

На правах рукописи

ДАВКОВА Лилиана Николаевна

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ  
РАДИАЦИОННОГО МУТАГЕНЕЗА ГЕНОВ *BLACK*  
И *CINNABAR DROSOPHILA MELANOGASTER*

03. 1 — Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2013

Работа выполнена в Научно-экспериментальном отделе фазотрона  
Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Дзелепова  
Объединённого института ядерных исследований, г. Дубна.

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

**Официальные оппоненты:**

**Засухина Галина Дмитриевна** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, главный научный сотрудник;

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

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

Защита состоится «        »                    2013 года в **15:00** час. на заседании диссертационного совета Д 501.001.65 при МГУ им. 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 им. 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

Современные молекулярно-генетические исследования по изучению природы генных мутаций, индуцированных ионизирующими излучениями, ведутся в основном на соматических клетках *in vitro* или *in vivo* с определением мутационных изменений, главным образом, в виде делеций всего или части гена методами блот-гибридизации или полимеразной цепной реакции (ПЦР) и в редких случаях методом секвенирования (UNSCEAR 2000 Report Vol. II).

Аналогичные исследования по выяснению молекулярной природы радиационно-индуцированных генных мутаций в генеративных клетках главных для радиационной генетики лабораторных тест-объектов (дрозофила, мышь) остаются немногочисленными, а их результаты фрагментарны, поскольку получены на ограниченном материале. В частности, первые молекулярно-генетические работы с использованием метода блот-гибридизации показали, что в основе генных мутаций, индуцированных редко-ионизирующим излучением, как у дрозофилы (Ashburner et. al., 1982; Kelley et. al., 1985), так и у мыши (Rinchik et. al., 1993) лежат, в основном, молекулярные делеции варьирующей величины. Близкие результаты получены и для генных мутаций в опытах на дрозофиле с нейтронами, как плотноионизирующим излучением (Pastink et. al., 1987). В то же время, использование метода секвенирования позволило обнаружить более широкий спектр рентген-индуцированных молекулярных изменений ДНК гена дрозофилы, включающий наряду с делециями/инсерциями и изменения на уровне отдельных оснований ДНК (Eeken et. al., 1994). Вопрос о характере молекулярных изменений, выявляемых методом секвенирования при индукции генных мутаций плотноионизирующими излучениями, в частности нейтронами, в генеративных клетках до сих пор остается открытым. Таким образом, ограниченность имеющихся данных для генеративных клеток затрудняет экстраполяцию на них результатов, полученных на соматических, и не позволяет выявить общие и специфические для двух типов клеток закономерности образования радиационно-индуцированных молекулярных изменений гена.

Важным и актуальным при проведении таких исследований является также изучение молекулярной природы мутаций разных генов в одних условиях эксперимента, что открывает перспективу для оценки характера модификации реакции гена на действие редко- и плотноионизирующего излучения такими его переменными параметрами, как величина, экзонно-интронная организация, положение на хромосоме и в 3D геноме. В процессе проведения этих исследований наибольший интерес представляет индукция первичных повреждений ДНК в гаплоидном геноме зрелых гамет (спермиев), поскольку репарация этих повреждений осуществляется репарационными системами зиготы после сингамии. Последующий молекулярно-генетический анализ реализованных предмутационных повреждений гена позволяет по характеру наблюдаемых изменений ДНК установить, активность какой репарационной системы в зиготе генерирует эти изменения.

Между тем знание молекулярной природы генных мутаций, индуцированных в генеративных клетках высших организмов ионизирующими излучениями с низкой и высокой ЛПЭ и особенно нейтронами, с которыми, как известно, человек все чаще сталкивается на Земле и в Космосе, имеет наряду с отмеченным выше фундаментальным и большое практическое значение. В самом деле, получение таких фундаментальных данных может стать экспериментальным обоснованием новых молекулярно-генетических подходов к сравнительной оценке риска редкоионизирующих излучений и нейтронов в индукции качественно разных молекулярных изменений гена, проявляющих себя в чреде поколений в виде дополнительного популяционно-генетического груза.

Вполне очевидно, что подобные исследования возможны лишь на немногих генетически хорошо изученных и относительно недорогих для эксперимента тест-объектах, среди которых в этом отношении наиболее перспективной остается плодовая мушка – *Drosophila melanogaster*.

**Цель и задачи работы.** Целью работы являлось сравнительное изучение молекулярной природы мутаций двух близких по величине и организации, но с

разной локализацией на хромосоме, генов *black*<sup>+</sup> и *cinnabar*<sup>+</sup> (*cn*<sup>+</sup>) *Drosophila melanogaster*, индуцированных ионизирующими излучениями с низкой и высокой ЛПЭ.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Систематизировать коллекционный материал для двух генов по характеру генетических изменений «точковой» или аберрационной природы, виду и дозе радиации.

2. Установить характер зависимости частоты мутаций «точковой» и аберрационной природы от дозы  $\gamma$ -излучения и нейтронов для двух генов и оценить ОГЭ нейтронов в индукции этих мутаций.

3. Изучить методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) характер и локализацию на карте двух генов регистрируемых изменений у  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов.

4. Провести сравнительный анализ секвенированных последовательностей ДНК родительских (контрольных) аллелей *black*<sup>1</sup> и *black*<sup>+32</sup> и спонтанных мутаций этого гена.

5. Проанализировать секвенированные последовательности оснований ДНК  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных аллелей *black* у «точковых» мутантов без выявляемых методом ПЦР изменений и определить характер доминирующих повреждений для двух видов радиации.

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

1. Геноспецифичность молекулярной картины радиомутабельности, установленная методом ПЦР, для двух изученных генов и видов радиации проявляется в доминировании делеционных мутантов у гена *cn*, находящегося в районе прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2R, и мутантов с «точковыми» изменениями у гена *black*, локализованного в средней части эухроматина хромосомы 2L.

2. У  $\gamma$ -индуцированных «точковых» мутантов *black* доминируют, согласно результатам секвенирования, однонуклеотидные изменения ДНК, а у нейтрон-индуцированных – изменения ДНК, специфичные для аллеля-маркера *black* из

материнской (родительской) тестер-линии.

3. Генная конверсия в ранней зиготе является одним из основных механизмов репарации ЛПЭ- зависимых повреждений ДНК, определяющих высокую ОГЭ нейтронов в индукции «точковых» мутаций гена *black*.

4. Конверсионный механизм репарации ЛПЭ- зависимых повреждений ведет к гомозиготности по уже имеющемуся у гетерозиготы  $F_1$  материнскому мутантному аллелю *black*<sup>1</sup>.

#### **Научная новизна работы.**

Впервые в одних условиях эксперимента на примере двух генов *D. melanogaster* и для двух видов радиации установлена геноспецифичность в молекулярной картине их радиомутабельности, проявляющаяся в доминировании мутантов *cn* с частичными делециями гена, а мутантов *black* – с «точковыми» изменениями, не определяемыми методом ПЦР.

Впервые показано образования генных («точковых») мутаций в генеративных клетках дрозофилы на основе нейтрон-индуцированных ЛПЭ-зависимых первичных повреждений ДНК.

Впервые установлена важная роль межallelльной рекомбинации по типу генной конверсии как механизма репарации ЛПЭ- зависимых предмутационных повреждений ДНК гена в облученных спермиях дрозофилы, функционирующего в ранней зиготе после сингамии.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были доложены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: 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 88 страницах, включает введения, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, приложение. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 10 таблицами. Список литературы насчитывает 145 источников, из них 24 отечественных и 121 зарубежных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Материалом для молекулярно-генетических исследований явились выборки спонтанных и радиационных мутантов генов *black* (2 355 п.н., 3 экзона и 2 интрона) и *cinnabar (cn)* (2 056 п.н., 3 экзона и 2 интрона) с разной локализацией на политенной аутосоме 2 *Drosophila melanogaster* (рис. 1), отобранных на основании протоколов опытов по изучению зависимости доза-эффект (2.5-60 Гр) и выживаемость-эффект (85.0-4.3%) после действия  $\gamma$ -излучения и нейтронов из генетической коллекции радиационных мутантов этого тест-организма (Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия) и систематизированных по характеру генетических изменений, виду радиации и дозе. Физические условия эксперимента, схема получения мутантов и результаты генетического и цитогенетического анализа подробно описаны в работах (Alexandrov, 1984; Александров и др., 2001). Здесь только необходимо отметить, что для получения мутаций названных генов использовался метод специфического локуса, когда облученные самцы из дикой лабораторной линии D32 скрещивались с самками *KL* генотипа:  $y\ Ins(1)\ sc^{s1} + sc^8 + dl49\ w^a (M5); b^1\ cn^1\ vg^1$  с инверсиями только в X хромосоме. Следовательно, формирование аутосомных мутаций *black* и *cn* в зиготе после сингамии происходило в условиях, не исключающих гомологичную рекомбинацию.

**Выделение ДНК.** Геномную ДНК выделяли из имаго гомо- или гемизиготных по мутациям генов *black* и *cinnabar* с использованием набора «Diatom® DNA Prep100» («ISOGEN», Россия).

**Полимеразная цепная реакция.** Молекулярный анализ мутационных изменений у «точковых» мутантов двух генов методом ПЦР проводили предварительно подразделив ген *black*<sup>+</sup> на 3, а ген *cn*<sup>+</sup> на 4 фрагмента (рис. 1з), к которым с помощью программ FAST-PCR и NCBI/Primer-BLAST были подобраны уникальные пары праймеров.

Аmplификацию фрагментов генов на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) проводили с использованием реагентов «GenPak® PCR MasterMix Core» («ISOGEN», Россия). Контрольной матрицей для ПЦР служила ДНК дикой лабораторной линии D32 или близкородственной линии D18.

Условия проведения ПЦР, предварительно оптимизированные по температуре отжига праймеров для каждого фрагмента, следующие: предварительная денатурация при 95°C - 5 мин. - 1 цикл; денатурация - 95°C, 1 мин., отжиг праймеров – 60-68°C, 30 с, синтез – 72°C, 1 мин. – 30 циклов; окончательная достройка – 72°C, 7 мин. Продукты реакции анализировали в 1% агарозном геле в присутствии этидиум бромид (0.5 мкг/мл). Размеры фрагментов, идентичные контрольным у данного мутанта свидетельствуют о наличии молекулярных изменений, не выявляемых методом ПЦР. Отсутствие одного или двух смежных фрагментов интерпретировали как частичную делецию гена. Результаты негативных реакций проверяли не менее 3 раз.

**Секвенирование.** Для секвенирования ген *black*<sup>+</sup> и его 5'- и 3'- смежные геномные районы (2911 п.н.) были подразделены на 5 перекрывающихся фрагментов (рис. 1д), к которым, используя программу NCBI/Primer-BLAST, были подобраны уникальные пары праймеров. ПЦР-продукты для секвенирования ДНК получали в следующих условиях: денатурация при 95°C – 5 мин. - 1 цикл; денатурация - 95°C, 1 мин., отжиг праймеров – 60-62°C, 30 с, синтез – 72°C, 1 мин. – 30 циклов; окончательная достройка – 72°C, 7 мин. Секвенирование полученных образцов ДНК проводили в ФГБУН НИИ Физико-химической медицины ФМБА (г. Москва, Россия). Сравнительный анализ секвенированных последовательностей из диких и мутантных аллелей



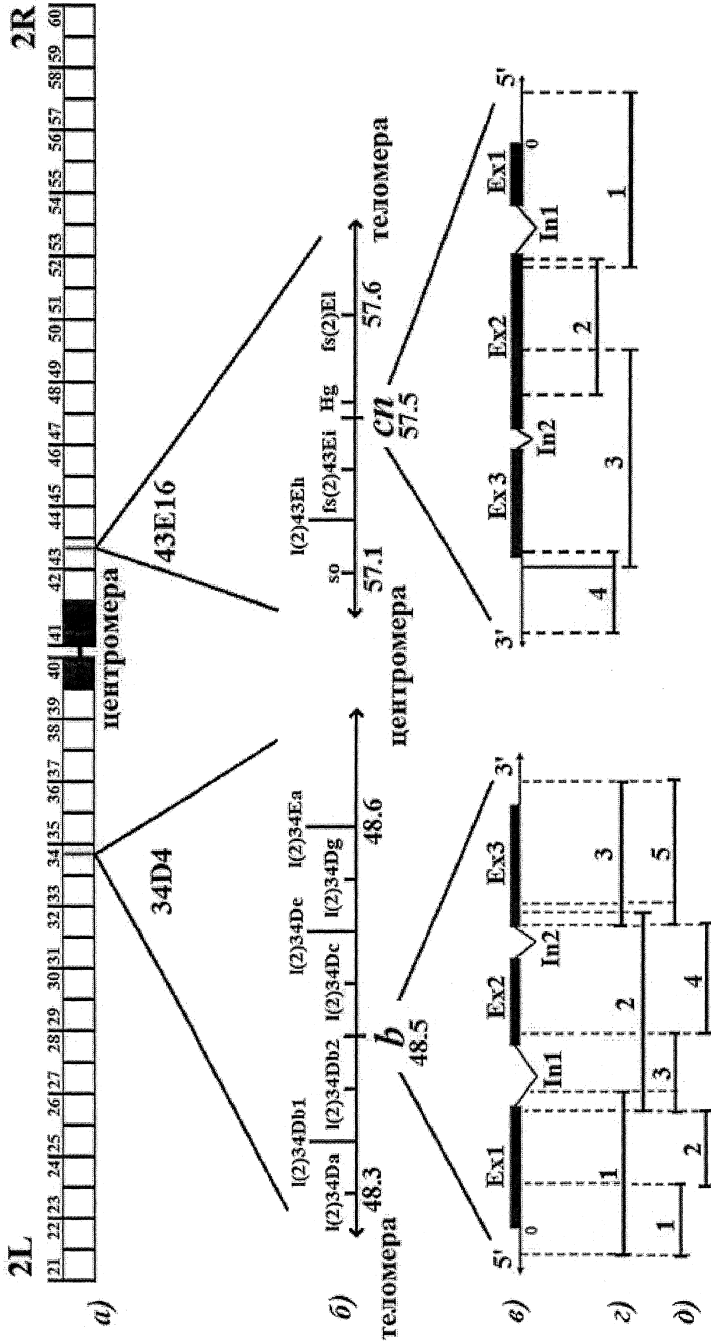


Рис. 1. (а) Схема политепной аутосомы 2L *D. melanogaster* и местоположение на ней генов *black<sup>+</sup>* и *cp<sup>+</sup>*; (б) генетические карты районов локализации двух изучаемых генов со смежными генами-маркерами; (в) экзонно-интронная организация двух генов; г) положение фрагментов-ампликонов, для ПЦР-анализа и д) секвенирования

гена *black* проводили, используя программу [http://helixweb.nih.gov/emboss\\_lite/compare.html](http://helixweb.nih.gov/emboss_lite/compare.html).

**Статистический анализ.** Графическую аппроксимацию зависимостей доза-эффект и выживаемость-эффект для отдельных классов мутаций обоих генов проводили с помощью программы Origin-pro8.1, а величину ОГЭ нейтронов определяли как отношение коэффициентов наклона кривых для нейтронов и  $\gamma$ -излучения. Достоверность различий между коэффициентами ОГЭ нейтронов для двух генов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Общая характеристика радиомутабельности генов.** Согласно результатам проведенной систематизации все радиационно-индуцированные мутанты двух генов были подразделены в соответствии с характером генетических и цитологических изменений на два основных класса – мутанты аберрационной (мутанты  $F_1$  с доминантной стерильностью, мультилокусные делеции, инверсии) и «точковой» природы.

Анализ кривых доза-эффект для всех выявленных в  $F_1$  аберрационных и «точковых» мутантов (рис.2) показывает, что зависимость частоты индукции разных типов мутаций линейна для двух генов и видов радиации. При этом однако, радиочувствительность гена *cn* по тесту «все мутанты  $F_1$ » существенно выше таковой гена *black* после действия  $\gamma$ -излучения ( $P < 0.05$ ), но не нейтронов (рис. 2б).

Анализ кривых доза-эффект отдельно для аберрационных (рис. 2в) и «точковых» (рис. 2г) мутантов показывает, что эти различия обусловлены более высокой частотой индукции  $\gamma$ -излучением мутантов *cn* аберрационной природы, где, как свидетельствует анализ спектра этих мутаций, преобладают в отличие от гена *black* структурные изменения в виде мультилокусных делеций. В самом деле, в общей выборке проанализированных особей  $F_1$  суммарно для всех доз обнаружено 15 мультилокусных делеций *cn* и только 5 делеций *black*. Таким образом, тест на мультилокусные делеции показывает наличие различий

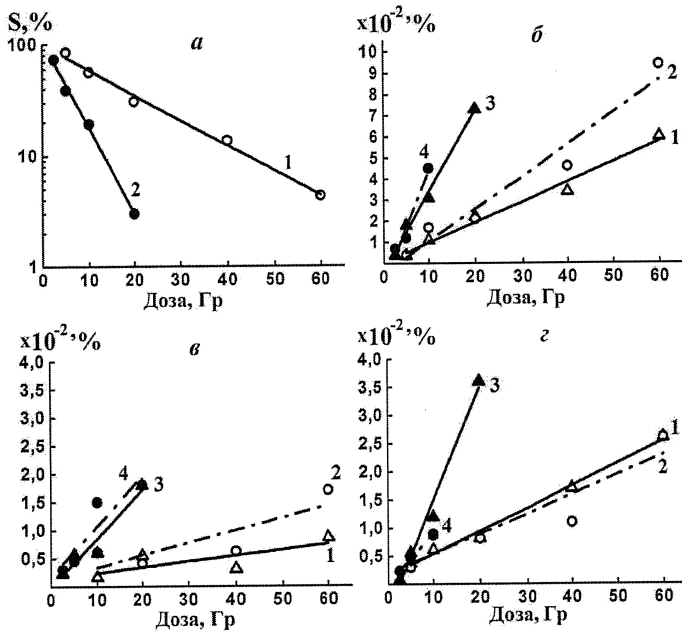


Рис.2. Зависимость доза-эффект по тестам: а – выживаемость зигот F<sub>1</sub> от яйца до имаго после (1) γ-облучения; (2) действия нейтронов; б - все выявленные в F<sub>1</sub> мутанты; в - мутанты абберрационной (без учета стерильных F<sub>1</sub>) и г - «точковой» мутаций *black* (1,3) и *cinnabar* (2,4) *D. melanogaster* после действия γ-квантов <sup>60</sup>Co (1,2) и нейтронов деления с E<sub>ср</sub>=0.85МэВ (3,4).

в радиочувствительности не столько самих генов, сколько районов аутосомы 2, где они локализованы (рис. 1).

Как видно из рис. 2, нейтроны более эффективно, чем γ-излучение индуцируют мутации обоих генов абберрационной природы. Однако их эффективность в индукции абберрационных мутантов *black* почти в 2 раза выше, чем для мутантов *cn* (значение коэффициентов ОГЭ равны 8.6 и 4.0, соответственно). Эти результаты вполне согласуются с классическими представлениями, основанными на теории мишени и принципе попадания, согласно которым плотноионизирующие излучения, а в данном случае

нейтроны, более эффективны, чем редкоизионирующие, в индукции аббераций хромосом. При этом нейтроны несколько более эффективны в индукции мутантов абберационной природы гена *cn*, чем *black*, хотя эти различия недостоверны ( $P > 0.05$ ).

Иная картина наблюдается при анализе сравнительной эффективности нейтронов в индукции «точковых» мутаций, где, как видно из рис. 2г, ОГЭ нейтронов по данному тесту для гена *black* намного выше (коэффициент равен 5.0), чем для гена *cn* (коэффициент равен 2.6) и эти различия статистически достоверны ( $P < 0.05$ ). В то же время, радиочувствительность двух генов к  $\gamma$ -излучению практически одинакова, что обусловлено, вероятно, близкими физическими размерами двух генов – «мишеней». На это еще более четко указывает анализ зависимости выживаемость-эффект (рис.3б).

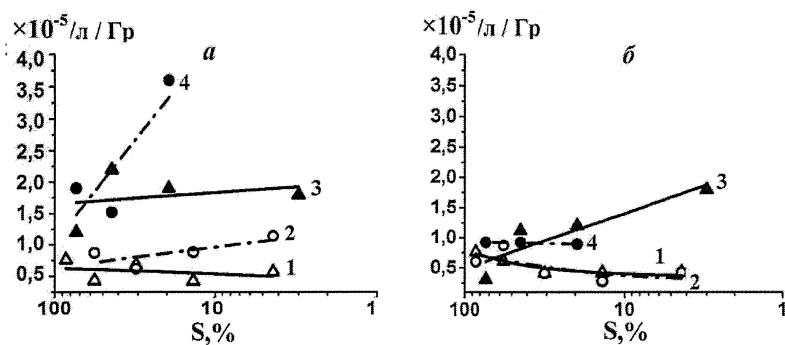


Рис.3 Зависимость выживаемость-эффект для (а) абберационных (с учетом стерильных F<sub>1</sub>) и (б) «точковых» (все в целом) мутаций *black* (1,3) и *cinnabar* (2,4) *D. melanogaster* после действия  $\gamma$ -квантов <sup>60</sup>Co (1,2) и нейтронов деления с E<sub>ср</sub>=0.85 МэВ (3,4).

Таким образом, по тесту «точковые» мутации гена *black* и в меньшей степени *cn* наблюдается парадоксально высокая эффективность нейтронов в их индукции, что не вполне согласуется с классической теорией мишени и принципа попадания. В целом полученные результаты позволяют говорить о геноспецифичности при индукции мутаций «точковой» и абберационной природы  $\gamma$ -излучением и нейтронами. Для выяснения молекулярной природы  $\gamma$ -

и нейтрон-индуцированных «точковых» мутаций двух генов на первом этапе был проведен молекулярно-генетический анализ этих мутаций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

**ПЦР- анализ.** В процессе молекулярно-генетического анализа предварительно была изучена этим методом структура ДНК тест-аллелей *black<sup>1</sup>* и *cn<sup>1</sup>* из материнской линии *KL*, с использованием которых регистрировали в  $F_1$  новые спонтанные и радиационные аллели этих генов. Согласно результатам ПЦР-анализа (табл. 1) все три изученных фрагмента гена *black<sup>1</sup>* идентичны контрольным из дикого аллеля линии D32, что и следовало ожидать, учитывая тот факт, что мутационным повреждением у *black<sup>1</sup>* является, как известно из литературы (Phillips at al., 2005), делеция (ATCC) с инсерцией (TACCTACC) в 1-м экзоне, не определяемая этим методом. В случае аллеля *cn<sup>1</sup>* полученные результаты показывают отсутствие смежных 3-го и 4-го фрагментов гена и этого результата следует ожидать, поскольку мутантный фенотип *cn<sup>1</sup>* обусловлен делецией около 1800 п.н. в конце 3-го экзона, где локализованы обратный праймер к изучаемому нами 3-му фрагменту и прямой праймер – к 4-му фрагменту гена. Учитывая возникшую нестабильность линии D32 в период проведения радиационных опытов и, как следствие, повышенную частоту спонтанных мутаций изучаемых генов (Александров, Александрова, 1994), которые могли стать частью выборки радиационных мутантов, был проведен молекулярный анализ 7-ми новых спонтанных аллелей *black* и 2-х аллелей *cn*, обнаруженных в контрольных экспериментах. Как видно из табл. 1, у 3-х мутантов *black* отсутствует 2-й фрагмент и у одного - третий. У одного из двух мутантов *cn* отсутствуют, как и у тестер-аллеля *cn<sup>1</sup>*, смежные 3 и 4-й фрагменты. Согласно табл.1, среди изученных 52  $\gamma$ -индуцированных «точковых» мутантов *black* лишь 6 (11.5%) имеют мутационные изменения в виде делеций того или иного фрагмента. Аналогичные изменения установлены у 20 (41.7%) среди 48 изученных  $\gamma$ -индуцированных «точковых» мутантов *cn*.

Таким образом  $\gamma$ -излучение в 3,6 раза чаще индуцирует внутригенные делеции у гена *cn* по сравнению с геном *black*.

Таблица 1. Результаты ПЦР-анализа родительских *black<sup>1</sup>* и *cn<sup>1</sup>* аллелей, а также спонтанных,  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов *black* и *cn D.melanogaster*.

Мутанты <i>black</i>				Мутанты <i>cn</i>				
Количество мутантов	Фрагменты гена			Количество мутантов	Фрагменты гена			
	1	2	3		1	2	3	4
<i>black<sup>1</sup></i>	+	+	+	<i>cn<sup>1</sup></i>	+	+	-	-
<b>Спонтанные</b>								
3	+	+	+	1	+	+	+	+
3	+	-	+	1	+	+	-	-
1	+	+	-					
<b>Всего</b>	<b>7</b>			<b>Всего</b>	<b>2</b>			
<b><math>\gamma</math>- индуцированные</b>								
46	+	+	+	28	+	+	+	+
1 (20Гр)	-	+	+	1 (5Гр)+4 (40Гр)	-	+	+	+
1 (40Гр)	-	-	+	1 (40Гр)	-	-	+	+
2 (5Гр)+1(40Гр)	+	-	+	1 (40Гр)	+	-	+	+
1 (10Гр)	+	+	-	1 (10Гр)+1(40Гр)	+	-	-	+
<b>Всего</b>	<b>52</b>			1 (40Гр)	-	+	-	+
				10 (40Гр)	+	+	-	-
				<b>Всего</b>	<b>48</b>			
<b>Нейтрон-индуцированные</b>								
11	+	+	+	3	+	+	+	+
1 (5Гр)	-	+	+	1 (10Гр)+1 (30Гр)	-	+	+	+
1 (10Гр)	+	+	-	1 (2,5Гр)+ 2 (20Гр,n+ $\gamma$ )	+	+	-	+
<b>Всего</b>	<b>13</b>			1 (2,5Гр)+2 (28Гр,Cf)	+	+	-	-
				<b>Всего</b>	<b>11</b>			

Примечание: Темным отмечен тот фрагмент, который отсутствует у данного мутанта; (+) – данный фрагмент гена идентичен контрольному фрагменту (аллели *black<sup>+32</sup>* и *cn<sup>+32</sup>*).

Близкая картина наблюдается и после действия нейтронов, где частота мутантов *cn* с аналогичными молекулярными изменениями (8 из 11, или 72.7%)

в 4.7 раза выше таковой для гена *black* (2 из 13 или 15.4%).

Таким образом, качественная картина молекулярных повреждений у двух генов для двух видов радиации близко совпадает и состоит из выявляемых (делеции фрагментов гена) и невыявляемых (скрытых) методом ПЦР «точковых» изменений. При этом однако, частота делеционных мутантов гена *sp* существенно выше, чем гена *black* после действия и  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  и нейтронов, что свидетельствует о выраженной геноспецифичности в действии редко- и плотноионизирующей радиации на молекулярном уровне.

Необычную картину радиомутабельности гена *black* (исключительно высокая частота индукции нейтронами «точковых» мутантов, а также исключительно низкая частота таких мутантов с частичными делециями гена, выявляемыми ПЦР), можно, по-видимому, объяснить высокой частотой возникновения в данном гене микромолекулярных делеций, не выявляемых этим методом, но в индукции которых нейтроны более эффективны, чем  $\gamma$ -излучение. С целью проверки этого предположения было проведено секвенирование ДНК у случайной выборки  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов *black* без изменений, выявляемых методом ПЦР.

**Результаты секвенирования.** Предварительно, до анализа радиационных мутантов были изучены, в качестве контроля, последовательности ДНК облучаемого исходного дикого аллеля *black*<sup>+32</sup> и тестер-аллеля *black*<sup>l</sup> из материнской линии *KL*, с самками которой скрещивались интактные и облученные самцы линии D32.

Согласно результатам секвенирования, последовательности экзонов и интронов аллеля *black*<sup>+32</sup> оказались идентичными описанным в литературе для диких аллелей из других лабораторных линий. Также было подтверждено наличие основного мутационного повреждения у аллеля *black*<sup>l</sup> (табл. 2) из линии *KL*, включая 27 замен оснований в разных районах гена.

Результаты секвенирования трех спонтанных мутаций *black*, обнаруженных в контрольных опытах в период нестабильности линии D32 вследствие транспозиции элемента  *copia* (Александров, Александрова, 1994) показали, что

все 3 из них имеют последовательности, идентичные аллелю *black*<sup>1</sup>, но один мутант (b88c30) оказался комплексным, имея ДНК как аллеля *black*<sup>1</sup>, так и *black*<sup>+32</sup> (табл.2).

Таблица 2. Природа и локализация изменений нуклеотидных последовательностей ДНК у аллеля-маркера *black*<sup>1</sup>, спонтанных,  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов *black D. melanogaster*.

Код мутации	Доза, Гр	Характер изменений и их локализация	Нормальные и измененные последовательности оснований ДНК
<b>Спонтанные мутанты</b>			
<i>black</i> <sup>1</sup>		Экзон 1: Делеция ATCC с инсерцией TACCTACC (+530); 27 замен оснований в разных районах гена	5'-GTGG <u>ATCC</u> ATAС-3'→ V V P T 5'-GTGG <u>TACCTACC</u> ATA-3' V D P Y I
b87h6 b94l13		Аналогично <i>black</i> <sup>1</sup>	
b88c30		Аналогично <i>black</i> <sup>1</sup> : 5'-геномная ДНК, экзон 1, интрон 1с транзицией +1169; экзон 3 с транзиции (+1866) до транзиции (+2215)	Аналогично <i>black</i> <sup>+</sup> : интрон 1 после транзиции +1169, экзон 2, интрон 2 и 5'-конец экзона 3 до транзиции (+1866)
Всего	4		
<b><math>\gamma</math>-индуцированные мутанты</b>			
b79d2 b81a2	40 60	Аналогично <i>black</i> <sup>1</sup>	
b81k	20	Экзон 1: делекция G (+594)	5'-TACGAG <u>G</u> TGGCTCCA-3'→ Y E V A P



			5'-TACGAGTGGCTCCAC-3' Y E W L H
b78f1	40	Интрон 1: трансверсия T→G (+764) Экзон 2: делеция G (+1340)	5'-AGG <u>T</u> GAGTG-3'→5'-AGG <u>G</u> GAGTG-3' ↑ ↑ 5'-ACCTCG <u>G</u> AGGACGCG-3'→ T S E D A 5'-ACCTCGAGGACGCGC-3' T S R T R
b78k2	40	Экзон 1: делеция A (+105)	5'-TTGAC <u>A</u> GCGACGGCA-3'→ L T A T A 5'-TTGACGCGACGGCAG-3' L T R R Q
b88d50	40	Интрон 1: замена GC→AA (+1291) Экзон 2: трансверсия G→T (+1301)	5'-AATCC <u>G</u> CAG-3'→5'-AATCC <u>AA</u> AG-3' ↑ ↑ 5'-AAC <u>G</u> GACTC-3'→5'-AACT <u>T</u> GACTC-3' N G L N STOP L
b88d70	40	Экзон 3: делеция GGCCAAGGTG A (+2016)	5'-TTCAC <u>GGCCAAGGTG</u> AGGGAG-3'→ F T A K V R E 5'-TTCACGGGAGCGTCC-3' F T G A S
b88d39	60	Экзон 3: делеция TGT с инсерцией CC (+1780)	5'-CAG <u>TGT</u> TCC-3'→5'-CAG <u>CCCT</u> CCA-3' O C S O P P
<b>Всего</b>	<b>8</b>		
<b>Нейтрон-индуцированные мутанты</b>			
b88c4	2,5	Аналогично	
b79d11	10	<i>black<sup>1</sup></i>	
b79a3	«		
b83f3	«		
b88c8	«		
b81c	20		
b79a1	10	Аналогично <i>black<sup>1</sup></i> и в экзоне 1 делеция GAC с	5'-TTT <u>GAC</u> TTTC-3'→5'-TTT <u>CCCTTCC</u> TTTC-3' F D F F P S F

		инсерцией ССТТСС (+406)	
<b>Всего</b>	<b>7</b>		
<b>Мутанты после комбинированного (нейтроны+γ-кванты) облучения</b>			
b88f5 b88g15 b88g97 b88l71 b88f69 b88g22	15 « « 20 « 30	Аналогично <i>black</i> <sup>l</sup>	
b79d8	20	Экзон 3: делеция САССАГ (+1801)	5'-CGTCACCAGCAG <sup>3'</sup> →5'CGTCAGGTGCTG <sup>3'</sup> R H Q Q R Q V L
b88e55	30	Экзон 3: делеция ТТСГАССААТГ СГАСАТАС (+1826)	5'-CAATTCGACCAATGCGACATACTTGTTCC <sup>3'</sup> H S T N A I Y L F 5'- CATGTTCC -3' H C S
<b>Всего</b>	<b>8</b>		

Сравнительный анализ ДНК γ-индуцированных мутантов с последовательностью ДНК из аллеля *black*<sup>+32</sup> показал наличие делеции в 1 основании у 3-х мутантов, делеции (TGT) с инсерцией (CC) у одного и делеции из 11 п.н. еще у одного мутанта (табл.2). Мутант b88d50 оказался комплексным, имея замену GC→AA в интроне 1 вблизи места сплайсинга и транзицию G→Т в экзоне 2, ведущую к стоп-кодону. Два остальных γ-индуцированных мутанта имели ДНК с молекулярными маркерами аллеля *black*<sup>l</sup>.

Замена ДНК аллеля *black*<sup>+32</sup> на ДНК аллеля *black*<sup>l</sup> наблюдается и у 13 нейтрон-индуцированных мутантов, причем у одного из них (b79a1) обнаружена дополнительно в экзоне 1 делеция (GAC) с инсерцией (ССТТСС) (табл.2). Два оставшихся нейтрон-индуцированных мутанта с последовательностью аллеля *black*<sup>+32</sup> имели делецию из 19 п.н. в экзоне 3 (мутант b88e55) и делецию в 6 п.н также в экзоне 3 (мутант b79d8) (табл. 2). Как эти, так и γ-индуцированные делеции размером более 1 п.н. фланкированы короткими прямыми повторами.

Таким образом, наше предположение о том, что нейтроны высоко эффективно индуцируют микромолекулярные изменения ДНК, которые не детектирует метод ПЦР, и именно эти повреждения лежат в основе «точковых» мутаций *black*, в индукции которых нейтроны оказались высоко эффективны, не подтверждают результаты секвенирования ДНК таких мутантов. Вместо этого, у большинства нейтрон-индуцированных мутантов наблюдается замещение облученного аллеля *black*<sup>+32</sup> на аллель *black*<sup>l</sup> из материнской линии. В то же время, у  $\gamma$ -индуцированных мутантов доминирующими являются однонуклеотидные изменения. Разный характер изменений ДНК у  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных мутантов позволяет предполагать и качественно разную природу первичных повреждений для этих видов радиации. Тот факт, что два  $\gamma$ -индуцированных мутанта имеют ДНК аллеля *black*<sup>l</sup>, а два нейтрон-индуцированных – небольшие делеции, показывает, что в спектре  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных повреждений ДНК имеются общие компоненты, репарируемые одними и теми же репарационными системами, следствием работы которых и являются наблюдаемые мутационные изменения.

Описанные выше изменения в последовательностях ДНК  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных мутантов *black* позволяют проследить связь отдельных типов изменений с определенными, функционирующими в ооците дрозофилы ошибочными системами репарации (Flores, 2006). В частности,  $\gamma$ -индуцированные мутанты с изменениями на уровне одного основания являются, вероятно, результатом репликативного мутагенеза, сопряженного с мис-мэтч репарацией. Наличие у мутантов небольших делеций, фланкированных короткими прямыми повторами, позволяет предполагать активность системы репарации по механизму одноцепочечного отжига (*single-strand annealing*, SSA). Поскольку для функционирования этих систем репарации не требуется гомологичная хромосома, можно полагать, что реализация индуцированных в геноме спермией первичных повреждений ДНК, индуцированных редкоизионизирующим излучением, осуществляется в ранней зиготе на стадии пронуклеуса перед или во время первой репликации ДНК до

первого деления дробления. В тоже время, наблюдаемый перенос ДНК аллеля *black*<sup>1</sup> на место облученного аллеля *black*<sup>+32</sup>, имеющего ЛПЭ-зависимые повреждения ДНК очевидно кластерного типа, непосредственно указывает на межallelельную рекомбинацию (генную конверсию) по механизму синтез-зависимого одноцепочечного отжига (*synthesis dependent strand annealing*, SDSA), предполагающего наличие гомолога и функционирующего после объединения родительских геномов. В свете полученных нами данных также очевидно, что конверсионный механизм репарации ЛПЭ-зависимых повреждений ДНК и определяет наблюдаемые высокие значения ОГЭ нейтронов в индукции «точковых» мутаций гена *black*.

Важным результатом функционирования конверсионного механизма репарации в зиготе после сингамии является не потеря гетерозиготности (LОН), а формирование гомозиготности (*reconstitution of homozygosity*, RОН) по уже имеющемуся в геноме гетерозиготы<sup>1</sup> мутантному аллелю. Это состояние гомозиготности не только сохранится в соматических и генеративных клетках данной особи, но при наследовании несомненно увеличит вдвое и вредный популяционный груз по данному мутантному аллелю.

## ВЫВОДЫ

1. Зависимость частоты индукции аберрационных и «точковых» мутантов от дозы для двух видов радиации и двух генов линейна и ОГЭ нейтронов по тесту аберрационные и особенно «точковые» мутации для гена *black* (коэффициенты 8.6 и 5.0 соответственно) существенно выше, чем для гена *cn* (коэффициенты 4.0 и 2.6 соответственно).
2. В основе  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов генов *black* и *cn* *D.melanogaster* лежат изменения структуры ДНК двух категорий: выявляемые методом ПЦР частичные делеции генов и скрытые, не детектируемые этим методом, «точковые» изменения, соотношение которых геноспецифично. Это выражается в том, что доля мутантов *cn* с делециями почти в 4 раза больше таковой среди мутантов *black* независимо от вида радиации.
3. Методом секвенирования идентифицированы делеция (АТСС) с инсерцией (ТАССТАСС) в экзоне 1 (+530) и 27 однонуклеотидных замен в разных районах гена у спонтанного аллеля *black*<sup>1</sup> из материнской тестер-линии KL, с самками которой скрещивались облученные самцы дикой лабораторной линии, а также аналогичные изменения у трех спонтанных мутаций гена *black* из нестабильной лабораторной линии D32 как результат конверсии гена.
4. Доминирующими повреждениями структуры ДНК у  $\gamma$ -индуцированных «точковых» мутантов *black* без выявляемых методом ПЦР изменений являются, согласно результатам секвенирования, делеции и модификации на уровне одного нуклеотида (50%), тогда как минорными фракциями - делеции нескольких пар оснований (до 11), фланкированные короткими прямыми повторами (25%) и мутанты конверсионной природы (25%).
5. Секвенирование ДНК нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов *black* показало, что 13 из 15 изученных являются мутантами конверсионной природы, что указывает на важную роль генной конверсии при репарации ЛПЭ-зависимых повреждений ДНК, определяющей наблюдаемую высокую

ОГЭ нейтронов в индукции «точковых» мутаций гена *black*.

6. Качественно разная природа доминирующих повреждений ДНК у  $\gamma$ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутантов, установленная методом секвенирования, отражает разнообразие первичных повреждений ДНК и репарационных систем, функционирующих в ранней зиготе до и после первого деления дробления.

## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

- 1) Александров И.Д., Намолован Л.Н., Александрова М.В. Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 3. Ген *black*. Общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности // Журнал «Радиационная биология. Радиоэкология», 2012, том 52, № 5, с. 453–466.

### *Материалы в сборниках трудов конференций:*

- 2) Namolovan L., Alexandrov I., Alexandrova M. Unusually the same  $\gamma$ -ray- and neutron-induced molecular changes revealed by PCR at the *Drosophila black* gene// abstracts of Third International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution», JINR, Dubna, 2010, p.194-196.
- 3) Намолован Л.Н., Александров И.Д., Александрова М.В. Молекулярно-цитогенетический анализ спонтанных и  $\gamma$ -индуцированных мутаций мини-гена *black D. melanogaster*// тезисы докладов «VI съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)», Издательство «Российский университет дружбы народов», Москва, 2010 г., том 1, с.71.
- 4) 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.
- 5) Александров И.Д., Александрова М.В., Намолован Л.Н. Молекулярная характеристика  $\gamma$ -индуцированных изменений в промоторно-экзонном районе генов *black* и *cinnabar D. melanogaster*// тезисы докладов Российской

научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии», Санкт-Петербург, 19-20 мая 2011 г., с.121-122.

Получено 26 апреля 2013 г.



Отпечатано методом прямого репродуцирования  
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 26.04.2013.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,69. Уч.-изд. л. 1,53. Тираж 100 экз. Заказ № 57967.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, б.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)