

DOI: 10.1134/S0041377118110093

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ НА АКТИВНОСТЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ МУЛЬТИПОТЕНТНОСТИ В ТКАНЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© *О. В. Анацкая*,^{1,*} *Е. А. Эренпрейса*,² *А. Вазкез-Мартин*,² *А. Гулиани*,³
К. Салмина,² *Н. Н. Никольский*,¹ *А. Е. Виноградов*¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия,*

² *Центр биомедицинских исследований, Рига, Латвия, и*

³ *Высший институт здоровья, Рим, Италия;*

* *электронный адрес: olga.anatskaya@gmail.com*

Полиплоидия, также называемая геномными дупликациями, создает селективные преимущества для целых видов и отдельных соматических клеток в норме и при трансформации. Одной из возможных причин этого явления может быть повышение биологической пластичности из-за активации программ развития. Для того чтобы улучшить понимание природы этой взаимосвязи, мы исследовали влияние геномных дупликаций на проявления эмбриональности. Для этого мы проанализировали активность молекулярных путей базы BioSystems, которые относятся к регуляции мульти- и плюрипотентности в гомологичных органах человека и мыши с разной степенью полиплоидизации. Применяв метод попарно-перекрестного сравнения транскриптомов, мы исследовали различия в сердце человека — сердце мыши и печени мыши — печени человека. Полученные данные выявили высокодостоверную ассоциацию генов, активированных в полиплоидных клетках, с эмбриональным сигнальным путем WNT и ветвями синергично регулируемых сигнальных путей Hippo, NOTCH, TGF β , PI3K и Hedgehog. Анализ сетей межбелковых взаимодействий для генов, входящих в активированные пути, подтвердил эти результаты и позволил обнаружить тесную связь WNT-сети (приниматель сигнал с клеточной поверхности) с активацией множества генов протеасом, что указывает на аттрактор (устойчивое состояние) протеома при активации данных путей стволовости в полиплоидной соматической клетке. Таким образом, наши данные показали, что полиплоидия, связанная с эмбрионализацией и координированной индукцией основных путей стволовости в ответ на изменение условий среды, обеспечена устойчивостью протеомного гомеостаза клетки. Полученные данные объясняют одну из важных причин селективного преимущества, создаваемого геномными дупликациями, что может быть использовано при разработке новых подходов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: полиплоидия, селективные преимущества, транскриптомный анализ, эмбрионализация, мультипотентность

Полиплоидия, также называемая геномными дупликациями, широко распространена среди организмов разного уровня сложности (видовая полиплоидия) и в отдельных клетках нормальных соматических тканей (соматическая полиплоидия). При видовой (генеративной) полиплоидии геномные дупликации передаются из поколения в поколение. В результате каждая клетка организма содержит несколько диплоидных геномов. Полногеномное секвенирование выявило следы древних и относительно недавних геномных дупликаций у дрожжей, грибов, высших и низших растений, насекомых, рыб, амфибий, птиц и даже млекопитающих, что указывает на эволюционный успех видов с геномными дупликациями в истории формирования (см. обзор: Van De Peer, 2017).

В соматических тканях полиплоидия является частью нормальной программы развития. Клетки с геномными дупликациями формируются в постнатальном развитии в

периоды активного роста и дифференцировки (Anatskaya et al., 2007). Степень полиплоидизации во многом определяется уровнем физиологической, стрессовой и (или) патологической нагрузки во время пролиферации (Anatskaya et al., 2010). Полиплоидные клетки найдены практически во всех тканях грибов, низших и высших растений, моллюсков, рыб, птиц и млекопитающих (Van De Peer, 2017), что также указывает на их поддержание естественным отбором.

Соматическая полиплоидия и анеуплоидия свойственны злокачественным опухолям, коррелируя с плохим прогнозом (Erenpreisa et al., 2018). Исследования последнего десятилетия свидетельствуют о том, что и эмбриональная стволовость свойственна многим типам раковых клеток *in vivo* (Erenpreisa et al., 2011). Увеличивая дозу генов и индуцируя эмбриональный эпигеном, геномные дупликации, вызванные генотоксическим или иным стрессом, повышают биологическую пластичность, наде-

ляют полиплоидные клетки селективными преимуществами выживания с возможностью возвращения через диплоидизацию к митотическим диплоидным клонам (Illidge et al., 2000; Salmina et al., 2010; Zhang et al., 2014). Таким образом, естественный отбор поддерживает полиплоидию в филогенезе, онтогенезе, а также в норме и при патологии.

Причины этого преимущества пока до конца неясны. Для того чтобы улучшить понимание природы взаимосвязи между полиплоидией, эмбрионализацией, биологической пластичностью и выживаемостью клеток, мы применили метод попарно-перекрестного сравнения транскриптомов, разработанный нами ранее (Anatskaya, Vinogradov, 2010) для исследования активности молекулярных путей базы BioSystems, относящихся к регуляции мульти- и плюрипотентности.

Материал и методика

Основой метода является одновременное попарно-перекрестное межвидовое и межтканевое сравнение активности транскриптома в органах с разной выраженностью полиплоидии, например в сердце и печени человека и мыши. Известно, что у человека кардиомиоциты содержат полиплоидные ядра, а гепатоциты в основном диплоидны, в то время как у мыши, напротив, кардиомиоциты содержат в основном диплоидные ядра, а в гепатоцитах ядра полиплоидны (Anatskaya, Vinogradov, 2010). Источником данных служила база BioGPS, содержащая полнотранскриптомные данные, полученные с помощью олигонуклеотидных микроэзреев. Полные протеомы человека и мыши были взяты из базы RefSeq. С помощью высокочувствительного алгоритма Смита—Ватермана, реализованного в программе ssearch из пакета Fasta, было проведено тотальное сравнение каждого белка человека с протеомом мыши (и наоборот, каждого белка мыши с протеомом человека). После этого были отобраны пары генов с наиболее высокой статистической значимостью обоих взаимных сравнений кодируемых ими белков (reciprocal best hit), которые можно считать ортологичными.

После отбора пар ортологичных генов мы проанализировали изменение экспрессии в каждой паре. Мы считали, что гены изменяют активность в зависимости от плоидности, если их экспрессия изменялась в одинаковом направлении в обоих реципрокных сравнениях в соответствии с различием в степени полиплоидизации тканей (сердце человека → сердце мыши и печень мыши → печень человека). Кроме того, по крайней мере один ген из ортологичной пары генов должен был быть достоверно экспрессирован в каждой паре сравниваемых тканей. Для того чтобы провести дополнительную фильтрацию сигнала от видо- и тканеспецифического шума, мы нормировали экспрессию каждого гена в исследуемой ткани (сердце и печени) по среднему уровню экспрессии этого гена в остальных тканях данного организма.

Гены, которые соответствовали всем перечисленным критериям, были разделены на активированные и ингибированные и проанализированы на статистически значимую ассоциацию с биологическими процессами базы Gene Ontology (GO) по авторской методике (Anatskaya, Vinogradov, 2010).

Сети межбелковых взаимодействий для генов, задействованных в биологических процессах, согласно базе

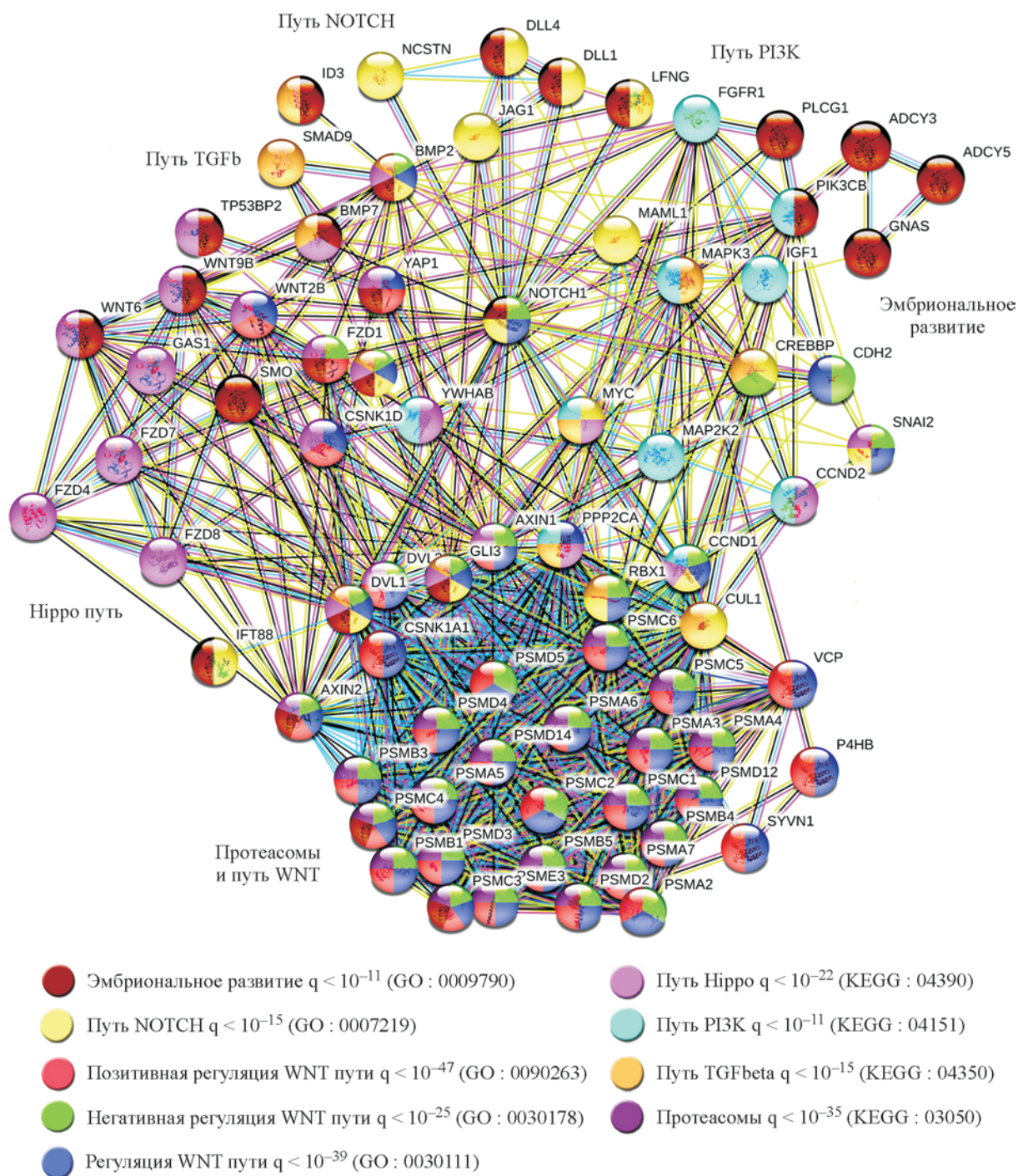
GO, конструировали с помощью сервера STRING. Анализ насыщения сетей межбелковых взаимодействий генными модулями баз GO и KEGG проводили также с помощью сервера STRING.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы исследовать молекулярную природу повышения биологической пластичности и стволовости при соматической полиплоидии, мы применили метод межвидового попарно-перекрестного сравнения транскриптомов для гомологичных органов с разной степенью полиплоидизации. В частности, мы сопоставили активность генов в сердце человека — сердце мыши и печени мыши — печени человека при двукратном пороге экспрессии и достоверности различий $P < 0.05$. Признаки стволовости оценивали по статистически значимой ассоциации дифференциально экспрессированных генов с молекулярными путями базы BioSystems (NCBI Resource Coordinators, 2018), которые содержат в аннотации названия регуляторов сигнальных путей мульти- и плюрипотентности (WNT, NOTCH, HIPPO, TGF β , FGF, FOXO, POU5F1, NANO и SOX) и термины, связанные со стволовостью, мульти- и плюрипотентностью и дифференцировкой. Обогащение считали достоверным при $P < 0.00001$, $q < 0.001$ (q можно рассматривать как P с поправкой на множественные тесты).

Данные, полученные для обоих попарных сравнений, свидетельствуют о том, что в сердце и печени человека и мыши полиплоидия связана с индукцией генов сигнального пути WNT (WP399, $q < 10^{-8}$), который играет важную роль в выборе клеточной судьбы во время эмбрионального развития. Также наши данные выявили индукцию WNT-корегулируемых путей, относящихся к стволовости, включая путь регуляции плюрипотентности (KEGG_ko04550, $q < 10^{-6}$) и Hedgehog (KEGG_hsa04340, $q < 10^{-4}$), NOTCH (REACT_118614, $q < 10^{-4}$), Hippo (KEGG_ko04390, $q < 10^{-6}$) и TGF β (WP366, $q < 10^{-5}$) сигнальных путей. Самая высокая полигенность и достоверность насыщения была отмечена для модулей WNT ($q < 10^{-8}$), Hippo ($q < 10^{-6}$), TGF β ($q < 10^{-5}$) и регуляции плюрипотентности, что подтверждает взаимосвязь между усилением стволовости и полиплоидией. Важно отметить, что ингибированные в полиплоидных клетках гены не были достоверно ассоциированы ни с одним из генных модулей развития или стволовости.

Для того чтобы дополнительно верифицировать полученные данные и исследовать характер взаимосвязей между сигнальными путями стволовости, мы построили сети межбелковых взаимодействий для всех генов путей мультипотентности и дифференцировки, используя сервер STRING (см. рисунок). Видно, что гены мультипотентности тесно связаны между собой и образуют плотную сеть с достоверностью насыщения межгенными взаимодействиями $p < 10^{-16}$, которая может представлять собой аттрактор (Giuliani et al., 2014; Mojtahedi et al., 2016). Следует отметить, что проверка генных модулей на наличие функциональных связей является одним из способов тестирования точности нормировки и адекватности метода отбора генов (Ideker et al., 2011). Высокая насыщенность сетей связями подтверждает, что набор тестируемых генов практически не зашумлен, а следовательно, методы нормировки данных и отбора генов были подобраны правильно (Ideker et al., 2011).



Сеть межбелковых взаимодействий для генов сигнальных путей мультипотентности и эмбриональности, которые достоверно ассоциированы с индуцированными полиплоидией генами. Сеть сконструирована с помощью сервера STRING при надежности (confidence) взаимодействия между белками выше 0.5. Ассоциация также определена с помощью базы STRING.

Для того чтобы исследовать взаимодействие между сигнальными путями и выяснить, какие из них являются основными, а какие корегулируемыми, мы оценили насыщенность сети генными модулями базы GO и базы KEGG с помощью сервера STRING. Максимальная достоверность насыщения ($q < 10^{-47}$) и самое большое число генов (35—39 из 76 генов) были отмечены для ветвей регуляции сигнального пути WNT. Примечательно, что у пути WNT есть общие регуляторы с путем эмбрионального развития и с путями Hippo, Notch, TGFb и PI3K-сиг-

нализации, что подтверждает их синергизм и корегуляцию. Особенно примечательно, что множество генов пути WNT и эмбрионального развития участвует в протеасомной деградации белков. Это видно из тесно сплетенного кластера сети, который представлен многочисленными генами белков протеасом (см. рисунок). Поскольку протеасома работает как единое целое, выявление координированной активации многих протеасомных генов можно рассматривать как подтверждение адекватности нашего метода. Роль убиквитин-протеасомной системы

деградации белков в поддержании свойств плюри- и мультипотентности была хорошо установлена для эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток человека и мыши (Selenina et al., 2017). Регулируя продолжительность жизни факторов стволовости и активность сигнальных путей WNT, NOTCH, TGF β и др., протеасомная система определяет выбор клетки между поддержанием плюрипотентного состояния или дифференцировкой (Selenina et al., 2017). Природа взаимосвязи между полиплоидией и проявлениями стволовости до конца неясна. Полиплоидные клетки долгое время относили к стареющим клеткам, которые из-за нарушения цитокинеза и митоза не способны к длительному выживанию и нормальному делению (Niu et al., 2017). Лишь недавно было показано, что полиплоидия усиливает эмбриональный фенотип в гигантских раковых клетках человека (Salmina et al., 2010; Zhang et al., 2014) и в нормальных клетках человека (Vazquez-Martin et al., 2016). Сведения об основных регуляторах и сигнальных путях, запускающих программы стволовости, при полиплоидизации только начинают появляться. Известно, что в гигантских раковых клетках и в эмбриональных стволовых клетках человека полиплоидия усиливает эмбриональность благодаря повышению уровня экспрессии индукторов плюрипотентности Oct4, SOX2 и NANOG (Salmina et al., 2010; Erenpreisa et al., 2011). В соматических клетках человека полиплоидия способствует активации эмбриональных программ через индукцию интерактома древнейшего транскрипционного фактора и протоонкогена MYC (Vazquez-Martin et al., 2016). В настоящей работе мы представили первые данные о том, что в клетках печени и сердца человека и мыши полиплоидия приводит к эмбрионализации клетки через активацию основных сигнальных путей мультипотентности, включая путь регуляции эмбрионального развития. Эти пути начинаются с активации трансмембранного сигналинга с клеточной поверхности — WNT и связанных каскадов NOTCH, Hippo, TGF β и PI3K, координированных с протеасомной регуляцией клеточного гомеостаза. Судя по проанализированным данным, эта система представляет собой аттрактор устойчивого эпигенетического состояния клетки, что и характеризует его адаптационную эффективность. Очевидно, что столь выраженный аттрактор адаптивности мог сформироваться только в ходе длительного эволюционного процесса. Полученные данные помогут улучшить понимание роли полиплоидии в нормальной физиологии, трансформации и других патологических состояниях, а также помогут пролить свет на причину селективных преимуществ и биологической пластичности полиплоидных клеток по сравнению с диплоидными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

- Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Beyer T. V., Vinogradov A. E. 2010. Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development. *Int. J. Cardiol.* 141 : 81—91.
- Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Vinogradov A. E., Beyer T. V. 2007. Impact of neonatal cryptosporidial gastroenteritis on epigenetic programming of rat hepatocytes. *Cell Biol. Int.* 31 : 420—427.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2010. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome. *Funct. Integr. Genomics.* 10 : 433—446.
- Erenpreisa J., Cragg M. S., Anisimov A. P., Illidge T. M. 2011. Tumor cell embryonicity and the ploidy number 32n: is it a developmental checkpoint? *Cell Cycle.* 10 : 1873—1874.
- Erenpreisa J., Giuliani A., Vinogradov A. E., Anatskaya O. V., Vazquez-Martin A., Salmina K., Cragg M. S. 2018. Stress-induced polyploidy shifts somatic cells towards a pro-tumourigenic unicellular gene transcription network. *Cancer Hypothesis.* 1 : 1—20.
- Giuliani A., Filippi S., Bertolaso M. 2014. Why network approach can promote a new way of thinking in biology. *Front. Genet.* 5 : 83.
- Ideker T., Dutkowski J., Hood L. 2011. Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell.* 144 : 860—863.
- Illidge T. M., Cragg M. S., Fringes B., Olive P., Erenpreisa J. A. 2000. Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell. Biol. Int.* 24 : 621—633.
- Mojtahedi M., Skupin A., Zhou J., Castaño I. G., Leong-Quong R. Y., Chang H., Trachana K., Giuliani A., Huang S. 2016. Cell fate decision as high-dimensional critical state transition. *PLoS Biol.* 14 : e2000640.
- NCBI Resource Coordinators. 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 46 : D8—D13.
- Niu N., Mercado-Urbe I., Liu J. 2017. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene.* 36 : 4887—4900.
- Salmina K., Jankevics E., Huna A., Perminov D., Radovica I., Klymenko T., Ivanov A., Jascenko E., Scherthan H., Cragg M., Erenpreisa J. 2010. Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells. *Exp. Cell Res.* 316 : 2099—2112.
- Selenina A. V., Tsimokha A. S., Tomilin A. N. 2017. Proteasomes in protein homeostasis of pluripotent stem cells. *Acta Naturae.* 9 : 39—47.
- Van de Peer Y., Mizrahi E., Marchal K. 2017. The evolutionary significance of polyploidy. *Nat. Rev. Genet.* 18 : 411—424.
- Vazquez-Martin A., Anatskaya O. V., Giuliani A., Erenpreisa J., Huang S., Salmina K., Inashkina I., Huna A., Nikolsky N. N., Vinogradov A. E. 2016. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature. *Oncotarget.* 7 : 75 235—75 260.
- Zhang S., Mercado-Urbe I., Xing Z., Sun B., Kuang J., Liu J. 2014. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene.* 33 : 116—128.

Поступила 29 VI 2018

IMPACT OF GENOME DUPLICATIONS ON MULTIPOTENCY SIGNALING ACTIVITY
IN MAMMALIAN CELLS

O. V. Anatskaya,^{1,} J. Erenpreisa,² A. Vazquez-Martin,² A. Giuliani,³ K. Salmina,²
N. N. Nikolsky,¹ A. E. Vinogradov¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russian Federation,

² Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia, and

³ Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy;

* e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

Polyploidy, that is also known as genome duplication, creates selective advantages for various species and individual somatic cells under normal conditions and transformation. One possible reason for this phenomenon may be an increase in biological plasticity due to the activation of developmental programs. To promote understanding of the nature of this relationship, we investigated the effect of genome duplications on the activity of signaling pathways related to early development. For this propose we analyzed the activity of the molecular pathways of the BioSystems data base related to the regulation of multi- and pluripotency in homologous organs of humans and mouse with different degrees of polyploidization. Using method of pairwise cross-species transcriptome comparison, we investigated the difference of pathway activity in the human heart — mouse heart and mouse liver — human liver. The obtained results revealed the highly significant induction of different branches of the WNT embryonic pathway and the synergistically regulated pathways of Hippo, NOTCH, TGFb, PI3K and Hedgehog signaling, which was associated with polyploidization. The analysis of protein interaction network for genes implicated in the induced pathways confirmed the results of functional gene module analysis and discovered a close connection between the WNT network (receiving the signals from the cell surface) and the activation of proteasome genes, that points to the attractor (stable state) of the proteome when these multipotency pathways are activated in polyploid cells. Thus, our data indicated that polyploidy, associated with embryonalization and coordinated induction of the main multipotency pathways in response to changes in environmental conditions, is ensured by the stability of the proteome homeostasis of the cell. The obtained data explain one of the important reasons for the selective advantage created by genomic duplications, which can be used in the development of new antitumor therapy approaches.

Key words: polyploidy, selective advantages, transcriptome analysis, embryonalization, multipotency
