

Преэклампсия: взгляд на патогенез заболевания через призму геномики и транскриптомики

Трифонов Е.А.*, Бабовская А.А., Зарубин А.А., Сваровская М.Г., Степанов В.А.

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

(Томский НИИМЦ), Томск, Россия

* ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

Ключевые слова: транскриптом; геном; преэклампсия; RNA-seq; tagSNPs

Мотивация и цель: Анализ генома и транскриптома различных тканей и клеток, а также регуляторных механизмов экспрессии генов представляет значительный интерес для исследователей, поскольку нарушение транскрипционной активности генов вовлечено в патогенез многочисленных заболеваний. На сегодняшний день омиксные технологии нашли широкое применение во всевозможных областях предиктивной медицины, к примеру, в разработке методов диагностики, стратегий прогнозирования и профилактики различных заболеваний, включая и акушерскую патологию, где в качестве одного из основных объектов изучения выступает плацента. Необходимо отметить, что изучение молекулярных процессов, происходящих в плацентарной ткани и связанных с транскрипционной регуляцией генной экспрессии, рассматривается на сегодняшний день как наиболее перспективное направление для раскрытия патофизиологии осложненного течения беременности, и в частности такого тяжелого заболевания как преэклампсия (ПЭ). В связи с чем целью нашей работы было охарактеризовать паттерны транскриптома плацентарной ткани и ее отдельных субпопуляций клеток, специфичные для женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности и оценить роль полиморфных маркеров генов, дифференциально экспрессирующихся при патологической и нормальной беременности, в формировании структуры предрасположенности к ПЭ.

Методы и алгоритмы: Полногеномный анализ экспрессионных профилей 24 образцов дистальной части плацентарной ткани пациенток с ПЭ и женщин с физиологической беременностью (ФБ) выполнен с помощью технологии микрочипов (HT-12 BeadChip v.4, Illumina). Единичные децидуальные клетки (ДК) и клетки синцитиотрофобласта (СТБ) были получены с помощью технологии лазерной микродиссекции («Laser Capture Microdissection») препаратов тонких окрашенных срезов. Тотальная РНК 1000 изолированных ДК и клеток СТБ была выделена набором Single Cell RNA Purification Kit (Norgen). Синтез библиотек для полнотранскриптомного анализа проводился набором SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara). Готовые библиотеки объединяли в пул и секвенировали на платформе Illumina Next-seq 500. Для поиска дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) был использован метод обобщенных линейных моделей (GLM) программного пакета limma. Функциональный анализ кластера ДЭГ, проводили с помощью веб-инструмента Molecular Signatures Database (MSigDB). Конструирование генных сетей проводили с использованием программы STRING 9.0.

Суммарный объем выборки для анализа вариабельности ДНК, включенной в исследование, составил более 1000 женщин, которые согласно течению и исходам беременности были разделены на группу больных с ПЭ ($N = 721$ чел.) и контрольную группу ($N = 552$ чел.). Генотипирование полиморфных маркеров (tagSNPs) ДЭГ осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса или двусторонний точный тест Фишера.

Результаты: В плацентарной ткани обнаружено 63 гена, статистически значимо дифференциально экспрессирующихся между пациентками с ПЭ и физиологической беременностью. Функциональная аннотация ДЭГ свидетельствует о ряде биологических процессов, играющих важную роль в молекулярном патогенезе ПЭ: реакции, связанные с иммунным ответом, межклеточным взаимодействием, регуляция апоптоза и др. Анализ метаболических путей, в которые включены ДЭГ, указывает на возможное участие в патофизиологических механизмах ПЭ путей цитотоксичности, обусловленной NK-клетками, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и сигнальных путей, опосредованных активаторами GTP-аз. Полученная с помощью базы данных «STRING» сеть белок-белковых взаимодействий подтверждает взаимосвязи между генами, выявленные при исследовании биологических путей и процессов. Интеграция данных функциональной аннотации ДЭГ и анализа сетевых взаимодействий белков, кодируемых этими генами, позволила выделить кластер наиболее значимых ДЭГ, наследственная вариабельность которых была изучена на геномном уровне.

В частности, сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов 85 полиморфных маркеров (tagSNPs) данных ДЭГ между пациентками с ПЭ и женщинами с ФБ выявил ассоциацию с развитием ПЭ 27 полиморфных вариантов следующих генов: *ANKRD37*, *BHLHE40*, *CORO2A*, *GPT2*, *HK2*, *INHA*, *LEP*, *LHB*, *NDRG1*, *PLIN2*, *PPP1R12C*, *SASH1*, *SIGLEC6*, *SYDE1* и *ZNF175*. Необходимо отметить, что большинство ассоциированных с ПЭ tagSNPs согласно результатам анализа с использованием онлайн ресурсов HaploReg и RegulomeDB были локализованы в сайтах связывания транскрипционных факторов и имели высокий регуляторный потенциал. Данное наблюдение представляет особый интерес в контексте результатов, полученных в ряде недавних работ, демонстрирующих важную роль регуляторных участков плацентарных генов как в развитии осложненного течения беременности, так и в отношении предрасположенности к множественным постнатальным заболеваниям человека. Тем не менее стоит отметить, что, исходя из современных представлений о крайне гетерогенном клеточном составе плаценты высоко актуальны исследования по картированию генетических вариантов, определяющих экспрессию генов в различных типах клеток плаценты при нормальной и патологической беременности.

Так, в результате проведенного нами анализа транскриптома на уровне отдельных субпопуляций клеток плацентарной ткани выявлены 26 генов, экспрессия которых статистически значимо различается в клетках СТБ женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности, и 35 ДЭГ обнаружено для ДК. Кластер ДЭГ содержит не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих зарубежных полногеномных исследованиях плаценты (к примеру, *LEP*, *INHBA* и *FLT1*), но и новые гены (*AC098613.1*, *AC087857.1*, *FCRLB*, *TENM4*, *PTP4A1P7*,

LINC01225 и др.), которые могут рассматриваться в качестве новых биологических маркеров ПЭ и представляют интерес для дальнейшего изучения. Результаты функциональной аннотации ДЭГ показывают, что с развитием ПЭ на уровне СТБ могут быть связаны сигнальные пути регуляции гормональной секреции, MAPK-каскада, ERK1 и ERK2 каскада, положительной регуляция клеточной адгезии и пролиферации эндотелиальных клеток. Наряду с этим биологические процессы, задействованные в молекулярный патогенез ПЭ на уровне ДК, связаны с синтезом гамма-аминомасляной кислоты и развитием оксидативного стресса.

Выводы: Таким образом, в представленной работе обнаружены новые генетические маркеры ПЭ и показана значимая роль регуляторных участков генома человека в подверженности к данной патологии. На примере ПЭ апробирован системный подход к поиску перспективных биомаркеров гестационных осложнений, основанный на комбинации геномных, транскриптомных и биоинформатических методов. Это исследование расширяет представление о задействованных в ПЭ молекулярных механизмах и может служить основой для разработки профилактических, прогностических и терапевтических стратегий в области персонифицированного акушерства.

Финансирование: Исследование выполнено за счет средств государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

Preeclampsia: a view on the pathogenesis of disease through the prism of genomics and transcriptomics

Trifonova E.A.*, Babovskaya A.A., Zarubin A.A., Svarovskaya M.G., Stepanov V.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

* *Ekaterina.trifonova@medgenetics.ru*

Key words: transcriptome; genome; preeclampsia; RNA-seq; tagSNPs

Motivation and Aim: The significant interest to researchers is the analysis of the genome and transcriptome of various tissues and cells as well as the regulatory mechanisms of gene expression since disruption of the transcriptional activity of genes is involved in the pathogenesis of numerous diseases. Today, omics technologies have found wide application in various areas of predictive medicine. For example, in the development of diagnostic methods, strategies for predicting and preventing various diseases including obstetric pathology where the placenta is one of the main objects of study. It should be noted that the study of molecular processes occurring in placental tissue and associated with the transcriptional regulation of gene expression is considered today as the most promising direction for revealing the pathophysiology of complicated pregnancy, and in particular such a serious disease as preeclampsia (PE). In this regard, the goal of our work was to characterize the transcriptome patterns of placental tissue and its individual cell subpopulations specific to women with PE and the physiological course of pregnancy and to evaluate the role of polymorphic gene markers differentially expressed in pathological and normal pregnancy in the formation of the structure of predisposition to PE.

Methods and Algorithms: Genome-wide analysis the expression profiles of 24 samples the distal part of the placental tissue from patients with PE and women with normal

pregnancy (NP) was performed using microarray technology (HT-12 BeadChip v.4, Illumina). Single decidual cells (DCs) and syncytiotrophoblast cells (SCTs) were obtained using laser microdissection technology ("Laser Capture Microdissection") of thin stained sections. Total RNA of 1000 isolated DCs and SCTs cells were extracted using the Single Cell RNA Purification Kit (Norgen). For full transcriptome analysis the library synthesis was carried out using the SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara). The libraries were pooled and sequenced on the Illumina Next-seq 500 platform. The generalized linear models (GLM) method of the limma software package was used to search for differentially expressed genes (DEGs). Functional analysis of the DEG cluster was performed using the Molecular Signatures Database (MSigDB) web tool. Gene networks were constructed using the STRING 9.0 program.

The total sample size for the analysis of DNA variability included in the study was more than 1000 women were divided into a group of patients with PE ($N = 721$ people) and a control group ($N = 552$ people) according the outcomes of pregnancy. Genotyping of polymorphic markers (tagSNPs) of DEGs was carried out using MALDI-TOF mass spectrometry. To compare allele and genotype frequencies between the analyzed groups were used Pearson's χ^2 test with Yates' correction or Fisher's exact test.

Results: We found 63 genes that were statistically significantly differentially expressed between patients with PE and physiological pregnancy in placental tissue.

The functional annotation of DEGs indicates a number of biological processes that play an important role in the molecular pathogenesis of PE: reactions associated with the immune response, intercellular interaction, regulation of apoptosis, etc. Analysis of metabolic pathways in which DEGs are included indicates a possible participation in the pathophysiological mechanisms of PE pathways cytotoxicity by NK cells, transendothelial migration of leukocytes and signaling pathways mediated by activators of GTPases. The network of protein-protein interactions obtained using the STRING database confirms the relationships between genes identified in the study of biological pathways and processes. Integration the functional annotation data and analysis of proteins interactions encoded made it possible to identify a cluster of the most significant DEGs with the hereditary variability at the genomic level.

Thus, a comparative analysis of the distribution frequencies of alleles and genotypes of 85 polymorphic markers (tagSNPs) DEGs between patients with PE and NP revealed an association with the PE of 27 polymorphic variants of the following genes: *ANKRD37*, *BHLHE40*, *CORO2A*, *GPT2*, *HK2*, *INHA*, *LEP*, *LHB*, *NDRG1*, *PLIN2*, *PPP1R12C*, *SASH1*, *SIGLEC6*, *SYDE1* and *ZNF175*. It should be noted that the majority of associated tagSNPs were localized in transcription factor binding sites and had a high regulatory potential according of analysis using the online resources HaploReg and RegulomeDB. However, studies on mapping genetic variants that determine gene expression in various types of placental cells during normal and pathological pregnancy are highly relevant based on modern ideas about the extremely heterogeneous cellular composition of the placenta.

As a result of our analysis of the transcriptome of individual subpopulations cells of placental tissue 26 genes were identified. Expression these genes is statistically significantly different in the SCTs of women with PE and the NP, and 35 DEGs were found for DC. The DEG cluster contains not only well-known candidate genes previously identified in many foreign genome-wide studies of the placenta (for example, *LEP*, *INHBA* and *FLT1*) but also new genes (*AC098613.1*, *AC087857.1*, *FCRLB*, *TENM4*, *PTP4A1P7*, *LINC01225* and etc.), which can be considered as new biological

markers of PE and interesting for further study. The results of functional annotation of DEGs show that the development of PE at the level of SCTs may be associated with signaling pathways regulating hormonal secretion, MAPK cascade, ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of cell adhesion and proliferation of endothelial cells. Along with this, the biological processes involved in the molecular pathogenesis of PE at the DCs level are associated with the synthesis of gamma-aminobutyric acid and the development of oxidative stress.

Conclusion: Thus, in the presented work were discovered new genetic markers of PE and was shown the significant role of regulatory regions of the human genome in susceptibility to this pathology. Using the example of PE was tested a systematic approach to the search for promising biomarkers of gestational complications witch based on a combination of genomic, transcriptomic and bioinformatics methods. This study expands our understanding of the molecular mechanisms involved in PE and may serve as a basis for the development of preventive, prognostic and therapeutic strategies in the personalized obstetrics.

Funding: The research was carried out at the expense of the state assignment (fundamental scientific research No. 122020200083-8).