ГЕНЕТИКА, 2022, том 58, № 10, с. 1210–1220

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 577.214.5;577.218

ЛАНДШАФТ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА В ДЕЦИДУАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

© 2022 г.
Е. А. Трифонова[1, 2, *], М. М. Гавриленко[1], А. А. Бабовская[1], А. А. Зарубин[1], М. Г. Сваровская[1], Е. В. Ижойкина[3], И. А. Степанов[3], В. Н. Сереброва[1], И. Г. Куценко[2], В. А. Степанов[1]

[1]*Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра, Российская академия наук, Томск, 634050 Россия*

[2]*Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия*

[3]*Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко, Томск, 634063 Россия*

**e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru*

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.
После доработки 15.05.2022 г.
Принята к публикации 31.05.2022 г.

Альтернативный сплайсинг (АС) РНК – ключевой этап посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, который обеспечивает пластичность транскрипции и контроль экспрессии изоформ РНК в данный момент времени в определенном типе тканей и клеток. Предположительно, этот механизм играет важную роль в развитии и функционировании плаценты. В исследовании проведено глубокое полнотранскриптомное секвенирование с детальным анализом событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках (ДК) плацентарной ткани при физиологическом течении беременности. В децидуальных клетках идентифицированы 149067 событий АС, аннотированных в GENCODE v.26, в 20463 генах, из которых 4038 генов характеризовались десятью и более изоформами. Анализ реконструированной генной сети продемонстрировал высокую степень взаимодействий альтернативно сплайсированных генов и позволил выявить регуляторные связи, обеспечивающие координированную экспрессию большинства центральных генов, которые ассоциированы с инициацией и элонгацией трансляции у эукариот, а также модуляцией ангиогенеза и адгезии клеток, опосредованной DE-кадгерином. Полученные результаты подтверждают важность альтернативного сплайсинга, который существенно увеличивает транскрипционное разнообразие и представляет собой значимый механизм регуляции генов в децидуальных клетках. Следует отметить, что ряд генов, подверженных АС в ДК, ассоциирован с осложнениями беременности, в связи с чем представляется актуальным дальнейшее изучение данного механизма процессинга РНК в когорте пациенток с акушерской патологией.

Ключевые слова: альтернативный сплайсинг, транскрипт, полнотранскриптомное секвенирование, плацента, децидуальные клетки, человек.

DOI: 10.31857/S0016675822100101

Альтернативный сплайсинг (**АС**) представляет собой посттранскрипционный регуляторный механизм, продуцирующий множественные изоформы РНК из одного предшественника мРНК. АС значительно увеличивает транскриптомное и протеомное разнообразие кодирующего генома человека и является важной составляющей регуляции экспрессии генов. Известно, что этому явлению подвержены около 95% всех генов человека [1]. Механизмы, принимающие участие в процессе АС, включают использование альтернативных донорных и акцепторных сайтов, альтернативных первого и последнего экзонов, пропуск экзонов, взаимоисключающие экзоны и удержание интронов [2]. Поскольку альтернативно сплайсированные транскрипты одного гена могут продуцировать белки с различными функциями, в последнее десятилетие растет интерес к изучению роли данного механизма процессинга РНК в развитии заболеваний человека [3]. К примеру, была показана связь АС генов, экспрессирующихся в нервной системе, с болезнью Альцгеймера и расстройствами аутистического спектра [4]. Обнаружена ассоциация с аберрантным АС, таких многофакторных заболеваний, как сердечно-сосудистые болезни, рак различной локализации, шизофрения, преэклампсия, задержка развития плода и др. [5–8].

Несмотря на всесторонний анализ альтернативного сплайсинга пре-мРНК во многих тканях и клетках человека в норме и при патологии, ранее

не проводился глобальный скрининг изменений альтернативного сплайсинга как в целом в плацентарной ткани, так и в отдельных клеточных популяциях, формирующих ее.

Известно, что одним из решающих событий для успешной имплантации эмбриона и развития плаценты является гормонально-контролируемая дифференцировка стромальных клеток эндометрия в децидуальные клетки (**ДК**) и формирование децидуальной оболочки. Ряд исследований продемонстрировал ключевую роль децидуальных стромальных клеток и их микроокружения в иммунном контроле над инвазией трофобласта, процессах ремоделирования тканей и развитии плода [9, 10]. Таким образом, децидуальные стромальные клетки служат основным функциональным клеточным компонентом в децидуальной ткани плаценты, выполняя трофическую, гормональную, защитную, иммунорегуляторную и гемопоэтическую функции, в связи с чем данный тип клеток является одним из наиболее интересных объектов для исследования событий АС при беременности как с теоретической точки зрения, так и с позиции предиктивной медицины. В представленном исследовании впервые в мире проведено глубокое полнотранскриптомное секвенирование ДК плацентарной ткани с детальным анализом событий альтернативного сплайсинга при физиологическом течении беременности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Материал для исследования представлен биоптатами материнской части плаценты женщин с физиологическим течением беременности ($N = 7$). Сбор биоптатов осуществлялся по стандартной методике [11] акушерами-гинекологами на базе ОГАУЗ “ОПЦ им. И.Д. Евтушенко” г. Томска. Полученный материал немедленно промывался физиологическим раствором и помещался в криопробирки, которые далее хранились в жидком азоте, чтобы свести к минимуму деградацию РНК. У всех пациентов срезы плацентарной ткани были охарактеризованы гистологически с окрашиванием гематоксилин-эозином. Лазерная микродиссекция осуществлена на оборудовании PALM (Carl Zeiss, Германия) с технологией автоматизированного захвата фрагментов (“Laser Capture Microdissection”). Для выделения тотальной РНК использован набор Single Cell RNA Purification Kit (Norgen, США). Концентрация и качество РНК были оценены с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer. Приготовление библиотек проведено по протоколу SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara, США). Массовое параллельное секвенирование выполнено на приборе Next-seq 2000 (Illumina). Выравнивание на референсный геном (hg38) было выполнено с помощью программы STAR. Аннотацию транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе в результате секвенирования децидуальных клеток, проводили в программной среде R с использованием базы данных “gencode.v19”. Функциональный анализ последовательностей, демонстрирующих АС, проводили с помощью веб-инструмента “WebGestalt” (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) и базы данных “STRING” (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [12, 13]. Анализ событий альтернативного сплайсинга выполнен в среде R с помощью пакета “SGSeq”, позволяющего прогнозировать и количественно оценивать события сплайсинга на основе данных полногеномного РНК-секвентрования. Профиль АС и экзоны в данном подходе предсказываются из прочтений, сопоставленных с эталонным геномом, и собираются в граф, описывающий события сплайсинга. События сплайсинга идентифицируются циклично с использованием графа и оцениваются количественно на основании локальных прочтений, приходящихся на начало или конец вариантов сплайсинга [14]. Экспериментальные исследования были выполнены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием ЦКП “Медицинская геномика” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты аннотации транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе, свидетельствуют, что большинство из анализируемых генов соответствуют протеинкодирующим регионам генома человека (15843). В оставшемся кластере преобладают локусы длинных некодирующих РНК и транскрибируемых непроцессированных псевдогенов (в табл. 1 приводятся усредненные данные по всем анализируемым образцам).

В соответствии с рекомендуемым подходом к анализу, описанному в ранее опубликованном исследовании [14], мы идентифицировали 149067 событий АС в 20463 генах. Основываясь на паттернах сплайсинга, данные события можно классифицировать на семь основных типов: альтернативный промотор, взаимоисключающие экзоны, сохранение интрона, пропуск экзона, альтернативный акцепторный сайт, альтернативный терминатор и альтернативный донорский сайт, преобладающими из которых являются сохранение интрона и пропуск экзона (рис. 1). Из более чем 20 тыс. генов, экспрессирующихся в ДК плаценты, 91% (около 18 тыс.) имели больше одной изоформы РНК, а 21% (4038 генов) – более десяти изоформ. Наибольшее количество изоформ (27) идентифицировано для гена *HNRNPH1,* кодирующего гете-

Таблица 1. Результаты аннотации транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе

Идентифицированные транскрипты	Количество транскриптов
Длинные некодирующие РНК (lincRNA)	3540
МикроРНК (miRNA)	68
Неидентифицированная РНК (misc_RNA)	8
Полиморфные псевдогены (polymorphic_pseudogene)	20
Процессированные псевдогены (processed_pseudogene)	17
Белок-кодирующие (protein_coding)	15633
Малые ядрышковые РНК (snoRNA)	2
Малые ядерные РНК (snRNA)	7
Транскрибируемые процессированные псевдогены (transcribed_processed_pseudogene)	141
Транскрибируемые непроцессированные псевдогены (transcribed_unprocessed_pseudogene)	550
Транскрибируемые унитарные псевдогены (transcribed_unitary_pseudogene)	95
Непроцессированные псевдогены (unprocessed_pseudogene)	66
Транслированные процессированные псевдогены (translated_processed_pseudogene)	1
Унитарные псевдогены (unitary_pseudogene)	2
Гены вариабельной цепи иммуноглобулина (IG_(C/J/V)_gene)	11
Инактивированный ген иммуноглобулина (IG_V_pseudogene)	4
Гены вариабельной цепи Т-клеточного рецептора (TR_(C/D/J/V)_gene)	11
Инактивированный ген Т-клеточного рецептора (TR_V_pseudogene)	1
Транскрипты с неустановленной функцией (TEC)	25

рогенный ядерный рибонуклеопротеин H1, представляющий собой РНК-связывающий белок, который обеспечивает субстрат для событий процессинга пре-мРНК.

Для количественной оценки обнаруженных событий АС были рассчитаны значения коэффициента *PSI* (percentage spliced in); который характеризует долю каждого обнаруженного события сплайсинга во всех экспрессируемых изоформах. Экспрессия некоторых изоформ была довольно низкой (*PSI* < 0.05), и большинство событий АС не могли быть стабильно обнаружены во всех

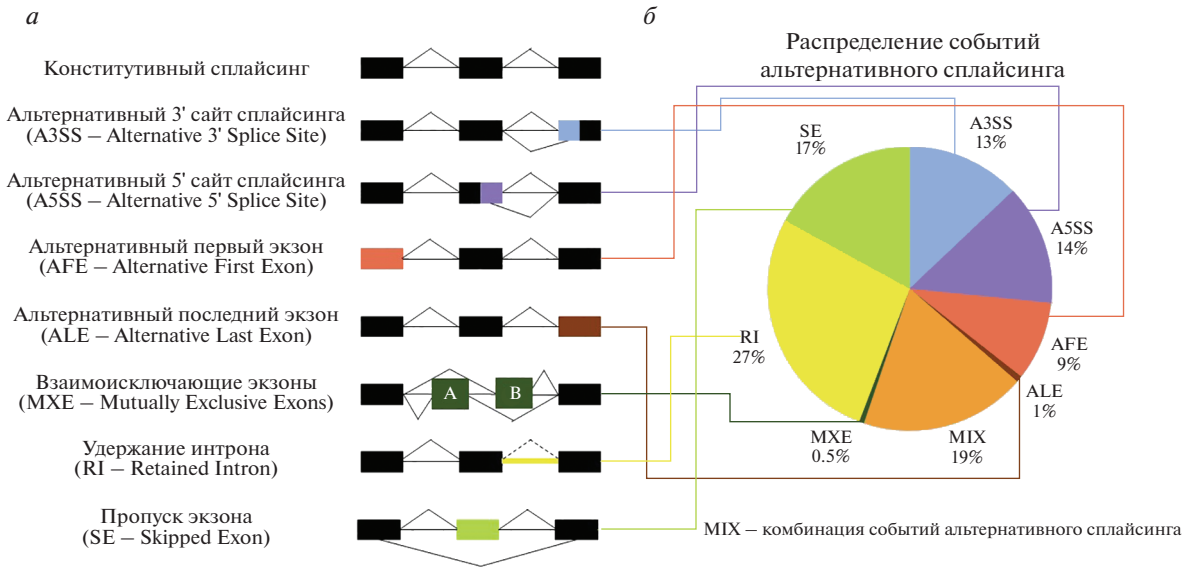

Рис. 1. Основные типы событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты.

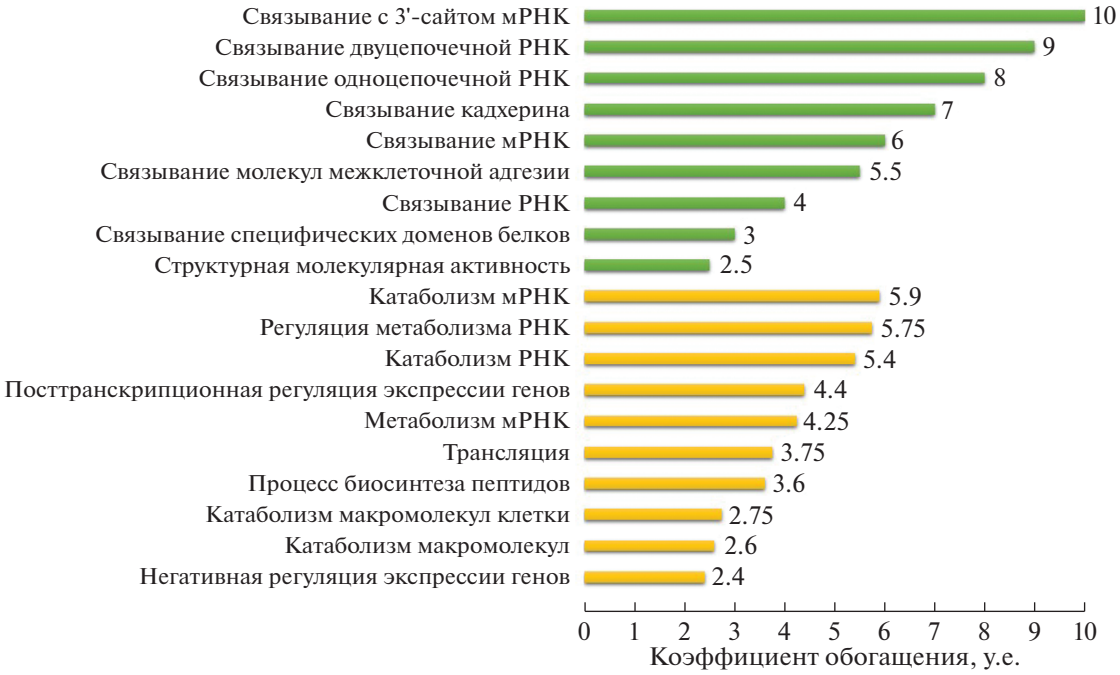

Рис. 2. Основные GO-категории, ассоциированные с кластером генов, для которых было идентифицировано более двух транскриптов, экспрессирующихся в ДК. Желтым цветом обозначены биологические процессы, зеленым – молекулярные функции.

данных образцах. Для идентификации наиболее значимых событий АС использовали следующие критерии: значение показателя *CPM* (counts per million) больше десяти, доля альтернативного транскрипта (значение коэффициента *PSI*) больше или равна 0.05 и меньше или равна 0.95. Указанным критериям соответствовал 1871 событие АС 352 генов, из них два и более транскрипта имели 312 генов, основные биологические функции и молекулярные процессы которых, согласно базы данных “GeneOntology”, статистически значимо (false discovery rate (*FDR*) > 0.05) связаны с негативной и посттранскрипционной регуляцией экспрессии генов, метаболизмом мРНК, процессом биосинтеза пептидов и катаболическим процессом макромолекул клетки, связыванием с РНК, молекулами клеточной адгезии, кадгерином и др. (рис. 2).

В целях более детальной функциональной аннотации альтернативно сплайсированных генов нами были выбраны 158 генов, для которых были обнаружены пять и более транскриптов, экспрессирующихся в ДК (список генов доступен по запросу у авторов статьи). Анализ реконструированной с использованием программы “STRING” белок-белковой сети (рис. 3), включающей 101 продукт данных генов, свидетельствует о высокой степени их взаимодействий (более 130 парных взаимодействий имеют значения коэффициента combined_score ≥ 0.9).

Центральное место в построенной сети с максимальным числом и силой взаимодействий (node_degree ≥ 10, score ≥ 0.99) занимают следующие 17 генов: *RPS27A*, *HNRNPK*, *CTNNB1*, *EIF4G1*, *HNRNPM*, *ACTB*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPH1*, *RPS9*, *RPL6*, *EEF1B2*, *RPL10*, *RPL15*, *RPL23*, *RPL38*, *RPL7A*, *SERBP1*, ассоциированных, согласно аннотации сигнальных путей в базах данных “KEGG” и “Reactome”, с инициацией и элонгацией трансляции у эукариот, а также регуляцией экспрессии белков Slit и Robo, обладающих множеством разнообразных функций, включая модуляцию ангиогенеза и адгезии клеток, опосредованную DE-кадгерином. Примечательно, что для 13 генов из данного кластера (*RPS27A*, *HNRNPK*, *HNRNPM*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPH1*, *RPS9*, *RPL6*, *EEF1B2*, *RPL10*, *RPL15*, *RPL23*, *RPL38*, *RPL7A*) характерно явление ко-экспрессии.

Результаты функциональной аннотации кластера генов, характеризующихся экспрессией пяти и более транскриптов в ДК, демонстрируют их сверхпредставленность в процессах, связанных с каноническим сигнальным путем Wnt/β-катенин, регуляцией сплайсинга мРНК, убиквитинирования и формированием адгезивных контактов, что свидетельствует о важной роли альтернативно сплайсированных генов ДК в межклеточной коммуникации в плацентарной ткани, а также в механизмах эпителиально-мезенхимального перехода (табл. 2).

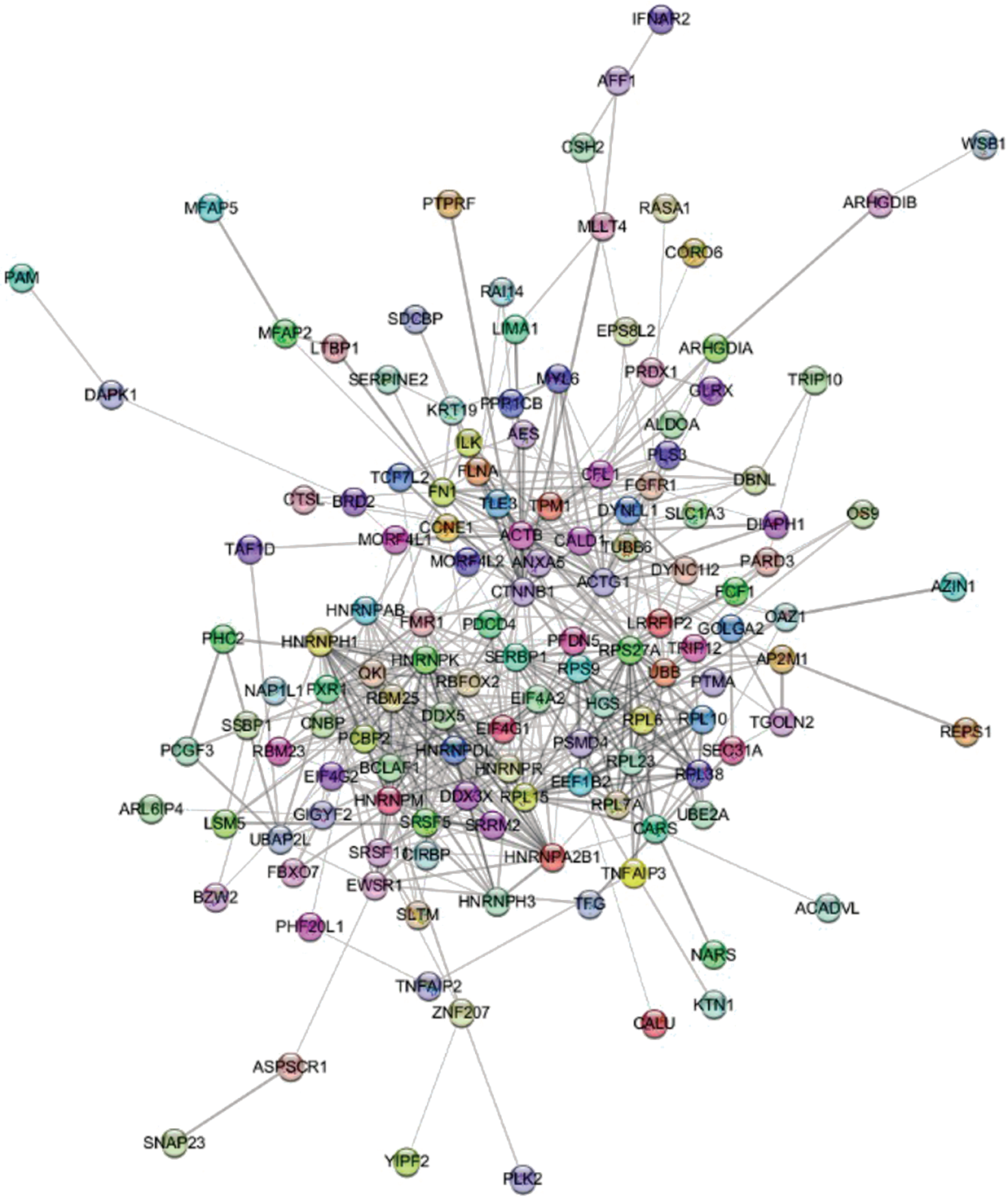

Рис. 3. Сеть белок-белковых взаимодействий продуктов альтернативно сплайсированных генов, экспрессирующихся в ДК.

Известно, что путь Wnt/β-катенина является каноническим сигнальным путем Wnt, который регулирует несколько биологических процессов, включая пролиферацию, миграцию, инвазию и апоптоз. К настоящему времени накоплены данные, в основном полученные на животных моделях, которые демонстрируют ключевую роль этого сигнального пути в развитии плаценты, имплантации бластоцисты, а также регуляции пролиферации и инвазии клеток трофобласта

Таблица 2. Результаты функциональной аннотации кластера генов, характеризующихся экспрессией пяти и более транскриптов в ДК

Категория	Описание	Коэффициент обогащения	*FDR*
	Биологические процессы (Gene Ontology)		
GO:0044334	Канонический сигнальный путь Wnt, участвующий в положительной регуляции перехода эпителиальных клеток в мезенхимальные	2.1	0.0289
GO:0010909	Положительная регуляция процесса биосинтеза гепарансульфат-протеогликанов	1.92	0.0415
GO:1900044	Регуляция убиквитинирования, связанного с белком k63	1.53	0.0152
GO:0150105	Локализация белка в межклеточном соединении	1.49	0.0184
GO:0098974	Организация постсинаптического актинового цитоскелета	1.4	0.0288
GO:2000637	Положительная регуляция подавления экспрессии генов микроРНК	1.32	0.0074
GO:0048024	Регуляция сплайсинга мРНК с помощью сплайсосомы	1.1	<0.0001
GO:0000381	Регуляция альтернативного сплайсинга мРНК с помощью сплайсосомы	1.08	0.00057
	Пути KEGG		
hsa04520	Адгезивные контакты	1.05	0.0028
hsa04962	Реабсорбция воды, регулируемая вазопрессином	1.05	0.0321
hsa05100	Бактериальная инвазия в эпителиальные клетки	0.95	0.0222
hsa03010	Рибосома	0.88	0.0025
hsa05205	Протеогликаны при раке	0.8	0.0021
hsa03040	Сплайсосома	0.75	0.0402
hsa04510	Фокальная адгезия	0.7	0.0210
	Пути Reactome		
HSA-9636383	Предотвращение фагосомально-лизосомального слияния	1.62	0.0040
HSA-8876493	Интерналин-опосредованное проникновение *Listeria monocytogenes* в клетки-хозяева	1.62	0.0040
HSA-9706377	Усиление передачи сигналов через FLT3 в результате нарушения CBL-опосредованного подавления рецептора в раковых клетках	1.55	0.0337
HSA-9637628	Модуляция *Mycobacterium tuberculosis* иммунной системы хозяина	1.55	0.0337
HSA-196025	Формирование кольцевых щелевых соединений	1.53	0.0059
HSA-4641265	Подавление генов-мишеней Wnt	1.49	0.0072
HSA-8951430	Регулирование RUNX3 передачи сигналов Wnt	1.49	0.0388

[15–18]. Помимо этого, нарушение экспрессии компонентов пути Wnt/β-катенина было связано с широким спектром гестационных заболеваний у мышей [19].

Аналогично животным моделям, сбалансированное действие передачи сигналов по пути Wnt/β-катенина критически важно и для нормальной плацентации человека. Как гиперактивация,

Таблица 3. Результаты аннотации транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе

Категория	Заболевание	Коэффициент обогащения	Уровень значимости	Гены
C1275278	Внескелетная миксоидная хондросаркома	38.84	0.001	*EWSR1*, *TFG*
C1846434	Гипоплазия лопатки	20.81	<0.001	*FGFR1*, *FLNA*, *ACTB*
C0027626	Инвазивные новообразования	5.43	<0.001	*FN1*, *ALDOA*, *CFL1*, *PDCD4*, *KRT19*, *ACTB*, *CTNNB1*, *CALU*
C0024668	Новообразования молочной железы	4.39	<0.001	*FN1*, *ACTG1*, *RPL6*, *PLK2*, *ACTB*, *RASA1*, *HNRNPAB*

так и недостаточная активация передачи сигналов Wnt-пути были ассоциированы с различными репродуктивными нарушениями: снижением инвазии трофобласта, хориокарциномой, молярной беременностью, преэклампсией и невынашиванием беременности [18, 20, 23]. Механизмы, лежащие в основе данных наблюдений, предположительно связаны с ведущей ролью сигнального пути Wnt в процессах инвазии и дифференцировки трофобласта человека, опосредованной межклеточными взаимодействиями в децидуальной ткани плаценты [24]. Кроме того, обнаружено участие молекул сигнального пути Wnt в регуляции уровня ангиогенных факторов, таких как VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), гипоэкспрессия которых является важным компонентом патогенеза осложненного течения беременности [25].

В настоящее время не вызывает сомнений ключевая роль сигнального пути Wnt/β-катенина в опухолевой трансформации и прогрессии некоторых злокачественных новообразований [26, 27]. Данное наблюдение представляет особый интерес в контексте полученных нами результатов аннотации кластера генов, характеризующихся экспрессией пяти и более транскриптов в ДК, в базе данных “DisGeNET” на платформе веб-ресурса “WebGestalt” (табл. 3). Вышеобозначенные гены преимущественно ассоциированы с онкологическими заболеваниями, тем не менее, для двух генов показана связь с патологическим течением беременности. Так, ген *CD46* ассоциирован с развитием HELLP-синдрома (score в базе данных “DisGeNET” составил 0.330), а ген *FN1* связан с невынашиванием беременности (score = 0.300). Наряду с этим, согласно литературным данным, продукт гена *FN1* – белок фибронектин является скрининговым маркером преждевременных родов и ассоциирован с развитием преэклампсии (ПЭ) [28, 29], а однонуклеотидные полиморфные маркеры гена *CD46* ассоциированы как с ПЭ [30], так и с идиопатическим привычным невынашиванием беременности [31].

Необходимо отметить, что проблема взаимоотношений беременности и роста злокачественных новообразований занимает особое место в современной медицине. В первую очередь интерес к данной проблеме обусловлен сходством обоих процессов по многим признакам на молекулярном, клеточно-тканевом и организменном уровнях, включая изменения нейроэндокринного, иммунного и метаболического статуса организма, сходные фенотипические свойства эмбриональных и злокачественных клеток, такие как способность к инвазивному росту, аутокринной секреции ростовых факторов, индукции микроциркуляции, “ускользанию” из-под иммунного надзора организма и другие [32]. В рамках данной проблемы особое внимание исследователей в последние годы уделяется поиску общих сигнальных путей инвазии клеток трофобласта в децидуальную ткань плаценты и процессов опухолевой инвазии. Показано, что клетки вневорсинчатого трофобласта и раковые клетки демонстрируют очень похожий молекулярный фенотип, как на уровне транскрипционной активности генов, так и на уровне метилирования промоторов [33–35]. Следует отметить, что клетки трофобласта с их способностью к пролиферации и дифференцировке, апоптозу и выживанию, миграции, ангиогенезу и иммунной модуляции, использующие в процессе инвазии сходные с раковыми процессами молекулярные пути, делают их привлекательной моделью для изучения рака.

Примечательно, что канонический Wnt-каскад, контролирующий связывание β-катенина с транскрипционными факторами TCF/LEF, является наиболее важным патогенетическим звеном в поддержании фенотипа опухолеинициирующих клеток и эпителиально-мезенхимального перехода, необходимых для метастазирования опухоли [36]. Важно отметить, что формирование плаценты

начинается с прорастания ворсинок трофобласта в децидуальную оболочку матери с последующим формированием активно пролиферирующих участков – цитотрофобластических колонн, часть наиболее дистально расположенных клеток которых также претерпевает эпителиально-мезенхимальный переход и приобретает способность к миграции и инвазии. После инициации инвазии трофобласта в децидуальную оболочку начинает формироваться пул вневорсинчатого трофобласта, принимающего активное участие в ремоделировании спиральных артерий. На молекулярном уровне эпителиально-мезенхимальный переход в плаценте может реализовываться путем различных сигнальных каскадов, включая и путь Wnt/β-катенина [37]. Примечательно, что мутации в этом каскаде ассоциированы с опухолевым ростом, участвуют в поддержании опухолеинициирующих клеток и метастазировании, а ингибиторы сигнального пути Wnt рассмативаются в качестве перспективных противоопухолевых препаратов. Так, показано, что подавление экспрессии или делеции β-катенина ингибирует образование опухолеинициирующих клеток в модели хронического миелолейкоза, острой миелоцитарной лейкемии и опухолях молочной железы [36].

Современные исследования продемонстрировали, что АС РНК, является важным уровнем регуляции экспрессии генов, нарушения которого могут способствовать росту и химиорезистентности опухолевых клеток [38, 39]. В связи с этим, аномальные изменения сплайсинга пре-мРНК считаются одной из ключевых особенностей раковых клеток, а изучение АС – одним из перспективных направлений поиска потенциальных биомаркеров для диагностики злокачественных опухолей.

Сплайсинг пре-мРНК осуществляет сплайсосома, представляющая собой высоко динамичную структуру, состоящую из рибонуклеопротеиновых комплексов, включающих в состав ряд малых ядерных РНК и около 200 белков [40]. Большая часть этих белков является регуляторами сплайсинга, которые контролируют выбор сайта сплайсинга посредством распознавания определенных участков пре-мРНК и определяют, какие участки должны войти в конечный транскрипт зрелой мРНК. В данном контексте интересными представляются полученные нами результаты функциональной аннотации генов, характеризующихся экспрессией пяти и более транскриптов в ДК, которые свидетельствуют об ассоциации данного кластера генов с такими биологическими процессами (Gene Ontology) и сигнальными путями KEGG как “Регуляция альтернативного сплайсинга мРНК с помощью сплайсосомы” и “Сплайсосома”.

Таким образом, представляются чрезвычайно перспективными дальнейшие исследования, характеризующие функциональную роль альтернативно сплайсированных генов в ген-генных сетях сигнального пути Wnt/β-катенина при физиологической и патологической беременности, а также онкологических заболеваниях. Изучение альтернативного сплайсинга ДК открывает возможности для понимания формирования на уровне транскрипции тканевых и клеточных различий, путей развития различных патологических процессов, а также некоторых механизмов плацентации и канцерогенеза, что позволит обнаружить критически важные гены и сигнальные пути, которые могут служить биомаркерами и/или мишенями для разработки таргетной терапии акушерских заболеваний и злокачественных новообразований.

АС играет фундаментальную роль во многих важнейших аспектах физиологии человека, включая гомеостаз, дифференцировку клеток, а также приобретение и поддержание идентичности тканей. В настоящей работе впервые в мире проведен анализ событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плацентарной ткани человека. Полученные результаты подтверждают важность альтернативного сплайсинга, который существенно увеличивает транскрипционное разнообразие и представляет собой значимый механизм регуляции генов в децидуальных клетках. Логический анализ реконструированной генной сети продемонстрировал высокую степень взаимодействий альтернативно-сплайсированных генов и позволил выявить регуляторные связи, обеспечивающие координированную экспрессию большинства центральных генов. Центральное место в построенной сети занимают гены *RPS27A*, *HNRNPK*, *CTNNB1*, *EIF4G1*, *HNRNPM*, *ACTB*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPH1*, *RPS9*, *RPL6*, *EEF1B2*, *RPL10*, *RPL15*, *RPL23*, *RPL38*, *RPL7A*, *SERBP1*, ассоциированные с инициацией и элонгацией трансляции у эукариот, а также модуляцией ангиогенеза и адгезии клеток, опосредованной DE-кадгерином. Для более детального изучения АС и характеристики соотношения отдельных изоформ генов в ДК требуется выполнение дальнейшего комплексного анализа на основе данных геномного и транскриптомного секвенирования, а также количественной оценки представленности изоформ мРНК ключевых генов с применением метода ПЦР в реальном времени над которым в настоящее время и работают авторы.

Настоящее исследование показало, что ряд генов, подверженных альтернативному сплайсингу в децидуальных клетках, ассоциирован с осложнениями беременности, что обусловливает высокую актуальность дальнейшего изучения данного механизма процессинга РНК в когорте пациенток с акушерской патологией. Необходимо отметить, что продукты альтернативно сплайсированных генов по результатам функциональной аннотации и литературным данным также ассоциированы с развитием онкологических заболеваний че-

рез сигнальный путь Wnt/β-катенина. В связи с этим, представляются чрезвычайно перспективными дальнейшие исследования, характеризующие функциональную роль АС в ген-генных сетях каскада Wnt при физиологической и патологической беременности, а также при развитии опухолевых заболеваний, что может обеспечить не только разработку новых стратегий профилактики и терапии акушерской патологии и злокачественных новообразований, но и лучшее понимание молекулярных механизмов данных патологических состояний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 20-34-90128.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pan Q., Shai O., Lee L.J. et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing // Nature Genet. 2008. V. 40. № 12. P. 1413–1415. https://doi.org/10.1038/ng.259
2. *Wang E.T., Sandberg R., Luo S. et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes // Nature. 2008. V. 456. № 7221. P. 470–476. https://doi.org/10.1038/nature07509
3. *Wang G.S., Cooper T.A.* Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. № 10. P. 749–761. https://doi.org/10.1038/nrg2164
4. *Raj T., Li Y.I., Wong G. et al.* Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer's disease susceptibility // Nat. Genet. 2018. V. 50. № 11. P. 1584–1592. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0238-1
5. *Tejedor J.R., Tilgner H., Iannone C. et al.* Role of six single nucleotide polymorphisms, risk factors in coronary disease, in OLR1 alternative splicing // RNA. 2015. V. 6. P. 1187–1202. https://doi.org/10.1261/rna.049890
6. *Kahles A., Lehmann K., Toussaint N.C. et al.* Comprehensive analysis of alternative splicing across tumors from 8705 patients // Cancer Cell. 2018. V. 34. № 2. P. 211–224. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001
7. *Takata A., Matsumoto N., Kato T.* Genome-wide identification of splicing QTLs in the human brain and their enrichment among schizophrenia-associated loci // Nat. Communications. 2017. V. 8. P. 14519. https://doi.org/10.1038/ncomms14519
8. *Ruano C.S.M., Apicella C., Jacques S. et al.* Alternative splicing in normal and pathological human placentas is correlated to genetic variants // Hum. Genet. 2021. V. 140. № 5. P. 827–848. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02248-x
9. *Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S. et al.* The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // Hum. Reprod. Update. 2016. V. 4. P. 497–515. https://doi.org/10.1093/humupd/dmw004
10. *Brighton P.J., Maruyama Y., Fishwick K. et al.* Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium // Elife. 2017. V. 6. P. e31274. https://doi.org/10.7554/eLife.31274
11. *Robson S.C., Simpson H., Ball E. et al.* Punch biopsy of the human placental bed // Am. J. Obstetrics and Gynecol. 2002. V. 187. № 5. P. 1349–1355. https://doi.org/10.1067/mob.2002.126866
12. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit. http://www.webgestalt.org/. Accessed April, 2022.
13. *Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D. et al.* STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // Nucl. Ac. Res. 2019. V. 47. № D1. P. D607–D613. https://doi.org/10.1093/nar/gky1131
14. *Goldstein L.D., Ca Y., Pau G. et al.* Prediction and quantification of splice events from RNA-seq data // PLoS One. 2016. V. 11. № 5. P. e0156132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156132
15. *Knöfler M., Pollheimer J.* Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling // Front. Genet. 2013. V. 4. P. 190. https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00190
16. *Sonderegger S., Pollheimer J., Knöfler M.* Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation–review // Placenta. 2010. V. 31. № 10. P. 839–847. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.07.011
17. *Bao H., Liu D., Xu Y. et al.* Hyperactivated Wnt-β-catenin signaling in the absence of sFRP1 and sFRP5 disrupts trophoblast differentiation through repression of Ascl2 // BMC Biology. 2020. V. 18. № 1. P. 1–14. https://doi.org/10.1186/s12915-020-00883-4
18. *Chronopoulou E., Koika V., Tsiveriotis K. et al.* Wnt4, Wnt6 and β-catenin expression in human placental tissue – is there a link with first trimester miscarriage? Results from a pilot study // Reprod. Biol. and Endocrinology. 2022. V. 20. № 1. P. 1–10. https://doi.org/10.1186/s12958-022-00923-4
19. *Xie H., Tranguch S., Jia X. et al.* Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competen-

cy for implantation // Development. 2008. V. 135. № 4. P. 717–727.
https://doi.org/10.1242/dev.015339

20. *Zeng X., Zhang Y., Xu H. et al.* Secreted frizzled related protein 2 modulates epithelial–mesenchymal transition and stemness via Wnt/β-catenin signaling in choriocarcinoma // Cell. Physiol. and Biochem. 2018. V. 50. № 5. P. 1815–1831.
https://doi.org/10.1159/000494862

21. *Pollheimer J., Loregger T., Sonderegger S. et al.* Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast // Am. J. Pathol. 2006. V. 168. № 4. P. 1134–1147.
https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050686

22. *Chen Y., Zhang Y., Deng Q. et al.* Wnt5a inhibited human trophoblast cell line HTR8/SVneo invasion: Implications for early placentation and preeclampsia // J. of Maternal-Fetal & Neonatal Med. 2016. V. 29. № 21. P. 3532–3538.
https://doi.org/10.3109/14767058.2016.1138102

23. *Wang G., Zhang Z., Chen C. et al.* Dysfunction of WNT4/WNT5A in deciduas: Possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia // J. Hypertension. 2016. V. 34. № 4. P. 719–727.
https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000000851

24. *Hess A.P., Hamilton A.E., Talbi S. et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators // Biol. Reprod. 2007. V. 76. № 1. P. 102–117.
https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054791

25. *Newman A.C., Hughes C.C.W.* Macrophages and angiogenesis: A role for Wnt signaling // Vascular Cell. 2012. V. 4. № 1. P. 1–7.
https://doi.org/10.1186/2045-824X-4-13

26. *Yang C., Iyer R.R., Albert C.H. et al.* β-Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas // PNAS. 2012. V. 109. № 18. P. 6963–6968.
https://doi.org/10.1073/pnas.1118754109

27. *Watanabe T., Nanamiya H., Kojima M. et al.* Clinical relevance of oncogenic driver mutations identified in endometrial carcinoma // Translational Oncology. 2021. V. 14. № 3. P. 101010.
https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101010

28. *Honest H., Bachmann L.M., Gupta J.K. et al.* Accuracy of cervicovaginal fetal fibronectin test in predicting risk of spontaneous preterm birth: Systematic review // BMJ. 2002. V. 325. № 7359. P. 301.
https://doi.org/10.1136/bmj.325.7359.301

29. *Bodova K.B., Biringer K., Dokus K. et al.* Fibronectin, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and uterine artery Doppler velocimetry as markers of preeclampsia // Disease Markers. 2011. V. 30. № 4. P. 191–196.
https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0772

30. *Banadakoppa M., Balakrishnan M., Yallampalli C.* Common variants of fetal and maternal complement genes in preeclampsia: Pregnancy specific complotype // Sci. Reports. 2020. V. 10. № 1. P. 1–9.
https://doi.org/10.1038/s41598-020-60539-9

31. *Abdi-Shayan S., Monfaredan A., Moradi Z. et al.* Association of CD46 IVS1-1724 C>G single nucleotide polymorphism in Iranian women with unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) // Iranian J. Allergy, Asthma and Immunol. 2016. V. 15. № 4. P. 303–308.

32. *Louwen F., Muschol-Steinmetz C., Reinhard J. et al.* A lesson for cancer research: Placental microarray gene analysis in preeclampsia // Oncotarget. 2012. V. 3. № 8. P. 759.
https://doi.org/10.18632/oncotarget.595

33. *Smith Z.D., Shi J., Gu H. et al.* Epigenetic restriction of extraembryonic lineages mirrors the somatic transition to cancer // Nature. 2017. V. 549. № 7673. P. 543–547.
https://doi.org/10.1038/nature23891

34. *Macaulay E.C., Chatterjee A., Cheng X. et al.* The genes of life and death: A potential role for placental-specific genes in cancer: Active retrotransposons in the placenta encode unique functional genes that may also be used by cancer cells to promote malignancy // BioEssays. 2017. V. 39. № 11. P. 1700091.
https://doi.org/10.002/bies.201700091

35. *Afzal J., Maziarz J.D., Hamidzadeh A. et al.* Evolution of placental invasion and cancer metastasis are causally linked // Nat. Ecol. Evol. 2019. V. 3. № 12. P. 1743–1753.
https://doi.org/10.1038/s41559-019-1046-4

36. *Татарский В.В.* Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования // Усп. мол. онкологии. 2016. Т. 3. № 1. С. 28–31.
https://doi.org/10.17650/2313-805X.2016.3.1.28-31

37. *Вишнякова П.А., Тарасова Н.В., Володина М.А. и др.* Эпителиально-мезенхимальный переход в плаценте при преэклампсии // Акушерство и гинекология. 2016. № 12. С. 53–57.
https://doi.org/10.18565/aig.2016.12.53-7

38. *Sebestyén E., Zawisza M., Eyras E.* Detection of recurrent alternative splicing switches in tumor samples reveals novel signatures of cancer // Nucl. Ac. Res. 2015. V. 43. № 3. P. 1345–1356.
https://doi.org/10.1093/nar/gku1392

39. *Martinez-Montiel N., Rosas-Murrieta N.H., Anaya Ruiz M. et al.* Alternative splicing as a target for cancer treatment // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 2. P. 545.
https://doi.org/10.3390/ijms19020545

40. *Will C.L., Lührmann R.* Spliceosome structure and function // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2011. V. 3. № 7. P. a003707.
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707

Alternative Splicing Landscape of Placental Decidual Cells during Physiological Pregnancy

E. A. Trifonova[a, b, *], M. M. Gavrilenko[a], A. A. Babovskaya[a], A. A. Zarubin[a], M. G. Svarovskaya[a], E. V. Izhoykina[c], I. A. Stepanov[c], V. N. Serebrova[a], I. G. Kutsenko[b], and V. A. Stepanov[a]

[a] *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia*

[b] *Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

[c] *Evtushenko Regional Perinatal Center, Tomsk, 634063 Russia*

**e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru*

Alternative splicing (AS) of RNA is a key step in the post-transcriptional regulation of gene expression. It's provides transcriptional plasticity and control of the expression of RNA isoforms in a certain type of tissues and cells at a given time. Presumably, this mechanism plays an important role in the development and functioning of the placenta. The study carried out deep whole-transcriptome sequencing with a detailed analysis of alternative splicing events in decidual cells (DC) of placental tissue during the physiological course of pregnancy. In decidual cells, 149067 AS events annotated in GENCODE v.26 were identified in 20463 genes; 4038 of these genes were characterized by 10 or more isoforms. Analysis of the reconstructed genes network demonstrated a high degree of interactions between alternatively spliced genes and revealed regulatory relationships that ensure the coordinated expression of most of the central genes associated with the initiation and elongation of translation in eukaryotes and modulation of angiogenesis and cell adhesion mediated by DE-cadherin. The obtained results confirm the importance of alternative splicing, which significantly increases transcriptional diversity and represents an important mechanism of gene regulation in decidual cells. It should be noted that a number of genes susceptible to AS in DC are associated with pregnancy complications, and therefore it seems relevant to further study this mechanism of RNA processing in a cohort of patients with obstetric pathology.

Keywords: alternative splicing, transcript, whole transcriptome sequencing, placenta, decidual cells, human.