

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук

На правах рукописи

Михайлова Алина Геннадьевна

Мутационные спектры мтДНК животных

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1.5.7 - генетика

Москва, 2022

Работа выполнена в лаборатории системной биологии и вычислительной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), г. Москва

Научный руководитель:

Попадьян Константин Юрьевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра геномных исследований Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград

Официальные оппоненты:

Глотов Андрей Сергеевич

доктор биологических наук, руководитель Отдела геномной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», г. Санкт-Петербург

Гусев Олег Александрович

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

Тел: (499) 135-62-13, факс: (499) 132-89-62, e-mail: dissovet@vigg.ru. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте института www.vigg.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И. И

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ожидаемая продолжительность жизни человека неустанно растет, и с каждым днем человечество все чаще сталкивается с болезнями старения. Наиболее революционные открытия в области геронтологии происходят не только при исследовании одного лишь человека, а также при сравнительных анализах короткоживущих и долгоживущих видов животных. Отличным примером такого подхода являются недавние открытия, сделанные в лаборатории Горбуновой, которые подчеркивают важность эволюционной перспективы при изучении процесса старения человека.

Старение, обусловленное накоплением мутаций в ДНК, наиболее сильно выражается в митохондриальной ДНК (мтДНК), которая мутирует в десятки раз быстрее ядерного генома, а также способна к быстрому внутриклеточному отбору в сторону эгоистичных форм мтДНК. Эти качества мтДНК делают ее очень интересным и важным объектом изучения старения. В связи с этим, исходя из актуальности исследования мутационных процессов в мтДНК, главной целью данной работы является понимание роли митохондриальной компоненты в процессе старения различных тканей у позвоночных животных. Ранее исследования на опухолевых тканях показали, что мутационный спектр (вероятности перехода одного нуклеотида в любой другой) митохондрий уникален и обусловлен действием специфичного для митохондрий мутагена, который воздействует схожим образом на разные клетки. Предположительно, что небольшие различия в мутационных спектрах митохондриальной ДНК могут свидетельствовать об особенностях митохондриальной среды и мутагенах.

Восстановление мутационных спектров мтДНК разных видов животных позволит провести сравнительно-видовые анализы, которые прольют свет на видоспецифичные мутагены. Важным этапом в расшифровке митохондриальных мутаций является проведение биоинформатического анализа доступных данных мтДНК, а также выявление химических мутагенов, которые могут быть ответственными за наблюдаемые ассоциации, такие как уровень окислительного метаболизма. Этот подход позволит открыть новую главу в интерпретации изменений в митохондриальных геномах. Мутационные спектры, восстановленные по

нейтральным синонимичным полиморфным заменам мтДНК, смогут раскрыть физиологические и метаболические особенности изучаемых видов животных.

Кроме однонуклеотидных вариантов в митохондриальном геноме, затрагивающие точечные изменения в геноме, более крупные повреждения мтДНК, такие как делеции, как правило приводят к более серьезным последствиям, ввиду высокой плотности генов в митохондриальном геноме. Соматические митохондриальные делеции, которые накапливаются у стареющих людей, связаны с нейродегенерацией и саркопенией. Несмотря на исследования, нет общепринятых мнений о механизмах образования делеций в мтДНК. Понимание этих механизмов поможет развивать митохондриальную медицину для снижения риска делеций.

В итоге, многомасштабные эмпирические данные по мутагенезу мтДНК, накопленные в различных базах данных позволят изучить и внедрить мутационные спектры мтДНК, что приведет не только к открытию новых фундаментальных законов, касающихся правил мутагенеза мтДНК, и описанию молекулярных подписей ключевых мутагенов, но и к некоторым прикладным результатам.

Степень разработанности темы исследования. Десятикратно более высокая скорость мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) по сравнению с ядерной ДНК и увеличенное число копий мтДНК создают высокий уровень митохондриальных мутаций как в герминальных, так и в соматических тканях. Эти мутации мтДНК могут быть связаны с наследственными генетическими болезнями, фенотипами старения (например, нейродегенерация и саркопения) и даже развитием злокачественных опухолей. Несмотря на высокую частоту возникновения мутаций мтДНК и их влияние на здоровье человека, процесс митохондриального мутагенеза изучен недостаточно. Вопросы, связанные с пониманием природы такого мутагена или мутагенов, его связью с возрастом человека и животных, межвидовой изменчивостью мутационных спектров и их причинами, по-прежнему остаются открытыми.

В мировой литературе существует огромное количество информации о мутационных спектрах ядерных геномов, однако митохондриальные геномы фактически не изучены. Например, ранее было предположено, что избыток G-нуклеотидов в митохондриальном геноме у долгоживущих млекопитающих может быть следствием благоприятного отбора в пользу более стабильных геномов у таких видов, однако для достоверных выводов необходимо сравнить мутационные процессы

у короткоживущих и долгоживущих млекопитающих. Мутационные спектры мтДНК оказались различными между разными видами, но до сих пор не установлены ключевые факторы, объясняющие эти различия.

Цель исследования: Целью настоящей работы является изучение особенностей мутационных спектров мтДНК различных видов животных и человека с последующим выделением факторов мутагенеза и установлением мутационных сигнатур митохондриального генома позвоночных.

Задачи исследования:

1. Анализ мутационных спектров мтДНК, полученных из данных соматических и герменативных мутаций здоровых тканей человека и мышей;
2. Реконструкция и анализ мутационных спектров мтДНК, полученных из полиморфных геномных данных млекопитающих;
3. Реконструкция и анализ мутационных спектров мтДНК, полученных из полиморфных геномных данных рыб;
4. Анализ мутационных спектров мтДНК соматических мутаций, полученных из данных опухолевых тканей человека;
5. Анализ эффектов, обусловленных различиями базового метаболизма позвоночных животных (продолжительности жизни и температуры) на митохондриальный мутационный спектр;
6. Анализ эффектов обусловленных различиями клеточных параметров и метаболизма (гипоксии и скорости пролиферации клеток) на митохондриальный мутационный спектр опухолевых тканей человека.

Научная новизна работы. Впервые восстановленные мутационные спектры митохондриальной ДНК (мтДНК) у различных видов животных позволили провести сравнительные анализы, которые раскрывают видоспецифичные мутагены митохондрий. В исследовании обнаружено, что вероятность транзиций А>Г на тяжелой цепи митохондриального генома увеличивается у долгоживущих животных и у животных с повышенной температурой тела. Также впервые было замечено, что мутационный спектр митохондриальной ДНК чувствителен к уровню молекулярного кислорода на тканевом и клеточном уровне, который определяется скоростью деления клеток и интенсивностью их метаболизма.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Предварительные результаты позволили сформулировать рабочую гипотезу: мутационный спектр митохондриальной ДНК, особенно частота мутаций А>Г на тяжелой цепи мтДНК, может быть чувствителен к уровню аэробного метаболизма на уровне клеток и тканей. Таким образом, мутационный спектр мтДНК может стать информативным маркером для оценки интенсивности аэробного метаболизма в различных клетках, тканях, организмах и видов. Исследование и использование этого маркера могут открыть новые возможности для решения как фундаментальных, так и прикладных задач, и расширить применение митохондриальных мутаций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Мутационные спектры позвоночных ассоциированы с такими параметрами жизненного цикла позвоночных животных, как температура тела и продолжительность жизни.
2. Вероятность транзиций А_Т>Г_Т увеличивается у долгоживущих животных и у животных с высокой температурой тела.
3. Вероятность транзиций А_Т>Г_Т уменьшается в опухолевых образцах на более поздней стадии канцерогенеза (предположительно более гипоксичных) и в тканях, с высокой скоростью пролиферации клеток (также предположительно более гипоксичных).
4. Мутация А_Т>Г_Т может быть чувствительна к уровню молекулярного кислорода и являться уникальным маркером окислительного метаболизма клеток, тканей и организмов.

Степень достоверности и апробация работы. Результаты исследования представлены в 6 научных публикациях, в том числе в 3 статьях в ведущих научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК для защиты диссертаций. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: международная конференция Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) Satellite Meeting, Эйв-Геди, Израиль, 3-6 сентября 2017; международная конференция SMBE, Йокогама, Япония, 8-12 июля 2018; международная конференция Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB), 20-25 августа 2018; международная конференция Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB), Москва, Россия, 27-

30 июля 2019; международная конференция SMBE Fitch Symposium, 30 июня 2020; BGRS/SB, 6-10 июля 2020; международная конференция European Society of Human Genetics (ESHG), 28–31 августа 2021; международная конференция МССМВ, Москва, Россия, 3-6 августа 2021; международная конференция ESHG, 11-14 июня 2022; международная конференция SMBE Everywhere Global Symposia 3, 2 августа 2022; международная конференция Mitochondria 2022 Workshop, Эй-Геди, Израиль, 13 – 16 ноября 2022; международная конференция ESHG, Глазго, Великобритания, 10-13 июня 2023; международная конференция SMBE, Феррара, Италия, 23-27 июля 2023; всероссийская конференция МССМВ, Москва, Россия, 3-6 августа 2023. Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2018-2022 гг.

Личный вклад автора. Все анализы в ходе данной работы проводились лично автором. Автору работы принадлежит ключевая роль в постановке целей и задач диссертационного исследования.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 128 страницах и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение», «Выводы», «Благодарности» «Список литературы». Работа содержит 40 рисунков и 29 таблиц. Список литературы включает 123 литературных источников. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-75-20143 - (2021-2024 гг.) и Российской Федеральной программой академического лидерства "Приоритет 2030" в Балтийском федеральном университете им. Иммануила Канта.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы посвящен аспектам изучения мутагенеза митохондриальной ДНК. Недавние исследования показали, что мутации в митохондриальной ДНК (мутационные спектры) различаются между отдельными видами позвоночных животных, однако до сих пор не было предложено никаких движущих факторов, объясняющих эти различия. Анализ мутаций в мтДНК на уровне сравнения тканей также показал существенные различия в мутационных спектрах. Мутации мтДНК в опухолевых клетках человека не соответствуют ожиданиям, базирующимся на

известных ядерных мутационных сигнатурах. Таким образом, основной мутаген мтДНК, а также причины изменчивости мутационных спектров мтДНК неизвестны как на сравнительно-тканевом, так и на сравнительно-видовом уровне. Кроме того, имеется недостаток информации о мутационных признаках, вызванных окислительным повреждением мтДНК. Принимая во внимание недавний прогресс в расшифровке вариаций мутационных спектров ядерного генома, главная цель данной работы закрыть данный пробел в области изучения митохондриального мутагенеза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Обозначение тяжелой цепи 12-компонентного мутационного спектра мтДНК. Хотя традиционно принято оперировать заменами мтДНК в нотации легкой цепи, которая соответствует референсным последовательностям мтДНК, чтобы упростить биологическую интерпретацию мутационного спектра мтДНК, был использован 12-компонентный спектр, основанный в нотации тяжелой цепи (далее обозначается подстрочным индексом T).

2.2 Анализ дуплексного секвенирования мтДНК. Все данные о соматических мутациях мтДНК, полученные с помощью метода дуплексного секвенирования, были получены от Санчес-Контрерас и др.

2.3 Реконструкция видоспецифичного мутационного спектра всех доступных видов млекопитающих. Используя все доступные внутривидовые последовательности (апрель 2016 г.) генов, кодирующих митохондриальные белки, был получен мутационный спектр для каждого вида. Згрузив все доступные последовательности мтДНК любых доступных белок-кодирующих генов для всех видов позвоночных, была реконструирована внутривидовая филогения, используя последовательность аутгруппы (ближайший вид к анализируемому), затем реконструированы спектры предковых состояний во всех позициях во всех узлах внутреннего дерева и, наконец, получен список однонуклеотидных замен для каждого гена каждого вида. Для выполнения данной задачи был разработан программный комплекс.

2.4 Подбор экологических параметров. Время генерации поколения в днях млекопитающих была загружена из базы данных «Dryad»:

<https://doi.org/10.5061/dryad.gd0m3>. Среднегодовая температура окружающей среды в градусах Цельсия и время полового созревания в годах для рыб были загружены с <https://www.fishbase.se/> (по состоянию на сентябрь 2019 г.). Температура тела была получена из базы данных AnAge (<https://genomics.senescence.info/species/index.html>). Температура птиц была получена из исследования McNab В.К., 1966.

2.5 Анализ полных митохондриальных геномов. Полные митохондриальные геномы были загружены из базы данных GenBank, используя следующий поисковый запрос: ‘Chordata [Organism] AND (complete genome [All Fields] AND mitochondrion [All Fields] AND mitochondrion [filter]’. Затем были получены неперекрывающиеся области генов, кодирующих белки, определено использование кодонов и извлечены фракции нуклеотидов Ат, Гт, Тт и Цт в синонимичных четырехкратно вырожденных позициях.

2.6 Анализ времени, проведенного ДНК в одноцепочечном состоянии. Основываясь на асинхронном режиме репликации мтДНК и предполагая постоянную скорость репликации ДНК-полимеразой в пределах большой и малой дуг репликации мтДНК, относительное время, проведенное ДНК в одноцепочечном состоянии (ВПДОС) для белок-кодирующих генов, кодируемых на тяжелой цепи мтДНК человека было рассчитано, как $ВПДОС_{\text{для большой дуги}} = (\text{Расположение гена} - \text{Точка начала репликации легкой цепи}) * 2$.

2.7 Анализ дополнительных метрик. Асимметрия кодонов была определена как медианное значение для каждой аминокислоты. $S_{TG-SAЦ}$ была рассчитана, как разность сумм пар относительных частот нуклеотидов. Весь статистический анализ проводился на языке R. Для анализа филогенетической инерции использовался метод PGLS. Все сырые данные и скрипты депонированы в репозитории GitHub по ссылкам https://github.com/polarsong/mtDNA_mutspectrum/, <https://github.com/mitoclub/MutSpecOfActinopterygii>.

2.8 Нормализация мутационных спектров. Нормализация наблюдаемых нуклеотидных замен производилась по частоте предковых нуклеотидов. Каждый видоспецифичный мутационный спектр трансформирован в частоты так, чтобы общая сумма всех скоростей замен была равна единице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Мутационные спектры млекопитающих: замена $A_T > G_T$ ассоциирована с продолжительностью жизни.

3.1.1 Частота de novo мутаций $A_T > G_T$ увеличивается с возрастом в соматических клетках и клетках зародышевой линии млекопитающих. Геном митохондрий характеризуется сильной асимметрией в содержании нуклеотидов: тяжелая цепь богата гуанином и бедна цитозином. Эта асимметрия может объясняться мутагенными процессами, которые воздействуют на митохондриальную ДНК (мтДНК) в процессе асинхронной репликации. Анализ полных митохондриальных геномов млекопитающих показывает, что данная асимметрия нуклеотидов образует градиент вдоль мтДНК и становится более выраженной вдоль большой дуги репликации мтДНК от гена субъединицы I цитохром с-оксидазы (CO1) к гену цитохрома b (CITb). Недавние исследования подтверждают мутагенную природу этого градиента и его чувствительность к возрасту. Чтобы проверить потенциальную чувствительность двух наиболее распространенных транзиций к параметрам жизненного цикла позвоночных, был проанализирован недавний набор данных de novo соматических мутаций в мтДНК, полученных с помощью метода дуплексного секвенирования. В работе Санчес-Контрерас и др. были представлены три группы образцов: молодые мыши (4–5 мес), старые мыши (26 мес) и люди (10–90 лет), что позволило доказать, что мутационный градиент усиливается с возрастом.

Сравнение мутаций между молодыми мышами, старыми мышами и людьми показывает, что выраженность градиентов $C_T > T_T$ и $A_T > G_T$ увеличиваются с возрастом. Однако, выраженность градиента $A_T > G_T$ увеличивается быстрее, что указывает на его более высокую чувствительность к возрасту.

Дополнительные анализы подтвердили, что $A_T > G_T$ также увеличивается с возрастом в образцах (Рисунок 1, все p-значения $< 1,583e-08$, U-критерий Манна-Уитни). Анализ данных мутаций у людей показал, что они также связаны с возрастом.

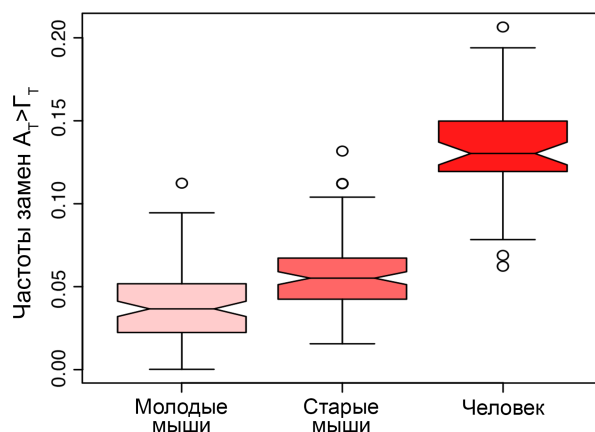


Рисунок 1 — Частота $A_T > G_T$ в общем мутационном спектре увеличивается с возрастом

3.1.2 $A_T > G_T$ наиболее часты у млекопитающих с большим временем генерации поколения. Полученные результаты и литературные данные позволяют предположить, что вариации в мутационных спектрах, в частности транзиции $A_T > G_T$, могут быть связаны со старением. Следовательно, было предположено, что видоспецифичные мутационные спектры мтДНК зависят от времени генерации поколения, что, в свою очередь, является хорошим аппроксиматором возраста ооцитов у млекопитающих. Сосредоточив внимание на самых нейтральных (замены нуклеотидов, происходящие в четырехкратно вырожденных синонимичных сайтах) заменах, был восстановлен нейтральный мутационный спектр для 611 видов млекопитающих. Средний мутационный спектр всех доступных видов млекопитающих (Рисунок 2) демонстрирует сильное преобладание замен $A_T > G_T$ и $C_T > T_T$.

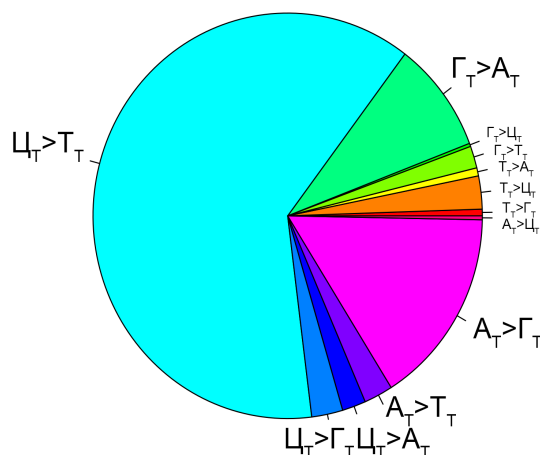


Рисунок 2 — Средний нормализованный мутационный спектр мтДНК видов млекопитающих (N = 611)

Подробно был проанализирован ген ЦИТЬ, который составлял большую часть полученной базы данных, включая 56% всех извлеченных замен (39,112 из 70,053). В качестве простейшей метрики мутационного спектра для каждого вида было рассчитано соотношение транзиций к трансверсиям (Ts/Tv), которое представляет собой сумму частот всех транзиций, деленную на сумму частот всех трансверсий. Для 424 видов млекопитающих с восстановленным Ts/Tv и известным временем генерации поколения была продемонстрирована положительная корреляция (Рисунок 3, коэффициент Спирмена = 0.23, р-значение = $2.021e-06$, $N = 424$)

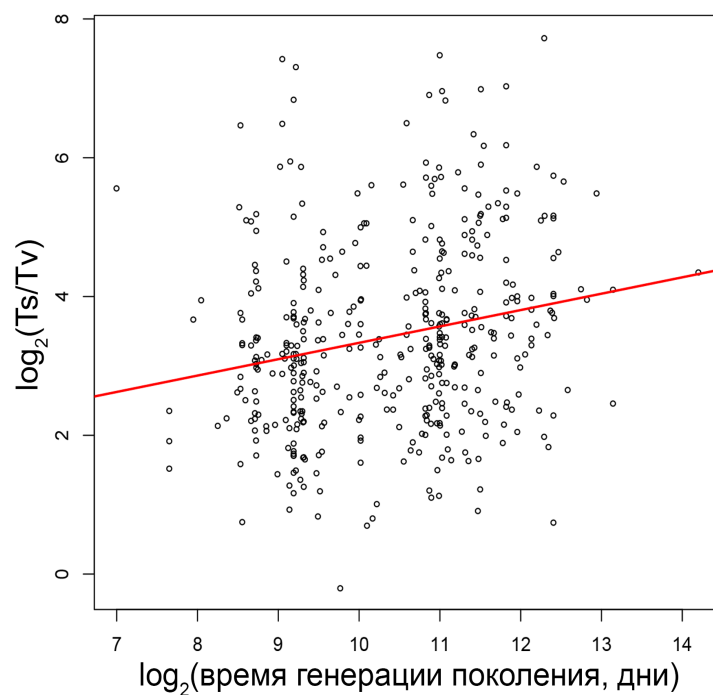


Рисунок 3 — Положительная корреляция между временем генерации поколения и Ts/Tv у млекопитающих

Чтобы понять, какой тип замены в основном способствует наблюдаемой корреляции между Ts/Tv и временем генерации поколения, было проведено двенадцать анализов попарной ранговой корреляции между каждым типом замены и временем генерации поколения. Было продемонстрировано, что только частота замены $A_T > G_T$ положительно коррелировала со временем генерации поколения (Рисунок 4, коэффициент Спирмена = 0,252, номинальное р-значение = $1,188e-07$, $N = 424$).

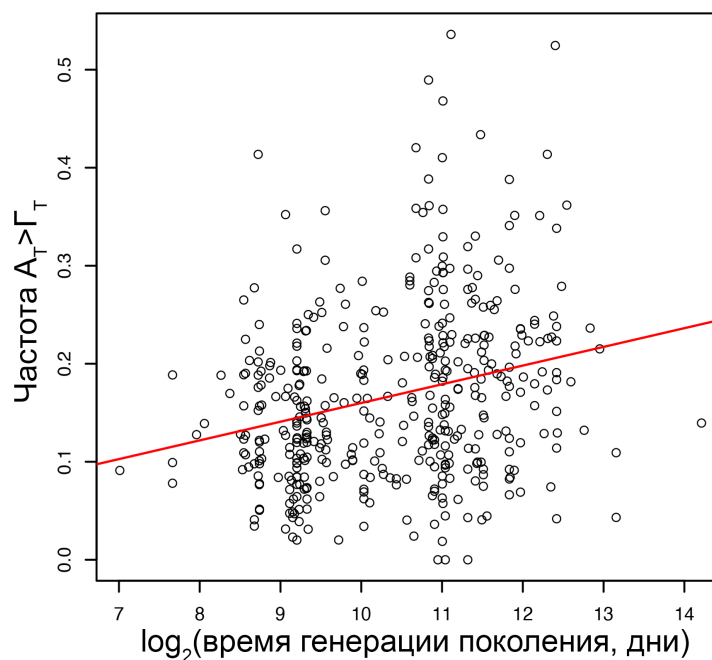


Рисунок 4 — $A_T > G_T$ - тип замен, частота которых сильнее всего коррелирует с временем генерации поколения

3.1.3 МтДНК млекопитающих с большим временем генерации поколения более бедна A_T и богата G_T вследствие интенсивного мутагенеза в направлении $A_T > G_T$. Далее было проанализировано влияние мутационного сдвига на состав нуклеотидов мтДНК у животных с различным временем генерации поколения. Компьютерные симуляции мутагенеза показали, что ожидаемый нейтральный состав нуклеотидов в мтДНК зависит от мутационного спектра и не зависит от начальных условий. Этот ожидаемый нуклеотидный состав был сравнен с наблюдаемым составом мтДНК у разных видов млекопитающих и показал, что фактический состав очень близок к ожидаемому. В целом, это говорит о том, что анализируемые виды близки к состоянию равновесия в нуклеотидном составе. Затем было проанализировано, как частота $A_T > G_T$ мутаций влияет на нуклеотидный состав мтДНК. Результаты показали, что у видов с долгой продолжительностью поколения наблюдается снижение частоты A_T и повышение G_T нуклеотидов (Рисунок 5, для A_T ро-коэффициент Спирмена = -0.31, р-значение = $1.287e-15$; для G_T ро-коэффициент Спирмена = 0.47, р-значение < $2.2e-16$; N = 650).

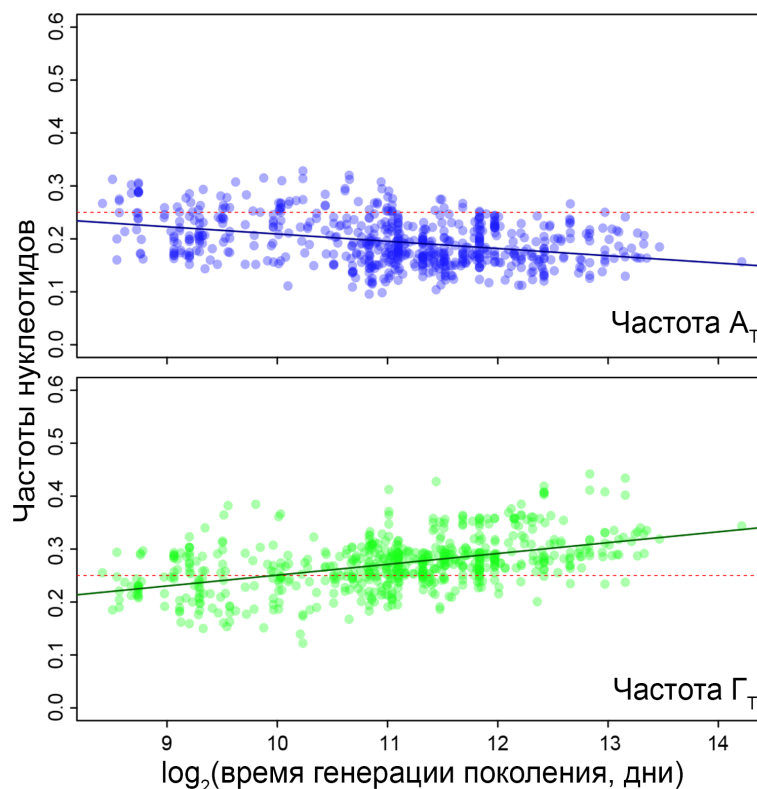


Рисунок 5 – Частоты нуклеотидов в нейтральных позициях всех 13 белок-кодирующих генов в зависимости от времени генерации поколения

3.1.4 $G_T A_T$ -сдвиг является функцией как ВПДОС, так и времени генерации поколения у млекопитающих. Наконец была проанализирована зависимость частоты замен $A_T > G_T$ в мтДНК от времени, проведенного ДНК в одноцепочечном состоянии (ВПДОС). Гены, расположенные близко к началу репликации легкой цепи (O_L), такие как ЦО1, проводят минимальное время в одноцепочечном состоянии и имеют низкую частоту замен $A_T > G_T$. Предположительно, нейтральный нуклеотидный состав мтДНК зависит как от специфического для гена ВПДОС, так и видоспецифического времени генерации поколения. Для проверки этой гипотезы был рассчитан $G_T A_T$ -сдвиг для каждого гена каждого вида млекопитающих, виды были разделены на категории с коротким и длинным временем генерации поколения. На графике $G_T A_T$ -сдвига 12 протеинкодирующих генов мтДНК проранжированы вдоль большой дуги репликации мтДНК от ЦО1 до ЦИТЬ, соответствующей увеличению ВПДОС (Рисунок 6). Результаты показали, что $G_T A_T$ -сдвиг увеличивается как со генспецифическим ВПДОС, так и с видоспецифическим временем генерации поколения.

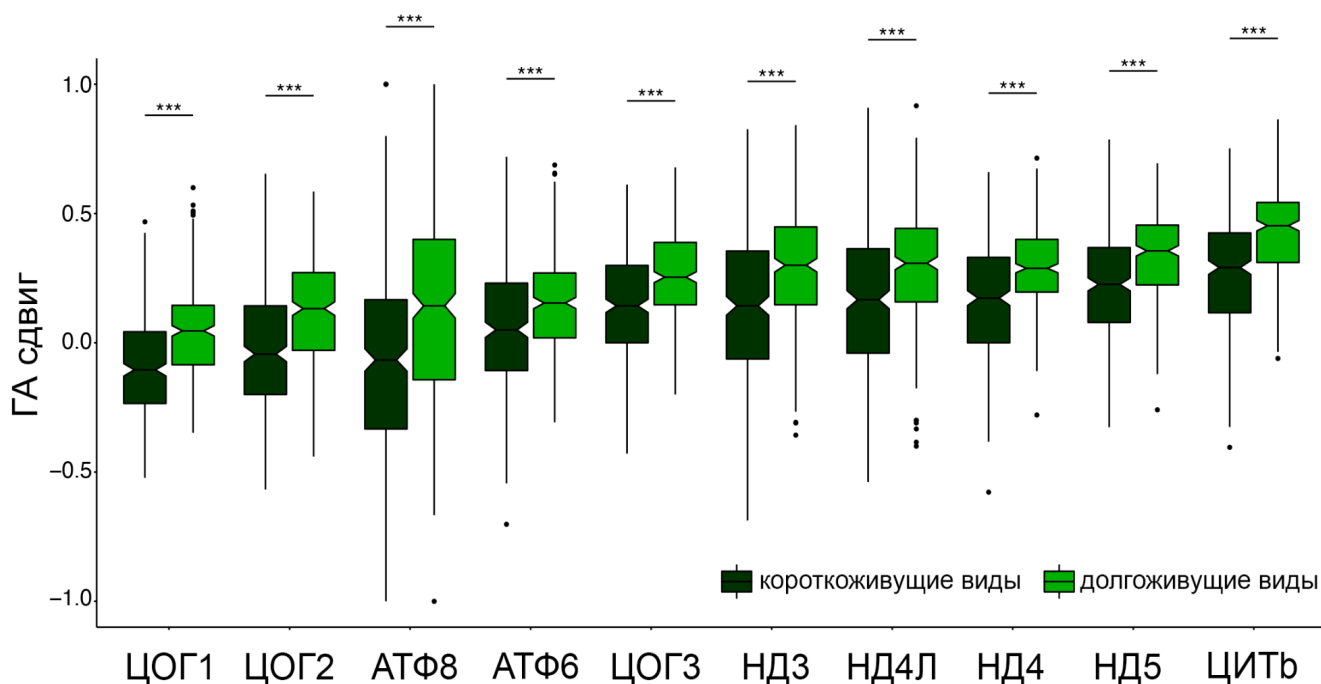
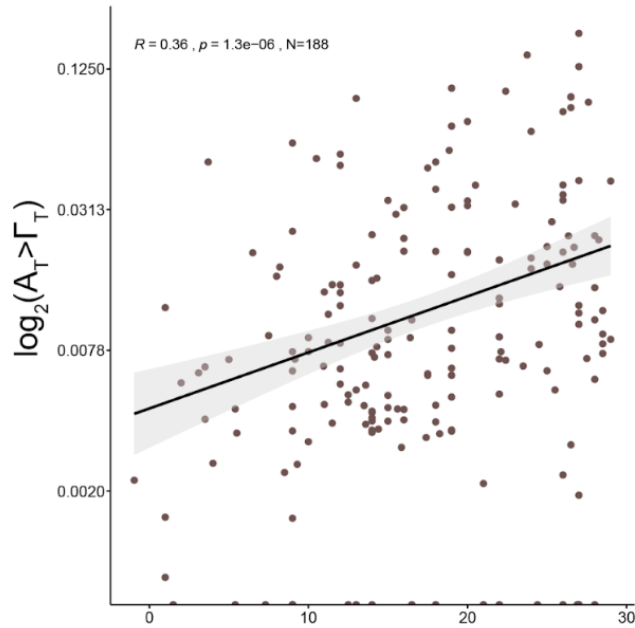


Рисунок 6 – Изменение нуклеотидного состава мтДНК (Г_ТА_Т-сдвиг) коротко- и долгоживущих млекопитающих

3.2 Мутационные спектры экзотермическими животными: замена А_Т>Г_Т ассоциирована с температурой тела.

3.2.1 Видоспецифичный мутационный спектр мтДНК рыб связан с температурой окружающей среды посредством повышенной асимметрии А_Т>Г_Т. Ранее было продемонстрировано увеличение количества замен А_Т>Г_Т в мтДНК долгоживущих млекопитающих, интерпретируя это как признак окислительного повреждения, ассоциированного со старением. Было предположено, что более высокие уровни замены А>Г будут обнаруживаться у видов с высоким аэробным метаболизмом и повышенной температурой тела. Чтобы изучить потенциальное влияние температуры на мутагенез мтДНК, были проанализированы мутационные спектры рыб (*Actinopterygii* N=180; *Chondrichthyes* N=8), которые являются экзотермическими животными, обитающими в широком диапазоне температур окружающей среды. Было продемонстрировано, что А_Т>Г_Т имеет значительную положительную корреляцию с температурой (Рисунок 7).



Медиана среднегодовой температуры воды, С°

Рисунок 7 – Видоспецифичный мутационный спектр рыб ассоциирован с температурой воды

Ранее проведенные исследования показали, что в митохондриальной ДНК млекопитающих замены $A_T > G_T$ положительно коррелируют со временем генерации поколения. Для исследования подобной связи в рыбах был использован аналогичный показатель: время полового созревания, определенное как возраст, при котором 50% популяции впервые способны размножаться. Был проведен ряд анализов для изучения воздействия температуры и времени созревания на мутационный спектр мтДНК. Была обнаружена отрицательная корреляцию между температурой и временем созревания, указывая на то, что тепловодные виды имеют тенденцию достигать созревания быстрее. Однако ни один из ключевых показателей мутационного спектра не показал корреляции со временем созревания. В целом полученные результаты предполагают, что мутационный спектр мтДНК рыб, в частности $A_T > G_T$ ассоциируются только с температурой.

3.2.2 Мутационный спектр мтДНК рыб влияет на их нейтральный нуклеотидный состав. Исследуя нейтральный нуклеотидный состав в протеин кодирующих 12 генах (все, кроме НД6) были выявлены четыре тенденции: увеличение G_T и T_T , а также снижение A_T и C_T у видов, обитающих в теплых водах по сравнению с

холодными (Рисунок 8). Важно отметить, что увеличение Γ_T и снижение A_T отражают последствия увеличения соотношений $A_T > \Gamma_T$ и у рыб, обитающих в теплых водах.

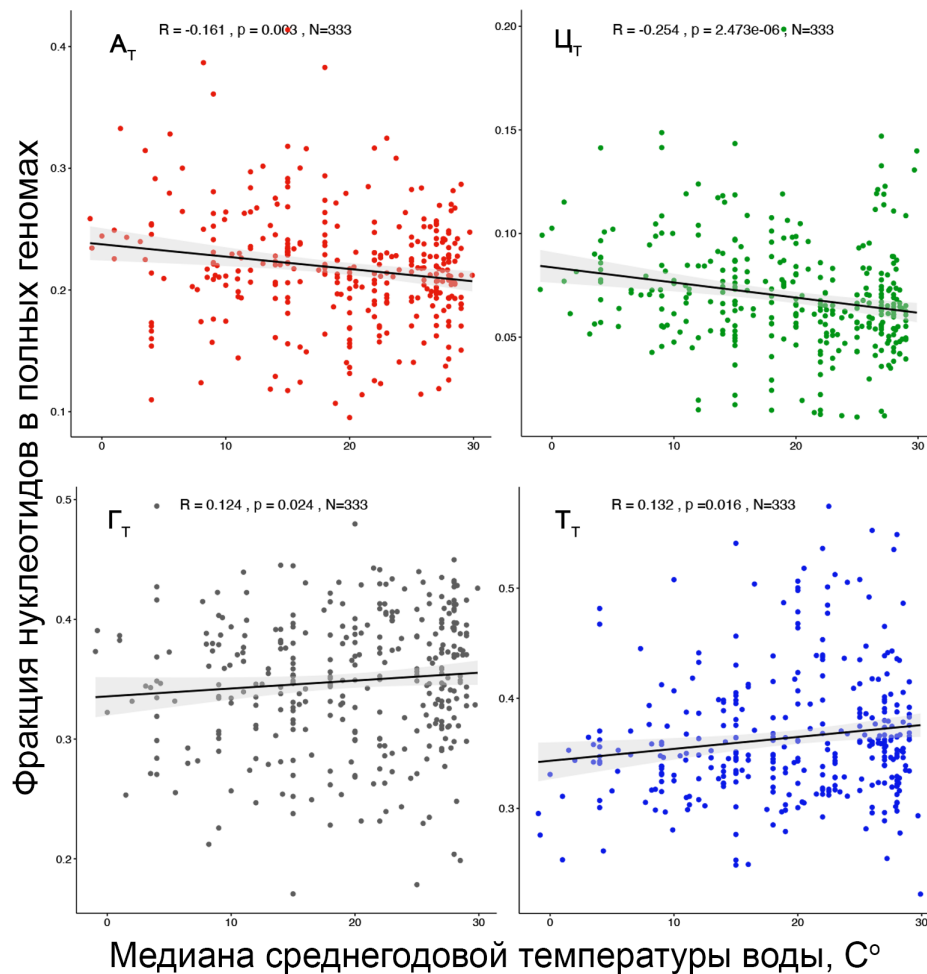


Рисунок 8 – Содержание нейтральных нуклеотидов в геноме мтДНК связано с температурой окружающей среды

Для более наглядного представления частоты нуклеотидов были объединены в специальную метрику $S_{\Gamma T} - S_{A \Psi}$ (сумма нуклеотидов Γ и T минус сумма нуклеотидов A и Ψ) для анализа их связи с температурой и временем созревания. Регрессия $S_{\Gamma T} - S_{A \Psi}$ относительно температуры показала ожидаемую положительную связь. Учитывая увеличение соотношения $A_T > \Gamma_T$ у млекопитающих с большим временем генерации поколения, была исследована возможная связь $S_{\Gamma T} - S_{A \Psi}$ как с температурой, так и с временем созревания у рыб. Было продемонстрировано, что оба фактора положительно влияют на $S_{\Gamma T} - S_{A \Psi}$, но температура оказывает более значительное воздействие на $S_{\Gamma T} - S_{A \Psi}$ по сравнению с временем созревания. Таким образом, состав нуклеотидов митохондриальной ДНК у рыб подвержен воздействию двух факторов: сильного

мутагена, зависящего от температуры, и более слабого мутагена, связанного с продолжительностью жизни (Рисунок 9).

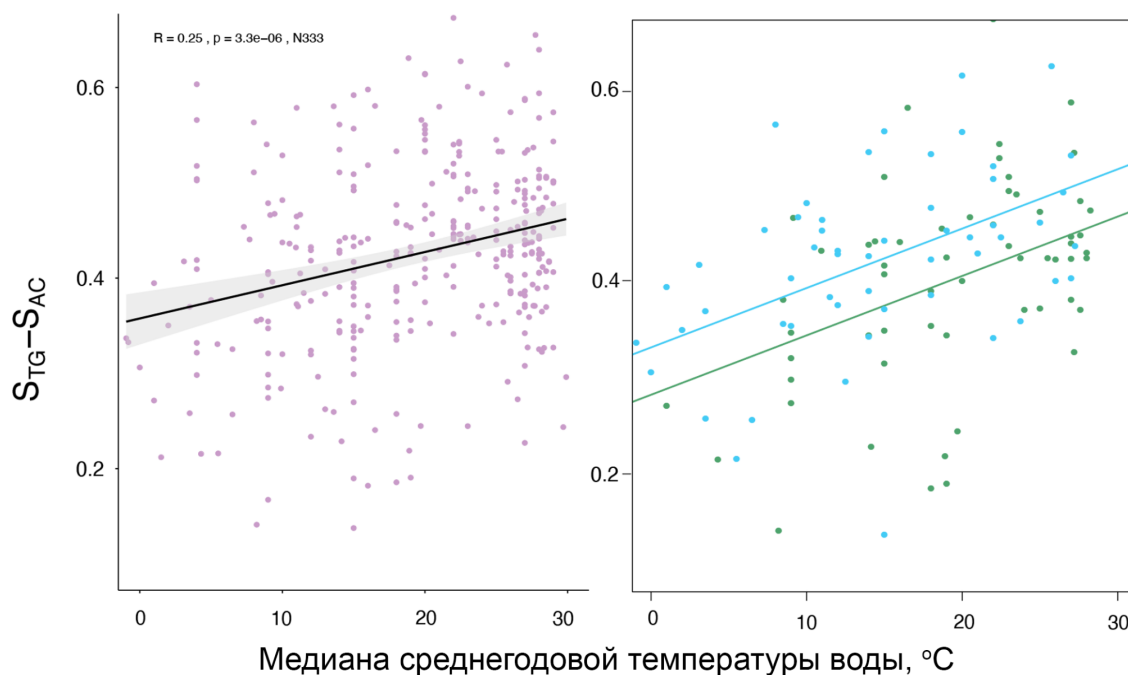


Рисунок 9 – $S_{TG}-S_{AC}$ чувствителен как к температуре, так и ко времени полового созревания, причем температура является наиболее сильным фактором

Примечание: аналогичные положительные наклоны между $S_{TG}-S_{AC}$ и температурой для рано и поздно созревающих рыб, где поздно созревающие рыбы обозначены голубыми точками, а рано созревающие обозначены зелеными точками.

3.2.3 Мутационный спектр мтДНК чувствителен к температуре у всех классов позвоночных. Температурная чувствительность мутационных спектров мтДНК на примере рыб предполагает, что данное явление может быть универсальным. Для проверки этой гипотезы было проведено сравнение мутационных спектров мтДНК пяти классов позвоночных, объединенных в эктотермных (Actinopterygii, Amphibia, Reptilia) и эндотермных (Mammalia, Aves) животных. Сравнивая мутационный спектр мтДНК между этими группами, была выявлена ожидаемая тенденцию: увеличение $A_T > G_T$, что указывает на то, что мутационный спектр мтДНК чувствителен к температуре у всех позвоночных. Поскольку мутационный спектр мтДНК всех позвоночных ассоциирован с температурой, можно ожидать, что состав нейтральных нуклеотидов всего генома также может быть изменен температурно-специфичным мутационным сдвигом. Используя состав нуклеотидов в синонимичных четырехкратно

вырожденных сайтах 12 генов, действительно был выявлен дефицит А_T и избыток Г_T у эктотермных позвоночных по сравнению с эктотермными.

3.3 Мутационный спектр мтДНК в опухолевых тканях человека изменяется во время канцерогенеза и связан со скоростью пролиферации клеток в тканях предшественниках.

Недавно проведенное исследование соматических мутаций митохондриальной ДНК в человеческих опухолях показало сохранение направления мутационных спектров мтДНК в разных типах рака с преобладанием транзиций Ц_T>Г_T и А_T>Г_T. Интересно, что эти спектры мутаций могут меняться в зависимости от стадии развития рака и тканевых метаболических особенностей. Для проверки этой гипотезы, была использована коллекция из 7611 соматических митохондриальных мутаций из 37 типов опухолей, сгруппированных по 21 ткани предшественника опухоли. Анализ показал, что мутационный спектр мтДНК изменяется в течение канцерогенеза: как отношение транзиций к трансверсиям (T_s/T_v), так и отношение А_T>Г_T/Ц_T>Г_T уменьшаются от ранних к поздним стадиям (на более поздних стадиях скорость пролиферации опухолевой ткани выше), что указывает на динамику митохондриальной мутагенной среды во время канцерогенеза.

Одним из ключевых показателей является скорость пролиферации клеток в данной ткани. Было продемонстрировано, что мутационный спектр мтДНК различается в зависимости от скорости обновления стволовых клеток: T_s/T_v уменьшается от медленно пролиферирующих к быстро пролиферирующим тканям, и это связано с уменьшением доли транзиций А_T>Г_T.

Объединяя эти наблюдения, можно предположить, что вероятность транзиций А_T>Г_T зависит как от времени возникновения мутации, так и от скорости пролиферации тканей. Анализ показал, что вероятность транзиций А_T>Г_T уменьшается как в течение канцерогенеза, так и в быстро пролиферирующим тканях. Эти изменения мутационных спектров могут быть связаны с уровнем аэробного метаболизма, от гипоксии к нормоксии. Дополнительный анализ также показал отрицательную связь между уровнем гипоксии и долей транзиций А_T>Г_T.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя разные подходы, было проведено сравнение мутационных спектров мтДНК у разных видов позвоночных и внутри разных типов тканей человека. Эти анализы позволили выявить различия в мутационных спектрах между видами с разными характеристиками жизненного цикла и физиологией. Полученные результаты показали, что скорость замен $A_T > G_T$ увеличивается с продолжительностью жизни организма и температурой тела. Это наблюдение было обнаружено на разных эволюционных масштабах, включая короткие периоды - месяцы и годы (анализ мутационных спектров разных тканей), средние периоды - десятки или сотни тысяч лет (анализ межвидовых мутационных спектров) и длительные периоды - миллионы лет (анализ межклассовых мутационных спектров). Такая универсальная зависимость требует дополнительного объяснения.

Предположительно, полученные наши результаты больше отражают мутационные процессы, нежели отбор. Во-первых, имеется мало оснований ожидать эффект отбора для чрезвычайно редких мутаций мтДНК с частотой менее 1%. Во-вторых, отсутствие доказательств отбора на синонимичных четырехкратно вырожденных сайтах мтДНК млекопитающих поддерживает идею, что полиморфные варианты играют важную роль в этом процессе.

Также было обнаружено, что температурная чувствительность мутационного спектра может быть связана с усилением окислительного повреждения у видов с высоким уровнем метаболизма. Дополнительные эксперименты показали положительную связь между потреблением кислорода и мутациями $A_T > G_T$. Эффект температуры может также влиять на характеристики жизненного цикла организмов, включая продолжительность жизни и время генерации поколения.

Несмотря на наблюдения, невозможно однозначно утверждать, что замены $A_T > G_T$ вызваны окислительным повреждением, но предположение о возможной связи остается открытым для дальнейших исследований. Интересно, что инозин, образующийся при окислительном дезаминировании аденозина в одноцепочечной ДНК, может способствовать мутациям $A > G$ и $T > C$. Полученные результаты предоставляют новые возможности для использования мутационных спектров мтДНК в различных исследованиях, включая исследования старения, биологического возраста ооцитов и оценки времени генерации поколения не модельных видов позвоночных.

ВЫВОДЫ

1. Мутационный спектр мтДНК млекопитающих определяется повреждениями ассоциированными с продолжительностью жизни организма, при чём мутации А_T>Г_T могут являться специфичным для митохондрий признаком химического повреждения, связанного со старением.

2. Мутационный спектр мтДНК рыб и других эктотермных позвоночных повреждениями ассоциированными с температурой среды, что подтверждается положительной корреляцией мутаций А_T>Г_T с видоспецифичной температурой окружающей среды и, как следствие, скоростью метаболизма.

3. Мутационный спектр мтДНК человека в опухолевых тканях ассоциирован со скоростью пролиферации клеток и с уровнем нормоксии/гипоксии посредством мутаций А_T>Г_T.

4. Предполагается, что мутационный спектр мтДНК позвоночных животных чувствителен к уровню аэробного метаболизма посредством транзиций А_T>Г_T, которые являются уникальным маркером окислительного повреждения клеток, тканей и организмов, специфического для митохондриального генома.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. Mikhailova A. G. [и др.]. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // *Nucleic acids research*. 2022. № 18 (50). С. 10264–10277.
2. Shamanskiy V., Mikhailova A.A., Tretiakov E.O., Ushakova K., **Mikhailova A. G.**, Oreshkov S. [и др.]. Secondary structure of the human mitochondrial genome affects formation of deletions // *BMC biology*. 2023. № 1 (21). С. 103.
3. Гончаров А.Г., Попадьян К.Ю., Козенков И.И., **Михайлова А.Г.**, Лобанова В.В., Татаркина М.А., Ильющенко Д.В., Реверчук И.В., Тынтерова А.М., Двирский А.А., Джигкаев А.Х., Тимофеева Е.В., Гунбин К.В. Methodological approaches to the study of the determinants of somatic mitochondrial heteroplasmy in the elderly // *Journal of Ural Medical Academic Science*. 2022. № 3 (19). С. 322–332.

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

1. Mikhailova A. G. [и др.]. Deamination of adenine to guanine is a signature of oxidative damage in mitochondrial DNA // Abstracts from the 55th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: Hybrid Posters. Eur J Hum Genet 31 (Suppl 1). 2023. P. 345–709.
2. Кошель А.А., Осадчий Г.Г., Михайлова А.А., **Михайлова А.Г.**, Ефименко Б.Э., Гунбин К.В., Попадьян К.Ю. Differences in the mtDNA mutation spectrum of termite and non-termite cockroaches are associated with life expectancy // X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. 2023. С. 39.
3. Mikhailova A. G. [и др.]. Mitochondrial mutational spectrum in human cancers is sensitive to cellular hypoxia // Abstracts from the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: e-Posters. Eur J Hum Genet 30 (Suppl 1). 2022. P. 88–608.
4. Гусаров Ю.С., **Михайлова А.Г.**, Орешков С.С., Ефименко Б.Э., Гунбин К.В., Бурская В.О., Попадьян К.Ю. Усиление метаболизма у птиц с различными типами питания и экозонами провоцирует мутагенез мтДНК вследствие урона от АФК // Сборник тезисов конференции ХИМБИОSEASONS 2022. 2022. С. 15.
5. Shamanskiy V., Mikhailova A. A., Ushakova K., **Mikhailova A. G.**, Oreshkov S., Knorre D., Tretiakov E. O. [и др.]. // Abstracts from the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: e-Posters. Eur J Hum Genet 30 (Suppl 1). 2022. P. 88–608.
6. Mikhaylova A.G. [и др.]. Mitochondrial mutational spectrum in poikilothermic versus homeothermic vertebrates: effects of the temperature // Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2020). The Twelfth International Multiconference Abstracts. 2020. P. 224-225.
7. Ushakova K., Shamanskiy V., Mikhailova A.A., **Mikhailova A.G.**, Tretiakov E., Mazunin I., Popadin K., Gunbin K. A global human mitochondrial tree as a resource for population and evolutionary studies // Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2020). The Twelfth International Multiconference Abstracts. 2020. P. 263.

8. Mikhaylova A.G. [и др.]. Transition transversion ratio in mtDNA is higher in long- versus short-lived mammals: effects of ROS and replication? // Biodiversity: Genomics and Evolution (BioGenEvo-2018). Symposium. Abstracts. 2018. P. 29.
9. Ushakova K., Mikhaylova A.A., **Mikhaylova A.G.**, Knorre D., Mazunin I., Reymond A., Gunbin K., Popadin K. Variability in Gibbs energy of tRNA molecules in mitochondrial genomes of chordates: neutral selection or evolution towards optimization of translation? // Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2018). The tenth International young Scientists School. Abstracts. 2018. P. 45.
10. Mikhaylova A.A., **Mikhaylova A.G.**, Ushakova K., Knorre D., Mazunin I., Reymond A., Gunbin K., Popadin K. Selfish elements drive mitochondrial and nuclear genome size in opposite directions // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018). The Eleventh International Conference. 2018. P. 61.
11. Sokol A., Ushakova K., Mikhaylova A.A., **Mikhaylova A.G.**, Knorre D., Mazunin I., Reymond A., Gunbin K., Popadin K. HSP as a long-term buffer of the genome-wide mutation burden // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018). The Eleventh International Conference. 2018. P. 81.
12. Михайлова А. [и др.]. Митохондриальные мутационные спектры: от эволюции позвоночных к онкологии и медицине [Электронный ресурс]: Proceedings of 11th Moscow Conference on Computational Molecular Biology MCCMB'23, August 3 - 6, 2023 Москва, Россия. М., ИППИ РАН, 2023.1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
13. Mikhailova A. G. [и др.]. A billion-year trend of amino acid substitutions in the mitochondrial genome [Электронный ресурс] // SMBE2023: abstracts book. URL : https://www.smb2023.org/_files/ugd/bccffb_7ecd1df08896478aa99d806cb17d372c.pdf (дата обращения: 03.08.2023)
14. Mikhailova A. G. [и др.]. Deamination of adenine to guanine is a signature of oxidative damage in mitochondrial DNA [Электронный ресурс] // Mitochondria 2022 Workshop: On-line posters program. URL: <https://program.eventact.com/Program/ivoYAAA/iiDY/en> (дата обращения: 03.08.2023)
15. Mikhailova A. G. [и др.]. Mitochondrial mutational spectrum in human cancers is sensitive to cellular hypoxia. [Электронный ресурс] // SMBEv2021: Abstract Book.

URL: <https://www.smbe.org/smbe/Portals/0/SMBEv2021%20-%20Updated%20Abstracts%2007072021.pdf> (дата обращения: 03.08.2023)

16. Mikhailova A. G. [и др.]. A billion-year trend of amino acid substitutions in the mitochondrial genome [Электронный ресурс] // Proceedings of 10th Moscow Conference on Computational Molecular Biology MCCMB'21, July 30th — August 2nd, 2021 Москва, Россия. М., ИППИ РАН, 2021. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
17. Mikhailova A. G. [и др.] Mitochondrial mutational spectrum in vertebrates is shaped by temperature and generation time. [Электронный ресурс] // Proceedings of 9th Moscow Conference on Computational Molecular Biology MCCMB'19, July 27-30, 2019 Москва, Россия. М., ИППИ РАН. 2019. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
18. Mikhailova A. G. [и др.] Transition transversion ratio in mitochondrial genome is higher in long- versus short-lived mammalian species: effects of ROS and replication timing? [Электронный ресурс] // SMBE2018: Poster Group B. URL: <https://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/SMBE2018/POB.pdf> (дата обращения: 03.08.2023)