

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

**ПРОЕКТ РАДИОГЕН**

<b>Шифр темы</b>	1132
<b>Лаборатория</b>	ЛЯП
<b>Направление</b>	Физика конденсированных сред
<b>Наименование темы</b>	Проведение медико-биологических и радиационно-генетических исследований с использованием различных типов ионизирующих излучений.

**Авторы:**

<b>ОИЯИ, ЛЯП</b> (г. Дубна)	И.Д. Александров, М.В. Александрова, К.П. Афанасьева, С.В. Кораблинова, Л.Н. Коровина, Е.В. Кравченко, Орлова Н.В. А.Н. Русакович, Солодилова О.П., Харченко Н.Е.
--------------------------------	--

<b>ИОГен, РАН,</b> (г. Москва)	И.А. Захаров-Гезехус
-----------------------------------	----------------------

<b>ЮФУ,</b> <b>Лаборатория</b> <b>экспериментального</b> <b>мутагенеза</b> (г. Ростов-на-Дону)	В.А. Чистяков
--	---------------

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА	И.Д. Александров
----------------------	------------------

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА	К.П. Афанасьева
----------------------------------	-----------------

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПРОЕКТА В НОО \_\_\_\_\_

ДАТА НТС ЛЯП \_\_\_\_\_ НОМЕР ДОКУМЕНТА \_\_\_\_\_

ДАТА НАЧАЛА ПРОЕКТА \_\_\_\_\_

ДАТА ПЕРВОГО УТВЕРЖДЕНИЯ ПРОЕКТА \_\_\_\_\_

## ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА

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

**ПРОЕКТ РАДИОГЕН**

ТЕМА 1132

УТВЕРЖДЕН ДИРЕКТОРОМ ОИЯИ	_____	___/___/2019
СОГЛАСОВАНО		
ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ	_____	___/___/2019
ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ	_____	___/___/2019
ПОМОЩНИК ДИРЕКТОРА ПО ЭКОНОМИЧЕСКИМ И ФИНАНСОВЫМ ВОПРОСАМ	_____	___/___/2019
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР	_____	___/___/2019
НАЧАЛЬНИК НОО	_____	___/___/2019
ДИРЕКТОР ЛЯП	_____	___/___/2019
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛЯП	_____	___/___/2019
РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА	_____	___/___/2019
ЗАМ. РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА	_____	___/___/2019
ОДОБРЕН		
ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ	_____	___/___/2019

## Оглавление

Аннотация.....	4
Введение .....	5
Состояние исследований по проблемам, изучаемым в проекте.....	6
Литература .....	7
Описание планируемых исследований и их методов .....	9
Анализ структурных изменений гена.....	9
Анализ мутаций гена, ассоциированных с абберационным разрывом .....	9
Геномный анализ наследуемых изменений ДНК .....	9
Анализ транскрипта (РНК) <i>D.melanogaster</i> .....	10
Ожидаемые результаты .....	10
План-график Работ по Проекту .....	11
Оценка кадровых ресурсов .....	12
Список журнальных публикаций.....	12
Список докладов на конференциях.....	13
Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления Проекта .....	14
Смета затрат по Проекту.....	15
ССВУ-анализ .....	16
Приложения (рисунки, рецензии и выписка из решения НТС) .....	17

## Аннотация

Как продолжение предыдущего проекта “Радиоген”, главными целями планируемого проекта являются: 1) изучение молекулярной природы (на уровне ДНК) структурных изменений гена без и в ассоциации с абберационным разрывом при инверсиях и транслокациях, в геноме спермиев самцов *Drosophila melanogaster*, индуцированных  $\gamma$ -излучением и нейтронами с использованием комплекса методов, включающих гибридизацию *In situ* и на фильтре по Саузерну, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование и проведение обще-геномного анализа радиационно-индуцированных изменений ДНК у потомков первого поколения от облученных самцов после действия  $\gamma$ -излучения в разных дозах, используя метод shotgun секвенирования с сопоставлением полученных результатов с аналогичными данными литературы на мышах, а также 2) изучить транскриптом (совокупность всей РНК) у контрольных и контрастно отличающихся по радиочувствительности линий дрозофилы с использованием прибора Afimetrix.

Результаты Проекта впервые позволят решить пока открытые вопросы структурного мутагенеза гена, оценить характер и степень пораженности наследуемого генома на молекулярном уровне при разных дозах  $\gamma$ -излучения, что позволит оценить эффективность этого вида радиации в индукции аналогичных микроизменений ДНК, лежащих в основе наследуемых генетических болезней человека (данные HGMD, [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)), а также позволит впервые идентифицировать кластер генов, контролирующей радиочувствительность генома у *Drosophila melanogaster*. Эти новые фундаментальные для животных организмов данные планируется опубликовать в отечественной и зарубежной печати.

За предыдущий этап работы по проекту (2017-2019 г) было опубликовано 3 статьи, сделано несколько докладов на конференциях и совещаниях.

Бюджет проекта составляет 144 тыс. долларов США на 2020-2022 г.

## Введение

Возможность предсказать генетические последствия действия радиации для ближайших и отдаленных поколений является одной из важнейших задач, которая вот уже более 50-ти лет стоит перед человечеством. Невозможность её решения непосредственно на человеке предопределила важность и необходимость радиационно-генетических исследований в этом направлении на модельных, генетически хорошо изученных тест-объектах, среди которых главными являются, дрозофила *Drosophila melanogaster* и мышь *Mus musculus*. Понимая, что ген является основой жизни, усилия генетиков были и остаются направлены на изучение природы и частоты наследуемых изменений гена при действии радиации на генеративные клетки этих тест-организмов. В первый период 90-летней истории радиационной генетики были получены генетические и цитогенетические характеристики наследуемых мутаций тех или иных генов при действии главным образом редко-ионизирующего излучения. Современный прогресс в ДНК-технологии открывает новую страницу в радиационной генетике названных тест-объектов и широкие перспективы изучения мутационных изменений не только отдельных генов, но и генома в целом. Начатые нами в рамках проекта “Радиоген” молекулярно-генетические исследования на *Drosophila melanogaster* по изучению  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных наследуемых изменений ДНК пяти генов касались той части генных мутаций в их общем спектре, которая обусловлена микроизменениями внутри гена (так наз. “точковые” мутации). Однако, как показали результаты уже проведенных нами генетических и цитогенетических исследований, “точковые” мутации являются лишь частью спектра радиационных изменений гена. Другая и более значительная часть этого спектра представлена структурными изменениями не только самого гена, но и генома в виде обменных перестроек с абберационным разрывом в районе локализации гена на хромосоме. Если на начальном этапе работы по проекту “Радиоген” предметом наших исследований являлась природа изменений ДНК у «точковых» мутаций гена, выявляемых полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и секвенированием, то первой задачей планируемых исследований, как продолжение проекта “Радиоген”, является молекулярный анализ внутригенных структурных изменений и мутаций гена, ассоциированных с абберационным разрывом после действия  $\gamma$ -излучения и нейтронов с использованием комплекса методов, включающих гибридизацию *In situ*, ПЦР и секвенирование. Одновременно, как вторая задача, планируется обще-геномный анализ генетических последствий  $\gamma$ -облучения самцов-родителей *Drosophila melanogaster* с оценкой спектра и частоты наследуемых изменений ДНК у потомков первого поколения на базе метода shotgun секвенирования с последующим сравнением этих результатов с данными литературы на мышах. Несмотря на большие различия в размере изучаемых структур (ген и геном), единые для них методология, методы и предмет изучения (изменения ДНК) позволяют сформулировать общую для названных задач цель проекта, а именно, молекулярный анализ радиационно-индуцированных изменений структуры гена и генома. Второй целью планируемых исследований, является изучение функциональных аспектов проблемы радиочувствительности генома, для чего планируется провести анализ транскриптома (совокупность всей РНК) у двух контрастно отличающихся по радиочувствительности высокоинбредных лабораторных линий *Drosophila melanogaster* на базе установки Afimetrix.

Результаты Проекта впервые позволят решить пока открытые вопросы о природе радиационно-индуцированных наследуемых мутаций генов и генома на уровне ДНК, оценить характер и степень пораженности наследуемого генома на молекулярном уровне при разных дозах  $\gamma$ -излучения. Все это позволит оценить эффективность этого вида радиации в индукции аналогичных микроизменений ДНК, лежащих в основе наследуемых генетических болезней человека (данные HGMD, [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)). Одновременно результаты планируемых исследований позволят впервые идентифицировать ансамбль генов, контролирующую радиочувствительность генома у *Drosophila melanogaster*.

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

### **Состояние исследований по проблемам, изучаемым в проекте**

Среди наследуемых генетических изменений, вызываемых ионизирующей радиацией в генеративных клетках высших организмов индуцированные рецессивные генные мутации менделевского типа, наряду со спонтанными, формируют тот генетический груз, который несут современные популяции человека и животных. Данные современной молекулярной генетики генетических болезней человека (OMIM 2017, [www.omim.org](http://www.omim.org); HGMD 2018, [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)), классической радиационной генетики *Drosophila melanogaster* [1,2], тутового шелкопряда *Bombyx mori* [3], нейроспоры *Neurospora crassa* [4] и мыши *Mus musculus* [5], а также наших многолетних исследований по генетике и цитогенетике радиационно-индуцированных наследуемых рецессивных мутаций пяти разных генов *Drosophila melanogaster* (Рис. 1) [6-9] позволяют сделать концептуальное заключение о том, что многообразие регистрируемых изменений гена (Рис. 2) можно объединить в два основных класса: 1) «точковые» мутации с локализацией изменений разного типа внутри гена и 2) структурные мутации, ассоциированные с такими структурными изменениями генома как интерстициальные делеции (потери) сегментов хромосомы, инверсии, транслокации или транспозиции с одним из абберационных разрывов в области изучаемого гена. Фактически, второй класс представляет собой структурные изменения генома, так или иначе затрагивающие изучаемый ген. По нашим данным доля радиационно-индуцированных мутаций данного класса в общем спектре наблюдаемых изменений варьирует от 20 до 80% в зависимости от величины гена и его положения в геноме (Рис. 3). Более того, как показали наши результаты ПЦР-анализа «точковых» мутаций изучаемых генов, в гетерогенной картине повреждений их ДНК регулярно наблюдаются структурные изменения в виде делеций и других молекулярных перестроек разной величины [6-9]. При этом локализация концов таких перестроек часто совпадает у мутантов, индуцированных разными дозами радиации (Рис. 4), формируя «горячие» точки радиационного мутагенеза с неслучайным их положением на карте гена [10]. Учитывая важное значение «горячих» точек в виде определенных последовательностей оснований ДНК в детерминации генетических болезней человека [11,12] и их роль в эволюции [13], молекулярный анализ природы «горячих» точек на уровне ДНК у радиационно-индуцированных мутаций изучаемых генов дрозофилы приобретает не только большой научный интерес, но и важное прогностическое значение.

В основе наблюдаемых нами с помощью стандартной ПЦР радиационно-индуцированных структурных изменений гена в виде делеций разной величины могут лежать разные генетические изменения. Как показали результаты исследований за предыдущий период работы по проекту “РадиоГен”, в первую очередь это могут быть инсерции (внедрение) или эксцизии (вырезание) крупных мобильных элементов генома (Рис. 5). В других случаях в основе делеций могут лежать потери 5-7 и более п.н. в области отжига праймеров или молекулярные инверсии/ транслокации. Выяснение этого вопроса методами ПЦР и секвенирования является первой задачей данного раздела проекта.

В основе радиационно- индуцированных мутаций гена, ассоциированных с абберационным разрывом, может также лежать несколько разных генетических изменений. В первом случае абберационный разрыв локализован вне гена, в результате чего ген оказывается в новом генетическом окружении, подавляющим его экспрессию, что ведет к мутантному фенотипу. При этом сам ген физически не изменен. В данном случае мы будем иметь дело с классическим «эффектом положения» гена мозаичного типа, как это имеет место при контакте, например, гена *white* с прицентромерным гетерохроматином. В другом случае абберационный разрыв может находиться внутри

самого гена и его локализация на карте гена с характеристикой ДНК-мишени требует самостоятельных исследований.

Наконец в третьем случае, который в период классической радиационной генетики казался мало вероятным [14], поскольку требовал два независимых попадания, хотя при этом наблюдалась линейная зависимость частоты мутаций от дозы, говорящая об одном попадании, абerrационный разрыв локализуется вблизи гена, а внутри него имеются независимые индуцированные повреждения, ведущие к мутантному фенотипу. В таком случае абerrационный разрыв и мутация гена оказываются двумя разными по физической природе мутационными событиями в результате прохождения одной ионизирующей частицы, что не является таким уж маловероятным в свете современных представлений о структуре трека в биологической конденсированной среде [15]. Гипотеза о двух и более мутационных событиях в геноме при одном попадании была нами высказана и экспериментально частично обоснована ранее [16]. Дальнейшее экспериментальное изучение трех выше перечисленных типов генетических изменений при сочетании генной мутации с абerrационным разрывом и определение вклада каждого из них в общую картину таких изменений является второй задачей этого раздела проекта. Решение этой задачи требует комплекса методов современной молекулярной генетики включая гибридизацию *In situ* на политенных хромосомах и на фильтре, ПЦР анализ и секвенирование.

Наблюдаемый прогресс в подходах и методах секвенирования открывает новые и широкие перспективы в изучении изменений ДНК всего генома генеративной клетки после действия любого экологически вредного фактора, включая ионизирующую радиацию. Подобного рода исследования только начинаются и первые результаты, полученные на мышах, открывают совершенно новый взгляд на генетические последствия для потомков, родители которых были облучены [17]. Широкий спектр описанных радиационно-индуцированных (доза 3 Гр X-лучей) изменений геномной ДНК, которые унаследовали потомки первого поколения от облученных самцов-родителей, включает не только уже известные типы повреждений ДНК (замены оснований, микроделеции/микроинсерции) с высокой частотой наследования, но и новые в виде кластеров из таких повреждений. Эти первые результаты позволяют говорить о гораздо большей генетической опасности ионизирующих излучений для потомства облученных родителей, чем это представлялось ранее. Учитывая тот факт, что на протяжении всей истории радиационной генетики сравнительный анализ генетического действия на дрозофиле и мыши являлся главной основой для экстраполяции на человека, в нашем проекте "Радиоген", как продолжение предыдущего проекта, планируется провести обще-геномный (*genome-wide*) анализ наследуемых изменений ДНК у потомков первого поколения, самцы-родители которых были подвергнуты  $\gamma$ -облучению в разных дозах.

Исследования по проблеме генетического контроля радиочувствительности у высших эукариот ограничивались до сих пор выявлением и характеристикой действия отдельных генов, контролирующих репарационные и другие важные генетические процессы [18]. Успехи в научном приборостроении и новейшие подходы к изучению функции (экспрессии) гена открывают перспективу анализа активности не одного, а сразу целых блоков генов в условиях разной генотипической и внешней среды, включая радиацию. В этом отношении представляет большой научный интерес и прогностическое значение планируемые приоритетные исследования по изучению всего транскриптома у линий *Drosophila melanogaster* разной радиочувствительности (Рис 6) на базе прибора Afimerrix, позволяющего выявить особенности экспрессии ансамблей генов на отдельных этапах онтогенеза при разных условиях радиационного воздействия. Таким образом в планируемых приоритетных исследованиях предполагается изучить оба фундаментальных аспекта (структурный и функциональный) проблемы радиочувствительности генеративных клеток животных на геномном и геномном уровнях.

### Литература

1. Lefevre G. Sterility, chromosome breakage, X-ray-induced mutation rates and detected mutation frequencies in *Drosophila melanogaster*// Genetics, 1967, v.55, p. 263-276.

2. Eeken J.C.J., de Long A.W.M., Loos M. et al., The nature of X-ray-induced mutations in mature sperm and spermatogonial cells of *Drosophila melanogaster* // *Mutat. Res.*, 1994, v. 307, p. 201-212.
3. Tazima Y., Onimaru K. Frequency pattern of mosaic and whole-body mutations induced by ionizing radiations in post-meiotic cells of the male *silkworm* // *Mutat. Res.* 1969, v. 8, P. 177–190.
4. de Serres F.J. X-ray-induced specific-locus mutations in the ad-3 region of two-component heterokaryon of *Neurospora crassa*. VIII. Dose-dependence of the overall spectrum // *Mutat. Res.* 1991, v. 246, P. 1–13.
5. Russell L.B. Definition of functional units in a small chromosome segment of the mouse and its use in interpreting the nature of radiation-induced mutations // *Mutat. Res.* 1971, v. 11, P. 107–123.
6. И.Д. Александров, М.В. Александрова и др. ОГЭ нейтронов деления при индукции рецессивных мутаций разного типа у *Drosophila melanogaster* // *Рад. Биология. Радиоэкология* 2001, т.41, № 3, с.245-258
7. И.Д.Александров, Л.Н. Намолован и др, Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 3: ген *black*. Общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности // *Рад. биология. Радиоэкология*, 2012, т.52, №5, с.1-14
8. Л.Н. Давкова, И.Д.Александров, и др, Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 5: Ген *cinnabar*. Общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности // *Рад. биология. Радиоэкология*, 2014, т.54, №1, с.5-20
9. Е.В. Кравченко, С.В. Дубовик и др, Сообщение 7: ген *yellow*. Общая характеристика мутабельности и ПЦР-анализ «точковых» мутаций // *Рад. биология. Радиоэкология*, 2018, т.58, № 4, с.341-351
10. Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д. , Кораблинова С.В. // Сообщение 2. Ген *vestigial*: молекулярная характеристика абберационных мутантов. Радиационная биология. Радиоэкология, 2012, т. 54, № 46 с. 349-362
11. Ball E.V., Stenson P.D., Abeysinghe S.S. et al. Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: common mechanisms of mutagenesis and role of local DNA sequence complexity // *Human Mutat.* 2005, v.26. No 3, p.205-213.
12. Kondrashov A.S., Rogozin I.B. Context of deletions and insertions in human coding sequences // *Human Mutat.*, 2004, v.23, p. 177-185.
13. Tanay A. and Eric D Siggia. Sequence context affects the rate short insertions and deletions in flies and primates // *Genome Biology*, 2008, v. 9 p. No 2, p.37.2-14.
14. Дубинин Н.П., Сидоров Н.Н. Зависимость эффекта гена от его положения в система // *Биол. Журн*, 1934, т. 3, с.707-720.
15. Goodhead D.T. Energy deposition stochastics and track structure: what about the target? // *Rad. Protec. Dosimetry*, 2006, v.122, No 1-4, p. 3-15.
16. Alexandrova M.V., Alexandrov I.D., Korablinova C.V., Levkovich N.V. Molecular genetics of radiation-induced chromosome exchanges in *Drosophila*: “Position effect” or gene mutation? // *Intern. Confer. “Genetic consequences of emergency radiation situations”*, Moscow, June 10-13, 2002.
17. Adewoye A.B., Lindsay S.J., Dubrova Yu. E and Hurles M.E. The genome wide effects of ionizing radiation on mutation induction in mammalian germline // *Nature Communications*, 2015, p. 1-8.
18. Плюснина Е.Н., Земская Н.В., Москалев Ф.Ф. Роль генов репарации ДНК в радиационно-индуцированном изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* // *Рад. Биология. Радиоэкология*, 2014г т. 54, № 5, с.482-492.



## Описание планируемых исследований и их методов

### Анализ структурных изменений гена

Для достижения первой поставленной цели проекта в части изучения молекулярной природы внутригенных перестроек у «точковых» мутантов и характеристики ДНК-мишени для них планируется решить следующие задачи: 1) На основании ранее полученных для каждого из пяти изучаемых генов (Рис. 1) данных о характере повреждений гена, выявляемых методом ПЦР, провести отбор мутантов с изменениями в виде потери одного, ряда смежных или нескольких разных фрагментов на карте гена; 2) Провести гибридологические скрещивания для получения гомо- или гемизигот по каждому из изучаемых генов для получения генетического материала (геномная ДНК) и последующего молекулярного анализа; 3) Проведение работ по выделению высокомолекулярной ДНК каждого изучаемого мутанта и создание банка геномной ДНК изучаемых мутантов *D. melanogaster*; 4) Проведение первого этапа молекулярного анализа (ПЦР) с целью определения отжига прямого и обратного праймеров для отсутствующих фрагментов гена у изучаемых мутантов; 5) При наличии отжига праймеров на следующем этапе молекулярного анализа планируется проведение Long-PCR для выявления инсерции мобильного элемента, определяющего отсутствие данного фрагмента при стандартной ПЦР; 6) Для мутантов без инсерций крупной мобильной или иной геномной ДНК провести fish-гибридизацию *in situ* на политенных хромосомах, используя меченые зонды-ДНК из районов гена, фланкирующих отсутствующий фрагмент для выявления молекулярных инверсий или транслокаций гена. Планируется изучить не менее 50 мутантов пяти изучаемых генов с вышеназванными внутригенными структурными изменениями разного типа.

### Анализ мутаций гена, ассоциированных с аберрационным разрывом

Для изучения генетической природы генных мутаций, ассоциированных с инверсионным или транслокационным разрывом планируются следующие этапы работы: 1) Из общей базы данных по радиационно-индуцированным мутациям пяти изучаемых генов сделать выборку тех из них, для которых мутация гена сопряжена со структурными изменениями генома; 2) Путем гибридизационных скрещиваний с известной крупной делецией изучаемого гена получить соответствующих гемизигот как исходного генетического материала для последующих молекулярно-генетических исследований; 3) Провести работы по выделению высокомолекулярной ДНК и создать базу геномной ДНК изучаемых мутантов; 4) На основании полученных ранее методом ПЦР данных провести классификацию мутантов по локализации и размеру отсутствующих на карте гена фрагментов; 5) Для мутантов с отсутствием одного фрагмента провести работы, соответствующие этапам 4-6 для «точковых» мутантов; 6) Для мутантов с протяженными внутригенными делециями провести работы по fish-гибридизации *in situ* на политенных хромосомах; 7) Для мутантов с предполагаемо крупными инсерциями геномной ДНК провести long-ПЦР с целью определения точной локализации и величины внедрившегося фрагмента. В данной части проекта планируется изучить более 50 мутантов подобного рода.

### Геномный анализ наследуемых изменений ДНК

Для достижения первой поставленной цели проекта в части установления спектра и частоты наследуемых в первом поколении изменений ДНК на уровне всего генома после облучения самцов-родителей *D. melanogaster* необходимо решить следующие задачи 1) Получить путем гибридизационных скрещиваний изогенные линии *D. melanogaster*, самцы которых будут облучены  $\gamma$ -квантами  $Co^{60}$  в разных дозах (10-40 Гр); 2) Облученных самцов индивидуально скрестить с гаремом из пяти самок той же изогенной линии для получения потомства (самки и самцы) первого поколения; 3) Выделить из отдельных (20-30) особей первого поколения высокомолекулярную геномную ДНК фенол-хлороформным методом; 4) Создать банк геномной ДНК с

радиационно-индуцированными изменениями потомков первого поколения от самцов-родителей, облученных разными дозами  $\gamma$ -излучения; 5) Провести полногеномное (genome-wide) shotgun секвенирование по Сэнгеру на установке *Illumina* на базе фирмы Евроген (Москва); 6) Провести анализ полученных результатов секвенирования с использованием биоинформационных программ.

### **Анализ транскриптома (РНК) *D.melanogaster***

Для достижения второй цели планируемого проекта по изучению генетического контроля радиочувствительности генома *D. melanogaster* на уровне транскриптома (РНК) с использованием контрастно отличающихся по радиочувствительности линий (Рис. 6) необходимо решить следующие задачи: 1) Учитывая десятилетний возраст культивирования ранее отселектированных линий контрастно отличающихся по радиочувствительности провести эксперименты по проверке генотипической чистоты этих линий в тех же условиях, при которых были установлены эти различия ( $\gamma$ -облучение личинок первого возраста в дозе 12 Гр); 2) При подтверждении генотипической чистоты этих линий по данному признаку провести работы по получению транскриптома (РНК) из личинок первого возраста, облученных на этой и более поздних стадиях онтогенеза 3) На базе установки Afimetrix определить количество и уровень экспрессии генома на разных стадиях онтогенеза у линий отличающихся по радиочувствительности.

В процессе выполнения вышеперечисленных работ по всем структурным разделам планируется использовать следующее оборудование: микроцентрифуга Eppendorf, амплификатор BioRad T100, камера для горизонтального электрофореза SE-1, источник тока Эльф-8, спектрофотометр IMPLIN, весы OHAUS, светооптический микроскоп, "Carl Zeiss", Секвенатор SeqStudio, Система GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix), флуоресцентный микроскоп Evos, гибридайзер UVP HB-1000.

### **Ожидаемые результаты**

Выполнение работ по Проекту позволит получить первые новые данные фундаментального значения, прежде всего, о природе структурных изменений гена при точковых мутациях и ассоциациях гена с инверсионным или транслокационным разрывом, индуцированным  $\gamma$ -излучением и нейтронами. При этом молекулярный анализ «горячих сайтов» радиационного мутагенеза на уровне контекста ДНК впервые позволит определить особенности организации и последовательности оснований ДНК таких сайтов, что будет иметь наряду с фундаментальным и большое прогностическое значение.

Приоритетные результаты секвенирования всего генома потомков первого поколения от  $\gamma$ -облученных самцов-родителей впервые позволят оценить на уровне ДНК генетические последствия действия радиации на геном генеративных клеток изучаемого классического генетического тест-объекта *Drosophila melanogaster* и сопоставить их с аналогичными данными литературы, полученными на мышах, что существенно повысит обоснованность экстраполяции экспериментальных (дрозофила-мышь) данных на человека.

Проведение молекулярно-генетических геномных (genome-wide) исследований на установке Afimetrix впервые позволит охарактеризовать общегеномный (на уровне транскриптома) контроль радиочувствительности клетки на разных этапах онтогенеза *Drosophila melanogaster* с идентификацией кластера генов, ответственных за реакцию клетки на облучение.

## План-график Работ по Проекту

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

Этапы работы	Содержание работ	Ответственные исполнители
2020 г.	<p>Провести работы по ПЦР-анализу структурных внутригенных изменений у <math>\gamma</math>- и нейтрон-индуцированных мутантов пяти изучаемых генов.</p> <p>Синтезировать изогенные линии для геномного анализа наследуемых в первом поколении мутаций.</p> <p>Провести подготовительные работы по оценке радиочувствительности линий <i>D. melanogaster</i> из генетической коллекции ЛЯП.</p> <p>Отработать метод fish-гибридизации <i>in situ</i> на политенных хромосомах дрозофилы</p> <p>Провести пробо-подготовительные работы на Afimetrix</p>	ОИЯИ
2021г.	<p>Секвенирование концов внутригенных делеций <math>\gamma</math>- и нейтрон-индуцированных мутаций пяти изучаемых генов</p> <p>Секвенирование геномной ДНК особей первого поколения от изогенных самцов-родителей <math>\gamma</math>-облученных в дозе 20-40 Гр.</p> <p>Провести сравнительный (контроль-опыт) компьютерный анализ полученных результатов секвенирования с помощью программы из ресурса EMBL-EBI.</p> <p>Начать работы по гибридизации <i>in situ</i> на мутантах, у которых генная мутация ассоциирована с абберационным разрывом</p> <p>Апробировать методику анализа транскриптома на контрольных линиях дрозофилы на установке Afimetrix.</p>	ОИЯИ
2022 г.	<p>Завершить работы по гибридизации <i>in situ</i> и секвенированию структурных изменений гена у мутантов, индуцированных <math>\gamma</math>-излучением и нейтронами.</p> <p>Провести сравнительный статистический анализ полученных результатов.</p> <p>Провести секвенирование генома потомков F1 от изогенных самцов-родителей <math>\gamma</math>-облученных в дозе 10 Гр и оценить характер дозовой зависимости для отдельных типов наследуемых изменений ДНК с сопоставлением этих результатов с имеющимися в литературе данными на мышах.</p> <p>Провести сравнительный анализ транскриптомов (РНК) у линий дрозофилы, контрастно отличающихся радиочувствительностью с идентификацией сети генов, ответственных за разную реакцию на облучение генома.</p>	<p>ОИЯИ</p> <p>ИОГен РАН (г.Москва) ЮФУ (г.Ростов-на-Дону) ОИЯИ</p>

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

И.Д. Александров

## Оценка кадровых ресурсов

Коллектив участников проекта включает 10 сотрудников ОИЯИ, среди которых 4 являются высококвалифицированными специалистами (1 д.б.н, 3 к.б.н.) в области молекулярной и радиационной генетики, владеющими генетическими, цитогенетическими и молекулярными методами изучения радиационно-индуцированных мутаций *D. melanogaster* и имеющими многолетний опыт работы в этой области. Одновременно участниками проекта являются чл.-корр. РАН, проф. И.А. Захаров-Гезихус (ИОГен, г.Москва) и д.б.н., зав. Лабораторией экспериментального мутагенеза ЮФУ В.А. Чистяков (Ростов-на-Дону)

### Список журнальных публикаций

1. Е.В. Кравченко, А.Н. Русокович и др. Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 8. Ген *white*: общая характеристика радиомутабельности и ПЦР-анализ «точковых» мутаций // Рад. биология. Радиоэкология, 2019 (в печати)
2. Е.В. Кравченко, С.В. Дубовик и др, Сообщение 7: ген *yellow*. Общая характеристика мутабельности и ПЦР-анализ «точковых» мутаций // Рад. биология. Радиоэкология, 2018, т.58, №4, с.341-351
3. И.Д.Александров, М.В. Александрова Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 6: Ген *cinnabar*: секвенирование  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутаций // Рад. биология. Радиоэкология, 2018, т.58, №1, с.15-25
4. Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д. Молекулярно-генетические исследования по радиационной генетике *Drosophila* в ОИЯИ, «Экологический вестник», 2016, №3 (37) с. 75-79.
5. И.Д.Александров, М.В. Александрова, К.П. Афанасьева Межхромосомная генная конверсия как регуляторный механизм потери гетерозиготности (LOH) в ранней зиготе у *Drosophila melanogaster* // ДАН 2015, т.460, №6, с1-3
6. Л.Н. Давкова, И.Д.Александров, и др, Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 5: Ген *cinnabar*. Общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности // Рад. биология. Радиоэкология, 2014, т.54, №1, с.5-20
7. Л.Н. Давкова, М.В. Александрова, и др, Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 4. Ген *black*: секвенирование «точковых» мутантов и рекомбинационные механизмы их образования // Рад. биология . Радиоэкология, 2013, т.53, №4, с.355-366
8. И.Д.Александров, Л.Н. Намолован и др, Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 3: ген *black*. Общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности // Рад. биология. Радиоэкология, 2012, т.52, №5, с.1-14
9. К.П. Афанасьева, М.В., Александрова, И.Д. Александров, С.В. Кораблинова // Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 2. Ген *vestigial*: молекулярная характеристика абберационных мутантов. Радиационная биология. Радиоэкология, 2012, т. 54, № 4, с. 349-362
- 10.И.Д. Александров, К.П. Афанасьева, и др. // Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 1. Ген *vestigial*: молекулярная характеристика «точковых» мутаций // Радиационная биология. Радиоэкология, 2012, т. 52, № 3, с. 1-14
- 11.Alexandrova M.V., Alexandrov I.D., Korablinova C.V., Levkovich N.V. Molecular genetics of radiation-induced chromosome exchanges in *Drosophila*: “Position effect” or gene mutation? // Intern. Confer. “Genetic consequences of emergency radiation situations”, Moscow, June 10-13, 2002.

12. Александров И.Д. , М.В. Александрова и др. ОГЭ нейтронов деления при индукции рецессивных мутаций разного типа у *Drosophila melanogaster* // Рад. биология Радиозэкология 2001, т.41, №3, с.245-258

#### **Список докладов на конференциях**

1. И.Д. Александров, М.В. Александрова, К.П. Афанасьева, и др Радиационная биология структурных генов *Drosophila melanogaster*/ тезисы Всероссийской конференции "Дрозофила в генетике и медицине", с.8, г. Гатчина, октябрь, 2017г.
2. Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д. Молекулярно-генетический анализ  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» и структурных мутаций гена *vestigial D. melanogaster* / тезисы Всероссийской конференции "Дрозофила в генетике и медицине", с.11, г. Гатчина, октябрь, 2017г.
3. К.П. Афанасьева, И.Д. Александров, М.В. Александрова Сравнительная характеристика повреждающего действия  $\gamma$ -квантов, нейтронов деления и ионов  $^{12}\text{C}$  на разных уровнях генома генеративных клеток *D. melanogaster*. Тезисы по материалам Первой Всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» г. Санкт-Петербург, май, 2017г
4. Афанасьева К.П., Александрова М.В., Александров И.Д. Молекулярно-генетические исследования по радиационной генетике *Drosophila* в ОИЯИ // тезисы в Материалах 16-й международной научной конференции Сахаровские чтения 2016 года: Экологические проблемы XXI века, Минск, май, 2016г. с.200-201.
5. К.П. Афанасьева Кластерный характер мутагенного действия радиации разнокачества на геном генеративных клеток *Drosophila melanogaster*, Дубна, февраль 2015г.
6. К.П. Afanasyeva, M.V. Alexandrova, I.D. Alexandrov Molecular nature of the heritable gene mutations induced by gamma-rays and neutrons in *Drosophila* germ cells // abstracts of Fourth International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution» JINR, Dubna, 2015, p.54

## Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления Проекта

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

Требуемое оборудование, источники финансирования		Стоимость (тыс.\$)	1 год 2020	2 год 2021	3 год 2022
Оборудование	1.Микроцентрифуга* 2.РН-метр* 3.Автоклав*	5 0.6 5.6	5 0.6	5.6	
Источники финансирования	Затраты из бюджета	11.2	5.6	5.6	

\*- замена устаревшего оборудования на более высокопроизводительное и функциональное

РУКОВОДИТЕЛЬ ТЕМЫ

Г.В. Мицын

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

И.Д. Александров

## Смета затрат по Проекту

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

№	Наименование статей затрат	Полная стоимость	2020 год	2021 год	2022 год
	Прямые расходы на Проект				
1	Материалы (тыс.\$)	117,8	39	39,8	39,0
2	Оборудование (тыс.\$)	11,2	5,6	5,6	-
3	Командировочные расходы (тыс.\$)	15,0	5,0	5,0	5,0
	Итого по прямым расходам:	144	49,6	50,4	44,0
	В том числе из бюджета ЛЯП	144	49,6	50,4	44,0

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

И.Д. Александров

ДИРЕКТОР ЛЯП

В. А. Бедняков

ПОМОЩНИК ДИРЕКТОРА ЛЯП  
ПО ЭКОНОМИЧЕСКИМ И ФИНАНСОВЫМ  
ВОПРОСАМ

Г.А. Усова

## ССВУ-анализ

### Сильными сторонами проекта являются:

1. Многолетний опыт работы главных исполнителей проекта в области общей, радиационной и молекулярной генетики, их широкая известность в научных кругах нашей страны и за рубежом
2. Наличие уникальной коллекции радиационно-индуцированных мутаций пяти разных генов *D. melanogaster*, являющихся предметом изучения как в первом, так и в планируемом проекте Радиоген
3. Большой опыт работы по первому проекту Радиоген
4. Сочетание передовых научных идей и самых современных ДНК-технологий
5. Научная поддержка планируемых исследований со стороны члена РАН, имеющего большой авторитет и широкое признание в науке.

### Слабые стороны проекта:

1. Малочисленность молодых специалистов (3 сотрудника)

### Возможности:

1. Высокий научный потенциал и современная научная база открывают широкие перспективы для привлечения молодых специалистов из стран-участниц ОИЯИ
2. Повышение научного авторитета ОИЯИ и ЛЯП, как организации, где ведутся современные фундаментальные молекулярно-радиационные геномные исследования
3. Наличие самого современного оборудования в виде Afimetrix может стать привлекательным для совместных исследований ОИЯИ и других исследовательских институтов

### Угрозы:

В рамках проведения планируемого проекта никаких угроз не выявлено.



## Приложения (рисунки, рецензии и выписка из решения НТС)

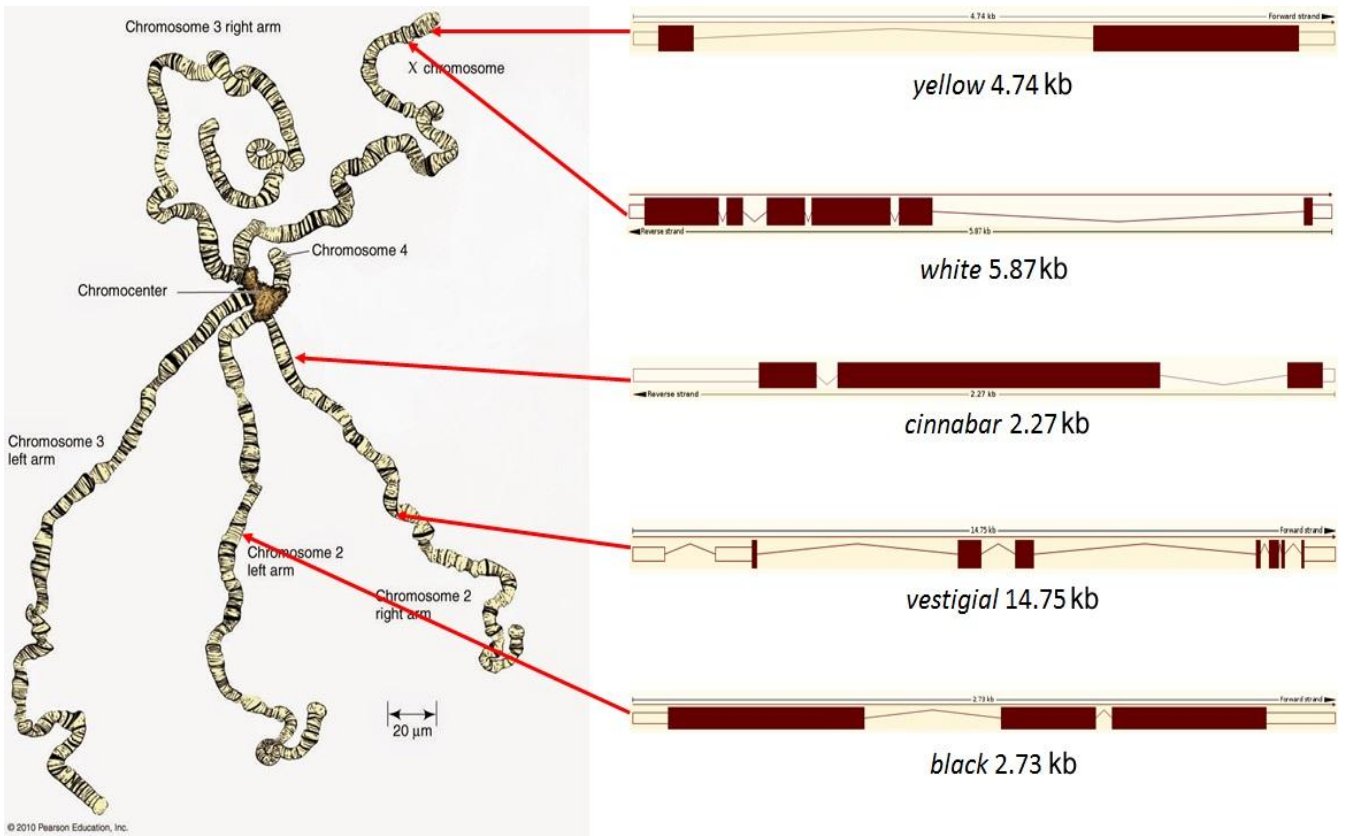


Fig. 1. The size, molecular organization and location on the polytene chromosomes of the five *Drosophila melanogaster* genes radiation-induced mutations of which are studding.

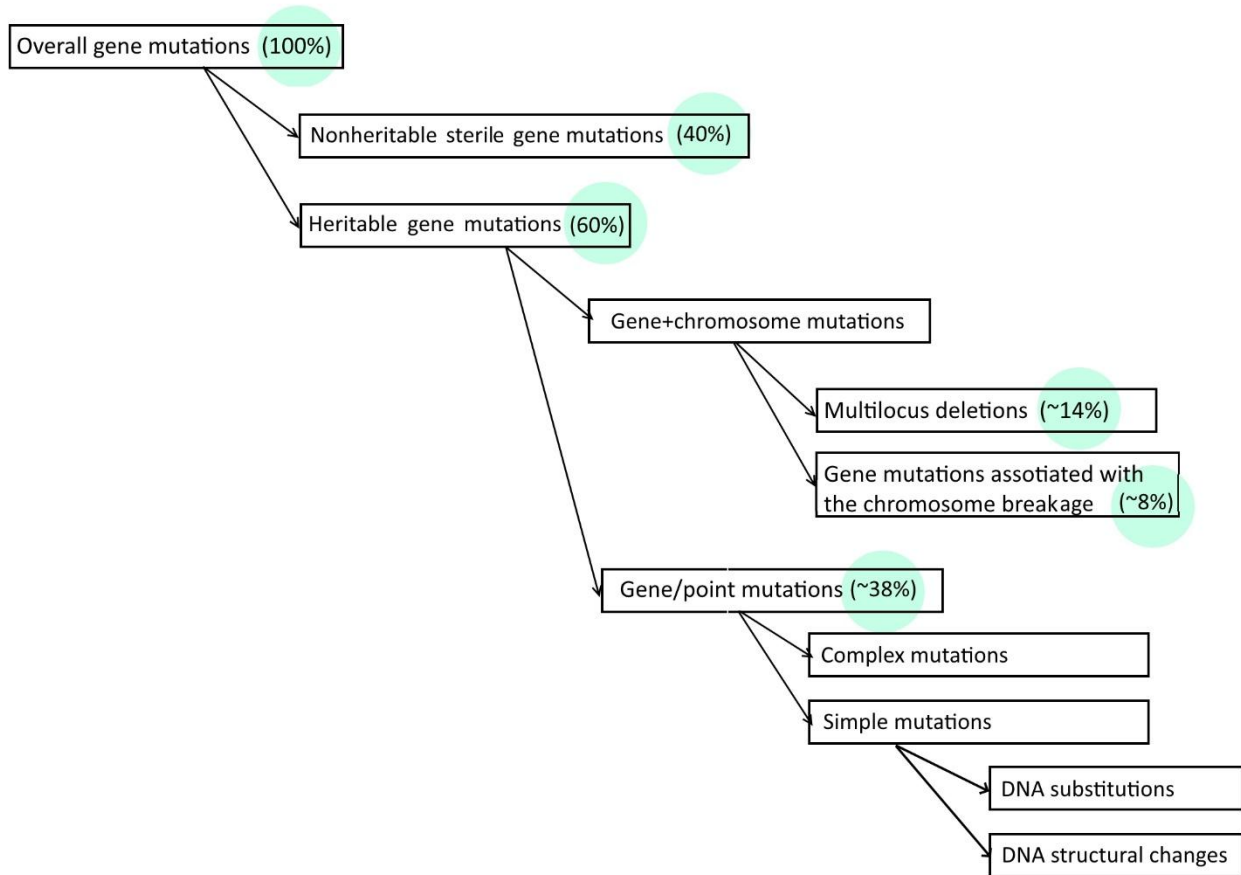


Fig. 2. Spectrum of  $\gamma$ -ray- or neutron-induced locus-specific mutations in the sperm cells of *Drosophila melanogaster* recovered by the genetic, cytogenetic and PCR-analysis.

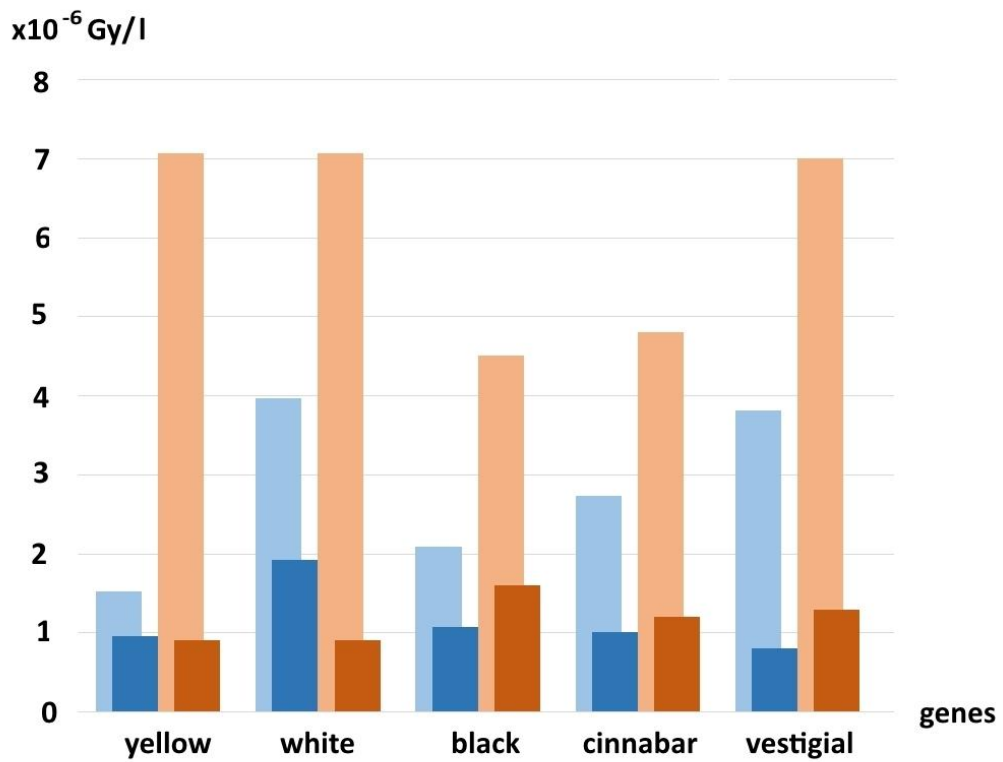


Fig. 3 The frequency ( $\times 10^{-6}/\text{Gy/l}$ ) of the gene (■) and genome (□) mutations induced by  $\gamma$ -ray (□■) and neutrons (□■) in the male germline of *Drosophila melanogaster*.

№	Mutations	Origin	The <i>vestigial</i> gene fragment studied															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
44	vg88b59	n, 2.5 Gy	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	vg88c3	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	vg88c64	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	vg88c87b	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	vg88c96	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	vg88b10	n, 5 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	vg88b32	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
51	vg88c30	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52	vg79d6	n, 10 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53	vg88c45	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54	vg88c62	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55	vg88c102	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	vg80i2	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	vg83i1	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58	vg83d	cf, 7 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59	vg82c13	cf 14 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	vg88f21	n + $\gamma$ , 15 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61	vg88g40	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62	vg79d5	n + $\gamma$ , 20 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63	vg88f66	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64	vg88g108	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	vg88h11	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66	vg88f33	n + $\gamma$ , 30 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	vg88g38	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68	vg88e94	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 4. The size and location of intragenic deletions induced by different doses of neutrons at the *vestigial* gene of *Drosophila melanogaster* recovered by the PCR technique. \*-a normal fragment, \*\* - lack of fragment

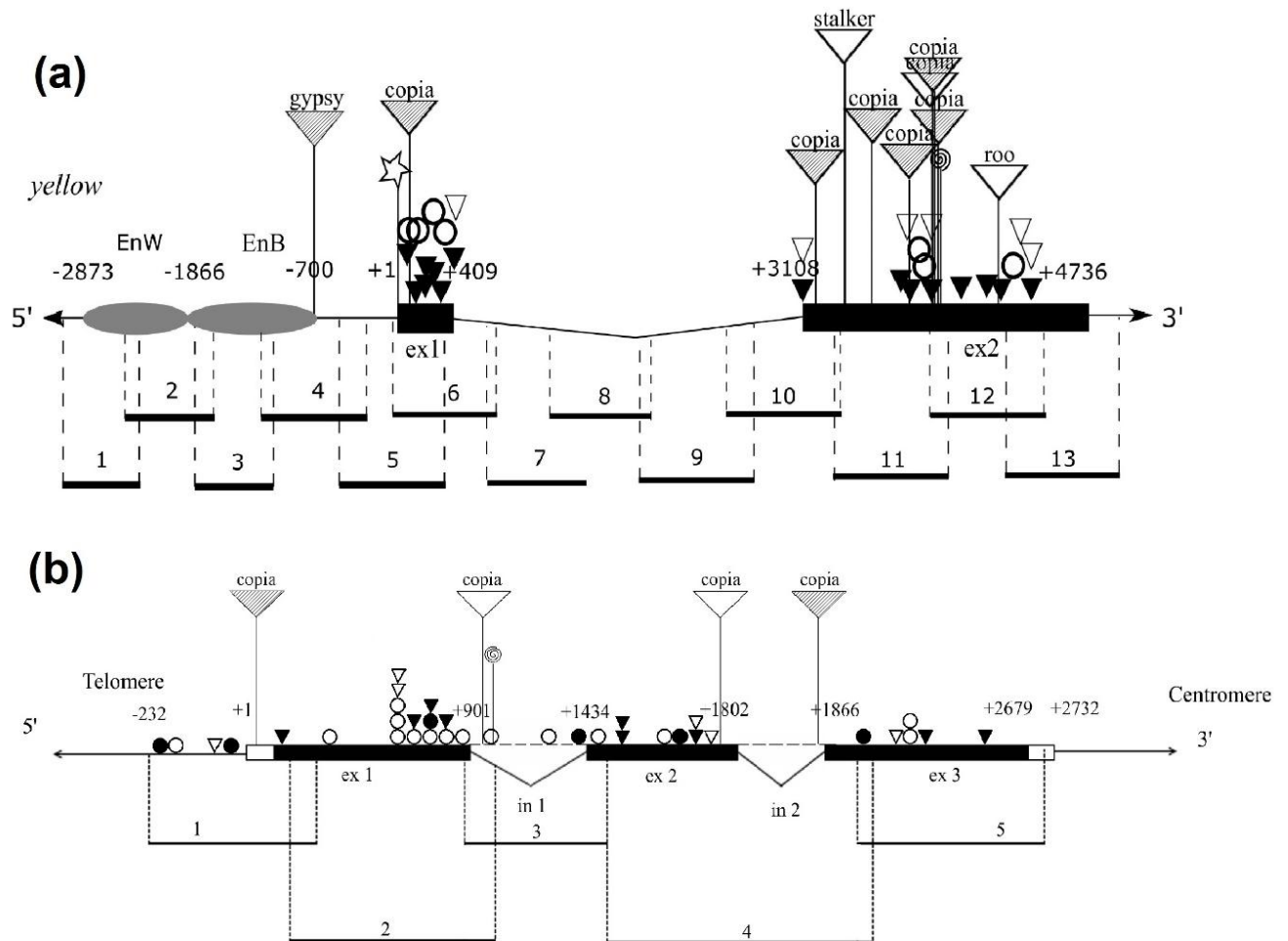


Fig. 5. Distribution of  $\gamma$ -ray-induced DNA changes on the linear map of the *yellow* (a) and *black* (b) genes of *Drosophila melanogaster*. ○ - base substitution, ● - substitution of > 2 bases, ▼ - microdeletion, ▽ - microinsertion, ▽, ⊙ - spontaneous insertion of a large retrotransposons or other genomic DNA, ▽ - the same insertions in radiation-induced mutants.

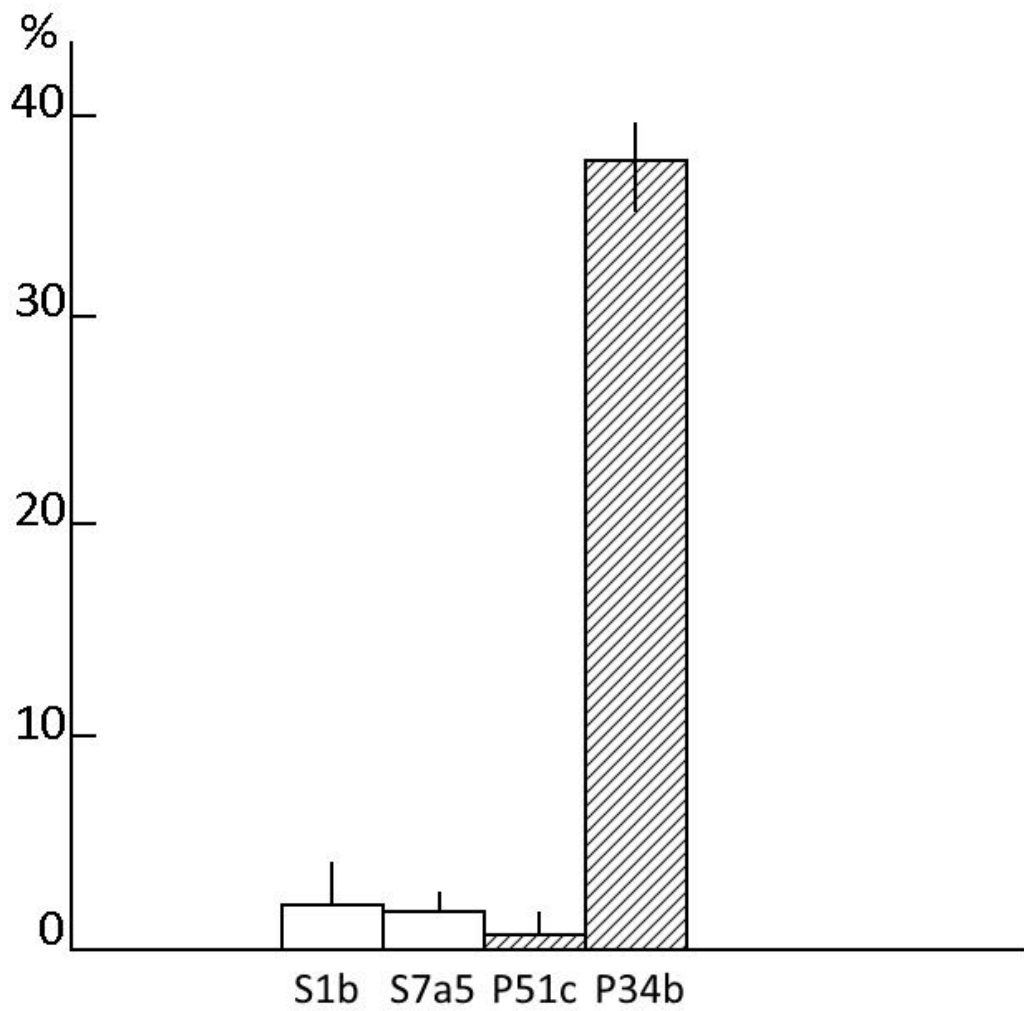


Fig. 6. Well-marked differences in the response (survival) to  $\gamma$ -ray- exposure (LD 80=12Gy) of four high-inbred lines of *Drosophila melanogaster* at the first instar larvae stage of ontogenesis.