

Методом електрофорезу аналізували різноманітність молекулярних форм карбоксиестераз у окремих видів дрозофіл та інших представників класу *Insecta*. Встановлено кількість та субстратна специфічність ферментів досліджуваних видів комах. Показано міжвидову схожість та відмінності за певними біохімічними ознаками. Виявлено філогенетичні особливості формування системи карбоксиестераз у представників роду *Drosophila* відносно інших видів класу комах.

A variety of molecular forms of carboxylesterases in some species of drosophila and other representatives of class *Insecta* has been analyzed with the help of electrophoresis. There are established quantity and substrate specificity of enzymes in investigated species of insects. Interspecific similarity and distinction in some biochemical attributes are shown. Phylogenetic features of system carboxylesterases formation at representatives of sort *Drosophila* concerning other species of class *Insecta* are revealed.

БОГУСЛАВСКИЙ Д.В.¹, ЗАХАРОВ И.С.², БАЛАБАН П.М.¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, РАН;
Россия, Москва, 117485, ул. Бутлерова, 5А, e-mail: boguslavsky@rambler.ru

²Институт биологии развития, РАН;
Россия, Москва, 119991, ул. Вавилова, 26, e-mail: iszakharov@yandex.ru

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК - ПРЕДШЕСТВЕННИК НЕЙРОПЕПТИДОВ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ

Одной из важнейших проблем современной биологии является изучение экспрессии генов, которые в большом количестве описаны у животных и человека. Физиологические воздействия на молекулярные механизмы экспрессии генов должны быть особенно важны в нервной системе, в которой экспрессируется наибольшее количество генов, и где такие воздействия оказывают существенное влияние на пластичность нервных клеток и синапсов. Что касается генов, локально экспрессирующихся в ЦНС в физиологически идентифицированных нейронах, изучение их экспрессии впервые начато в нашей лаборатории (Bogdanov et al., 1994). Была обнаружена экспрессия отдельных генов в группах нейронов, участвующих в реализации определенного типа поведения.

В нашей лаборатории был открыт новый ген, названный preHelixSFamid, экспрессирующийся в группе серотонинергических нейронов виноградной улитки *Helix lucorum*, вовлеченных в модуляцию работы нейросети. Последовательность preHelixSFamid гомологична последовательности таких пептидов, как LymnaDFamide и педального пептида тритонии. Препропротеин preHelixSFamid состоит из гидрофобного лидера в N-концевой части и десяти предположительно амидируемых пептидов (Рис.1). *In situ* гибридизация и окрашивание антителами показало селективную экспрессию гена preHelixSFamid в отдельных идентифицированных нейронах педального, церебрального и плеврального ганглия. Эта экспрессия коррелирует с проявлением пищевого поведения. Было показано увеличение количества клеток, экспрессирующих preHelixSFamid у голодных улиток. Также показано достоверное увеличение количества нейронов, транскрибирующих preHelixSFamid у ювенильной улитки до начала активного питания. По-видимому, пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения виноградной улитки.

Met Leu Leu Val Lys Glu Thr Met Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Pro Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Glu Asp Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Lys Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser

Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Glu Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ala Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Asp Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Arg Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Asp Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Pro Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Asn Asp Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Tyr Gly Lys Arg Glu Asp Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Glu Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Tyr Gly Lys Arg Lys Lys Lys Arg Asp Asp Leu Ile Leu Phe Leu Ala

Рис.1. Первичная структура белка кодируемого геном preHelixSFamid. Курсивом выделены пептиды, жирным шрифтом – места протеолиза, подчеркнут гидрофобный лидер в N-концевой части белковой молекулы.

Материалы и методы

Приготовление зонда к мРНК

Открытая рамка считывания изучаемого гена была клонирована в вектор pBSK II + (pBluescript II SK+; Stratagene) по сайту рестрикции Not I. Смысловая мРНК синтезировалась с промотора T7, соответственно антисмысловая – с T3. Перед синтезом вектор был линеаризован рестрикцией по сайту Sac I (для синтеза смысловой мРНК) и по сайту Kpn I (для синтеза антисмысловой мРНК). После чего плазмидную ДНК очищали через легкоплавкую агарозу.

Гибридизация in situ на whole-mount препаратах

Изолированную ЦНС виноградной улитки фиксировали 2 часа в 4% растворе параформальдегида. Затем инкубировали трижды по 5 мин. в буфере PTW (1X PBS, 0,1% Tween 20) и дегитратировали путем последовательной инкубации в растворах PTW/метанол 3:1, 1:1 и 1:3 по 10 мин., после чего ткани переносили на 5 мин. в метанол. Регидратация тканей проводилась путем их перенесения в вышеупомянутые растворы в обратном порядке. После регидратации препараты обрабатывали 10 - 15 мин. раствором протеиназы К (Boehringer, 10 мкг/мл) в PTW. Препараты ЦНС подвергали постфиксации в 4% параформальдегиде на 1X PBS в течение 20 минут. Затем ЦНС 2 раза промывали раствором глицина (2мг/мл) в PTW и дважды PTW. Препараты ЦНС дважды промывали 0,1 М раствором триэтаноламина гидрохлорида (рН 8.0), помещали в свежий раствор триэтаноламина гидрохлорида и по каплям при постоянном помешивании добавляли уксусный ангидрид из расчета 12,5 мкл на 5 мл. Данную смесь инкубировали 5 мин. и затем к ней опять добавляли такое же количество уксусного ангидрида с последующей инкубацией в течение 5 мин. Препарат несколько раз промывали PTW и помещали в гибридизационный буфер, содержащий 50% формамид, 5 мМ ЕДТА, 5X SSC, 1X раствор Денхардта (0,02% фиколл, 0,02% поливинилпирролидон и 0,02% BSA), 0,1% Tween20 и 0,5мг/мл тРНК. Предгибридизацию проводили 6-8 часов при 50°C.

Гибридизацию проводили в гибридизационном буфере при 50°C 12-14 часов. Концентрация зонда к мРНК, меченного дигоксигенином составляла 0,3-0,5 мкг/мл. Непрогибридизовавшуюся пробу отмывали последовательными инкубациями при 60°C следующими растворами: 50% формамид/5X SSC/1% SDS; 50% формамид/ 2X SSC/ 1%SDS и дважды 0,2X SSC. Каждая инкубация с вышеупомянутыми растворами длилась по 30 мин. После этого образцы несколько раз промывали буфером PBT (1X PBS, 0,1% TritonX100, 2мг/мл BSA) и инкубировали 60-90 мин. при 4°C в растворе PBT, содержащем 10% инактивированной теплом нормальной овечьей сыворотки.

К препаратам затем добавляли PBT, содержащий 1% инактивированной теплом нормальной овечьей сыворотки и конъюгированные со щелочной фосфатазой антитела к дигоксигенину (Boehringer Mannheim, разведение 1:1500), и инкубировали при постоянном помешивании 12-14 часов при 4°C. Не связавшиеся антитела отмывали инкубацией с PBT трижды по 20 мин., а затем препараты промывали дважды по 5 мин.

раствором, содержащим 100мМ NaCl, 50мМ MgCl₂, 0,1% Tween 20, 1мМ levamisol (Sigma) и 100мМ Трис/Cl pH 9,5. После этого к образцам добавляли вышеупомянутый раствор, содержащий на 10 мл 45 мкл NBT и 35 мкл ВСIP. Данную смесь инкубировали в темноте при помешивании и при комнатной температуре, периодически проверяя под микроскопом интенсивность окраски нейронов. По достижении необходимого соотношения сигнал/фон окрашивание прекращали, помещая препарат в 1X PBS, 10мМ EDTA (на несколько минут). Далее препараты помещались в раствор параформальдегида/PBS.

Результаты и обсуждение

На первом этапе мы картировали транскрипцию изучаемого гена у взрослых животных при отсутствии, каких-либо воздействий. Цель данных исследований – выяснение паттерна экспрессии *preHelixSFamid* в норме, для последующего анализа изменений экспрессии данного гена при различных функциональных состояниях животных, и в онтогенезе. Было изучено распределение экспрессии *preHelixSFamida* у 32 животных для получения максимально полной карты транскрипции гена.

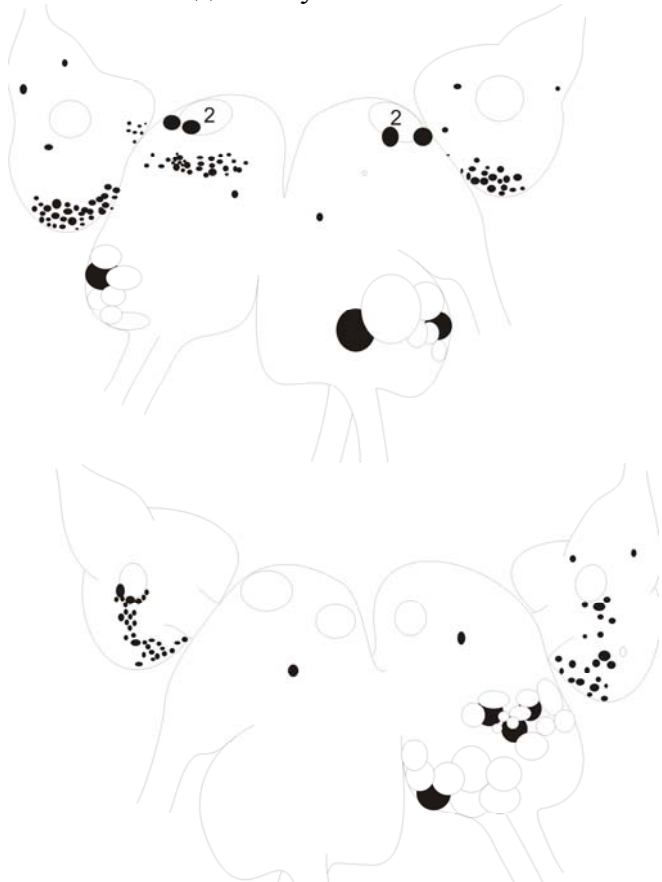


Рис.2.Париеальный ганглий (вентральная сторона - слева, дорсальная сторона-справа).

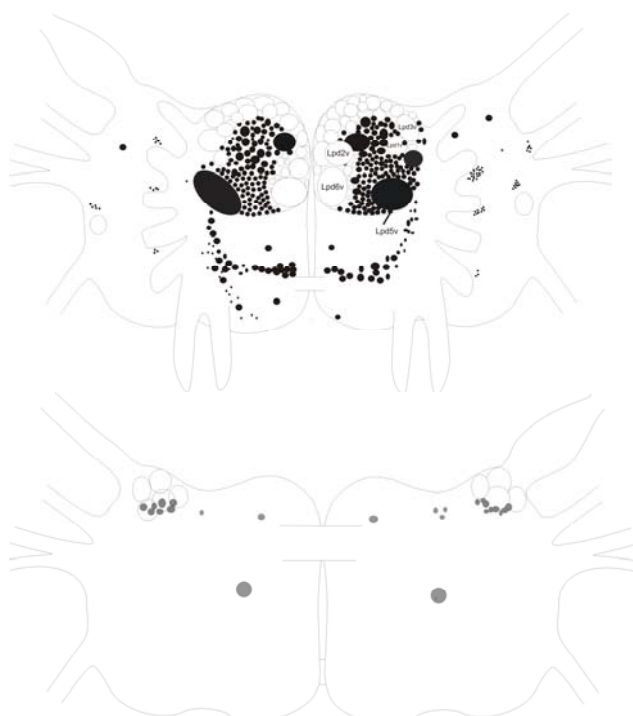


Рис.3. Педальный ганглий (вентральная сторона – слева, дорсальная сторона – справа).

По результатам выполненных нами гибридизаций построена карта транскрипции гена *preHelixSFamida* в ЦНС виноградной улитки (Рис.2,3). На карте отмечены отдельные нейроны, экспрессирующие данный ген. Такие нейроны присутствуют в следующих ганглиях: буккальных, церебральных, педальных и плевральных. Часть этих нейронов идентифицирована по выполняемой ими функции, все они включены в сеть пищевого поведения.

На втором этапе исследований мы попытались установить закономерность изменений в паттерне распределения в нервной системе экспрессии изучаемого гена, сопоставляя результаты гибридизации *in situ* нервной системы животных, находящихся в разном функциональном состоянии. Были поставлены эксперименты по исследованию зависимости уровня экспрессии гена *preHelixSFamid* от состояния насыщения животного. Для этого две группы животных (по 15 улиток) содержали в течение 12-14 дней в активном состоянии. При этом одна группа пищи не получала, а другая получала *ad libitum*. На препаратах ЦНС голодных улиток после проведения гибридизации *in situ* выявляется на 20-40% больше *preHelixSFamid*-экспрессирующих нейронов в плевральных ганглиях и в процеребруме (Рис.4).

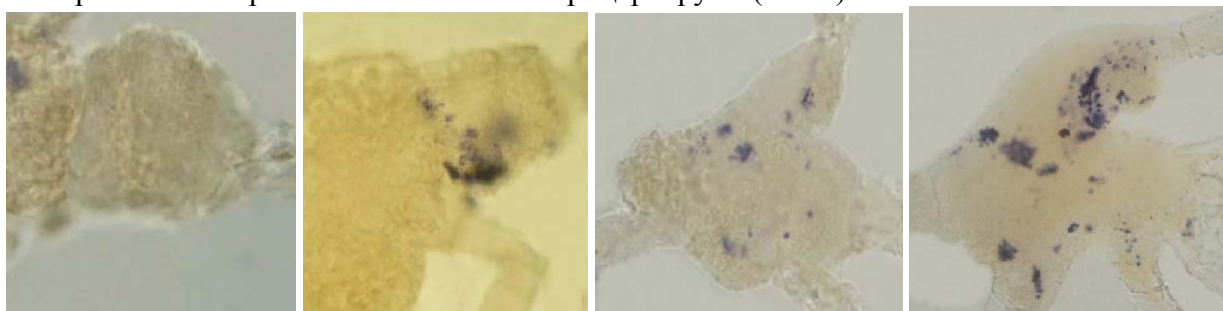


Рис.4. Изменение паттерна экспрессии *preHelixSFamid* при пищевой депривации (плевральный ганглий, сытая улитка, голодная улитка; процеребрум, сытая улитка, голодная улитка).

На третьем этапе исследовали паттерн экспрессии гена *preHelixSFamida* на различных стадиях эмбриогенеза и у ювенильных улиток до 30-дневного возраста после вылупления (Рис.5). Исследования проводили на эмбрионах, начиная с 10 дня после откладки яиц (соответствует примерно 56% эмбрионального развития) с

интервалом в 1 сутки. У ювенильных улиток анализировали нервную систему в 1-й день (новорожденные), на 4-й и 7-й день после вылупления.

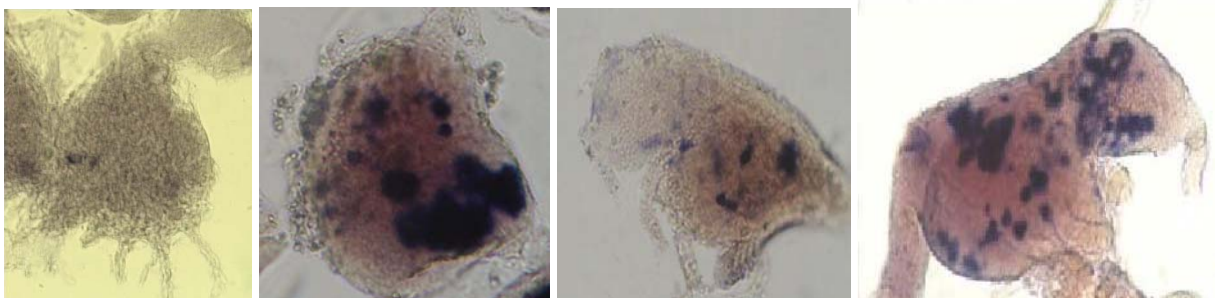


Рис.5. Изменение паттерна транскрипции preHelixSFamid в онтогенезе (педальный ганглий, новорожденная улитка; эмбрион, новорожденная улитка; церебральный ганглий, новорожденная улитка; церебральный ганглий, ювенильная улитка).

Экспрессия данного гена в нервной системе начинается достаточно рано. Самая ранняя стадия, на которой в наших условиях устойчиво выявлялись клетки, маркированные зондом на мРНК preHelixSFamid, соответствует 11-12-ому дню эмбриогенеза. Единичные, относительно крупные клетки появляются примерно одновременно в педальных, церебральных ганглиях и парието-висцеральном комплексе и среднего размера клетки – в буккальных ганглиях. Нейрон, который в зрелой ЦНС идентифицируется нами как Pd5v (на вентральной поверхности педального ганглия), является самой ранней из этих первых preHelixSFamid-экспрессирующих клеток в эмбриональной ЦНС. Общим правилом, видимо, является то, что клетки, имеющие наибольшие размеры в зрелом состоянии, в эмбриогенезе выявляются как preHelixSFamid-экспрессирующие раньше других. Таким образом, анализ паттернов экспрессии гена preHelixSFamida в ЦНС новорожденных и семидневных улиток показывает значительное уменьшение экспрессии данного гена, сходное по своей интенсивности с уменьшением экспрессии у сытого взрослого животного. Такая корреляция объясняется тем, что до 6-7 дня после рождения улитка не питается.

Выводы

Показано увеличение количества клеток, экспрессирующих preHelixSFamid у голодных улиток и достоверное увеличение количества нейронов, транскрибирующих preHelixSFamid у ювенильной улитки до начала активного питания. По-видимому, пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения улитки.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-01379.

Литература

Bogdanov YD, Ovchinnikov DA, Balaban PM, Belyavsky AV. (1994) Novel gene HCS1 is specifically expressed in the giant interneurons of the terrestrial snail. *Neuroreport*. Jan 31; 5(5): 589-92.

Резюме

Новый ген, экспрессирующийся в серотонинергических нейронах *Helix lucorum*, кодирует белок-предшественник нейропептидов. Пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения виноградной улитки. Было показано увеличение количества клеток, экспрессирующих preHelixSFamid у голодных улиток и достоверное увеличение числа preHelixSFamid нейронов у ювенильной улитки до начала активного питания.

Novel gene is expressed in serotonin-containing neurons of *Helix lucorum*, coding protein-precursor neuropeptides. Peptides preHelixSFamid participate in the organization of feeding behavior of terrestrial snail. Was shown increase in number of the preHelixSFamid gene-expressing cells in hungry snails relative the number in sated animals and increase in number of gene-expressing neurons in juvenile snails prior to the beginning of an active feed.