

ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТУ

1. Общие сведения по проекту

Научное направление

Физика конденсированных сред, радиационные и радиобиологические исследования

Наименование проекта

“Молекулярная генетика радиационно-индуцированных изменений гена и генома *Drosophila melanogaster*”. ПРОЕКТ РАДИОГЕН

Шифр темы

04-2-1132-2017/2023

Фактический срок реализации проекта 04.22-04.23г

Руководитель проекта

Афанасьева Кристина Петровна

Заместитель руководителя проекта

Русакович Артем Николаевич

Авторы проекта

И.Д. Александров, М.В. Александрова, К.П. Афанасьева, С.В. Кораблинова, Л.Н. Коровина, А.Н. Русакович, Солодилова О.П., Харченко Н.Е.

2. Аннотация

В отчете представлены результаты исследований на *D. melanogaster* по двум главным направлениям работ, выполненных в период 04.20-04.23:

В рамках первого направления представлены результаты изучения молекулярной природы структурных изменений ДНК отдельных генов после действия γ -излучения и нейтронов. Показан спектр наследуемых изменений ДНК для двух изученных видов радиации.

По второму направлению проведены комплексные исследования с целью изучения радиационно-индуцированных изменений ДНК всего генома у потомков первого поколения от γ -облученных (40 Гр) самцов методом высокотехнологичного полногеномного секвенирования и биоинформационной обработки его результатов. Полученные результаты дают первые представления о множественности изменений ДНК генома потомков от γ -облученных самцов-родителей, в спектре которых преобладают делеции разной величины внутри и вне генов.

3. Развернутый научный отчет

В отчетный период были завершены работы по генетическому и цитогенетическому анализу γ - и нейтрон-индуцированных мутаций пяти генов *D. melanogaster*. Общей закономерностью для 5 генов и 2 видов радиации является индукция следующих 4 типов изменений (Рис. 1):

- Изменения гена, не наследуемые в результате сопутствующих изменений генома, ведущих к стерильности мутантов F₁;
- Мультилокусные делеции, ведущие к потере изучаемого гена;
- Мутации гена, ассоциированные с инверсионным или транслокационным разрывом в области гена;
- Рецессивные, наследуемые по Менделю «точковые» мутации гена.

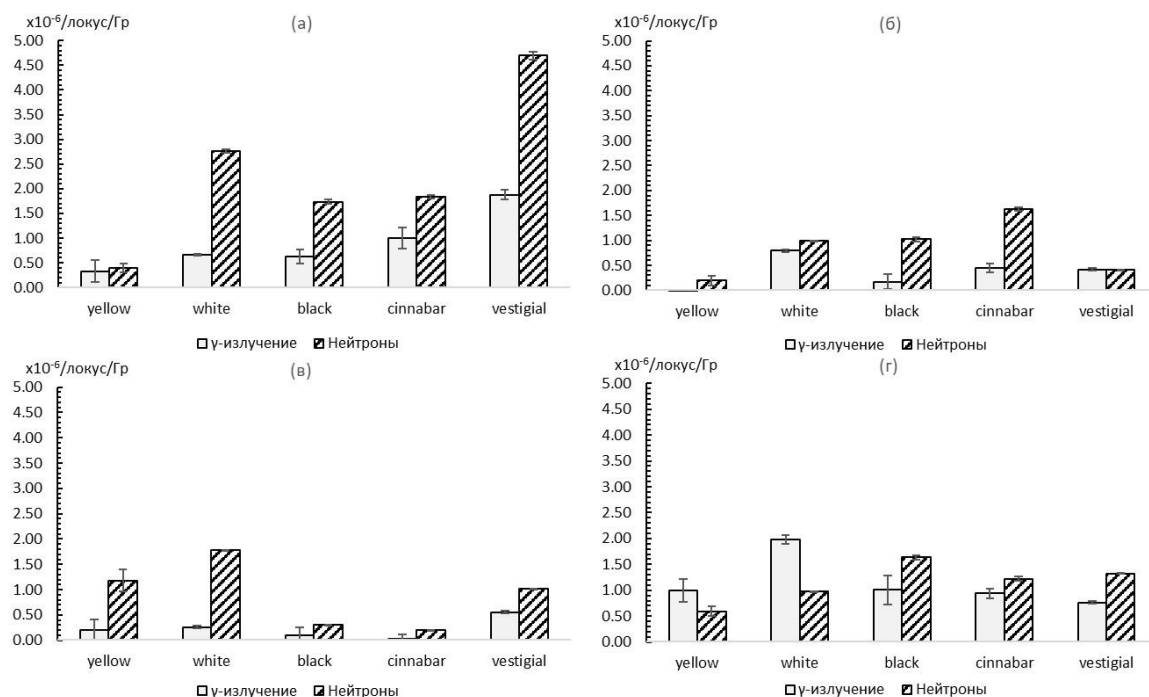


Рис. 1. Сравнительная частота γ - и нейтрон-индуцированных локус-специфических мутаций разного типа на ед. дозы (1 Гр) у пяти изученных генов *Drosophila melanogaster*: а) Изменения гена, не наследуемые в результате сопутствующих изменений генома, ведущих к стерильности мутантов F₁; б) Мультилокусные делеции, ведущие к потере изучаемого гена; в) Мутации гена, ассоциированные с инверсионным или транслокационным разрывом в области гена; г) Рецессивные, наследуемые по Менделю «точковые» мутации гена.

Найдена частота индукции каждого типа на 1 Гр, которая оказалась ген-специфичной и существенно зависит от качества радиации (Рис.1). В основе мутаций первых трех типов (Рис.1, а-в) лежат изменения на хромосомном уровне, т.е. более крупные генетические изменения, в отличие от «точковых» мутаций (Рис. 1, г), где изменения локализованы внутри гена. При этом важно отметить, что для всех пяти генов в индукции трех типов изменений (Рис.1, а-в) нейтроны более эффективны, чем γ -излучение (в среднем в 2,6 раза для названных генов и типов мутаций). Частота «точковых» мутаций для 5 генов и двух видов радиации несколько варьирует. Следует отметить, что в аутосомных генах нейтроны несколько чаще индуцируют «точковые» мутации (Рис.1, г *black*, *cinnabar*, *vestigial*), чем γ -излучение, в отличие от генов, локализованных в половой X-хромосоме, где γ -излучение более эффективно, чем нейтроны. Более высокая частота «точковых» мутаций после действия нейтронов в аутосомных генах, как показал молекулярный анализ, обусловлена вкладом изменений генерируемых генной конверсией, которая посредством рекомбинации участков ДНК ведет к замещению облученного отцовского гена нормальным необлученным материнским. Данный механизм репарации маловероятен у гетерозигот по инверсиям в половых хромосомах, которыми являются самки F_1 в нашем эксперименте.

Для дальнейшего изучения характера изменений ДНК у «точковых» мутаций разных генов после действия γ -излучения и нейтронов (первое направление исследований) проведено секвенирование следующих «точковых» мутаций: 34 γ - и 20 нейтрон-индуцированных мутантов по гену *black*, и 33 γ - и 14 нейтрон-индуцированных мутантов по гену *cinnabar*. Согласно полученным результатам в основе «точковых» мутаций изученных генов лежат одни и те же изменения ДНК: замены оснований; короткие инсерции/делеции (indels); протяженные делеции; протяженные инсерции, изменения, генерируемые конверсией гена (Табл. 1). Редкий тип изменения в виде делеции сопровождающейся инсерцией в этом же месте наблюдается только среди мутаций гена *black* после действия обоих видов радиации. Как видно из Табл. 1, частота отдельных типов изменений ДНК является уникальной для каждого изученного гена. Функциональное значение этих изменений планируется изучить в планируемом пятилетнем проекте путем анализа экспрессии мутантных генов.

Табл. 1. Спектр изменений ДНК у γ - и нейтрон-индуцированных мутаций генов *cinnabar* и *black* и *D. melanogaster*.

Тип изменений	Ген <i>cinnabar</i>		Ген <i>black</i>	
	γ -кванты	нейтроны	γ -кванты	нейтроны
Замены оснований	5* (16,1%)**	7 (46,6%)	20 (46,5%)	
Короткие инсерции/делеции (indels)	5 (16,1%)	0	7 (16,2%)	
Протяженные делеции	11 (35,5%)	4 (26,7%)	6 (14,0%)	2 (9,5)
Протяженные инсерции	2(6,4%)	1 (6,6%)	3 (7,1%)	
Изменения, генерируемые конверсией гена	8 (25,8%)	3 (20%)	6 (14,0%)	18 (85,7%)
Инверсия вместо делеции	0	0	1 (2,3%)	1 (4,8%)
Всего	31	15	43	21

*- Количество изменений; **-Относительная частота изменений.

Запланированные в рамках второго направления геномные исследования выполнены далеко не в полном объеме в следствие недофинансирования, в результате чего, выполнен только следующий объем работы: 1) Самцы ранее сконструированной нами изогенной линии были облучены γ -квантами ^{60}Co в только одной дозе 40 Гр (из двух запланированных доз) 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 безфенольный метод. 3) На

следующем этапе работы проведено полногеномное секвенирование геномной ДНК на платформе Illumina. Общее количество выборки составило 3 контрольных и 9 облученных образцов (из 20 запланированных) 4) После секвенирования проведен биоинформационный анализ полученного материала используя пакеты соответствующих программ для выявления крупных структурных изменений ДНК. Согласно результатам этого анализа, значительное количество изменений (44,8%) среди всех выявленных представляли собой сложные для интерпретации изменения, но по-видимому, не случайные, поскольку у каждого из 6 из 9 изученных потомков наблюдается корреляция их высокой частоты с большим числом достоверных изменений (Рис. 2).

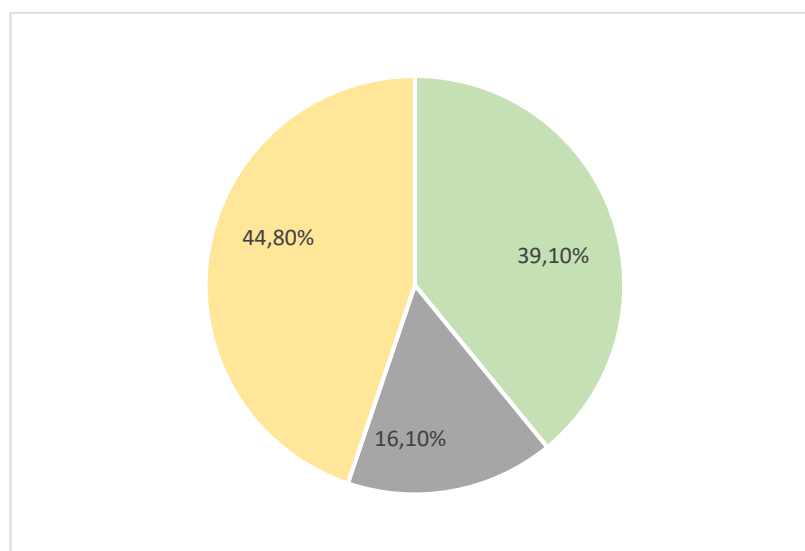


Рис. 2. Полные (■), мозаичные (■), и сложные для интерпретации изменения ДНК (■), выявляемые биоинформационным анализом после полногеномного секвенирования генома потомков облученных самцов.

Остальные достоверно выявленные изменения ДНК (55,2%) представлены полными (39,1%) и мозаичными (16,1%) мутациями. Полные мутации представляют собой гетерозиготу по измененному участку, у которой на фоне нормальной материнской ДНК (50%) наблюдается мутационное изменение всей отцовской ДНК (50%) в равных соотношениях (1:1). Тогда как у мозаичных мутаций это соотношение нормальной и мутантной ДНК составляет соотношение 75% к 25% (3:1). Наличие подобного рода мозаичных мутационных изменений свидетельствует о том, что в их основе лежат индуцированные одностранные повреждения ДНК в спермиях облученных самцов, которые в процессе следующих репликаций и клеточных делений могут вести к формированию клонов мозаичных клеточных.

Все полные и мозаичные мутации неравномерно распределены среди 9 изученных потомков от облученных родителей самцов, варьируя от 1 до 12 изменений на геном. Эти изменения включают суммарно 36 делеции разной величины (17 – 2280 п.н. и один случай делеции 71460 п.н.), 5 дупликаций, 7 инверсий и 3 транслокации, тогда как в контроле обнаружено 2 делеции у трех изученных геномов (Рис. 3). Наибольшее число наблюдаемых делеций среди выявленных типов мутаций свидетельствует, что потомки облученных самцов чаще всего наследуют именно этот тип изменений.

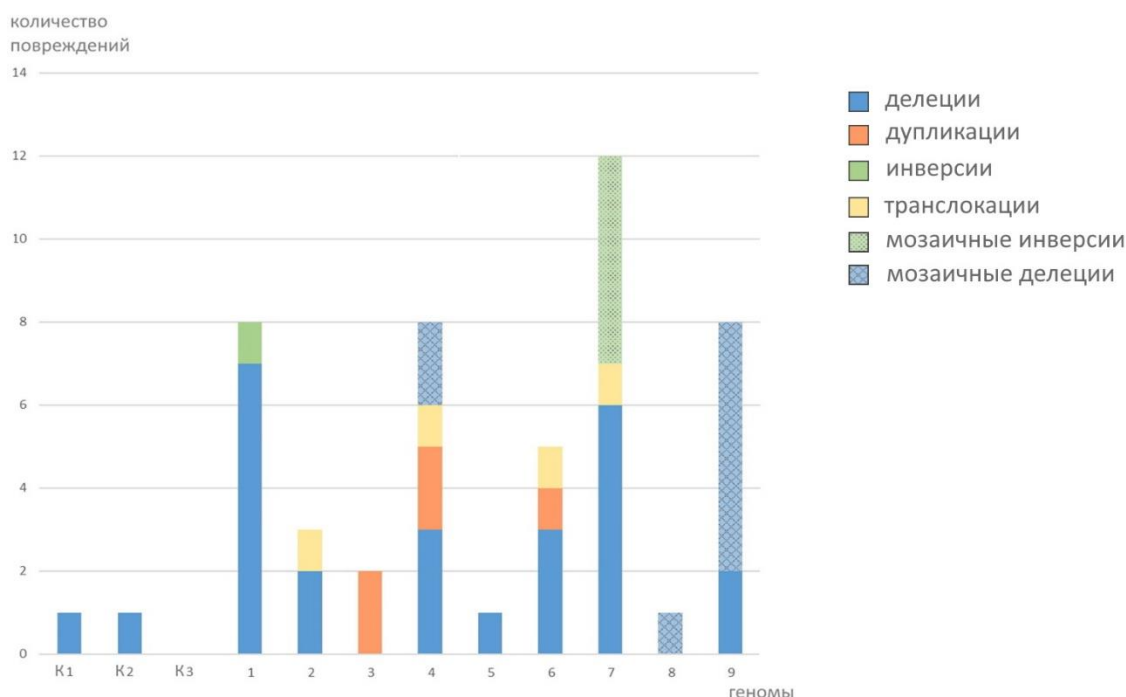


Рис. 3. Количество и типы изменений ДНК в геномах потомков от контрольных (К1-К3) и γ -облученных (40 Гр, Co^{60}) самцов *D. melanogaster*.

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

Наличие двух делеций и 9 сложных для интерпретации изменений в трех контрольных геномах позволяют предполагать что они являются результатом спонтанного мутационного процесса в сконструированной нами изогенной линии в течение периода с ее получения до эксперимента по облучению (1,5 года). С целью оценки уровня полиморфизма, как самостоятельной задачи, а также для исключения его вклада в наблюдаемую частоту индуцированных изменений в эксперименте подготовлен материал для геномного секвенирования образца из 100 самцов сконструированной нами изогенной линии для последующего его геномного секвенирования и биоинформационного анализа.

4. Список основных публикаций и докладов на международных конференциях и совещаниях

1. И. Д. Александров, М.В. Александрова, К. П. Афанасьева, А. Н. Русакович, Н. Е. Харченко «Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 9. Общие закономерности и локус-специфические особенности радиомутабельности сцепленных с полом и аутосомных генов». Радиационная биология. Радиоэкология. (Импакт-фактор (РИНЦ): 0,685) (в печати).

2. Афанасьева К.П, Александров И.Д. и др., «Геномные изменения у потомков самцов *D. melanogaster*, облученных γ -квантами Co^{60} ». Научное издание «Сахаровские чтения 2022 года: экологические проблемы XXI-го века», Материалы Международной научной конференции 19-20 мая, г.Минск, с. 328.

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

5. Результаты сопутствующей деятельности

1. Научно-образовательная деятельность: Афанасьева К.П., куратор проекта в Международных студенческих практиках, март, 2022.

2. Научно-популяризаторская деятельность:

1. Научно-популярная лекция Артем Русакович «Из мухи слона и не только», дом ученых ОИЯИ, март, 2023

2. Научно-популярная лекция Анастасия Русакович «Генеалогия и гены», Универсальная библиотека ОИЯИ имени Д.И. Блохинцева, ноябрь, 2022.

6. Заключение

Получены новые фундаментальные данные, раскрывающие общие закономерности индукции мутаций для 5 генов и двух качественно разных видов радиации (γ -квантов и нейтронов). Среди 4 идентифицированных типов генных мутаций впервые выделен класс «точковых» мутаций и определена их частота на единицу дозы 1 Гр для изученных видов радиации. Продолжен молекулярный анализ «точковых» мутаций и охарактеризован их спектр для двух генов после действия γ -квантов и нейтронов. Получены первые результаты пилотного эксперимента по геномным исследованиям, которые показали множественный характер повреждений ДНК всего генома у потомков γ -облученных самцов *D. melanogaster*. Проведены работы по подготовке к секвенированию референсного генома используемой в экспериментах изогенной линии.

Руководитель темы Мицын Г.В.

_____/_____
“ ____ ” _____ 202_г.

Руководитель проекта Афанасьева К.П.

_____/_____
“ ____ ” _____ 202_г.