

ПАНЬКОВА

Виктория Владимировна

**АЛЛОЗИМНЫЕ СПЕКТРЫ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ ИЗОМЕРАЗЫ У
ПОЛИДОРИД (POLYCHAETA: SPIONIDAE) И ВОЗМОЖНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ ИХ ФОРМИРОВАНИЯ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Работа выполнена в Институте биологии моря
имени А. В. Жирмунского ДВО РАН**

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Манченко Геннадий Петрович

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН
доктор биологических наук
Булгаков Виктор Павлович

доктор биологических наук
Балакирев Евгений Станиславович

Ведущая организация: Институт биологических проблем севера
ДВО РАН

Защита состоится 28 ноября 2006 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Институте биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН

Адрес: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (4232) 31-09-00

E-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН

Автореферат разослан 18 октября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

М. А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изоферменты – множественные молекулярные формы одного и того же фермента, давно и успешно используются в качестве маркеров генов в различных областях биологии и медицины. Наиболее широкое применение они нашли в популяционной генетике для исследования генетической изменчивости природных популяций и видов. Ключевым моментом в использовании изоферментов как маркеров генов является ясная генетическая интерпретация результатов ферментного электрофореза. Однако, в литературе описано много необычных изоферментных спектров, не нашедших обоснованного и убедительного объяснения. К числу таких случаев относится недавно описанный необычный электрофоретический спектр димерного фермента глюкозо-6-фосфат изомеразы (ГФИ) у полихеты *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae) (Manchenko, 2001). Анализ таких спектров, трудных для традиционной интерпретации, представляется важным и своевременным.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в выяснении молекулярных механизмов формирования изоферментных спектров ГФИ у полидорида (Polychaeta: Spionidae).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изоферментные спектры ГФИ у десяти видов полидорида (Polychaeta: Spionidae).
2. Исследовать сопряженность экспрессии изофермента ГФИ-2 с полом у десяти видов полидорида.
3. Исследовать тканеспецифичность экспрессии изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2.

Научная новизна работы. Проведено электрофоретическое исследование изоферментных спектров глюкозо-6-фосфат изомеразы (ГФИ) у десяти видов полидорида родов *Polydora* и *Dipolydora* (Polychaeta: Spionidae), ранее не исследованных в этом отношении. Установлено, что у всех исследованных видов полидорида экспрессируется два изофермента (ГФИ-1 и ГФИ-2), один из которых (ГФИ-2) экспрессируется только у самцов. Проведено исследование тканеспецифичности экспрессии изоферментов ГФИ. Показано, что изофермент ГФИ-1 экспрессируется преимущественно в соматических тканях у особей обоих полов и в незначительных количествах в диплоидных сперматогенных клетках самцов. Изофер-

мент ГФИ-2 экспрессируется в диплоидных сперматогенных клетках самцов. Установлен факт гибридизации изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 у всех исследованных видов. Показано, что у каждого из исследованных видов полидорид, среди особей, экспрессирующих оба изофермента, преобладают те, которые имеют идентичные аллозимные спектры ГФИ-1 и ГФИ-2. Впервые сделана оценка доли таких особей у 10 исследованных видов.

Впервые получены данные, свидетельствующие в пользу гипотезы о том, что альтернативный сплайсинг (АС) способен генерировать изоферменты, которые на электрофоретических гелях могут быть неотличимы от классических изоферментов, определяемых разными генными локусами.

Теоретическая и практическая ценность работы. Полученные данные, говорящие о том, что изоферменты ГФИ полидорид генерируются АС, послужат важной предпосылкой для формулирования положений новой концепции изоферментов, учитывающей важную роль АС в их генерировании. Это составит основу для ясной генетической интерпретации электрофоретических данных и подтвердит для изоферментов статус надежных генных маркеров.

Апробация работы и публикации. Основные положения работы докладывались на IV Региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии и экологии (Владивосток, 2001); Международной конференции: «Evolution, Genetics, Ecology and Biodiversity» (МАРЕЕГ) (Владивосток, МБС «Восток», 2001), VII Дальневосточной молодежной школе – конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, МЭС ТИБОХ, 2003) и ежегодных научных конференциях Института биологии моря (Владивосток, 2004, 2006). По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 209 ссылок. Диссертация изложена на 108 страницах, содержит 4 таблицы и 43 рисунка.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Г.П. Манченко за руководство, помощь и поддержку при выполнении работы, В.И. Радашевскому за помощь в сборе материала и определении видов, А.И. Пудовкину и В.А. Брыкову за ценные замечания и рекомендации при написании и оформлении работы, а также всему коллективу Лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы выборки особей десяти видов полихет родов *Polydora* и *Dipolydora* семейства Spionidae (Таблица 1). Все виды были собраны в заливе Восток (залив Петра Великого) Японского моря в период с 2001 по 2006 год, за исключением *P. limicola* и *P. cornuta*, которые были собраны в бухте Золотой Рог (Амурский залив (залив Петра Великого)) в 2004 году.

Особей *P. brevipalpa*, *D. bidentata* и *D. carunculata* собирали из разбитых раковин гребешка *Mizuhopecten yessoensis*; *P. glycymerica* – из раковин *Glycymeris yessoensis*; *P. calcarea*, *P. manchenkoi* и *D. commensalis* – из раковин *Cryptonatica janthostoma*, заселенных раками-отшельниками. Особей *P. cornuta* и *D. cardalia* извлекали из илстых трубочек, собранных на глубине 3-4 м, на заиленных песчаных грунтах, в районе МБС Восток ИБМ ДВО РАН. Исследованная выборка *P. limicola* собрана из обрастаний, сформировавшихся на судах, простоявших не менее 6 месяцев в бухте Золотой Рог. Пол червей определялся путем визуального исследования содержимого их гонад под биноклем.

Таблица 1. Виды полидорид и число исследованных особей.

Вид	Число исследованных особей
1. <i>Polydora brevipalpa</i>	1051
2. <i>P. calcarea</i>	321
3. <i>P. cornuta</i>	33
4. <i>P. glycymerica</i>	43
5. <i>P. limicola</i>	71
6. <i>P. manchenkoi</i>	83
7. <i>Dipolydora bidentata</i>	107
8. <i>D. cardalia</i>	37
9. <i>D. carunculata</i>	73
10. <i>D. commensalis</i>	250

Для электрофореза использовали стандартную аппаратуру (Корочкин и др., 1977). При исследовании состава изоферментных спектров и характера аллозимной (аллельной) изменчивости ГФИ, в качестве образцов для электрофореза использовали гомогенаты целых особей. Для определения тканеспецифичности экспрессии изоферментов ГФИ использовали препараты соматических тканей (головная часть, не несущая гонад), а также препараты половых продуктов самцов и самок, которые собирали из зрелых (наполненных) гонад путем их надрыва и сбора текущей спермы или яйцеклеток вместе с морской водой с помощью пипетки. Сперму и яйцеклетки отделяли от морской воды центрифугированием при 12000 g в течение 1 мин.

Электрофорез проводили в горизонтальном блоке 14% крахмального геля (195 x 140 x 3 мм) при температуре 3-4 С° и силе тока 10-15 mA. Для геля, а также для катодного и анодного отсеков электрофоретической камеры, использовали модифицированную непрерывную трис-ЭДТА-боратную буферную систему (pH 8,4) (Manchenko, 2003, p. 550). Длительность электрофореза составляла 12-13 часов. По окончании электрофореза блок геля разрезали пополам на две пластины толщиной 1,5-2 мм. Нижний срез окрашивали на ферментативную активность, используя проявляющую смесь для фермента глюкозо-6-фосфат изомеразы (К.Ф. 5.3.1.9; ГФИ) (Manchenko, 2003).

Для оценки значимости различий между видами по доле идентичных фенотипов ГФИ-1 и ГФИ-2 и выявления однородных групп видов по этому признаку использовали стандартный χ^2 -критерий (Урбах, 1964):

$$\chi^2 = \sum \frac{(N_{ij} - \dot{N}_{ij})^2}{N_{ij}},$$

где N_{ij} – фактическое число i -ых фенотипов j -го вида,

\dot{N}_{ij} – ожидаемое их число при справедливости нулевой гипотезы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электрофоретические исследования изоферментных и аллозимных спектров ГФИ показали, что:

1) У всех исследованных видов электрофоретический спектр ГФИ представлен двумя изоферментами – ГФИ-1 и ГФИ-2. ГФИ-1 экспрессируется у всех особей, а ГФИ-2 только у самцов. Таким образом, у самок спектр ГФИ представлен только изоферментами ГФИ-1, а у самцов ГФИ-1 и ГФИ-2. (см. рис.1, А).

2) У всех исследованных видов изоферменты ГФИ-1 и ГФИ-2 демонстрируют аллозимную изменчивость, типичную для димерных ферментов. Аллозимные спектры гомозигот представлены одной зоной, а спектры гетерозигот – тремя.

3) Исследование тканеспецифичности экспрессии изоферментов ГФИ у самцов пяти видов полидорид (*P. brevipalpa*, *P. calcarea*, *P. glycymerica*, *D. bidentata*, *D. commensalis*) показало, что изофермент ГФИ-1 экспрессируется преимущественно в соматических тканях и в незначительных количествах в сперматогенных клетках самцов. Изофермент ГФИ-2 экспрессируется только в сперматогенных клетках, где он практически полностью замещает изофермент ГФИ-1. (рис.1, А, Б). Трехполосные спектры изофермента ГФИ-2 у гетерозиготных самцов, свидетельствуют о том, что аллельные изоформы этого фермента формируют гибридные молекулы, а следовательно, их экспрессия сопряжена в пространстве и времени. Это в свою очередь свидетельствует о том, что экспрессия изофермента ГФИ-2 происходит в диплоидных сперматогенных клетках (сперматогониях или сперматоцитах I), где в каждой отдельной клетке экспрессируются продукты обоих аллелей (Панькова и Манченко, 2003). Если бы изофермент ГФИ-2 экспрессировался в гаплоидных клетках (сперматоцитах II, сперматидях, или сперматозоидах), то экспрессия разных аллелей была пространственно разобщена на клеточном уровне, и гибридных аллозимов не формировалось. Однако мы не исключаем, что ГФИ-2, синтезируемый в диплоидных клетках остается функциональным и в сперматозоидах.

Одинаковая тканеспецифичность экспрессии изофермента ГФИ-2 у всех пяти исследованных в этом отношении видов полидорид, которые относятся и к роду *Polydora* и *Dipolydora*, дает основания утверждать, что

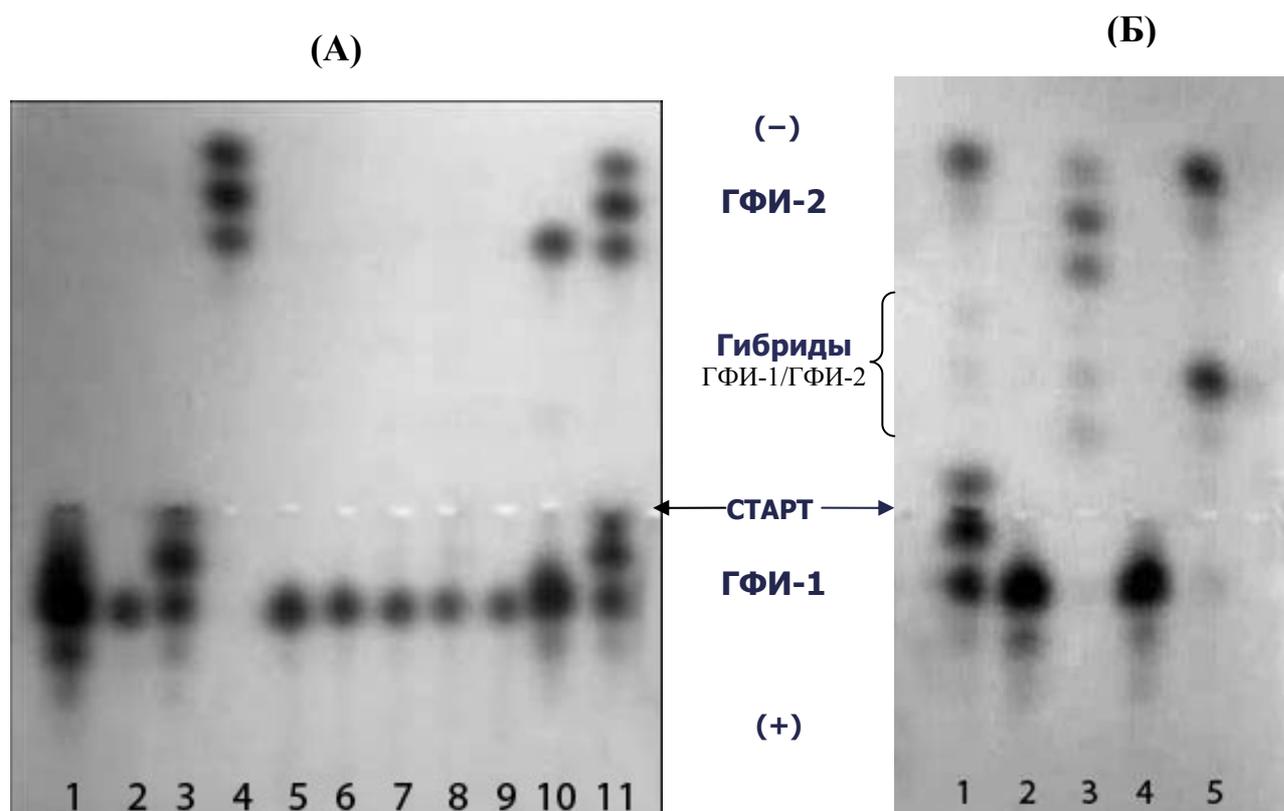


Рис. 1. Зимограммы ГФИ *Polydora brevipalpa* (А) и *P. calcarea* (Б), демонстрирующие тканеспецифичность экспрессии изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 и формирование гибридов ГФИ-1/ГФИ-2.

(А): Дорожки 1, 2 – препараты одной самки: 1 – соматические ткани (головная часть не несущая гонад), 2 – яйцеклетки. Дорожки 3, 4 – препараты одного самца: 3 – соматические ткани, 4 – сперма. Дорожки 5–9 – ♀♀; 10, 11 – ♂♂.

(Б): Дорожка 1 – ♂. Дорожки 2, 3 – препараты одного самца: 2 – соматические ткани (головная часть, не несущая гонад), 3 – сперма. Дорожки 4, 5 – препараты другого самца: 4 – соматические ткани, 5 – сперма.

у всех видов этих двух родов изофермент ГФИ-2 экспрессируется в диплоидных сперматогенных клетках.

Анализ тканеспецифичности экспрессии изоферментов ГФИ-1 у самок показал, что и в соматических тканях и в яйцеклетках у них экспрессируется изофермент ГФИ-1 (рис.1, А).

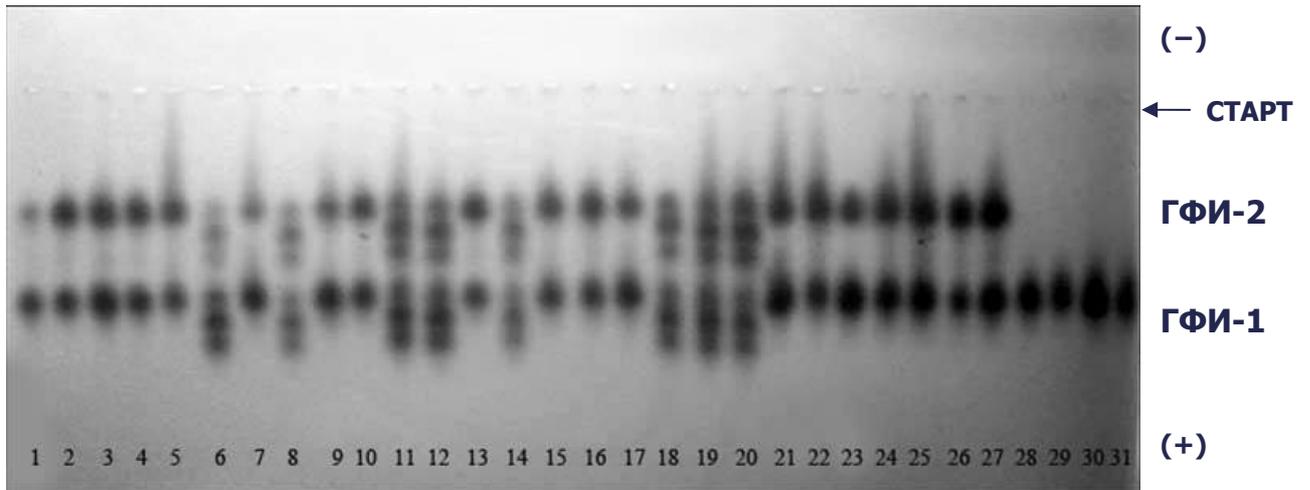
4) У всех исследованных видов в электрофоретических спектрах ГФИ, выявляемых у особей, экспрессирующих оба изофермента, обнаруживаются межизоферментные гибриды ГФИ-1/ГФИ-2. Спектры гибридных изоферментов подвержены качественной и количественной индивидуальной изменчивости, что, вероятно, определяется состоянием гонад самцов (рис.1, Б).

5) Большинство особей каждого из исследованных видов демонстрировали согласованную аллозимную изменчивость изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 (имели идентичные аллозимные спектры изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 (рис.2)), и только редкие особи демонстрировали несогласованную аллозимную изменчивость (имели разные аллозимные спектры (рис.3)). Доля особей с идентичными аллозимными спектрами варьирует от 55 – 100% (Табл. 2). χ^2 -тест показал, что различие между видами по доле идентичных фенотипов ГФИ-1 и ГФИ-2 очень существенно: $\chi^2 (df = 9) = 348.4, p < 0.001$. По этой доле исследованные виды разделяются на три однородные группы (Табл. 3).

Таблица 2. Доля идентичных аллозимных фенотипов ГФИ-1 и ГФИ-2 у 10 видов полихет.

Вид	Количество особей с ГФИ-1 и ГФИ-2	Количество особей с идентичными спектрами ГФИ-1 и ГФИ-2.	Доля особей с идентичными аллозимными спектрами ГФИ-1 и ГФИ-2
<i>Polydora brevipalpa</i>	542	535	98%
<i>P. calcarea</i>	172	98	57%
<i>P. cornuta</i>	16	14	88%
<i>P. glycymerica</i>	39	36	92%
<i>P. limicola</i>	31	17	55%
<i>P. manchenkoi</i>	33	33	100%
<i>Dipolydora bidentata</i>	57	56	98%
<i>D. cardalia</i>	24	24	100%
<i>D. carunculata</i>	48	48	100%
<i>D. commensalis</i>	125	125	100%

(A)



(Б)

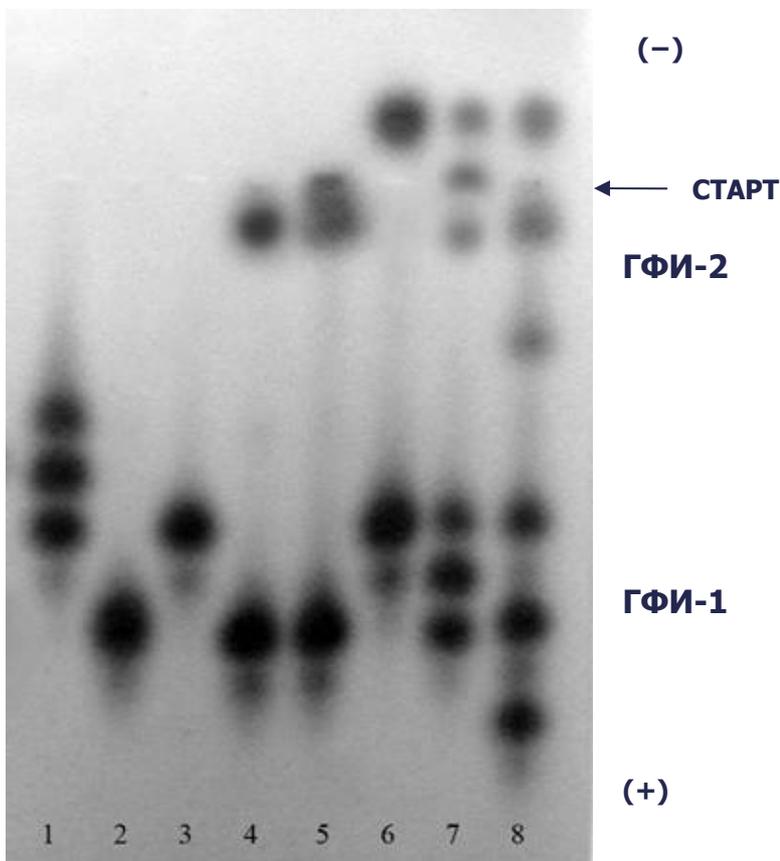


Рис. 2. Зимограммы ГФИ *Dipolydora carunculata* (A) и *D. cardalia* (Б), демонстрирующие согласованность аллозимной изменчивости изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2. (A): Дорожки 1–27 – ♂♂, 28–31 – ♀♀; (Б): Дорожки 1–3 – ♀♀, 4–8 – ♂♂

На зимограммах видно, что у каждого из исследованных самцов *D. carunculata* и *D. cardalia* аллозимные спектры ГФИ-1 идентичны аллозимным спектрам ГФИ-2. Если изофермент ГФИ-1 имеет гомозиготный фенотип, то ГФИ-2 имеет точно такой же гомозиготный фенотип (см. например, А: дорожки 1–5; Б: дорожки 4–6). Если ГФИ-1 имеет гетерозиготный фенотип, то ГФИ-2 имеет точно такой же гетерозиготный фенотип (см. например, А: дорожки 6, 8, 11, 12; Б: дорожки 7, 8).

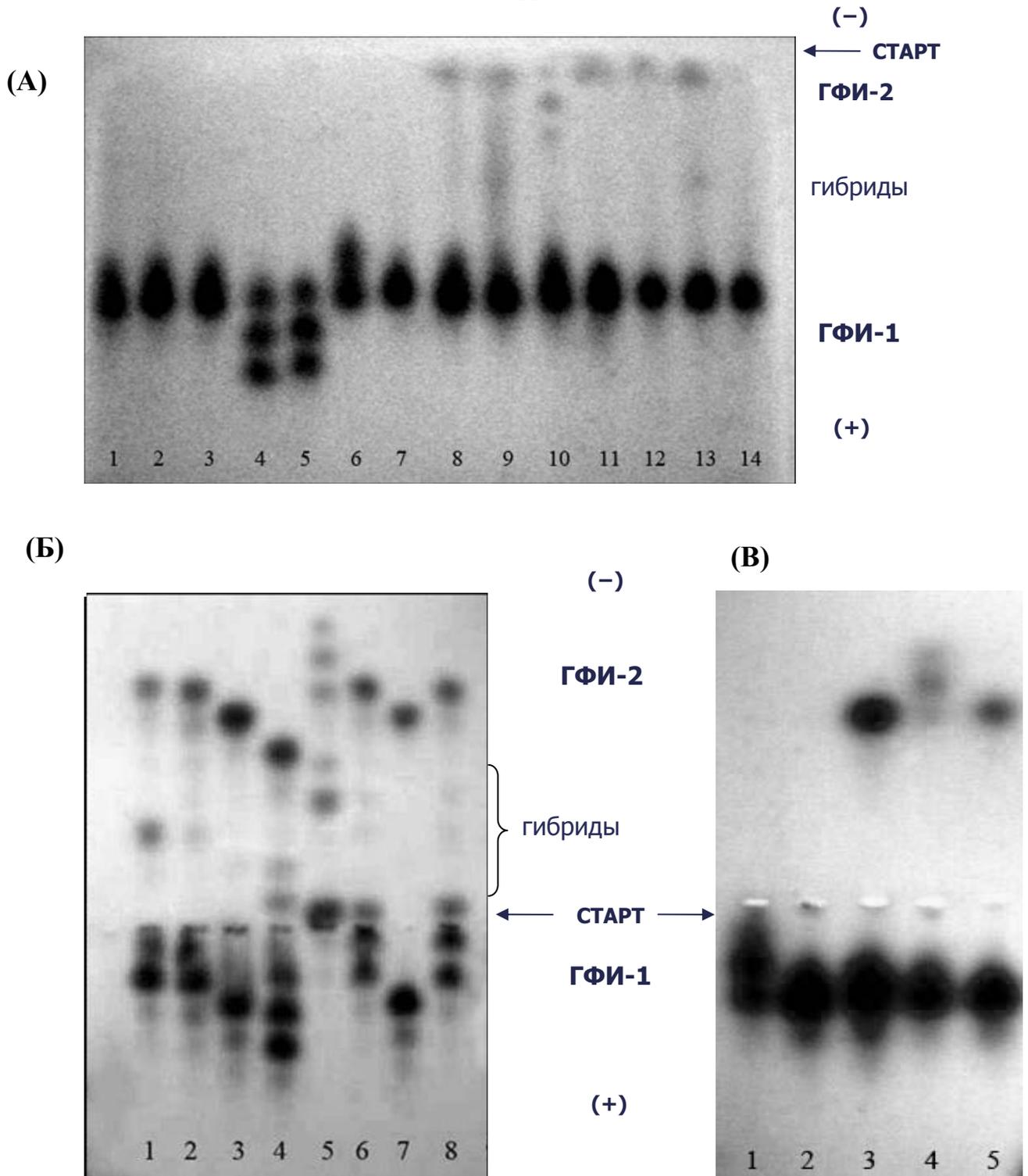


Рис. 3. Зимограммы ГФИ, демонстрирующие несогласованность аллозимной изменчивости изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 у *Dipolydora bidentata* (А), *P. calcarea* (Б) и *P. brevipalpa* (В).

(А): Дорожки 1–7 – ♀♀, 8–14 – ♂♂

(Б): Дорожки 1, 2, 4–6, 8 – ♂♂ *P. calcarea*; 3, 7 – ♂♂ *P. manchenkoii*. *P. calcarea* и *P. manchenkoii* являются близнецовыми видами, которые неотличимы по внешним признакам, поэтому они представлены на одной зимограмме.

(В): Дорожки 1, 2 – ♀♀, 3–5 – ♂♂

На зимограммах видно, что некоторые из самцов *D. bidentata*, *P. calcarea* и *P. brevipalpa* имеют разные аллозимные спектры изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2. Изофермент ГФИ-1 имеет гомозиготный фенотип, а ГФИ-2 – гетерозиготный (А: дорожка 10; Б: дорожка 5; В: дорожка 4), или наоборот (Б: дорожки 4, 6, 8).

Таблица 3. Три группы видов полихет, различающихся по доле идентичных фенотипов ГФИ-1 и ГФИ-2.

Вид	Усредненная доля особей с идентичными аллозимными спектрами ГФИ-1 и ГФИ-2 (результаты X^2 – теста на гомогенность)
<i>P. calcarea</i> <i>P. limicola</i>	56, 7% ($X^2 (df = 1) = 0,05 < X^2_{0,5} (1) = 3.84$)
<i>P. cornuta</i> <i>P. glycymerica</i>	90, 9 % ($X^2 (df = 1) = 0,32 < X^2_{0,5} (1) = 3.84$)
<i>P. brevipalpa</i> <i>P. manchenkoi</i> <i>D. bidentata</i> <i>D. cardalia</i> <i>D. carunculata</i> <i>D. commensalis</i>	99, 0 % ($X^2 (df = 5) = 3,24 < X^2_{0,5} (df = 5) = 11,07$)

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Трудности интерпретация изоферментных спектров ГФИ полидорида с применением общепринятой концепции изоферментов.

Выявленные электрофоретические спектры ГФИ у полидорида можно попытаться объяснить, придерживаясь традиционной интерпретации. При этом представляется разумным рассмотреть две модели генетического контроля: 1) один генный локус ГФИ, продукты которого претерпевают посттрансляционную модификацию, 2) два независимых генных локуса ГФИ-1 и ГФИ-2. Однако, как первая, так и вторая интерпретации встречаются со значительными трудностями.

1) Один генный локус ГФИ.

Согласованная аллозимная изменчивость изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 у 100% особей может быть объяснена, исходя из представления, что оба изофермента являются продуктами одного гена, т.е. один из них

(ГФИ-1) является первичным изоферментом, а другой (ГФИ-2) – вторичным изоферментом, возникшим в результате посттрансляционной модификации молекул первичного изофермента ГФИ-1. Однако эта интерпретация маловероятна, поскольку: во-первых, изоферменты ГФИ-1 и ГФИ-2 разделены на геле необычно большим расстоянием. При используемых условиях проведения электрофореза это расстояние составило 2-4 см. Такое большое электрофоретическое различие в подвижности ГФИ-1 и ГФИ-2 нехарактерно для ситуации посттрансляционного происхождения изофермента ГФИ-2. Как правило, первичные и вторичные изоферменты отстоят друг от друга на расстоянии, обусловленном различием молекул в единицу заряда. Такое расстояние соответствует минимальному расстоянию между электрофоретически выявляемыми аллельными вариантами фермента – аллозимами и, как правило, не превышает 0,5 см.

Во-вторых, между изоферментами ГФИ-1 и ГФИ-2 выявлялись гибридные молекулы, чего не должно бы быть – богатый опыт электрофоретических исследований свидетельствует о том, что первичные и вторичные изоферменты олигомерных ферментов никогда не образуют гибридов. Это соответствует общепринятому мнению, что посттрансляционные модификации происходят уже после ассоциации субъединиц в олигомерные каталитически активные молекулы (Harris, Hopkinson, 1976) и что олигомерные молекулы, однажды образовавшись, уже никогда не диссоциируют и не реассоциируют *in vivo* снова (Serov et al., 1979).

В-третьих, против того, что ГФИ-1 и ГФИ-2 являются первичным и вторичным изоферментами, свидетельствует разная тканевая и половая специфичность их экспрессии. Согласно общепринятой концепции изоферментов первичные и вторичные изоферменты, определяемые одним геном, выявляются в одних и тех же клетках и одновременно, поскольку посттрансляционным модификациям подвергается только часть молекул первичного изофермента (Uy and Wold, 1977; Poly, 1997).

2) Два независимых генных локуса ГФИ-1 и ГФИ-2.

Эта модель не может дать убедительного объяснения возникновению и сохранению согласованной аллозимной изменчивости в двух независимых генных локусах у подавляющего большинства особей каждого из исследованных видов. Вероятность этого чрезвычайно мала, и практически нереальна для большого числа аллелей в каждом из генных локусов, даже если допустить их тесное сцепление.

Кроме того, если придерживаться традиционной интерпретации, то создается впечатление, что у близких видов полидорид система ГФИ может иметь разные генетические механизмы. У одних видов система изоферментов ГФИ представлена одним генным локусом, у других – двумя. При этом генетические основы системы изоферментов ГФИ оказываются одинаковыми у видов разных родов (*Polydora* и *Dipolydora*), и в то же время принципиально разными у видов одного и того же рода. Трудно найти объяснение тому, как в процессе эволюции двух групп близких видов для детерминации одинаковой системы изоферментов, характеризующихся одинаковой дифференциальной экспрессией, могли возникнуть две разные генетические системы.

Таким образом, полученные результаты не могут найти удовлетворительного объяснения с позиций общепринятой концепции изоферментов.

2. Альтернативный сплайсинг – механизм, способный генерировать изоферментные спектры ГФИ, наблюдаемые у полидорид.

Трудности интерпретации полученных нами данных по изоферментным спектрам ГФИ у полидорид на основании общепринятой концепции изоферментов дали нам основание предположить, что в этом случае мы имеем дело с изменчивостью, обусловленной действием механизма АС¹. Хорошо известно, что АС является одним из основных генераторов белковых изоформ у эукариот. Благодаря АС с одного структурного гена, обладающего экзон-интронной структурой, может считываться несколько структурно (Andreadis et al., 1987; Schmucker et al., 2000) и функционально (Kriventseva et al.; 2003) отличающихся белковых изоформ. Альтернатив-

¹Использование альтернативных сайтов инициации и терминации транскрипции также может приводить к появлению структурно отличающихся изоформ одного и того же белка, за счет изменения его 5' и 3' концов, соответственно. Однако, учитывая то, что и альтернативная инициация (множественные сайты инициации) и альтернативная терминация (множественные сайты полиаденилирования) транскрипции, протекают в тесной связи с АС и принципиально не отличаются от него по своему действию на структуру и электрофоретические свойства белковых изоформ, а также принимая во внимание, что некоторые авторы (Andreadis et al., 1987) рассматривают их в качестве событий АС, в данной работе они рассматриваются вместе и объединены общим названием – АС.

ные изоформы одного белка, как правило, характеризуются дифференциальной экспрессией во внутриклеточном и тканевом пространстве организма, а также во времени его онтогенеза (Lopez, 1998, Graveley, 2001; Maniatis and Tasic, 2002). К настоящему времени имеются экспериментальные данные об участии АС в экспрессии 270 ферментов Metazoa (Манченко и Панькова, неопубликованные данные). Многие из этих генов кодируют ферменты, которые вовлечены в электрофоретический анализ и их изоферменты широко используются в качестве генных маркеров. В общей сложности события АС описаны для 85 таких ферментов, что составляет 20% всех ферментов, для которых разработаны методы получения зимограмм (Manchenko, 2003). Таким образом, изоферменты каждого пятого фермента, исследуемого электрофоретически, могут быть продуктом АС.

Согласованная и несогласованная аллозимная изменчивость изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 может быть объяснена различным уровнем полиморфизма в последовательностях конститутивных и альтернативных экзонов гена ГФИ (Manchenko, 2001). Под альтернативным экзоном мы понимаем любой кодирующий участок пре-мРНК, который вовлечен в механизм АС. В одном случае альтернативный экзон является обычным экзоном, и после прохождения всех стадий сплайсинга и созревания мРНК входит в состав мРНК, соответственно – транслируется в часть белковой молекулы. В другом случае, в процессе сплайсинга альтернативный экзон может удаляться как интрон. В результате он не входит в состав мРНК и не транслируется. Конститутивные экзоны – кодирующие участки пре-мРНК, которые всегда входят в состав мРНК. Согласованная аллозимная изменчивость изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 будет наблюдаться в том случае, если в процесс АС вовлечен электрофоретически мономорфный экзон. Как можно видеть из рисунка 4 (А) в процессе АС молекул пре-мРНК гена ГФИ образуется две формы молекул мРНК (мРНК ГФИ-1 и мРНК ГФИ-2) – альтернативные изоформы мРНК, определяющие соответственно изоферменты ГФИ-1 и ГФИ-2. Одна из форм (мРНК ГФИ-2) содержит альтернативный экзон, другая (мРНК ГФИ-1) – нет. Отсутствие электрофоретически мономорфного альтернативного экзона в молекулах аллельных мРНК ГФИ-1, изменяет заряд соответствующих аллельных изоферментов ГФИ-1 на одинаковую величину и их электрофоретическая

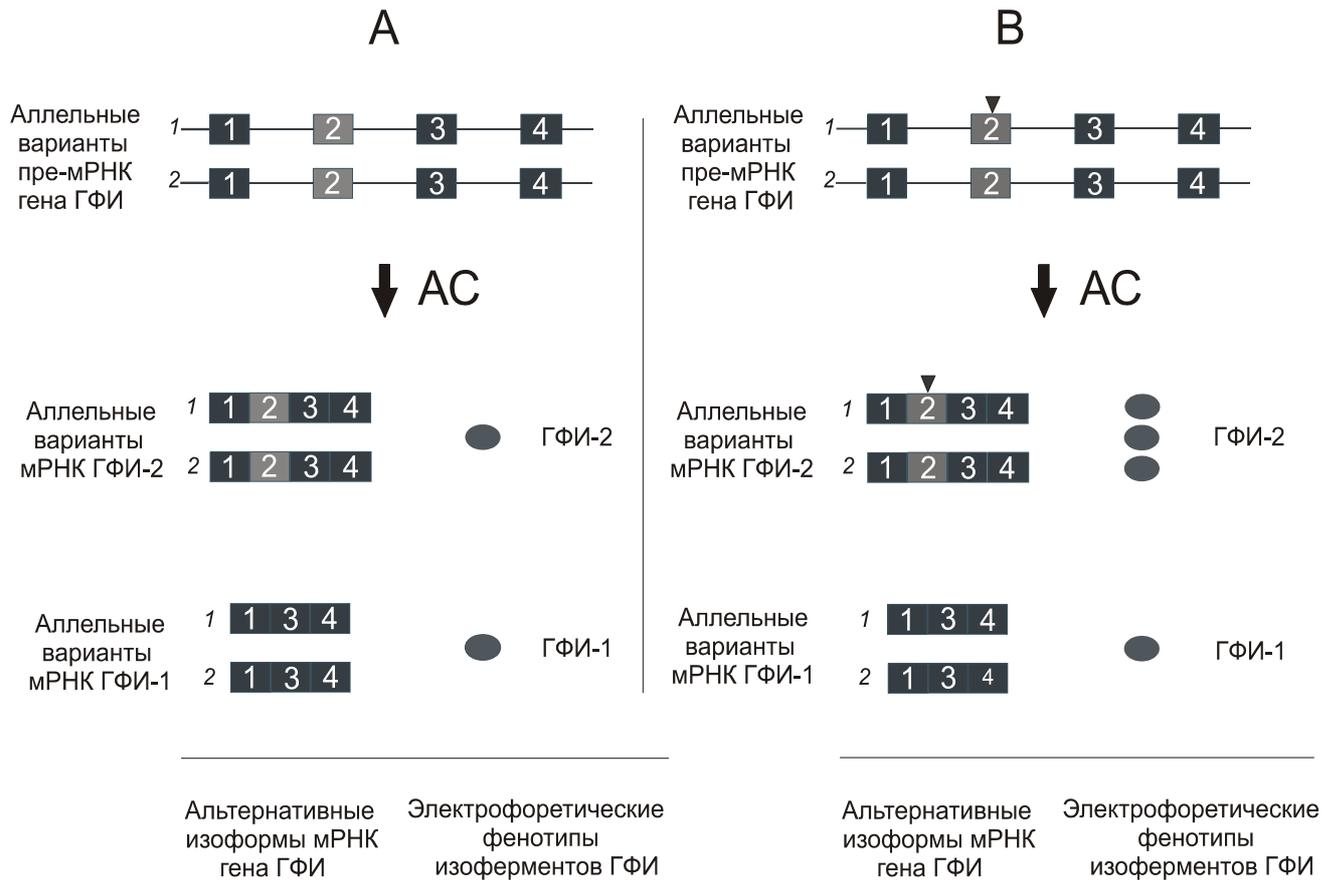


Рис. 4. Схема, отображающая влияние мономорфного (А) и полиморфного (В) альтернативных экзонов на характер аллозимной изменчивости изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2. Конститутивные экзоны показаны черными прямоугольниками, альтернативные экзоны – серыми. Интроны изображены в виде сплошной линии, соединяющей экзоны. Треугольником (▼) отмечены экзоны, несущие замещения, обуславливающие различия аллельных изоформ фермента (аллозимов) (см. описание в тексте).

подвижность относительно друг друга не меняется. Поэтому изоферменты ГФИ-1 и ГФИ-2 имеют одинаковые аллозимные спектры (рис. 4А).

Несогласованная аллозимная изменчивость будет наблюдаться в том случае, если в процесс АС вовлечен электрофоретически полиморфный экзон в гетерозиготном состоянии (рис. 4В). На рисунке видно, что в состав молекул мРНК ГФИ-2 входит полиморфный альтернативный экзон, поэтому изофермент ГФИ-2 имеет гетерозиготный фенотип. Различия аллельных вариантов изофермента ГФИ-2 обусловлены замещениями, присутствующими в альтернативном экзоне. В молекулах мРНК ГФИ-1 таких замещений нет, т.к. в них отсутствует альтернативный экзон, поэтому изофермент ГФИ-1 имеет гомозиготный фенотип. Таким образом, изоферменты ГФИ-1 и ГФИ-2 имеют разные аллозимные спектры.

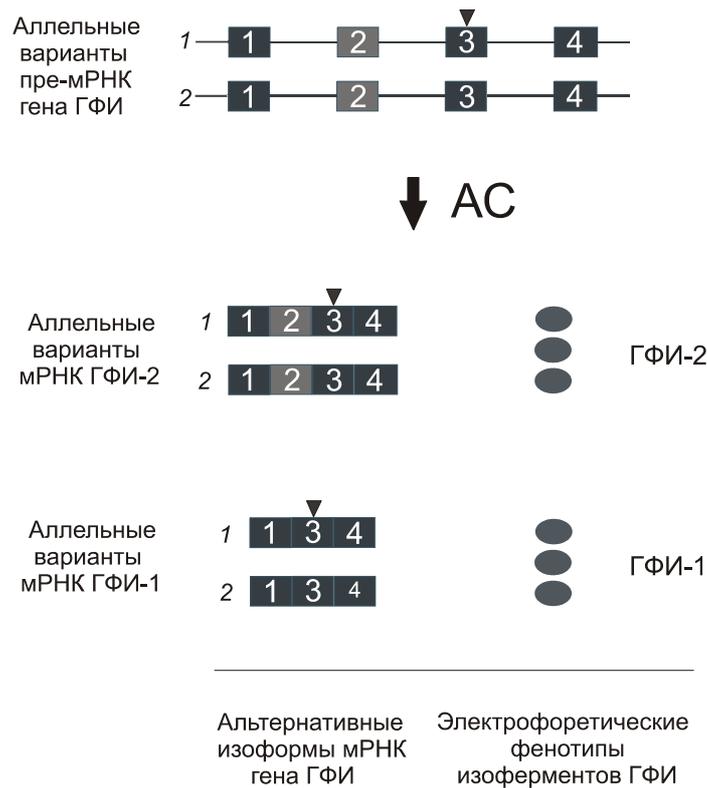


Рис. 6. Схема, отображающая влияние полиморфного конститутивного экзона на характер аллозимной изменчивости. Конститутивные экзоны показаны черными прямоугольниками, альтернативные экзоны – серыми. Интроны изображены в виде сплошной линии, соединяющей экзоны. Треугольником (▼) отмечены экзоны, несущие замещения, обуславливающие различия аллельных изоформ фермента (аллозимов). Из схемы видно, что если полиморфным является только конститутивный экзон изоферменты ГФИ-1 и ГФИ-2 будут иметь идентичные аллозимные спектры. Это объясняется тем, что молекулы мРНК ГФИ-1 и мРНК ГФИ-2 отличаются по признаку наличие/отсутствие альтернативного экзона, который является мономорфным и не влияет на характер аллозимной изменчивости (см. обсуждение выше).

конститутивными экзонами (Stamm et al., 2000). У высших эукариот средний ген с экзон-интронной структурой имеет 5-6 экзонов, из которых, как правило, только один является альтернативным (Fedorova and Fedorov, 2003). Из этого следует, что по своему общему размеру конститутивные экзоны среднего гена в несколько раз превышают размер его альтернативного экзона. Следовательно, если вероятность возникновения нуклеотидных замещений одинакова и в конститутивных, и в альтернативных экзонах, то замещения чаще будут затрагивать именно конститутивные экзоны. Таким образом, среди конспецифичных особей будут преобладать те, которые имеют идентичные аллозимные спектры альтернативных изоферментов (рис. 6). Это подтверждается результатами, полученными

для димерной глицерол-3-фосфат дегидрогеназы дрозофилы (Wright and Shaw, 1969; Bewley et al., 1974; Cook et al., 1988) и тетрамерной пируваткиназы грызунов (Peters et al., 1981; Noguchi et al., 1986). Анализ данных, полученных независимыми исследованиями, показал, что в двух этих случаях изоферменты, демонстрирующие согласованную аллозимную изменчивость, генерируются АС. При этом, как и в нашем случае, изоформы пируваткиназы формируют гибридные молекулы. Все приведенные выше данные свидетельствуют в пользу гипотезы о происхождении изофермента ГФИ-2 у полидорида в результате альтернативного сплайсинга молекул пре-мРНК, считываемых с одного гена *Gpi*.

Необычно большое расстояние на зимограммах между ГФИ-1 и ГФИ-2 легко объясняется значительными структурными различиями, ожидаемыми для изоферментов, генерируемых АС. Показано, что 80% всех событий АС у человека являются событиями разноразмерного АС, который приводит к образованию белковых изоформ, существенно отличающихся по своим размерам и молекулярной массе (Mironov et al., 1999; Stamm et al., 2000). Такие структурные различия альтернативных изоформ белка должны обуславливать их ярко выраженные электрофоретические различия, что и наблюдается в нашем случае.

Тканеспецифичная экспрессия изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 также может быть объяснена участием АС в экспрессии гена ГФИ. Многочисленные примеры свидетельствуют о том, что, как правило, альтернативные изоформы белка характеризуются дифференциальной экспрессией. Среди этих примеров есть и такие, которые демонстрируют специфичную экспрессию альтернативных изоформ ферментов в сперматогенных клетках (Manku, 1997). К ним относятся ДНК-лигаза III (Manku, 1997) и аденозин деаминаза мыши (Meng et al., 1997), гексокиназа мыши (Mori et al., 1998) и человека (Andreoni et al., 2000).

АС также легко объясняет наличие гибридов между изоферментами ГФИ-1 и ГФИ-2. Гибридизация полипептидов ГФИ, синтезируемых на облигатных и альтернативных мРНК, вполне возможна, если такие матрицы образуются в одних и тех же клетках, в одних и тех же компартментах, а структурные различия синтезируемых полипептидов не препятствуют их олигомеризации. Ярким примером способности альтернативных изоформ формировать гибриды служит гибридизация изоферментов пируваткиназы крысы (Noguchi et al., 1986).

Таким образом, предположение об участии АС в генерировании изоферментных спектров ГФИ легко снимает все трудности, связанные с интерпретацией их генетического контроля.

3. Возможное ретропозонное происхождение изофермента ГФИ-2.

Известны примеры, когда в сперме животных обычные ферментные формы часто замещены уникальными изоформами, часть которых генерируется АС (Mori et al., 1998, Manku, 1997), а часть определяется независимыми генами, представляющими собой безинтронные ретротранспозоны (Hendriksen et al., 1997). Если кДНК, скопированная с процессированной мРНК с помощью обратной транскриптазы, вставляется в ядерный геном, в область промотора, специфичного для сперматогенных клеток, то возникает функциональный безинтронный ген, экспрессируемый в сперме. В связи с этим мы не исключаем возможность того, что в случае независимой аллозимной изменчивости изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 *P. calcarata* и *P. limicola*, характерной для изоферментов, определяемых разными генами, мы имеем дело с ситуацией, когда изофермент ГФИ-2 определяется независимым структурным геном ретропозонного происхождения. Хотя более вероятным представляется наличие одного гена ГФИ полидорида, экспрессия которого сопряжена с механизмом АС.

ВЫВОДЫ

1. У всех десяти исследованных видов полидорида (*Polydora brevipalpa*, *P. calcarea*, *P. cornuta*, *P. glycymerica*, *P. limicola*, *P. manchenkoi*, *Dipolydora bidentata*, *D. cardalia*, *D. carunculata*, *D. commensalis* (Polychaeta: Spionidae)) у самцов выявлено два изофермента ГФИ – ГФИ-1 и ГФИ-2, у самок – только один ГФИ-1.
2. Изофермент ГФИ-1 у всех исследованных видов экспрессируется в соматических тканях, а ГФИ-2 – в сперме.
3. У всех исследованных видов полидорида выявлены гибридные зоны между изоферментами ГФИ-1 и ГФИ-2, что свидетельствует о том, что изофермент ГФИ-2 не может иметь посттрансляционное происхождение. Об этом же свидетельствует и большое электрофоретическое различие между изоферментами ГФИ-1 и ГФИ-2.
4. Согласованная полиаллельная аллозимная изменчивость изоферментов ГФИ-1 и ГФИ-2 у большинства особей у всех исследованных видов полидорида свидетельствуют против того, что эти изоферменты определяются разными генными локусами.
5. Своеобразие спектров ГФИ полидорида – согласованная аллозимная изменчивость двух гибридизующихся изоферментов у большинства исследованных особей наряду с наличием редких особей с несогласованной аллозимной изменчивостью и разная тканеспецифичность экспрессии этих изоферментов – может быть объяснено участием альтернативного сплайсинга в экспрессии одного гена ГФИ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Manchenko G.P., Pankova V.V. Sex-linkage of a gene responsible for the expression of alternative isozyme of glucose-6-phosphate isomerase in *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae) // GFI Bull. 2001. Vol. 34. P. 55.
2. Pankova V.V., Manchenko G.P. Individual variation of sets of hybrid isozymes of glucose-6-phosphate isomerase in *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae) // Evolution, Genetics, Ecology and Biodiversity: Abstr. Intern. Confer. (MAPEEG), Vladivostok-Vostok Marine Biological Station, 2001. P. 21.
3. Панькова В.В., Манченко Г.П. Исследование альтернативных изоферментов глюкозо-6-фосфат изомеразы *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae) // IV Региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии: Тезисы докладов: Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2001. С. 92-94.
4. Панькова В.В., Манченко Г.П. Ген, ответственный за экспрессию спермий-специфичного изофермента ГФИ-2 *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae), локализуется в псевдоаутосомальной области половых хромосом // VII Дальневосточная молодежная школа – конференция по актуальным проблемам химии и биологии: Тезисы докладов: Владивосток: ДВО РАН, 2003, с. 41.
5. Панькова В.В., Манченко Г.П. Сцепление генов, ответственных за определение пола и экспрессию спермий-специфичного изофермента глюкозо-6-фосфат изомеразы, у полихеты *Polydora brevipalpa* // Генетика. 2003. Т. 39, № 8. С. 1106-1110.
6. Manchenko G.P., Radashevsky V.I., Pankova V.V. Obligatory and male-specific GPI isozymes of *Polydora limicola* (Polychaeta: Spionidae) form unexpected hybrids in females // GFI Bull. 2003. Vol. 36. P. 34 .
7. Pankova V.V., Pudovkin A.I., Manchenko G.P. Allozymic variation determined by alternatively spliced exon of the GPI gene in *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae) // GFI Bull. 2004. Vol. 37. P. 30.
8. Pankova V.V., Radashevsky V.I., Manchenko G.P. Coordinated allozyme variation of two hybridizing isozymes of glucose-6-phosphate isomerase in polydorids (Polychaeta: Spionidae) // GFI Bull. 2005. Vol. 38. P. 27.
9. Radashevsky V.I. and Pankova V.V. The morphology of two sibling sympatric *Polydora* species (Annelida: Spionidae) from the Sea of Japan // The Journal of Marine Biological Association of United Kingdom» (JMBA). 2006. V. 86. P. 245-252.