

М. Г. АЙЗЕНЗОН, Л. И. КОРОЧКИН, И. Ф. ЖИМУЛЕВ

**ГОРМОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ
ФОСФАТАЗЫ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA*
MELANOGASTER ВО ВРЕМЯ МЕТАМОРФОЗА**

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 18 VII 1975)

В слюнных железах и других личиночных органах многих насекомых, развивающихся с полным метаморфозом, во время гистолиза увеличивает активность лизосомных ферментов, в частности кислой фосфатазы (¹⁻⁷). Поскольку это увеличение наблюдается на фоне высокой концентрации гормона экдизона и гистолиз слюнных желез дрозофилы, как было показано ранее (⁸), также индуцируется экдизоном, можно предположить, что возрастание активности кислой фосфатазы происходит под действием данного гормона.

Настоящая работа посвящена выяснению возможности непосредственной гормональной индукции увеличения активности кислой фосфатазы в слюнных железах *D. melanogaster*.

Использовали личинок и мух лабораторной линии Батуми-Л и двух линий, различающихся по электрофоретической подвижности кислой фосфатазы: *Asph-1^{AA}* и *Asph-1^{BB}*.

Суммарную активность кислой фосфатазы определяли спектрофотометрически (^{7, 9, 10}) в гомогенатах слюнных желез личинок и предкуколок (14 желез в 0,8 мл раствора Эфрусси — Бидла (⁹) или 1% тритона X-100). Количество общего белка слюнных желез определяли по методу Лоури (¹¹). Для вычисления удельной активности суммарную активность фермента относили к количеству общего белка. В каждом опыте сделано 2—6 независимых определений, по результатам которых подсчитывали среднее и ошибку среднего (¹²). Электрофоретическое разделение вариантов кислой фосфатазы проводили по методу Шоу и Прасада (¹³). Методика трансплантации слюнных желез, инъекций экдистерона, актиномицина D и циклогексимида, использованные в работе, описаны в предыдущем сообщении (⁸).

В слюнных железах дрозофилы удельная активность кислой фосфатазы в течение третьего личиночного возраста имеет постоянный невысокий уровень, затем резко возрастает у предкуколок и через 14 час. после начала окукливания в два раза превышает активность фермента в третьем возрасте (рис. 1). Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее на других объектах (¹⁻⁷). Исследование особей старше 14-часовых предкуколок не проводили, так как железу вследствие активно протекающего гистолиза уже невозможно выделить как целостный орган.

Для проверки предположения об участии гормона в индукции усиления активности кислой фосфатазы провели серию трансплантаций слюнных желез 72-часовых личинок (возраст указан в часах от момента откладки яиц), не контактировавших с экдизоном, в брюшко взрослых мух, где экдизон отсутствует. Спустя 6 дней мухам-реципиентам вводили экдистерон, через определенные промежутки времени мух вскрывали и в найденных слюнных железах определяли удельную активность фермента. Контрольным мухам-реципиентам экдизон не инъектировали. Было обнаружено, что через 26,5 час. после инъекции экдистерона удельная активность

кислой фосфатазы трансплантированных слюнных желез увеличивается почти в два раза (рис. 2). Более длительных наблюдений не проводили, так как железы в результате инъекций гормона подвергались гистолиту и уже к этому сроку в 40 % случаев их невозможно было обнаружить в мухах-реципиентах. Таким образом, увеличение активности кислой фосфатазы стимулируется экдизоном.

Чтобы выяснить, возрастает ли активность фермента за счет синтеза новых его молекул или активации уже существующих, были проведены следующие опыты. Мухам-реципиентам, в брюшке которых 6 дней инкубировали слюнные железы 72-часовых личинок, вводили актиномицин D или циклогексими́д и через 60 ± 6 мин. экдистерон. В опытах с циклогексими́-

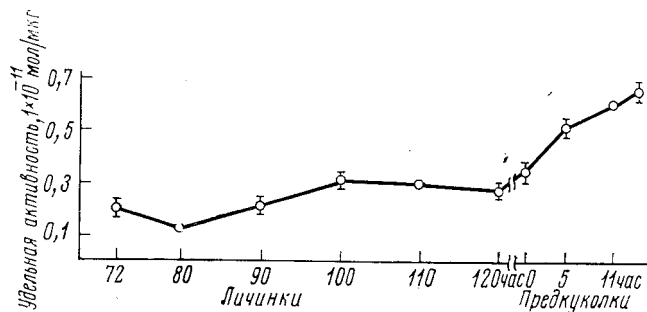


Рис. 1. Изменения удельной активности кислой фосфатазы слюнных желез у личинок третьего возраста и предкуколок. Время отсчитывается от откладки яиц для личинок и от выворачивания передних дыхалец для предкуколок. Ошибки среднего подсчитаны для 3–6 измерений

мидом проводили повторные инъекции ингибитора через 11 час. после введения гормона. Оказалось, что при инъекциях ингибиторов синтеза РНК и белков удельная активность кислой фосфатазы через 26,5 час. после инъекции гормона находится на уровне контроля (рис. 2).

Для того чтобы оценить изменение суммарной активности, связанной с мембранами фракции кислой фосфатазы, экстракцию проводили с помощью детергента тритона X-100. В этом случае нарастание активности кислой фосфатазы происходит параллельно изменению суммарной активности водорастворимой фракции фермента (*). Этот факт позволяет исключить возможность того, что увеличение активности фермента происходит за счет перехода связанной с мембранами фракции кислой фосфатазы в водорастворимую фракцию. Можно было бы предположить, что под действием гормона синтезируется некий белок, активирующий синтезированный заранее фермент. В этом случае концентрация белка-активатора должна быть очень высокой у предкуколок. Поэтому следует ожидать, что

Таблица 1

Удельная активность кислой фосфатазы в смеси желез личинок третьего возраста и 14-часовых предкуколок

Возраст доноров	Отношение числа смешиваемых желез	Удельная активность кислой фосфатазы в смеси, $1 \cdot 10^{-11}$ моль/мкг	Уровень активности кислой фосфатазы в смеси от активности у 14-часовой предкуколки, %
96-часовая личинка и 14-часовая предкуколка	1:1	0,485	73,5
	2:1	0,479	72,5
	5:1	0,372	56,4
115-часовая личинка и 14-часовая предкуколка	1:1	0,493	74,6
	2:1	0,368	55,6

в гомогенатах смеси слюнных желез личинок и предкуколок активность кислой фосфатазы должна приближаться к активности фермента у предкуколок. Однако оказалось, что удельная активность кислой фосфатазы в смеси слюнных желез личинок и 14-часовых предкуколок не достигает уровня активности, обнаруживаемого в гомогенатах желез предкуколок. Более того, активность падает по мере увеличения доли белка личинок (табл. 1). Это может свидетельствовать о том, что возрастание активности кислой фосфатазы у предкуколок происходит не за счет активации молекул фермента, синтезированных у личинки, а в результате синтеза новых молекул.

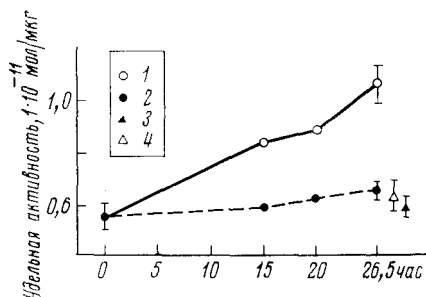


Рис. 2

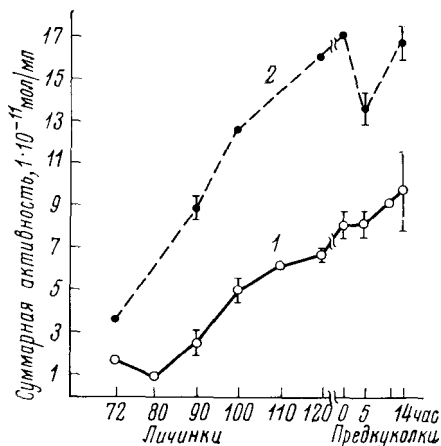


Рис. 3

Рис. 2. Индукция активности кислой фосфатазы экдистероном. Время отсчитывается от инъекции экдистерона в брюшко имаго. 1 — инъекции экдистерона, 2 — контроль, 3 — инъекции актиномицина D и экдистерона, 4 — инъекции циклогексимида и экдистерона. Ошибки среднего подсчитаны для 4 измерений

Рис. 3. Изменения суммарной активности кислой фосфатазы слюнных желез. Время отсчитывается так же, как на рис. 1. Ошибки среднего подсчитаны для 3–6 измерений. 1 — гомогенат приготовлен на физиологическом растворе, 2 — в 1% триптоне X-100

Поскольку не исключена возможность того, что некоторые белки синтезируются в других органах, а затем транспортируются в слюнную железу (¹⁴), сделана попытка выяснить, синтезируется ли кислая фосфатаза непосредственно в слюнных железах при гормональной индукции. С этой целью провели серию трансплантаций слюнных желез 72-часовых личинок *D. melanogaster* линии *Asph-1^{BB}* (гомозиготы по быстрому варианту кислой фосфатазы) в брюшко имаго линии *Asph-1^{AA}* (гомозиготы по медленному варианту фермента). Спустя 6 суток мухам-реципиентам вводили экдистерон. Через 26,5 час. после инъекции гормона мух вскрывали и проводили электрофорез белков трансплантированных желез (6 желез в одной пробе). В качестве контроля использовали железы, извлеченные из мух, которым гормон не вводили. Если при гормональной индукции фермент синтезируется не в слюнной железе, то в ней можно было бы ожидать наличие двух фракций кислой фосфатазы: быстрой, собственной, которая существовала до инъекций гормона, и медленной, синтезированной в каких-либо органах мухи-реципиента после введения гормона, а затем поступившей в железу. Однако и в опытах и в контрольных образцах трансплантированных слюнных желез имеется только одна быстрая фракция фермента (рис. 4). Это говорит о том, что увеличение активности кислой фосфатазы происходит благодаря индуцированному экдистероном синтезу новых молекул фермента непосредственно в слюнной железе.

Поскольку применяемая методика электрофореза позволяет выявить активность только одного фермента из группы кислых фосфатаз, а именно кислой фосфатазы, кодируемой геном *Asph-1* (¹³), была сделана попытка установить, индуцируется ли экдизоном активность данного белка. С этой целью полученные электрофореграммы денситометрировали и активность фермента выражали в условных единицах. Оказалось, что после инъекции гормона активность кислой фосфатазы *Asph-1* ($M=176$, $m=\pm 13$, $n=11$) достоверно выше ($P>0,05$), чем в контроле ($M=115$, $m=\pm 16$, $n=8$).

Ранее было показано, что процесс гистолиза индуцируется экдистероном и для его осуществления необходим синтез РНК и белков *de novo* (⁸).

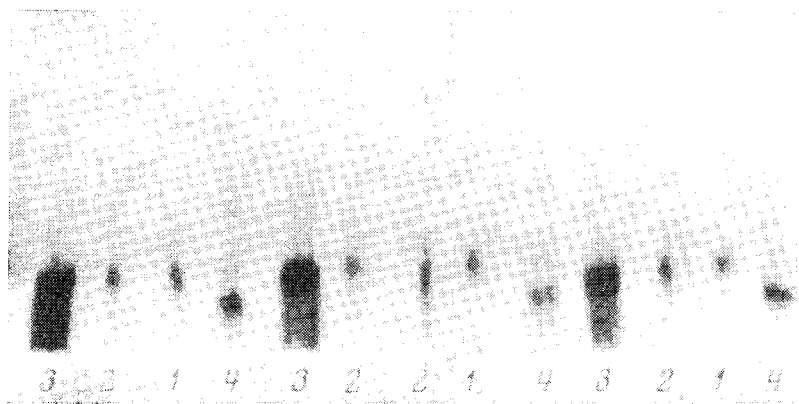


Рис. 4. Электрофоретическая характеристика кислой фосфатазы, индуцированной экдистероном. 1 — контроль, 2 — опыт, 3 — гомогенат из целой мухи линии *Asph-1^{BB}*, 4 — гомогенат из целой куколки линии *Asph-1^{AA}*

Кроме того, хорошо известно, что функциональная активность большого числа районов хромосом увеличивается под действием гормона (¹⁵). Совокупность этих фактов позволяет предположить, что механизм индукции гормоном гистолиза слюнных желез заключается в активировании специфических районов хромосом, отвечающих за синтез гидролитических ферментов.

Авторы выражают глубокую благодарность Г. Д. Берендесу и Р. Дж. Макинтайру за любезно предоставленный препарат экдистерона и линии *Asph-1^{AA}*, *Asph-1^{BB}*, О. Л. Серову, В. И. Глазко, М. А. Сукоян за помощь в работе, Е. С. Беляевой за обсуждение результатов.

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
11 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. J. Barker, B. N. Alexander, Ann. Entomol. Soc. Am., v. 51, 255 (1958). ² D. W. Misch, J. Histochem. and Cytochem., v. 10, 6, 666 (1962). ³ S. Sridhara, J. V. Bhat, J. Insect Physiol., v. 9, 693 (1963). ⁴ H. Laufer, K. S. Schin, Canad. Entomol., v. 103, 3, 454 (1971). ⁵ L. Mulherkar, R. M. Kothari, V. G. Vaidga, Wilhelm Roux's Arch. Entwicklungsmech. Organ., v. 171, 3, 195 (1972). ⁶ K. S. Schin, H. Laufer, Exp. Cell. Res., v. 82, 335 (1973). ⁷ G. M. Price, J. Insect. Physiol. v. 20, 329 (1974). ⁸ M. Г. Айзензон, И. Ф. Жимулев, ДАН, т. 221, № 6, 1441 (1975). ⁹ B. Ephrussi, G. B. Beadle, Am. Nat., v. 60, 728, 218 (1936). ¹⁰ Methods of Enzymatic Analysis, Ed. H. U. Bergmeyer, N. Y.—London, 1965, p. 783. ¹¹ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 1, 265 (1961). ¹² H. А. Плохинский, Алгоритмы биометрии, М., МГУ, 1967, стр. 15, 25. ¹³ C. R. Shaw, R. Prasad, Biochem. Genet., v. 4, 297 (1970). ¹⁴ K. Schin, H. Laufer, J. Insect. Physiol., v. 20, 205 (1974). ¹⁵ М. Эшбёрнер, Онтогенез, т. 5, 2, 107 (1974).