

Отчет по проекту

“Молекулярная генетика радиационно-индуцированных изменений гена, генома и транскриптома *Drosophila melanogaster*”

ПРОЕКТ РАДИОГЕН

2020-2022гг.

Целями названного проекта являлись:

1. Изучение молекулярной природы структурных изменений ДНК гена после действия γ -излучения и нейтронов;
2. Проведение обще-геномного анализа радиационно-индуцированных изменений ДНК у потомков первого поколения от γ -облученных (10 и 40 Гр) самцов *D. melanogaster*;
3. Изучение транскриптома у линий *D. melanogaster*, отличающихся по радиочувствительности.

1. Молекулярно-генетические исследования, запланированные для достижения первой цели Проекта, выполнены полностью.

Был проведен отбор 15 мутантов у которых отсутствовал ПЦР-продукт того или иного фрагмента из 16 изучаемых в гене *vestigial* (табл. 1).

Таблица 1. Положение ПЦР-отсутствующих фрагментов, обусловленных делециями (■), инсерциями (■) или инверсиями (■), среди 16, на которые подразделен ген *vestigial D. melanogaster*.

№	код мутации	происхождение, доза, Гр	Фрагменты гена <i>vestigial</i> и их размеры															
			1 983 п.н.	2 1138 п.н.	3 776 п.н.	4 1033 п.н.	5 923 п.н.	6 751 п.н.	7 1901 п.н.	8 471 п.н.	9 812 п.н.	10 381 п.н.	11 1573 п.н.	12 1183 п.н.	13 1150 п.н.	14 1740 п.н.	15 670 п.н.	16 783 п.н.
1	vg88c42	n, 2,5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	vg83l3b	n, 10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	vg88b32	n, 5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	vg88c45	n, 10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	vg88c62	n, 10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	vg81k1	γ , 10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	vg88c1	n, 10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	vg83c45	γ , 40	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	vg88c64	n, 2,5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	vg87e140	γ , 20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
11	vg79b1	γ , 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
12	vg88c87b	n, 2,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
13	vg88c96	n, 2,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	vg83c5	γ , 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
15	vg87g43	γ , 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Природа мутационных изменений ДНК, определяющих отсутствие того или иного фрагмента гена, изучена методами ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Согласно полученным результатам, 6 мутантов имели делеции разной величины в районе отжига прямого или обратного праймеров (vg88c42, vg88b32, vg88c45, vg81k1, vg88c1, vg83c5), 5 имели крупные инсерции мобильного элемента 412 внутри гена (vg83l3b, vg87e140, vg79b1, vg88c87b, vg88c96) а 4 были обусловлены инверсиями с одним из двух разрывов внутри гена (vg88c62, vg83c45, vg88c64, vg87g43).

Таким образом, выявляемое при молекулярном анализе отсутствие ПЦР-продукта может быть обусловлено разными генетическими событиями, связанными как с действием γ -излучения (делеции, инверсии), так и с инсерциями мобильного элемента, произошедшими в незрелых зародышевых клетках самца до облучения.

В дальнейших работах по этому направлению планируется изучить контекст ДНК, фланкирующей крупные делеции внутри гена (отсутствие двух и более смежных ПЦР-продуктов).

2. Запланированные для достижения второй цели Проекта геномные исследования выполнены далеко не в полном объеме в следствие недофинансирования. Выполнены следующие этапы работы: 1) В процессе межлинейных скрещиваний получено несколько изогенных линий *D. melanogaster*. Среди них по результатам скрещиваний брат x сестра была отобрана наиболее жизнеспособная и плодовитая линия для проведения работ по геномному секвенированию. Самцы этой изогенной линии были облучены γ -квантами ^{60}Co в дозе 40 Гр и сразу скрещены с самками той же линии для получения потомства первого поколения. 2) На следующем этапе работы проведено выделение геномной ДНК из индивидуальных самок-потомков первого поколения, используя адаптированный нами без фенольный метод. 3) На следующем этапе работы проведено полногеномное секвенирование геномной ДНК на платформе Illumina. 4) После секвенирования проведен биоинформационный анализ полученного материала используя пакеты соответствующих программ для выявления крупных структурных изменений ДНК. Согласно результатам этого анализа, значительное количество (44,8%) изменений среди всех выявленных представляли собой сложные для сборки участки, изменения в которых пока не идентифицируются, но, по-видимому, не случайные, поскольку наблюдается корреляция их частоты с количеством достоверных изменений у большинства изученных геномов (рис. 1).

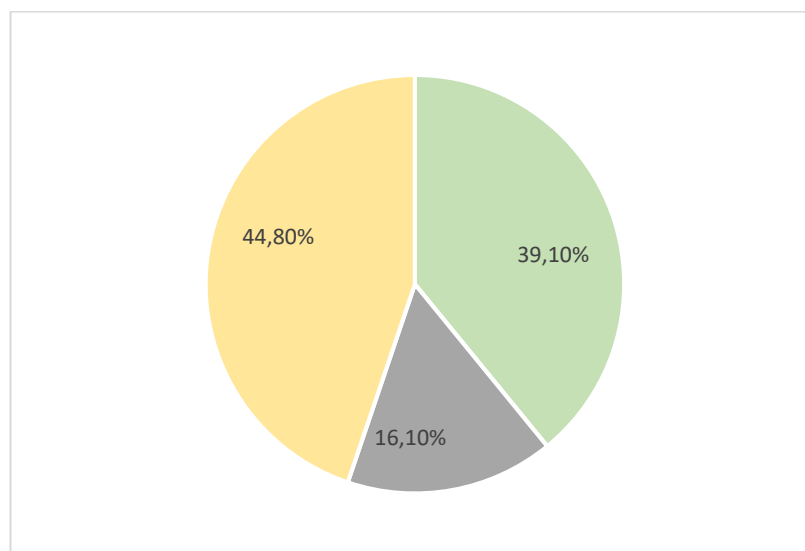


Рис. 1. Полные (■), мозаичные (■), и не идентифицированные изменения ДНК (■), выявляемые биоинформационным анализом после полногеномного секвенирования генома потомков облученных самцов.

Остальные достоверно выявленные изменения ДНК (полные +мозаичные, в сумме 55,2%) неравномерно распределены среди 9 изученных потомков от облученных родителей самцов, варьируя от 1 до 12 на геном. Эти изменения включают суммарно 33 делеции разной величины (17 – 2280 п.н. и один случай делеции 71460 п.н.), 5 дупликаций, 10 инверсий и 4 транслокации, тогда как в контроле обнаружено 2 делеции у трех изученных геномов (рис. 2). При этом среди всех наблюдаемых типов изменений преобладают делеции, показывая тем самым, что потомки облученных самцов чаще всего получают именно этот тип изменений.

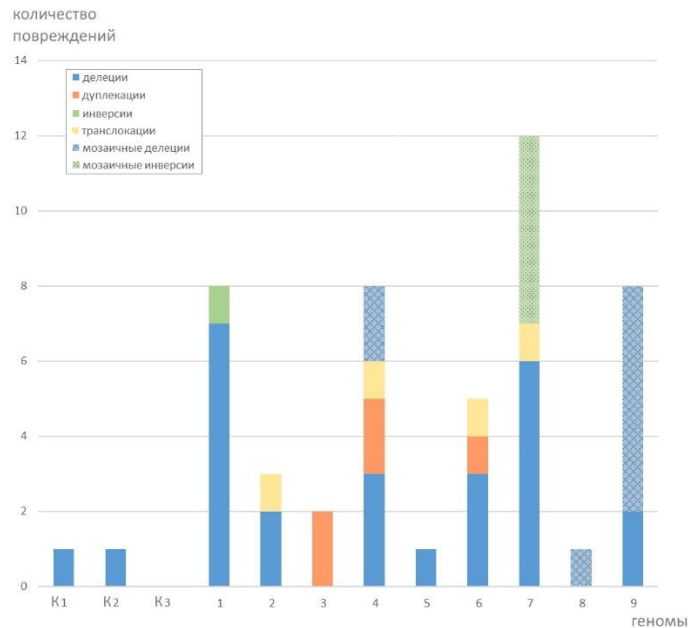


Рис. 3. Количество и типы изменений ДНК в геномах потомков от контрольных (К1-К3) и γ -облученных (40 Гр, Co^{60}) самцов *D. melanogaster*.

Обращает на себя внимание необычайная множественность изменений ДНК генома спермиев у 5 потомков (от 5 до 12 независимых изменений), которая может свидетельствовать о многих событиях взаимодействия γ -квантов с ДНК этих геномов при дозе 40 Гр и малой эффективности безошибочной репарации первичных повреждений в яйцеклетке после оплодотворения.

Следует отметить, что среди полных достоверных изменений (39,1%) наблюдались мозаики (16,1%), у которых $\frac{3}{4}$ данного участка ДНК являлись нормальными, а $\frac{1}{4}$ – изменения в виде делеций или инверсий.

3. Запланированные исследования по изучению транскриптома двух лабораторных линий *D. melanogaster*, отличающихся по радиочувствительности, проведены не были вследствие отсутствия необходимого финансирования этих работ.

По результатам проведенных исследований в рамках текущего проекта опубликовано 4 работы в зарубежной печати, сделано 8 докладов на конференциях с международным участием.

Список журнальных публикаций за 2020-2022гг

- Alexandrov ID, Alexandrova MV, The dose-, LET-, and gene-dependent patterns of DNA changes underlying the point mutations in spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. Autosomal gene black, Mutational research, 2021, v.823, pp 1-11.
- Alexandrov ID, Alexandrova MV, Afanasyeva KP The Nature of Radiation-induced Inherited Recessive Gene Mutations in *Drosophila melanogaster*, Arch Mol Biol Genet. 2021 V1, Issue 1, pp12-19
- Alexandrov ID, Alexandrova MV, Ionizing radiation and DNA Changes underlying inherited recessive gene/point mutations, Cell Science and molecular biology, 2021, v7, pp 001-003.

4. Афанасьева К.П., Александров И.Д. и др., Геномные изменения у потомков самцов *Drosophila melanogaster*, облученных γ -квантами Co^{60} . Материалы 22-ой Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2022 года: экологические проблемы XXI-го века» (в печати).

Список докладов на конференциях с международным участием за 2020-2022гг

1. «Molecular nature of the vestigial no wing mutations in *Drosophila melanogaster*» Afanasyeva K.P., Kharchenko N.E., Alexandrov I.D. доклад и тезисы на конференции V International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky (Armenia, 2021)

2. «Large intron 4 regulates the expression of the vestigial gene of *Drosophila melanogaster*» Kharchenko N.E., Afanasyeva K.P., Alexandrov I.D. доклад и тезисы на конференции V International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky (Armenia, 2021)

3. «The nature of direct radiation-induced point gene mutations in *Drosophila melanogaster*» Alexandrov I.D., Alexandrova M.V. доклад и тезисы на конференции V International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky (Armenia, 2021)

4. «PCR-analysis of direct radiation-induced mutations of white gene in *Drosophila melanogaster*» Rusakovich A.N., Alexandrov I.D доклад и тезисы на конференции V International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky (Armenia, 2021)

5. Радиационно-индуцированные изменения ДНК, выявляемые секвенированием, у мутантов *vestigial nowing Drosophila melanogaster* К. П. Афанасьева, И. Д. Александров доклад и тезисы на конференции «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, 2020)

6. Генетический и молекулярный анализы мутации *vestigial-strapGla (vg sGla) Drosophila melanogaster* Н. Е. Харченко, К. П. Афанасьева, И. Д. Александров доклад и тезисы на конференции «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, 2020)

7. Генетические последствия у потомков облученных родителей-самцов *Drosophila melanogaster* И. Д. Александров, М. В. Александрова доклад и тезисы на конференции «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, 2020)

8. «Радиационная генетика: вчера, сегодня, завтра» Александров И.Д. 22-я Международная научная конференция «Сахаровские чтения 2022 года: экологические проблемы XXI-го века» 19-20 мая 2022 г

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

И.Д. Александров

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА

К.П. Афанасьева