

УСТОЙЧИВОСТЬ К БОРНОЙ КИСЛОТЕ У *Drosophila melanogaster* ЗАВИСИТ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *Cyp9b2*

© 2022 г. П. А. Миляева¹, Л. Н. Нефедова¹, *

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: lidia_nefedova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.07.2021 г.

После доработки 24.09.2021 г.

Принята к публикации 05.10.2021 г.

Drosophila melanogaster широко используется в качестве модельного объекта в исследованиях молекулярно-генетических механизмов ответа на воздействие на организм различных ксенобиотиков, в том числе инсектицидов. Борная кислота является одним из распространенных инсектицидов, однако механизмы ее воздействия на организм насекомых не изучены. Ранее у *D. melanogaster* был выявлен ген-кандидат *Cyp9b2* – мутант, по которому приобретает чувствительность к борной кислоте. В настоящей работе исследована роль кластера двух высокоомологичных генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* в устойчивости *D. melanogaster* к борной кислоте. Уровень базовой транскрипции гена *Cyp9b2* в пять раз выше, чем гена *Cyp9b1*, что коррелирует с *in silico*-анализом 5'-регуляторных областей этих генов, демонстрирующим их различный регуляторный потенциал. Устойчивость к борной кислоте зависит дозоспецифично от уровня транскрипции гена *Cyp9b2*, но не от уровня транскрипции гена *Cyp9b1*. Инактивация гена *Cyp9b1* не сказывается на фенотипе и не влияет на уровень устойчивости к инсектициду.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, цитохром, ксенобиотики, борная кислота.

DOI: 10.31857/S0016675822040099

Дрозофила широко используется в качестве модельного объекта в исследованиях молекулярно-генетических механизмов ответа на воздействие на организм различных ксенобиотиков, в том числе ответа на инсектициды [1]. Метаболизм инсектицидов, как и других ксенобиотиков, происходит в ходе трех последовательных фаз: фаза I осуществляется цитохромами P450, фаза II осуществляется глутатион-S-трансферазами, UDP-глюкозилтрансферазами и карбоксилэстеразами, фазу III осуществляют АВС-транспортёры, которые выводят продукты метаболизма ксенобиотиков из клетки [2]. Активация отдельных цитохромов в ответ на ксенобиотики может быть ткане- и полостеспецифична, основными структурами, в которых происходит метаболизм ксенобиотиков, являются жировое тело, средняя кишка и мальпигиевы сосуды [3, 4].

Борная кислота является одним из распространенных инсектицидов. Ее действие на гистологическом уровне было продемонстрировано на *Blattella germanica*: при содержании борной кислоты в корме в больших концентрациях (20%) происходит полное разрушение эпителия средней кишки рыжего таракана [5]. При этом происходит активация глутатион-S-трансфераз в ответ на окислительный стресс, а также снижение актив-

ности ацетилхолинтрансферазы – мишени нейротоксичных инсектицидов, что свидетельствует о влиянии борной кислоты на нервную систему [5]. Борная кислота приводит к аномалиям средней кишки и мальпигиевых сосудов у муравьев-листорезов [6], аргентинских муравьев [7] и личинок медоносной пчелы [8], а также к дефектам средней кишки и жирового тела у восковой моли [9]. Конкретные физиологические механизмы воздействия борной кислоты на организм насекомых пока не изучены.

Drosophila melanogaster широко используется в качестве модельного объекта в исследованиях, касающихся различных окислителей, мутагенов и ксенобиотиков, в том числе борной кислоты [10, 11]. В ходе исследования [11] с использованием более 200 инбредных линий из коллекции DGRP (*Drosophila* Genetic Reference Panel) было проведено QTL-картирование локусов, связанных с метаболизмом борной кислоты у *D. melanogaster*, в ходе которого был выявлен единственный ген-кандидат – *Cyp9b2*, кодирующий цитохром семейства P450, нокадаун которого приводил к снижению примерно в 1.5 раза выживаемости восьмидневных самок на среде, содержащей полупроцентную борную кислоту [11].

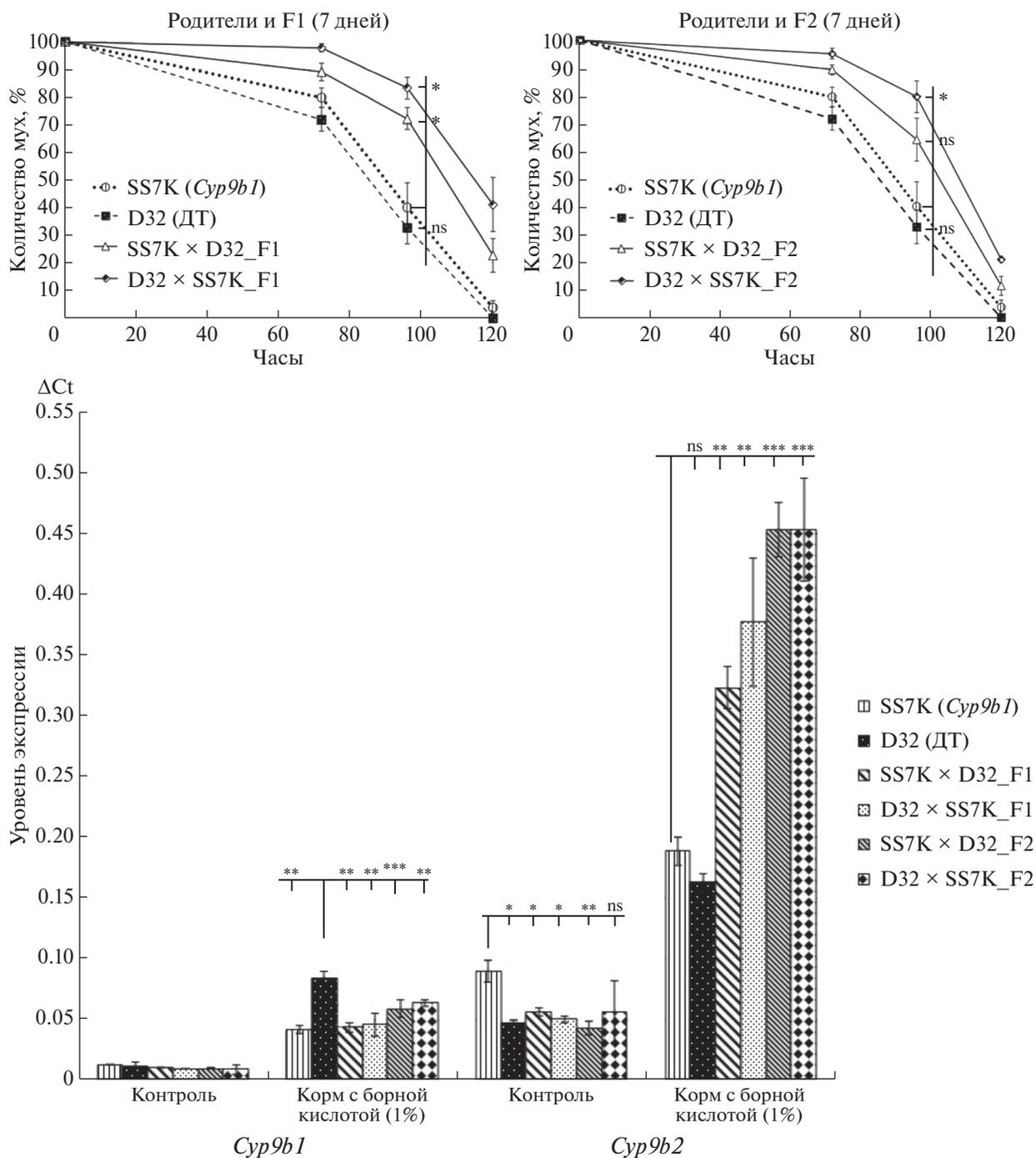


Рис. 1. Выживаемость на среде, содержащей борную кислоту (верхняя часть рисунка), и уровень экспрессии генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* (нижняя часть рисунка) у самок линий SS7K, несущей мутацию в гене *Cyp9b1*, дикого типа D32, а также их гибридов первого и второго поколений (* – $p < 0.5$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по критерию Манна–Уитни; ns, not significant – незначимое изменение).

нии дикого типа, а в линии SS7K и у гибридов уровень индуцированной транскрипции гена *Cyp9b1* примерно одинаков и в два раза ниже, чем в линии SS7K. Однако уровень транскрипции гена *Cyp9b2* у гибридов на среде с борной кислотой активируется в 2.5–3 раза по сравнению с родитель-

скими линиями. Таким образом, повышенный уровень выживаемости у гибридов обусловлен именно повышенным уровнем экспрессии гена *Cyp9b2*, так как значительное повышение экспрессии этого гена у гибридов коррелирует с их повышенной выживаемостью на среде с борной кислотой.

Суммарный уровень индуцированной транскрипции генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* в линии D32 сравним с таковым для гена *Cyp9b2* в линии SS7K. Если предположить, что гены работают аддитивно, то, при условии отсутствия (из-за наличия стоп-кодона) белкового продукта гена *Cyp9b1* линии SS7K, должна была бы наблюдаться повышенная устойчивость к борной кислоте в линии D32, а не в SS7K. Однако количество белковых продуктов не обязательно должно быть пропорционально количеству транскриптов и, тем более, выживаемости. Последнее следует из данных по гибридам, у которых транскрипция гена *Cyp9b2* на среде с борной кислотой повышена примерно в три раза, а выживаемость — не более, чем в два раза, и то в определенных временных точках (рис. 1). Таким образом, опираясь на данные исследования [11] и полученные в настоящем исследовании данные, можно заключить, что выживаемость на борной кислоте строго коррелирует с уровнем транскрипции гена *Cyp9b2*, а экспрессии гена *Cyp9b1* недостаточно, чтобы значимо повлиять на уровень устойчивости к борной кислоте.

По данным масштабного транскриптомного анализа, результаты которого размещены в базе данных FlyBase [13], уровень базовой транскрипции гена *Cyp9b1* оценивается у имаго как очень низкий (2–3 условные единицы), *Cyp9b2* — как умеренный (14–16 условных единиц). Очень высокий уровень неиндуцированной транскрипции гена *Cyp9b2* (более 150 условных единиц) наблюдается в пищеварительной системе, высокий (50–100 условных единиц) — в тканях головы и каркаса. Для гена *Cyp9b1* в тканях головы и пищеварительной системы наблюдается умеренный уровень (11–17 условных единиц) экспрессии. Характер экспрессии генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* в разных тканях и в ответ на воздействие различных ксенобиотиков в целом схож. Согласно анализу корреляции профилей экспрессии, проведенному FlyBase на основании сравнения транскриптомных данных, корреляция транскрипции генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* в разных тканях и в ответ на воздействие стрессоров, составляет 84.4 и 91.7% соответственно, что может свидетельствовать о сходном контроле транскрипции этих генов. Однако в списке HitList коррелирующих по профилю экспрессии в разных тканях генов, кроме *Cyp9b1* и *Cyp9b2*, присутствуют еще шесть генов цитохромов (*Cyp6g1*, *Cyp28d1*, *Cyp4ac1*, *Cyp6w1*, *Cyp6a2*, *Cyp4p1*), а в списке коррелирующих по профилю экспрессии генов в ответ на стрессовые воздействия наряду с *Cyp9b1* и *Cyp9b2* присутствуют еще десять генов цитохромов (*Cyp12a5*, *Cyp6a9*, *Cyp6a21*, *Cyp4p1*, *Cyp6a23*, *Cyp12e1*, *Cyp6a17*, *Cyp6a14*, *Cyp4d14*, *Cyp6d4*). Таким образом, списки генов цитохромов, индуцируемых в разных тканях и в ответ на

стрессовые воздействия, в основном, не пересекаются и содержат только три одинаковых гена — *Cyp9b1*, *Cyp9b2* и *Cyp4p1*. Последний ген не попал в круг рассматриваемых кандидатов, выявленных в работе [11], и имеет незначительное структурное сходство с геном *Cyp9b2* (*Cyp4p1* и *Cyp9b2* на 25% идентичны и на 40% сходны по аминокислотным последовательностям).

Следует отметить, что кроме корреляции профилей транскрипции, необходимо сравнивать еще уровень транскрипции генов цитохромов. Так уровень индуцированной экспрессии гена *Cyp9b2* выше, чем *Cyp9b1*, в пять раз в тканях головы и каркаса и в 20 раз выше в тканях пищеварительной системы. Такой высокий уровень экспрессии гена *Cyp9b2* в тканях пищеварительной системы может объяснять устойчивость к борной кислоте, которую мухи получали с пищей. Почему же ген *Cyp9b1* имеет низкий базовый уровень транскрипции?

Поскольку гены *Cyp9b1* и *Cyp9b2* — результат дубликации предкового гена, мы проанализировали регуляторные 5'-регуляторные области (по 500 пн от начала кодирующей рамки) на предмет сходства нуклеотидных последовательностей и наличия общих регуляторных сайтов. Выравнивание последовательностей в программе Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) не выявило протяженных участков гомологии сходства, что свидетельствует о значительной дивергенции последовательностей. Поиск коротких сходных последовательностей длиной 10–12 пн (допустимо наличие двух неспаренных нуклеотидов) в некодирующих 5'-регуляторных областях генов в программе Oligonucleotids repeats finder (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/oligorep/>) выявил 20 гомологичных участков, из которых только пять имеют примерно одинаковые координаты в регуляторных областях. Предсказание сайтов связывания транскрипционных факторов в программе LASAGNA (https://biogrid-lasagna.eng.uconn.edu/lasagna_search/index.php) [14] с использованием алгоритма позиционно-весовых матриц и двух баз данных TRANSFAC (Insects, 38 моделей сайтов связывания) и JASPAR (Insects, 126 моделей сайтов связывания). Поиск в базе данных TRANSFAC выявил с вероятностью $p < 0.001$ три предполагаемых сайта связывания транскрипционных факторов для гена *Cyp9b1* и семь — для гена *Cyp9b2*. Поиск в базе данных JASPAR выявил с вероятностью $p < 0.001$ 11 и 19 предполагаемых сайтов связывания транскрипционных факторов для генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* соответственно. Общим для двух генов и для двух баз данных оказался только один сайт связывания — сайт транскрипционного фактора CF-2II, контролирующего дифференцировку фолликулярных кле-

ток и регулирующий экспрессию генов миогенеза. Таким образом, по крайней мере по данным биоинформатического анализа, регуляция работы генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* может различаться, а у гена *Cyp9b2* может быть больше регуляторов транскрипционной активности. Однако предсказательная сила у биоинформатических методов поиска сайтов связывания транскрипционных факторов невысока и требует экспериментального подтверждения.

Опубликовано единственное исследование, в котором экспрессия на уровне транскрипции обоих генов, *Cyp9b1* и *Cyp9b2*, согласовано повышалась до трех раз в ответ на воздействие ксенобиотиком – фенобарбиталом [15]. Индукция только гена *Cyp9b2* под действием фенобарбитала обнаружена в работах [16, 17]. Примечательно, что фенобарбитал в низких концентрациях в ряде исследований используется как антиоксидант, повышающий устойчивость к определенным пестицидам при совместной обработке [18]. Чаще всего такой эффект обусловлен дополнительной индукцией систем антиоксидантной защиты, поскольку в ряде случаев цитохромы, участвуя в детоксикации ксенобиотиков, сами индуцируют окислительный стресс [19].

Различный характер экспрессии генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* был выявлен в нескольких работах, посвященных исследованию ответа цитохромов на различные стрессовые воздействия [20–25]. Показано, что *Cyp9b1* снижает свою экспрессию при облучении молодых мух синим светом (наряду с девятью другими генами цитохромов – *Cyp28d1*, *Cyp317a1*, *Cyp4c3*, *Cyp4e1*, *Cyp4e3*, *Cyp4s3*, *Cyp6a20*, *Cyp6a8*, *Cyp6a9*), при этом индуцируются нейротекторные гены [18]. Также ген *Cyp9b1* снижает свою экспрессию в ответ на гипоксию у личинок третьего возраста (наряду с генами *Cyp6a22* и *Cyp6a17*) [21]. Напротив, экспрессия *Cyp9b2* повышается при голодании [22] и гипоксии [23]. У взрослых самцов экспрессия *Cyp9b2* индуцируется на среде с туникамицином – индуктором стресса эндоплазматического ретикулума [24]. В работе [25] было обнаружено, что экспрессия гена *Cyp9b2* индуцируется голоданием у дрозофилы. Таким образом, гены *Cyp9b1* и *Cyp9b2* могут активироваться как согласованно, так и дифференциально.

Примечательным является тот факт, что лабораторная линия SS7K, используемая в нашем эксперименте, оказалась полностью гомозиготной по мутации в гене *Cyp9b1*. Конечно это может быть результатом случайных событий. Но очевидно это свидетельствует о том, что ген не является важным и не поддерживается отбором в лабораторных условиях культивирования. Шел ли отбор в пользу закрепления в данной популяции

мутантного аллеля гена *Cyp9b1* – неизвестно. Однако те немногочисленные исследования, которые включали анализ транскрипции гена *Cyp9b1*, показывают, что его экспрессия снижается, то есть не является необходимой, при ряде стрессовых воздействий [20, 21]. А если и индуцируется некоторыми воздействиями, то в незначительной степени, в отличие от гена *Cyp9b2*, что делает роль этого гена второстепенной. По-видимому, ген *Cyp9b1* не находится под действием стабилизирующего отбора, поскольку дублирует функцию *Cyp9b2* и имеет слишком низкий уровень экспрессии.

Полученные нами данные о зависимости уровня устойчивости к борной кислоте в зависимости от дозы гена *Cyp9b2* косвенно подтверждаются исследованиями на другом виде дрозофил – *D. sechellia*. Исследование генома *D. sechellia*, питающихся плодами растения *Morinda citrifolia*, экстракт которого часто используют в качестве инсектицида с нейротоксическим действием, имеют три дополнительные копии гена *Cyp9b2* (а также по одной дополнительной копии генов *Cyp6d5*, *Cyp9f2*, *Cyp6a9*, *Cyp6a17*, *Cyp4p1*, *Cyp4d1*, *Cyp4d2*) [26]. Очевидно ген *Cyp9b2* является важным геном детоксикации, отвечающим на широкий спектр воздействий. Характер индукции гена *Cyp9b2* свидетельствует о его участии в ответе на нейротоксический стресс, он активируется нейротоксичными ксенобиотиками (фенобарбитал, ротенон, кофеин, этанол) [27]. По-видимому борная кислота оказывает сходное воздействие, влияя и на пищеварительную, и на центральную нервную систему дрозофилы. Основной вопрос заключается в том, каким образом ген *Cyp9b2* обеспечивает некоторый уровень устойчивости к борной кислоте. Известно, что борная кислота может физически взаимодействовать с одним из типов цитохромов, цитохромом *c*, в реакции *in vitro* [28]. Это не исключает возможности ее взаимодействия с другими типами цитохромов, что требует дальнейшего исследования.

Исследование выполнено в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang J., McCart C., Woods D.J., Terhzaz S. et al. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism // *Physiol. Genomics*. 2007. V. 30. P. 223–231.
2. Ranson H., Claudianos C., Orтели F. et al. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance // *Science*. 2020. V. 298. P. 179–181.
3. Petersen R.A., Zangerl A.R., Berenbaum M.R., Schuler M.A. Expression of CYP6B1 and CYP6B3 cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae) // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001. V. 31. P. 679–690.
4. Le Goff G., Hilliou F., Siegfried B.D. et al. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2006. V. 36. № 8. P. 674–682.
5. Habes D., Morakchi S., Aribi N. et al. Boric acid toxicity to the german cockroach, *Blattella germanica*: alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity // *Pesticide Biochem. and Physiology*. 2005. P. 17–24.
6. Sumida S., Da Silva-Zacarin E.C.M., Decio P. et al. Toxicological and histopathological effects of boric acid on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers // *J. Economic Entomology*. 2010. V. 103. № 3. P. 676–690.
7. Klotz J.H., Amrhein Ch., McDaniel S. et al. Assimilation and toxicity of boron in the *Argentine ant* (Hymenoptera: Formicidae) // *J. Entomol. Sci.* 2002. V. 37. № 2. P. 193–199.
8. da Silva Cruz A., da Silva-Zacarin E.C.M., Bueno O.C. et al. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae // *Cell Biol. Toxicol.* 2010. V. 26. P. 165–176.
<https://doi.org/10.1007/s10565-009-9126-x>
9. Büyükgüzel E., Büyükgüzel K., Snela M. et al. Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella* // *Cell Biol. and Toxicology*. 2013. V. 29. P. 117–129.
10. Sarıkaya R., Erciyas K., Kara M.I. et al. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of boron by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila* // Taylor and Francis. 2016.
11. Najarro M.A., Hackett J.L., Macdonald S.J. Loci contributing to boric acid toxicity in two reference populations of *Drosophila melanogaster* // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2017. V. 7. № 6. P. 1631–1641.
12. Кукушкина И.В., Махновский П.А., Нефедова Л.Н. и др. Анализ транскриптома линий *Drosophila melanogaster* с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона gypsy // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 5. С. 550–560.
13. Brown J.B., Boley N., Eisman R. et al. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome // *Nature*. 2014. V. 512. № 7515. P. 393–399.
14. Lee C., Huang C.-H. LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization // *BioTechniques*. 2013. V. 54. № 3. P. 141–153.
15. Willoughby L., Chung H., Lumb C., Robin C. et al. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 36. P. 934–942.
16. Sousa-Polezzi R., Hermione B. Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). // *Genet. Mol. Biol.* 2004. V. 27. № 2.
17. King-Jones K., Horner M.A., Lam G., Thummel C.S. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila* // *Cell Metabolism*. 2006. V. 4. P. 37–48.
18. Sun W., Margam V.M., Sun L. et al. Genome-wide analysis of phenobarbital-inducible genes in *Drosophila melanogaster* // *Insect Mol. Biol.* 2006. V. 15. P. 455–464.
19. Hrycay E.G., Bandiera S.M. Chapter Two – Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer // *Adv. in Pharmacology*. 2015. V. 74. P. 35–84.
20. Hall H., Ma J., Shekhar S. et al. Blue light induces a neuroprotective gene expression program in *Drosophila* photoreceptors // *BMC Neurosci.* 2018. V. 19. № 43.
21. Li Y., Padmanabha D., Gentile L.B., Dumur C.I. et al. HIF- and non-HIF-regulated hypoxic responses require the estrogen-related receptor in *Drosophila melanogaster* // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 1. e1003230.
22. Harbison S.T., Chang S., Kamdar K.P. et al. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila* // *Genome Biol.* 2005. V. 6. № R36.
23. Liu G., Roy J., Johnson E.A. Identification and function of hypoxia-response genes in *Drosophila melanogaster* // *Physiol. Genomics*. 2006. V. 25. P. 134–141.
24. Girardot F., Monnier V., Tricoire H. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster* // *BMC Genomics*. 2004. V. 5. № 74.
25. Carsten L.D., Watts T., Markow T.A. Gene expression patterns accompanying a dietary shift in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 3203–3208.
26. Rane R.V., Clarke D.F., Pearce S.L. et al. Detoxification genes differ between cactus-, fruit-, and flower-feeding *Drosophila* // *J. Heredity*. 2019. V. 110. № 1. P. 80–91.
27. Giraud M., Unnithan G.C., Le Goff G., Feyereisen R. Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights // *Pestic Biochem. Physiol.* 2010. V. 97. № 2. P. 115–122.
28. Taler G., Eliav U., Navon G. Detection and characterization of boric acid and borate ion binding to cytochrome using multiple quantum filtered NMR // *J. Magnetic Resonance*. 1999. V. 141. № 2. P. 228–238.

Boric Acid Resistance in *Drosophila melanogaster* Depends on the Expression Level of the *Cyp9b2* geneP. A. Milyaeva^a and L. N. Nefedova^{a, *}^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*^{*}*e-mail: lidia_nefedova@mail.ru*

Drosophila melanogaster is widely used as a model object in studies of molecular genetic mechanisms of response to effects of various xenobiotics, including insecticides. Boric acid is one of the most common insecticides, but the mechanisms of its effect on the insect organism have not been studied yet. Previously, the candidate gene *Cyp9b2* was identified in *D. melanogaster*, the mutant for which acquires sensitivity to boric acid. In this work, we investigated the role of a cluster of two highly homologous genes *Cyp9b1* and *Cyp9b2* in the resistance of *D. melanogaster* to boric acid. The level of basic transcription of the *Cyp9b2* gene is five times higher than that of the *Cyp9b1* gene, which correlates with in silico analysis demonstrating the different regulatory potential of 5'-regulatory regions of these genes. Resistance to boric acid depends dose-specifically on the level of transcription of the *Cyp9b2* gene, but not on the level of transcription of the *Cyp9b1* gene. Inactivation of the *Cyp9b1* gene does not affect the phenotype and does not affect the level of insecticide resistance.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, cytochrome, xenobiotics, boric acid.