

УДК 576.8:593.161.13:576.36

**МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
(К.Ф.1.1.1.37) У CRITHIDIA ASCLEPII И C. ONCOPELTI
(MASTIGOPHORA, TRYPANOSOMATIDAE)**

М. В. Крылов, Л. М. Белова

Изозимный анализ мМДГ у *Crithidia asclepii* и *C. oncopelti* с использованием электрофореза и денситометрического метода позволил высказать предположение о диплоидности и наличии генетических обменов у этих организмов. Синтез мМДГ у *C. asclepii* контролируется дублированными полиморфными локусами Мдг-1 и Мдг-2 с двумя аллелями каждый, у *C. oncopelti* функционируют также два «дочерних» локуса — полиморфный Мдг-1 с тремя аллелями и мономорфный Мдг-2. Сходства и различия в изозимных спектрах мМДГ могут быть использованы для таксономических целей.

Ряд ферментов существует у одного и того же организма и даже в одной клетке в виде нескольких молекулярных форм. Многие из этих форм генетически детерминированы и различаются последовательностью аминокислот. Эти разновидности молекул одного и того же фермента отличаются значением суммарного электрического заряда и могут быть выделены из клеточных субстратов методом гель-электрофореза. Электрофоретический метод выявления изоэнзимных форм ферментов широко используется в популяционной генетике различных групп животных, растений и микроорганизмов. В последние годы этот метод начали применять для решения вопроса о плоидности и наличии генетических обменов у трипаносоматид. В руках одних исследователей (Tibaugenc, Desjeus, 1983) метод изоэнзимного анализа дал отрицательный ответ на вопрос о существовании полового процесса у трипаносоматид, в руках других (Tait, 1980; Maazoun e. a., 1981; Tait, 1983) — положительный, третьи (Tibaugenc e. a., 1981; Tibaugenc e. a., 1981) получили противоречивые результаты. Совершенно очевидно, что для окончательного решения вопроса необходимы дополнительные широкие исследования на различных группах этих организмов и в первую очередь на низших трипаносоматидах. Если в жизненном цикле трипаносоматид существует половой процесс, то он, вероятнее всего, может быть обнаружен у низших трипаносоматид, потому что эволюционно продвинутые формы могли его утратить при адаптации к теплокровным хозяевам. Эти соображения послужили основанием для изучения изоэнзимов малатдегидрогеназы у представителей рода *Crithidia*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В экспериментах использована культура критидий, полученная из Московского государственного университета, в свою очередь в МГУ культура была передана доктором Ировичем из ЧССР (Маслов и др., 1982).

Изоэнзимный анализ и изучение ряда признаков клеток, входящих в культуру критидий, показали, что в ней содержатся два самостоятельных вида критидий — *Crithidia oncopelti*, имеющий бактериальных эндосимбионтов, и безсимбионтный — *C. asclepii*.

Культивирование критидий проводили на жидкой среде следующего состава (в г): HCl — 0.42, NaCl — 5, K₂HPO₄ — 0.272, Na₂HPO₄ — 2.6, глю-

козы — 20, гидролизат казеина — 15, дрожжевой экстракт — 15, раствор микроэлементов (Newton, 1956) — 10 мл, дистиллированной воды до 1 л. Клонирование и получение больших количеств клеток проводили на твердой питательной среде, отличающейся от жидкой пониженным содержанием глюкозы — 4 г и наличием агара — 20 г; pH сред — 7.5. После стерилизации в автоклаве (давление 0.5 атм. в течение 30 мин) в среды добавляли пенициллин 500 ед./мл и стрептомицин 500 мкг/мл. Непосредственно перед засевом культуры, там, где это было необходимо по условиям эксперимента, в среду вносили гемин. Клонировали по методике А. С. Хаецкого (1982). Клетки разрушали путем четырехкратного замораживания при -35°C и оттаивания при $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Электрофорез выполнен в полиакриламидном геле (Gibson e. a., 1978). Электрофореграммы сканировались и обрабатывались на автоматическом спектрофотометре DU-8B фирмы «Beckman» США.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МДГ — димер, поэтому при электрофорезе у гетерозигот должно наблюдаться три полосы активности, а у гомозигот — одна. Электрофорез МДГ у 82 клонов *Crithidia asclepii* выявил наличие среди них зимодемов двух типов — трехполосчатого (I) в 81.7% случаев и двухполосчатого (II) в 18.3% случаев (рис. 1).

У всех 67 клонов *C. asclepii*, имеющих трехполосчатый тип зимограмм, установлено наличие определенной тенденции — неравномерности в окраске полос. Во всех случаях интенсивность окраски полос уменьшается по направ-

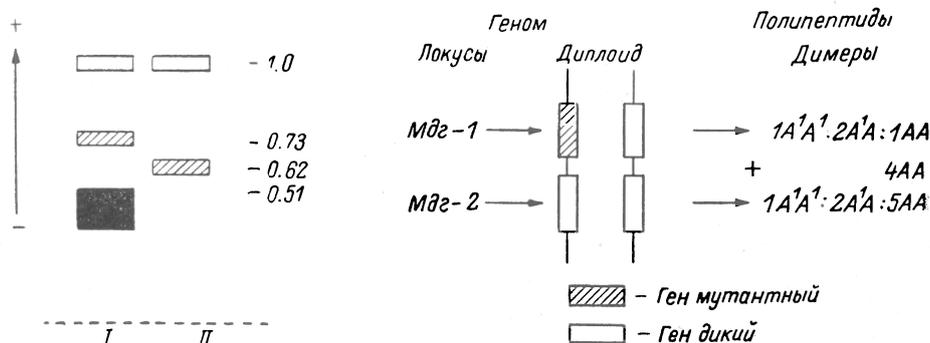


Рис. 1. Обобщенная схема зимограмм 82 клонов *Crithidia asclepii*.

I — трехполосчатый тип зимодемов, II — двухполосчатый тип зимодемов.

Рис. 2. Генетическая диплоидная двухлокусная модель. Продукты локусов не взаимодействуют между собой при формировании четвертичной структуры изозимов.

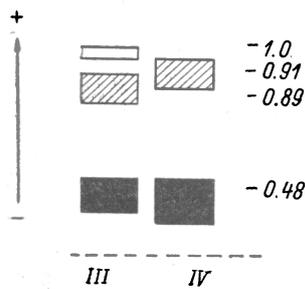
лению к аноду. Наиболее интенсивно окрашивалась «медленная» полоса с относительной электрофоретической подвижностью (R_f) равной 0.51, слабее — средняя, с R_f 0.73 и еще слабее «быстрая» полоса, с R_f 1.0.

Самое простое объяснение этих фактов может быть дано с помощью диплоидной двухлокусной генетической модели, где один из локусов возник в результате дубликации, и продукты локусов не взаимодействуют между собой при формировании четвертичной структуры изозимов (рис. 2). Согласно с этой моделью продукты гетерозиготного локуса Мдг-1, имеющего аллели A^1 и A , при случайном объединении субъединиц фермента, должны быть представлены тремя различными изозимами в соотношении $1A^1A^1 : 2AA^1 : 1AA$, а продукты гомозиготного по аллелю A локуса Мдг-2 одним изозимом в пропорции $4AA$. Следовательно, продукты обоих «дочерних» локусов должны синтезироваться клеткой в соотношении $1A^1A^1 : 2AA^1 : 5AA$.

Денситометрический анализ трехполосчатых зимограмм двух клонов *C. asclepii* показал, что измеренные оптические плотности полос каждого клона, количественно характеризующие изозимы, близки к ожидаемым пропорциям

1 : 2 : 5, у клона 162 они соотносятся как 1 : 1.95 : 6.89; а у клона 163 как 1 : 1.53 : 5.47.

У 15 клонов *C. asclepii*, имеющих двухполосчатый тип зимограмм, «быстрая» полоса по электрофоретической подвижности совпадает с «быстрой» полосой в зимограммах трехполосчатого типа и на этой основе может быть отождествлена с изозимом $A^I A^I$, контролируемым в двухполосчатых фенотипах гомозиготным по аллелю A^I локусом Мдг-1. «Медленная» полоса в зимограммах двухполосчатого типа отличается по Оп (0.62) от всех изученных и на этом основании может интерпретироваться как продукт мутантного по аллелю A^{II} локуса Мдг-2 в гомозиготном состоянии. Таким образом, наблюдаемые количественные соотношения в окраске полос и их взаимное расположение у зимодемов трехполосчатого и двухполосчатого типов служат указанием на функционирование у *C. asclepii* дублированных локусов Мдг-1 и Мдг-2. При этом оба «дочерних» локуса полиморфны с двумя аллелями каждый. Локус Мдг-1 имеет аллели A и A^I , локус Мдг-2 — A и A^{II} . Генетическая структура у клонов с зимограммами трехполосчатого типа имеет вид $AAAA^I$, у клонов с двухполосчатым типом — $A^I A^I A^{II} A^{II}$.



У *C. oncopelti* выявлено также два фенотипа — трехполосчатый (III), встречающийся очень редко — в 1.14% случаев, и двухполосчатый (IV), обна-

Рис. 3. Обобщенная схема зимограмм 88 клонов *Crithidia oncopelti*. III — трехполосчатый тип зимодемов; IV — двухполосчатый тип зимодемов.

руженный у 87 из 88 изученных клонов (рис. 3). В зимограмме трехполосчатого типа *C. oncopelti* интенсивность окраски полос имеет тенденцию, сходную с таковой в зимограммах трехполосчатого типа у *C. asclepii*. Наиболее интенсивно окрашивается «медленная» полоса с Оп 0.48, слабее — средняя с Оп 0.89 и менее интенсивно — «быстрая» с Оп 1.0. Денситометрический анализ зимограммы клона 154 *C. oncopelti* выявил следующие соотношения в оптической плотности полос: 1 : 1.63 : 6.22. Эти соотношения близки к ожидаемым (1 : 2 : 5) в соответствии с вышерассмотренной гипотезой диплоидной двухлокусной генетической модели.

Все двухполосчатые зимограммы 87 клонов *C. oncopelti* имеют одну тенденцию в окраске полос. «Медленная» полоса с Оп 0.48 окрашена значительно интенсивнее «быстрой» полосы с Оп 0.94.

Денситометрический анализ зимограммы двухполосчатого типа клона 157 показал, что оптические плотности «быстрой» и «медленной» полос имеют соотношение 1 : 4.49. Наблюдаемые количественные соотношения интенсивности окраски полос у *C. oncopelti* в зимодеме двухполосчатого типа близки к 1 : 5. Соотношение оптической плотности полос зимодемов двухполосчатого типа напоминает соответствующие соотношения между «быстрой» и «медленной» полосами в зимодемах трехполосчатого типа. Можно думать, что у клонов *C. oncopelti*, имеющих двухполосчатый тип зимодемов, либо не образуются гетеродимеры AA^{II} , либо они не выявляются в нашей системе. Гетеродимер зарегистрирован только у одного из 88 изученных клонов *C. oncopelti*.

Иногда ферменты с четвертичной структурой не дают гетерогибридных продуктов, что объясняется разрывом во времени или пространстве между синтезом двух аллельных форм белка у гетерозигот (Ferris, Whitt, 1978).

Таким образом, у *C. oncopelti* функционируют два «дочерних» локуса — Мдг-1 полиморфный, имеющий три аллеля A , A^I и A^{II} , и мономорфный Мдг-2, гомозиготный по аллелю A .

Генетическая структура у клона *C. oncopelti* с трехполосчатым типом зимограммы имеет вид $AAAA^I$, а у клонов с двухполосчатым типом зимограмм — $AAAA^{II}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Относительно недавно трипаносоматид предположительно считали гаплонтами и описывали у различных видов по 3 хромосомы (Райков, 1978). Лишь в последнее время методами электронной микроскопии (Solari, 1980a, 1980b)

и молекулярной биологии (Borst e. a., 1980; Borst e. a., 1982) были получены данные, поколебавшие наши прежние представления о пloidности ядер у этих организмов.

Вариабельность изозимов МДГ на наших зимограммах в ряде случаев аналогична той, которую дают диплоидные организмы с половым процессом. Например, у фибробластов человека и китайского хомячка (Fa-Ten Kao, Puck, 1970), у рыб (Слынько, 1976а, 1976б; Кирпичников, 1979), у цестод (Valerio e. a., 1983) и нематод (Hermoso e. a., 1983).

Аналогия не может служить бесспорным доказательством, но позволяет предположить у критидий диплоидию и наличие генетических обменов. Диплоидия делает весьма вероятным наличие полового процесса в жизненном цикле критидий, потому что достоверных диплоидов, лишенных полового процесса и чередования ядерных фаз среди простейших, пока не обнаружено (Райков, 1967, 1978).

Существование локуса Мдг-2 в двух гомозиготных состояниях у *Crithidia asclepii* также указывает на наличие в жизненном цикле критидий каких-то генетических обменов, имеющих место в настоящее время либо происходивших в недалеком прошлом. В самом деле, если геном диплоиден, то для того чтобы объяснить переход гомозиты из одного состояния в другое при отсутствии мейоза, необходимо, чтобы в двух аллелях одного и того же локуса, у одной и той же особи произошла одна и та же мутация. Это событие маловероятно, поэтому наблюдаемую гомозиготность по разным аллелям у *C. asclepii* наиболее правдоподобно объяснить присутствием в жизненном цикле этого организма мейоза. Наличие в жизненном цикле *C. oncopelti* генетических обменов подтверждается также работами по получению рекомбинантов между клонами, резистентными к циклогексимиду и хлорамфениколу (Крылов и др., 1982).

Сходство и различия в изозимных спектрах МДГ между клонами в пределах одного вида и между разными видами критидий можно использовать также для таксономических целей. В работе применен упрощенный способ определения сходства между клонами и видами критидий по Шоу (Shaw, 1970).

$$Q = \frac{n}{0.5(N_1 + N_2)},$$

где Q — индекс сходства, n — число сходных полос в зимодемах, N_1 и N_2 — общее число полос в зимодемах. Оказалось, что индекс сходства между клонами в пределах видов *C. asclepii* и *C. oncopelti* составляет 1.0—0.4, в то время как между видами одинаковых изозимов не обнаружено. Это указывает, как на филогенетическую общность клонов в пределах вида так и на значительные филогенетические различия между видами *C. asclepii* и *C. oncopelti*.

Литература

- Кирпичников В. С. Генетические основы селекции рыб. Л., Наука, 1979, с. 189—192.
- Крылов М. В., Подлипаев С. А., Самиовар А. Г., Хаецкий А. С. Изучение возможности передачи резистентности к циклогексимиду и хлорамфениколу между штаммами *Crithidia oncopelti*. — В кн.: Современные проблемы протозоологии. Вильнюс, Изд-во АН ЛитССР, 1982. 188 с.
- Маслов Д. А., Энтелис Н. С., Колесников А. А., Зайцева Г. Н. ДНК кинетопласта *Crithidia oncopelti*. Рестрикционное картирование максикольцевой ДНК. — Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 676—685.
- Райков И. Б. Кариология простейших. Л., Наука, 1967. 258 с.
- Райков И. Б. Ядро простейших. Л., Наука, 1978. 327 с.
- Слынько В. И. Электрофоретический анализ изоферментов малатдегидрогеназы рыб сем. Salmonidae. — ДАН СССР, 1976а, т. 226, № 2, с. 448—451.
- Слынько В. И. Множественные молекулярные формы малат- и лактатдегидрогеназы русского осетра (*Acipenser guldenstadti* Br.) и белуги (*Huso huso* L.). — ДАН СССР, 1976б, т. 228, № 2, с. 470—472.
- Хаецкий А. С. Клонирование жгутиконосца *Crithidia oncopelti* на плотной питательной среде неопределенного состава, не содержащей гемин. — Цитология, 1982, т. 24, № 2, с. 211—214.
- Borst P., Fase-Fowler F., Frasch A. C. C., Hoeijmakers J. H. J. and Weijers P. J. Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. — Mol. Biochem. Parasitol., 1980, vol. 1, p. 221—246.

- Borst P., Van der Ploeg M., Van Hoek J. F. M., Tas J., James J. On the DNA content and ploidy of trypanosomes. — *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1982, vol. 6, N 1, p. 13—23.
- Fa-Ten Kao, Puck T. T. Genetics of somatic mammalian cells: linkage studies with human chinese hamster cell hybrids. — *Nature*, 1970, vol. 288, N 5269, p. 329—332.
- Ferris S. D., Whitt G. S. Genetic and molecular analysis of nonrandom dimer assembly of the creatine kinase isozymes of fishes. — *Biochem. Genet.*, 1978, vol. 16, N 7—8, p. 811—829.
- Gibson W. C., Mehltz D., Lanham S. M., Godfrey D. G. The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma. — *Tropen. Med. Parasit.*, 1978, vol. 29, p. 335—345.
- Hermoso R., Valero A., Leon P., Monteoliva M. Analisis comparativo de *Trichuris suis* y *Trichuris ovis* (Nematoda) por electroforesis de enzimas. — *Rev. Iber. Parasitol.*, 1983, vol. 43, fasc. 3, p. 299—303.
- Mazoun R., Lanotte G., Rioux J.-A., Pasteur N., Killick-Kendrick R., Platlong F. Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. A propos de trois souches heterozygotes de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 et *Leishmania oethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. — *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1981, vol. 56, N 5, p. 467—475.
- Newton B. A. A synthetic growth medium for trypanosomid flagellate *Strigomonas* (*Herpetomonas*) *oncopelti*. — *Nature*, 1956, vol. 177, p. 279—280.
- Shaw C. R. How many genes evolves? — *Biochem. Genetic.*, 1970, vol. 4, N 2, p. 381—388.
- Solari A. J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. — *Chromos.*, 1980a, vol. 78, p. 239—255.
- Solari A. J. Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. — *Exper. Cell Res.*, 1980b, vol. 127, N 2, p. 457—460.
- Tait A. Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. — *Nature*, 1980, vol. 287, p. 536—538.
- Tait A. Sexual processes in the kinetoplastida. — *Parasitol.*, 1983, vol. 86, N 4, p. 29—57.
- Tibayrenc M., Desjeus P. The presense in Bolivia of two distinct zymodemes of *Trypanosoma cruzi*, circulating sympatrically in a domestic transmission cycle. — *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1983, vol. 77, N 1, p. 73—75.
- Tibayrenc M., Cariou M.-L., Solignac M. Interpretation genetique des zymogrammes de flagelles des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. — *C. R. Acad. Sc., Paris*, 1981, t. 292, sep. 3, p. 623—625.
- Tibayrenc M., Cariou M.-L., Solignac M., Carlier Y. Arguments genetiques contre l'existence d'une sexualite actuelle chez *Trypanosoma cruzi*. Implications taxinomiques. — *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1981, t. 293, sep. 3, p. 207—209.
- Valero A., Hermoso R., Monteoliva M. A. Estudios electroforeticos en alguones especies de cestodes. — *Rev. Iber. Parasitol.*, 1983, vol. 43, fasc. 1, p. 89—92.

ЗИН АН СССР, Ленинград

Поступило 16 III 1984

MULTIFORMS OF MALATE DEHYDROGENASE (K.F.1.1.1.37)
IN CRITHIDIA ASCLEPII AND C. ONCOPELTI
(MASTIGOPHORA, TRYPANOSOMATIDAE)

M. V. Krylov, L. M. Belova

SUMMARY

Isozyme analysis of mMDH in *Crithidia asclepii* and *C. oncopelti* by means of electrophoresis and densimetry method suggests the diploidness and genetic exchange in these organisms. Synthesis of mMDH in *C. asclepii* is checked by duplicated polymorphic loci MDH-1 and MDH-2, each with two alleles. In *C. oncopelti* two «daughter» loci are functioning too, polymorphic MDH-1 with 3 alleles and monomorphic MDG-2. Resemblance and differences in the isozyme spectra of mMDH can be used for taxonomic purposes.