

РАДИАЦИОННАЯ
ГЕНЕТИКА

УДК 577.2:575.1:575.224:595.773.4:539.1.047

РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ СТРУКТУРНО РАЗНЫХ
ГЕНОВ *Drosophila melanogaster*. СООБЩЕНИЕ 7. ГЕН *yellow*:
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАДИОМУТАБИЛЬНОСТИ
И ПЦР-АНАЛИЗ “ТОЧКОВЫХ” МУТАЦИЙ© 2018 г. Е. В. Кравченко¹, С. В. Дубовик¹, М. В. Александрова¹, И. Д. Александров^{1,*}¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

* E-mail: a38don@jinr.ru

Поступила в редакцию 13.06.2017 г.

Приведены результаты генетического, цитогенетического и молекулярного (ПЦР) анализа γ - и нейтрон-индуцированных мутаций гена *yellow* (*y*), локализованного в прителомерном районе X хромосомы *Drosophila melanogaster*. Как и в случае аутосомных генов, общий спектр γ - и нейтрон-индуцированных мутаций у включает генетические изменения “точковой” и аберрационной природы, частота индукции которых линейно растет с дозой для обоих видов радиации. При этом нейтроны эффективнее γ -излучения (коэффициент ОГЭ равен 2.0 во всем диапазоне доз 2.5–10 Гр для нейтронов) по тесту “все мутации в целом”, но не по тесту “точковые” мутации, где их коэффициент ОГЭ = 1.0. ПЦР-анализ значительной выборки из семи спонтанных, 25 γ - и девяти нейтрон-индуцированных мутаций у на протяжении всей структурно-функциональной карты гена (7991 п.н.) позволил установить четыре основных категории мутаций с разным характером молекулярно-генетических изменений: 1) изменения ДНК, не выявляемые методом ПЦР (ПЦР+-мутации); 2) мутации в виде делеций одного фрагмента; 3) мутации в виде делеций двух и более смежных фрагментов и 4) мутации в виде кластера из делеций отдельных фрагментов. Анализ распределения названных категорий мутаций на структурно-функциональной карте гена позволил установить два “горячих” участка, где статистически значимо чаще выявляются мутации второй категории, один из которых локализован в 5'-участке ДНК, расположенном перед промотором, а второй – в районе 3'-конца гена. Сравнительный анализ относительной частоты четырех категорий мутаций, выявляемых ПЦР только в структурной части гена у и аутосомных генов *b*, *cn*, *vg*, позволил установить как общие для этих локусов закономерности возникновения радиационно-индуцированных изменений ДНК, так и геноспецифические особенности в картине их молекулярного мутагенеза, природа которых обсуждается.

Ключевые слова: нейтроны, γ -излучение, *Drosophila melanogaster*, ген *yellow*, рецессивные “точковые” и хромосомные мутации, ОГЭ, ПЦР

DOI: 10.1134/S0869803118040082

Одним из фундаментальных вопросов радиационного мутагенеза в генеративных клетках высших эукариот является установление молекулярной природы радиационно-индуцированных *de novo* генных мутаций. Этот вопрос до сих пор остается малоизученным даже у классического объекта генетических исследований *Drosophila melanogaster*. Ряд работ, посвященных оценке повреждений ДНК после воздействия радиации, выполнен на соматических и генеративных тканях *D. melanogaster* с использованием метода COMET, позволяющего оценить степень фрагментации геномной ДНК [1], и методик анализа, основанных на полимеразной цепной реакции [2, 3].

Как продолжение наших работ по радиационной биологии структурно разных генов *D. melano-*

gaster, нами проведен комплексный генетический, цитогенетический и молекулярный анализ наследуемых мутаций гена *yellow* (*y*), индуцированных γ -излучением ⁶⁰Со и моноэнергетическими нейтронами деления ($E_{cp} = 0.85$ МэВ) в разных дозах. Анализ радиомутабельности гена *yellow* представляет особый интерес по нескольким причинам. Во-первых, в отличие от ранее изученных аутосомных генов *black* (*b*), *cinnabar* (*cn*) и *vestigial* (*vg*) ген *yellow* локализован в прителомерном районе X хромосомы, что позволяет ожидать для этого гена специфическую картину радиомутабельности. Во-вторых, для гена *yellow* установлены элементы регуляции его активности (энхансеры), молекулярный анализ структуры радиационно-индуцированных мутаций которых позволит

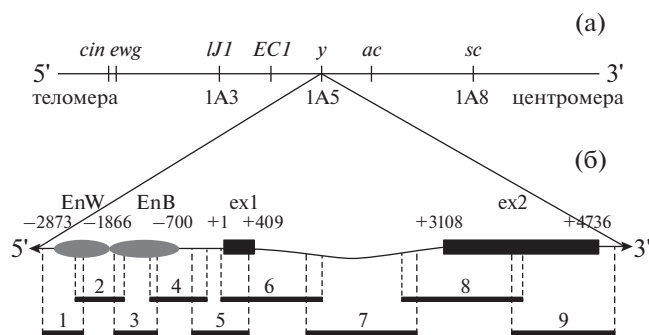


Рис. 1. а – схема локализации гена *yellow* на цитогенетической карте прителомерного района X-хромосомы; б – схема регуляторной и кодирующей частей гена *yellow* (EnW – энхансер, регулирующий активность гена в крыльях, EnB – энхансер, регулирующий активность гена в теле, ex – экзон) и положение перекрывающихся фрагментов – ампликонов (1–9) на карте гена.

оценить вклад радиационного повреждения таких элементов в общую картину радиомутабельности изучаемого гена. В-третьих, в отличие от аутосомных генов, в наших экспериментах процессинг мутаций гена *yellow* в ранней зиготе после сингамии происходил в условиях структурной гетерозиготности по инверсиям в материнской X хромосоме, что могло блокировать систему ошибочной репарации, основанную на гомологичной рекомбинации, и тем самым модифицировать спектр регистрируемых мутаций.

Полученные данные являются необходимыми для научно обоснованной оценки генетического риска ионизирующего излучения для потомства облученных родителей и установления вклада регуляторных частей гена в особенности мутагенеза всего локуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Структурная часть гена *y* (цитология: 1A5 политенной X-хромосомы; генетическая локализация 0,0) размером 4736 пар нуклеотидов (п. н.) состоит из двух экзонов и одного интрона (43.0 и 57.0% ДНК гена соответственно) [www.Fly-Base.org] (рис. 1).

Идентифицирована область регуляции активности гена (5'-область, координаты от –2873 до –700), содержащая два тканеспецифичных энхансера, регулирующих работу локуса *yellow* в крыльях – EnW и теле – EnB (рис. 1) [4]. Продуктом гена является белок, состоящий из 541 аминокислоты, принимающий участие в процессах биосинтеза меланина и полового поведения самцов [5, 6]. Мутационная инактивация гена *y* ведет к изменению окраски кутикулярных структур у личинок и имаго. Все мутации в данном локусе являются рецессивными и приводят к изменению

нормальной коричнево-черной окраски на желтую. Среди описанных в литературе мутантных аллелей гена [7] наиболее широко известны и используются в различных лабораторных линиях в качестве маркеров рецессивные “точковые” мутации y^1 и y^2 . В основе мутации y^1 лежит замена А на С в кодоне инициации трансляции, ведущая к функционально неактивному продукту гена [4] и желтой окраске всех кутикулярных структур, а в основе мутации y^2 – инсерция мобильного элемента *gypsy* в положение –700 от точки начала транскрипции, в результате которой энхансеры, которые контролируют экспрессию гена *yellow* в теле и крыльях, оказываются изолированными от промотора [4], что приводит к желтой окраске тела и крыльев, но не щетинок. Именно мутацией y^1 маркирован генотип самок тестер-линии *KL* (In (1) *sc^{SIL} sc^{8R} + dl-49, y¹ sc^{S1} sc⁸ w^a; b¹ cn¹ v g¹*), с которыми скрещивались интактные и облученные самцы дикой лабораторной линии *D-32* для получения в F_1 мутантных самок по этому гену.

Изученные в работе мутации *y* получены в тех же контрольных и радиационно-генетических экспериментах, что и мутации аутосомных генов *black (b)* [16], *cinnabar (cn)* [14] и *vestigial (vg)* [17]. Физические условия воздействия γ -квантов ^{60}Co и реакторных нейтронов с $E_{cp} = 0.85\text{МэВ}$, комбинированного действия нейтронов и γ -квантов, смешанного γ -нейтронного излучения ^{252}Cf , включая детали классического цито- и генетического анализа с их классификацией на три основных класса: 1) ненаследуемые мутации F_1 с доминантной стерильностью; 2) наследуемые мутации абберационной природы и 3) наследуемые мутации “точковой” природы, детально были описаны ранее [8–11].

Молекулярная природа 25 γ -, девяти нейтрон-индуцированных, а также семи спонтанных “точковых” мутаций *y* нами изучена, как первый этап анализа, с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), для чего область гена *yellow* была подразделена на девять перекрывающихся фрагментов (рис. 1), к которым были подобраны уникальные пары праймеров (табл. 1).

Геномную ДНК геми- или гомозиготных мутантов для ПЦР анализа выделяли с помощью стандартного фенольного метода. Амплификацию проводили с помощью реагентов GenPak (Isogen). В качестве контроля использовали геномную ДНК из дикой близкородственной лабораторной линии *D-18* (y^{+18}). Неслучайный характер распределения на структурно-функциональной карте гена ПЦР-выявляемых мутационных изменений в виде отсутствия того или иного фрагмента у радиационных мутаций оценивали с помощью критерия χ^2 .

Таблица 1. Праймеры, используемые для молекулярного анализа гена *yellow D. melanogaster* (5' → 3') и их локализация относительно точки начала транскрипции (+1)

№ фрагмента гена	Нуклеотидная последовательность праймеров 5' → 3'	Локализация концов фрагментов	Размеры фрагментов, п.н.	Область перекрытия фрагментов, п.н.
1	ATCAATGATTCGACTGTTGTTGT	–3001	681	92
	GCGCTCAAACATATTAGTACCCC	–2321		
2	TCGGGACAGTGGAAATTGAC	–2412	792	70
	CTGCAGCCGTTGAACCTATA	–1621		
3	AACAGACAAACGCAGCATCC	–1690	706	103
	GACCATCGCCGCAAGTAAAT	–985		
4	TATTATGCGTGTGGCTGGTT	–1087	806	132
	TTTGGCCTTCATCGACATTT	–282		
5	GCCTCCTGGCCTTACAATTT	–413	789	443
	ACGAATAACCGATTGCCAAA	+375		
6	CATATAAAACGCGGCCGACA	–33	1281	150
	CGAAAGCATTCCTAGACGTA CTG	+1247		
7	ATTAATTTGGCTTACACAATAATC	+1098	1357	59
	TAAAAATCAAACCAGGCGTT	+2454		
8	GTATATTTATCGCAACCCCGGT	+2396	1351	106
	AGCTATCTTCCGTCCTGGTT	+3746		
9	CGATCGGATGGTTATCGTACCCTG	+3641	1350	
	AGGTAGAGCTCTGACAACCCCAAC	+4990		

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных опытах (проводили одновременно с экспериментами по радиационному воздействию с 1979 по 1988 г. с целью анализа зависимости доза–эффект) среди почти 270 тыс. исследованных самок F₁, полученных от скрещивания интактных самцов дикой лабораторной линии *D-32* с самками тестер-линии *KL*, выявлено четыре мутации гена *yellow*, из которых одна оказалась мультилокусной делецией, а три – “точковыми”. Таким образом, частота возникновения последних составляет 1.1×10^{-5} /локус/поколение.

Результаты экспериментов по индукции отдельных классов мутаций у γ -излучением ⁶⁰Со в разных дозах представлены в табл. 2, а нейтронами – в табл. 3. После воздействия γ -излучения среди 207983 проанализированных регулярных самок F₁ суммарно по всем дозам обнаружено 24 мутации с фенотипом у, а в опытах с нейтронами среди 116961 самок F₁ – 12 таких мутаций. Согласно результатам гибридологического анализа определенная их часть (шесть из 24 или 25.0% и две из 12 или 16.7% для γ -квантов и нейтронов соответственно) оказалась ненаследуемыми из-за

доминантной стерильности, которая обусловлена, как известно, крупными структурными изменениями хромосом, затрагивающими район изучаемого гена [12].

Как показали результаты генетического и цитогенетического анализа [13], три из 18 (16.6%) γ - и семь из 10 (70.0%) нейтрон-индуцированных наследуемых мутаций у ассоциированы с хромосомными изменениями. Для γ -излучения эти изменения представлены только инверсиями, тогда как после действия нейтронов наряду с инверсиями наблюдаются и межхромосомные обмены (транслокации) (табл. 2 и 3).

За вычетом аберрационных мутаций у остальные 15 γ - и три нейтрон-индуцированных являются наследуемыми “точковыми” мутациями, доля которых среди всех проанализированных составляет таким образом 83.3% и 10.0% для фотонов ⁶⁰Со и нейтронов соответственно. При этом среди всех γ -индуцированных “точковых” мутаций у наблюдаются как простые (генетические изменения локализованы в самом гене), так и комплексные (изменению гена сопутствуют другие независимые генетические изменения в виде

Таблица 2. Количество и частота (%) мутаций гена *yellow*, индуцированных γ -излучением ^{60}Co в разных дозах, в зрелых спермиях самцов дикой лабораторной линии *D-32 D. melanogaster*

Объект исследования	Доза, Гр					
	5	10	20	40	60	Все
Число облученных самцов	491	645	757	1500	855	4248
Число изученных F ₁ самок (y + аллелей)	69375	60954	37955	33705	5994	207983
Среднее количество самок F ₁ от 1 самца (% от контроля [#])	141.3 (80.5)	94.5 (53.9)	50.1 (28.5)	22.5 (12.8)	7.0 (3.9)	
Всего мутантов F ₁	(4)* 0.0058	(6) 0.0098	(6) 0.016	(7) 0.021	(1) 0.016	(24)
Стерильные мутанты F ₁	(1) 0.0014	(2) 0.0033	(1) 0.0026	(1) 0.0003	(1) 0.016	(6)
Все изученные наследуемые мутации	(3)	(4)	(5)	(6)	(0)	(18)
Число/частота мутаций <i>yellow</i> разного типа						
Аберрационные мутации:						
мультилокусные делеции	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)
инверсии	(0)	(0)	(2)	(1)		(3)
транслокации	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)
Все аберрационные	(0)	(0)	(2) 0.0052	(1) 0.0003	(0)	(3)
“Точковые” мутации:						
простые	(2) + (1)**	(1) + (3)**	(0)	(3)		(10)
комплексные	(0)	(0)	(2) + (1)**	(1) + (1)**		(5)
Все “точковые”	(3) 0.0044	(4) 0.0065	(3) 0.0079	(5) 0.015	(0)	(15)

[#] Среднее количество самок F₁ от одного необлученного самца линии D-32 составляет 175.3; * в скобках число мутаций; ** число мутаций, потерянных до молекулярного анализа.

рецессивных леталей или аберраций того или иного типа) мутации. После действия нейтронов немногочисленные “точковые” мутации оказались простыми.

Анализ зависимостей доза–эффект по тесту выживаемость самок F₁ от яйца до имаго после действия γ -излучения в изученных дозах и нейтронов показывает (рис. 2, а) их линейный характер и на уровне выживаемости 12.8–17.5% имаго ОГЭ нейтронов оказывается равным 4.0.

Учитывая количество мутаций *y*, полученное в опытах по изучению зависимости доза–эффект, нами проведен ее анализ для всех мутаций в целом (в этом тесте для нейтронов преобладают аберрационные мутации) (рис. 2, б) и только для “точковых” мутаций (по этому тесту для γ -излучения преобладают “точковые” мутации) (рис. 2, в) (табл. 2 и 3).

Как видно из рисунка, эти зависимости в обоих случаях линейны. Это позволяет оценить ОГЭ нейтронов по названным тестам как отношение доз при близких значениях частоты мутаций. На-

пример, при близкой частоте всех мутаций 0.016% (20 Гр для γ -квантов) и 0.015% (доза 10 Гр для нейтронов) ОГЭ нейтронов оказывается равной 2.0. Аналогичные значения ОГЭ нейтронов наблюдаются и для более низких доз этих излучений (5 и 2.5 Гр для фотонов и нейтронов). В случае экстраполяции линейной зависимости доза–эффект по тесту “точковые” мутации до спонтанного уровня этих мутаций можно наблюдать (рис. 2, в), что γ -кванты и нейтроны практически с одинаковой эффективностью индуцируют данный тип мутаций *y*, т.е. ОГЭ нейтронов равен 1.0.

Наличие данных по выживаемости F₁ после воздействия нейтронов и γ -квантов на родительские спермии позволяет оценить эффективность этих видов излучения в индукции всех мутаций F₁ (для нейтронов и γ -излучения) и только “точковых” для γ -квантов в широком диапазоне выживаемости в виде частоты мутаций на локус/Гр (рис. 2, г). Анализ зависимостей выживаемость–эффект позволяет отметить две интересные закономерности: 1) частота индукции всех названных

Таблица 3. Количество и частота (%) мутаций гена *yellow*, индуцированных реакторными нейтронами ($E_{cp} = 0.85$ МэВ) в разных дозах в зрелых спермиях самцов дикой лабораторной линии *D-32 D. Melanogaster*

Объект исследования	Доза, Гр				
	2.5	5	10	20	Все
Число облученных самцов	559	479	1103	572	2713
Число изученных F ₁ самок (y + аллелей)	67369	33952	33906	2943	138170
Среднее количество самок F ₁ от одного самца (% от контроля [#])	120.5 (68.7)	70.9 (40.4)	30.7 (17.5)	5.1 (2.9)	
Всего мутантов F ₁	(4)* 0.0059	(3) 0.0088	(5) 0.015	(0)	(12)
Стерильные мутанты F ₁	(1) 0.0015	(0)	(1) 0.0024	(0)	(2)
Все изученные наследуемые мутации	(3)	(3)	(4)	(0)	(10)
Число/частота мутаций <i>yellow</i> разного типа					
Аберрационные мутации:					
мультилокусные делеции	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)
инверсии	(1)	(1)	(1)	(0)	(3)
транслокации	(0)	(1)	(2)	(0)	(3)
Все аберрационные	(1) 0.0014	(2) 0.0059	(4) 0.012	(0)	(7)
“Точковые” мутации:					
простые	(1) + (1)**	(1)	(0)	(0)	(3)
комплексные	(0)				
Все “точковые”	(2) 0.0028	(1) 0.0029	(0)	(0)	(3)

Примечание. #, *, ** см. табл. 2.

типов мутаций у существенно снижается (почти в 2 раза для обоих видов радиации) с уменьшением выживаемости и 2) частота индукции всех мутаций в целом нейтронами на локус/Гр стабильно в 1.5 раза выше по сравнению с таковой при воздействии γ -излучения (диапазон выживаемости тот же).

Для выяснения молекулярной природы γ - и нейтрон-индуцированных “точковых” мутаций у, полученных в опытах по анализу зависимости доза–эффект, нами, как первый этап такого анализа, были изучены мутантные последовательности ДНК методом ПЦР. Учитывая их ограниченное количество, выборка мутаций для молекулярного анализа была расширена за счет “точковых” мутаций у, индуцированных γ -квантами, нейтронами и их комбинированным действием в независимых и полностью идентичных по физическим и генетическим параметрам экспериментах [11]. В целом результаты ПЦР-анализа – семь спонтанных, 25 γ - и девять нейтрон-индуцированных мутаций у представлены в табл. 4.

Учитывая значительный размер области гена у (7607 п.н.), названная последовательность была подразделена на девять перекрывающихся фрагментов, из которых первые четыре перекрывают регуляторную область гена (два тканеспецифичных энхансера), а остальные пять – структурную область (рис. 1). Таким образом, для всей совокупности мутаций гена было изучено $43 \times 9 = 387$ ПЦР фрагментов.

Анализ γ - и нейтрон-индуцированных мутаций, определяющих отсутствие того или иного фрагмента (табл. 4), показывает их сходный характер и часто идентичную локализацию для двух видов радиации. Это позволяет выделить общие для фотонов и нейтронов четыре категории мутаций, возникающих с относительно разной частотой: 1) мутации, не выявляемые методом ПЦР и требующие секвенирования (ПЦР+-мутации), 2) мутации с потерей только одного фрагмента, 3) мутации с потерей двух смежных фрагментов и 4) мутации в виде кластера из двух независимых повреждений. Относительная частота этих категорий для γ -квантов и нейтронов также близка,

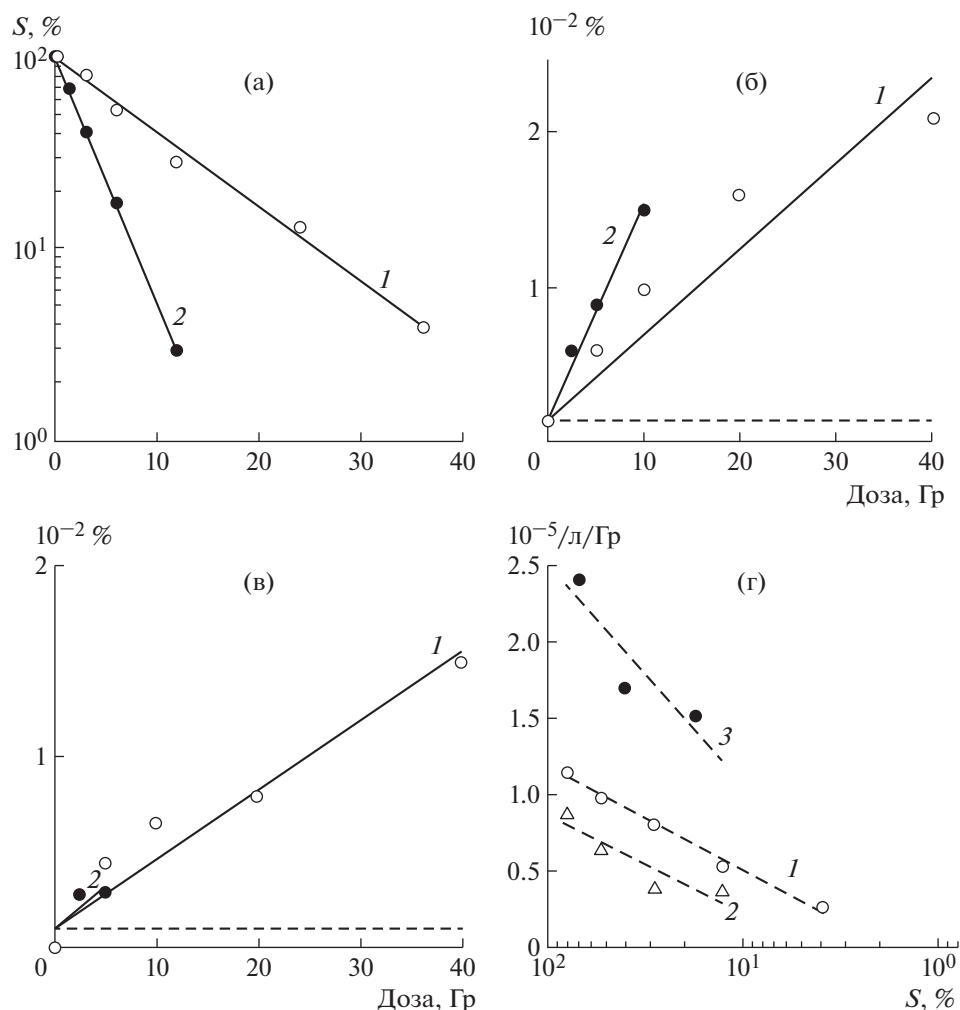


Рис. 2. Зависимость доза–эффект для: а – выживаемости F_1 от яйца до имаго; б – всех выявленных в F_1 мутационных изменений; в – “точковых” мутаций гена *yellow D. melanogaster*. 1 – γ -излучение ^{60}Co ; 2 – нейтроны деления ($E_{\text{ср}} = 0.85$ МэВ) Пунктирная линия – спонтанный уровень мутаций. г – Зависимость выживаемость–эффект для всех мутаций, индуцированных γ -квантами ^{60}Co (1) и нейтронами деления $E_{\text{ср}} = 0.85$ МэВ (3), и “точковых” мутантов, индуцированных γ -квантами ^{60}Co .

составляя 60.0 и 20.0%, 12.0 и 8.0%, 55.5 и 22.2%, 11.1 и 11.1% для перечисленных категорий и двух видов радиации соответственно.

Согласно результатам анализа гена *yellow*, наследуемые мутационные изменения, детектируемые с помощью ПЦР, обнаруживаются и в структурной и в регуляторной частях гена. У пяти радиационно-индуцированных мутаций (15.0%) какой-либо фрагмент отсутствует только в регуляторной части гена, у двух мутаций (6.0%) фрагменты отсутствуют и в регуляторной, и в структурной части гена, и для семи таких мутаций (21.0%) выявлено отсутствие фрагментов только в структурной области гена. Интересно отметить, что и для γ - и нейтрон-индуцированных мутаций при их анализе с помощью ПЦР в случае отсутствия какого-либо фрагмента чаще всего – это восьмой фраг-

мент, расположенный в структурной части гена (рис. 3).

Вторым по частоте отсутствия является 4-й фрагмент, расположенный в регуляторной части гена и захватывающий часть района энхансера, регулирующего пигментацию тела, и 5'-участок ДНК, расположенный перед промотором. Также довольно часто встречается отсутствие девятого фрагмента, находящегося во второй половине второго экзона. Качественно и количественно сходная картина мутабельности для фотонов ^{60}Co и нейтронов позволяет провести общий статистический анализ характера распределения отсутствующих фрагментов по структурно-функциональной карте гена с использованием критерия χ^2 , который показал, что распределение носит неслучайный характер (рис. 3).

Таблица 4. Результаты ПЦР-анализа спонтанных и радиационно-индуцированных мутаций гена *yellow* *Drosophila melanogaster*

№ п/п	№ фонда	Код мутации	Фенотип	Происхождение	Изученные фрагменты гена <i>yellow</i>								
					1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	412	<i>y</i> ¹	<i>y</i> ¹	<i>y</i> ¹ <i>w</i> ^a , <i>b</i> ¹ <i>cn</i> ¹ <i>vg</i> ¹ (KL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	101	<i>y</i> ²	<i>y</i> ¹	<i>y</i> ² <i>sc w spl</i>	+	+	+	–	+	+	+	+	+
3	<i>yS4</i>	<i>y88c50</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	+
4	<i>yS8</i>	<i>y90e15</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	+
5	<i>yS10</i>	<i>y91h2</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	+
6	<i>yS11</i>	<i>y91i</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	<i>yS12</i>	<i>y94j</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	+
8	<i>yS13</i>	<i>y94l-s</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	<i>yS14</i>	<i>y95g-s</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	–
10	62	<i>y87f14</i>	<i>y</i> ¹	γ – 5 Гр	+	+	+	+	+	+	+	–	+
11	67	<i>y87h50</i>	<i>y</i> ²	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	–
12	40	<i>y79d3</i>	<i>y</i> ¹	γ – 10 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	66	<i>y87g92</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	39	<i>y79d2(In)</i>	<i>y</i> ¹	γ – 20 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	64	<i>y87g49</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	1	<i>y66c</i>	<i>y</i> ¹	γ – 40 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	4	<i>y71l2</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	5	<i>y72a</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	8	<i>y72d4</i>	<i>y</i> ²	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	11	<i>y74b121</i>	<i>y</i> ^{td}	*(K) + γ – 40 Гр	+	+	+	+	–	–	+	+	+
21	12	<i>y74b151</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	–	+	+	+	–	+
22	14	<i>y74d1</i>	<i>y</i> ¹	γ – 40 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	15	<i>y74d2</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	18	<i>y74e</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	23	<i>y75l2</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	24	<i>y75l3</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	25	<i>y76b37(T)</i>	<i>y</i> ^{td}	—“—	+	+	+	+	–	+	+	+	+
28	26	<i>y76b94(In)</i>	<i>y</i> ^{td}	—“—	+	+	–	–	+	+	+	+	+
29	27	<i>y76i</i>	<i>y</i> ¹	*(AD) + γ – 40 Гр	+	+	+	–	+	+	+	+	+
30	43	<i>y81c1</i>	<i>y</i> ¹	γ – 40 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	49	<i>y83c</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	–	+	+	+	+	+	+	–
32	72	<i>y88d48a</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	74	<i>y88d100</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	+
34	94	<i>y91l18</i>	<i>y</i> ¹	—“—	+	+	+	+	+	+	+	–	+
35	70	<i>y88c93</i>	<i>y</i> ¹	n – 2.5 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	–

Таблица 4. Окончание

№ п/п	№ фонда	Код мутации	Фенотип	Происхождение	Изученные фрагменты гена <i>yellow</i>								
					1	2	3	4	5	6	7	8	9
36	30	<i>y77d</i>	♀ <i>y^{td}</i> , ♂ <i>y¹</i>	n – 5 Гр	+	+	+	–	+	+	+	+	+
37	36	<i>y79dsd</i>	♀ <i>y²</i> , ♂ <i>y¹</i>	n + γ – 10 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	46	<i>y82c1</i>	<i>y¹</i>	n + γ †(Cf) – 14 Гр	+	+	+	+	+	+	+	–	–
39	48	<i>y82c3</i>	<i>y¹</i>	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	82	<i>y88g56</i>	<i>y¹</i>	n+ γ – 15 Гр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	76	<i>y88e20</i>	<i>y²</i>	n+ γ – 20 Гр	+	+	+	–	+	+	+	–	+
42	78	<i>y88e66</i>	<i>y¹</i>	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	83	<i>y88g98</i>	<i>y¹</i>	—“—	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. В таблице представлены наряду с “точковыми” (цитологически нормальные) и абберационные мутации *yellow* (In – инверсия; T – транслокация; Df – мультилокусная делеция; l – сопутствующая леталь). * кофеин (K) и актиномицин (AD), на водном растворе которых содержались самцы линии D32 (см. “Материалы и методика”); † – излучение ²⁵²Cf.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление результатов по гену *yellow* с данными для гена *cn* [14] показывает, что при малых дозах облучения (10 и 5 Гр для фотонов и нейтронов соответственно) ОГЭ нейтронов в индукции всех мутаций *cn* также равно 2.0, хотя этот коэффициент при высоких дозах (40 и 10 Гр для фотонов и нейтронов соответственно) возрастает до 4.0. В то же время в индукции “точковых” мутаций *cn*, как и в случае мутаций *y*, ОГЭ нейтронов равно 1.0.

Названные закономерности радикально отличаются ген *y* от прицентромального аутосомного гена *cn*, где в случае воздействия γ-излучения частота хромосомных и “точковых” мутаций варьирует незначительно в пределах $0.5–0.7 \times 10^{-5}$ /локус/Гр в названном диапазоне выживаемости F₁,

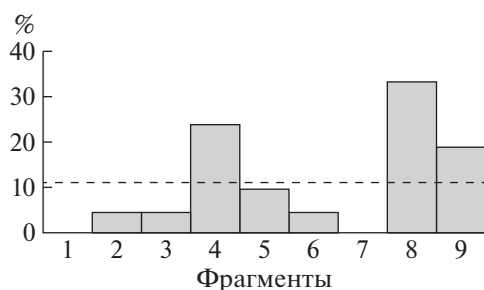


Рис. 3. Наблюдаемая относительная частота среди всех радиационно-индуцированных мутантных повреждений каждого из девяти изученных фрагментов гена *y*. Пунктирная линия – теоретически ожидаемая частота этих повреждений при случайном и независимом их распределении.

тогда как для нейтронов уровень хромосомных мутаций возрастает с 1.5 до 3.6×10^{-5} /локус/Гр в этом же диапазоне выживаемости [14]. Следовательно, оценка генетической эффективности γ-квантов и нейтронов по частоте мутаций относительно выживаемости позволяет выявить гораздо более глубокие различия в радиомутабельности генов, занимающих разное положение в геноме генеративной клетки.

Картина ПЦР анализа классических мутаций *y¹* и *y²* (табл. 4) соответствует их молекулярной природе – единственная замена нуклеотида в мутации *y¹* не регистрируется выбранными методами ПЦР анализа, тогда как мутационное событие в аллели *y²*, вызванное инсерцией мобильного генетического элемента в положение –700, четко детектируется в виде отсутствия 4-го фрагмента гена из-за невозможности прохождения стандартной ПЦР на данном участке.

ПЦР анализ семи спонтанных мутаций *y*, выявленных в разных контрольных экспериментах, показал, что в двух случаях все исследуемые фрагменты гена присутствуют, в четырех случаях наблюдается отсутствие одного и того же восьмого фрагмента гена, захватывающего конец интрона и начало второго экзона, и в одном случае отсутствие одновременно восьмого и девятого фрагментов (табл. 4). Эти данные позволяют предположить, что в восьмом фрагменте находится “горячая” точка мутагенеза – последовательность, в которой мутационные события происходят с более высокой частотой, чем в других районах гена. Дальнейший молекулярный анализ этих мутаций позволит установить природу мутационных событий и точную локализацию “горячей” области гена.

Таблица 5. Количество и относительная частота в % четырех разных категорий мутаций, выявляемых ПЦР в структурной части (экзоны + интроны) генов-мишеней *D. melanogaster* после действия γ -излучения ^{60}Co и реакторных нейтронов с $E_{\text{ср}} = 0.85$ МэВ (суммарно для изученных доз и двух видов радиации)

Категории мутаций	Гены-мишени и их размеры (п.н.)			
	<i>yellow</i> (5403)	<i>black</i> [13] (2911)	<i>cinnabar</i> [11] (4394)	<i>vestigial</i> [14] (14613)
ПЦР+	(23) 67.6	(57) 87.7	(31) 52.5	(24) 40.7
Делеция одного фрагмента	(8) 23.5	(7) 10.8	(13) 22.1	(20) 33.9
Делеция двух и более смежных фрагментов	(3) 8.8	(1) 1.5	(14) 23.7	(9) 15.2
Кластеры делеций из отдельных фрагментов	(0)	(0)	(1) 1.7	(6) 10.2
Все категории мутаций	(34) 100.0	(65) 100.0	(59) 100.0	(59) 100.0

Обращает на себя внимание совпадение “горячего” участка в районе 8-го фрагмента (3'-конец гена) для спонтанных и радиационно-индуцированных мутаций, что позволяет предположить единую для всех этих мутаций генетическую природу повреждений в данном районе гена. Анализ этого вопроса – задача наших дальнейших исследований.

Обобщая рассмотренные выше результаты, важно отметить необходимость анализа не только структурной, но и регуляторной части гена при изучении радиационно-индуцированных мутаций, поскольку повреждения в его регуляторной области вносят значительный вклад в общую картину мутагенеза.

Сопоставляя картину радиомутабельности гена *yellow* с ранее полученными данными [14], следует отметить также более высокую долю “точковых” мутаций у (83,3%) по сравнению с таковой для гена *cn* (65,2%). При этом, однако, относительная частота индукции комплексных мутаций среди всех “точковых” для гена *cn* существенно выше (56,6%), чем для гена у (33,3%). Это прямо коррелирует с большими размерами эухроматина второй аутосомы (44,4 млн п.н.) по сравнению с величиной эухроматина X хромосомы (21,8 млн п.н.) [15], в котором и возникают независимые генетические изменения, сопутствующие “точковым” мутациям *cn* и у.

Обращает на себя внимание тот факт, что в спектре аберрационных мутаций у полностью отсутствуют мультилокусные делеции после действия γ -излучения и лишь одна такая делеция после действия нейтронов в дозе 10 Гр, что существенно отличает спектр аберрационных изменений гена у от наблюдаемого для прицентромерно-

го гена *cn*, где преобладают мультилокусные делеции после действия двух изучаемых видов радиации [14]. Эти различия, по-видимому, обусловлены уникальным прителомерным положением гена у и смежных летальных локусов, мультилокусные делеции которых с доминантным эффектом определяют нежизнеспособность особей F_1 уже в гетерозиготном состоянии.

Описанную выше для структурной части гена *yellow* относительную частоту мутаций интересно сопоставить с их частотой, ранее установленной также для структурной части аутосомных генов *black* [16], *cinnabar* [14], *vestigial* [17] (табл. 5).

Как видно из таблицы, в спектре радиационно-индуцированных мутаций этих генов широко представлены мутационные изменения, не детектируемые ПЦР (ПЦР+-мутации), дальнейшее изучение которых требует секвенирования. При этом обращает на себя внимание тот факт, что наименьшему по размеру гену *b* соответствует наибольшая частота ПЦР+-мутаций, а наибольшему гену *vg* – их наименьшая частота. Важно также отметить, что мутации в виде кластеров делеций из отдельных фрагментов наиболее широко представлены именно в наиболее крупном гене *vg* и практически отсутствуют у всех остальных менее крупных генов. Это показывает, что с увеличением размера гена-мишени следует ожидать и соответствующего возрастания частоты таких кластерных мутантов. Доля мутаций с отсутствием одного фрагмента для у и *cn* практически одинакова, тогда как она минимальна у гена *b* и максимальна для гена *vg*. Относительная частота мутаций в виде протяженных делеций (3-я категория) наиболее высока у гена *cn* и минимальна для гена *b*. Высокая частота таких мутаций у *cn* и му-

таций с потерей одного фрагмента для гена *vg* обусловлена, как показал комплексный молекулярный анализ, включающий секвенирование [18], существенным вкладом в названные категории мутаций радиационно-индуцированных конвертантов, генетические изменения у которых, выявляемые ПЦР, идентичны материнским аллелям *cn*¹ и *vg*¹.

Подводя общий итог сравнительному анализу радиационно-индуцированных мутационных изменений, выявляемых ПЦР в четырех генах разной величины и локализации в геноме, можно выделить как общие закономерности в картине их мутагенеза (наличие трех первых категорий мутаций), так и локус-специфические особенности мутагенеза, обусловленные величиной самого гена (появление кластеров делеций из отдельных фрагментов на карте гена *vg*) и особенностями репарации, ведущей к конверсии у всех трех аутосомных генов в ранней зиготе после сингамии. Дальнейший молекулярный анализ названных категорий мутаций требует секвенирования, такие исследования начаты и в настоящее время продолжаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юшкова Е.А., Зайнуллин В.Г. Радиационно-индуцированная фрагментация ДНК в клетках соматических и генеративных тканей *Drosophila melanogaster* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 1. С. 97–103.
2. Wang Z.C., Wang X.M., Jiao B.H. et al. Detection of mitochondrial DNA deletion by a modified PCR method in a ⁶⁰Co radiationexposed patient // IUBMB Life. 2003. V. 55. P. 133–137.
3. Kima E.J., Kima S.Y., Yuna H.J. et al. Detection and quantification of a radiation-associated mitochondrial DNA deletion by a nested real-time PCR in human peripheral lymphocytes // Mutat. Res. 2012. V. 749. P. 53–59.
4. Geyer P.K., Corces V.G. Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster* // Genes Dev. 1987. V. 1. P. 996–1004.
5. Wittkopp P.J., True J.R., Carroll S.B. Reciprocal functions of the *Drosophila yellow* and *ebony* proteins in the development and evolution of pigment patterns // Development. 2002. V. 129. № 8. P. 1849–1858.
6. Drapeau M.D., Radovic A., Wittkopp P.J., Long A.D. A gene necessary for normal male courtship, *yellow*, acts downstream of fruitless in the *Drosophila melanogaster* larval brain // J. Neurobiol. 2003. V. 55. № 1. P. 53–72.
7. Lindsley D. and Zimm G. The genome of *Drosophila melanogaster*. Part 4: Genes L-Z // Drosophila Inform. Service. 1990. V. 68. P. 350–355.
8. Alexandrov I.D. Quality and frequency of γ - and neutron-induced visible mutations in *Drosophila spermatozoa* // Mutat. Res. 1984. V. 127. P. 123–127.
9. Александров И.Д., Александрова М.В., Ланидус И.Л., Кораблинова С.В. ОГЭ нейтронов деления при индукции рецессивных мутаций разного типа у *Drosophila melanogaster* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 3. С. 245–258.
10. Александров И.Д., Александрова М.В. Нейтроны и тяжелые заряженные частицы в биологии и медицине // Под ред. А.Ф. Цыба. Обнинск: НИИ мед. радиологии АМН СССР, 1989. С. 6–17.
11. Александров И.Д. Использование излучения ²⁵²Cf для терапии опухолей // Под ред. Б.М. Втюрина. Обнинск: НИИ мед. радиологии АМН СССР, 1987. С. 47–52.
12. Lefevre G. Sterility, chromosome breakage, x-ray-induced mutation rates and detected mutation frequencies in *Drosophila melanogaster* // Genetics (US). 1967. V. 55. № 2. P. 263–275.
13. Alexandrov I.D., Zakharov I.A. and Alexandrova M.V. The Moscow Regional *Drosophila melanogaster* Stock Center // Drosophila Inform. Serv. 1997. V. 80. P. 109–130.
14. Давкова Л.Н., Александров И.Д., Александрова М.В. Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 5. Ген *cinnabar*: Общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 1. С. 5–20.
15. Adams M. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. V. 287. P. 2185–2195.
16. 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 // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52. № 5. С. 453–466.
17. Александров И.Д., Афанасьева К.П., Александрова М.В., Ланидус И.Л. Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 1. Ген *vestigial*: Молекулярная характеристика “точковых” мутаций // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52. № 3. С. 234–246.
18. Александров И.Д., Александрова М.В., Афанасьева К.П. Межхромосомная генная конверсия как регулярный механизм потери гетерозиготности (LOH) в ранней зиготе у *Drosophila melanogaster* // Докл. академии наук. 2015. Т. 460. № 6. С. 1–3.

Radiation Biology of Structurally Different *Drosophila* Genes. Report VII. The *yellow* Gene: General Characteristics of Radiomutability and PCR Assay of Gene “Point” Mutations

E. V. Kravchenko^a, S. V. Dubovik^a, M. V. Alexandrova^a, and I. D. Alexandrov^{a,#}

^aJoint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

[#]E-mail: a38don@jinr.ru

The results of the genetic, cytogenetic and molecular (PCR) analysis of γ - and neutron-induced recessive mutations at the sex-linked peritelomeric *yellow*⁺ (*y*⁺) gene are presented. These mutations are isolated at the same large-scale experiments as were undertaken for induction of the recessive mutations at the autosomal *black*⁺ (*b*⁺), *cinnabar*⁺ (*cn*⁺) and *vestigial*⁺ (*vg*⁺) genes of *Drosophila melanogaster*. As with the autosomal genes, the whole spectrum of the *y* mutations induced by different radiation qualities consists of the two main genetically different classes such as gene/point and gene/structural mutations. The induction rate of both mutation classes is found to be increased linearly with the dose of low- and high-LET radiation; the RGE values of neutrons are 1.0 and 2.0 for the gene/point and gene/structural mutations, respectively. The results of PCR assay of 7 spontaneous, 25 γ - and 9 neutron-induced gene/point *y* mutations arising within the structural-functional gene map (7991 bp) subdivided into 9 overlapping fragments permit to identify 4 different categories of DNA alterations underlying these mutations: 1) DNA alterations, which are not detected by PCR (PCR⁺ mutations); 2) mutations as a loss of one fragment; 3) mutations as a loss of several adjacent fragments and 4) mutations as a cluster of the lost single fragments. The distribution of the deletion mutations on the full gene map is found to be not uniform. The comparative analysis of the frequency and quality patterns of the deletion mutations induced only in the structural part (exons + introns) of the *y*, *b*, *cn* and *vg* genes has revealed general and gene-specific regularities of the radiation-induced mutagenesis detected by PCR on the DNA level, which is under discussion.

Keywords: neutrons, γ -rays, recessive mutations, *Drosophila melanogaster*, *yellow* gene, PCR, relative biological effectiveness, enhancer