

На правах рукописи

АФАНАСЬЕВА Кристина Петровна

МОЛЕКУЛЯРНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ СЛОЖНОГО ГЕНА  
*VESTIGIAL DROSOPHILA MELANOGASTER*

03.01.01– Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Научно-хозрасчетном подразделении  
«Отдел фазотрона»

Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Джелепова  
Объединённого института ядерных исследований, г. Дубна

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, главный научный  
сотрудник НХПОФ ЛЯП ОИЯИ Александров Игорь Донатович

**Официальные оппоненты:**

**Ким Александр Иннокентьевич** доктор биологических наук, профессор  
кафедры генетики биологического факультета МГУ имени  
М.В. Ломоносова;

**Михайлов Владимир Федорович** кандидат биологических наук, заведующий  
лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных  
эффектов ФНБУ ГНУ Федеральный медицинский биофизический  
центр им. А.И. Бурназяна.

**Ведущая организация:** ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН

Защита состоится «**19**» декабря 2013 года в **14:00** час. на заседании  
диссертационного совета Д 501.001.65 при МГУ имени М.В. Ломоносова по  
адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ,  
аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ  
имени М.В. Ломоносова по адресу: Ломоносовский проспект 27, 8 этаж, ком.  
812. Отзывы на автореферат просим отправлять по адресу: Веселовой Т.В.  
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр.  
12, Москва, 119991. Факс: +7(495)939-11-15 (2 экз. в бумажном варианте с  
печатью и подписью обязательно)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук

Веселова Т.В.

## Актуальность работы

Концептуальное для высших эукариот обобщение классической радиационной генетики и цитогенетики (Muller, 1954 а, б), о наличии в спектре наследуемых изменений гена 2 основных классов мутаций – «точковые» (внутригенные изменения) и абerrационные (делеционного и обменного типа) оставило нерешенным фундаментальный вопрос о их молекулярной природе.

Изучение этого вопроса стало возможным с появлением таких молекулярных методов, как блот-гибридизация по Саузерну, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование. В частности, на небольших выборках мутаций ряда генов *Drosophila* облученных в генеративных клетках  $\gamma$ -квантами и нейтронами и изученных названными методами был описан гетерогенный спектр молекулярных изменений от внутригенных делеций до замен отдельных пар оснований, лежащих в основе «точковых» мутаций (Pastink et al., 1988; 1990). О делеционной природе рентген-индуцированных мутаций отдельных генов свидетельствуют и данные для генеративных клеток *Mus Musculus* (Rinchick E.M. et al., 1986).

Близкие результаты были получены в последствии и на соматических клетках с использованием таких генов-репортеров, как HPRT (Anderson et al., 1993, Philips et al., 1997) и APRT (Fujimori et al., 1992).

В то же время работы по молекулярному анализу структуры гена у радиационно-индуцированных абerrационных мутантов обменного типа немногочисленны и свидетельствуют о возможности локализации разрыва внутри гена облученного в генеративных клетках *Drosophila* (Williams, et al., 1991, Александров, Александрова, 1994) и соматических клетках человека (Sugg S.L. et al., 1996).

Эти и другие имеющиеся в литературе данные по обсуждаемому вопросу получены на разных тест-системах, генах с разной экзон-интронной структурой и в сильно отличающихся по радиационным условиям экспериментах, что не дает общего представления о качественных и количественных закономерностях радиомутабельности гена на молекулярном уровне в случае его мутаций «точковой» и абerrационной природы. В этой связи важным и актуальным является системный подход, т.е. проведение исследований на одном гене-репортере, сравнительное изучение действия на него в одних и тех же условиях эксперимента различных по ЛПЭ видов излучений с целью выявления спектра всех возможных повреждений, их оценки и молекулярной характеристики.

Наиболее актуальным в настоящее время остается изучение радиомутабельности генов в генеративных клетках, поскольку радиационный мутагенез на молекулярном уровне в этих клетках является менее изученными, но при этом высоко значимым для оценки рисков действия радиации для последующих поколений. К тому же, возможность экстраполяции данных полученных на соматических клетках на генеративные остается не ясной в силу малочисленности соответствующих данных для генеративных клеток, принципиальных различий в организации хроматина, а так же различий в работе систем репарации, обуславливающих судьбу первичных радиационных повреждений у этих двух типов клеток.

Проведение такого рода масштабных исследований в относительно короткий период времени возможно лишь на немногих генетически хорошо изученных объектах, среди которых в первую очередь следует рассматривать *Drosophila melanogaster*. В качестве гена-репортера перспективным является использование гена *vestigial* (*vg*), как наиболее близкого по размерам и организации к генам млекопитающих, и в спектре радиационно-индуцированных изменений которого регулярно наблюдаются мутации обоих классов, частота индукции которых линейно зависит от дозы редко- и плотноионизирующего излучения (Александров и др., 2001).

### **Цели и задачи работы**

Целью работы является сравнительное изучение природы молекулярных изменений крупного гена *vestigial Drosophila melanogaster* у мутантов «точковой» и абберрационной природы, индуцированных разными дозами  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$ , моноэнергетических нейтронов ( $E_{\text{cp}}=0,85\text{МэВ}$ ) и их комбинированного воздействия, с оценкой спектра этих изменений и их распределения по карте гена.

Для достижение вышеназванной целей в работе были поставлены следующие задачи:

1. Систематизировать генетическую коллекцию спонтанных и радиационных мутантов по гену *vg* по таким параметрам, как «точковая» и абберрационная природа, вид излучения и доза.

2. Провести молекулярный анализ структуры гена *vg* методом ПЦР у спонтанных,  $\gamma$ -, нейтрон- и нейтроны+ $\gamma$ -индуцированных мутантов «точковой» и абберрационной природы.

3. Сравнить выявленные молекулярные изменения у «точковых» и абберрационных мутантов гена *vg*, оценить зависимость этих изменений от вида и дозы излучения и определить характер распределения молекулярных изменений на карте гена.

4. Изучить на молекулярном уровне генетические эффекты комбинированного действия нейтронов и  $\gamma$ -излучения по сравнению с эффектами этих видов радиации в отдельности.

5. Провести гетеродуплексный анализ и секвенирование не выявляемых методом ПЦР изменений ДНК 3-го и 4-го экзонов гена у «точковых» и абберрационных мутантов *vg* спонтанного и радиационного происхождения.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Качественная картина молекулярных изменений гена, выявляемая методом ПЦР, одинакова для двух изученных видов радиации, однако в индукции частичных делеций гена нейтроны более эффективны, чем  $\gamma$ -излучение.

2. Наличие кластеров повреждений на разных уровнях организации генома после действия обоих изученных видов радиации свидетельствует о гораздо более высокой степени пораженности генома клетки чем это следует из анализа традиционных радиобиологических эффектов (генные мутации, абберрации хромосом).

3. Потери ДНК варьирующей величины, наблюдаемые в области абберрационного разрыва при обменных перестройках хромосом ожидаемы в рамках современной теории структуры трека и моделей организации хроматина зрелых генеративных клеток.

4. Систематические замены оснований ДНК в облученном гене ведущие к повышению уровня однонуклеотидного полиморфизма (SNP) свидетельствуют о необходимости нового подхода к оценке риска радиации, основанного на анализе SNP.

#### **Научная новизна работы**

Впервые в одинаковых условиях эксперимента на одном гене сложной организации в зародышевых клетках выявлен спектр молекулярных повреждений после действия ионизирующих излучений с разной ЛПЭ.

Впервые показана кластерность повреждающего действия радиации на генетический аппарат зародышевой клетки, проявляющаяся в наличии

нескольких независимых мутационных повреждений разной сложности как у «точковых» мутантов так и у мутантов абберационной природы.

Впервые представлена схема механизма формирования аббераций обменного типа с делетированием последовательностей ДНК разной величины в области абберационного разрыва.

### **Апробация работы**

Материалы диссертационной работы были доложены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: «V съезд вавиловского общества генетиков и селекционеров» (Москва, 2009); Third International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution» (Alushta, 2010); «VI съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)» (Москва, 2010); X Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 50-летию со дня первого полета человека в Космос» (Москва, 2011); Российская научная конференция с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии» (Санкт-Петербург, 2011).

### **Структура и объем работы**

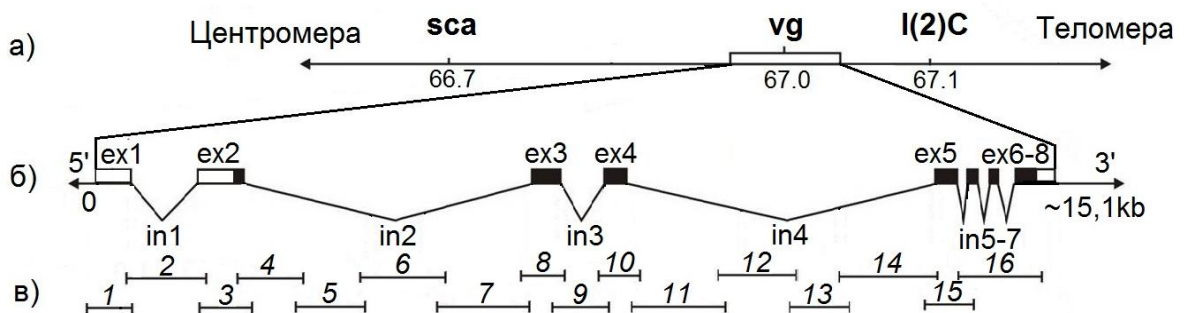
Диссертация изложена на 92 страницах, включает введения, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа иллюстрирована 10 рисунками и 7 таблицами. Список литературы насчитывает 121 источник, из них 22 отечественных и 99 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Рецессивный ген *vg* (15107 п.н., 8 экзонов, 7 интронов) локализован в секции 49E1 плеча политенной аутосомы 2R *Drosophila melanogaster* (рис. 1).

Случайные выборки из 8 мутантов *vg* спонтанного происхождения, полученных в контрольных скрещиваниях в период нестабильности дикой линии D32 (87-91гг) (Александров, Александрова, 1994), и 114 мутантов радиационно-индуцированной природы (среди них 60  $\gamma$ -, 27 нейтрон- и 27 нейтроны +  $\gamma$ -индуцированных, среди которых 5 получены от источника  $^{252}\text{Cf}$ ) были взяты для анализа из генетической коллекции радиационных мутантов *Drosophila melanogaster* в ОИЯИ (Дубна, Россия), которые были получены в ходе широкомасштабных радиационно-генетических экспериментов,

проводимых на протяжении 70-90 гг. прошлого столетия. Физические параметры экспериментов по воздействию  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  (установка «Gamma-cell-220»,  $N=5,7$  Гр/мин, дозы 5–60 Гр) и моноэнергетических нейтронов деления (реактор БР-10,  $E_{\text{ср}}=0.85$  МэВ,  $N=2,6$  Гр/мин, дозы 2.5–20 Гр) (Alexandrov, 1984) на зрелые спермии самцов дикой лабораторной линии *D32 D. melanogaster*, а также опытов по комбинированному действию нейтронов и  $\gamma$ -излучения (те же источники) при их равном вкладе в общую дозу 15–30 Гр (Александров, Александрова, 1989) и по воздействию смешанного  $\gamma$ -нейтронного излучения (источник  $^{252}\text{Cf}$ ,  $N=0,35$  Гр/мин, дозы 7-28 Гр) (Александров, 1987) детально описаны ранее. Условия получения новых спонтанных и радиационно-индуцированных мутаций гена  $vg^{+D32}$  в 5-локусном тесте, где интактные и облученные дикие самцы скрещивались с самками тестер-линии *KL* генотипа  $y\ sc^{s1}\ dl49\ sc^8\ w^a\ (M5);\ b^1\ cn^1\ vg^1$  так же описаны ранее (Александров и др., 2001).



**Рис. 1.** ген *vg*, (а): генетическая карта района гена *vestigial*; (б): схема экзонно-интронной структуры гена *vestigial* (15112 п.н.); (г): положение ампликонов изучаемых субрайонов гена.

На основании ранее проведенного цитогенетического анализа (Alexandrov, 2004) вся выборка мутантов была подразделена на 2 класса: «точковые», не имеющие цитологически выявляемых изменений в районе локализации гена на уровне хромосомы и мутанты, имеющие хромосомные перестройки различного рода с локализацией одного из разрывов в области гена *vg*. Класс с хромосомными перестройками был проанализирован и систематизирован по уже имеющимся данным генетического теста на комплементацию с проксимальным *sca* и дистальным *l(2)C* генами-маркерами (рис. 1), с определением генетических границ делеций по тем же генам-маркерам (Александров и др., 2001). Как было показано ранее, индукция мутаций обоих классов линейно зависит от дозы  $\gamma$ -

излучения, нейтронов и их комбинированного воздействия (Александров и др., 2001, Александров, Александрова, 1989). В этих же работах показано, что в индукции мутантов абerrационной природы нейтроны и комбинированное облучение нейтроны+ $\gamma$ -кванты более эффективны, чем  $\gamma$ -излучение, тогда как по тесту «точковые» мутации – картина обратная.

### **Выделение геномной ДНК**

Геномную ДНК выделяли из 20-25 имаго близкородственных лабораторных линий *D32*, (дикая аллель  $vg^{+32}$ ),  $vg^I$  из материнской линии *KL* и мутантов гомоили гемизигот  $vg^x/vg^{88c28}$  ( $vg^{88c28}$  является делецией *Df(2R)49D4-F6* (Alexandrov, 2004), 80 т.п.н., захватывающей весь ген *vg* и дистальный ген-маркер *l(2)C*), с использованием набора реагентов «Diatom® DNA Prep 100» («ISOGEN», Россия).

### **Полимеразная цепная реакция**

Учитывая значительный размер гена, для ПЦР-анализа вся его последовательность была подразделена на 16 перекрывающихся фрагментов варьирующей величины (381–1901 п.н.) (рис. 1), к которым были подобраны уникальные пары праймеров. Амплификацию фрагментов гена на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) проводили с помощью реагентов «GenPak® PCR Master» Mix Core» («ISOGEN», Россия) на геномной ДНК мутантов *vg*. Условия проведения ПЦР, предварительно оптимизированные по температуре отжига праймеров для каждого фрагмента, следующие: предварительная денатурация - 95°C, 5мин, 1 цикл; денатурация – 95°C, 1мин, отжиг праймеров – 54–64°C, 30с, синтез – 72°C, 1 мин, 30 циклов; окончательная достройка – 72°C, 7мин. Продукты реакции анализировали в 1%-ном агарозном геле в присутствии этидиум бромид (0,5 мкг/мл). Визуализацию проводили на трансиллюминаторе «Флускоп» (Россия) с последующим фотографированием. При интерпретации полученных данных полагали, что отсутствие одного фрагмента отражает наличие мутационного повреждения (микроделеция) в районе посадки прямого или обратного праймеров отсутствующего фрагмента, а отсутствие двух и более смежных фрагментов – наличие протяженной частичной делеции гена. Результаты таких реакций проверялись не менее трех раз. В случае мутантов с нормальной картиной всех изучаемых фрагментов гена полагали, что они имеют мелкие мутационные повреждения, не выявляемые этим методом. Достоверность различий в относительной частоте возникновения отдельных типов повреждений, выявляемых методом ПЦР для разных видов излучений,



оценивали с помощью критерия t-Стьюдента. Неслучайный характер распределения ПЦР-детектируемых мутационных повреждений на карте гена *vg* по сравнению с теоретически ожидаемым случайным оценивали с помощью критерия  $\chi$ -квадрат.

#### **Анализ гетеродуплексов**

Для выявления возможных изменений ДНК гена, не определяемых методом ПЦР, был проведен гетеродуплексный анализ ДНК экзонов 3 и 4 (фрагмент 8 и 10, соответственно) у 50 радиационных мутантов *vg* из той же изучаемой выборки с использованием метода конформационно-чувствительного гелевого электрофореза (CSGE) (Hill, 2005).

Формирование гетеродуплексов проводили в объеме 20 мкл с использованием продуктов ПЦР мутантного и контрольного генотипов в соотношении 2:1 в следующих условиях: денатурация - 98°C, 5 мин., образование гетеродуплекса - 65°C, 30 мин., с последующим охлаждением до комнатной температуры. Тонкий, 0,8 мм толщины гель, содержащий 10%-ный полиакриламид в соотношении 28:1 к бис-акриламиду, 10%-ный этиленгликоль, 15%-ный формамид с добавлением ПСА и ТЕМЕД для инициации полимеризации, готовили в 0,5×ТТЕ буфере (1×ТТЕ: 89 ммоль/л Трис, 28,5 ммоль/л таурин, 0,2 ммоль/л ЭДТА, pH 9.0). Префорез проводили в 0,5×ТТЕ буфере в течение 30 мин при 500V, форез - при 500V в течение 20 ч. на аппарате для секвенирования («Macrophor»). Окрашивание геля проводили методом серебрения.

#### **Секвенирование**

Секвенирование прямой и обратной нитей ДНК экзонов 3 и 4 гена *vg* у мутантов с выявленными в процессе гетеродуплексного анализа изменениями проводили в ФГБУН НИИ Физико-химической медицины ФМБА (г. Москва, Россия). Секвенирование этих фрагментов для каждого мутанта повторяли как минимум 3 раза. Программу [http://helixweb.nih.gov/emboss\\_lite/compare.html](http://helixweb.nih.gov/emboss_lite/compare.html) использовали для сравнительного анализа секвенированных последовательностей диких и мутантных аллелей гена *vg*.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **ПЦР-анализ спонтанных мутаций**

Перед анализом структуры гена *vg* у спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов был проведен ПЦР-анализ облучаемого аллеля *vg*<sup>+32</sup>

из лабораторной линии *D32* и аллеля *vg*<sup>1</sup> из материнской линии *KL*. Согласно полученным результатам, структура гена у обоих аллелей оказалась идентичной и ожидаемо нормальной, исключая фрагмент 9 (интрон 3), ПЦР-продукт которого отсутствовал у аллеля *vg*<sup>1</sup>. Это обусловлено стабильной инсерцией крупного мобильного элемента 412 (7,6 т.п.н.) именно в этот интрон (Lindsley and Zimm, 1990), вследствие чего, размер этого фрагмента возростал с 812 до 8412 п.н. и не мог быть амплифицирован в наших стандартных условиях реакции.

Согласно результатам ПЦР-анализа 8 спонтанных мутантов, у 1 из них не было выявлено никаких изменений структуры гена, тогда как у трех отсутствовал интрон 3 (фрагмент 9), у двух – экзон 2 (фрагмент 3) у двух остальных - экзон 3 (фрагмент 8) или экзоны 6–8 (фрагмент 16) соответственно.

Таким образом, анализ спонтанных мутантов показал наличие 2 типов повреждений: не выявляемые методом ПЦР (т.н. **ПЦР<sup>+</sup>-мутанты**) и обуславливающие отсутствие одного из изученных фрагментов гена (**«односайтовые» мутанты**).

#### **ПЦР-анализ радиационно-индуцированных «точковых» мутантов гена *vg D. melanogaster***

Согласно суммарным данным ПЦР-анализа 62 «точковых» мутантов гена *vg*, индуцированных изученными в работе видами радиационного воздействия, мутационные изменения, лежащие в основе их повреждения можно подразделить на четыре разных типа (рис. 2а): 1) **ПЦР<sup>+</sup>-мутанты**, 2) **«односайтовые» мутанты**, 3) внутригенные делеции с отсутствием от двух до девяти смежных фрагментов гена (**«многосайтовые» делеционные мутанты**) и 4) мутанты с кластерами из 2–3 независимых повреждений «односайтового» и/или «многосайтового» типа в их разных сочетаниях, разделенных между собой ПЦР-нормальными участками гена (**кластерные мутанты**).

Важно отметить, что 3-ий и 4-ый типы мутантов не характерны для спонтанных, следовательно, их можно рассматривать как молекулярные маркеры действия радиации на ген.

Анализ относительной частоты мутантов каждого типа отдельно для 3 видов лучевого воздействия (рис. 2а) показывает, что доля ПЦР<sup>+</sup>-мутантов среди всех остальных типов наиболее высока для  $\gamma$ -квантов (16 случаев из 35 или 45,7%) и комбинированного воздействия (8 из 13 или 61,5%), что почти в 3 раза выше, чем для нейтронов (2 из 14 мутантов или 14,3%). Мутанты «односайтового» типа

повреждения преобладают, напротив, после действия нейтронов (6 из 14 или 42,9%), их уровень несколько ниже после  $\gamma$ -квантов (13 из 35 или 37,1%), и является наименьшим после комбинированного воздействия (2 из 13 или 15,4%). Частота мутантов с «многосайтовыми» делециями после всех изученных в работе видов лучевого воздействия близка и составляет в среднем 14,7%. При этом, различий в вариабельности размеров и положении на карте гена «многосайтовых» делеций для всех трех видов облучения не установлено. Доля кластерных мутантов минимальна для  $\gamma$ -квантов (1 из 35 или 2,9%), в отличие от нейтронов, где их доля в 9 раз выше (4 из 14 или 28,5%). После комбинированного облучения частота таких мутантов является промежуточной (1 из 13 или 7,7%).

Важно отметить, что зависимость спектра от дозы наблюдается лишь в случае  $\gamma$ -излучения, где мутанты с 3-м и 4-м типами повреждения наблюдаются лишь при дозе 40 Гр и они отсутствуют в изученном диапазоне 5-20 Гр.

#### **ПЦР-анализ радиационных мутантов *vg* с хромосомными обменами**

ПЦР-анализ гена *vg* у 37 мутантов с инверсией (In), 14 с транслокациями (Т) и 1 с транспозицией (Тр) (всего 52 с обменами) показал, что 4 (2 In и 2 Т) из них являются мутантами с полной потерей изучаемого гена. Более того, согласно данным генетического анализа, у 4-х из них отсутствует дистальный маркер *l(2)C*, а у трех – дополнительно и проксимальный маркер *sca*. Следовательно, эти мутанты являются мультилокусными делециями сочетающимися с абберационным обменом.

Результаты ПЦР-анализа оставшихся 48 абберационных мутантов показали наличие тех же 4 типов повреждений гена, что и у «точковых» (рис. 2б).

При этом, частоты мутанов 1-го типа для всех трех видов облучений близко совпадают с таковыми у класса «точковых» мутантов, а именно: преобладают в выборках  $\gamma$ - и нейтроны+ $\gamma$ -индуцированных мутантов (50 и 61,5% соответственно), и являются наименьшим для нейтронов (27,3%). В индукции «односайтовых» мутантов нейтроны в 2 раза более эффективны, чем  $\gamma$ -кванты и комбинированное облучение (45,5; 20,8 и 23,1% соответственно). Эффективность  $\gamma$ -квантов в индукции мутантов 3-го типа («многосайтовые» делеции) близка к таковой для «точковых» мутантов и составляет 16,7%, и выше в 2 раза чем для нейтронов и комбинированного воздействия (9,1 и 7,7% соответственно). Как показывает анализ данных, размеры таких внутригенных делеций варьируют от двух до шести смежных фрагментов. Относительная

частота индукции кластерных мутантов (4-й тип) нейтронами и  $\gamma$ -квантами у абберрационных мутантов ниже таковой для «точковых» после тех же видов облучения и составляет 18,2 и 12,5% соответственно, тогда как у кластерных мутантов абберрационной и «точковой» природы после комбинированного облучения эта частота совпадает и составляет 7,7%.

Важно отметить, что все 4 типа повреждений у абберрационных мутантов наблюдаются при всех дозах и видах облучения, что показывает отсутствие какой-либо дозовой зависимости в их индукции изученными в работе видами радиации. Этим отличается данный класс мутантов от «точковых», где наблюдалась зависимость спектра от дозы в случае  $\gamma$ -излучения.

Факт обнаружения значительной части абберрационных мутантов с ПЦР<sup>+</sup>-картиной (23 из 48 или 47,9% суммарно для трех видов облучения) свидетельствует о том, что во всех этих случаях абберрационный разрыв локализуется вне гена, поскольку в противном случае ген был бы разорван и разобщен обменом, и места внутригенного разрыва детектировались бы методом ПЦР как изменения 2-го или 3-го типов. Локализацию разрыва вне гена у 7 таких мутантов подтверждают и независимые результаты экспериментов по гибридизации *in situ* (Александров, Александрова, 1994).

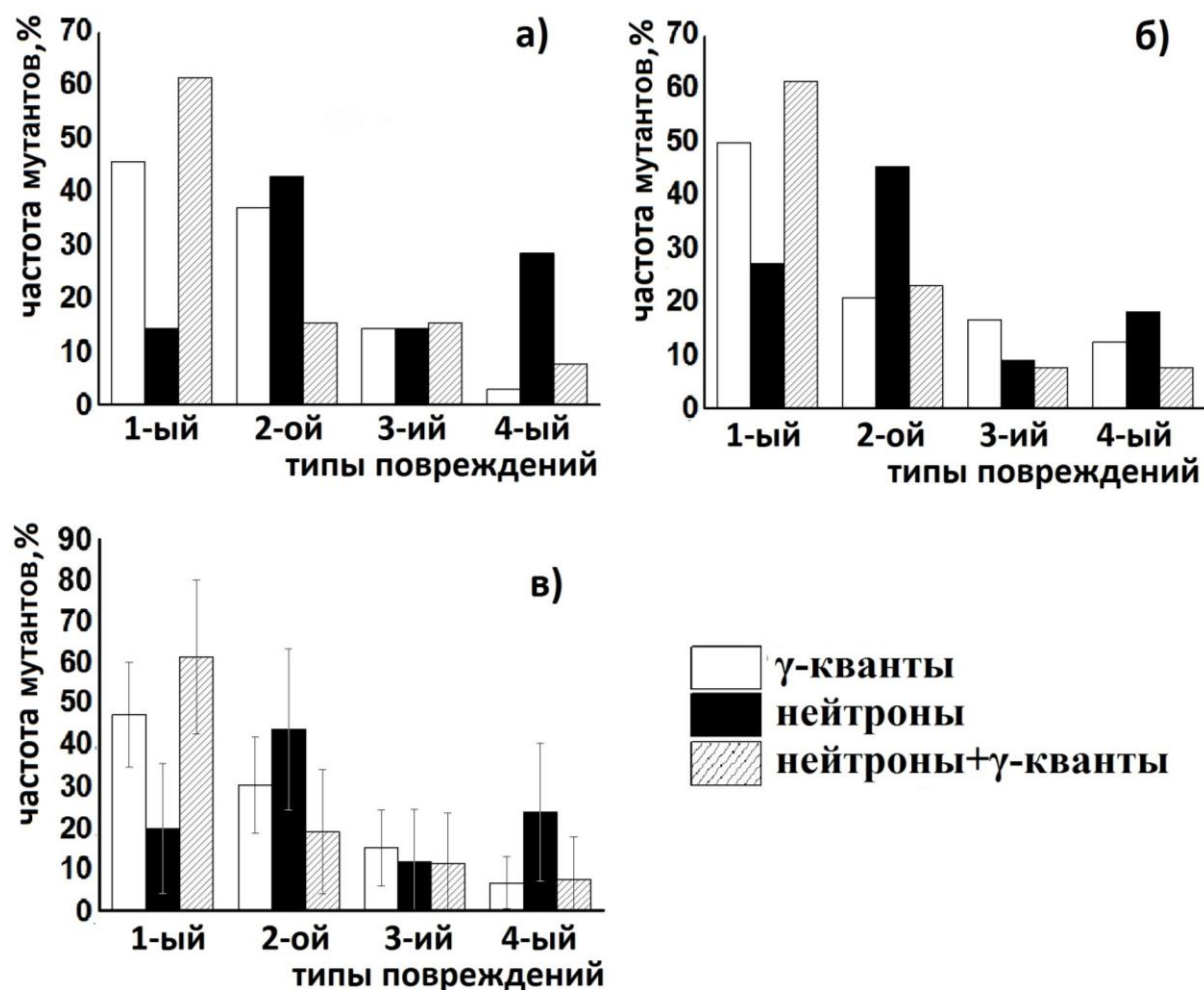
Сопоставление результатов вышеназванной работы по локализации разрыва внутри гена у шести мутантов с полученными нами результатами ПЦР-анализа этих же мутантов о наличии у них «односайтовых» или «многосайтовых» повреждений может свидетельствовать о том, что процесс формирования абберрационного разрыва-соединения сопровождается потерями ДНК гена в области разрыва, которые могут варьировать от сотен п.н. (отсутствие одного фрагмента) до 5-6 т.п.н. («многосайтовая» делеция), независимо от характера обмена и вида радиации. У остальных мутантов с ПЦР-детектируемыми изменениями того или иного типа локализация абберрационных разрывов относительно гена *vg* остается пока неясной и требует проведения дополнительных исследований.

### **Сравнительный анализ действия трех видов облучения на молекулярном уровне**

Установленное сходство в спектре и частотах мутантов с разными мутационными ПЦР-выявляемыми повреждениями позволяет объединить выборки абберрационных и «точковых» мутантов для каждого вида облучения и

оценить эффективность изученных в работе видов облучения в их индукции (рис. 2в).

Как показывает анализ, у  $\gamma$ - и нейтроны+ $\gamma$ -индуцированных мутантов картина распределения 4 типов повреждений близка, и в ней доля ПЦР<sup>+</sup>-мутантов в среднем (около 52%) достоверно выше, чем у нейтрон-индуцированных (20%) ( $p < 0,01$ ).



**Рис. 2.** Относительная частота мутантов  $\nu g$  с мутационными повреждениями 4 разных типов детектируемых методом ПЦР для изученных в работе видов излучений: а) мутанты «точковой» природы; б) мутанты аберрационной природы; в) сумма двух выборок.

В тоже время у нейтрон-индуцированных мутантов преобладающим типом являются «односайтовые», и частота их возникновения выше чем у  $\gamma$ - и нейтроны+ $\gamma$ -индуцированных. Остальные 3 типа мутационных повреждений у нейтрон-индуцированных мутантов встречаются с приблизительно одинаковой

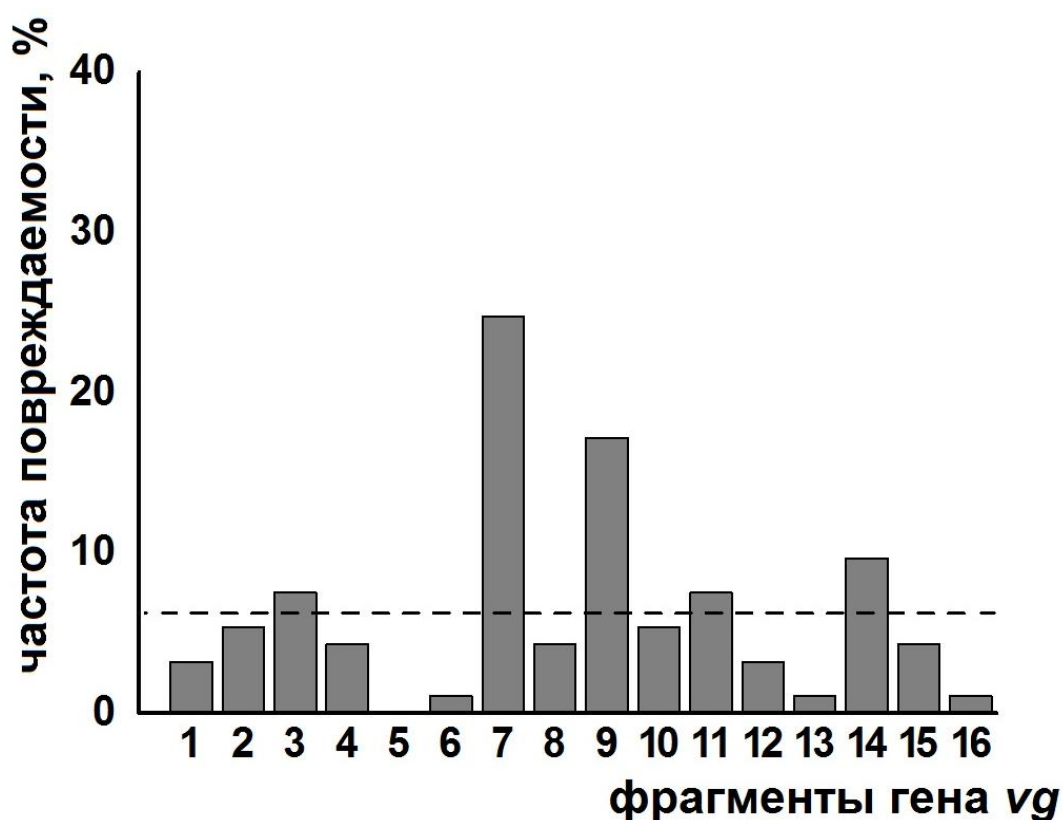
частотой. Однако, доля кластерных мутантов после действия нейтронов более чем в 3 раза выше таковой для двух других видов облучения.

Таким образом, если распределение относительных частот мутантов по типу повреждения после комбинированного облучения близко к таковому после  $\gamma$ -квантов, то отсутствие у них зависимости спектра от дозы облучения (наличие мутантов 3-го и 4-го типов при всех изученных дозах) аналогично таковому для нейтронов. Это позволяет предполагать вклад в молекулярно-генетические эффекты комбинированного облучения как  $\gamma$ -излучения, так и нейтронов.

### **Распределение на карте гена *vg* ПЦР-выявляемых повреждений**

Близкая ПЦР-картина распределения по 4 типам мутационных повреждений у мутантов «точковой» и абберационной природы позволяет оценить частоту повреждаемости каждого изученного фрагмента гена (рис. 3).

Сравнительный анализ распределения среди 16 изученных фрагментов «односайтовых» повреждений и 5'- и 3'-концов «многосайтовых» делеций (93 независимых случая в целом для хромосомных и «точковых» мутантов)



**Рис. 3.** Распределение на карте гена *vg* выявляемых методом ПЦР «односайтовых» повреждений и концов «многосайтовых» делеций.

показывает их частое совпадение на карте гена для всех видов радиации, что позволяет оценить относительную частоту повреждаемости каждого фрагмента в отдельности для всех трех видов облучения. В таком случае распределение относительных частот мутационных изменений на карте гена *vg* оказывается далеко неравномерным и достоверно отличается от теоретически ожидаемого случайного ( $\chi^2=133.22$ ,  $P<0.001$ ). Эта неравномерность обусловлена, главным образом, наиболее частым повреждением 3'-конца интрона 2 и района интрона 3 (фрагменты 7 и 9 соответственно), которые могут представлять собой "горячие" участки среди всех изученных для данного гена.

Высокая частота повреждаемости 9го фрагмента (интрон 3) наблюдается за счет большего вклада типа «односайтовых» делеций у  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных мутантов «точковой» природы (10 случаев среди 19 мутантов или 52,6%). Близкая же картина наблюдается у 3 спонтанных мутантов из 7 имеющих «односайтовые» делеции (42,9%).

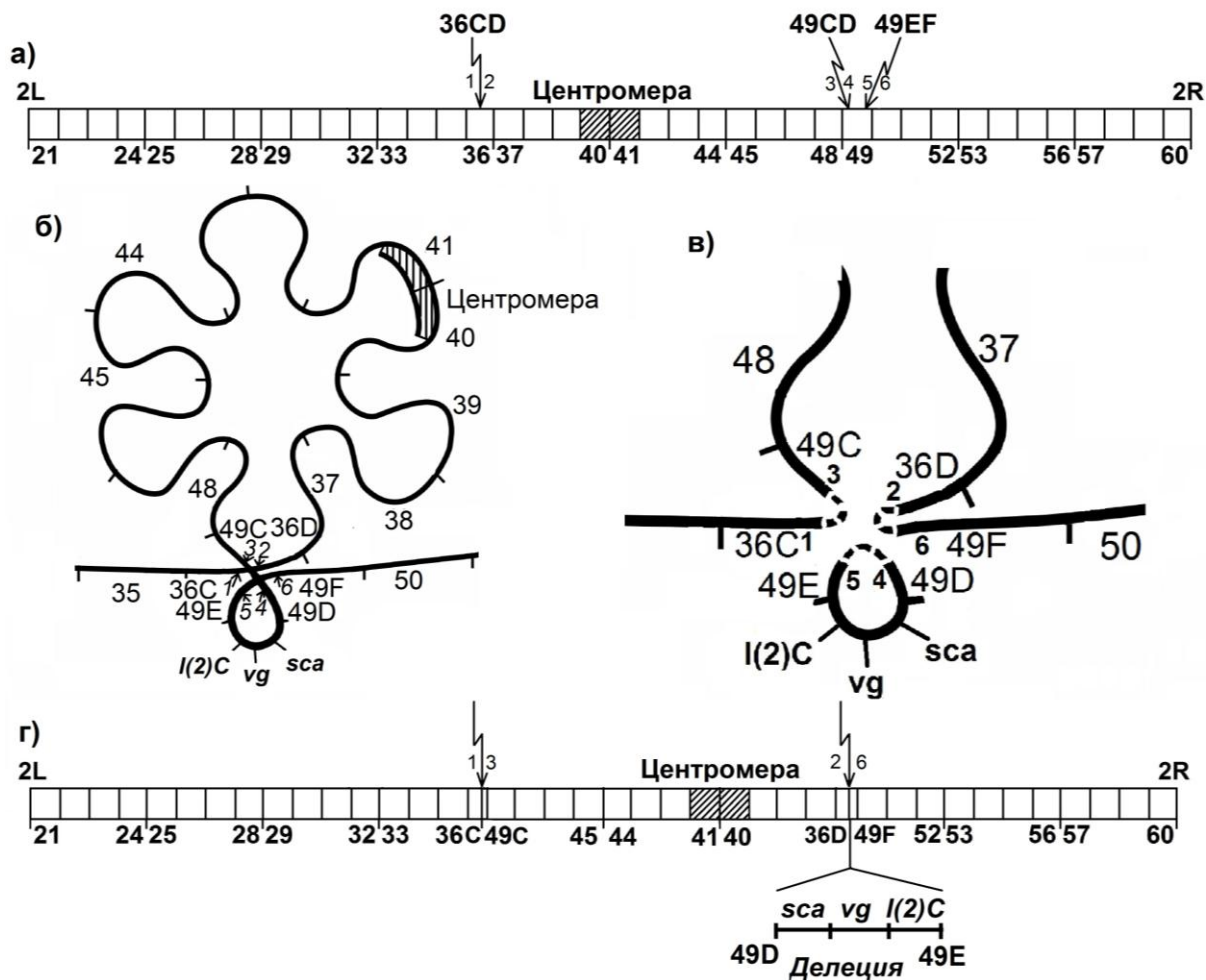
Поскольку, аналогичная ПЦР-картина характерна и для тестер-аллеля *vg*<sup>1</sup>, возникает вопрос: не являются ли названные спонтанные и радиационные мутанты фактически аллелью *vg*<sup>1</sup>? Результаты экспериментальной проверки этого предположения представлены в разделе секвенирования.

### **Сочетание хромосомного обмена с делецией в области абберационного разрыва**

Как было показано выше, абберационный разрыв может быть локализованн внутри гена и сопровождаться, как нами устновлено методом ПЦР, односайтовыми или многосайтовыми делециями, размеры которых т.о. может варьировать от сотен п.н. до 5-6 т.п.н.

Наряду с небольшими внутригенными делециями, сопутствующими абберационному разрыву-соединению, методом комплементационного анализа установлены более крупные потери генетического материала в области хромосомного разрыва у 4 мутантов, где наряду с делецией всего гена *vg* наблюдается и генетически определяемая потеря фланговых генов-маркеров (проксимального *sca* у первых трех и дистального *l(2)C* у всех четырех мутантов), что позволяет определить размеры этих протяженных не только на молекулярной но и на генетической карте делеций в пределах не менее 200 т.п.н. ДНК.

Эти результаты свидетельствуют о том, что формирование хромосомных обменов сопровождается делециями разной величины в области одного из



**Рис. 4.** Молекулярная модель образования комплексных обменно-делеционных aberrаций на примере нейтрон-индуцированного инверсионного мутанта *vg* с разрывами в подсекциях 36CD, 49EF и делеции с разрывами в подсекциях 49CD и 49EF: а) схема политенной аутосомы 2 с локализацией в соответствующих подсекциях концов потенциальных aberrационных разрывов; б) схема топологического контакта («топологический узел») соответствующих подсекций с предаберрационными повреждениями ДНК, формирующих основания макро- и микропетель – предшественников инверсии и делеции; в) «топологический узел» (в увеличенном масштабе) с шестью концами от трех двунитевых разрывов и схема негомологичных соединений этих концов, ведущих к образованию инверсии и делеции; г) схема структурно перестроенной аутосомы 2 с наблюдаемыми в опыте перичентрической инверсией и интерстициальной делецией с генами *sca-vg-I(2)C*. Для простоты и наглядности двухцепочечная ДНК на б) и в) изображена в виде одной нити.



разрывов-соединений локализованных в районе гена *vg*. Существование подобного явления может быть обусловлено сложной структурой трека, наложенной на не менее сложную многоуровневую 3Д-укладку хроматина в спермии. Схема одного из возможных рекомбинационных механизмов образования в зиготе после сингамии хромосомных перестроек, сопровождаемых крупными делециями, нами предложена на рис. 4. В основу модели положены представления о тороидально-петлевом принципе организации хроматина и компактной укладки этих петель в ядре зрелых спермиев животных (Alexandrov et al., 2009; Ward 2010), позволяющих формировать «топологические узлы», а так же представления о сложной структуре трека, включающей его кор и «шубу» из  $\delta$ -электронов (Goodhead, 2006). Прохождение коровой части трека через топологический узел с большим энерговыделением, с образованием кластеров двунитевых разрывов создает предпосылки для процессов репарации, основанных на межнитевой рекомбинации. В результате негомологичной рекомбинации возможен процесс образования аберрационного обмена и сопутствующей делеции мини-петли.

#### **Анализ методом секвенирования 3-го и 4-го экзонов гена *vg***

Общая ПЦР-картина у спонтанных, радиационных мутантов и аллеля *vg*<sup>1</sup> из *KL* не даёт еще оснований говорить о единой генетической природе всех этих аллелей. Для выявления дополнительных молекулярных маркеров в районах гена, смежных интрон 3 (экзоны 3 и 4), было проведено секвенирование этих экзонов у всех названных аллелей. Как показывают результаты секвенирования (табл.1) молекулярные маркеры выявленные у *vg*<sup>1</sup> наблюдаются у всех изученных трех спонтанных и четырех радиационно-индуцированных мутантов, у которых методом ПЦР так же, как и у аллеля *vg*<sup>1</sup> было установлено отсутствие интрона 3.

Таким образом, учитывая наличие 5 молекулярных маркеров в этом районе гена (около 1600 п.н.) у *vg*<sup>1</sup>, вслед за ПЦР было проведено секвенирование этих экзонов у 3 спонтанных и 4 радиационно-индуцированных мутантов (табл. 1).

Следовательно, изученные мутанты имеют район гена, включающий экзон 3, интрон 3 и экзон 4 (включающий около 1600п.н.) идентичны аллелю *vg*<sup>1</sup>.

Согласно полученным результатам, выявленные независимые дополнительные маркеры в этих 2 экзонах подтвердили, что все эти проанализированные мутанты имеют этот район из аллеля *vg*<sup>1</sup>.

Эти результаты свидетельствуют о факте переноса генетической информации аллеля  $vg^1$  на аллель  $vg^{+32}$  в основе механизма которого, можно полагать, лежит межаллельная рекомбинация по типу **генной конверсии** в зиготе после объединения удвоенных интактного материнского и облученного отцовского геномов.

**Табл. 1.** Результаты секвенирования экзонов 3 и 4 гена  $vg$  у аллеля  $vg^1$ , спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов  $vg$  «точковой» природы с отсутствием интрона 3.

мутант	вид облучения, доза (Гр)	секвенирование ex3	ПЦР in 3	секвенирование ex4
KL		A2007G*, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vgS2	спонтанное	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vgS10	спонтанное	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vgS11	спонтанное	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vg87e140	$\gamma$ , 20	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vg79b1	$\gamma$ , 40	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vg88c87b	n, 2,5	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T
vg88c96	n, 2,5	A2007G, T2331C	Отриц.	A2514C, C2520T

\* - положение оснований по экзонной карте

### **Гетеродуплексный анализ и секвенирование экзонов 3 и 4 радиационных мутантов гена $vg$**

Учитывая высокую частоту ПЦР<sup>+</sup>-мутантов среди «точковых» и абберационных классов, представляет интерес выяснить, какие молекулярные изменения могут лежать в основе не детектируемые методом ПЦР повреждений.

Так же наличие кластерного типа повреждений у целого ряда мутантов обоих классов позволяет предполагать и наличие дополнительных молекулярных изменений на уровне отдельных оснований, сопутствующих повреждениям, выявляемым цитологически, генетически и методом ПЦР.

Для решения этих вопросов был проведен гетеродуплексный анализ 3 и 4 экзонов у случайной выборки из 26 «точковых» и 20 абберационных мутантов с разными типами повреждений, выявляемых методом ПЦР.

Согласно полученным результатам у 9 ПЦР<sup>+</sup>-мутантов из 26 всех изученных «точковых» было показано наличие гетеродуплексов, в основе которых лежат, как выявило секвенирование, однонуклеотидные замены, делеции 7-11 и инсерция 2 п.н. в разных положениях (табл. 2). При этом у 4 из них и одного с многосайтовой делецией, которые индуцированы разными изученными видами лучевого воздействия в экзонах обнаружено несколько независимых изменений, что позволяет их рассматривать как мутантов кластерного типа. Эти результаты расширяют наши представления о кластерном характере действия ионизирующих излучений разного вида на молекулярном уровне.

У 20 аберрационных мутантов методом гетеродуплекса не было выявлено никаких молекулярных изменений в 3 и 4 экзонах.

**Табл. 2.** Результаты секвенирования экзонов 3 и 4 гена *vg* у мутантов «точковой» природы

№	мутантная линия	вид облучения, доза (Гр)	картина ПЦР	секвенирование ex3	секвенирование ex4
1	vg87e80	γ, 10	ПЦР <sup>+</sup>		2616del11
2	vg67d2	γ, 40	«многосайтовая» делеция	A2007G	A2513C, A2582T
3	vg77a4	γ, 40	ПЦР <sup>+</sup>	1971del5	
4	vg83b24	γ, 40	ПЦР <sup>+</sup>		C2637A, A2638G, 639del11
5	vg83c24	γ, 40	ПЦР <sup>+</sup>	2111del11	
6	vg83c42	γ, 40	ПЦР <sup>+</sup>		2590del7
7	vg83i1	n, 10	ПЦР <sup>+</sup>	A2009G	A2513C, A2582T
8	vg88g104	n+γ, 15	ПЦР <sup>+</sup>	A2007G, T2331C	
9	vg88g40	n+γ, 15	ПЦР <sup>+</sup>	A2007G	
10	vg88f66	n+γ, 20	ПЦР <sup>+</sup>		2437insTA, C2438T, C2439T, C2442T, G2444C

### Кластерный характер действия радиации на геном.

Если проанализировать всех аберрационных мутантов на предмет наличия кластеров на уровне гена, определяемого методом ПЦР, а так же на уровне района гена и хромосомы в целом (с привлечение литературных данных гибридизации *in situ*, генетического и цитологического анализов), то из 48 мутантов, 34 имеют кластер повреждений на том или ином уровне организации генома, что составляет 70,8% общей выборки аберрационных мутантов (табл.3).

**Табл. 3.** Анализ выборки мутантов аберрационной природы на предмет выявления кластеров на разных уровнях организации генома.

Выборка, проанализированная на предмет кластеров	Разрыв вне гена			Разрыв внутри гена	Локализация разрыва неясна	Сумма мутантов с кластерами
	ПЦР <sup>+</sup>	1-4-ый тип ПЦР-повр.	1-4-ый тип ПЦР-повр и отсутствие <i>sca</i> или <i>l(2)C</i> гена	4-ый тип ПЦР-повр.	4-ый тип ПЦР-повр.	
48	23	4	2	2	3	34 (70,8%)

Сопоставление этих результатов с данными для мутантов «точковой» природы показывает, что 6 из 62 (9,7%) имеют кластеры, выявляемые методом ПЦР. А у 5 других из 27 (18,5%) с изученными методом секвенирования 3-м и 4-м экзонами имеются кластеры в виде замен, делеций и инсерций на уровне оснований ДНК. Т.о. секвенирование позволяет выявить дополнительные молекулярные кластеры, которые возникают по-видимому с большей частотой.

Установленные нами особенности природы кластеров для мутантов «точковой» и аберрационной природы могут быть объяснены в рамках современных представлений о структуре трека ионизирующей частицы. В частности, аберрационные мутанты с дополнительными повреждениями на молекулярном (ДНК гена) и генетическом (поведение смежных генов-маркеров) уровнях возникают, по-видимому, в результате прохождения в этом районе коровой части трека и сопутствующего действия вторичных частиц в виде дельта-электронов, определяющих дополнительные эффекты на разных уровнях

генома. В случае «точковых» мутантов, их изменения похожи на результат действия отдельно долетающих менее плотноионизирующих частиц шубы  $\delta$ -электронов.

Таким образом, анализ структуры гена *vg* (включая все его экзоны и интроны) у радиационно-индуцированных мутантов «точковой» и аберрационной природы методом ПЦР выявил наличие 4 типов мутационных изменений (ПЦР<sup>+</sup>, «односайтовые», «многосайтовые», кластерные), соотношение которых определяется дозой и качеством радиации. Распределение «односайтовых» повреждений и концов «многосайтовых» делеций на карте гена является неравномерным с наиболее частым повреждением определенных районов двух интронов гена. Новым и важным является обнаружение методом ПЦР нескольких независимых повреждений (кластер) в пределах гена после действия как редко- так и плотно-ионизирующих видов излучений, изученных в работе. Методы гетеродуплексного анализа и секвенирования выявили в изученных экзонах дополнительно молекулярные изменения у мутантов «точковой» природы в виде замен оснований, делеций и инсерций в несколько пар оснований, что расширяет количество мутантов с кластером независимых повреждений в пределах гена. Привлечение литературных данных по генетическому и цитологическому анализам для некоторых изученных в работе мутантов аберрационной природы показало наличие кластеров на генетическом и хромосомном уровнях. Одновременно результаты секвенирования смежных отсутствующему интрону районов гена у «односайтовых» мутантов позволило установить в этом районе процесс генной конверсии, как механизм репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК гена, наблюдаемый и у спонтанных мутантов в условиях нестабильности генома. Так же было обнаружено, что аберрации обменного типа сопровождаются в области разрыва потерей части ДНК варьирующей величины (от нескольких сотен до 200 т.п.н.).

## ВЫВОДЫ

1. Генетическая коллекция из 121 спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов *vestigial Drosophila melanogaster* систематизирована по цитогенетической природе (62 «точковой», 52 абберационной), виду и дозе радиации.

2. ПЦР-анализ структуры гена *vg* у изученных в работе мутантов выявил 4 типа молекулярных повреждений (ПЦР<sup>+</sup>, «односайтовые», «многосайтовые», кластерные).

3. У радиационных мутантов «точковой» и абберационной природы после трех испытанных видов облучения выявлены все типы повреждений, у спонтанных мутантов – два типа (ПЦР<sup>+</sup> и «односайтовые»). Установлена зависимость спектра повреждений от дозы только для  $\gamma$ -излучения у «точковых» мутантов, для всех остальных изученных в работе выборок мутантов дозовых зависимостей не установлено. Распределение односайтовых повреждений и концов многосайтовых делеций на карте гена является не случайным, с их локализацией преимущественно в 3'-конец интрона 2 и интроне 3.

4. Спектр ПЦР-детектируемых мутационных повреждений после комбинированного нейтроны+ $\gamma$ -облучения качественно идентичен таковому для двух видов радиации в отдельности, а соотношение в нем разных типов повреждений близко к наблюдаемому для  $\gamma$ -излучения.

5. Гетеродуплексный анализ ДНК и секвенирование ПЦР<sup>+</sup>-фрагментов гена *vg* выявили молекулярные изменения в виде замен оснований, небольших делеций и инсерций.

6. Комплексный молекулярный, генетический и цитологический анализ радиационных мутантов *vg* позволил установить кластерный характер действия изученных в работе видов радиации на молекулярном, генетическом и хромосомном уровнях организации генома.

7. Установлен факт межallelная рекомбинация с переноса части материнского аллеля *vg*<sup>1</sup> в отцовский ген *vg*<sup>+32</sup> у некоторых спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов.

8. Комплексный молекулярно-генетический анализ радиационно-индуцированных мутантов *vg* абберационной природы выявил потери ДНК сопутствующие абберационному разрыву-соединению, варьирующей величины на молекулярном и генетическом уровнях.

## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### **Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ:**

- 1) Александров И.Д., Афанасьева К.П., Александрова М.В., Лapidус И.Л. Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 1. ген *vestigial*: молекулярная характеристика «точковых» мутаций // Журнал «Радиационная биология. Радиоэкология», 2012, том 52, № 3, с. 234–246.
- 2) Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д., Кораблинова С.В. Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 2. ген *vestigial*: молекулярная характеристика абберационных мутантов // Журнал «Радиационная биология. Радиоэкология», 2012, том 52, № 4, с. 349–362.

### **Материалы в сборниках трудов конференций:**

- 3) Afanasyeva K., Alexandrova M., Alexandrov I. Molecular radiobiology of the animals genes: from N.W. Timofeeff-Ressovsky to the present day // abstracts of Third International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution» JINR, Dubna, 2010, p.182-184.
- 4) Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д. Изменения ДНК, выявляемые методом ПЦР, у спонтанных и  $\gamma$ -индуцированных мутантов по гену *vestigial* у *Drosophila melanogaster* // тезисы докладов «VI съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)», Издат. «РУДН», Москва, 2010 г., том 2, с.53.
- 5) Афанасьева К.П., Намолован Л.Н., Александрова М.В. Сравнительная эффективность  $\gamma$ -квантов, нейтронов и ионов  $^{12}\text{C}$  в индукции наследуемых мутаций генов разной величины и экзон-интронной организации у *D. melanogaster*// тезисы докладов «X Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 50-летию со дня первого полета человека в космос», Москва, 19 апреля 2011г., с.13.
- 6) Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д. Характеристика молекулярного спектра наследуемых мутаций сложного гена *vestigial* *Drosophila melanogaster* вызываемых реакторными нейтронами и фотонами  $^{60}\text{Co}$  // тезисы докладов Российской 25 научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии», Санкт-Петербург, 19-20 мая 2011 г., с.123-124.