

## ОТЧЕТ

По проекту Радиоген «Экспериментальное обоснование оценки генетического риска ионизирующей радиации по частоте наследуемых изменений ДНК структурных генов животных и человека»

**Целью** проекта являлось экспериментальное обоснование современного молекулярного подхода к оценке генетической опасности (риска) ионизирующей радиации при её действии на генеративные клетки животных организмов. В основе этого подхода должен лежать анализ характера и частоты наследуемых изменений ДНК гена, выявляемых современными методами молекулярной генетики и биологии (полимеразная цепная реакция - ПЦР и секвенирование).

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- Методом ПЦР изучить природу наследуемых изменений ДНК  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутаций пяти изучаемых генов и оценить характер зависимости этих изменений от дозы радиации;
- Методом секвенирования изучить характер, частоту и распределение на карте гена изменений ДНК, выявляемых этим методом;
- Определить частоту индукции наследуемых микро-изменений ДНК гена в расчете на 1Гр на 1 нуклеотид.
- На основании полученных данных о частоте индукции наследуемых изменений ДНК и данных литературы о спонтанной частоте таких изменений определить значение удваивающей дозы редко-ионизирующего излучения как максимально допустимой при оценке генетической опасности радиации для популяций животных и человека.

Экспериментальным материалом для достижения поставленной цели являлись  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированные мутации пяти генов *Drosophila melanogaster* разной величины, внутренней экзон-интронной организации и локализации в геноме (на политенных хромосомах) (рис. 1).

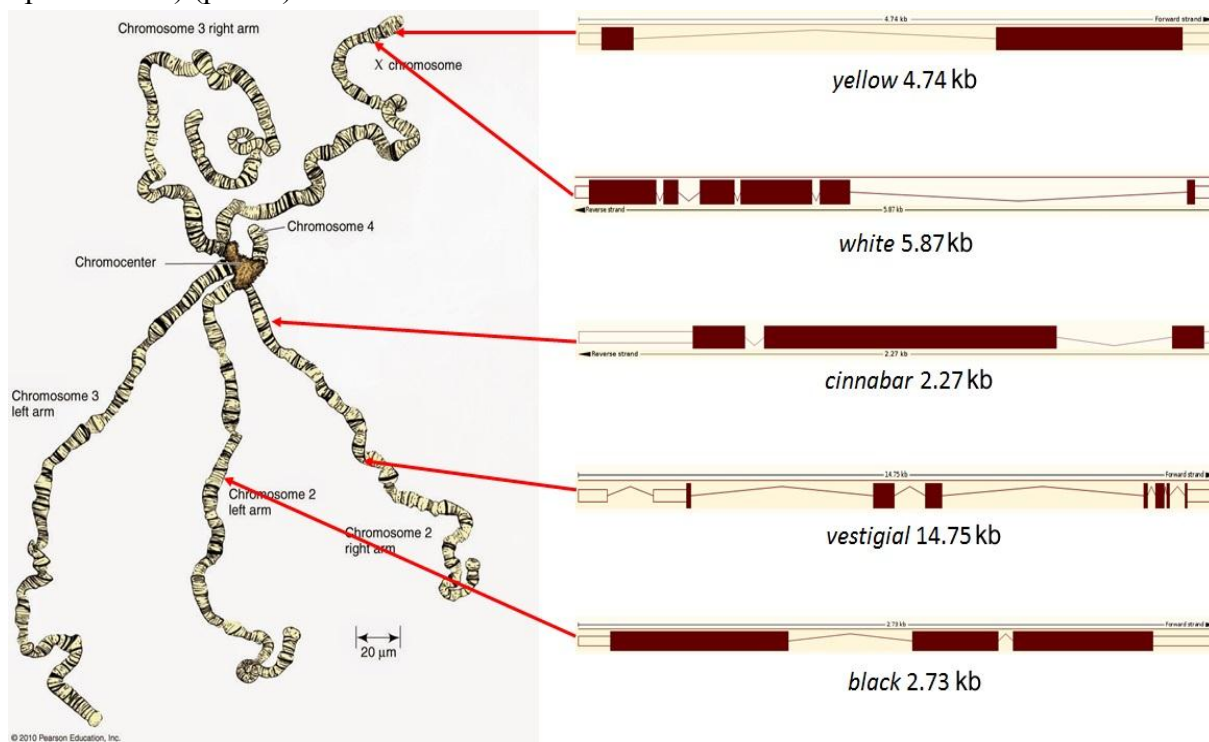


Fig. 1. The size, molecular organization and location on the polytene chromosomes of the five *Drosophila melanogaster* genes radiation-induced mutations of which were studied.

Спонтанные и радиационно-индуцированные мутации названных генов были получены путем скрещивания интактных или облученных самцов дикой лабораторной линии Д-32 с самками тестер-линии KL, имеющими генотип  $In(1)sc^8 + dl-49, y^{31d} sc^8 w^a; b^1 cn^1 vg^1$ . Среди регулярного потомства первого поколения отбирались мутанты с фенотипом того или иного из названных генов. Последующий генетический и цитогенетический анализ каждой мутантной особи позволил установить сложный спектр генетических изменений, лежащих в основе изучаемых мутаций. Тем не менее в нем можно выделить два главных класса мутаций: в основе первого из них лежат наследуемые рецессивные летали в виде структурных изменений генома, так или иначе затрагивающих изучаемый ген, тогда как второй класс представлен рецессивными, наследуемыми по менделевскому типу, изменениями внутри гена (так наз. «точковые» мутации) (рис. 2).

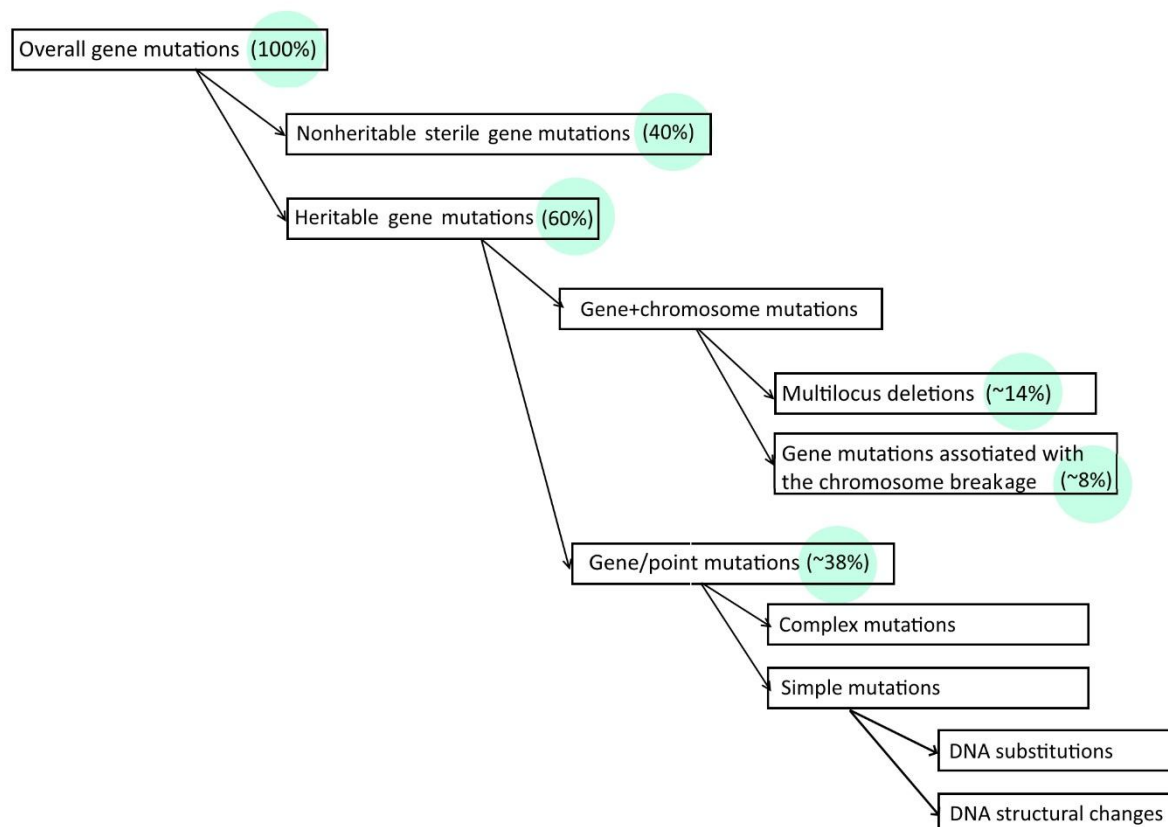


Fig. 2. Spectrum of  $\gamma$ -ray- or neutron-induced locus-specific mutations in the sperm cells of *Drosophila melanogaster* recovered by the genetic, cytogenetic and PCR-analysis.

Именно рецессивные «точковые» мутации лежат в основе почти половины наследственных генетических болезней человека, молекулярная природа которых в настоящее время систематически изучается. В этой связи изучение молекулярной природы спонтанных и радиационно-индуцированных «точковых» мутаций стало основным направлением экспериментальных исследований в рамках данного проекта.

Первым этапом этих исследований стало изучение изменений структуры ДНК у мутаций пяти изучаемых генов методом ПЦР. Согласно полученным результатам, основанным на 2500 реакций ПЦР для всех пяти генов, общая картина регистрируемых изменений близко совпадает и включает две основные категории мутаций, в основе которых лежат микроизменения ДНК не идентифицируемые этим методом (ПЦР<sup>+</sup>-

мутанты), и мутации в виде делеций ДНК разной величины и локализации на карте гена (ПЦР<sup>-</sup>-мутаты) (Рис. 3).

№	Mutations	Origin	The vestigial 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	vg80l2	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	vg83l1	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58	vg83d	cf, 7 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59	vg82c13	cf 14 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	vg88f21	n + γ, 15 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61	vg88g40	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62	vg79d5	n + γ, 20 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63	vg88f66	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64	vg88g108	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	vg88h11	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66	vg88f33	n + γ, 30 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	vg88g38	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68	vg88e94	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 3. As example, 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

Анализ соотношения двух категорий γ-индуцированных мутаций для отдельных генов показал, что ПЦР<sup>+</sup>-мутанты в 2-3 раза возникают чаще, чем ПЦР<sup>-</sup> (p<0.001). Эта картина сохраняется в диапазоне доз 10-40Гр (Рис.4).

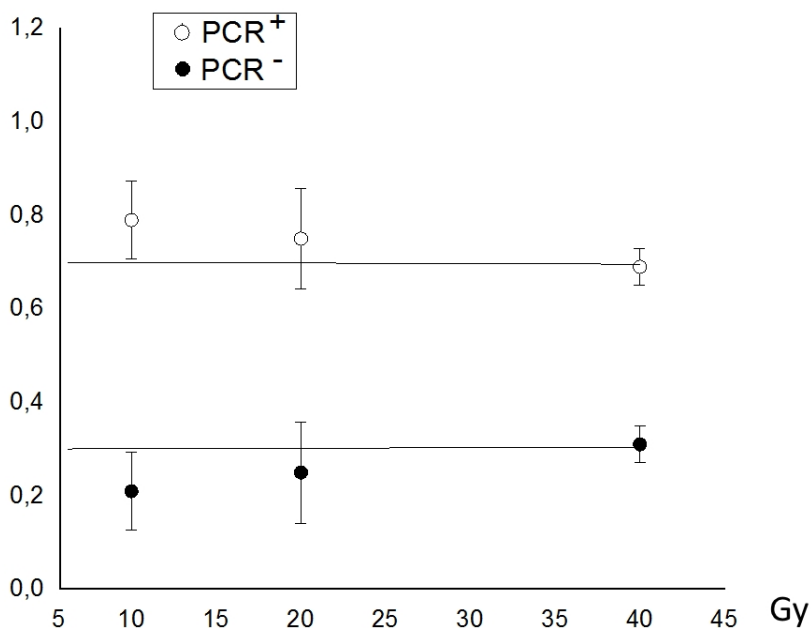


Fig. 4. The dose-effect dependence of PCR<sup>+</sup> and PCR<sup>-</sup>-mutants for five *Drosophila melanogaster* genes studied after action of <sup>60</sup>Co γ- irradiation.

Однако, при действии нейтронов картина относительной частоты тех и других ПЦР-мутантов отличается от таковой для  $\gamma$ -излучения, а именно, относительная частота ПЦР<sup>+</sup>-мутантов с ростом дозы растёт, а ПЦР<sup>-</sup>-мутантов - снижается. Причем, суммарно по всем дозам нейтроны в 2 раза эффективнее в индукции ПЦР<sup>+</sup>- мутантов по сравнению с ПЦР<sup>-</sup>-мутантами (Рис 5).

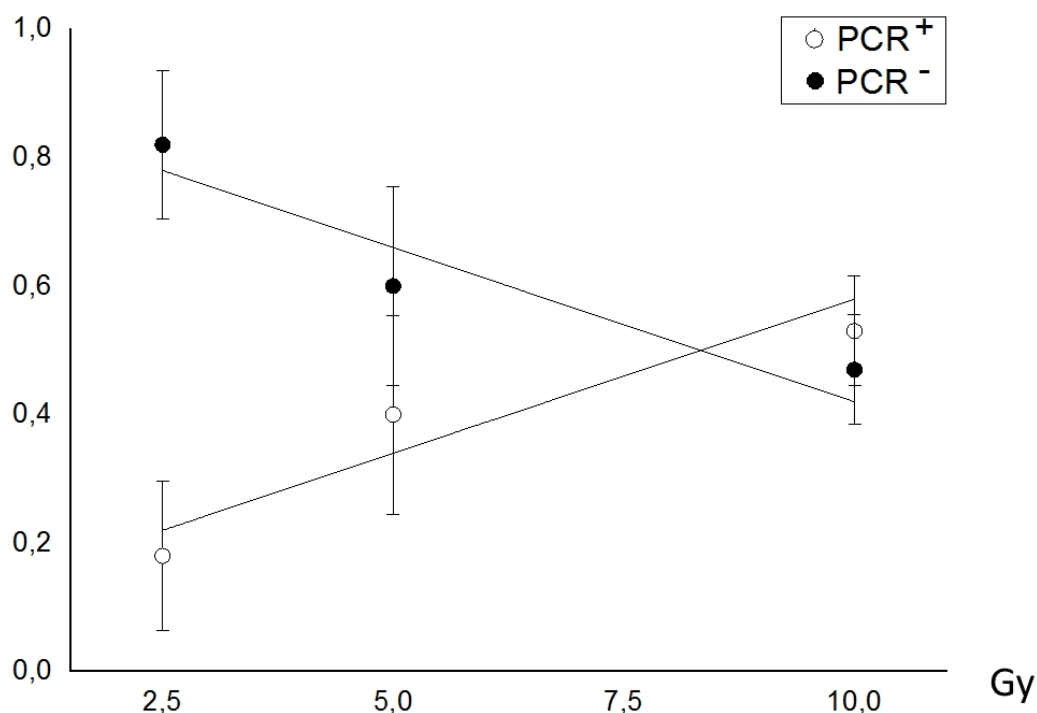


Fig. 5. The dose-effect dependence of PCR<sup>+</sup> and PCR<sup>-</sup> mutants for five *Drosophila melanogaster* genes studied after action of fission neutrons.

Это показывает, что в основе ПЦР<sup>-</sup> мутаций могут лежать структурные изменения гена, в индукции которых нейтроны более эффективны, чем  $\gamma$ -излучение, для выяснения природы которых требуется проведение самостоятельных исследований. В контексте настоящего проекта детально была изучена методом секвенирования молекулярная природа ПЦР<sup>+</sup> мутаций.

Анализ результатов завершённых работ по секвенированию спонтанных и индуцированных ПЦР<sup>+</sup>-мутантов сцепленного с полом гена *yellow* (изучено всего 30 мутантов) и аутосомного гена *black* (изучено всего 34 мутанта) показал, что в их основе могут лежать разные изменения ДНК, среди которых общими для двух генов являются замены отдельных оснований ДНК, микроделеции (1-53 пн), микроинсерции (1-15 пн), делеции + инсерции и крупные инсерции (> 5 тыс. пн) (Рис. 6,7). Специфичными для гена *black* оказались изменения в виде замен 2-3-х смежных оснований ДНК (6 случаев среди 45 выявленных изменений или 13,3%), а также генной конверсии (6 случаев из 465 или 13,3%) (Рис. 7).

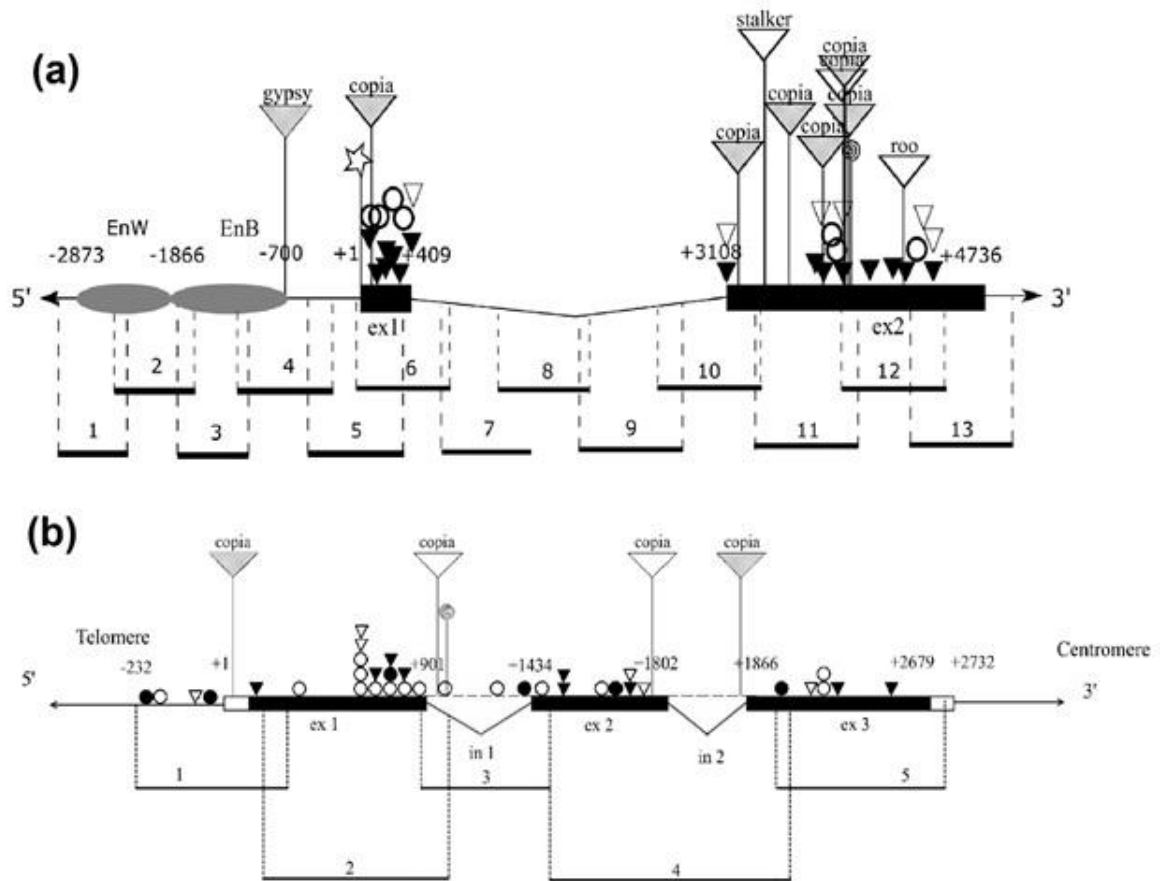


Fig. 6. Distribution of  $\gamma$ -ray-induced DNA changes on the linear map of the *yellow* (a) and *black* (b) genes of *Drosophila melanogaster*. ○ - base substitution, ● - substitution of > 2 bases, ▼ - micro-deletion, ▽ - micro-insertion, ▽, ⊙ - spontaneous insertion of a large retrotransposons or other genomic DNA, ▽<sup>copia</sup> - the same insertions in radiation-induced mutants.

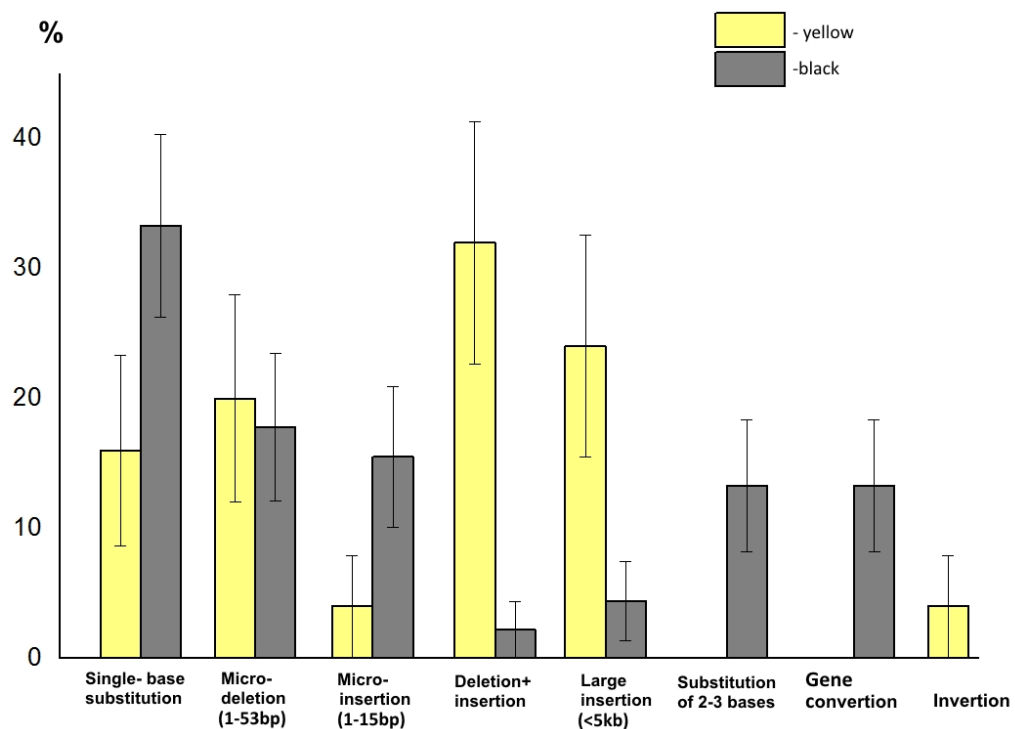


Fig.7. Spectra of  $\gamma$ -ray-induced DNA changes at the *yellow* and *black* genes of *Drosophila melanogaster*

Неожиданно высокой оказалась частота генной конверсии среди нейтрон-индуцированных ПЦР<sup>+</sup>-мутантов гена *black* (18 случаев среди 24 выявленных изменений ДНК или 75%). В основе остальных нейтрон-индуцированных ПЦР<sup>+</sup>-мутантов, как и в случае  $\gamma$ -излучения лежали крупная инсерция ретротранспозона (1 случай), микроделеция (1 случай), делеция+инсерция (1 случай), замены оснований (2 случая) и крупная делеция (1 случай) (Рис. 8). Обнаружение генной конверсии, т.е. замещение облученного отцовского гена *black*<sup>+32</sup> интактным материнским *black*<sup>1</sup> стало возможным после секвенирования аллеля *black*<sup>1</sup> и установления тех изменений его ДНК, по которым он

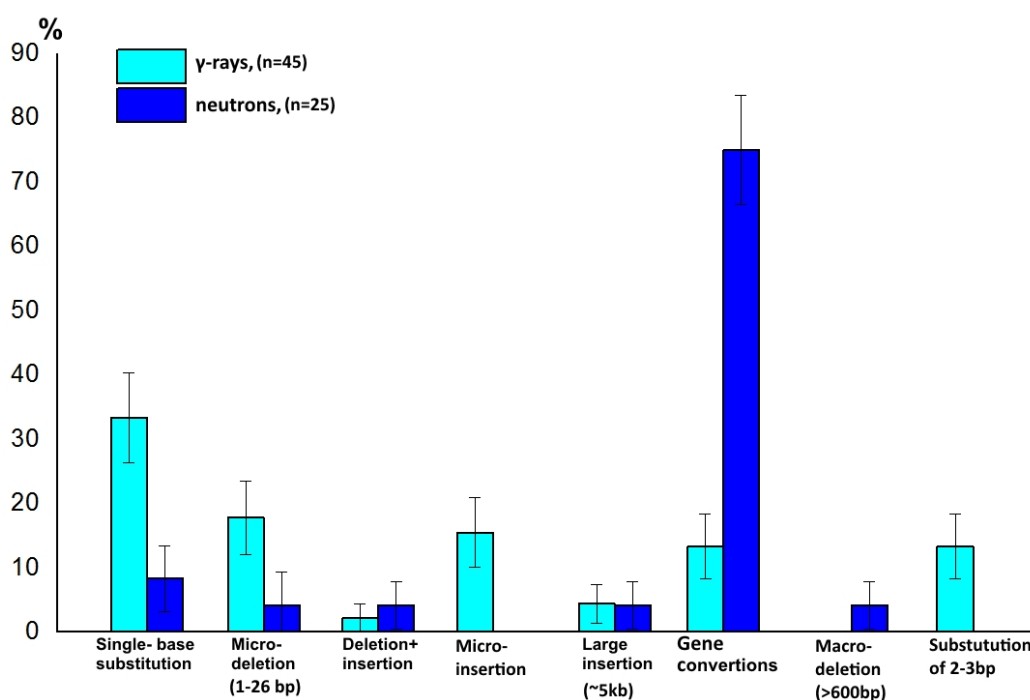


Fig.8. The relative frequency of different DNA changes induced by  $\gamma$ -rays and neutrons at the *black* gene of in *Drosophila melanogaster*

отличался от дикого аллеля *black*<sup>+32</sup> (всего 26 полиморфных сайтов) на всем протяжении гена. Полное, а в ряде случаев частичное, замещение одного аллеля другим свидетельствует о репарации по механизму межаллельной гомологичной рекомбинации, которая впервые нами установлена на стадии ранней зиготы в период первого объединения гаплоидных геномов самки и самца. Тот факт, что после действия нейтронов частота генной конверсии почти в 6 раз выше, чем после  $\gamma$ -излучения (Рис. 8)

,8) показывает, что нейтрон-индуцированные первичные повреждения ДНК (локальные кластеры одно-и двунитевых разрывов) в геноме облученного спермия репарируются уже в ранней зиготе, главным образом, по механизму генной конверсии.

Анализ распределения на карте генов *yellow* и *black*  $\gamma$ -индуцированных микроизменений ДНК разного типа, выявленных секвенированием (Рис. 7) позволил предположить о неслучайном их положении с тенденцией к кластеризации в определенных районах гена. Проверка 0-гипотезы о случайном характере распределения таких изменений с помощью критерия  $\chi^2$  показала, что она справедлива для гена *yellow*, но не для *black*, для которого достоверно наблюдается ( $p < 0,001$ ) кластеризация микроизменений ДНК в 3'-конце экзона 1 гена (Рис. 9).

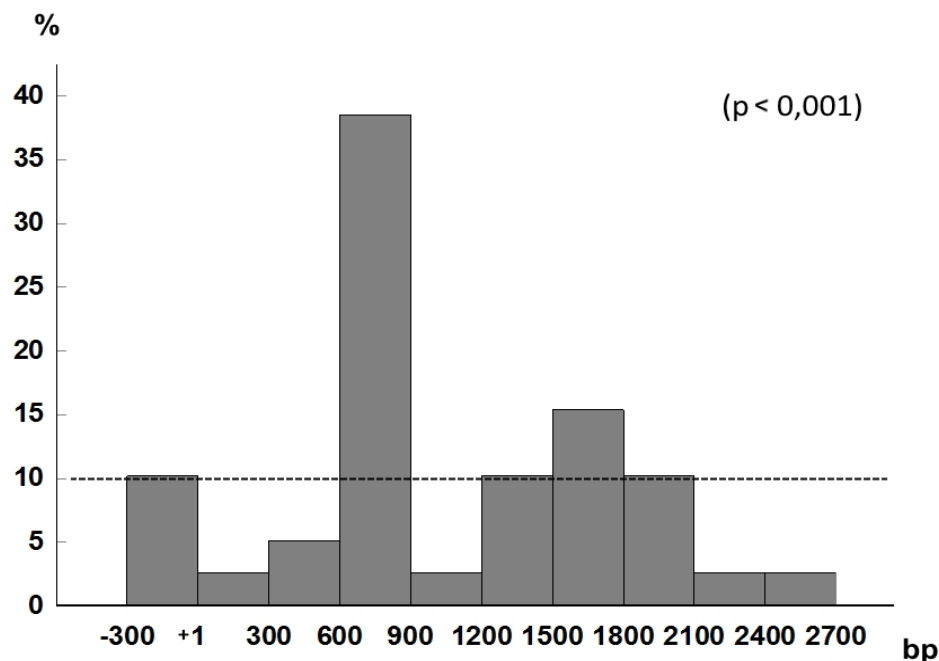


Fig. 9. Distribution of  $\gamma$ -ray-induced DNA micro-changes on the *black* gene map underlying the point mutations in *Drosophila melanogaster*

Полученные для гена *black* результаты секвенирования  $\gamma$ -индуцированных изменений в дозе 40Гр, как наиболее полные, позволяют впервые определить частоту замен оснований в расчете на 1 Гр и 1 нуклеотид, которая оказалась равной  $2,1 \times 10^{-9}$  / Гр/нуклеотид. Знание спонтанной частоты таких замен в геноме *Drosophila melanogaster* ( $3,5 \times 10^{-9}$  /нуклеотид/поколение), установленной другими авторами (P.D. Keightley et al, 2017), и полученное нами значение частоты  $\gamma$ -индуцированных замен оснований в геноме этого же организма позволяют получить первую оценку величины удваивающей дозы редко-ионизирующего излучения на молекулярном уровне, которая оказывается равной  $3,5 \times 10^{-9}$  /нуклеотид/ $2,1 \times 10^{-9}$ /Гр/нуклеотид= 1,7 Гр. Эта сугубо предварительная оценка удваивающей дозы как критерия генетической опасности (риска) ионизирующей радиации будет уточняться после завершения в текущем году работ по секвенированию трех других изучаемых генов. Эти работы в настоящее время успешно продолжаются.

По результатам проведенных исследований в рамках текущего проекта опубликовано 4 статьи в отечественном профильном рецензируемом журнале «Радиационная биология. Радиоз экология», а также сделаны устные доклады на нескольких конференциях и рабочих совещаниях.

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

И.Д. Александров

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА

К.П. Афанасьева