

РАЗРАБОТКА КЛАССИФИКАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МУТАГЕНОВ: АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ МУТАГЕНОВ И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ

DEVELOPMENT OF A CLASSIFICATION FOR MITOCHONDRIAL MUTAGENS: ANALYSIS OF THE CHEMICAL NATURE OF MUTAGENS AND THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES

**N. Van Leiden
N. Patlay
Park Sohee**

Summary. Mitochondrial dysfunction may be associated with damage to mitochondrial DNA (mtDNA) by mutagens [1]. However, the mutational signatures of both individual mutagens and their groups have not been established; therefore, the issue of creating a classification of mtDNA mutagens according to the functional principle and the chemical nature of origin is topical. In this article, the mutagens used in the works of *Serena Nik-Zainal* [2, 3] were analyzed and a new classification system was proposed that takes into account physiological and structural features. Three main groups of mutagens were identified according to their functional effect on mtDNA: oxidative stress initiators, adductors, and alkylating agents. We hypothesize that many mitochondrial mutagens damage mtDNA indirectly through the generation of large amounts of reactive oxygen species (ROS). Adduct formers are mainly represented by polycyclic aromatic hydrocarbons, which irreversibly bind to mtDNA. Presumably, some mutagens are able to act as superoxide dismutase inhibitors, causing an abnormal increase in the number of mutations. Funding: This research was supported by funds provided through the Russian Federal Academic Leadership Program «Priority 2030» at the Immanuel Kant Baltic Federal University, project number 1166.

Keywords: mitochondria, mitochondrial DNA, mutagenesis, reactive oxygen species, oxidative stress.

Ван Лейден Никита Сергеевич

Аспирант, Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта, Калининград
leyden@email.cz

Патлай Наталия Игоревна

Аспирант, Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта, Калининград
nataliyapatlay@gmail.com

Парк Сохи

Магистрант, Пусанский национальный университет,
Янсан, Республика Корея
sohee5172@gmail.com

Аннотация. Нарушение работы митохондрий может быть связано с повреждением митохондриальной ДНК (мтДНК) мутагенами [1]. Однако мутационные подписи как отдельных мутагенов, так и их групп не установлены, поэтому актуален вопрос о создании классификации мутагенов мтДНК по функциональному принципу и по химической природе происхождения. В данной статье были проанализированы мутагены, используемые в работах *Serena Nik-Zainal* [2, 3], и была предложена новая система их классификации, учитывающая физиологические и структурные особенности. Были выделены 3 основные группы мутагенов по функциональному воздействию на мтДНК: инициаторы окислительного стресса, аддуктообразователи и алкилирующие агенты. Мы предполагаем, что многие митохондриальные мутагены повреждают мтДНК косвенно через генерацию большого количества активных форм кислорода (АФК). Аддуктообразователи в основном представлены полициклическими ароматическими углеводородами, которые необратимо связываются с мтДНК. Предположительно, некоторые мутагены способны выступать в качестве ингибиторов супероксиддисмутаз, вызывая аномальное увеличение числа мутаций.

Ключевые слова: митохондрии, митохондриальная ДНК, мутагенез, активные формы кислорода, окислительный стресс.

Митохондрии выполняют метаболические функции и имеют важное значение в жизнеобеспечении клетки. Нарушение функциональной активности митохондрий может происходить вследствие повреждения структуры митохондриальной ДНК мутагенами, которые могут приводить к заменам нуклеотидов в мтДНК [1]. Есть многочисленные данные, подтверждающие большую распространенность некоторых мутаций, а также наличие характерных мутаций для конкретных мутагенов [4, 5, 6].

На данный момент классификация митохондриальных мутагенов отсутствует. Классификация могла бы иметь обширное применение в области митохондриаль-

ной геномики: это могло бы помочь с идентификацией характерных мутационных подписей для групп мутагенов в мутационном спектре мтДНК. Данная статья является аналитической частью проекта по установлению мутационных спектров и характерных черт ключевых мутагенов митохондриального генома.

Наше исследование базируется на работах научной группы под руководством *Serena Nik-Zainal* [2, 3], которые были связаны с установлением особенностей мутагенеза ядерного генома. В рамках этих исследований было проведено полногеномное секвенирование створовых плюрипотентных клеток человека, которые были предварительно подвержены воздействию мутагенов.

Всего было использовано 73 мутагена, которые в некоторых случаях были представлены разными значениями концентраций и/или комбинациями со смесью S9. Таким образом, в исследовании использовалось 93 вариативных мутагена. Также для своей работы *Serena Nik-Zainal* использовала классификацию мутагенов, которая базировалась на химическом происхождении мутагена, или на физиологическом воздействии мутагена на ядерный геном. В некоторых случаях использовалась группировка по месту нахождения мутагена (например, группа «Медицинские препараты»). Мутагены, которые не были детерминированы, были объединены в группу «Другие».

Мы считаем, что такая классификация недостаточно информативна для исследований, связанных с митохондриальным геномом, так как мтДНК отличается как структурной организацией, так и физиологической и метаболической активностью, внутренней средой, способом репликации и т.д.

Нами было получено разрешение на загрузку и использование в своих исследованиях архивов с данными секвенирования лаборатории *Serena Nik-Zainal*. Мы апробировали исходную классификацию в предварительном анализе митохондриального генома, последовательности которого были извлечены из датасетов [7, 8]. Нами была установлена гетерогенность мутационного спектра для некоторых групп мутагенов, особенно для солей тяжелых металлов. Так, хлориды кадмия и никеля (II) имели аномальное число замен в нехарактерных мутациях, что выделяет их из общей группы. В тоже время, исключив данные металлы из анализа, мы получили статистическую значимость. Таким образом, были установлены статистические различия между солями металлов и другими классами мутагенов для комбинации замен A>G и T>C (Рис. 1). В связи с этим появилась необходимость в разработке классификации митохондриальных мутагенов, учитывающая их разную функциональную активность, а не только сходство в химическом строении.

В ходе предварительного исследования, где мы проводили общий анализ по каждому типу замен в отдельности, мы установили, что мутационный спектр между всеми группами был схож. Мы предположили, что сглаженный мутационный спектр для всех мутагенов обусловлен тем, что активные формы кислорода (АФК) могут воздействовать на митохондриальный геном не напрямую, а косвенно. Достоверно известно, что большое количество мутагенов приводит к увеличению числа АФК и/или инициирует окислительный (оксидативный) стресс в митохондриях [9, 10, 11]. Таким образом, на мтДНК будет напрямую воздействовать не сам мутаген, а АФК. Следовательно, у таких мутагенов мы увидим мутационный спектр, который будет иметь сходство со спектром АФК.

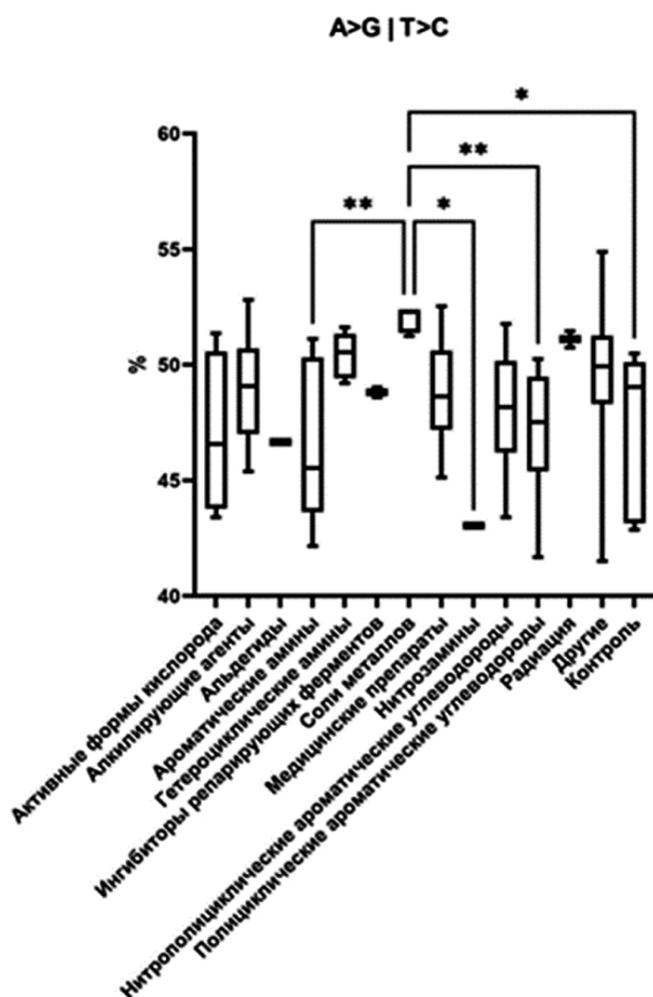


Рис. 1. Процентное распределение мутаций A>G и T>C в мтДНК субклонов, которые были подвержены воздействию мутагенов разных классов.

Из анализа исключены хлориды кадмия и никеля (II).

По вертикали: классы мутагенов, по горизонтали: процентное содержание мутаций.

Статистическая значимость: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Проведя обширный анализ актуальной литературы, мы классифицировали мутагены по разным группам на основании их физиологической активности и химического строения, учитывая наличие функциональных групп и радикалов. Некоторые мутагены не были отнесены к какой-либо группе по причине отсутствия достоверной информации о характере их воздействия на мтДНК. Для описания химической классификации был задействован ресурс «PubChem.NCBI», в некоторых случаях использовались данные из исследований *Serena Nik-Zainal*.

Было определено 29 групп мутагенов во время классифицирования по химическому строению:

1. альдегиды (Ал);
2. амиды (Ад);

3. амины (Ам);
4. ароматические амины (АА);
5. ароматические оксоуглеводороды (АОу);
6. гетероциклические амины (ГцАм);
7. гетероциклические ацелоины (ГцАц);
8. гидразины (Гд);
9. гликопептиды (Гп);
10. металлосодержащие амины (МА);
11. металлосодержащие комплексы (МК);
12. многоатомные ароматический спирт (МАС);
13. мышьяксодержащие соли (МС);
14. непредельные гетероциклы (НГц);
15. непредельный амид (НАд);
16. нитроамины (НАм);
17. нитрозамины (НзАм);
18. нитрополициклические ароматические углеводороды (НпАУ);
19. оксоуглеводороды (Оу);
20. полигетероциклические амины (ПгцАм);
21. полигетероциклические ароматические углеводороды (ПгцАУ);
22. полициклические ароматические карбоновые кислоты (ПцАКК);
23. полициклические ароматические амины (ПцААм);
24. полициклические ароматические гидроксизины (ПцАГа);
25. полициклические ароматические углеводороды (ПцАУ);
26. радиация (Р);
27. серосодержащие углеводороды (СУ);
28. соли тяжелых металлов (СТМ);
29. хиноны (Х).

При классификации мутагенов по функциональной активности было выделено 7 групп:

1. алкилирующие агенты;
2. инициаторы окислительного стресса;
3. аддуктообразователи;
4. активные формы кислорода;
5. ингибитор антиоксидантных ферментов;
6. не оказывают влияния на мтДНК;
7. ингибиторы репаративных белков.

Итоговые результаты представлены в Таблице 1. Обозначение химического класса мутагена было указано рядом с его названием. Функциональные класс указывались под своими номерами из списка.

Таким образом, мы смогли разделить все мутагены по функциональным эффектам в митохондриях, а также на основании химической классификации. Наибольший интерес для нашей работы представляет функциональная классификация, где мы выделили три основные группы мутагенов: инициаторы окислительного стресса, аддуктообразователи и алкилирующие агенты. Под инициаторами окислительного стресса подразумеваются мутагены, которые напрямую не воздействуют на мтДНК, но опосредованно, через образование АФК, могут повреждать мтДНК, вызывая характерные нуклеотидные замены, которые могли бы являться мутационной подписью АФК. При этом большинство всех мутагенов являются именно инициаторами окислительного стресса, что подтверждает наши полученные предварительные результаты. Аддуктообразователи преимущественно представлены полициклическими ароматическими углеводородами и их производными, которые демонстрируют высокую способность необратимо связываться с мтДНК, вызывая нарушение транскрипции и репликации [12]. Как показали результаты нашего анализа, в исследовании *Serena Nik-Zainal* были выделены не все алкилирующие агенты. В эту группу мы дополнительно включили некоторые мутагены из группы «Медицинские препараты», что является корректным с точки зрения их функциональной активности.

Были обнаружены особенности взаимодействия хлорида кадмия с мтДНК: хлорид кадмия способен снижать активность супероксиддисмутазы, ингибируя ее [13]. Ранее мы установили для этого мутагена аномальное число мутаций в нехарактерных заменах, что может быть объяснено его способностью ингибировать антиоксидантные ферменты. Мутационный спектр хлорида кадмия и хлорида никеля (II) схожи, наблюдается аномальное число замен в нехарактерных мутациях. Мы предполагаем, что хлорид никеля (II) тоже может ингибировать супероксиддисмутазу.

Разработанная классификация имеет большое значение для проведения дальнейших работ в рамках нашего исследования, где мы планируем сопоставлять мутационные спектры мутагенов между собой попарно, а также в рамках выделенных групп.

Таблица 1.

Классифицированный список мутагенов (химические и функциональные группы).
 Условные обозначения: ► — указание для мутагена из правой колонки,
 ◄ — указание класса для мутагена из левой колонки, ● — общий класс для мутагенов в строке.

Название мутагена (хим. класс мутагена) (1)	Функциональные классы							Название мутагена (хим. класс мутагена) (2)
	1	2	3	4	5	6	7	
1,2-диметилгидразин (Гд)	●	►						Диэтилсульфат (СУ)
1,4-бензохинон (Х)		●						Камптотецин (ПгцАУ)
1,6-динитропирен (НпАУ)	►		◄					Карбоплатин (МА)
1,8-динитропирен (НпАУ)		●						Катехол (МАС)
1-нитропирен (НпАУ)		●						Метаарсенит натрия (МС)
PhIP (ГцАм)		◄	►					DB(aj)A-DE (ПцАУ)
MeIQx (ГцАм)		◄	►					Дибенз[а, j]акридин (ПцАУ)
Mea- α -C (ГцАм)			●					DB[a, I]P (ПцАУ)
IQ (ГцАм)			●					Дибензо[а, I]пирен (ПцАУ)
2-нафтиламин (АА)		◄	►					DB[a, I]PDE (ПцАУ)
2-нитротолуол (НпАУ)	►	◄						Метилметансульфонат (СУ)
2-нитрофлуорен(НпАУ)	◄	►						Мехлорэтамин (Ам)
3-нитробензантрон (НпАУ)		●						Митомицин С (ПгцАм)
МХ (ГцАц)		●						Нитрат свинца (II) (СТМ)
МОСА (АА)		●						о-Анизидин (АА)
4-аминобифенил (АА)		●						Окись пропилена(Оу)
4-аминодифенил (АА)		●						Оксид стирола (АОу)
5-метилхризен (ПгцАУ)			◄			►		Олапариб (ПгцАУ)
6-нитрохризен (НпАУ)	◄	►						о-Толуидин (АА)
7H-DB(c,g)C (ПцАУ)	►		◄					Офлоксацин В1 (ПцАУ)
AZ20 (-)			►			◄		Охратоксин А (ПцААм)
AZD7762 (-)				►		◄		Пероксид водорода (АФК)
MNU (Нам)	◄	◄		►				Пероксинитрит (АФК)
NPYR (НзАм)		●						Солнечное излучение (Р)
ENU (Нам)	◄		►					Судан I (ПцАГа)
Акриламид (НАд)	►	◄						Темозоломид (ГцАм)
Акролеин (Ал)		►	◄				◄	Формальдегид (Ал)
АА I (ПцАКК)		●						Фуран (НГц)
АА II (ПцАКК)		►	◄		►			Хлорид кадмия (СТМ)
Ацетальдегид (Ал)		●						Хлорид кобальта (СТМ)
Ацетат свинца (II) (СТМ)		●						Хлорид никеля (II) (СТМ)
Бензо[а]пирен (ПцАУ)		►	◄					Хромат калия (СТМ)
Блеомицин (Гп)	►	◄						Циклофосфамид (ГцАм)
Бромат калия (АФК)			►	◄				Цисплатин (МК)
Гамма-излучение (Р)		●						Эллиптицин (ПгцАУ)
Глицидамид (Ад)		●						Этопозид (ПцАУ)
DB(a,h)A (ПцАУ)			◄					

ЛИТЕРАТУРА

1. Roubicek D.A., de Souza-Pinto N.C. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants // *Toxicology*. — 2017. — Т. 391. — С. 100–108.
2. Kucab J.E. et al. A compendium of mutational signatures of environmental agents // *Cell*. — 2019. — Т. 177. — №. 4. — С. 821–836. e16.
3. Zou X. et al. A systematic CRISPR screen defines mutational mechanisms underpinning signatures caused by replication errors and endogenous DNA damage // *Nature cancer*. — 2021. — Т. 2. — №. 6. — С. 643–657.
4. Federico A. et al. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration // *Journal of the neurological sciences*. — 2012. — Т. 322. — №. 1-2. — С. 254–262.
5. Ziada A.S. et al. Mitochondrial DNA somatic mutation burden and heteroplasmy are associated with chronological age, smoking, and HIV infection // *Aging cell*. — 2019. — Т. 18. — №. 6. — С. e13018.
6. Partridge M.A. et al. Environmental mutagens induced transversions but not transitions in regulatory region of mitochondrial DNA // *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. — 2009. — Т. 72. — №. 5. — С. 301–304.
7. Ван Лейден Н.С., Попадьян К.Ю. Разработка новой классификации для основных мутагенов мтДНК: функциональные и химические аспекты мутагенеза // *ХимБиоSeasons 2023: Сборник тезисов докладов Всероссийского форума молодых исследователей, Калининград, 20–22 апреля 2023 года*. — Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта. — 2023. — С. 16.
8. Ван Лейден Н.С., Патлай Н.И., Патлай И.И. Поиск мутационной подписи активных форм кислорода в мтДНК: анализ экспериментальных данных // *Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования*. — 2021. — №. 3. — С. 4–9.
9. Patlolla A.K. et al. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. — 2009. — Т. 6. — №. 2. — С. 643–653.
10. Kim J.Y. et al. Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: the potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases // *Toxicology*. — 2011. — Т. 289. — №. 2-3. — С. 91–102.
11. De Jager T.L., Cockrell A.E., Du Plessis S. S. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species // *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. — 2017. — С. 15–23.
12. Graziewicz M.A. et al. Nucleotide incorporation by human DNA polymerase γ opposite benzo [a] pyrene and benzo [c] phenanthrene diol epoxide adducts of deoxyguanosine and deoxyadenosine // *Nucleic acids research*. — 2004. — Т. 32. — №. 1. — С. 397–405.
13. Wang Y. et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. — 2022. — Т. 236. — С. 113494.

© Ван Лейден Никита Сергеевич (leyden@email.cz); Патлай Наталия Игоревна (nataliyapatlay@gmail.com); Парк Сохи (sohee5172@gmail.com)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»