

АНАЛІЗ ДИФЕРЕНЦІЙНО ЕКСПРЕСОВАНИХ ГЕНІВ І БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ПЛАЦЕНТІ ЛЮДИНИ МІЖ ПЕРШИМ І ДРУГИМ ТРИМЕСТРОМ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ ВАГІТНОСТІ

Джікірба Р.І¹, Оболенська М.Ю.²

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, dzhikirba.roman.bioi@gmail.com

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України



Abstract. *In this study, a differential expression analysis on microarray was performed to compare the gene expression of 9 samples during the second trimester to 13 samples during the first trimester of normal pregnancy. These results were used to perform gene-set enrichment analysis, the results of which demonstrated 260 enriched biological processes. Both the top 3 activated and inhibited biological processes were illustrated using cnetplot.*

Keywords: *pregnancy complications, differential gene expression, gen-set enrichment analysis, placenta, enriched biological pathways.*

Вступ. Плацента – це високоспеціалізований тимчасовий орган, який поєднує мати і плід у триєдину систему. Через плаценту мати забезпечує розвиток плоду, а плід зумовлює адаптацію матері до своїх потреб. Плацента є не тільки посередником, а й активним співучасником обох процесів [1]. Дисфункція плаценти, яка часто пов'язана з порушеннями під час імплантації і формуванні плаценти, призводить до серйозних ускладнень вагітності, наприклад, прееклампсії, для якої не існує надійної діагностики на ранніх етапах вагітності [2].

Метою цієї роботи є виявлення диференційно експресованих генів (ДЕГів) і збагачених біологічних процесів у плаценті під час переходу від першого до другого триместру фізіологічної вагітності заради отримання контрольних характеристик процесів, необхідних для порівняння з відповідними характеристиками за умов ускладнень вагітності і виявлення принципових розбіжностей.

Матеріали та методи. Об'єкт дослідження – експресія генів у плаценті першого (13 зразків) і другого (9 зразків) триместру нормальної вагітності. Дані, отримані за допомогою технології microarray і завантажені із відкритих баз даних GEO та ArrayExpress, люб'язно надані О.К. Лихенко (ІМБГ, Київ, Україна) у вигляді матриці з нормалізованими значеннями експресії анотованих генів після видалення батч-ефекту.

Для визначення диференційно експресованих генів і статистичної оцінки їх значущості послідовно проведено інтеграцію і обробку даних за використання функцій з бібліотеки limma: model.matrix, lmfit, makeContrasts, contrasts.fit, eBayes. Функцію topTable застосовано для візуалізації результатів у вигляді таблиці [4].

Для визначення біологічних шляхів, які об'єднують певні групи ДЕГів, застосовано метод Gene set enrichment analysis (GSEA), наявний у бібліотеці clusterProfiler [5]. Згадані бібліотеки наявні у програмному забезпеченні Bioconductor. Отримані результати аналізу ДЕГів використано як вхідні дані для

методу GSEA. Для виконання цього аналізу створено рангований список генів, де ранг кожного гена визначається за формулою [6]:

$$rank_{gene_i} = logFC_{gene_i} * (-log_{10}(Adj.P.Value_{gene_i})),$$

де $\log(FC)$ – це логарифм кратності зміни експресії гена між 2-им і 1-им триместром;

Adj.P.value – це скоригована статистична значущість для множинних порівнянь експресії генів між другим і першим триместром.

Сформований рангований список генів передано у функцію gseGO, яку під'єднано до бази даних людського геному org.Hs.eg.db, і додано атрибуту «біологічний процес» як характеристику онтології генів, значення 20 як мінімальний показник кількості ДЕГів у біологічних процесах і порогове значення P-value ≤ 0.05 для біологічних процесів.

Метод GSEA ідентифікує надмірно представлені набори генів із ранжованого списку генів у біологічних процесах шляхом порівняння даного списку із списком генів у складі відомих біологічних процесів, та обраховує показники збагачення за допомогою певного статистичного підходу для кожного знайденого набору генів у складі біологічного процесу й відповідні нормалізовані показники, абсолютні значення яких значно обумовлені внесками ДЕГів. Результати GSEA представлені у вигляді генно-концептуальної мережі (cnetplot).

Результати та обговорення.

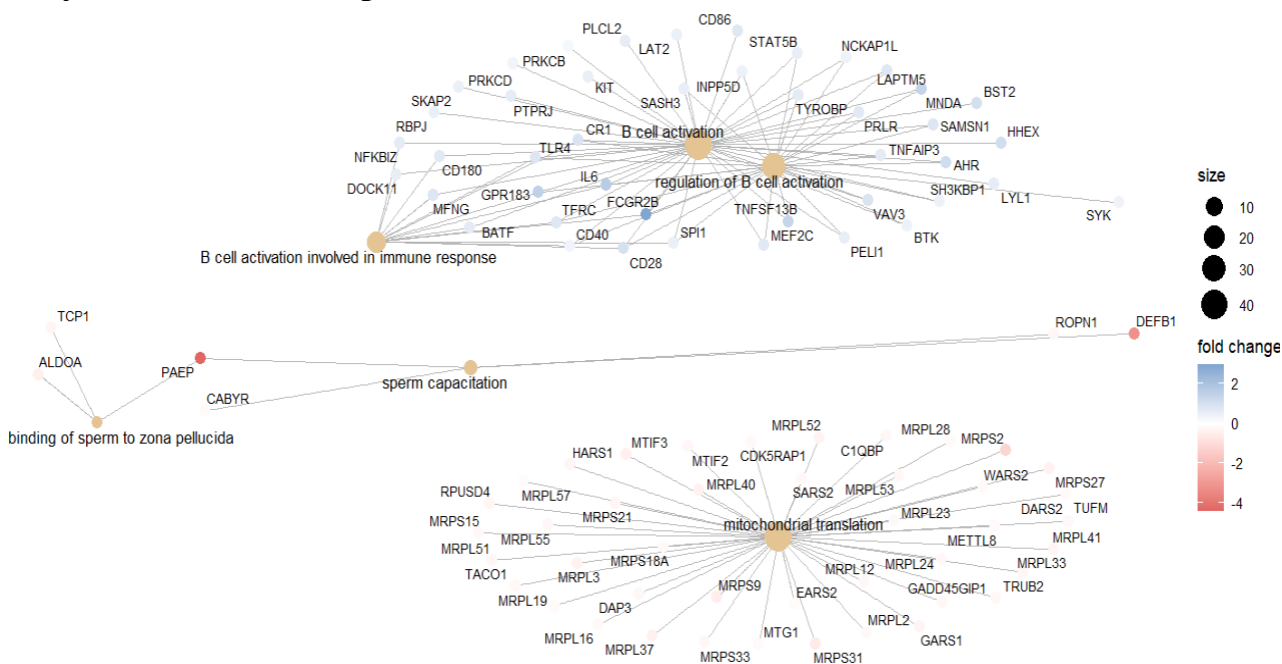


Рис.1. Cnetplot збагачених біологічних процесів* із трьома найбільш позитивними і негативними нормалізованими показниками збагачення.

*Примітка. Біологічні процеси позначені жовтими вузлами, а з'єднані з ними диференційно експресовані гени позначені точками. Розмір вузлів віддзеркалює кількість ДЕГів, присутніх у біологічному процесі; насиченість кольору точок пропорційна кратності змін в експресії генів. Визначено і проаналізовано 19529 ДЕГів і виокремлено 260 біологічних процесів, серед яких обрано по три процеси із найбільш позитивними і

негативними нормалізованими показниками збагаченнями. Показник збагачення визначає ступінь, до якого певний набір генів біологічного шляху надмірно представлений зверху або знизу ранжованого списку генів.

До перших належать: процес активації В-клітин (GO:0042113), активації В-клітин, залучених до імунної відповіді (GO:0002312), морфогенез мезенхіми (GO:0072132). В-клітини в плаценті є координаторами імунної відповіді, критично важливої для підтримки фето-материнської толерантності. Цитокін ІІ-6, хоріальний гонадотропін (hCG) і альфафетопротеїн (AFP) продукуються плацентою і сприяють активації В-клітин і синтезу ними протизапального ІІ-10 і асиметричних антитіл, які зв'язуються з батьківськими антигенами. На відміну від конвенційних, асиметричні антитіла не викликають знищення батьківських антигенів і унеможливають материнську лімфоцитарну відповідь [7]. Гени, які належать до процесів активації В-клітин, можуть діяти і через інші механізми та також регулювати фето-материнську толерантність. Порушення регуляції активації В-клітин можуть призводити до зміни цитокінового профілю й антитіло-опосередкованих імунних реакцій і спричиняти втрату вагітності, розвиток прееклампсії, затримку внутрішньоутробного росту, мертвонародження та передчасні пологи [8].

Морфогенез мезенхіми плаценти (GO:0072132) передбачає формування у хоріональних ворсинках сполучної тканини, яка складається з нещільно розташованих мультипотентних мезенхімальних клітин і ретикулярних волокон в позаклітинному матриксі, що забезпечує легку міграцію клітин. Це має важливе значення для позиціонування клітин під час морфогенезу плаценти. Мезенхімальні клітини складають до ~10 % від епітеліальних клітин плаценти. Перетворення епітеліальних клітин у мезенхімальні клітини (epithelial-mesenchymal-transition, EMT) і перетворення у зворотньому напрямку (mesenchymal-epithelial-transition, MET) відбуваються циклічно і збалансовано і супроводжують зростання і формування плаценти, васкуло- і ангиогенез, децидуалізацію стромальних клітин ендометрію, диференціювання позаклітинного трофобласту тощо. Порушення EMT/MET балансу призводять до ускладнень вагітності, включаючи прееклампсію [9].

До інших трьох з негативними нормалізованими показниками збагачених біологічних процесів належать мітохондріальна трансляція (GO:0032543) і пов'язані між собою процес капацитації сперматозоїдів (GO:0048240) і зв'язування сперматозоїдів із зовнішньою оболонкою яйцеклітини (GO:0007339). Мітохондрії є енергетичними станціями клітин, які живлять плаценту протягом всієї вагітності, перехід від першого триместру до другого супроводжується зміною гіпоксичного середовища на нормоксичне, коли багата киснем материнська кров поступає до плаценти. За умов гіпоксії активність мітохондрій і відповідних генів підвищується. З цими змінами у забезпеченні киснем і може бути пов'язане незначне зниження мітохондріальної активності [10].

Капацитація передбачає ряд морфологічних і молекулярних процесів дозрівання сперматозоїдів, необхідних для їх взаємодії із специфічними глікопротеїнами на зовнішній оболонці яйцеклітини і запліднення [11]. Дефектна взаємодія

сперматозоїдів із зовнішньою оболонкою яйцеклітини сприяє безпліддю [12]. Під час переходу від першого до другого триместру ці процеси вже давно позаду, і активність відповідних генів знижується. Типовим прикладом є ген PAEP, експресія якого знижується трохи більше ніж в 16 разів у досліджуваний період.

Висновки. Визначено диференційно експресовані гени і збагачені біологічні процеси у плаценті людини у другому триместрі порівняно з першим за умов фізіологічної вагітності. Ці результати засвідчили визначну роль імунних процесів і морфогенезу мезенхіми на цьому етапі вагітності і фактичне зникнення біологічних процесів, пов'язаних із заплідненням і гіпоксією, притаманних попередньому етапу вагітності.

Визначені кількісні зміни в експресії генів і виокремлені збагачені біологічні процеси слугуватимуть базовими для порівняння з процесами, які відбуваються у плаценті за умов ускладнень вагітності. Виявлені розбіжності сприятимуть кращому розумінню патогенезу ускладнень вагітності, для яких дисфункція плаценти відіграє вирішальну роль.

Список використаної літератури:

1. Zhang, et al. Placental Adaptations in Growth Restriction. doi:10.3390/nu7010360
2. Cuffe et al. Placenta. 2017; 54: 104–110. doi:10.1016/j.placenta.2017.01.119
3. Lykhenko .Biopolym. Cell. 2021;37(1):73-82. doi:10.7124/bc.000A4D
4. Dunning. Analysing data from GEO. Режим доступу до ресурсу:https://sbc.shef.ac.uk/geo_tutorial/tutorial.nb.html#Sample_clustering_and_Principal_Components_Analysis.
5. Khalfan et al. Gene Set Enrichment Analysis with ClusterProfiler. Режим доступу до ресурсу: <https://learn.gencore.bio.nyu.edu/rna-seq-analysis/gene-set-enrichment-analysis/>.
6. Xiao, Y. et al. A novel significance score for gene selection and ranking. Bioinformatics, 30(6), 801–807. doi:10.1093/bioinformatics/btr671
7. Fettke F, et al. B cells: the old new players in reproductive immunology. Front Immunol. 2014 Jun 23;5:285. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00285.
8. Lima, et al. Serum markers of B cell activation in pregnancy during late gestation, delivery and the postpartum period., e13090. doi:10.1111/aji.13090
9. Pei. D, et al. Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming. doi:10.1038/s41556-018-0195-z
10. Snyder CM, Chandel NS. Mitochondrial regulation of cell survival and death during low-oxygen conditions. Antioxid Redox Signal. doi: 10.1089/ars.2009.2730
11. Sperm capacitation GO:0048240 – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0048240>.
12. Erica T. Y, et al. The role of spermatozoa-zona pellucida interaction in selecting fertilization-competent spermatozoa in humans. doi: 10.3389/fendo.2023.1135973