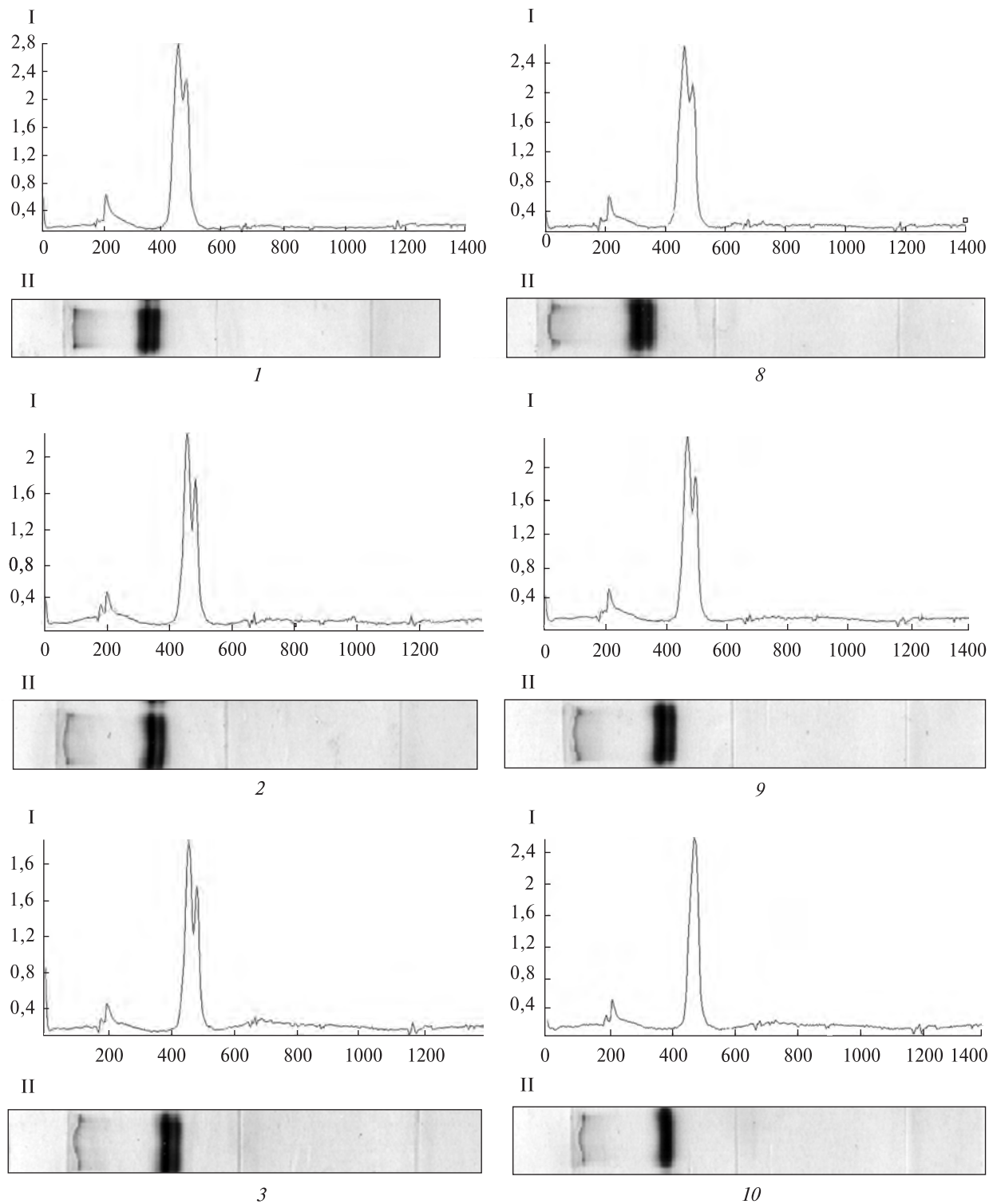


Рис. 2. Качественный и количественный анализ экспрессии аллозимов β -специфичной эстеразы у генотипически различающихся самцов имаго *Drosophila melanogaster*. I – денситограммы, II – электрофореграммы; 1–3, 7–9 – гетерозиготы; 4, 6, 11–13 – рецессивные гомозиготы; 5, 10, 14 – доминантные гомозиготы

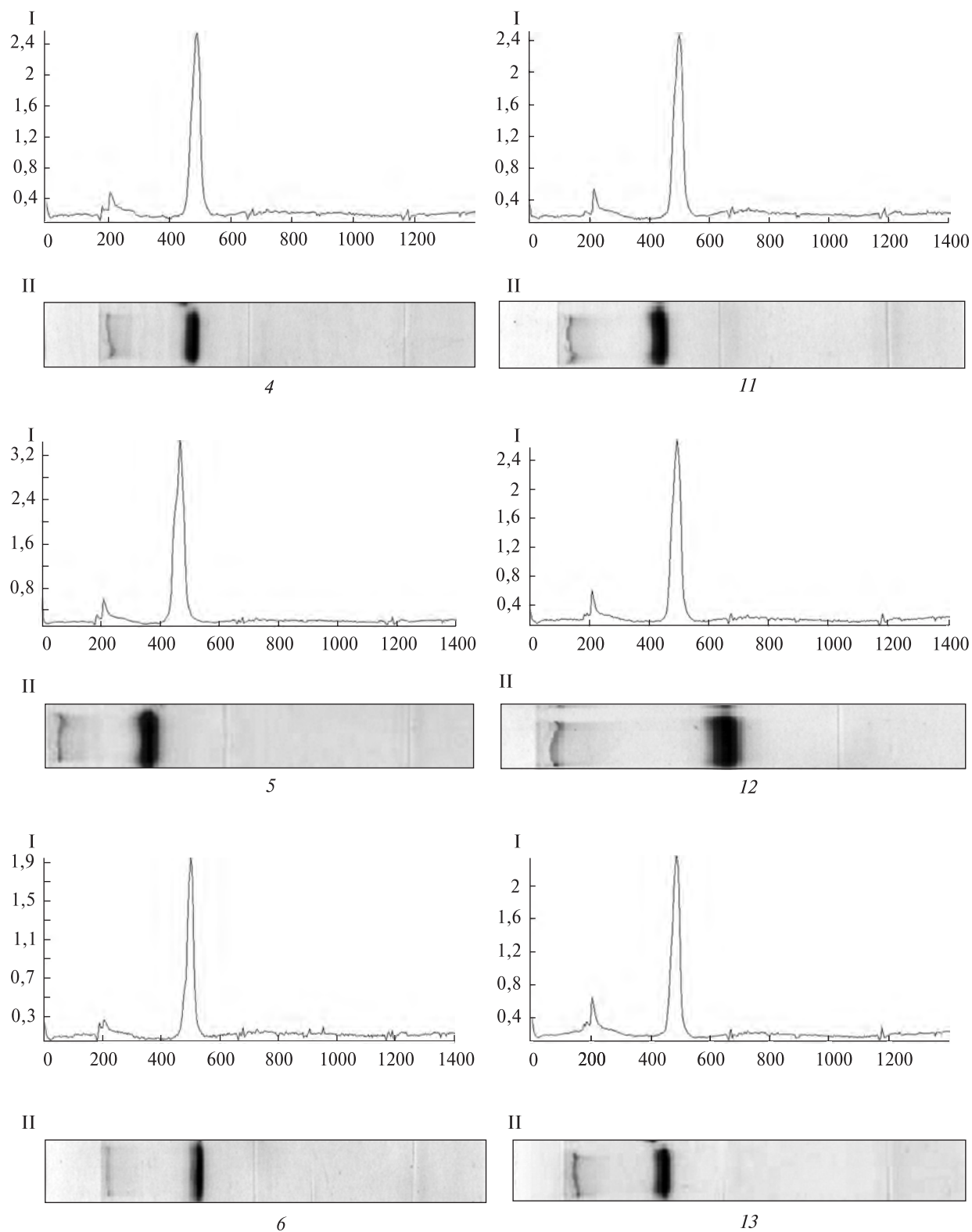


Рис. 2. Продолжение

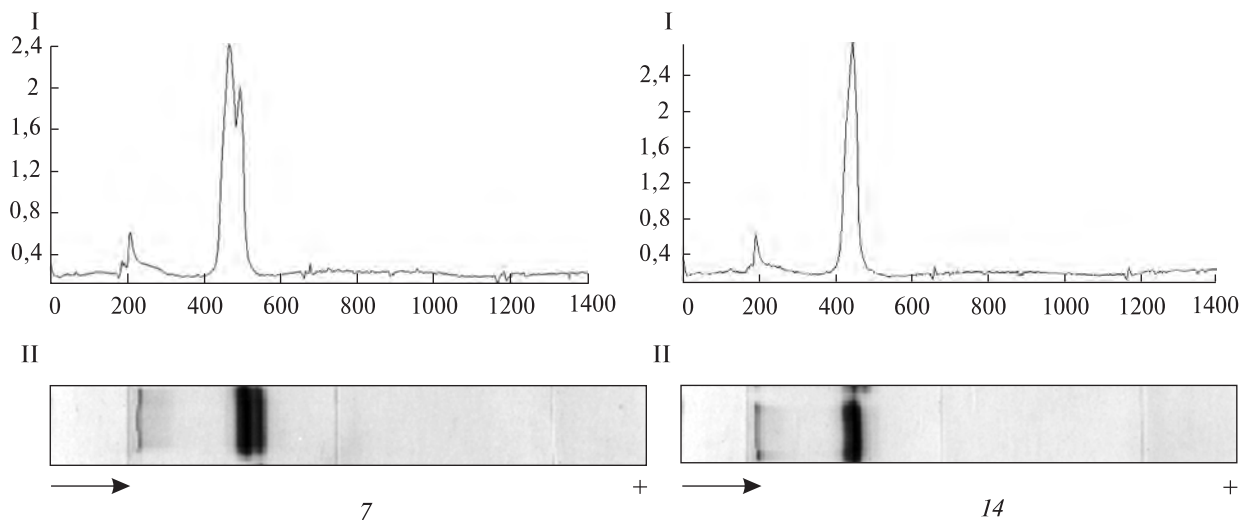


Рис. 2. Окончание

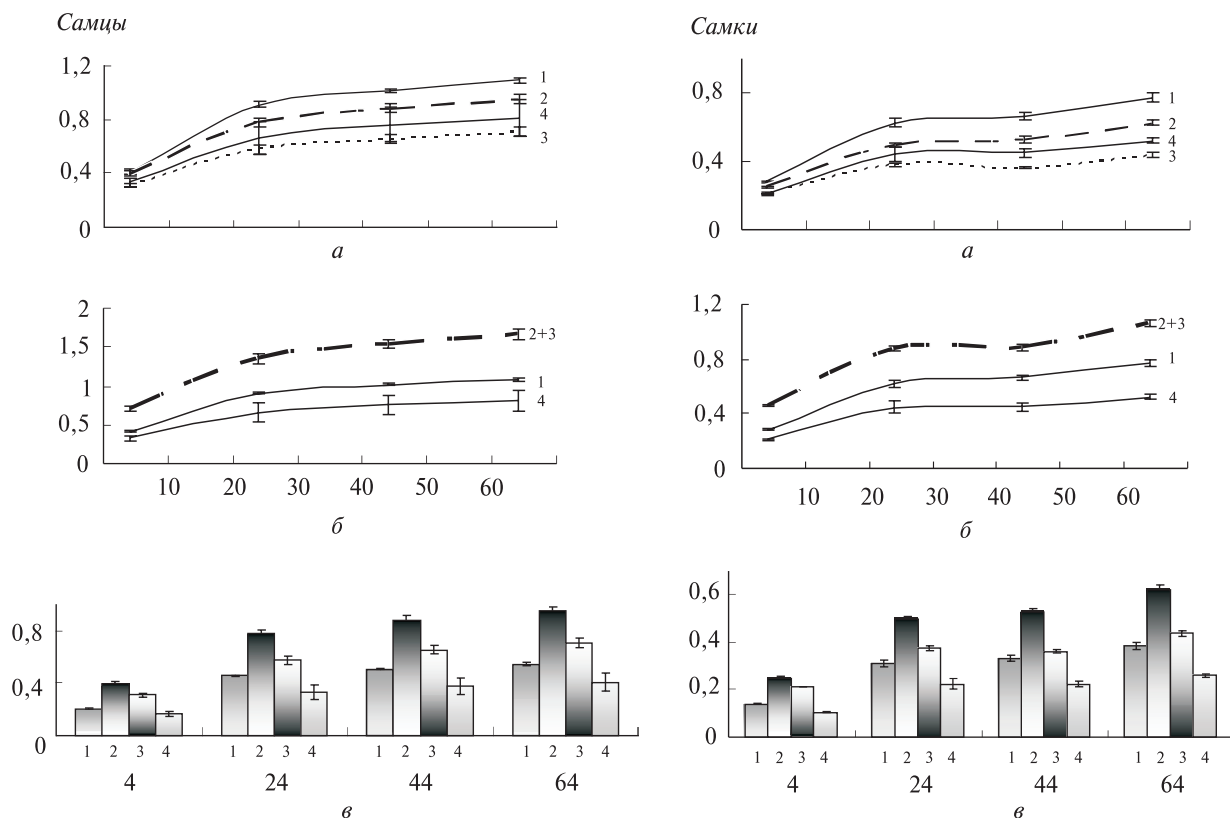


Рис. 3. Динамика экспрессии аллозимов β -специфичной эстеразы, определяемой по β -нафтилацетату у самцов и самок *Drosophila melanogaster*, которые различаются по аллельному составу локуса β -Est: а – 1 – SS-аллозимы гомозигот; 2 – S-аллозим гетерозигот; 3 – F-аллозим гетерозигот; 4 – FF-аллозимы гомозигот; б – 1 – SS-аллозимы гомозигот; 2 + 3 – SF-аллозимы гетерозигот; 4 – FF-аллозимы гомозигот; в – 1 – S-аллозим гомозигот; 2 – S-аллозим гетерозигот; 3 – F-аллозим гетерозигот; 4 – F-аллозим гомозигот; по вертикали – оптическая плотность ΔDo , отн. ед.; по горизонтали – t , мин. Представлены результаты анализа 30 особей поколения $F_{1(1)}$

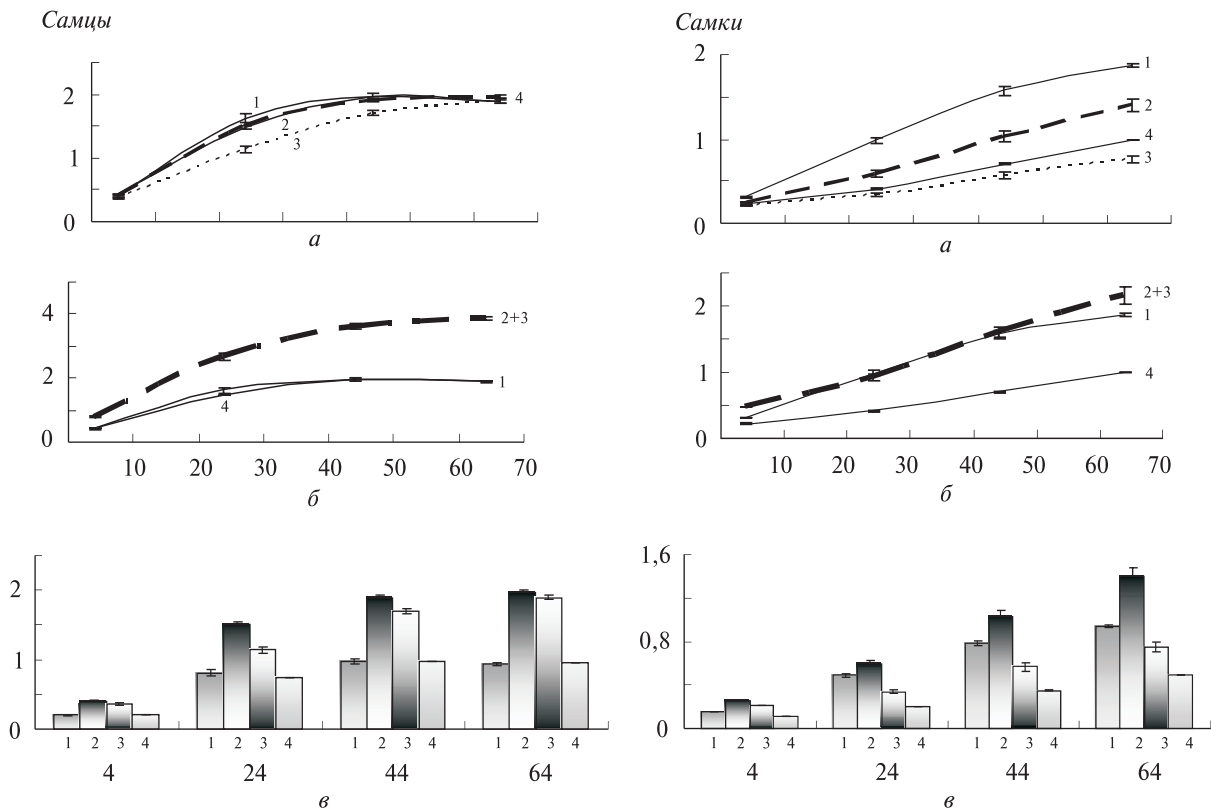


Рис. 4. Динамика экспрессии аллозимов β -специфичной эстеразы, определяемой по α -нафтилпропионату у самцов и самок *Drosophila melanogaster*, которые различаются по аллельному составу локуса β -*Est*. Обозначения те же, что и на рис. 3. Представлены результаты анализа 30 особей поколения $F_{i(5)}$

самца либо на одну самку. Статистическую обработку полученных данных и построение графиков и гистограмм выполняли, пользуясь руководством [15], а также компьютерной программой «Excel».

При постановке экспериментов использовали реактивы квалификации «х.ч.» и «о.с.ч.» фирм «Reanal» (Венгрия), «Chemapol» (Чехия), «Ferak» (Германия), а также установку для электрофореза «VE-4» российского производства (г. Москва).

Результаты исследований и их обсуждение. Количественный анализ определяемой по нафтилацетатам экспрессии *S*- и *F*-аллозимов β -специфичной эстеразы имагинальных форм дрозофилы показал, что между разными генотипами существуют явные различия по изучаемому биохимическому признаку (рис. 1 и 2).

Как видно из рис. 3–5, а, наибольшей активностью фермента по сравнению с гомози-

готными рецессивами обладают гомозиготные доминанты, содержащие *S*-аллозимы. Однако показатели суммарной относительной активности *S*- и *F*-аллозимов гетерозигот заметно превосходят каждую из гомозигот (рис. 3–5, б), причем в динамике проявления ферментативной активности от 4 до 64 мин инкубации различия между разными генотипами становятся все более выраженными.

Если допустить, что в реальной экспрессии β -специфичной эстеразы зигот генотипов β -*Est^S* / β -*Est^S* и β -*Est^F* / β -*Est^F* в равной мере принимают участие генопродукты обоих аллелей, то вклад каждого из них в общую активность составит ровно половину максимального значения их суммарной экспрессии, тогда, как видно из рис. 3–5, в, экспрессия каждого из аллозимов — *S* и *F* — у гетерозигот оказывается более высокой: по нашим данным она обычно превышает индивидуальную выраженность

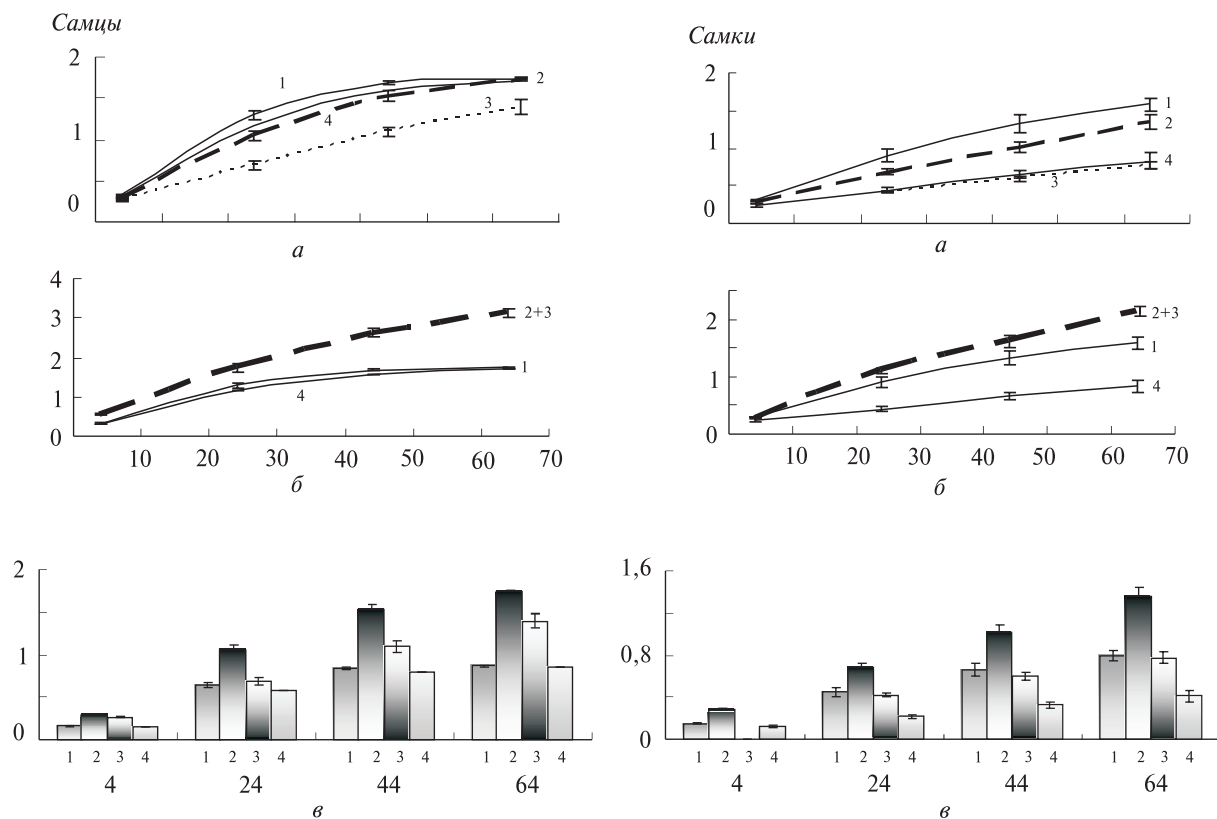


Рис. 5. Динамика экспрессии аллозимов β -специфичной эстеразы, определяемой по α -нафтилацетату у самцов и самок *Drosophila melanogaster*, которые различаются по аллельному составу локуса β -Est. Обозначения те же, что и на рис. 3. Представлены результаты анализа 30 особей поколения $F_{i(6)}$

соответствующих аллозимов у гомозигот в 1,5–2 раза. Наблюдаемый эффект усиления экспрессии обоих аллозимов у гетерозигот с одной стороны может указывать на более высокое содержание ферментов типа *S* и *F* у гибридов, а с другой – на возможные модификационные изменения в структуре аллозимов у гетерозиготных самцов и самок имаго, в результате чего обеспечивается их более высокая ферментативная активность. И то, и другое допущение несомненно требуют дополнительных исследований и доказательств, однако уже сейчас ясно, что обнаруженное явление по упомянутому биохимическому признаку можно считать неслучайным. Если это так, то следует предположить, что наблюдаемый эффект гибридной силы имеет место в живом гетерозиготном организме и определенным образом сказывается на его приспособленности к окружающей среде. Сказанное подтверждают

результаты ранее проведенных нами экспериментов, которые направлены на определение частот встречаемости различных фенотипов по признаку экспрессии β -специфичной эстеразы в той же популяции дрозофилы, находящейся в стационарных условиях [16].

Полученные данные указывают на то, что наиболее часто встречающимся генотипом является гомозиготный доминант (β -Est^s/ β -Est^s), тогда как гетерозиготы составляют менее половины всего состава гетерогенной популяции. Вполне вероятно, что поддержание оптимальной численности гетерозигот как мобилизационного резерва наследственной изменчивости в сложившейся популяционной системе обеспечивается повышенной экспрессией у них *S*- и *F*-аллозимов. Одной из особенностей наблюдаемого нами эффекта гетерозиса является то, что он не снижается из поколения в поколение и не требует постановки специаль-

ных типов скрещиваний, как это имело место, например, при изучении гетерозиса по признаку экспрессии у дрозофилы алкогольдегидрогеназы [8].

Выводы. В размножающейся путем инбридинга экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster* дикого типа (линия Одесская 1) по активности β -специфичной гидролазы эфиров карбоновых кислот из поколения в поколение наблюдается устойчивый гетерозисный эффект. Определяемая по различным субстратам суммарная активность *S*- и *F*-аллозимов гетерозигот значительно превосходит показатели общей активности *S*-аллозимов гомозиготных доминантов и *F*-аллозимов гомозиготных рецессивов. Суммарная активность *S*- и *F*-аллозимов гетерозигот в 1,5–2 раза превосходит уровень индивидуальной активности *S*-аллозима гомозиготных доминантов и *F*-аллозима гомозиготных рецессивов. Наблюдаемое явление биохимического гетерозиса не зависит от половой принадлежности имаго дрозофилы и одинаково интенсивно проявляется как у самцов, так и у самок.

A.M. Andrievsky

GENOTYPICAL PECULIARITIES OF THE β -SPECIFIC HYDROLASE ALLOZYMES EXPRESSION OF THE CARBOXYLIC ETHERS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* OF THE WILD TYPE

Using the method of computer densitometry we have determined the expression level of the electrophoretically separated *S*- and *F*-allozymes of β -specific esterase (E.C. 3.1.1.2) in *Drosophila melanogaster* homozygotes and heterozygotes for β -Est locus. α -naphthylacetate, β -naphthylacetate and α -naphthylpropionate were used as substrates. Expression intensity of the esterases was estimated using the quantity of the reaction product which is created as a result of simultaneous azocoupling between naphthol and diazonium during 4, 24, 44 and 64 min of incubation time. We have established the reliable differences between the *S*- and *F*-allozyme expression depending on the β -Est locus structure. In all the variants the higher level of summary activity *S*- and *F*-allozymes of β -esterase of the heterozygotes comparing to those of two types of homozygotes was demonstrated independently of the *Drosophila* sex. We compared the characteristics of the expression dynamics of the allozymes of dominant homozygotes (β -Est^S/ β -Est^S), heterozygotes (β -Est^S/ β -Est^F) and recessive homozygotes (β -Est^F/ β -Est^F). We also consider some possible mechanisms of heterosis of *S*- and *F*-allozyme expression according to the theory of biochemical enrichment of heterozygote genotypes.

О.М. Андрієвський

ГЕНОТИПОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ АЛОЗИМІВ β -СПЕЦИФІЧНОЇ ГІДРОЛАЗИ ЕФІРІВ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПУ

Використовуючи метод комп'ютерної денситометрії, визначали рівень експресії електрофоретично розподілених аллозимів *S* і *F* β -специфичної естерази (К.Ф. 3.1.1.2) у монозиготних та гетерозиготних за локусом β -Est генотипово відмінних *Drosophila melanogaster* (самців і самок) дикого типу. Як субстрати застосовували α -нафтилацетат, β -нафтилацетат та α -нафтилпропіонат. Про інтенсивність експресії естераз робили висновок на підставі кількості продуктів, що утворюються в ході реакції одночасного азосполучення нафтолу з діазонієм за 4, 24, 44 і 64 хв інкубації. Встановлено достовірні розходження в експресії *S*- та *F*-аллозимів, що залежать від структури локусу β -Est особин. В усіх варіантах експериментів показано більш високий рівень сумарної активності *S*- і *F*-аллозимів β -естерази гетерозигот у порівнянні з окремою активністю *F*- та *S*-аллозимів відповідних гомозигот незалежно від статевої належності мух. Проведено порівняльну оцінку часової динаміки експресії *in vitro* аллозимів гомозиготних домінантів (β -Est^S/ β -Est^S), гетерозигот (β -Est^S/ β -Est^F) та гомозиготних рецесивів (β -Est^F/ β -Est^F). Розглядаються можливі механізми виникнення гетерозису за ознакою експресії *S*- і *F*-аллозимів β -естерази с позиції теорії біохімічного збагачення гетерозиготних генотипів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Шахбазов В.Г. Новое в понимании биофизической природы эффекта гетерозиса // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. — Харьков : Штрих, 2003. — Вып. 2. — С. 58–70.
- Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Гандирук Н.Г. Генный баланс и адаптация природных и искусственно созданных генотипов *Drosophila melanogaster* // Труды по фундаментальной и прикладной генетике (к 100-летию юбилею генетики). — Харьков: Штрих, 2001. — С. 140–151.
- Воробьева Л.И., Яковлева С.В., Кулабухова Н.Н. Роль мутаций цвета тела в изменении отдельных компонентов приспособленности на гетерозис у *Drosophila melanogaster* // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. — Харьков : Штрих, 2003. — Вып. 2. — С. 111–123.
- Шахбазов В.Г., Чешко В.Ф., Шерешевская Ц.М. Механизмы гетерозиса: история и современное состояние проблемы. — Харьков : Основа, 1990. — 120 с.
- Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. — Киев : Урожай, 1993. — 528 с.

6. Тоцкий В.Н. Генетико-биохимические аспекты проблемы адаптации и адаптивного гетерозиса // Природа, проявления и прогнозирование гетерозиса. — Киев : Наук. думка, 1992. — С. 24–32.
7. Richmond R.C., Powell J.R. Evidence of heterosis associated with an enzyme locus in a natural population of *Drosophila* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1970. — **67**, № 3. — P. 1264–1267.
8. Singh R.S., Hubby J.L., Lewontin R.C. Molecular heterosis for heat-sensitive enzyme alleles // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1974. — **71**, № 5. — P. 1808–1810.
9. Singh R. S. Substrate-specific enzyme variation in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. — 1976. — **82**, № 3. — P. 507–526.
10. Trehan K.S., Gill K.S. Subunit interaction : A molecular basis of heterosis // Biochem. Genet. — 1987. — **25**, № 11/12. — P. 855–862.
11. Страшнюк В.Ю. Эффект гетерозиса у дрозофилы и биоэлектрические свойства клеточных ядер // Природа, проявления и прогнозирование гетерозиса. — Киев : Наук. думка, 1992. — С. 53–57.
12. Страшнюк В.Ю. Генетична варіабельність та адаптивні модифікації ступеня політенії гігантських хромосом у *Drosophila melanogaster* // Труды по фундаментальной и прикладной генетике (к 100-летию юбилею генетики). — Харьков : Штрих, 2001. — С. 285–295.
13. Божков А.И., Шерешевская Ц.М., Скляр А.И. Динамика синтеза различных типов РНК в клетках печени линейных и гибридных крыс на фоне гипертермии // Природа, проявления и прогнозирование гетерозиса. — Киев : Наук. думка, 1992. — С. 62–67.
14. Медведев Н.Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
15. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. — Минск : Вышэйш. школа, 1978. — 448 с.
16. Андриевский А.М., Тоцкий В.Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу β -фильной карбоксиэстеразы // Цитология и генетика. — 2006. — **40**, № 6. — С. 3–10.

Поступила 23.07.07