

Bogdan Kontek*, Renata Kontek**

**AKTYWNOŚĆ TRANSFERAZ S-GLUTATIONOWYCH U WYBRANYCH
MUTANTÓW *DROSOPHILA MELANOGASTER* PO DŁUGOTRWAŁYM
PODAWANIU MALATIONU**

**ACTIVITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN SELECTED
MUTANTS *DROSOPHILA MELANOGASTER* AFTER LONG-TERM
TREATMENT WITH MALATHION**

Słowa kluczowe: *Drosophila melanogaster*, malation, aktywność transferaz S-glutationowych.

Key words: *Drosophila melanogaster*, malathion, activity of glutathione S-transferases.

Streszczenie

Zbadano wpływ długotrwałego działania związku fosforoorganicznego – malationu, na poziom aktywności transferaz S-glutationowych (GST) u wybranych mutantów („e - ebony”/mutacja ciała, „w^a - white apricot”/mutacja oczu) *Drosophila melanogaster*. Insektycyd ten jest bardzo często używanym związkiem chemicznym w rolnictwie na całym świecie. Transferazy S-glutationowe były otrzymywane z wielu pokoleń *Drosophila melanogaster*. Wykazano, że u badanej muszki owocowej wzrost aktywności transferaz S-glutationowych ma duże znaczenie w oporności na badany insektycyd fosforoorganiczny. Stwierdzono, że w obecności malationu poziom aktywności enzymu zmieniał się w zależności od stosowanej dawki i czasu oddziaływania z tym związkiem. Największe zmiany aktywności badanego enzymu (wzrost aktywności transferaz S-glutationowych) stwierdzono w 15-tym i 20-tym pokoleniu (max.) *Drosophila melanogaster* („e”) oraz w 10-tym do 20-tego pokolenia *Drosophila melanogaster* („w^a”).

* Dr Bogdan Kontek – Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; tel.: 42 635 43 36; e-mail: kontekb@biol.uni.lodz.pl

** Dr Renata Kontek – Pracownia Cytogenetyki, Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

Summary

The effects of the long-term action of the organophosphate insecticide – malathion on the activity level of glutathione S-transferases (GSTs) in selected mutants of Drosophila melanogaster („e – ebony”/body mutation, „w^a - white apricot”/eye mutation) were studied. Malathion is among the most widely used chemicals in agriculture all over the world. Glutathione S-transferases were extracted from many generations of Drosophila melanogaster.

The increased activities of tested enzymes (GSTs) in fruit fly is positively correlated with the resistance to malathion. It was found that in the presence to malathion the level of enzyme activity is changed in a dose/time dependent manner. The most visible changes in the activities of tested enzymes (increase activities glutathione S-transferases) were found in the 15-th, 20-th (max.) generations of Drosophila melanogaster („e”) and in the 10–20 -th (max.) generations Drosophila melanogaster („w^a”).

1. WPROWADZENIE

W wyniku powszechnego stosowania związków fosforoorganicznych (IFO) jako środków ochrony roślin następuje nabywanie oporności przez zwierzęta na insektycydy fosforoorganiczne [Bull i Pryor 1990]. Organizmy żywe broniąc się przed szkodliwym działaniem związków fosforoorganicznych wykształciły mechanizmy oporności. Mechanizmy oporności wydają się nierozdzielnie wiązać ze stopniem aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie IFO, głównie w ich degradacji i detoksykacji [Kao i Sun 1991]. Nabywanie oporności na insektycydy przez owady jest poważnym problemem gospodarczym i prowadzi w praktyce do zwiększenia stosowanych dawek, by osiągnąć podobne efekty trujące. Poznanie mechanizmów oporności na IFO owadów stwarza szansę aby zmniejszyć ilość stosowanych substancji toksycznych w celu ochrony roślin i zwierząt przed niepożądanymi pasożytami oraz ograniczyć skażenie środowiska. Stosowanie IFO już w dawkach podprogowych może wywoływać powstawanie aberracji chromosomowych, mutacji oraz zmian teratogennych. Wprowadzane do organizmu związki fosforoorganiczne (malation) wpływają na przebieg wielu procesów enzymatycznych prowadzących do zatrucia organizmu przez hamowanie aktywności różnych enzymów, zwłaszcza cholinioesteraz [Kontek i in. 2003]. Same związki fosforo-organiczne jednak ulegają przemianom metabolicznym do związków bardziej lub mniej toksycznych, a odbywa się to między innymi przy udziale transferaz S-glutationowych [Enayati i in. 2005].

Transferazy S-glutationowe (GST) są to białka o budowie dimerów, należące do wielogenowej rodziny izoenzymów o podjednostkowej budowie i wielofunkcyjnym charakterze [Walter 1994]. Występują powszechnie w organizmach żywych [Wilce i Parker 1994]. Transferazy S-glutationowe odgrywają ważną rolę w inicjowaniu detoksykacji wielu związków endo- i egzogennych [Tu i Akgül 2005]. Katalizują nukleofilowy atak grup-SH zredukowa-

nego glutationu na elektrofilowe centra związków organicznych, w wyniku czego powstają koniugaty glutationu [Walter i Gawrońska 1987]. W wyniku reakcji sprzęgania grupy-SH neutralizują centrum elektrofilowe związku, z którym reagują. Powstają produkty lepiej rozpuszczalne w wodzie, co ułatwia ich eliminację [Walter 1994]. Charakterystyczną cechą transferaz jest występowanie ich w danym organizmie w postaci wielu izoenzymów. Transferazy S-glutationowe owadów nie odbiegają swymi zasadniczymi cechami, schematem budowy od GST pochodzących z innych źródeł [Alias i Clark 2007, Ranson i Hemingway 2005]. U *Drosophila melanogaster* istnieją dwie odrębne immunologiczne klasy transferaz [Toung i Tu 1992]. Również u innych owadów stwierdzono w zależności od gatunku różną liczbę form GST [Sawicki i in. 2003, Yu 1991].

2. CEL, MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Celem prezentowanych w niniejszej pracy badań była ocena wpływu malationu, długo-trwale podawanego *in vivo* wybranym mutantom („e” i „w^a”) *Drosophila melanogaster* poprzez ocenę aktywności transferaz S-glutationowych w poszczególnych pokoleniach badanych muszek owocowych.

Materiałem do badań była *Drosophila melanogaster* (muszka owocowa). Została wybrana do doświadczenia ze względu na dobrze poznany aparat genetyczny oraz ze względu na szybkość jej namnażania, co pozwala otrzymać w krótkim czasie wiele pokoleń tego owadu. Założono populację *Drosophila melanogaster* i utrzymywano ją w stałej temperaturze ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), w ciągłej hodowli laboratoryjnej. Składała się ona z wybranych mutantów („e - ebony”/mutacja ciała, „w^a - white apricot”/mutacja oczu). Populację założono na pożywcę agarozowej (agarożowo-pszennej). Związkiem fosforoorganicznym, którym działano na mutanty muszki owocowej, był malation (S-1,2-dikarboetoksyetylo-O, O-dimetyloditiofosforan) o czystości 99% (otrzymany z Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie). Wchodzi on w skład różnych preparatów handlowych do zwalczania owadów, np. Malation E-50, Karbofoz i Sadofoz. Hodowlę mutantów *Drosophila melanogaster* prowadzono z zastosowanym w tym doświadczeniu związkiem fosforoorganicznym do osiągnięcia 25 pokolenia.

Malation rozpuszczony w 50-procentowym alkoholu etylowym podawano bezpośrednio na pożywkę, w stężeniach: 0,01 ppm, 0,1 ppm i 1,0 ppm, do kolejnych pokoleń *Drosophila melanogaster*. Tkanki owada (140 mg) homogenizowano homogenizatorem Pottera z tłokiem teflonowym, w 0,1 M buforze sodowo-potasowym o pH 7,5 zawierającym 0,25 M sacharozę w temperaturze 4°C według zmodyfikowanej metody Jakoby'ego [1985].

Białko oznaczano metodą Bradford [1976]. Aktywność transferaz S-glutationowych (GST) oznaczana była metodą Habiga i in. [1974] z dwoma substratami: 1,2-dichloro-4-nitrobenzenem (DCNB) oraz 1-chloro 2,4-dinitrobenzenem (CDNB). Przy oznaczaniu aktywności transferaz S-glutationowych pomiary absorbancji wykonywano przy użyciu spektrofotometru Specord M-40, przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ z CDNB oraz przy długości fali 345 nm z DCNB.

Badanie powtarzano 6-cio krotnie (n=6), a każdą próbę oznaczenia aktywności powtarzano 3-krotnie. Aktywność enzymatyczną wyrażono w jednostkach aktywności specyficznej [1 μmol produktu powstałego w ciągu jednej minuty w warunkach reakcji enzymatycznej w przeliczeniu na mg białka].

3. WYNIKI I DYSKUSJA

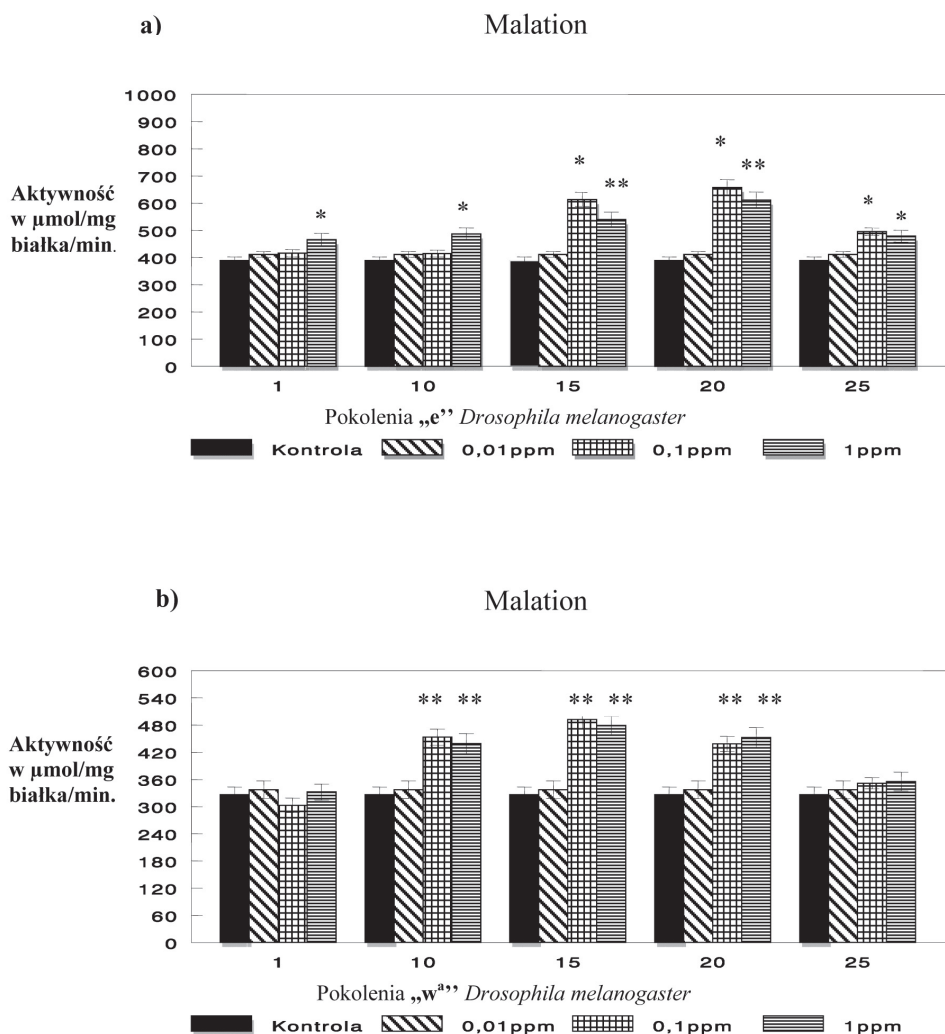
Prezentowane wyniki dotyczą wpływu malationu na aktywność transferazową w kolejnych pokoleniach mutantów *Drosophila melanogaster* („e” i „w^a”). Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano zwiększenie aktywności GST w zależności od dawki i badanego pokolenia. Stwierdzono także różnicę w aktywności enzymu wobec stosowanych substratów (CDNB i DCNB). Poziom aktywności transferaz S-glutationowych u *Drosophila melanogaster* po działaniu malationu w poszczególnych pokoleniach przedstawiono na rysunkach: 1a i b oraz 2a i b, zamieszczonych na stronach 92 i 93.

Aktywność GST (z CDNB) dla szczepu „e” zwiększała się stopniowo już od pierwszego pokolenia zwłaszcza dla największego stosowanego stężenia, ale maksimum osiągnęła w pokoleniach od 15-tego do 20-tego, a następnie nastąpił spadek aktywności w pokoleniu 25-tym. Natomiast aktywności GST (z CDNB) dla szczepu „w^a” zwiększyła się gwałtownie dopiero w dziesiątym pokoleniu również przy największych stosowanych stężeniach. Maksimum aktywności GST przypadło tutaj na pokolenia od 10-tego do 20-tego. Gwałtowny spadek aktywności GST (z CDNB) dla szczepu „w^a” nastąpił jak poprzednio w pokoleniu 25-tym.

Aktywność GST (z DCNB) dla szczepu „e” podobnie zwiększała się stopniowo już od pierwszego pokolenia zwłaszcza dla największych stosowanych stężeń, i swoje maksimum osiągnęła również w pokoleniach od 15-tego do 20-tego. Spadek aktywności enzymów nastąpił w pokoleniu 25-tym (podobnie jak spadek aktywności z CDNB). Aktywności GST (z DCNB) natomiast dla szczepu „w^a” zwiększyła się gwałtownie już od pierwszego pokolenia także przy największych stosowanych stężeniach. Maksimum aktywności GST przypadło tutaj na pokolenia od 15-tego do 20-tego. Zdecydowany spadek aktywności GST (z DCNB) dla szczepu „w^a” nastąpił w pokoleniu 25-tym (podobnie jak spadek aktywności z CDNB).

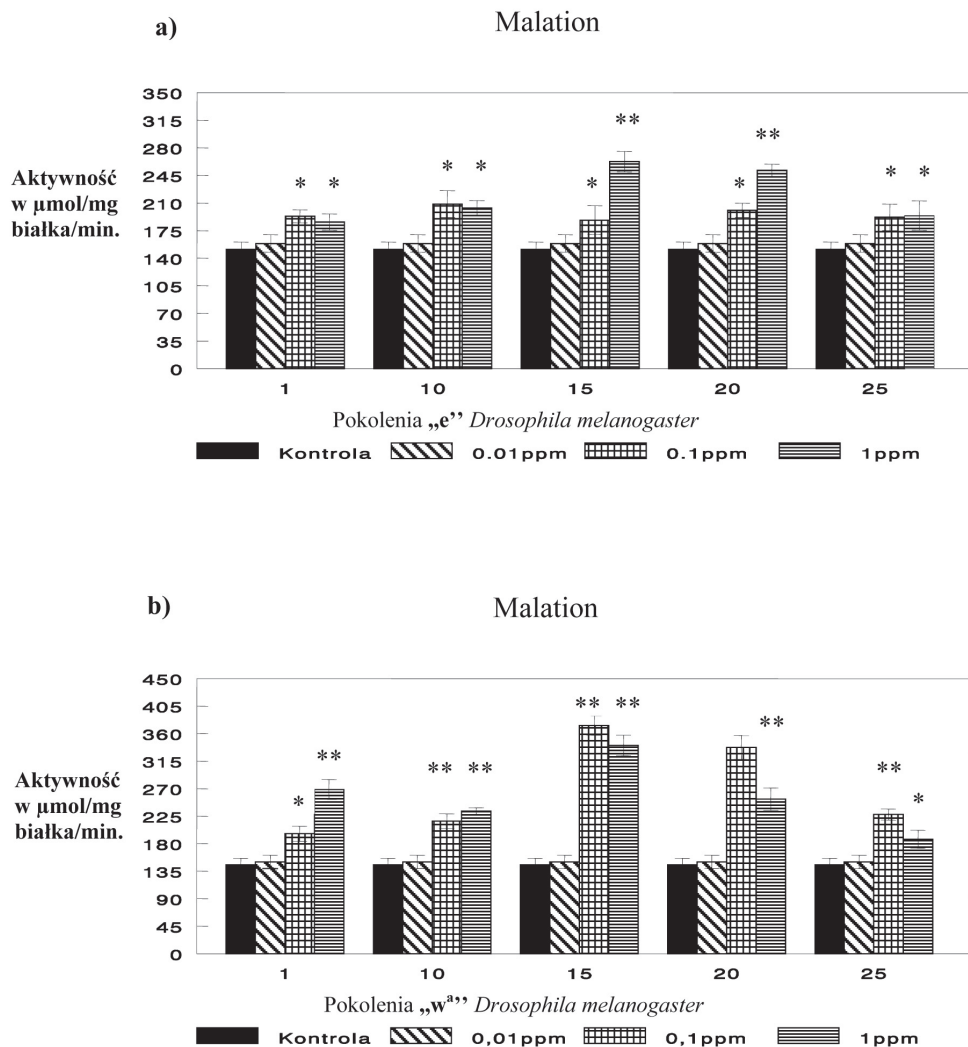
Zaobserwowano silniejsze działanie substratu CDNB względem DCNB na aktywność GST w badanej frakcji u *Drosophila melanogaster*. Aktywność GST (z CDNB) dla kontroli była zdecydowanie większa (± 350 – 400) μmol/mgP/min niż aktywność GST (z DCNB), która wynosiła (± 140 – 160) μmol/mgP/min.

Związki fosforoorganiczne (IFO) stosowane w dawkach podprogowych mogą wywoływać powstawanie aberracji chromosomowych, mutacji oraz zmiany teratogenne [Flessel i in. 1993, Walter i in. 1980, Walter 1989, Wiszkowska i in. 1986]. W badaniach *in vitro* okazało się, że IFO uszkadzają DNA, wywołując alkilację zasad azotowych [Wiaderekiewicz i in. 1986] oraz zmiany struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej [Wojtyśiak i in. 1989].



Rys. 1. Aktywność GST (CDNB) po działaniu IFO (malationu) dla szczepu „e”(a) i „w”(b) w poszczególnych pokoleniach *Drosophila melanogaster*: * $p < 0,05$ różnica istotna statystycznie odnośnie do grupy kontrolnej, ** $p < 0,01$ różnica istotna statystycznie odnośnie do grupy kontrolnej

Fig. 1. Activity of GST (CDNB) after action of IFO (malathion) in several generations of „e”(a) i „w”(b) *Drosophila melanogaste*: * $p < 0,05$ statistically significant relative to the control group, ** $p < 0,01$ statistically significant relative to the control group



Rys. 2. Aktywność GST (DCNB) po działaniu IFO (malationu) dla szczepu „e”(a) i „w”(b) w poszczególnych pokoleniach *Drosophila melanogaster*: * $p < 0,05$ różnica istotna statystycznie odnośnie do grupy kontrolnej, ** $p < 0,01$ różnica istotna statystycznie odnośnie do grupy kontrolnej

Fig. 2. Activity of GST (DCNB) after action of IFO (malathion) in several generations of „e”(a) i „w”(b) *Drosophila melanogaster*: * $p < 0,05$ statistically significant relative to the control group, ** $p < 0,01$ statistically significant relative to the control group

Skutki biologiczne obserwowane *in vitro* świadczą o uszkodzeniu materiału genetycznego [Machin i in. 1989]. Zmiany te mogą wiązać się również z powstawaniem oporności na stosowane związki. Powstająca oporność na insektycydy fosforoorganiczne zależy w znacznym stopniu od sprawności systemów enzymatycznych przeprowadzających IFO w mniej toksyczne pochodne. Melation wprowadzony do organizmu wpływa na szereg procesów enzymatycznych prowadzących do zatrucia organizmu, przez hamowanie aktywności różnych enzymów, zwłaszcza cholinoesteraz [Kontek i in. 2003]. Przemianom metabolicznym również podlega sam malation, do związków bardziej lub mniej toksycznych, a odbywa się to między innymi przy udziale transferaz S-glutationowych. Wzrost aktywności GST świadczy o czynnym udziale transferaz S-glutationowych w detoksykacji malationu. Ze względu na katalizowanie przez GST reakcji sprzęgania z dużą liczbą związków chemicznych, w tym z wieloma czynnikami alkilującymi, chronią one komórkę przed potencjalną toksycznością różnych związków.

Zwiększenie aktywności enzymów, a następnie jej zmniejszenie, może być także związane z amplifikacją bądź indukcją genów. Udało się określić lokalizację genów odpowiedzialnych za oporność na działanie insektycydów fosforoorganicznych u laboratoryjnych szczepów *Drosophila melanogaster*. Geny te wydają się uczestniczyć w regulacji mikrosomalnego cytochromu P450 i są zlokalizowane w chromosomie 2 i 3, [Walter 1997; Miyo i in. 2002].

Różnice w aktywności GST we frakcji postmitochondrialnej wobec badanych substratów (CDNB i DCNB) mogą natomiast wynikać z występowania w homogenacie różnych form izoenzymów, o odmiennej budowie i specyficzności substratowej.

Molekularny mechanizm nabywania oporności przez owady nie jest wyjaśniony. Metodą behawioralną stwierdzono, że *Drosophila melanogaster* od 23. pokolenia nabywa oporność na malation [Pluthero i in. 1982], co może pociągnąć za sobą zmiany aktywności enzymów [Kao i in. 1984, Morton i Holwerda 1985], a co próbowano w niniejszym opracowaniu wykazać. Zwiększenie aktywności GST, a następnie jej zmniejszenie w ponad 20-tym pokoleniu może świadczyć o czynnym udziale GST w nabywaniu oporności na malation. Oporność na malation może być także związana w różny sposób ze zdolnością metabolizowania tego związków przez owady. U owadów ze zwiększającą się opornością obserwowano zwiększenie syntezy enzymów metabolizujących IFO bądź enzymów reperujących DNA.

Oddziaływanie niskich dawek malationu na procesy metaboliczne komórki wydaje się również świadczyć o wpływie na materiał genetyczny, a tym samym na syntezę różnych enzymów biorących udział w ich metabolizowaniu [Kontek i in. 2001, 2005, 2007].

W przeprowadzonej analizie statystycznej otrzymanych wyników za pomocą testów F-Fishera-Snedecora oraz t-Studenta przyjęto poziom istotności $\alpha=0,05$ i $\alpha=0,01$.

4. PODSUMOWANIE

Na podstawie otrzymanych wyników i danych z piśmiennictwa można przypuszczać, że zwiększenie syntezy enzymów metabolizujących IFO bądź enzymów reperujących DNA odgrywa bardzo istotną rolę w procesie nabywania oporności, a zastosowane oznaczenia enzymatyczne spełniają swoją rolę jako markery nabywania oporności.

Oddziaływanie niskich niewykazujących ostrej toksyczności dawek malationu na aktywność enzymów biorących udział w ich metabolizowaniu (zwiększenie aktywności GST) wydaje się świadczyć o ich indukcji (np. przez zwiększanie liczby genów). Same IFO bowiem są inhibitorami białka enzymatycznego.

Otrzymane wyniki mogą stać się kolejnym krokiem na drodze poznania mechanizmów działania malationu na enzymy uczestniczące w ich detoksykacji, w kolejnych pokoleniach muszki owocowej. Pozwala to lepiej poznać i zrozumieć mechanizmy nabywania oporności na te związki przez owady poddane działaniu insektycydów w rolnictwie, medycynie jak też w naszym domowym otoczeniu.

PIŚMIENICTWO

- ALIAS Z., CLARC A.G. 2007. Studies on the glutathione S-transferase proteome of adult *Drosophila melanogaster*: responsiveness to chemical challenge. *Proteomics* 7: 3618–3628.
- BRADFORD H. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- BULL D.L., PRYOR N.W. 1990. Characteristic of resistance in house flies subjected to long-term concurrent selection with malathion and permethrin. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 101–115.
- ENAYATI A.A., RANSON H., HEMINGWAY J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Journal Insect Mol. Biol.* 14: 3–8.
- FLESSEL P., QUINTANA P.J.F., HOOPPER K. 1993. Genetic toxicity of Malathion. A Review *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22: 7–17.
- HABIG W.H., PABST H.J., JACOBY W.B. 1974. Glutathione S-transferases; the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249: 7130–7139.
- JACOBY W.B. 1985. *Methods in enzymology* 113: 495–499.
- KAO Ch.-H., SUN Ch.-N. 1991. In vitro degradation of some organophosphorus insecticides susceptible and resistant diamondback Moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* 41: 132–141.
- KAO L.R., Motoyama N., Dauterman W.C. 1984. Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 86–92.
- KONTEK B., WALTER Z. 2001. Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej u *Drosophila*

- melanogaster* poddanej długotrwałemu działaniu dichlorfosu. *Folia Biochimica et Biophysica* 15: 45–57.
- KONTEK B., WALTER Z., KONTEK R. 2003. Działanie wybranych insektycydów fosforoorganicznych na aktywność cholinergiczną owadów (*Drosophila melanogaster*). Bory Tucholskie II Zasoby i ich ochrona, (pod red. K. Gwoździński) Wyd. UŁ: 329–337.
- KONTEK B., WALTER Z., KONTEK R. 2005. Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej u *Drosophila melanogaster* poddanej długotrwałemu działaniu malationu i bromfenwinfosu metylowego. Bory Tucholskie III Zasoby i ich ochrona, (pod red. K. Gwoździński) Wyd. Uniwersytetu Łódzkiego: 63–71.
- KONTEK B., WALTER Z., KONTEK R. 2007. Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej u wybranych szczepów *Drosophila melanogaster* poddanych długotrwałemu działaniu malationu, bromfenwinfosu metylowego i dichlorfosu. Bory Tucholskie i inne obszary leśne ochrona, monitoring, edukacja (pod red. K. Gwoździński) Wyd. Uniwersytetu Łódzkiego: 457–468.
- MACHIN M., McBRIDE W. 1989. Teratological study of malathion in the rabbit. *Journal Toxicol. Environ. Hlth.* 26: 249–253.
- MIOY T., KONO Y., OGUMA Y. 2002. Genetic basis of cross-resistance to three organophosphate insecticides in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal Econ. Entomol.* 95: 871–7.
- MORTON R.A., HOLWERDA B.C. 1985. The oxidative metabolism of malathion and malaoxon in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Pest. Biochem. Physiol.* 24: 19–31.
- PLUTHERPO F.G., SINGH R.S., THRELKELD S.F.H. 1982. The behavioral and physiological components of malathion resistance in *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 807–815.
- RANSON H., HEMINGWAY J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401: 226–41.
- SAWICKI R., SINGH S.P., MONDAL A.K., BENES H., ZIMNIAK P. 2003. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochem. J.* 370: 661–9.
- TOUNG Y.P.S., TU C.P.D. 1992. *Drosophila glutathione* S-transferases have sequence homology to the stringent starvation protein of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 182: 355–360.
- TU C.P., AKGÜL B. 2005. *Drosophila glutathione* S-transferases. *Methods Enzymol.* 401: 204–26.
- WALTER Z. 1989. Amplifikacja genów odpowiedzialnych za oporność na insektycydy fosforoorganiczne. *Biol. Mech. Proc. Adapt., VII Symp w Krakowie*, Wydawnictwo Naukowe WSP, Kraków: 97–100.

- WALTER Z. 1994. Specyficzność tkankowa transferaz S-glutationowych w monografii „Białka komórek prawidłowych i patologicznych. ŁTN, Łódź 118: 151–171.
- WALTER Z. 1997. Działanie insektycydów fosforoorganicznych na strukturę genomu i mechanizm przekazywania informacji genetycznej, w: Ekologia. Jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy, red. Kurnatowska A., PWN, Warszawa: 81–97.
- WALTER Z., CZAJKOWSKA A., LIPECKA K. 1980. Effect of malathion on the genetic material of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin (PHA). Hum. Genet. 53: 375–381.
- WALTER Z., GAWROŃSKA M. 1987. Wpływ malationu na strukturę chromatyny. Kieleckie Studia Biologiczne, T4: 143–153.
- WIADERKIEWICZ R., WALTER Z., REIMSCHUSSEL W. 1986. Sites of metylathion of DNA bases by the action of organophosphorus insecticides in vitro. Acta Biochimica. Polonica 33: 73–85.
- WILCE M.C.J., PARKER M.W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochimica et Biophysica Acta 1205: 1–18.
- WISZKOWSKA H., KULAMOWICZ I., MALINOWSKA A., WALTER Z. 1986. The effect of malathion on RNA polymerase activity off cell nuclei and transcription products in lymphocyte culture. Env. Res. 41: 372–377.
- WOJTYSIAK M., WALTER Z. 1989. The effects of malathion and gamma radiation on DNA. Bull. Soc. Sci. Lett. vol. XXXIX 19: 1–10.
- YU S.J. 1991. Insecticide resistance in the Fall Armyworm, Spodoptera frugiperda. Pestic. Biochem. Physiol. 39: 84–91.