

... БІОХІМІЯ ...

УДК: 575.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ ГИДРОЛАЗ ЭФИРОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ЛИЧИНОК, КУКОЛОК И ИМАГО *DROSOPHILA MELANOGASTER*
А.М.Андрієвський*Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова (Одесса, Украина)*
andriev_scar@mail.ru

Исследовали влияние температуры в диапазоне 11–51°C на предварительно разделённые путём электрофореза молекулярные формы карбоксиэстераз личинок, куколок и самцов имаго дрозофилы дикого типа. Полиакриламидно-гелевые блоки с локализованными в них ферментами инкубировали при определённой температуре в присутствии смеси субстратов α - и β -нафтилацетатов, а также отдельно взятого α -нафтилпропионата с диазонием. Об уровне экспрессии молекулярных форм эстераз судили по интенсивности специфической окраски зон гелевого блока, соответствующих местам расположения молекулярных форм ферментов. Количественный анализ наблюдаемых результатов экспрессии эстераз проводили с помощью метода компьютерной денситометрии. Для каждой молекулярной формы карбоксиэстераз установлен температурный оптимум проявления активности; показаны онтогенетические особенности термочувствительности основных форм изучаемых ферментов; установлены межаллозимные различия в термостабильности для β -фильной карбоксиэстеразы. Обсуждается вопрос адаптивной ценности *S*- и *F*-аллозимов β -специфичного фермента.

Ключевые слова: *формы и аллозимы карбоксиэстераз, термочувствительность, онтогенез, дрозофила.*

Введение

Акты жизнедеятельности пойкилотермных животных практически всегда зависят от температуры окружающей среды (Детлаф, 2001). В свою очередь выживаемость организма во многом определяется термочувствительностью ферментов, катализирующих многочисленные процессы метаболизма. Однако, показатели термостабильности организма в целом часто не совпадают с параметрами устойчивости к температуре изолированных ферментов; поэтому знания об оптимальном режиме проявления активности биокатализаторов оказываются важными при изучении механизмов адаптации организма к обычным, а также к экстремальным условиям существования (Касинская и др., 1992; Тоцкий и др., 1994; Балакирев, Айала, 2004).

Поскольку проблема температурной зависимости экспрессии гидролаз эфиров карбоновых кислот мало изучена, нам представилось интересным исследовать влияние температурного фактора на проявление активности электрофоретически изолированных карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго *Drosophila melanogaster*. В связи с этим преследовалась цель изучить термочувствительность основных эстераз дрозофилы под влиянием температурного фактора в широком диапазоне его действия. Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи: 1) провести качественный и количественный анализ результатов экспрессии основных эстераз при разных температурных режимах; 2) определить температурные оптимумы проявления активности эстераз личинок, куколок и имаго; 3) установить различия в термостабильности между основными эстеразами и их молекулярными формами личинок, куколок и имаго дрозофилы.

Объекты и методы исследования

Источником гидролаз эфиров карбоновых кислот служили равновозрастные 3-суточные личинки, куколки и самцы имаго единой популяции *Drosophila melanogaster* Meigen, представляющей дикий тип мухи, или лабораторную линию – *Одесская 1*. Весь цикл развития дрозофилы проходил на стандартной питательной среде при 25°C (Медведев, 1968). Отобранных личинок, куколок и имаго, не разделяя поштучно, гомогенизировали в 0,1 М глицин-NaOH буфере (pH 9,0) с добавкой 1% тритона X-100, исходя из расчёта 10 мкл растворителя – на 1 особь. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 г в течение 15 мин на холоде, после чего содержащие эстеразы супернатанты подвергали электрофорезу в щелочных условиях (pH 8,3–8,9), используя вертикально-пластинчатую установку (140 x 120 x 1 мм), заполненную 10% полиакриламидным гелем. Пробы вносили в слоты гелевого

блока в количестве 10 мкл в смеси с 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, содержащего 60% сахарозы. По окончании электрофореза пластины геля разрезали по вертикали на две равные части и отмывали в дистиллированной воде, затем в нейтральном буфере. После этой процедуры каждую половину гелевого блока помещали в среду 0,1 М трис-глицинового буфера (рН 7,4), предварительно прогретого до нужной температуры. Прединкубация гелей при температуре 11°C, 25°C, 37°C, 44°C и 51°C продолжалась 30 мин, после чего в инкубационную среду (25 мл) добавляли смесь 12 мг α -нафтилацетата с 12 мг β -нафтилацетата либо 25 мг α -нафтилпропионата с 25 мг прочного синего ВВ (субстраты и диазоний предварительно растворяли в 50 мкл диметилформамида, затем в 2 мл прогретого инкубационного буфера). Гидролиз субстратов эстеразами проходил при указанном температурном режиме ($t \pm 0,2^\circ\text{C}$) в течение 20 мин при периодическом перемешивании раствора, после чего ферменты, находящиеся в геле, инактивировали заливкой пластин кипящей дистиллированной водой. Далее блоки промывали и сканировали во влажном состоянии при высоком режиме разрешения, а их цифровые изображения сохраняли в формате BMP. Созданные сканограммы денситометрировали с помощью лицензионной компьютерной программы «АнаИС» (2004 г.). Об относительной экспрессии гидролаз эфиров карбоновых кислот судили по оптической плотности (ΔDo , относительные единицы) фракций, образованных азокрасителем и совпадающих с локусами соответствующих ферментов в геле. Средние показатели выраженности эстераз – ΔDo – находили по данным 8 образцов одного типа. Статистическую обработку проводили согласно руководству (Рокицкий, 1973), применяя компьютерную программу «Excel». В работе использованы реактивы квалификации «х. ч.» и «о. с. ч.» фирм «Reanal» (Венгрия), «Chemapol» (Чехия), «Acros organics» (США), «Ferak» (Германия), «Реахим» (Россия), а также аппарат для электрофореза «VE-4» российского производства (г. Москва).

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1 и рис. 2, все основные фракции гидролаз эфиров карбоновых кислот личинок, куколок и самцов имаго по-разному реагируют на изменение температурного режима в системе *in vitro*. При этом, разные ферменты неодинаково экспрессируются в одних и тех же условиях. С другой стороны – ферментативная выраженность отдельно взятой эстеразы под влиянием конкретного температурного фактора зависит от того, кому принадлежит выделенный фермент: личинкам, куколкам или самцам имаго дрозофилы. Последнее замечание позволяет высказать предположение о том, что отдельные эстеразы личинок, куколок и взрослых мух не являются структурно-идентичными белками, которые, возможно, по-разному модифицируются в ходе онтогенеза. Так, например, ацетилхолинэстераза личинок при 11°C проявляет примерно такую же активность, как и ацетилхолинэстеразы куколок и самцов имаго, тогда как при 25°C наибольшая активность проявляется у фермента, экстрагированного из тканей имаго. Кроме того, если при 37°C ацетилхолинэстераза взрослых мух активируется более чем в 3,5 раза по сравнению с проявлением активности при 25°C, то в тех же условиях ацетилхолинэстераза куколок заметно повышает активность, а фермент личинок оказывается менее выраженным, чем при 25°C. Повышение температуры до 44 и 51°C практически не изменяет активности личиночной ацетилхолинэстеразы, тогда как ферменты куколок и самцов имаго отвечают значительным снижением её по сравнению с условиями проявления максимальной ферментативной экспрессии.

В отличие от ацетилэстеразы самцов имаго, максимальное проявление активности ацетилэстеразы личинок и куколок наблюдается при температуре 25°C. При этом по сравнению с экспрессией этого фермента при 11°C уровень активности возрастает примерно в 2 раза. Влияние более высоких температур (37, 44 и 51°C) негативно сказывается на экспрессии ацетилэстеразы личинок и куколок: уровень этого показателя снижается более чем на половину от максимального. В то же время, отличительная особенность самцов имаго состоит в том, что тот же фермент максимум активности проявляет не при 25, а при 37°C.

Что касается аллозимных форм β -специфичной эстеразы личинок, то они оказались более устойчивыми к температуре 44 и 51°C по сравнению с *S*- и *F*-аллозимами того же фермента куколок и имаго. В отличие от этого, *S*- и *F*-формы как куколок, так и имаго с максимальной эффективностью экспрессируются при 37°C. Кроме того, *S*-аллозим самцов имаго, по сравнению с *F*-аллозимом, оказался более позитивно-чувствительным к действию температурного фактора – с повышением температуры вплоть до 44°C активация медленноподвижной формы β -специфичной эстеразы была более выраженной.

Полученные результаты зависимости экспрессии основных карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго от температуры интерпретированы в виде графиков на рис. 3. Хорошо видно, что особенностью эстераз взрослой мухи является то, что все они имеют один и тот же температурный оптимум проявления активности по гидролизу α - и β -нафтилацетатов; но в то же время, ферменты

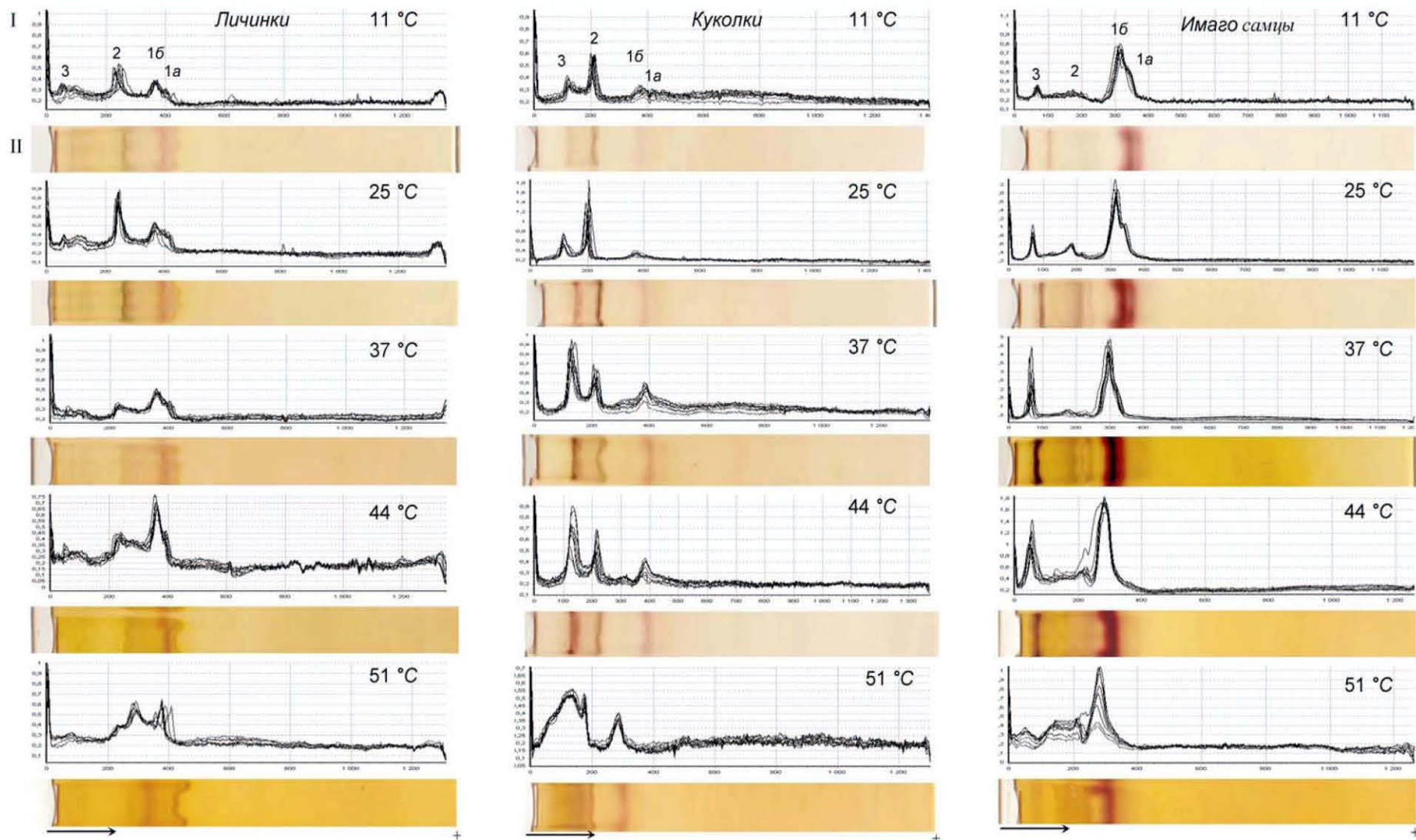


Рис. 1. Влияние температуры на экспрессию карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго *Drosophila melanogaster*. I – денситограммы: по оси x – длина трека (пиксели); по оси y – оптическая плотность (ΔD_0 , относительные единицы), представлены данные по 8 трекам. II – электрофореграммы: 1a (б) – 3 – молекулярные формы ферментов. Субстраты: α -нафтилацетат + β -нафтилацетат.

по-разному реагируют на повышение температуры: более чувствительным является *F*-аллозим β -специфичной эстеразы, менее чувствительным – ацетилэстераза.

Температурный оптимум проявления активности большинства эстераз личинок и куколок либо соответствует 37°C, либо смещён к 44°C; однако обращает на себя внимание то, что ацетилэстераза и личинок, и куколок, в отличие от ацетилэстеразы самцов имаго, максимум активности проявляет при 25°C.

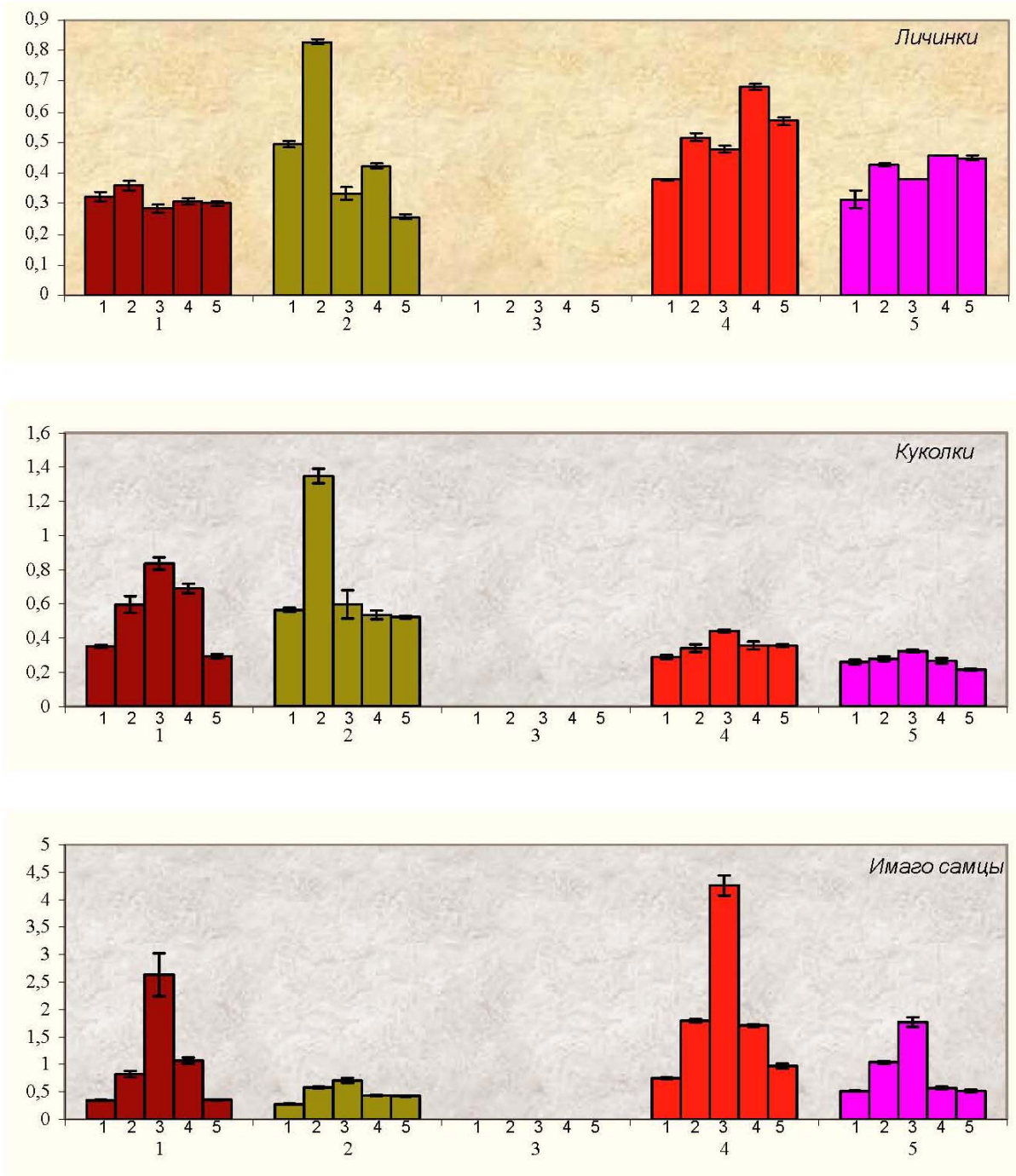


Рис. 2. Зависимость экспрессии карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго *Drosophila melanogaster* от температуры:

По оси y – оптическая плотность (ΔD_o , относительные единицы); по горизонтали: 1 – ацетилхолинэстераза (тетрамер, фермент № 3), 2 – ацетилэстераза (фермент № 2), 3 – ацетилхолинэстераза (димер, фермент не представлен), 4 – *S*-аллозим β -эстеразы (фермент № 1б), 5 – *F*-аллозим β -эстеразы (фермент № 1а). 1 – 11°C, 2 – 25°C, 3 – 37°C, 4 – 44°C, 5 – 51°C. Приведенные данные отражают $\Delta \overline{D_o} \pm s_{\Delta \overline{D_o}}$ при $n = 8$. Субстраты: α -нафтилацетат + β -нафтилацетат.

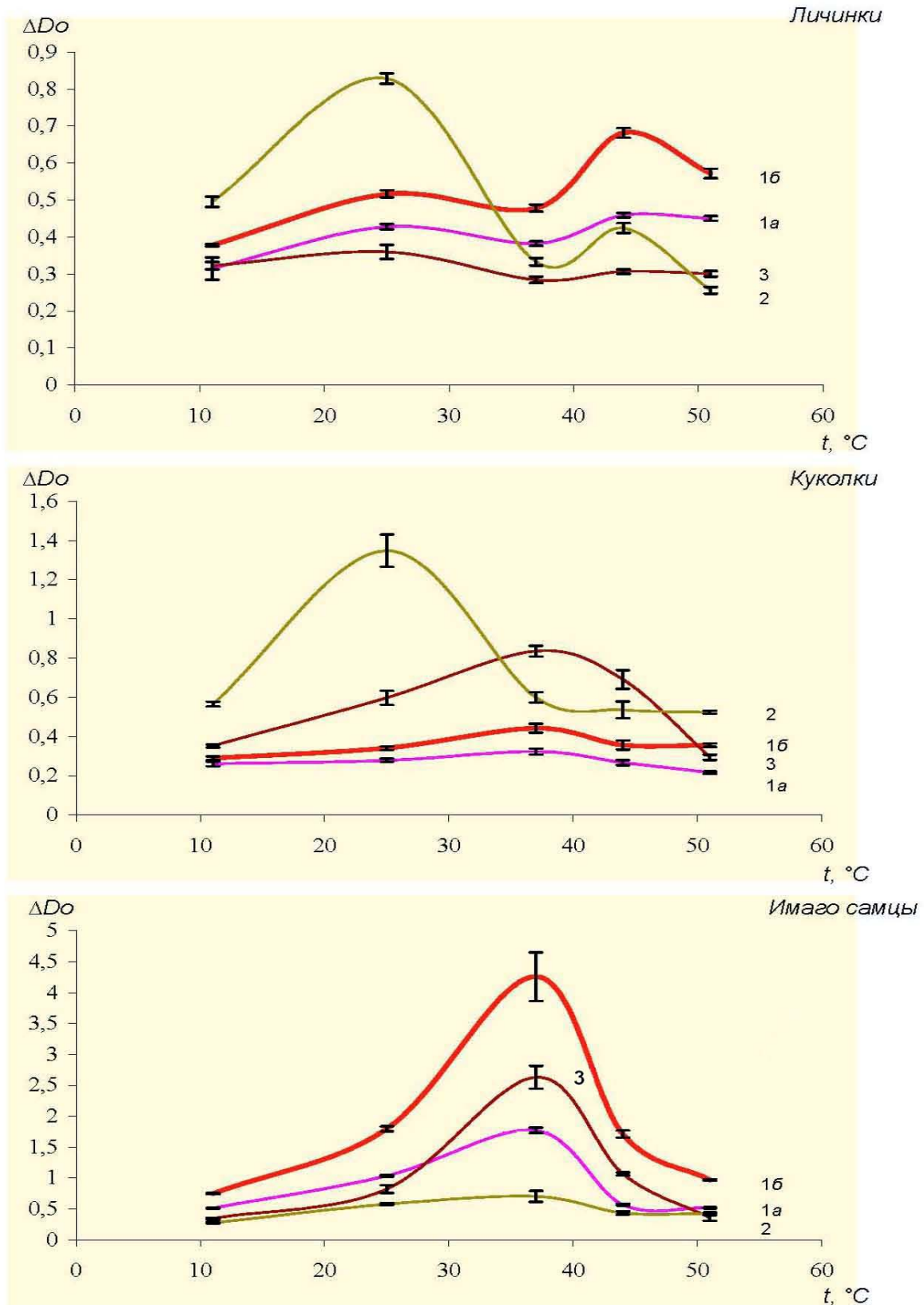


Рис. 3. Температурные оптимумы проявления активности карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго *Drosophila melanogaster*:

1a – F-аллозим β-эстеразы, 1b – S-аллозим β-эстеразы, 2 – ацетилэстераза, 3 – ацетилхолинэстераза. Приведенные данные отражают $\Delta\bar{D}_o \pm s_{\Delta\bar{D}_o}$ при $n = 8$. Субстраты: α-нафтилацетат + β-нафтилацетат.

О степени различий в термочувствительности *S*- и *F*-аллозимов β -эстеразы личинок, куколок и имаго можно судить по показателям межаллозимных соотношений, найденных по $\Delta \overline{Do Est}^S / \Delta \overline{Do Est}^F$ и представленных на рис. 4: очевидно то, что для имагинального фермента существенное увеличение показателя – *S* / *F* – при температуре 37°C и особенно при 44°C связано с инактивацией *F*-аллозима. В противоположность этому *S*-аллозим остаётся довольно активным и при 51°C, что говорит о его достаточно высокой термостабильности. В то же время, аллозимы β -эстеразы личинок и куколок на изменение температурного режима гидролиза β -нафтилацетата реагируют практически одинаково.

Наблюдаемые эффекты влияния температурного фактора на экспрессию гидролаз эфиров карбоновых кислот самцов имаго в основном подтверждаются результатами экспериментов, в которых вместо смеси субстратов – α - и β -нафтилацетатов, использовали α -нафтилпропионат. Иллюстрация зависимости активности изучаемых ферментов самцов имаго от температурного режима в случае гидролиза эфира пропионовой кислоты представлена на рис. 5.

Как видно из приведенной гистограммы и графика, оптимум проявления активности обоих аллозимов β -специфичной эстеразы самцов соответствует 37°C. При температурах 44 и 51°C усиливается инактивация *F*-аллозима. Примечательным оказывается и то, что, несмотря на значительную стимуляцию ферментов температурой, экспрессия ацетилхолинэстеразы и ацетилэстеразы по гидролизу α -нафтилпропионата оказывается слабой. Это указывает на то, что данные ферменты более специфичны по отношению к эфирам уксусной кислоты, а не пропионовой: хотя, гидролизуя в качестве субстрата α -нафтилпропионат, ацетилхолинэстераза демонстрирует умеренное повышение активности в диапазоне от 11°C до 44°C. В то же время изменение температурного режима практически не сказывается на проявлении экспрессии ацетилэстеразы.

Наблюдаемое отклонение в субстратной специфичности β -эстеразы в экстремальных температурных условиях, очевидно, связано с модификацией активного центра фермента, который под влиянием высокой температуры оказывается более адаптированным к расщеплению нафтолового эфира пропионовой кислоты, нежели уксусной. Более того, при 44 и 51°C, вероятно, нарушается субстратная стереочувствительность β -эстеразы, которая, как было показано, при высоких температурах в присутствии α - и β -нафтилацетатов, гидролизует исключительно β -нафтилацетат (рис. 2 и рис. 3 (Имаго самцы)).

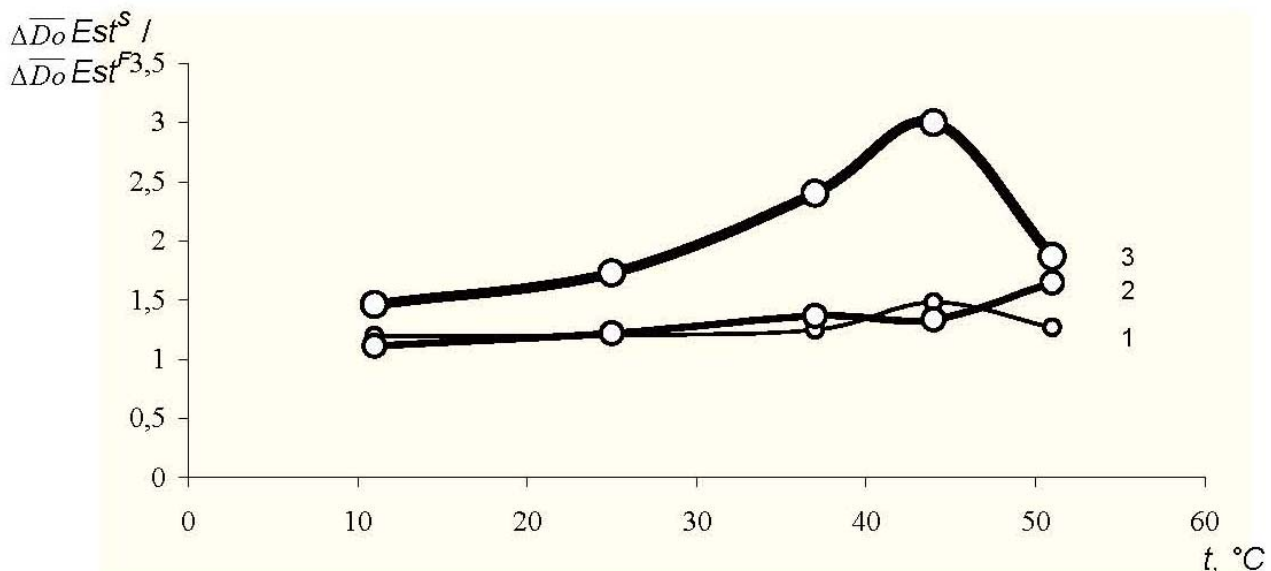


Рис. 4. Соотношения показателей экспрессии аллозимов *S* и *F* β -специфичной эстеразы личинок (1), куколок (2) и самцов имаго (3) *Drosophila melanogaster* при разных температурных режимах:

Субстраты: α -нафтилацетат + β -нафтилацетат.

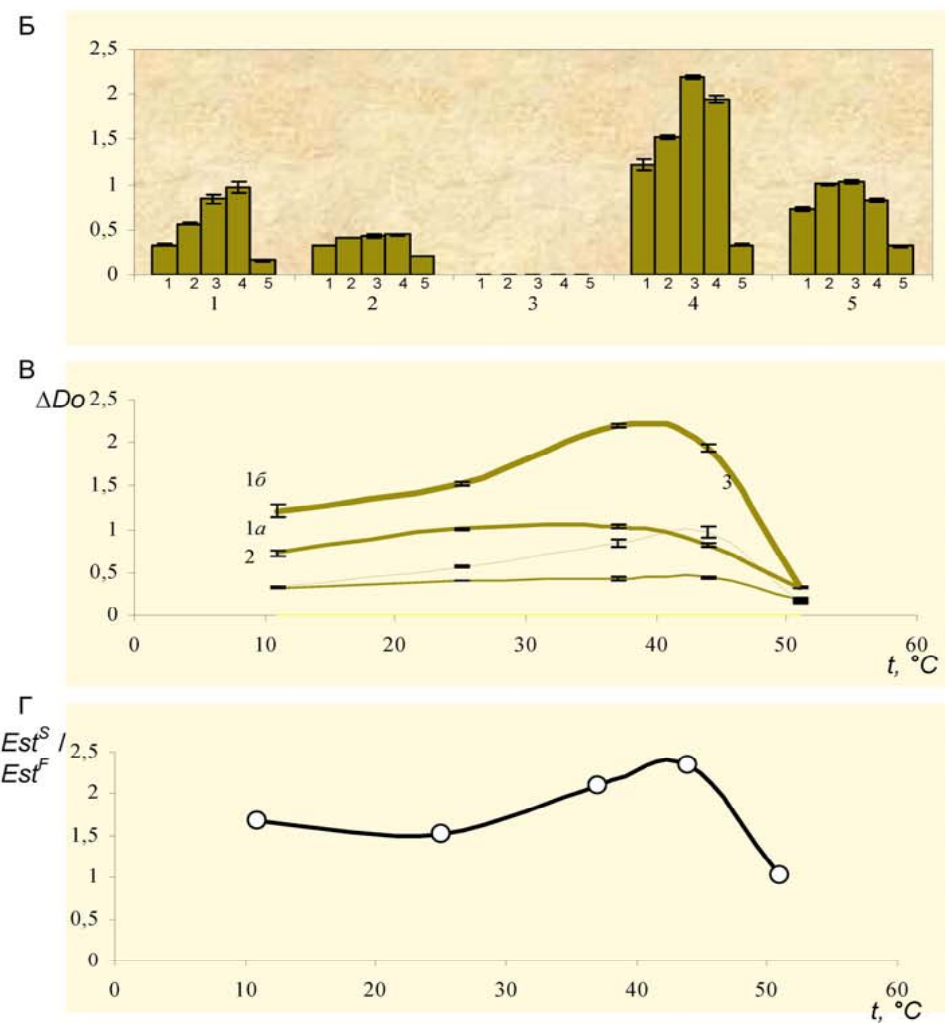
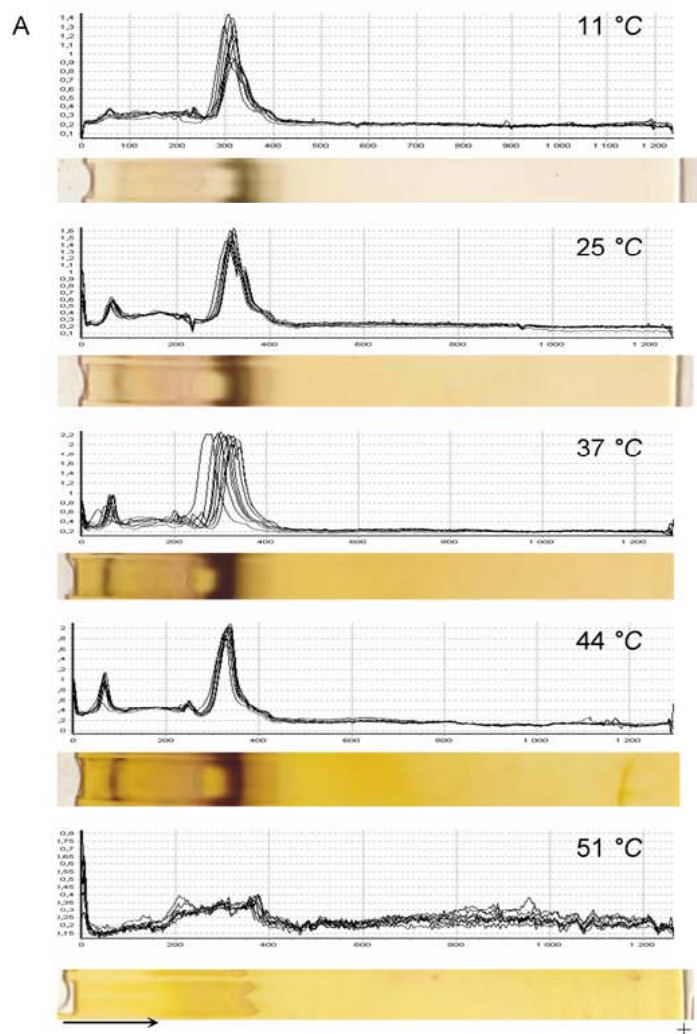


Рис. 5. Качественные и количественные изменения экспрессии гидролаз эфиров карбоновых кислот самцов имаго *Drosophila melanogaster*, определяемой по α -нафтилпропионату при разных температурных режимах:

А – электрофореграммы и денситограммы: обозначения те же, что и на рис. 1. Б – гистограмма: обозначения те же, что и на рис. 2. В – Г – графики: обозначения те же, что и на рис. 3 и 4.

Выводы

1. Уровень экспрессии гидролаз эфиров карбоновых кислот личинок, куколок и имаго *in vitro* зависит от температуры окружающей среды. При этом наиболее характерные изменения в работе ферментов наблюдаются в диапазоне от 11 до 51°C.
2. Все основные эстеразы взрослых мух максимальную активность проявляют при 37°C.
3. Ацетилэстеразы личинок и куколок, в отличие от фермента имаго, наиболее активно гидролизуют α -нафтилацетат при 25°C.
4. При температуре 37°C начинается процесс инактивации *F*-аллозима β -специфичной эстеразы, который ускоряется при 44 и 51°C.
5. В ходе онтогенеза дрозофилы от стадии личинки до стадии имаго возрастает термочувствительность ацетилхолинэстеразы и β -специфичной эстеразы и снижается термочувствительность ацетилэстеразы.
6. В условиях действия критических температур β -фильная эстераза самцов имаго оказывается более активной в случае гидролиза α -нафтилпропионата.

Список литературы

- 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.
- Детлаф Т.А. Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. – М.: Наука, 2001. – 211с.
- Касинская С.И., Михайлова М.Е., Савченко В.К. Изменение генетической структуры экспериментальных популяций дрозофилы по электрофоретическим локусам под влиянием экологических условий // Генетика. – 1992. – Т.28, №10. – С. 58–66.
- Медведев Н.Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1968. – 294с.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320с.
- 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.

**ТЕРМОЧУТЛИВІСТЬ МОЛЕКУЛЯРНИХ ФОРМ ГІДРОЛАЗ ЕФІРІВ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ
ЛИЧИНОК, ЛЯЛЕЧОК ТА ІМАГО *DROSOPHILA MELANOGASTER*
О.М.Андрієвський**

Досліджували вплив температури в діапазоні 11–51°C на попередньо розділені шляхом електрофорезу молекулярні форми карбоксиестераз личинок, лялечок і самців імаго дрозофіли диконого типу. Поліакриламідно-гелеві блоки з локалізованими в них ферментами інкубували при визначеній температурі в присутності суміші субстратів α - і β -нафтилацетатів, а також окремо взятого α -нафтилпропіонату з діазонієм. Про рівень експресії молекулярних форм естераз судили по інтенсивності специфічного забарвлення зон гелевого блоку, що відповідають місцям розташування молекулярних форм ферментів. Кількісний аналіз результатів експресії естераз проводили за допомогою методу комп'ютерної денситометрії. Для кожної молекулярної форми карбоксиестераз встановлено температурний оптимум прояву активності; показані онтогенетичні особливості термочутливості основних форм досліджуваних ферментів; визначено міжалозимні розходження в термостабільності для β -фільної карбоксиестерази. Обговорюється питання адаптивної цінності *S*- і *F*-алозимів β -специфічного ферменту.

Ключові слова: *форми та алозими карбоксиестераз, термочутливість, онтогенез, дрозофіла.*

**THERMOSENSIBILITY OF MOLECULAR FORMS OF THE CARBOACID HYDROLASES OF
LARVAE, PUPAE AND IMAGO OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*
A.M.Andrievsky**

We investigated an influence of the temperature ranging from 11 to 51°C on the preliminary electrophoretically separated molecular forms of the larvae, pupae and imago males carboxylesterases of the wild type of *Drosophila*. The polyacrylamid gel blocks with localized ferments were incubated at a given temperature in presence of the α - and β -naphthylacetate substrate mixture, as well as with separately taken α -naphthylpropionate with diazonium. The expressivity level of the esterase molecular forms was estimated using the intensity of the specific colour of the gel block

zones that correspond to the places where molecular forms of ferment are localized. The quantitative analysis of observed expressivity results was carried out with a help of computer densitometry. For each molecular form of carboxylesterase we determined the optimal temperature of the activity expression. We also showed the ontogenetic peculiarities in the thermosensibility of the principal forms of studied ferments, and established interallozymatic differences in the thermostability of β -phil carboxylesterase. We discuss the problem of the adaptive value inherent to S- and F-allozymes of the β -specific ferment.

Key words: *forms and allozymes of carboxylesterases, thermosensibility, ontogenesis, Drosophila.*

Представлено С.В.Чеботарем
Рекомендовано до друку В.Ю.Страшнюком