

10. Чистяков В.А., Корниенко И.В., Клецкий М.Е., Корниенко И.Е., Лисицын А.С., Новиков В.В. Супероксидустрояющая активность некоторых аминокислот в водных растворах. // Биофизика.- 2005.- т.50, №4- с. 601-605.
11. Imlay, J.A., Fridovich I. J. Biol. Chem.- 1991.- vol. 226, - P. 6957-6965.
12. Oda M., Satta Y., Takenaka O., Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications // Molecular Biology and Evolution.- 2002.- vol. 19,- P. 640-653

Резюме

Анализ структурной организации гена уриказы показал, что он представлен системой коротких консервативных регионов, стабильных у всех исследованных позвоночных. Урат способен более эффективно, чем аллантиин «перехватывать» супероксид анион, проявляя в то же время меньшую способность инактивировать действие перекиси водорода.

Analysis of structural organization of *uox* gene showed, that *uox* gene consists of a short conservative region unchanging in all investigated vertebrates. Urat can more effectively than allantoin "intercept" superoxide anion, but at the same time urate showed less ability to inactivate free radicals responsible for the DNA-destructive activity of hydrogen peroxide.

АНДРИЕВСКИЙ А. М.

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: andriev_scar@mail.ru

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗНООБРАЗИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У ДРОЗОФИЛ И ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ КЛАССА *INSECTA*

Ферментативные системы являются важнейшими интегративными компонентами биохимического фенотипа и в определённой мере отражают степень адаптации живых организмов к условиям среды обитания [1]. Одна из таких систем представлена карбоксиэстеразами, гидролизующими разнообразные сложные эфиры карбоновых кислот [2]. К сожалению, группа эстеразных ферментов отдельных видов животных, как в онтогенетическом, так и в филогенетическом аспектах практически не изучена [3]. В связи с этим, целью данной работы было исследовать филогенетические особенности разнообразия и экспрессии молекулярных форм карбоксиэстераз у представителей рода *Drosophila*, а также провести сравнительный анализ по изучаемым биохимическим признакам отдельных видов класса насекомых.

Материалы и методы

В экспериментах, направленных на исследование филогенетических особенностей экспрессии карбоксиэстераз у дрозофил использовали такие виды насекомых как: стрекоза коричневая (*Orthetrum cancellatum*), златоглазка обыкновенная (*Chrysoperla carnea*), трихограмма (*Trichogramma pentoi*, *Trichogramma evanescens*), муравей рыжий лесной (*Formica rufa*), комар грибной (*Bradysia pilistriata*), комар хаборус (*Chaoborus species*), мухи: падальная синяя, мясная серая, комнатная, бабочница, плодовая мушка чернотелая, плодовая мушка мужественная и другие представители рода *Drosophila* (*Calliphora species*, *Coprosarcophaga haemorrhoidalis*, *Musca domestica*, *Psychoda phalaenoides*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*, *Drosophila species*, *Drosophila species*, *Drosophila species*).

Опытные образцы для электрофоретического разделения готовили, гомогенизируя ткани в 0,1 М глицин-NaOH буфере pH 9,0 в соотношении 1 : 10. Ферментсодержащие экстракты получали путём центрифугирования гомогенатов при 10 000 g в течение 15 мин. После проведения щелочного электрофореза карбоксиэстеразы выявляли с помощью совместно используемых субстратов α -нафтилацетата и β -нафтилацетата [4, 5, 6]. Полученные энзимограммы использовали для установления числа молекулярных форм карбоксиэстераз у каждого конкретного вида организмов, определения числа α -специфичных форм эстераз, β -специфичных форм эстераз и эстераз со смешанной субстратной специфичностью. Кроме того, определяли число медленноподвижных форм эстераз (Rf 0,000 – 0,330), среднеподвижных (Rf 0,330 – 0,660) и быстроподвижных (Rf 0,660 – 1,000).

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные по разнообразию молекулярных форм карбоксиэстераз у представителей разных таксономических категорий позволяют судить о том, что в процессе филогенетического развития у насекомых происходили существенные изменения в системе эстеролитических ферментов, отражающие соответствующие адаптации к условиям среды существования. В этой связи основными показателями исторического преобразования исследуемой системы на наш взгляд являются количество молекулярных форм эстераз, отражающие разнообразие биохимических функций, и как следствие этого – субстратная специфичность, указывающая на конкретную реализацию отдельной функции определенного фермента.

По нашим данным насекомые по показателям разнообразия карбоксиэстераз представляют собой наиболее интересную группу животных организмов, что, скорее всего, связано с типами питания на различных этапах онтогенеза, а также со сложными перестройками самого организма в процессе индивидуального развития. Так, у личинок стрекозы коричневой нами обнаружено 5 форм карбоксиэстераз, одна из которых обладает довольно высокой нафтилацетазной активностью.

Необычайно ярким по выраженности активности оказался спектр карбоксиэстераз трихограмм. Из шести молекулярных форм – 3 обладают α - β -нафтилацетазной активностью и 2 – β -нафтилацетазной.

Карбоксиэстеразный спектр другого представителя перепончатокрылых – муравья лесного рыжего – оказался также весьма разнообразным: из подавляющего большинства (6 форм) медленноподвижных и среднеподвижных эстераз чётко выделяется одна фракция β -специфичной карбоксиэстеразы.

В отличие от вышеописанных видов, спектр изучаемых ферментов златоглазки обыкновенной представлен нами в онтогенезе насекомого. У эмбрионов златоглазки эстеразы экспрессируются крайне слабо, хотя уже на этой первой стадии цикла развития усматривается их субстратная α -специфичность. Существенного уровня активности ферментативная система достигает на стадии личинки, и в это время наиболее выражено проявляются среднеподвижные эстеразы, гидролизующие как α -, так и β -нафтилацетат. В то же время обнаруживается медленноподвижная форма β -специфичной эстеразы. На стадии куколки экспрессия эстераз со смешанной специфичностью достигает максимума. Вполне вероятно, что эти ферменты на стадии покоя выполняют крайне важную экстеро-липазную функцию, направленную на гидролиз жиров, депонированных личинкой-хищником. На стадии имаго, как у самцов, так и у самок, экспрессия той же группы эстераз заметно снижается; при этом по отдельным фракциям ферментов обнаруживается полиморфизм. Индивидуальное развитие комара грибного нами представлено стадиями личинки и имаго, которые существенно различаются по разнообразию и степени выраженности молекулярных форм эстераз. У питающихся мицелием вешенки личинок идентифицируется 7 основных фракций ферментов, причем 6 из них проявляют α - β -специфичную активность, тогда как β -специфичный энзим отсутствует вовсе. У непитающихся же

самцов и самок имаго большинство личиночных форм карбоксиэстераз сохраняется, однако их каталитическая активность менее выражена.

По сравнению с комаром грибным, у комара-звонца электрофоретический спектр карбоксиэстераз оказался намного беднее. Крайне слабо выраженными представлены единичные формы эстераз эмбрионов; значительно сильнее экспрессируются эстеразы у личинок и куколок, а имагинальные особи, очевидно, ввиду редукции пищеварительной системы и ослабления пищеварительной функции демонстрируют низкий уровень экспрессии всех форм карбоксиэстераз.

Судя по нашим данным, радикальные преобразования система карбоксиэстераз претерпевает у мух (таблица 1): появляются дополнительные формы ферментов, по некоторым из них обнаруживаются аллозимные варианты, у всех представителей прослеживается наличие одной, двух и более форм β -специфичной эстеразы, представленной отдельными аллозимными вариантами; у подавляющего большинства представителей этой группы двукрылых определяется широкий спектр субстратной специфичности. Так, у мухи падальной синей из 8 отдельных форм эстераз – 5 проявляют β -специфичность и 3 являются неспецифичными. В расчёте на одну особь все формы эстераз этой мухи являются очень высоко экспрессивными, что вполне соответствует основному типу её питания, предусматривающему утилизацию разнообразных сложных эфиров, и в том числе жиров, разлагающихся организмов. Чётким, однако менее разнообразным оказался эстеразный спектр у мухи мясной серой. Он насчитывает всего три хорошо различающиеся фракции со смешанной и β -специфичной ферментативной активностью. У мухи комнатной выявлено 5 форм карбоксиэстераз, как и у предыдущих двух видов мух, характеризующихся медленной и средней электрофоретической подвижностью и, в основном, сходным отношением к используемым нами субстратам.

Интересным объектом оказалась муха-бабочница, в тканях которой насчитывается, как минимум 6 высокоактивных форм карбоксиэстераз, пять из которых проявляют явную β -специфичность по отношению к β -нафтилацетату и, кроме того, распределяются по всем зонам электрофоретической подвижности в ходе электрофореза. В онтогенезе этой мухи происходят существенные преобразования в системе карбоксиэстераз, по-видимому, связанные с переходом насекомого на другой тип питания.

Таблица 1

Разнообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у отдельных представителей отряда *Diptera*

№	Виды	ΣMff	ΣS ,	ΣM ,	ΣF ,	Σ α -эстераз	Σ α - β -эстераз	Σ β -эстераз
			$Rf 0 - 0,330$	$Rf 0,330 - 0,660$	$Rf 0,660 - 1$			
1	<i>Calliphora species</i>	8	3	5	0	0	3	5
2	<i>Coprosarcophaga haemorrhoidalis</i>	3	2	1	0	0	1	2
3	<i>Musca domestica</i>	5	3	2	0	1	2	2
4	<i>Psychoda phalaenoides</i>	6	3	2	1	1	0	5
5	<i>Drosophila species</i>	5	5	0	0	1	2	2
6	<i>Drosophila melanogaster</i>	6	6	0	0	1	3	2
7	<i>Drosophila virilis</i>	8	4	2	2	1	6	1
8	<i>Drosophila species</i>	7	4	1	2	1	5	1
9	<i>Drosophila species</i>	7	3	2	2	0	7	0

Примечание: ΣMff – общее количество молекулярных форм ферментов; ΣS , $Rf 0 - 0,330$ – количество медленноподвижных молекулярных форм, ΣM , $Rf 0,330 - 0,660$ – количество среднеподвижных молекулярных форм, ΣF , $Rf 0,660 - 1$ – количество быстроподвижных молекулярных форм; $\Sigma \alpha$ -эстераз – количество α -специфичных молекулярных форм, $\Sigma \alpha$ - β -эстераз – количество α - β -специфичных молекулярных форм, $\Sigma \beta$ -эстераз – количество β -специфичных молекулярных форм.

Наиболее подробно в филогенетическом аспекте нами были изучены представители семейства *Drosophilidae*. Среди них – 3 неустановленных вида характеризовались сходным общим количеством форм карбоксиэстераз, охватывающих весь диапазон субстратной специфичности, за исключением вида, расположенного в таблице 1 под номером 9. Как у самок, так и у самцов имаго этой дрозофилы практически не экспрессировалась β -специфичная эстераза, обычная для других

представителей рода *Drosophila*. Кроме того, ацетилэстераза не проявляла строгой α -специфичности по отношению к используемым субстратам, хотя и обладала сходной с аналогичным ферментом других видов электрофоретической подвижностью. Однако, что интересно, у этого вида, как и у другого, условно названного *Апаратской* линией, обнаруживаются одна-две быстроподвижные формы карбоксиэстераз, явно представляющие собой аллозимы одного и того же фермента. Это указывает на существование в популяциях данных видов полиморфизма по соответствующему локусу обнаруженной карбоксиэстеразы. Весьма сходным, однако несколько более богатым оказался энзимный спектр *Drosophila virilis* и, в отличие от дрозофилы чернотелой, он также как и спектры неустановленных нами видов, содержит две формы сверхподвижных эстераз.

Анализируя карбоксиэстеразные спектры отдельных видов дрозофил, можно прийти к выводу о том, что их система карбоксиэстераз представлена большим количеством (5 – 8) молекулярных форм, обладающих разной субстратной специфичностью и характеризующихся определенным межвидовым сходством.

Выводы

1. Представители рода *Drosophila* характеризуются большим разнообразием молекулярных форм карбоксиэстераз. 2. Среди эстераз дрозофил присутствуют ферменты, обладающие групповой субстратной специфичностью, а также эстеразы, избирательно действующие на β -изомеры сложных эфиров. 3. По наличию средне- и быстроподвижных форм β -специфичной эстеразы изучаемые виды дрозофил сходны с большинством представителей отряда *Diptera*. 4. Разнообразие индивидуальных форм β -специфичной эстеразы у различных представителей насекомых указывает на наличие генетически обусловленного полиморфизма по данному биохимическому признаку. 5. Экспрессия всех исследуемых форм карбоксиэстераз у представителей отряда двукрылых носит онтогенетически зависимый характер. 6. Экспрессия и разнообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у представителей рода *Drosophila* являются как организменными, так и популяционно-видовыми адаптациями, отражающими особенности филогенеза группы плодовых мушек.

Литература

1. Голубцов А.С. Внутрипопуляционная изменчивость животных и белковый полиморфизм. – М.: Наука, 1988. – 168 с.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Издание в 3-х томах. – Т. 1. – 389 с.
3. Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений. – Киев: Урожай, 1993. – 528 с.
4. Андриевский А. М., Тоцкий В. Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу β -фильной карбоксиэстеразы // Цитология и генетика, 2006. – Т. 40, № 6. – С. 3 – 10.
5. Андриевский А. М. Половой диморфизм по экспрессии эфиров карбоновых кислот в популяциях *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ, 2006. – Т. 11, Вип. 9. – С. 7 – 17.
6. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.

Резюме

Методом электрофореза анализировали многообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у отдельных видов дрозофил и других представителей класса *Insecta*. Установлено количество и субстратная специфичность ферментов исследуемых видов насекомых. Показано межвидовое сходство и различие по изучаемым биохимическим признакам. Выявлены филогенетические особенности формирования системы карбоксиэстераз у представителей рода *Drosophila* относительно других видов класса насекомых.

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