(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 037326 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.12

(21) Номер заявки
201591582

(22) Дата подачи заявки
2014.02.28

(51) Int. Cl. ***C12Q 1/68*** (2006.01)
G06F 19/00 (2011.01)

(54) СПОСОБ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОВ МАТЕРИНСКОЙ ПЛАЗМЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАССИВНОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК

(31) **61/770,985**
(32) **2013.02.28**
(33) **US**
(43) **2015.12.30**
(86) **PCT/IB2014/059351**
(87) **WO 2014/132244 2014.09.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТЕ ЧАЙНИЗ ЮНИВЕРСИТИ ОВ ГОНКОНГ (CN)

(72) Изобретатель:
Ло Юйк Мин Дэннис, Чиу Росса Вай Квун, Чань Квань Чэ, Цзян Пэйюн, Цуи Бо Юин (CN)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) EP-A1-1859051
TSUI Nancy B.Y. et al. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. Prenatal diagnosis, 2009, 29, pp. 1031-1037
LIAO Gary J.W. et al. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 21 by Allelic Ratio Analysis Using Targeted Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA. PLoS one, 2012, v. 7, Issue 5, e38154
WO-A1-2004065629
TW-A1-201243326
WO-A1-2012093331
NG Enders K.O. et al. "The Concentration of Circulating Corticotropin-releasing Hormone mRNA in Maternal Plasma Is Increased in Preeclampsia." Clinical Chemistry., Vol. no. 5, No. vol. 49, 31 December 2003 (2003-12-31), pages 727-731
LO, Y.M. Dennis et al. "Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection." nature medicine., Vol. no. 2, , No. vol. 13, ,28 February 2007 (2007-02-28), pages 218-223

(57) Предложены способы диагностики связанных с беременностью нарушений, определения аллельных отношений, определения вклада матери или плода в циркулирующие транскрипты и/или идентификации материнских или плодных маркеров с применением образца, полученного от субъекта - беременной женщины.

037326 B1

037326 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/770985, озаглавленной "Анализ транскриптома материнской плазмы с применением массивного параллельного секвенирования РНК" и поданной 28 февраля 2013 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

Область техники

Сообщалось о существовании внеклеточных молекул РНК, специфических для беременности, в материнской плазме. Они обеспечили неинвазивный инструмент тестирования для оценки состояния плода и мониторинга беременности с использованием просто образца периферической крови матери. К настоящему времени разработан ряд перспективных вариантов пренатальной диагностики с применением РНК материнской плазмы. Исследователи активно искали дополнительные РНК-маркеры для расширения возможностей применения в различных контекстах нарушений у плода и патологий беременности.

Теоретически самым прямым способом идентификации РНК-маркеров является прямое профилирование внеклеточных молекул РНК в материнской плазме. Однако указанный способ не прост, поскольку стандартные технологии высокопроизводительного скрининга, такие как микроматричный анализ и серийный анализ экспрессии генов (SAGE), обладают ограниченной способностью детектировать являющиеся обычно низкими концентрации частично разрушенных внеклеточных РНК в материнской плазме. Поэтому большинство описанных стратегий скрининга на РНК-маркеры работают непрямо, за счет сравнения профилей экспрессии плаценты и клеток материнской крови. Только транскрипты, уровни экспрессии которых значительно выше в плаценте, чем в клетках материнской крови, в последующем исследуются в образцах материнской плазмы с применением высокочувствительных, но низкопроизводительных технологий, таких как ПЦР в реальном времени с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). Число РНК-маркеров плазмы, идентифицируемых указанным непрямым способом, до сих пор относительно ограничено. Это, возможно, обусловлено тем, что в основанной на тканях стратегии получения данных полностью не учитывались все биологические факторы, оказывающие влияние на уровни плацентарной РНК в материнской плазме. Кроме того, транскрипты, которые экспрессируются и высвобождаются неплацентарными тканями в ответ на беременность, не могут быть идентифицированы указанным способом. Таким образом, было бы очень желательным получит чувствительную и высокопроизводительную методику, позволяющую осуществлять прямое профилирование транскриптома материнской плазмы.

Аналогичным образом прямое профилирование РНК плазмы может находить применение в других условиях, где присутствует смесь молекул РНК от двух индивидуумов, например, при трансплантации органов. Кровоток реципиента трансплантации содержит молекулы нуклеиновых кислот как донора, так и указанного реципиента. Изменение относительного профиля молекул РНК, происходящих от донора или от реципиента, может позволять обнаружение патологий в трансплантированном органе или у реципиента, например отторжение трансплантата.

Краткое описание изобретения

Предложены способы, системы и устройства для диагностики связанных с беременностью нарушений, определения отношений аллелей, определения материнского или плодного вклада в циркулирующие транскрипты и/или идентификации материнских или плодных маркеров с применением образца полученного от субъекта - беременной женщины. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец представлен плазмой крови, содержащей смесь молекул РНК, происходящих от матери и от плода.

Молекулы РНК исследуют (например, секвенируют) и получают совокупность ридов, и идентифицируют положения указанных ридов в референсной последовательности (например, путем выравнивания последовательностей). Идентифицируют информативные локусы, гомозиготные по первому аллелю у матери или у плода, и гетерозиготные по первому аллелю и второму аллелю у другого объекта, выбранного из указанных матери и плода. Затем отбирают информативные локусы и дополнительно анализируют риды, расположенные в отобранных информативных локусах (например, выравниваемые по ним). Согласно некоторым вариантам реализации отношение ридов, соответствующих первым аллелям и вторым аллелям, вычисляют и сравнивают с пороговым значением для диагностирования связанного с беременностью расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации части РНК в образце, происходящие от плода, определяют с применением ридов, расположенных в отобранных информативных материнских локусах. Согласно некоторым вариантам реализации отношение ридов, соответствующих первому аллелю и второму аллелю, вычисляют для индивидуального отобранного информативного локуса, и указанное отношение сравнивают с пороговым значением для определения указанного локуса как материнского или плодного маркера.

Применение предложенных способов не ограничено пренатальной диагностикой; они могут применяться для любого биологического образца, который содержит смесь молекул РНК, происходящих от двух индивидуумов. Например, может использоваться образец плазмы крови, полученный от реципиента трансплантированного органа. Транскрипты, экспрессируемые в трансплантированном органе, отражают генотип донора и присутствуют на детектируемых уровнях в крови реципиента. При считывании указанных транскриптов могут быть идентифицированы информативные локусы в составе генов, экспрессируемых как донором, так и реципиентом, и могут быть измерены относительные уровни экспрессии ал-

лелей от каждого индивидуума. Аномальные уровни экспрессии аллеля, происходящего только от донора или только от реципиента, могут использоваться для диагностирования связанных с трансплантацией расстройств.

Биологические образцы, которые подходят для применения в предложенных способах, включают кровь, плазму, сыворотку, мочу, слюну и образцы ткани. Например, плодные нуклеиновые кислоты обнаруживали в моче беременных женщин. Моча реципиентов трансплантации почек, как было показано, содержит бесклеточные нуклеиновые кислоты и клетки из трансплантированного органа. В разнообразных условиях наблюдался микрохимеризм. Микрохимеризм относится к присутствию источника клеток или нуклеиновых кислот другого индивидуума в организме, включая органы и ткани конкретного индивидуума. Микрохимеризм наблюдался в биоптатах тканей щитовидной железы, печени, селезенки, кожи, костного мозга и других тканей. Микрохимеризм может возникать в результате предыдущих беременностей или переливания крови.

Также предложено применение гена для диагностики связанного с беременностью расстройства у субъекта - беременной женщины. Уровень экспрессии указанного гена сравнивают с контрольным значением, определенным по одной или нескольким другим субъектам-женщинам, каждая из которых беременна здоровым плодом. Связанные с беременностью нарушения согласно настоящему документу включают преэклампсию, внутриутробную задержку роста, инвазивную плацентацию и преждевременные роды. Другие связанные с беременностью нарушения могут представлять собой состояния, обуславливающие риск гибели плода, такие как гемолитическая болезнь новорожденных, плацентарная недостаточность, водянка плода, пороки развития плода. Также другие связанные с беременностью заболевания могут быть представлены состояниями, приводящими к осложнениям во время беременности, такими как синдром HELLP, системная красная волчанка и другие иммунологические заболевания матери.

Таким образом, предложен способ диагностики связанного с беременностью нарушения с применением образца, полученного от беременной плодом женщины, где связанное с беременностью нарушение является нарушением, характеризующимся аномальным относительным уровнем экспрессии генов в ткани матери или плода и не характеризуется хромосомными аномалиями плода, причем указанный способ включает:

получение совокупности ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца, причем образец содержит смесь молекул РНК материнского и плодного происхождения;

идентификацию с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности;

идентификацию одного или большего количества информативных локусов, где локус считается информативным, когда он гомозиготен у первого субъекта по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у второго субъекта по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю, где первый субъект представляет собой беременную женщину или плод, и второй объект представляет собой плод или беременную женщину соответственно, и где информативный локус может быть идентифицирован либо как специфичный для матери, либо как специфичный для плода;

выбор среди указанных идентифицированных информативных локусов определенных информативных локусов в соответствии со следующими критериями:

локусы расположены внутри экспрессируемой области референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, где первое заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, где второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

для каждого из выбранных информативных локусов:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление первой суммы, представляющей собой сумму указанных первых чисел, и второй суммы, представляющей собой сумму указанных вторых чисел;

вычисление отношения, используя первую сумму и вторую сумму,

сравнение указанного отношения с пороговым значением, определенным так, как раскрыто в описании, для определения того, имеется ли у плода, беременной женщины или при беременности связанное с беременностью нарушение, при этом указанное пороговое значение определяют по одному или большему количеству образцов, полученных от беременных женщин, не имеющих связанного с беременностью нарушения.

Согласно данному способу указанный образец беременной женщины может представлять собой образец плазмы крови, второй субъект может представлять собой беременную женщину или плод.

Вычисление отношения первой суммы и второй суммы может включать деление второй суммы на сумму первой суммы и второй суммы.

Анализ молекул РНК, полученных из образца, может включать секвенирование указанных молекул РНК или их кДНК-копий или проведение цифровой ПЦР.

Идентификация положений ридов в референсной последовательности может включать выравнивание указанных ридов с референсной последовательностью.

Первое заранее определенное число ридов может составлять 1, и второе заранее определенное число ридов может составлять 1.

Способ может дополнительно включать секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа беременной женщины в каждом информативном локусе.

Также дополнительно он может включать секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы, для определения генотипа плода в каждом информативном локусе.

Наконец, способ может дополнительно включать оценку в образце части РНК материнского или плодного происхождения, где указанная часть представлена отношением, умноженным на общий уровень экспрессии в выбранных информативных локусах относительно экспрессии вторых аллелей у второго субъекта.

Также предложен способ определения в образце, полученном от беременной плодом женщины, части РНК плодного происхождения, причем указанный способ включает:

получение совокупности ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца, причем образец содержит смесь молекул РНК материнского и плодного происхождения;

идентификация с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности, где референсная последовательность представляет собой последовательность генома;

идентификацию одного или большего количества информативных материнских локусов, где локус считается информативным, когда он гомозиготен у плода по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у беременной женщины по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю;

выбор среди указанных идентифицированных информативных материнских локусов определенных информативных локусов в соответствии со следующими критериями:

локусы расположены внутри экспрессируемой области референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, где первое заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования, и

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, где второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

для каждого из выбранных информативных материнских локусов:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном материнском локусе и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном материнском локусе и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление суммы указанного первого числа и указанного второго числа, вычисление материнского отношения как второго числа, разделенного на сумму,

определение общей экспрессии в выбранном информативном материнском локусе относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у беременной женщины,

умножение материнского отношения на общую экспрессию в выбранном информативном материнском локусе относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у беременной женщины для получения материнского вклада,

вычисление плодного вклада посредством вычитания материнского вклада из единицы,

определение в образце части РНК, происходящей от плода, отличающееся тем, что указанная часть представляет собой среднее значение плодных вкладов для выбранных информативных материнских локусов.

Причем указанное среднее значение может быть взвешенным по суммам для выбранных информативных материнских локусов, а указанная общая экспрессия в выбранном информативном материнском локусе относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у беременной женщины может быть равна 2 для выбранного информативного материнского локуса.

Указанный образец беременной женщины может представлять собой образец плазмы крови.

Анализ молекул РНК, полученных из образца, может включать секвенирование указанных молекул РНК или их кДНК-копий или проведение цифровой ПЦР.

Идентификация положений ридов в референсной последовательности согласно этому способу также может включать выравнивание указанных ридов с референсной последовательностью.

Первое заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных материнских локусов может составлять 1, и второе заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных материнских локусов может составлять 1.

Дополнительно данный способ также может включать секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа беременной женщины в каждом из информативных материнских локусов или секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы, для определения генотипа плода в каждом из информативных материнских локусов.

Кроме того, способ может дополнительно включать

идентификацию одного или большего количества информативных локусов плода, каждый из которых гомозиготен у беременной женщины по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у плода по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю;

выбор одного или большего количества информативных локусов плода для идентификации одного или большего количества выбранных информативных локусов плода:

которые расположены внутри экспрессируемой области референсной последовательности,

в которых расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов из совокупности ридов, содержащих соответствующий первый аллель, и

в которых расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов из совокупности ридов, содержащих соответствующий второй аллель,

для каждого из выбранных информативных локусов плода:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе плода и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе плода и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление суммы указанного первого числа и указанного второго числа, вычисление отношения для плода как второго числа, разделенного на сумму,

определение общей экспрессии в выбранном информативном локусе плода относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у плода;

умножение плодного отношения на общую экспрессию в выбранном информативном локусе плода относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у плода для получения плодного вклада,

определение в образце части РНК, происходящей от плода, отличающееся тем, что указанная часть представляет собой среднее значение плодного вклада для выбранных информативных материнских локусов и выбранных информативных локусов плода.

В этом случае указанное среднее значение также может быть взвешенным по суммам для выбранных информативных материнских локусов и выбранных информативных локусов плода.

В данном способе можно предположить, что указанная общая экспрессия в выбранном информативном локусе плода относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у плода равна 2 для выбранного информативного локуса плода.

Первое заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных локусов плода может составлять 1 и второе заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных локусов плода может составлять 1 в данном способе.

Кроме того, этот способ может дополнительно включать секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа указанной беременной женщины в каждом информативном локусе плода или секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы для определения генотипа плода в каждом информативном локусе плода, либо диагностирование связанного с беременностью нарушения путем сравнения части РНК в образце, происходящей от плода, с пороговым значением.

Другим предложенным способом является способ определения того, является ли геномный локус материнским или плодным маркером связанного с беременностью нарушения, путем анализа образца, полученного от беременной плодом женщины, где связанное с беременностью нарушение является нарушением, характеризующимся аномальным относительным уровнем экспрессии генов в ткани матери или плода и не характеризуются хромосомными аномалиями плода, причем указанный способ включает:

получение совокупности ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца, причем образец содержит смесь молекул РНК, материнского и плодного происхождения;

идентификацию с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности;

идентификацию одного или большего количества информативных локусов, где локус считается информативным, когда он гомозиготен у первого субъекта по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у второго субъекта по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю, при этом первый субъект представляет собой беременную женщину или плод и второй субъект представляет собой плод или беременную женщину, и соответственно где информативный локус может быть

идентифицирован как специфичный для матери или как специфичный для плода;

выбор среди указанных идентифицированных информативных локусов определенных информативных локусов в соответствии со следующими критериями:

локусы расположены внутри экспрессируемой области референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, где первое заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования, и

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, где второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

для каждого из выбранных информативных локусов:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление отношения указанного первого числа и указанного второго числа,

идентификацию выбранного информативного локуса как маркера второго субъекта, если указанное отношение превышает пороговое значение, определенное так, как раскрыто в описании.

Здесь также указанный образец беременной женщины может представлять собой образец плазмы крови, второй субъект - беременную женщину или плод, а вычисление отношения указанного первого числа и указанного второго числа может включать деление второго числа на сумму указанного первого числа и указанного второго числа.

Пороговое значение согласно этому способу составляет от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,5, более предпочтительно указанное пороговое значение составляет 0,4.

Анализ молекул РНК, полученных из образца, может, как в других способах, описанных выше, включать секвенирование указанных молекул РНК или их кДНК-копий или проведение цифровой ПЦР.

Идентификация положений ридов в референсной последовательности может включать выравнивание указанных ридов с референсной последовательностью.

Первое заранее определенное число ридов и второе заранее определенное число ридов согласно данному способу также могут составлять 1.

Данный способ дополнительно может включать секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа указанной беременной женщины в каждом информативном локусе или секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы для определения генотипа плода в каждом информативном локусе, либо включать диагностирование связанного с беременностью нарушения на основании того, определен ли выбранный информативный локус как маркер второго субъекта, либо предусматривать определение в РНК из образца, содержащей выбранный информативный локус, части РНК, происходящей от второго субъекта, в котором указанную часть определяют путем умножения указанного отношения на общий уровень экспрессии в выбранных информативных локусах относительно экспрессии вторых аллелей у второго субъекта.

Общий уровень экспрессии в выбранном информативном локусе плода относительно экспрессии второго аллеля у второго субъекта может быть равен 2.

Способ может дополнительно включать определение части РНК, происходящей от первого субъекта, путем вычитания части РНК, происходящей от второго субъекта, из 1.

Еще одним предложенным объектом изобретения является применение способа сравнения уровня экспрессии гена из списка, приведенного на фиг. 26, и контрольного значения, определенного по одной или нескольким другим женщинам, каждая из которых беременна здоровым плодом, для диагностики связанного с беременностью нарушения у женщины, беременной плодом, где связанное с беременностью нарушение является преэклампсией, характеризующейся аномальным относительным уровнем экспрессии указанного гена в ткани матери или плода.

Согласно применению указанное связанное с беременностью нарушение диагностируют в том случае, если уровень экспрессии превышает контрольное значение или если уровень экспрессии ниже контрольного значения. Причем у женщины может наблюдаться повышенный уровень экспрессии указанного гена при беременности по сравнению с уровнем после родов.

Уровень экспрессии указанного гена у женщины может быть измерен путем получения образца плазмы крови от указанной женщины,

получения совокупности ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца;

идентификации с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности;

подсчета ридов, расположенных в указанном гене.

Следующим объектом настоящего изобретения является система, содержащая один или боль-

шее количество процессоров, обеспечивающих возможность осуществления любого из описанных выше способов.

Наконец, согласно настоящему изобретению предложен компьютерный продукт, содержащий машиночитаемый носитель, где хранится совокупность инструкций для управления процессором для осуществления операции согласно любому из описанных выше способов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана положительная взаимосвязь аллельного отношения B/A и относительных уровней экспрессии соответствующих генов в плаценте и клетках материнской крови.

На фиг. 2 показана взаимосвязь общего уровня генной экспрессии и относительных уровней экспрессии генов в плаценте и клетках материнской крови.

На фиг. 3 в графическом виде представлены способы диагностики связанного с беременностью нарушения.

На фиг. 4 и 5 показаны обобщенные результаты выравнивания ридов, полученных при секвенировании РНК.

На фиг. 6 представлены данные секвенирования РНК из плазмы крови для двух индивидуумов. На фиг. 6A представлено процентное распределение GC в ридах последовательностей при секвенировании РНК-библиотек M9356P (с предварительной обработкой Ribo-Zero Gold) и M9415P (без предварительной обработки Ribo-Zero Gold). На фиг. 6B показана корреляция профилей генной экспрессии M9356P и M9415P.

На фиг. 7 показаны аллельные отношения РНК-SNP и зависимость общих концентраций разных РНК-транскриптов в материнской плазме от относительных уровней экспрессии в тканях (плацента/клетки крови).

На фиг. 8 показаны аллельные отношения РНК-SNP и зависимость общих уровней в плазме разных генов, содержащих информативные SNP, от относительного уровня экспрессии в тканях (клетки крови/плацента).

На фиг. 9 показаны аллельные отношения РНК-SNP для специфических плодных аллелей SNP и приведены уровни экспрессии РНК-транскриптов, содержащих указанные аллели, в материнской плазме.

На фиг. 10 показаны аллельные отношения РНК-SNP, для специфических материнских аллелей SNP приведены уровни экспрессии РНК-транскриптов, содержащих указанные аллели, в материнской плазме.

На фиг. 11 представлены данные для специфических материнских аллелей SNP у субъектов с преэклампсией и контрольных субъектов. На фиг. 11A показаны аллельные отношения РНК-SNP для случая 5641 (преэклампсия в третьем триместре с поздним началом) и случая 7171 (контроль) для информативных SNP, содержащих специфические материнские аллели SNP. На фиг. 11B приведена кратность различия аллельных отношений и уровней в плазме РНК-SNP для случая 5641 и случая 7171 (контроль) для информативных SNP, содержащих специфические материнские аллели SNP.

На фиг. 12 представлены данные для специфических материнских аллелей SNP у субъектов с преэклампсией и контрольных субъектов. На фиг. 12A показаны аллельные отношения РНК-SNP для случая 5641 (преэклампсия в третьем триместре с поздним началом) и случая 9356 (контроль) для информативных SNP, содержащих специфические материнские аллели SNP. На фиг. 12B приведена кратность различия аллельных отношений и уровней в плазме РНК-SNP для случая 5641 и случая 9356 для информативных SNP, содержащих специфические материнские аллели SNP.

На фиг. 13 представлены данные фиг. 11 в форме таблицы.

На фиг. 14 представлены данные фиг. 12 в форме таблицы.

На фиг. 15 в графическом виде представлены способы определения в образце, полученном от субъекта - беременной плодом женщины, происходящей от плода части РНК.

На фиг. 16 показаны результаты анализа информативных SNP транскриптома материнской плазмы.

На фиг. 17 представлены относительные вклады плода и матери без отбора по аллелеспецифической экспрессии в образцах материнской плазмы на поздних сроках беременности.

На фиг. 18 представлены вклады плода и матери в транскриптом материнской плазмы. На фиг. 18A показаны доли транскриптов плодного и материнского происхождения в материнской плазме на ранних и поздних сроках беременности. На фиг. 18B приведены подсчитанное количество аллелей и доля плодных аллелей до и после родов.

На фиг. 19 приведено сравнение удельных вкладов плода и матери по одному РНК-SNP для случая беременности с преэклампсией и контрольного случая беременности.

На фиг. 20 в графическом виде представлены способы определения геномного локуса как материнского или плодного маркера.

На фиг. 21 приведен список связанных с беременностью генов.

На фиг. 22 показаны более низкие уровни экспрессии связанных с беременностью генов у субъектов после родов по сравнению с дородовым периодом.

На фиг. 23 показана иерархическая кластеризация образцов плазмы с использованием 131 связанного с беременностью гена.

На фиг. 24 показаны уровни экспрессии 131 связанного с беременностью гена в плаценте, клетках материнской крови и материнской плазме. На фиг. 24A представлена карта интенсивности генной экспрессии (log_2(уровень транскрипции)) для плаценты и клеток материнской крови, а также дородовой и послеродовой материнской плазмы в двух случаях беременности на позднем сроке. Указанный 131 связанный с беременностью ген преимущественно экспрессировался в плаценте. На фиг. 24B показано, что уровни экспрессии указанного 131 гена в плаценте и в плазме положительно коррелировали ($P<0,05$, корреляция Спирмена).

На фиг. 25 приведено сравнение вкладов плода и матери в РНК в плазме для генов, идентифицированных способами на основе плазмы и на основе тканей.

На фиг. 26 приведен список 98 связанных с преэклампсией РНК материнской плазмы, идентифицированных с помощью RNA-Seq. Показаны уровни экспрессии в плазме, полученной от беременных женщин, не имевших осложнений, и женщин, у которых развивалась преэклампсия.

На фиг. 27 приведены значения количества ридов при секвенировании РНК в сайтах однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) РНК PAPPA для случая 9415. Аллель A - общий аллель, а аллель G является специфическим для плода аллелем.

На фиг. 28 приведены значения количества ридов при секвенировании РНК на сайтах однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) РНК H19 для случая 9415.

На фиг. 29 показано определение статуса метилирования материнского H19 с применением чувствительного к метилированию ферментативного расщепления.

На фиг. 30 приведена блок-диаграмма примера компьютерной системы 3000, подходящей для применения с системе и способах, соответствующих вариантам реализации настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

I. Введение.

Присутствие бесклеточной плодной РНК в материнской плазме было описано более десяти лет назад. После указанного открытия было проведено множество исследований для детекции циркулирующих РНК плодного и плацентарного происхождения в материнской плазме. Интересно, что уровни экспрессии специфических для плаценты транскриптов в плазме, как было обнаружено, положительно коррелируют с указанными уровнями в плацентарных тканях, что подчеркивает клиническую значимость анализа РНК плазмы как неинвазивного инструмента для мониторинга состояния здоровья и развития плаценты или плода. Так, исследование материнской циркулирующей РНК нашло клиническое применение при связанных с беременностью или плацентой нарушениях, таких как преэклампсия, внутриутробная задержка роста и преждевременные роды, а также для неинвазивного тестирования хромосомных анеуплоидий плода. Такие разработки подчеркивают потенциальную полезность РНК-биомаркеров для молекулярной оценки пренатальных расстройств.

Несмотря на многообещающие перспективы анализа РНК плазмы для пренатального тестирования, к настоящему времени число надежно подтвержденных связанных с беременностью или с плацентой транскриптов в материнской плазме все еще ограничено. В связи с этим было проведено исследование РНК-биомаркеров в плазме с применением ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ), чувствительного метода, обычно нацеленного на относительно малое число видов РНК на один анализ. Примечательно, что указанные исследования в основном сфокусированы на генах, уровни экспрессии которых относительно высоки в плаценте по сравнению с клетками материнской крови, исходя из того, что связанные с беременностью гены в основном происходят из плаценты. Такие подходы обеспечили выявление связанных с беременностью целевых РНК с высокими уровнями экспрессии в плаценте, но, возможно, другие важные мишени были упущены. Кроме того, учитывая низкие концентрации и низкую устойчивость РНК плазмы [9, 15], стандартные высокопроизводительные способы, такие как серийный анализ экспрессии генов и микроматричный анализ, не являются надежными способами прямого исследования транскриптома плазмы.

Указанные технические ограничения при анализе РНК плазмы потенциально могут быть преодолены за счет использования массивного параллельного секвенирования (МПС) для анализа РНК, а именно секвенирования РНК (РНК-seq). За счет повышенной чувствительности и широкого динамического диапазона РНК-seq применяется для исследования генной экспрессии во многих тканях человека, включая плаценту [19]. Преимущество МПС также было подтверждено его применимостью при прямом профилировании микроРНК плазмы здоровых индивидуумов и беременных женщин. Тем не менее, полный спектр транскриптома плазмы все еще не определен, возможно, ввиду меньшей стабильности в плазме длинных РНК по сравнению с короткими микроРНК.

В настоящем исследовании авторы показали, что в материнской плазме можно определить транскрипты плодного и материнского происхождения и что их относительные вклады могут быть оценены с применением РНК-seq, путем исследования специфических плодных и материнских однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Кроме того, по материнской плазме может проводиться мониторинг паттернов аллелеспецифической экспрессии в плаценте. Авторы также продемонстрировали, что связанные с беременностью транскрипты могут быть идентифицированы путем непосредственного исследования материнской плазмы до и после родов.

II. Способ диагностики связанного с беременностью нарушения с применением отношений аллелей SNP.

Анализ профиля генной экспрессии подходит для применения при определении статуса заболевания индивидуума. Варианты реализации настоящего изобретения включают способы анализа профиля экспрессии индивидуума путем анализа смеси молекул РНК от двух разных индивидуумов. В указанных способах используется относительная распространенность аллелей, специфических для одного индивидуума, и аллелей, общих для двух индивидуумов. На основании относительных распространенностей указанных общих и специфических для индивидуума аллелей может быть определен профиль генной экспрессии указанных двух индивидуумов. Одним из возможных применений предложенных способов является анализ профиля генной экспрессии плода путем анализа РНК в образце материнской плазмы, который содержит РНК как плода, так и беременной женщины. Другое применение представлено анализом профиля генной экспрессии происходящей от донора РНК в образце плазмы, полученном от реципиента трансплантации, содержащего РНК как донора, так и указанного реципиента.

В смеси, содержащей РНК от двух индивидуумов, профиль экспрессии каждого индивидуума не может быть определен на основании анализа общего количества разных РНК-транскриптов в смеси, поскольку сложно определить относительные вклады каждого индивидуума в тотальную РНК. Относительная распространенность разных РНК-транскриптов может быть использована для мониторинга состояния здоровья индивидуума или для определения болезненного состояния.

Согласно настоящему способу генотип указанных двух индивидуумов может сначала быть определен путем прямого генотипирования указанных индивидуумов или путем семейного анализа. Например, если генотипы родителей - AA и TT, у плода будет генотипа AT.

Следующий гипотетический пример иллюстрирует принцип указанного способа. Для каждого из представляющих интерес генов в составе кодирующей области имеется SNP, так что полиморфизм может наблюдаться в РНК-транскриптах разных генов. Допустим, что генотипы плода и беременной женщины - AB и AA соответственно. Соответственно аллель B будет специфическим для плода, а аллель A будет общим для плода и матери. Относительные уровни экспрессии разных генов в плаценте и клетках материнской крови соответствуют приведенным в табл. 1.

В данном примере авторы допустили, что плацента и клетки материнской крови вносят вклад в материнскую плазму в относительно равной пропорции, составляющей 2% от каждого из их РНК-транскриптов. Иными словами, если в плаценте уровень экспрессии гена составляет 10000, вклад в материнскую плазму составит 200 РНК-транскриптов указанного гена. Как видно из фиг. 1, наблюдается хорошо выраженная положительная взаимосвязь аллельного отношения B/A с относительными уровнями экспрессии соответствующих генов в плаценте и клетках материнской крови. Напротив, на общий уровень генной экспрессии влияют флуктуации экспрессии в клетках материнской крови, поэтому он хуже коррелирует с экспрессией в плаценте (фиг. 2).

Таблица 1

Ген	Материнский генотип	Плодный генотип	Относительный уровень экспрессии		Относительная экспрессия (плацента /клетки материнской крови)	Материнская плазма				
			в клетках материнской крови	в плаценте		Относительная распространенность материнской/ плодной РНК	Общая концентрация РНК	Концентрация РНК с аллелем A	Концентрация РНК с аллелем B	Отношение B/A
1	AA	AB	8000	20000	2,5	1:1	560	360	200	0,56
2	AA	AB	6000	10000	1,67	1:1	320	220	100	0,45
3	AA	AB	10000	5000	0,5	1:1	300	250	50	0,2
4	AA	AB	14000	1000	0,071	1:1	300	290	10	0,03

Другое преимущество применения анализа аллельных отношений заключается в том, что уровень экспрессии конкретного гена в плаценте нормируют по уровню экспрессии клеток материнской крови. Поскольку уровень экспрессии может значительно варьировать для разных генов и разных образцов, указанная нормировка делает сравнение разных генов более надежным и позволяет избежать необходимости сравнения в референсным геном, например геном "домашнего хозяйства". Иными словами, при стандартном анализе генной экспрессии уровень экспрессии гена в образце либо измеряют, соотнося с геном "домашнего хозяйства", либо выражают в виде доли тотальной РНК в образце. Для идентификации аберрантной генной экспрессии затем обычно сравнивают указанные относительные значения для тестируемого образца со значениями для контрольных образцов.

В настоящем описании изобретения авторами предложен новый подход, где в качестве способа определения профиля генной экспрессии используются относительные количества, внесенные плодом в

образец, нормированные по вкладу матери по тому же самому гену. При патологических состояниях, например преэклампсии, преждевременных родах, таких заболеваниях матери как системная красная волчанка, при которых экспрессия указанного гена в плаценте или материнских органах изменена, отношение плод/мать для указанного гена будет изменено по сравнению с беременностями без таких патологических состояний. Указанный подход может быть реализован с применением специфического плодного аллеля SNP относительно общего аллеля в РНК-транскриптах материнской плазмы.

Указанный подход может также быть реализован с использованием отношения специфического материнского аллеля SNP и общих аллелей в РНК-транскриптах из материнской плазмы. Патологические состояния могут быть идентифицированы в том случае, если одно или большее количество таких аллельных отношений для одного или большего количества генных РНК-транскриптов изменены по сравнению с ожидаемыми для непатологического состояния. Паттерн таких аллельных отношений в генном локусе или нескольких генных локусах может использоваться для идентификации патологических состояний. Непатологические состояния могут быть представлены аллельными отношениями при нормальных беременностях, в образцах, полученных до или после тестирования, когда на беременность больше не влияет патологическое состояние, или имеющимися данными, ранее полученными для нормальных беременностей, т.е. ранее полученным референсным диапазоном.

Связанные с беременностью нарушения, которые могут быть диагностированы с применением предложенных способов, включают любые нарушения, характеризующиеся аномальными относительными уровнями экспрессии генов в материнской и плодной ткани. Указанные нарушения включают, не ограничиваясь перечисленными, преэклампсию, внутриутробную задержку роста, инвазивную плацентацию, преждевременные роды, гемолитическую болезнь новорожденного, плацентарную недостаточность, водянку плода, пороки развития плода, синдром HELLP, системную красную волчанку и другие иммунологические заболевания матери. Указанные способы позволяют различать молекулы РНК, вносимые матерью и плодом, в образце, который содержит смесь таких молекул. Соответственно указанные способы позволяют идентифицировать изменения вклада одного индивидуума (т.е. матери или плода) в указанную смесь в конкретном локусе или для конкретного гена, даже если вклад другого индивидуума не меняется или изменяется противоположным образом. Такие изменения невозможно легко определить при измерении общего уровня экспрессии указанного гена без учета происхождения из ткани или от индивидуума. Связанные с беременностью нарушения согласно обсуждению в настоящем описании изобретения не характеризуются хромосомными аномалиями плода, такими как анеуплоидия.

Предложенные способы могут также быть реализованы без предварительно полученной информации о генотипе плаценты. Например, генотип беременной женщины может быть определен посредством прямого генотипирования клеток ее крови. Затем может быть проведен анализ РНК-транскриптов образцов плазмы, например с помощью массивного параллельного секвенирования, но не ограничиваясь им. Могут быть идентифицированы РНК-транскрипты, в которых наблюдаются два разных аллеля. В указанном наборе транскриптов, в том случае, если мать гомозиготна, это будет указывать на гетерозиготность плода по специфическому плодному аллелю и материнскому аллелю. В указанном случае анализ аллельного отношения РНК может проводиться без предварительно полученной информации о генотипе плода (или плаценты). Кроме того, случаи, когда мать гетерозиготна, а плод гомозиготен, могут быть идентифицированы по отклонению от отношения 1:1. Более подробная информация о таких техниках приведена в патенте США 8467976.

А. Способ диагностики.

Способ 300 диагностики связанного с беременностью нарушения в соответствии с некоторыми варианты реализации представлен на фиг. 3. В указанном способе используется образец, полученный от субъекта - беременной плодом женщины. Указанный образец может быть получен из плазмы крови матери; он содержит смесь молекул РНК, происходящих от матери и от плода. Указанный образец может быть получен подходящим способом от субъекта-женщины на любом этапе беременности. Например, субъектами могут быть беременные женщины с одноплодной беременностью в первом, втором и третьем триместре. Беременные женщины в первом и втором триместре могут быть классифицированы как "случаи беременности на раннем сроке"; беременные женщины в третьем триместре могут быть классифицированы как "случаи беременности на позднем сроке". Согласно некоторым вариантам реализации образцы могут также собираться после рождения плода или от одного и того же субъекта до и после родов, и образцы от небеременных женщин могут использоваться в качестве контролей. Образцы могут быть получены в любое время после родов (например, 24 ч).

Указанный образец может быть получен из периферической крови. Образец материнской крови может быть обработан подходящим способом, например центрифугированием, для отделения клеток крови от плазмы. В образец крови или его части могут быть добавлены стабилизаторы, и образец может быть отправлен на хранение до использования. Согласно некоторым вариантам реализации также получают образцы плодной ткани, например ворсин хориона, амниотической жидкости или плацентарной ткани. Плодная ткань может использоваться для определения плодных генотипов согласно описанию ниже. Плодная ткань может быть получена до или после родов.

После получения образца РНК или ДНК может затем быть экстрагирована из клеток материнской

крови и плазмы, а также из любой плодной ткани, такой как образец плаценты. Образцы РНК плаценты и клеток крови могут быть предварительно обработаны, например, с применением набора Ribo-Zero Gold Kit (Epicentre) для удаления рибосомальной РНК (рРНК) перед получением библиотеки для секвенирования.

На этапе 301 указанного способа получают совокупность ридов. Указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца. Согласно различным вариантам реализации указанные риды могут быть получены путем секвенирования, цифровой ПЦР, ОТ-ПЦР и масс-спектрометрии. Хотя обсуждение сфокусировано на секвенировании, аспекты настоящего описания также применимы к другим методикам получения ридов. Например, цифровая ПЦР (включая микрожидкостную и капельную ПЦР) может обеспечить информацию о разных аллелях в конкретном локусе за счет применения зондов (включая праймеры), нацеленных на каждый аллель. Указанные зонды могут содержать метки, позволяющие отличать их друг от друга, например окрашивающие их в разные цвета. В ходе того же эксперимента или другого эксперимента (например, на отдельном слайде или чипе) зонды с разными метками могут быть нацелены на разные локусы. Обнаружение меток отражает присутствие и/или количество амплифицируемых молекул РНК или кДНК и соответствует ридам молекул РНК или кДНК при этом такие риды обеспечивают информацию относительно последовательности молекул РНК или кДНК в локусах, соответствующих зондам. Описание, включающее "риды секвенирования" в равной степени относится к ридам, полученным с применением любой подходящей техники, включая не задействующие секвенирование техники.

Секвенирование может осуществляться подходящим способом с применением любой доступной технологии. Примеры технологий и способов секвенирования нуклеиновых кислот включают массивное параллельное секвенирование, секвенирование нового поколения, полногеномное секвенирование, секвенирование экзома, секвенирование с обогащением или без обогащения по мишени, секвенирование синтезом (например, секвенирование амплификацией, клональная амплификация, мостиковую амплификацию, секвенирование с обратимыми терминаторами), секвенирование лигированием, секвенирование гибридизацией (например, секвенирование на микроматрицах), одномолекулярное секвенирование, секвенирование в реальном времени, нанопоровое секвенирование, пиросеквенирование, полупроводниковое секвенирование, масс-спектрометрическое секвенирование, секвенирование методом дробовика и секвенирование методом Сэнгера. Согласно некоторым вариантам реализации секвенирование осуществляется с применением массивно-параллельных техник на библиотеке кДНК, полученной из РНК в образце. Библиотеки кДНК могут быть синтезированы подходящим способом, например с применением набора для получения образцов мРНК mRNA-Seq Sample Preparation Kit (Illumina) согласно инструкциям производителя или с незначительными модификациями. Согласно некоторым вариантам реализации для этапа восстановления концов кДНК плазмы используют 5-кратно разведенный фрагмент ДНК-полимеразы Кленова. Наборы QIAquick PCR Purification Kit и QIAquick MinElute Kit (Qiagen) могут использоваться для очищения продуктов с восстановленными концами и анденилированных продуктов соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации для образцов кДНК плазмы используются 10-кратно разведенные адаптеры спаренных концов, или проводятся два раунда очищения для продуктов с лигированными адаптерами с применением гранул AMPure XP (Agencourt).

Библиотека кДНК может быть секвенирована с длиной прочтений 75 и.о. в формате спаренных концов на инструменте HiSeq 2000 (Illumina) или с применением других форматов или инструментов.

На этапе 302 определяют положение ридов в референсной последовательности. При использовании методик на основе ПЦР расположение может быть определено, например, по совпадению цветов детектируемой метки на зонде или праймере, с последовательностью, для которой является специфическим указанный зонд или праймер. При использовании техник секвенирования положение может быть определено по выравниванию рида последовательности с референсной последовательностью. Выравнивание последовательностей может осуществляться с применением компьютерной системы. Для предварительной обработки необработанных данных может использоваться любой биоинформационный алгоритм (например, удаление высокодуплицированных ридов и ридов низкого качества), выравнивание данных и/или нормирование данных. Уровни транскрипции РНК в клетках материнской крови, плацентарных тканях и материнской плазме могут быть рассчитаны как количество фрагментов на Кб на миллион экзонных ридов (FPKM). Для определения аллельных отношений могут осуществляться предварительная обработка и выравнивание данных, но нормирование данных не требуется. Для выравнивания может использоваться любая референсная последовательность (например, референсный геном человека hg19) и любой алгоритм.

Согласно одному примеру проведения этапов 301 и 302 после удаления дуплицированных ридов и ридов рРНК получали в среднем по 3 млн пригодных для анализа ридов для каждого образца плазмы небеременной женщины; получали в среднем по 12 млн пригодных для анализа ридов для каждого образца плазмы беременных женщин. Для РНК-seq тканей получали в среднем по 173 млн и 41 млн пригодных для анализа ридов на образец для плаценты и клеток крови соответственно. Статистические данные по выравниванию РНК-seq обобщены на фиг. 4 и 5. Содержание GC в ридах секвенирования также исследовали во всех образцах (фиг. 6А и табл. 2).

Таблица 2. Доля богатых GC ридов секвенирования в библиотеках РНК-seq

Тип образца	Образец	Обработка	Богатые GC риды (% необработанных ридов)[a]
Плазма	M9356P	Истощение рРНК	49,28%
	M9415P	Нет	0,00%
Плацента	N9356	Истощение рРНК	0,15%
Клетки крови	M9356W	Истощение рРНК	0,30%

A. Необработанные риды выравнивали по собранной de novo богатой GC последовательности с помощью BLAST (NCBI).

На этапе 303 идентифицируют один или большее количество информативных локусов. Указанный этап позволяет определять генотипы или делать выводы относительно генотипов субъекта-женщины и плода в локусах в составе генома и сравнивать указанные генотипы. Локус считают информативным, если он гомозиготен у первого субъекта по соответствующему первому аллелю (например, AA), и гетерозиготен у второго субъекта по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю (например, AB). Указанный первый субъект может представлять собой субъект - беременную женщину или плод, а указанный второй субъект представляет собой плод или беременную женщину соответственно. Иными словами, один индивидуум (либо мать, либо плод) гомозиготен, а другой индивидуум гетерозиготен по каждому информативному локусу.

Информативные локусы могут быть дополнительно классифицированы в соответствии с тем, какой индивидуум является гетерозиготным и единственным источником одного аллеля. Локус считают информативным материнским локусом, или, что то же самое, специфическим материнским (специфическим материнским) локусом, если плод гомозиготен, а беременная женщина гетерозиготна. Локус считают информативным локусом плода, или, что то же самое, специфическим для плода локусом, если беременная женщина гомозиготна, а плод гетерозиготен. На этапе 303 все идентифицированные информативные локусы являются либо специфическими для матери, либо специфическими для плода.

Информативный локус может быть представлен однонуклеотидным полиморфизмом, или "SNP", когда первый аллель и второй аллель отличаются единственным нуклеотидом. Информативный локус может быть представлен также короткой (коротким) вставкой или удалением, когда одного или большего количества нуклеотидов добавлены или удалены в одном аллеле относительно другого аллеля.

Согласно некоторым вариантам реализации генотип субъекта - беременной женщины в одном или большем количестве информативных локусов, или в каждом информативном локусе, определяют путем секвенирования геномной ДНК, полученной из материнской ткани. Указанная материнская ткань может быть представлена клетками материнской крови или любым другим видом ткани. Согласно некоторым вариантам реализации генотип плода в одном или большем количестве информативных локусов, или в каждом информативном локусе, определяют путем секвенирования геномной ДНК, полученной из плодной ткани, такой как плацента, ворсины хориона, амниотическая жидкость. Если предпочтителен менее инвазивный способ, плодная ДНК для секвенирования может также быть получена из образца материнской крови. Источником такой плодной ДНК может быть тот же образец, что и используемый для получения молекул РНК для секвенирования, или может использоваться другой образец. Следует иметь в виду, что информативные локусы плода могут быть идентифицированы без прямого генотипирования плода. Например, если определено, что субъект - беременная женщина гомозиготен по первому аллелю в одном локусе и секвенирование РНК указывает на присутствие второго аллеля в смеси материнской и плодной РНК, плод может считаться гетерозиготным в указанном локусе.

Согласно некоторым вариантам реализации и мать, и плод генотипируют с применением методов массивного параллельного секвенирования для идентификации информативных локусов. Секвенирование может осуществляться на обогащенных по экзому образцах геномной ДНК клеток крови матери и плаценты. Геномная ДНК может быть экстрагирована из плацентарных тканей и клеток материнской крови с использованием наборов QIAamp DNA Kit и QIAamp Blood Kit (оба от Qiagen) соответственно, с соблюдением инструкций производителя. Обогащение по экзому и получение библиотек для секвенирования может осуществляться с применением набора TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina) согласно протоколу производителя. Библиотеки могут быть секвенированы с длиной прочтений 75 п.о. в формате PE-секвенирования на инструменте HiSeq 2000 (Illumina).

На этапе 304 отбирают один или большее количество информативных локусов. В настоящем документе "отбор" означает выбор определенных информативных локусов из идентифицированных на этапе 303, для дальнейшего анализа. "Отобранный" информативный локус представляет собой локус, выбранный таким образом. Выбор может осуществляться на основании одного или нескольких критериев. Одним из таких критериев является то, где указанные информативные локусы расположены в геноме или на референсной последовательности. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительно анализи-

руют только локусы, расположенные в экзоне или экспрессируемой области референсной последовательности.

Другим критерием отбора является число ридов секвенирования, которые выравниваются с указанным локусом и содержат каждый аллель, из тех ридов, которые были получены на этапе 301 и выравнивались с референсной последовательностью на этапе 302. Согласно некоторым вариантам реализации с отобранным информативным локусом должно быть связано, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов секвенирования, содержащих первый аллель, и/или второе заранее определенное число ридов секвенирования, содержащих второй аллель. Указанное заранее заданное число может составлять 1, 2 или более, и может соответствовать требуемому качеству ридов или глубине секвенирования. В результате отбора идентифицируют один или большее количество отобранных информативных локусов.

Согласно некоторым вариантам реализации для отбора рассматривают только информативные локусы, представляющие SNP. Согласно одному из примеров реализации указанного способа исследовали приблизительно 1 млн SNP базы данных dbSNP NCBI, версия 135, все из которых расположены в экзонах, и идентифицировали информативные SNP из указанных 1 млн SNP с использованием материнского и плодного генотипов. Для иллюстрации информативных SNP, "A" задавали как общий аллель, а "B" - как специфический материнский или специфический плодный аллель. Информативные SNP включали SNP со специфическим материнским аллелем SNP, а именно, "AA" у плода и "AB" у матери в определенном локусе, и SNP со специфическим для плода аллелем SNP, а именно, "AA" у матери и "AB" у плода, в определенном локусе. Генотипы прогнозировали с применением собственного биоинформационного алгоритма. Для проведения отбора в анализ включали только информативные SNP, в которых и для аллеля "A", и для аллеля "B" имелся по меньшей мере один подсчитанный рид соответственно.

На этапах 305 и 306 подсчитывают риды секвенирования, выравнивающиеся с каждым отобранным информативным локусом, и сортируют их в зависимости от того, какой аллель они содержат. Для каждого отобранного информативного локуса определяют два числа: первое число, которое представляет собой число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом и содержащих соответствующий первый аллель (т.е. общий аллель); и второе число, которое представляет собой число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом и содержащих соответствующий второй аллель (т.е. специфический материнский или специфический плодный аллель). Указанные первое число и второе число могут быть вычислены подходящим способом. Указанное первое число плюс указанное второе число для каждого локуса дают общее число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом. Отношение указанного первого числа и указанного второго числа для конкретного отобранного информативного локуса может называться "аллельным отношением".

На этапах 307 и 308 суммируют число первых аллелей и вторых аллелей во всех отобранных информативных локусах. На этапе 307 вычисляют первую сумму первых чисел. Первая сумма отражает общее число ридов секвенирования, содержащих соответствующие первые аллели (т.е. общие аллели) для отобранных информативных локусов. На этапе 308 вычисляют вторую сумму вторых чисел. Вторая сумма отражает общее число ридов секвенирования, содержащих соответствующие вторые аллели (т.е. специфические материнские или специфические плодные аллели) для отобранных информативных локусов. Указанные суммы могут быть вычислены подходящим способом с применением всех отобранных информативных локусов, идентифицированных на этапе 304, или их подсовокупности. Согласно некоторым вариантам реализации указанные суммы взвешивают, что может включать масштабирование сумм. Например, вклады в указанные суммы локусов из определенной хромосомы могут быть масштабированы, с уменьшением или увеличением, путем умножения первых чисел и вторых чисел для указанных локусов на скаляр.

На этапе 309 вычисляют отношение первой суммы и второй суммы. Указанное отношение отражает относительное число ридов секвенирования для первых аллелей и вторых аллелей, объединенных по отобранным информативным локусам. Согласно некоторым вариантам реализации указанное отношение рассчитывают просто делением первой суммы на вторую сумму. Такой расчет дает число ридов секвенирования для общих аллелей в виде множества ридов секвенирования для специфических материнских или специфических плодных аллелей. Как вариант, указанное отношение может быть рассчитано путем деления второй суммы на сумму указанных первой суммы и второй суммы. В этом случае указанное отношение дает число ридов секвенирования для специфических материнских или специфических плодных аллелей в виде доли от всех ридов секвенирования. Другие способы вычисления указанного отношения будут очевидны для специалиста в данной области техники. Указанные первая сумма и вторая сумма, на основании которых вычисляют указанное отношение, могут использоваться в качестве замены присутствующих в образце количеств РНК (т.е. транскриптов), которые происходят из общих и специфических аллелей, для отобранных информативных локусов.

На этапе 310 вычисленное на этапе 309 отношение сравнивают с пороговым значением для определения того, имеется ли у плода и/или беременной женщины связанное с беременностью нарушение. Согласно различным вариантам реализации пороговое значение может быть определено по одному или большему количеству образцов, полученных от беременных женщин, у которых отсутствует связанное с

беременностью нарушение (т.е. от контрольных субъектов) и/или определено по одному или большему количеству образцов, полученных от беременных женщин, у которых имеется связанное с беременностью нарушение. Согласно некоторым вариантам реализации пороговое значение определяют путем реализации того же способа согласно приведенному выше описанию на образцах от контрольных субъектов и исследования того же или перекрывающего набора отобранных информативных локусов. Пороговое значение может быть установлено как значение между ожидаемыми значениями для беременностей без нарушения и ожидаемыми значениями для беременностей с нарушением. Пороговое значение может быть основано на статистическом отличии от нормального значения.

Согласно некоторым вариантам реализации для отношения, вычисляемого для беременной женщины (согласно этапу 309), используются отобранные информативные локусы из определенного набора генов, и отношение (а именно, пороговое значение) вычисляют для контрольных субъектов с применением отобранных информативных локусов в генах, некоторые или все из которых совпадают. Если вычисленное отношение для беременной женщины основано на специфических материнских аллелях, тогда вычисленное пороговое значение для контрольных субъектов может также быть основано на специфических материнских аллелях. Аналогичным образом и отношение, и пороговое значение могут быть основаны на специфических плодных аллелях.

Сравнение отношения с пороговым значением может осуществляться подходящим способом. Например, нарушение может диагностироваться в том случае, когда указанное отношение превышает пороговое значение или меньше порогового значения, на любую величину или на величину, превышающую определенный предел. Сравнение может включать вычисление разности или вычисление другого отношения между отношением для беременной женщины и пороговым значением. Согласно некоторым вариантам реализации сравнение включает оценку того, имеется ли значимое различие относительных уровней экспрессии общих и не являющихся общими аллелей для определенных генов у беременной женщины и контрольных субъектов.

При необходимости указанный способ может также применяться для оценки в образце части РНК, имеющей материнское или плодное происхождение. Указанную оценку получают путем умножения отношения, рассчитанного на этапе 309, на скаляр. Указанный скаляр отражает общий уровень экспрессии в отобранных информативных локусах относительно экспрессии вторых аллелей у гетерозиготного индивидуума.

Следующий пример иллюстрирует применение указанного скаляра. В том случае, если вторые аллели, подсчитанные указанным способом, являются специфическими для плода, отношение, рассчитанное на этапе 309, может давать число ридов секвенирования для специфических плодных аллелей, представленное в виде доли от всех ридов секвенирования для отобранных информативных локусов. Среди ридов секвенирования, содержащих общий аллель, некоторые внесены матерью и некоторые внесены плодом.

Если относительные уровни экспрессии специфических плодных и общих аллелей у плода известны, или могут быть оценены, отношение может быть масштабировано для получения оценки удельного вклада плода во все риды секвенирования для отобранных информативных локусов.

Согласно некоторым вариантам реализации плодные и общие аллели экспрессируются симметрично в большинстве локусов, и скаляру присваивается значение, близкое к 2. Согласно другим вариантам реализации указанный скаляр не равен 2 и учитывает асимметричную генную экспрессию [24]. Относительный материнский вклад в риды секвенирования в таком случае получают вычитанием относительного вклада плода из единицы. Аналогичные расчеты могут быть выполнены в случае, если вторые аллели в отобранных информативных локусах являются специфическими для матери.

В. Примеры.

1. Корреляция аллельных отношений и концентраций в плазме.

Анализировали профиль экспрессии образца материнской плазмы (срок гестации 37 2/7) и сравнивали с соответствующими образцами плаценты и клеток материнской крови у беременной женщины. Массивное параллельное секвенирование РНК осуществляли для каждого из указанных образцов с применением инструмента Illumina HiSeq 2000. Плаценту и клетки материнской крови генотипировали с применением секвенирования экзома массивно-параллельным методом. Авторы исследовали приблизительно 1 млн SNP из базы dbSNP NCBI, верс. 135, расположенных в экзонах, и классифицировали информативные SNP, по которым мать гомозиготна (генотип AA), а плод гетерозиготен (генотип AB). Соответственно аллель A будет представлять собой аллель, общий для матери и плода, и аллель B является специфическим для плода.

Сопоставляют аллельные отношения РНК-SNP и общие концентрации разных РНК-транскриптов в материнской плазме с относительными тканевыми уровнями экспрессии (плацента/клетки крови) (фиг. 7). Авторы наблюдали, что аллельное отношение РНК-SNP в плазме хорошо коррелирует с относительным тканевым уровнем экспрессии (коэффициент Спирмена R=0,9731679, $P=1{,}126\times10^{-9}$). Однако общий уровень в плазме не коррелировал с тканевой экспрессией (коэффициент Спирмена R= -0,7285714, P=0,002927).

Помимо анализа экспрессии у плода указанный способ может также применяться для профилиро-

вания экспрессии у матери. В указанных обстоятельствах могут использоваться информативные SNP, по которым мать гетерозиготна (генотип AB), а плод гомозиготен (генотип AA). В таком случае аллельное отношение РНК-SNP может быть рассчитано путем деления подсчитанного количества специфических материнских аллелей на подсчитанное количество общего аллеля. На фиг. 8 представлена зависимость аллельных отношений РНК-SNP и общих уровней в плазме разных генов, содержащих информативные SNP, и относительного уровня тканевой экспрессии (клетки крови/плацента). Авторы наблюдали выраженную положительную связь уровня тканевой экспрессии и аллельного отношения РНК-SNP в материнской плазме (коэффициент Спирмена R=0,9386, $P<2,2\times10^{-16}$), но не общих уровней транскрипции в плазме (коэффициент Спирмена R=0,0574, P=0,7431).

РНК-транскрипты, аллельные отношения содержащихся в них РНК-SNP и уровни в плазме представлены в таблицах на фиг. 9 и 10.

2. Сравнение аллельного отношения РНК-SNP в материнской плазме для случаев беременности с преэклампсией и контрольных случаев.

Для двух случаев с субъектами - беременными женщинами получали в среднем 117901334 необработанных фрагментов (табл. 3A). Аллельное отношение РНК-SNP подсовокупности циркулирующих транскриптов, несущих специфические материнские аллели SNP, сравнивали для случая преэклампсии с поздним началом в третьем триместре (PET), 5641, и соответствующего ему по гестационному сроку контрольного случая, 7171. Как видно из фиг. 11A, аллельные отношения РНК-SNP для указанных транскриптов отражают отличающиеся профили в случае PET и в контрольном случае. Важно, что профиль аллельных отношений РНК-SNP отличается от профиля уровней транскрипции в плазме, как видно из фиг. 11B. Это предполагает, что анализ аллельных отношений РНК-SNP в материнской плазме может использоваться в качестве дополнительного показателя для лучшей дифференциации случаев PET и нормальных беременностей. Число информативных транскриптов может быть дополнительно увеличено при увеличении числа информативных SNP, как показано на примере сравнения случая PET, 5641, и другого контрольного случая нормальной беременности, 9356 (фиг. 12A и B). Аллельные отношения РНК-SNP и уровень в плазме РНК-транскриптов, представленные на фиг. 11 и 12, приведены в форме таблицы на фиг. 13 и фиг. 14 соответственно.

Таблица 3A. Обобщенные результаты выравнивания ридов РНК-seq

Тип образца	Образец	Необработанные риды	Предварительно обработанные[a] риды	(%)[b]	Картируемые риды[c]	(%)[d]
Материнская плазма	5641 (Преэклампсия)	119 902 178	30 106 800	25,11%	4 001 376	13,29%
Материнская плазма	7171 (контроль)	115 900 490	29 160 920	25,16%	1 397 345	4,79%

a) оставшиеся риды после удаления часто повторяющихся ридов

b)% необработанных ридов

c) см. дополнительную табл. 2B с подробной расшифровкой

d) % предварительно обработанных ридов

Таблица 3B. Обобщенные результаты выравнивания ридов РНК-seq

Тип образца	Образец	Отобранные риды[a]	Пригодные для анализа риды[b]	Экзон (%)	Интрон (%)	Межгенная область (%)[c]
Материнская плазма	5641 (Преэклампсия)	2 579 163	1 422 213	44,87%	12,32%	42,80%
Материнская плазма	7171 (контроль)	790 735	606 610	37,69%	16,09%	46,22%

a) отобранные риды представляют в основном ядерные и митохондриальные рРНК и тРНК

b) пригодные для анализа риды = общее число картируемых ридов - отобранные риды

c) % ридов, выравнивающихся с областями вне экзонов и интронов референсных генов

III. Способ определения плодного или материнского вклада РНК.

A. Способ.

На фиг. 15 представлен способ 1500 определения в полученном от субъекта - беременной плодом женщины образце части РНК плодного происхождения. Указанный образец может быть получен и подготовлен согласно приведенному выше для способа 300 описанию.

На этапе 1501 получают совокупность ридов секвенирования. На этапе 1502 указанные риды секвенирования выравнивают с референсной последовательностью. Указанные этапы могут осуществляться согласно приведенному выше для этапов 301 и 302 описанию.

На этапе 1503 идентифицируют один или большее количество информативных материнских локусов. Каждый информативный материнский локус гомозиготен у плода по соответствующему первому

аллелю и гетерозиготен у субъекта - беременной женщины по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю. Первый аллель соответственно является общим для матери и плода, а второй аллель является специфическим материнским. Информативные материнские локусы могут быть идентифицированы согласно приведенному выше для этапа 303 описанию.

На этапе 1504 отбирают информативные материнские локусы, согласно этапу 304, и идентифицируют один или большее количество отобранных информативных материнских локусов. Риды секвенирования обрабатывают на уровне индивидуальных отобранных на этапах 1505-1511 информативных локусов. На этапах 1505 и 1506 определяют первое число и второе число для каждого отобранного информативного материнского локуса. Первое число определяют на этапе 1505 как число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом и содержащих соответствующий первый аллель. Второе число определяют на этапе 1506 как число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом и содержащих соответствующий второй аллель. Этапы 1505 и 1506 могут осуществляться аналогичным этапам 305 и 306 образом согласно описанию выше.

На этапе 1507 вычисляют сумму указанного первого числа и указанного второго числа для каждого информативного материнского локуса. Указанная сумма может быть эквивалентна общему числу ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом. На этапе 1508 вычисляют материнское отношение путем деления второго числа на указанную сумму. Материнское отношение дает долю от всех ридов секвенирования, выравнивающихся с конкретным локусом, которые содержат второй (специфический для матери) аллель.

На этапе 1509 определяют скаляр. Указанный скаляр отражает общий уровень экспрессии в отобранном информативном материнском локусе относительно экспрессии соответствующего второго аллеля у беременной женщины. Согласно некоторым вариантам реализации, если информация об экспрессии двух аллелей у беременной женщины известна или предполагается, что экспрессия симметрична, указанный скаляр приблизительно равен 2. Согласно другим вариантам реализации значение указанного скаляр может отличаться от 2 и учитывать асимметричную генную экспрессию. Поскольку большинство локусов экспрессируются симметрично, допущение о симметрии применимо.

На этапе 1510 материнское отношение умножают на скаляр для получения материнского вклада. Материнский вклад отражает, в отобранном информативном материнском локусе, долю ридов секвенирования (или, соответственно, долю РНК в указанном образце), внесенную матерью. Вычитание материнского вклада из единицы дает плодный вклад, или долю ридов секвенирования, внесенную плодом. На этапе 1511 вычисляют плодный вклад для отобранных информативных материнских локусов.

На этапе 1512 в образце определяют часть РНК, происходящую от плода. Указанная часть представляет собой среднее значение плодных вкладов для отобранных информативных материнских локусов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное среднее значение взвешивают, например, по суммам, вычисленным для отобранных информативных материнских локусов. При вычислении взвешенного среднего значения определенная на этапе 1512 часть может отражать относительные уровни экспрессии разных локусов или генов в образце.

Часть РНК плодного происхождения в образце может быть вычислена для одного отобранного информативного материнского локуса, многих таких локусов или всех таких локусов, для которых получены данные секвенирования. Следует иметь в виду, что указанная часть отражает циркулирующий транскриптом у конкретного субъекта - беременной женщины в момент времени, когда был получен указанный образец. В том случае, если образцы получают от субъекта в разные моменты времени на протяжении беременности, набор отобранных информативных материнских локусов, идентифицированных в соответствии со способом 1500, может варьировать в разных образцах так же, как и часть РНК плодного происхождения, определенная в указанных локусах. Часть РНК плодного происхождения в образце также может быть различной у разных субъектов, даже при контроле срока гестации или других факторов, и может отличаться у субъекта, имеющего связанное с беременностью нарушение, и здорового субъекта. Соответственно указанная часть может сравниваться с пороговым значением для диагностирования такого нарушения.

Согласно некоторым вариантам реализации пороговое значение определяют путем осуществления способа 1500 с применением образцов от одного или большего количества здоровых субъектов. Согласно некоторым вариантам реализации диагноз ставят, если указанная часть превышает пороговое значение или меньше порогового значения на любую величину или на величину, превышающую определенный допуск. Указанное сравнение может включать вычисление разности или вычисление отношения между частью РНК, происходящей от плода, у субъекта - беременной женщины, и пороговым значением. Согласно некоторым вариантам реализации сравнение включает оценку того, отличается ли существенно часть РНК, происходящая от плода, у субъекта - беременной женщины от наблюдаемой у здоровых беременных женщин в аналогичные периоды гестации.

Часть РНК плодного происхождения в образце также может быть определена путем исследования информативных локусов плода. В каждом информативном локусе плода оценка указанной части может быть получена путем, во-первых, вычисления отношения для плода, которое представляет собой число ридов секвенирования, содержащих второй (специфический плодный) аллель, разделенное на общее

число ридов секвенирования. В этом случае вклад плода равен плодному отношению, умноженному на скаляр, отражающий относительные уровни экспрессии указанных двух аллелей у плода. Соответственно вариант способа 1500 может осуществляться путем идентификации информативных локусов плода, отбора указанных локусов, вычисления плодного вклада для каждого отобранного локуса и усреднения плодных вкладов для отобранных локусов. При необходимости происходящая от плода часть РНК, определенная с помощью способа 1500, может быть расширена путем усреднения плодных вкладов, вычисленных для отобранных информативных материнских локусов и плодных вкладов, вычисленных для отобранных информативных локусов плода. Вычисленные описанным способом средние значения могут быть взвешены для учета вариаций числа ридов секвенирования в разных локусах для увеличения веса специфических материнских или специфических плодных локусов и т.п., при необходимости.

В. Примеры.

1. Идентификация и оценка происходящего от плода и от матери транскрипта в материнской плазме.

Информативные гены, определенные как гены, содержащие по меньшей мере один информативный SNP, сначала идентифицировали на основании данных генотипирования. В двух случаях беременности на ранних сроках было доступно всего 6714 и 6753 информативных генов для исследования относительных пропорций вкладов плода и матери соответственно (фиг. 16 и 17). В двух случаях беременности на поздних сроках было доступно всего 7788 и 7761 информативных генов для исследования относительных пропорций вкладов плода и матери соответственно. Для измерения относительной доли плодного вклада в материнской плазме авторы отбирали РНК-транскрипты, содержащиеся в которых специфические для плода аллели покрывал по меньшей мере один рид РНК-seq в образцах материнской плазмы. Относительное содержание таких транскриптов плодного происхождения составляло 3,70% и 11,28% на ранних и поздних сроках гестации соответственно. С применением аналогичного подхода было установлено, что относительные пропорции материнского вклада в кровоток, исследованные с использованием специфических материнских аллелей SNP, составляют 76,90% и 78,32% на ранних и поздних сроках гестации соответственно (фиг. 18А).

2. Сравнение относительных вкладов плода и матери в РНК-SNP для случаев беременности с PET и контрольной беременности.

Авторы исследовали относительные вклады плода и матери в транскрипт GNAS, детектируемый в обоих случаях, как PET, 5641, так и в соответствующем ему по гестационному сроку контрольном случае, 7171. В транскрипте GNAS присутствовал информативный SNP-сайт, содержащий специфические для плода аллель SNP в локусе rs7121 в случае 5641; на том же SNP-сайте в случае 7171 присутствовал специфический для матери аллель SNP. Рассчитанные относительны вклады плода и матери для указанного SNP-сайта в случае 5641 составили 0,09 и 0,91 соответственно. С другой стороны, удельные вклады плода и матери для того же SNP-сайта в случае 7171 составили 0,08 и 0,92 соответственно (фиг. 19). По сравнению с контрольным случаем 7171 наблюдалось увеличение на 12,5% относительного плодного вклада и уменьшение на 1,09% относительного материнского вклада в указанный транскрипт. Интересно, что в случае 5641 для указанного транскрипта детектировали увеличение FPKM на 21% относительно 7171.

IV. Способ определения геномного локуса как материнского или плодного маркера.

А. Способ.

Способ 2000 определения того, что геномный локус является материнским или плодным маркером, представлен на фиг. 20. Указанный способ включает анализ образца, полученного от субъекта - беременной плодом женщины. Указанный образец может быть образцом плазмы материнской крови и содержит смесь молекул РНК материнского или плодного происхождения. Образец может быть получен и подготовлен, как обсуждается выше для способа 300.

На этапе 2001 получают совокупность ридов секвенирования. На этапе 2002 указанные риды секвенирования выравнивают с референсной последовательностью. Указанные этапы могут осуществляться, как описано выше для этапов 301 и 302.

На этапе 2003 идентифицируют один или большее количество информативных локусов. Каждый локус гомозиготен у первого субъекта по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у второго субъекта по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю. Первый субъект представляет собой беременную женщину или плод, и второй субъект представляет собой плод или беременную женщину соответственно. Информативные локусы могут быть идентифицированы согласно приведенному выше для этапа 303 описанию.

На этапе 2004 отбирают информативные локусы таким же образом, как на этапе 304, и идентифицируют один или большее количество отобранных информативных локусов. Согласно некоторым вариантам реализации для отбора рассматривают только информативные локусы, представляющие SNP. Согласно одному из примеров реализации указанного способа, отобранные информативные локусы включали информативные SNP, содержащие по меньшей мере один рид последовательности для аллеля "А" и один рид последовательности для аллеля "В" в материнской плазме.

Затем риды секвенирования обрабатывают на уровне индивидуальных отобранных на этапах 2005-2008 информативных локусов. На этапах 2005 и 2006 определяют первое число и второе число для каж-

дого отобранного информативного локуса. Указанное первое число определяют на этапе 2005 как число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом и содержащих соответствующий первый аллель. Указанное второе число определяют на этапе 2006 как число ридов секвенирования, выравнивающихся с указанным локусом и содержащих соответствующий второй аллель. Этапы 2005 и 2006 могут осуществляться аналогично описанным выше этапам 305 и 306.

На этапе 2007 вычисляют отношение указанного первого числа и указанного второго числа для каждого отобранного информативного локуса. Указанное отношение отражает относительную распространенность ридов секвенирования (и, таким образом, транскриптов в образце), содержащих первый аллель и второй аллель. Согласно некоторым вариантам реализации указанное отношение рассчитывают просто как первое число, разделенное на второе число. Такой расчет дает число ридов секвенирования для общего аллеля в виде множества ридов секвенирования для специфических материнских или специфических плодных аллелей. Указанное отношение, или обратное ему, может считаться аллельным отношением, а для SNP-локусов - аллельным отношением РНК-SNP.

Согласно некоторым вариантам реализации для информативных SNP, которые включают специфические материнские аллели SNP, аллельное отношение РНК-SNP для каждого SNP вычисляют как отношение "специфический для матери аллель:общий аллель". С другой стороны, для информативных SNP, которые включают специфические для плода аллели SNP, аллельное отношение РНК-SNP может быть рассчитано как отношение "специфический плодный аллель:общий аллель". В отличие от анализа генной экспрессии, при котором нормирование данных является обязательным условием, анализ аллельных отношений РНК-SNP не требует нормирования данных, и вносится меньшая систематическая погрешность. Для транскриптов, содержащих более одного информативного SNP, может быть рассчитано аллельное отношение РНК-SNP для каждого сайта информативного SNP и может быть вычислено среднее аллельное отношение РНК-SNP на транскрипт.

На этапе 2007 отношение может, как вариант, быть рассчитано как второе число, разделенное на сумму указанного первого числа и указанного второго числа. В этом случае указанное отношение представляет число ридов секвенирования для специфического материнского или специфического для плода аллеля в виде доли от всех ридов секвенирования в указанном локусе. В случае аллелей "A" и "B" указанное отношение может быть выражено как:

отношение для аллеля B = подсчитанное количество аллеля B/(подсчитанное количество аллеля A+подсчитанное количество аллеля B)

Теоретически для транскрипта в плазме, вносимого исключительно плодом или матерью, отношение для аллеля B должно быть равно 0,5 при предположении об аллелеспецифической экспрессии. Другие способы вычисления указанного отношения будут понятны для специалиста в данной области техники.

На этапе 2008 отобранный информативный локус определяют как маркер, если указанное отношение превышает пороговое значение. Согласно некоторым вариантам реализации пороговое значение составляет от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,5. Согласно некоторым вариантам реализации пороговое значение составляет 0,4. Согласно одному из примеров реализации указанного способа пороговое значение для отношения аллеля B было определено как ≥0,4 для РНК-транскрипта с высоким плодным или материнским вкладом. Указанное пороговое значение учитывало распределение Пуассона и рандомизированный отбор ридов РНК-seq. Согласно некоторым вариантам реализации говорится, что вклад аллеля "B" является высоким, если указанное отношение превышает пороговое значение.

Высокое аллельное отношение в конкретном информативном локусе может указывать на то, что (i) уровень экспрессии второго аллеля, или аллеля "B", у гетерозиготного индивидуума выше, чем уровень экспрессии аллеля "A" (т.е. аллель экспрессируется асимметрично), (ii) более значительная доля всех РНК, выравнивающихся с указанным локусом в материнской плазме, вносится гетерозиготным индивидуумом; или справедливы и (i), и (ii). Высокое аллельное отношение может также указывать на связанное с беременностью нарушение, если ген, связанный с указанным информативным локусом, патологически сверхэкспрессируется. Соответственно некоторые варианты реализации указанного способа также включают диагностирование связанного с беременностью нарушения на основании того, определен ли отобранный информативный локус как маркер второго объекта (т.е. гетерозиготного индивидуума). При постановке такого диагноза пороговое значение, используемое для сравнения с аллельным отношением, может быть основано на уровнях транскрипции в образцах плазмы, полученных от здоровых беременных субъектов.

Согласно некоторым вариантам реализации способ 2000 может также применяться для оценки части РНК материнского или плодного происхождения в образце, в конкретном отобранном информативном локусе. Указанную оценку осуществляют путем умножения указанного отношения рассчитанного на этапе 2007 на скаляр. Указанный скаляр отражает общий уровень экспрессии в указанном локусе относительно экспрессии второго аллеля у гетерозиготного индивидуума.

Например, если второй ("B") подсчитываемый в указанном способе аллель является специфическим для плода, тогда отношение аллеля B, рассчитанное, как описано выше, отражает число ридов секвенирования для указанного аллеля в виде доли от всех ридов секвенирования для отобранного информативного локуса. Из ридов секвенирования, содержащих общий ("A") аллель, некоторые внесены матерью и

некоторые внесены плодом. В том случае, если относительные уровни экспрессии специфических плодных и общих аллелей у плода известны или могут быть оценены, отношение аллеля B может быть масштабировано для получения оценки относительного вклада плода во все риды секвенирования для указанного локуса. Если аллели "A" и "B" экспрессируются у плода одинаково, скаляр приблизительно равен 2. В этом случае вычитание относительного плодного вклада из единицы дает фракционный материнский вклад в риды секвенирования в указанном локусе. Аналогичные расчеты могут быть выполнены в случае, если аллель "B" в отобранном информативном локусе является специфическим материнским.

B. Пример.

Высокие вклады плода и матери.

При использовании порогового значения 0,4 для аллеля B согласно приведенному выше описанию высокий вклад плода на ранних сроках гестации (т.е. в первом и во втором триместрах), как было обнаружено, наблюдается для 0,91% циркулирующих транскриптов. Указанный процент увеличивался до 2,52% на поздних сроках гестации (т.е. в третьем триместре). При этом высокий вклад матери наблюдался для 42,58% и 50,98% транскриптов на ранних и поздних сроках гестации соответственно (фиг. 16, 17, и 18 A).

V. Использование генов для диагностики связанных с беременностью нарушений.

A. Связанные с беременностью гены.

Также предложен способ идентификации связанных с беременностью генов. Указанный способ включает получение совокупности первых ридов секвенирования и совокупность вторых ридов секвенирования. Указанные первые риды секвенирования получают при секвенировании молекул РНК, полученных из образца плазмы крови беременной женщины. Указанные вторые риды секвенирования получают при секвенировании молекул РНК, полученных из образца плазмы крови небеременной женщины. Указанные первые риды секвенирования и вторые риды секвенирования выравнивают с референсной последовательностью и определяют набор кандидатных генов.

В соответствии с указанным способом затем риды секвенирования используют для определения уровней экспрессии для каждого кандидатного гена в образцах от беременной женщины и небеременной женщины. В частности, для каждого кандидатного гена первое число транскриптов, соответствующее указанному кандидатному гену, определяют с применением первых ридов секвенирования; второе число транскриптов, соответствующее указанному кандидатному гену, определяют с применением вторых ридов секвенирования. Указанное первое число транскриптов и указанное второе число транскриптов может быть нормировано. Затем вычисляют отношение транскриптов для кандидатного гена, при этом указанное отношение транскриптов включает первое число транскриптов, разделенное на второе число транскриптов. Отношение транскриптов затем сравнивают с пороговым значением. Указанный кандидатный ген идентифицируют как связанный с беременностью ген, если отношение транскриптов превышает пороговое значение.

Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа нормирование первого числа транскриптов соответствует масштабированию первого числа транскриптов по общему числу первых ридов секвенирования. Аналогичным образом нормирование второго числа транскриптов может соответствовать масштабированию второго числа транскриптов по общему числу вторых ридов секвенирования. Согласно другим вариантам реализации нормирование первого числа транскриптов для каждого кандидатного гена соответствует масштабированию первого числа транскриптов для кандидатного гена по общему числу первых транскриптов для всех кандидатных генов. Нормирование второго числа транскриптов для каждого кандидатного гена может соответствовать масштабированию второго числа транскриптов для кандидатного гена по общему числу вторых транскриптов для всех кандидатных генов.

В указанном способе гены обычно идентифицируют как связанные с беременностью, если уровни их экспрессии выше у беременной женщины по сравнению с небеременной женщиной, при прочих равных условиях. Беременная и небеременная женщина может быть одним и тем же индивидуумом; т.е. образцы, полученные от индивидуума до и после родов, могут быть источниками первых ридов секвенирования и вторых ридов секвенирования соответственно.

Авторы показали, что подсовокупность циркулирующих РНК-транскриптов, несущих специфические плодные аллели, полностью исчезала из материнской плазмы после родов (фиг. 18B). Указанные транскрипты считали специфическими для плода в материнской плазме. С другой стороны, часть специфических материнских аллелей также не выявлялась после родов. Соответственно авторы исследовали гены, называемые связанными с беременностью генами, повышающая регуляция которых наблюдалась во время беременности, путем непосредственного сравнения их представленности в материнской плазме до родов и после родов. Авторы определили связанные с беременностью гены как гены, которые обнаруживались в плазме беременных женщин до родов в третьем триместре, уровень которых в плазме после родов снижался ≥ чем двукратно в обоих случаях. С применением биоинформационного алгоритма для нормирования данных и анализа дифференциальной генной экспрессии авторы составили список, включающий 131 связанный с беременностью ген (фиг. 21). Из указанных генов 15 были ранее описаны как специфические для беременности в материнской плазме. С применением одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени авторы дополнительно подтвердили связь с беременностью для пяти впервые иденти-

фицированных транскриптов, которые присутствовали в большом количестве в материнской плазме до родов, а именно STAT1, GBP1 и HSD17B1 в 10 дополнительных образцах плазмы беременных женщин в третьем триместре, а также KRT18 и GADD45G в 10 образцах плазмы из другой когорты беременных женщин в третьем триместре (фиг. 22).

Для оценки связи указанного 131 гена с беременностью осуществляли иерархическую кластеризацию для всех образцов плазмы. Наблюдалось явное разделение образцов плазмы от беременных женщин (а именно на ранних и поздних сроках беременности) и образцов, не связанных с текущей беременностью (а именно от небеременных контролей и после родов) (фиг. 23).

Интересно, что при сравнении паттернов экспрессии указанного 131 гена в образцах плазмы в двух случаях беременности на позднем сроке и соответствующих им плацентах и клетках материнской крови более близкое сходство наблюдалось между плацентой и образцами плазмы до родов и между клетками материнской крови и образцами плазмы после родов (фиг. 24A). Указанное наблюдение поддерживает тезис о том, что большинство связанных с беременностью генов преимущественно экспрессируются в плаценте, а не в клетках материнской крови. Кроме того, уровни экспрессии указанных связанных с беременностью транскриптов в плаценте и материнской плазме положительно коррелировали ($P<0,05$, корреляция Спирмена) (фиг. 24B).

B. Дифференциальная генная экспрессия в плаценте и в материнской крови.

Наряду с тем, что авторам удалось каталогизировать панель связанных с беременностью генов путем непосредственного исследования образцов дородовой и послеродовой материнской плазмы, авторы также проанализировали данные РНК-seq плаценты и клеток крови с целью сравнения. При предположении, что связанные с беременностью гены должны быть представлены генами с высокими уровнями экспрессии в плаценте и низкими уровнями экспрессии в клетках материнской крови, как сообщалось ранее, авторы установили условный 20-кратный уровень различия в качестве минимального порога при анализе, основанном на тканях. Указанный основанный на тканях анализ дал всего 798 потенциальных кандидатных генов, для которых вычислялись доли вкладов плода и матери в материнской плазме. Была идентифицирована относительно высокая доля генов с преобладающим вкладом плода (фиг. 25) по сравнению с полным транскриптомом (фиг. 18A). Однако основанная на плазме стратегия превосходила указанную основанную на тканях стратегию, позволяя идентифицировать большую долю генов с преобладанием плодного вклада (фиг. 25).

C. Гены, связанные с заболеванием или нарушением.

Также в настоящем изобретении предложен способ идентификации генов, связанных со связанным с беременностью нарушением. Указанный способ включает получение совокупности первых ридов секвенирования и совокупность вторых ридов секвенирования. Указанные первые риды секвенирования получают путем секвенировании молекул РНК, полученных из образца плазмы крови здоровой беременной женщины. Указанные вторые риды секвенирования получают при секвенировании молекул РНК, полученных из образца плазмы крови беременной женщины, страдающей связанным с беременностью нарушением, или вынашивающей плод, страдающий связанным с беременностью нарушением. Указанные первые риды секвенирования и указанные вторые риды секвенирования выравнивают с референсной последовательностью и определяют набор кандидатных генов.

В соответствии с указанным способом риды секвенирования затем используют для определения уровней экспрессии для каждого кандидатного гена в образцах двух беременных женщин. В частности, для каждого кандидатного гена первое число транскриптов, соответствующее указанному кандидатному гену, определяют с применением первых ридов секвенирования, и второе число транскриптов, соответствующее указанному кандидатному гену, определяют с применением вторых ридов секвенирования. Указанное первое число транскриптов и указанное второе число транскриптов может быть нормировано. Затем вычисляют отношение транскриптов для кандидатного гена, при этом указанное отношение транскриптов включает первое число транскриптов, разделенное на второе число транскриптов. Указанное отношение транскриптов затем сравнивают с референсным значением. Кандидатный ген идентифицируют как связанный с нарушением, если указанное отношение транскриптов отклоняется от референсного значения.

Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа нормирование первого числа транскриптов соответствует масштабированию указанного первого числа транскриптов по общему числу первых ридов секвенирования. Аналогичным образом нормирование второго числа транскриптов может соответствовать масштабированию указанного второго числа транскриптов по общему числу вторых ридов секвенирования.

Согласно другим вариантам реализации нормирование первого числа транскриптов для каждого кандидатного гена соответствует масштабированию указанного первого числа транскриптов для кандидатного гена по общему числу первых транскриптов для всех кандидатных генов. Нормирование второго числа транскриптов для каждого кандидатного гена может соответствовать масштабированию указанного второго числа транскриптов для кандидатного гена по общему числу вторых транскриптов для всех кандидатных генов.

В соответствии со способом идентификации генов, связанных со связанным с беременностью на-

рушением, согласно некоторым вариантам реализации референсное значение составляет 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное отношение транскриптов отклоняется от референсного значения, если отношение указанного отношения транскриптов и референсного значения выше порогового значения или ниже порогового значения. Согласно некоторым вариантам реализации указанное отношение транскриптов отклоняется от референсного значения, если разница между отношением транскриптов и референсным значением превышает пороговое значение.

В указанном способе обычно ген идентифицируют как связанный со связанным с беременностью нарушением, если уровень экспрессии указанного гена существенно отличается при беременностях с указанным нарушением и без указанного нарушения, при прочих равных условиях.

Диагностика и мониторинг нарушений у плода и патологий беременности проводились ранее с использованием РНК материнской плазмы, связанных с заболеваниями. Например, было показано, что уровень в материнской плазме мРНК кортикотропин-рилизинг-гормона (CRH) можно использовать для неинвазивной детекции и предсказания преэклампсии. Детекция мРНК, подобного рецептору интерлейкина-1 белка (IL1RL1) в материнской плазме, как было продемонстрировано, может применяться для выявления женщин, предрасположенных к спонтанным преждевременным родам. Также была исследована панель связанных с ростом РНК-маркеров материнской плазмы для неинвазивной оценки роста плода и внутриутробной задержки роста. В настоящем исследовании авторы приходят к выводу, что новые, связанные с заболеваниями циркулирующие РНК-маркеры могут быть идентифицированы путем прямого сравнения транскриптомов материнской плазмы здоровых беременных женщин и женщин с осложнениями беременности, такими как преэклампсия, внутриутробная задержка роста, преждевременные роды и анеуплоидии плода. Чтобы продемонстрировать применимость указанного подхода, авторы проводили RNA-Seq на образцах материнской плазмы, полученных от трех беременных женщин, у которых развилась преэклампсия, и семи беременных женщин, не имеющих осложнений, с совпадающими сроками гестации. Авторы идентифицировали 98 транскриптов, существенное повышение уровня которых наблюдалось в плазме беременных женщин с преэклампсией (фиг. 26). Впервые идентифицированные связанные с преэклампсией транскрипты потенциально могут применяться для предсказания, прогнозирования и мониторинга указанного заболевания.

Указанная методика может также применяться для предсказания и мониторинга преждевременных родов. Указанная методика может также применяться для предсказания риска гибели плода. Указанная методика может также применяться для выявления заболеваний, вызываемых генными мутациями, при условии, что задействованный ген транскрибируется в плодных или плацентарных тканях, и транскрипты детектируются в материнской плазме.

RNA-Seq плазмы может применяться в других клинических условиях. Например, технология RNA-Seq плазмы, разработанная в указанном исследовании, потенциально может подходить для исследования других патологических состояний, таких как рак, для которых описаны аберрантные концентрации РНК в плазме. Например, путем сравнения транскриптомов плазмы страдающего раковым заболеванием пациента до и после терапии могут быть идентифицированы опухолеассоциированные циркулирующие РНК-маркеры при применении для неинвазивной диагностики.

VI. Паттерны экспрессии аллелей специфических генов

Секвенирование РНК применяется для изучения паттерна экспрессии аллелей. Авторы постулировали, что паттерн экспрессии аллелей определенного гена сохраняется при высвобождении РНК-транскриптов из тканей в кровоток, следовательно и соответственно его можно определять в плазме. В настоящем исследовании авторы исследовали подсчитанное количество аллелей в двух РНК-транскриптах, а именно, PAPPA, специфического для беременности гена, и H19, импринтингового гена, экспрессируемого матерью.

В случае гена PAPPA авторы анализировали SNP, rs386088, который содержит специфический плодный аллель SNP (фиг. 27). Отсутствие ридов РНК-seq для PAPPA в образцах плазмы после родов указывает на то, что он действительно является специфическим для беременности. Отметим, что отсутствовало статистически значимое различие пропорций подсчитанных ридов для плодного аллеля в РНК из образцов материнской плазмы до родов и плацентарных образцов (P=0,320, критерий χ^2), что указывает на то, что данные для материнской плазмы отражают биаллельный паттерн экспрессии PAPPA в плаценте.

Недавно авторами была описана возможность определения путем бисульфитного секвенирования ДНК материнской плазмы паттерна метилирования ДНК импринтингового экспрессируемого с аллеля матери гена H19 в плаценте и клетках материнской крови. В настоящей работе авторы дополнительно исследовали, возможно ли исследование статуса геномного импринтинга гена H19 на уровне РНК. Сначала авторы сосредоточили внимание на SNP-сайте в экзоне 1 гена H19, rs2839698, который содержит специфический для матери аллель, а именно AA у плода и AG у матери. Как видно из фиг. 28, в послеродовой материнской плазме был детектирован только аллель G (фиг. 28). Такой моноаллельный паттерн соответствовал связи с неметилированным аллелем G на SNP-сайте rs4930098 в области контроля импринтинга (фиг. 29). В материнской плазме до родов, помимо присутствия аллеля G, детектировали и присутствие аллеля A, внесенного плацентой (фиг. 28). В трех других SNP-сайтах, а именно rs2839701, rs2839702 и rs3741219, несущих специфические материнские аллели, был обнаружен аналогичный ал-

лельный паттерн, а именно биаллельный в материнской плазме до родов и моноаллельный в послеродовой материнской плазме (фиг. 28). Возможно, специфические материнские аллели в указанных SNP-сайтах располагались в том же материнском гаплотипе, который не был метилирован и, таким образом, транскрибировался. Примечательно, что РНК H19 не экспрессировался в клетках материнской крови (фиг. 28), что позволяет предположить, что молекулы РНК H19 в плазме происходят не из клеток крови, а из других материнских тканей/органов. Неплацентарные и не относящиеся к плоду ткани, в которых сообщалось, что в них наблюдается экспрессия H19, включают надпочечники, скелетные мышцы, матку, адипоциты, печень и поджелудочную железу.

VII. Обсуждение.

Целью данной работы была разработка технологии получения глобальной картины транскриптомной активности в материнской плазме с применением РНК-seq (секвенирования РНК). Ранее авторами было показано, что доля плодной ДНК в материнской плазме может быть вычислена по одному или нескольким целевым специфическим для плода локусам, поскольку в материнской плазме равномерно представлен весь плодный геном. В отличие от измерения циркулирующих ДНК, измерение доли РНК-транскриптов плодного происхождения в материнской плазме не является столь же простым, поскольку осложняется дифференциальной генной экспрессией в тканях плода и матери и их возможным высвобождением в кровоток. За счет проведения РНК-seq на материнской плазме и исследования полиморфных различий плода и матери авторам удалось оценить долю транскриптов, вносимых плодом, в плазме.

Несмотря на то, что в транскриптоме плазмы, как и следовало ожидать, преобладали транскрипты материнского происхождения, 3,70% и 11,28% циркулирующих транскриптов в материнской плазме на ранних и поздних сроках беременности соответственно имели плодное происхождение. Указанные транскрипты плодного происхождения включают молекулы РНК, внесенные совместно плодом и матерью, а также внесенные исключительно плодом. Авторы обнаружили, что последнее значение составляет 0,90% и 2,52% материнских циркулирующих транскриптов на ранних и поздних сроках беременности соответственно. Более выраженная представленность таких специфических плодных генов на поздних сроках беременности, возможно, связана с увеличением размеров плода и плаценты по мере развития беременности.

В настоящем исследовании авторы продемонстрировали, что в материнской плазме наблюдается сбалансированная аллельная экспрессия РНК специфического для беременности гена PAPPA в плаценте и моноаллельная экспрессия импринтингового экспрессируемого с аллеля матери гена H19. Указанные данные предполагают, что материнская плазма может использоваться в качестве источника образцов для неинвазивного исследования паттернов аллельной экспрессии.

На основании количественного сравнения РНК-транскриптов в образцах дородовой и послеродовой материнской плазмы авторы составили список из 131 гена, повышающая регуляция которого происходит во время беременности, что очевидно следует из снижения представленности указанных генов в образцах послеродовой плазмы. Как и ожидалось, профиль указанных генов может использоваться для дифференциации образцов плазмы беременных женщин и образцов плазмы небеременных женщин. Такое прямое сравнение образцов материнской плазмы до родов и после родов позволило авторам с высокой производительностью отбирать связанные с беременностью гены, уровни экспрессии которых в плаценте не обязательно значительно выше, чем в клетках материнской крови, как было продемонстрировано в предыдущем исследовании. В сущности, указанный способ прямого исследования плазмы представляет новый подход к обнаружению циркулирующих связанных с беременностью РНК-транскриптов в отсутствие априорной информации о транскриптомных профилях плацентарных тканей и клеток крови.

Хотя авторы показали, что РНК-seq представляет собой подходящий способ профилирования транскриптома плазмы, некоторые технические моменты могут быть дополнительно усовершенствованы. Во-первых, объем получаемой при РНК-seq плазмы информации может быть увеличен за счет дополнительной оптимизации протокола секвенирования, в частности в отношении истощения плазмы по высокотранскрибируемым рРНК и глобиновым генам. Во-вторых, внимание авторов было сосредоточено только на референсных транскриптах, и индивидуальные изоформы еще не были исследованы. Будущие исследования могут включать детекцию новых транскриптов и дифференциальный анализ вариантов сплайсинга и их изоформ за счет увеличения глубины считывания при секвенировании. В-третьих, авторы исключили отбор по ASE при анализе долей транскриптов плодного и материнского происхождения для образцов, полученных на ранних сроках беременности, так как ворсины хориона и амниотическая жидкость были израсходованы при генотипическом анализе. Тем не менее, авторы показали, что на поздних сроках беременности ASE не оказывает заметного влияния на идентификацию в материнской плазме генов с преобладающими плодным и материнским вкладами (фиг. 16 и 17).

Наконец, авторы продемонстрировали, что технология РНК-seq может использоваться для измерения пропорции происходящих от плода транскриптов и для идентификации циркулирующих связанных с беременностью генов в материнской плазме. Настоящее исследование создает предпосылки к лучшему пониманию транскриптомного ландшафта материнской плазмы, облегчая идентификацию кандидатных биомаркеров, вовлеченных в связанные с беременностью заболевания. Авторы считают, что указанная технология приведет к новым подходам к молекулярной диагностике связанных с беременностью или с плацентой заболеваний, а также других заболеваний, таких как рак.

VIII. Трансплантация.

Как уже упоминалось выше, описанные в настоящем документе способы могут также применяться при трансплантации. Способы для применения при трансплантации могут осуществляться таким же образом, как при исследовании плода. Например, может быть получен генотип трансплантированной ткани. Варианты реализации позволяют идентифицировать локусы, где трансплантированная ткань гетерозиготна, а организм-хозяин (например, мужского или женского пола) гомозиготен. Также варианты реализации позволяют идентифицировать локусы, где трансплантированная ткань гомозиготна, а организм-хозяин (например, мужского или женского пола) гетерозиготен. Могут быть вычислены те же отношения и проведено сравнение с пороговым значением для определения наличия нарушения.

IX. Компьютерные системы.

В любых из компьютерных системах, упоминаемых в настоящем документе, может быть использовано любое подходящее количество подсистем. Примеры таких подсистем представлены на фиг. 30 в компьютерном устройстве 3000. Согласно некоторым вариантам реализации компьютерная система включает одно компьютерное устройство, при этом подсистемы могут представлять собой компоненты указанного компьютерного устройства. Согласно другим вариантам реализации компьютерная система может включать множество компьютерных устройств, каждое из которых является подсистемой, с внутренними компонентами.

Подсистемы, представленные на фиг. 30, соединены системной шиной 3075. Показаны дополнительные подсистемы, такие как принтер 3074, клавиатура 3078, устройство(а) хранения данных 3079, монитор 3076, который соединен с адаптером дисплея 3082, и другие. Периферийные устройства и устройства ввода/вывода (I/O), связанные с контроллером ввода/вывода 3071, могут быть подсоединены к компьютерной системе любыми способами, известными в данной области техники, например через последовательный порт 3077. Так, последовательный порт 3077 или внешний интерфейс 3081 (например, Ethernet, Wi-Fi и т.п.) может использоваться для соединения компьютерной системы 3000 с сетью широкого охвата, такой как Интернет, с устройством ввода типа "мышь" или со сканером. Соединение через системную шину 3075 обеспечивает сообщение центрального процессора 3073 с каждой подсистемой и управление выполнением инструкций системной памяти 3072 или устройств(а) хранения данных 3079 (например, стационарного диска, такого как жесткий диск или оптический диск), а также обмен информацией между подсистемами. Системная память 3072 и/или устройство(а) хранения данных 3079 могут представлять собой машиночитаемый носитель. Любые данные, упоминаемые в настоящем документе, могут быть выведены из одного компонента в другой компонент и могут быть выведены для предоставления пользователю.

Компьютерная система может включать совокупность тех же компонентов или подсистем, например, соединенных внешним интерфейсом 3081 или внутренним интерфейсом. Согласно некоторым вариантам реализации компьютерные системы, подсистема или аппаратура могут сообщаться между собой через сеть. В таких случаях один компьютер может рассматриваться как клиент, а другой компьютер - как сервер, при этом каждый из них может входить в состав одной и той же компьютерной системы. И клиент, и сервер могут включать множество систем, подсистем или компонентов.

Следует понимать, что любые из вариантов реализации настоящего изобретения могут быть реализованы в форме устройства логического управления с применением оборудования (например, специализированной интегральной схемы или перепрограммируемой логической матрицы) и/или с применением компьютерного программного обеспечения с помощью обычного программируемого процессора модульным или интегрированным образом. В настоящем документе процессор включает многоядерный процессор на одной интегральной схеме или множество обрабатывающих модулей на одноплатной схеме или в сетевой структуре. На основании настоящего раскрытия и изложенных в настоящем документе принципов среднему специалисту в данной области техники будут понятны и очевидны другие подходы и/или способы воплощения вариантов реализации настоящего изобретения с применением оборудования и комбинации оборудования и программного обеспечения.

Любые компоненты или функции программного обеспечения, описанные в указанной заявке, могут быть реализованы в виде программного кода для выполнения процессором с применением любого подходящего компьютерного языка, такого как, например, Java, C++ или Perl, с применением, например, традиционных или объектно-ориентированных техник. Указанный программный код может храниться в виде последовательности инструкций или команд на машиночитаемом носителе для хранения и/или передачи данных, подходящие носители включают оперативное запоминающее устройство (ОЗУ), постоянное запоминающее устройство (ПЗУ), магнитный носитель, такой как жесткий диск или дискета, или оптический носитель, такой как компакт-диск (CD) или DVD (универсальный цифровой диск), флеш-память и т.п. Машиночитаемый носитель может представлять собой любую комбинацию таких устройств для хранения или передачи данных.

Такие программы могут также кодироваться и передаваться с применением несущих сигналов, предназначенных для передачи через проводные, оптические и/или беспроводные сети в соответствии с различными протоколами, включая Интернет. Таким образом, машиночитаемый носитель в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения может быть получен с применением сигнала данных,

кодируемого такими программами. Машиночитаемый носитель, содержащий программный код, может быть упакован с совместимым устройством или предоставлен отдельно от других устройств (например, путем загрузки через сеть Интернет). Любой такой машиночитаемый носитель может находиться на одном компьютерном продукте или входить в состав одного компьютерного продукта (например, жесткого диска, CD-диска или компьютерной системы полностью) и может находиться на разных компьютерных продуктах или входить в состав разных компьютерных продуктов в составе системы или сети. Компьютерная система может включать монитор, принтер или другое подходящее устройство отображения для предоставления пользователю любых результатов из упоминаемых в настоящем документе.

Любые из способов, описанных в настоящем документе, могут быть полностью или частично реализованы с помощью компьютерной системы, включающей один или большее количество процессоров, которые могут быть сконфигурированы для осуществления этапов. Соответственно варианты реализации могут относиться к компьютерным системам, сконфигурированным для осуществления этапов любых из способов, описанных в настоящем документе, потенциально с разными компонентами, осуществляющими соответствующие этапы или соответствующую группу этапов. Несмотря на то, что этапы представленных в настоящем документе способов в описании пронумерованы, они могут осуществляться одновременно или в другом порядке. Кроме того, части указанных этапов могут применяться с частями других этапов, относящихся к другим способам. Также этап может быть полностью или частично необязательным. Кроме того, любые этапы любых способов могут осуществляться при помощи модулей, схем или других способов выполнения указанных этапов.

Конкретные детали частных вариантов реализации могут быть скомбинированы любым подходящим образом без отступления от сущности и объема вариантов реализации настоящего изобретения. При этом другие варианты реализации настоящего изобретения могут относиться к конкретным вариантам реализации, применительно к каждому индивидуальному аспекту или конкретным комбинациям указанных индивидуальных аспектов.

Представленное выше описание примеров реализации настоящего изобретения приведено с иллюстративными и описательными целями. Не предполагается, что оно является исчерпывающим или ограничивающим настоящее изобретение точно описанной формой, и возможны многие модификации и варианты в свете вышеизложенных принципов. Варианты реализации были выбраны и описаны для наилучшего разъяснения принципов настоящего изобретения и его практического применения, чтобы обеспечить другим специалистам в данной области техники возможность наилучшего использования настоящего изобретения согласно различным вариантам реализации и с различными модификациями, подходящими для конкретного предполагаемого применения.

Предполагается, что все термины, приведенные в единственном числе, включая дополненные определением "указанный", означают "один или большее количество", если конкретным образом не указано иное.

Все патенты, заявки на патенты, публикации и описания, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей. Никакие из них не признаются предшествующим уровнем техники.

X. Список литературы.

1. Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YMD. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;**100**: 4748-53.

2. Ng EKO, Leung TN, Tsui NBY, Lau TK, Panesar NS, Chiu RWK, Lo YMD. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. Clin Chem 2003;**49**: 727-31.

3. Farina A, Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Jimbo M, Saito H, Okai T. Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable for preeclampsia. A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low-risk nonsymptomatic patients. Prenat Diagn 2004;**24**: 83-6.

4. Pang WW, Tsui MH, Sahota D, Leung TY, Lau TK, Lo YM, Chiu RW. A strategy for identifying circulating placental RNA markers for fetal growth assessment. Prenat Diagn 2009;**29**: 495-504.

5. Lo YMD, Tsui NBY, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. Nat Med 2007;**13**: 218-23.

6. Tsui NBY, Akolekar R, Chiu RWK, Chow KCK, Leung TY, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YMD. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. Clin Chem 2010;**56**: 73-81.

7. Tsui NBY, Wong BCK, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. Prenat Diagn 2009;**29**: 1031-7.

8. Chim SS, Lee WS, Ting YH, Chan OK, Lee SW, Leung TY. Systematic identification of spontaneous preterm birth-associated RNA transcripts in maternal plasma. PLoS One 2012;**7**: e34328.

9. Wong BCK, Chiu RWK, Tsui NBY, Chan KCA, Chan LW, Lau TK, Leung TN, Lo YMD. Circulating placental RNA in maternal plasma is associated with a preponderance of 5' mRNA fragments: implications for noninvasive prenatal diagnosis and monitoring. Clin Chem 2005;**51**: 1786-95.

10. Tsui NBY, Chim SSC, Chiu RWK, Lau TK, Ng EKO, Leung TN, Tong YK, Chan KCA, Lo YMD. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. J Med Genet 2004;**41**: 461-7.

11. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. Clin Chem 2000;46:1832-4.

12. Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, Van Vugt JM, Oudejans CB.

Detection of placental transcription factor mRNA in maternal plasma. Clin Chem 2004;50:1413-4.

13. Smets EM, Visser A, Go AT, van Vugt JM, Oudejans CB. Novel biomarkers in preeclampsia. Clin Chim Acta 2006;364:22-32.

14. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjosastro GH, et al. Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. Clin Chem 2007;53:399-404.

15. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, et al. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. Prenat Diagn 2010;30:849-61.

16. Ng EKO, El-Sheikhah A, Chiu RWK, Chan KC, Hogg M, Bindra R, et al. Evaluation of human chorionic gonadotropin beta-subunit mRNA concentrations in maternal serum in aneuploid pregnancies: a feasibility study. Clin Chem 2004;50:1055-7.

17. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods 2008;5:621-8.

18. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. Science 2008;321:956-60.

19. Kim J, Zhao K, Jiang P, Lu ZX, Wang J, Murray JC, Xing Y. Transcriptome landscape of the human placenta. BMC Genomics 2012;13:115.

20. Wang K, Li H, Yuan Y, Etheridge A, Zhou Y, Huang D, et al. The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota? PLoS One 2012;7:e51009.

21. Li H, Guo L, Wu Q, Lu J, Ge Q, Lu Z. A comprehensive survey of maternal plasma miRNAs expression profiles using high-throughput sequencing. Clin Chim Acta 2012;413:568-76.

22. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, Tuschl T. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:4255-60.

23. Chim SSC, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. Clin Chem 2008;54:482-90.

24. Pickrell JK et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression

variation with RNA sequencing. Nature 2010;464:768-772.

25. Smith RM, Webb A, Papp AC, Newman LC, Handelman SK, Suhy A, et al. Whole transcriptome RNA-Seq allelic expression in human brain. BMC Genomics 2013;14:571.

26. Frost JM, Monk D, Stojilkovic-Mikic T, Woodfine K, Chitty LS, Murrell A, et al. Evaluation от всexelic expression of imprinted genes in adult human blood. PLoS One 2010;5:e13556.

27. Daelemans C, Ritchie ME, Smits G, Abu-Amero S, Sudbery IM, Forrest MS, et al. High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta. BMC Genet 2010;11:25.

28. Lun FMF, Chiu RWK, Sun K, Leung TY, Jiang P, Chan KCA, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. Clin Chem 2013;59:1583-94.

29. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. Genome Biol 2009;10:R130.

30. Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med 2010;2:61ra91.

31. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. Genes Dev 2011;25:1915-27.

32. St Laurent G, Shtokalo D, Tackett MR, Yang Z, Eremina T, Wahlestedt C, et al. Intronic RNAs constitute the major долю of the non-coding RNA in mammalian cells. BMC Genomics 2012;13:504.

33. Anders S, Reyes A, Huber W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. Genome Res 2012;22:2008-17.

34. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. Biochim Biophys Acta 2007;1775:181-232.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики связанного с беременностью нарушения с применением образца, полученного от беременной плодом женщины, где связанное с беременностью нарушение является нарушением, характеризующимся аномальным относительным уровнем экспрессии генов в ткани матери или плода, и не характеризуется хромосомными аномалиями плода, причем указанный способ включает

получение множества ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца, причем образец содержит смесь молекул РНК материнского и плодного происхождения;

идентификацию с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности;

идентификацию одного или большего количества информативных локусов, где локус считается информативным, когда он гомозиготен у первого субъекта по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у второго субъекта по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю, где первый субъект представляет собой беременную женщину или плод, второй субъект представляет собой плод или беременную женщину соответственно и где информативный локус может быть идентифицирован либо как специфичный для матери, либо как специфичный для плода;

выбор среди указанных идентифицированных информативных локусов определенных информативных локусов в соответствии со следующими критериями:

локусы расположены внутри экспрессируемой области указанной референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, причем первое заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования, и

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, где второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

для каждого из выбранных информативных локусов:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление первой суммы, представляющей собой сумму указанных первых чисел, и второй суммы, представляющей собой сумму указанных вторых чисел;

вычисление отношения первой суммы и второй суммы,

сравнение указанного отношения с пороговым значением, определенным так, как раскрыто в описании, для определения того, присутствует ли связанное с беременностью нарушение, при этом указанное пороговое значение определяют по одному или большему количеству образцов, полученных от беременных женщин, не имеющих связанного с беременностью нарушения.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный образец беременной женщины представляет собой образец плазмы крови.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что второй субъект представляет собой беременную женщину.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что второй субъект представляет собой плод.

5. Способ по п.1, в котором вычисление отношения первой суммы и второй суммы включает деление второй суммы на сумму первой суммы и второй суммы.

6. Способ по п.1, в котором анализ молекул РНК, полученных из образца, включает секвенирование указанных молекул РНК или их кДНК-копий.

7. Способ по п.1, в котором анализ молекул РНК, полученных из образца, включает проведение цифровой ПЦР.

8. Способ по п.1, в котором идентификация положений ридов в референсной последовательности включает выравнивание указанных ридов с референсной последовательностью.

9. Способ по п.1, в котором первое заранее определенное число ридов составляет 1 и второе заранее определенное число ридов составляет 1.

10. Способ по п.1, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа беременной женщины в каждом информативном локусе.

11. Способ по п.1, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы, для определения генотипа плода в каждом информативном локусе.

12. Способ по п.1, дополнительно включающий оценку в образце части РНК материнского или плодного происхождения, где часть РНК второго субъекта представляет собой указанное отношение, умноженное на величину, выражающую общий уровень экспрессии обоих аллелей в выбранных информативных локусах по отношению к экспрессии вторых аллелей в указанных выбранных информативных локусах у второго субъекта, а часть РНК, происходящую из первого субъекта, получают вычитанием части РНК, происходящей из второго субъекта, из 1, причем указанную величину, выражающую общий уровень экспрессии обоих аллелей в указанных выбранных локусах по отношению к экспрессии указанных вторых аллелей в указанных выбранных информативных локусах у второго субъекта, определяют так, как раскрыто в описании.

13. Способ определения в образце, полученном от беременной плодом женщины, части РНК плодного происхождения, причем указанный способ включает

получение совокупности ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца, причем образец содержит смесь молекул РНК материнского и плодного происхождения;

идентификацию с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности, где референсная последовательность представляет собой последовательность генома человека;

идентификацию одного или большего количества информативных материнских локусов, где локус считается информативным, когда он гомозиготен у плода по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у беременной женщины по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю;

выбор среди указанных идентифицированных информативных материнских локусов определенных информативных локусов в соответствии со следующими критериями:

локусы расположены внутри экспрессируемой области указанной референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, причем первое заранее определенное число ридов соответствует тре-

буемому качеству прочтения или глубине секвенирования, и

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, где второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

для каждого из выбранных информативных материнских локусов:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном материнском локусе и содержащих соответствующий первый аллель;

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном материнском локусе и содержащих соответствующий второй аллель;

вычисление суммы указанного первого числа и указанного второго числа;

вычисление материнского отношения как второго числа, разделенного на указанную сумму;

определение величины общего уровня экспрессии обоих аллелей в выбранном информативном материнском локусе по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в указанных выбранных информативных локусах у беременной женщины;

умножение материнского отношения на указанную величину, выражающую общий уровень экспрессии обоих аллелей в выбранном информативном материнском локусе по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в указанных выбранных информативных локусах у беременной женщины, для получения материнского вклада;

вычисление плодного вклада посредством вычитания материнского вклада из единицы и

определение в образце части РНК, происходящей от плода, причем указанная часть представляет собой среднее значение плодных вкладов для выбранных информативных материнских локусов,

причем величину, выражающую общий уровень экспрессии обоих аллелей в указанных выбранных информативных материнских локусах по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в указанных выбранных информативных материнских локусах у беременной женщины определяют так, как раскрыто в описании.

14. Способ по п.13, в котором указанное среднее значение взвешено по суммам указанного первого числа и указанного второго числа для выбранных информативных материнских локусов.

15. Способ по п.13, в котором указанная величина, выражающая общий уровень экспрессии в выбранном информативном материнском локусе по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в указанных выбранных информативных материнских локусах у беременной женщины, равна 2.

16. Способ по п.13, в котором указанный образец беременной женщины представляет собой образец плазмы крови.

17. Способ по п.13, в котором анализ молекул РНК, полученных из образца, включает секвенирование указанных молекул РНК или их кДНК-копий

18. Способ по п.13, в котором анализ молекул РНК, полученных из образца, включает проведение цифровой ПЦР.

19. Способ по п.13, в котором идентификация положений ридов в референсной последовательности включает выравнивание указанных ридов с этой референсной последовательностью.

20. Способ по п.13, в котором первое заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных материнских локусов составляет 1 и второе заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных материнских локусов составляет 1.

21. Способ по п.13, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа беременной женщины в каждом из информативных материнских локусов.

22. Способ по п.13, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы, для определения генотипа плода в каждом из информативных материнских локусов.

23. Способ по п.13, дополнительно включающий

идентификацию одного или большего количества информативных локусов плода, где локус считается информативным, если он гомозиготен у беременной женщины по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у плода по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю;

выбор среди указанных идентифицированных информативных локусов одного или большего количества определенных информативных локусов плода в соответствии со следующими критериями для идентификации определенных информативных локусов:

локусы расположены внутри экспрессируемой области указанной референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, причем первое заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвинирования, и

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, причем второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвинирования,

для каждого из выбранных информативных локусов плода:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе плода и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе плода и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление суммы указанного первого числа и указанного второго числа,

вычисление плодного отношения как второго числа, разделенного на эту сумму,

определение величины, выражающей общий уровень экспрессии в выбранном информативном локусе плода, по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в выбранном информативном локусе плода у плода;

умножение плодного отношения на указанную величину, выражающую общий уровень экспрессии обоих аллелей в выбранном информативном локусе плода по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в выбранном информативном локусе плода у плода для получения плодного вклада, и

определение в образце части РНК, происходящей от плода, отличающееся тем, что

указанная часть представляет собой среднее значение плодного вклада для выбранных информативных материнских локусов и выбранных информативных локусов плода,

причем величину, выражающую общий уровень экспрессии обоих аллелей в указанном выбранном информативном локусе плода по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в указанном выбранном информативном локусе плода у плода, определяют так, как раскрыто в описании.

24. Способ по п.23, в котором указанное среднее значение взвешено по суммам указанного первого числа и указанного второго числа для выбранных информативных материнских локусов и выбранных информативных локусов плода.

25. Способ по п.23, в котором указанная величина, выражающая общий уровень экспрессии в выбранном информативном локусе плода по отношению к экспрессии соответствующего второго аллеля в выбранном информативном локусе плода у плода, равна 2.

26. Способ по п.23, в котором первое заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных локусов плода составляет 1 и второе заранее определенное число ридов для одного или большего количества выбранных информативных локусов плода составляет 1.

27. Способ по п.23, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа указанной беременной женщины в каждом информативном локусе плода.

28. Способ по п.23, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы для определения генотипа плода в каждом информативном локусе плода.

29. Способ по п.13 или 23, дополнительно включающий диагностирование связанного с беременностью нарушения путем сравнения части РНК в образце, происходящей от плода, с пороговым значением, определенным так, как раскрыто в описании.

30. Способ определения того, является ли геномный локус материнским или плодным маркером связанного с беременностью нарушения, путем анализа образца, полученного от беременной плодом женщины, где связанное с беременностью нарушение является нарушением, характеризующимся аномальным относительным уровнем экспрессии генов в ткани матери или плода, и не характеризуются хромосомными аномалиями плода, причем указанный способ включает

получение совокупности ридов, при этом указанные риды получают в результате анализа молекул РНК, полученных из указанного образца, причем образец содержит смесь молекул РНК материнского и плодного происхождения;

идентификацию с помощью компьютерной системы положений ридов в референсной последовательности;

идентификацию одного или большего количества информативных локусов, где локус считается информативным, когда он гомозиготен у первого субъекта по соответствующему первому аллелю и гетерозиготен у второго субъекта по соответствующему первому аллелю и соответствующему второму аллелю, при этом первый субъект представляет собой беременную женщину или плод и второй субъект представляет собой плод или беременную женщину соответственно, и где информативный локус может быть идентифицирован как специфичный для матери или как специфичный для плода;

выбор среди указанных идентифицированных информативных локусов определенных информативных локусов в соответствии со следующими критериями:

локусы расположены внутри экспрессируемой области этой референсной последовательности,

в локусах расположено, по меньшей мере, первое заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий первый аллель, причем первое заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования, и

в локусах расположено, по меньшей мере, второе заранее определенное число ридов, содержащих соответствующий второй аллель, причем второе заранее определенное число ридов соответствует требуемому качеству прочтения или глубине секвенирования,

для каждого из выбранных информативных локусов:

определение первого числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий первый аллель,

определение второго числа ридов, расположенных в указанном выбранном информативном локусе и содержащих соответствующий второй аллель,

вычисление отношения указанного первого числа и указанного второго числа,

идентификацию выбранного информативного локуса как маркера второго субъекта, если указанное отношение превышает пороговое значение, определенное так, как раскрыто в описании.

31. Способ по п.30, в котором указанный образец беременной женщины представляет собой образец плазмы крови.

32. Способ по п.30, в котором второй субъект представляет собой беременную женщину.

33. Способ по п.30, в котором второй субъект представляет собой плод.

34. Способ по п.30, в котором вычисление отношения указанного первого числа и указанного второго числа включает деление второго числа на сумму указанного первого числа и указанного второго числа.

35. Способ по п.30, в котором указанное пороговое значение составляет от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,5.

36. Способ по п.35, в котором указанное пороговое значение составляет 0,4.

37. Способ по п.30, в котором анализ молекул РНК, полученных из образца, включает секвенирование указанных молекул РНК или их кДНК-копий.

38. Способ по п.30, в котором анализ молекул РНК, полученных из образца, включает проведение цифровой ПЦР.

39. Способ по п.30, в котором идентификация положений ридов в референсной последовательности включает выравнивание указанных ридов с этой референсной последовательностью.

40. Способ по п.30, в котором первое заранее определенное число ридов составляет 1 и второе заранее определенное число ридов составляет 1.

41. Способ по п.30, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из материнской ткани, для определения генотипа указанной беременной женщины в каждом информативном локусе.

42. Способ по п.30, дополнительно включающий секвенирование геномной ДНК, полученной из плаценты, ворсин хориона, амниотической жидкости или материнской плазмы, для определения генотипа плода в каждом информативном локусе.

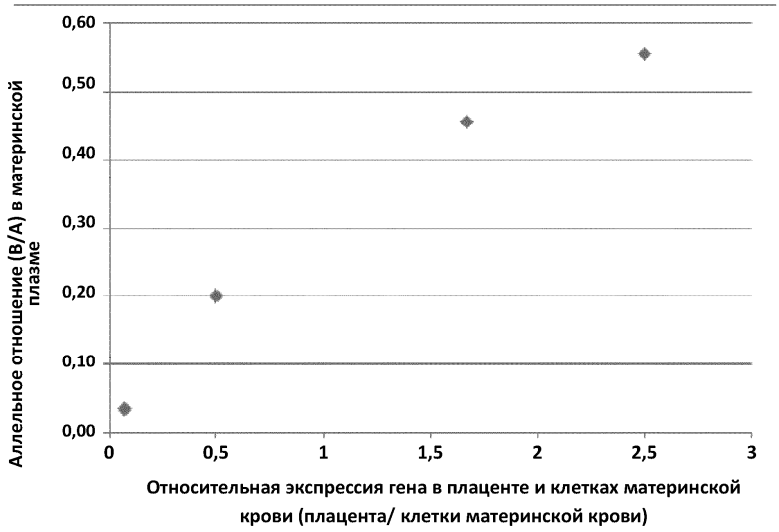
43. Способ по п.30, дополнительно включающий определение в РНК из образца, содержащей выбранный информативный локус, части РНК, происходящей от второго субъекта, в котором указанную часть определяют путем умножения указанного отношения на величину, выражающую общий уровень экспрессии в выбранных информативных локусах по отношению к экспрессии вторых аллелей в выбранных информативных локусах у второго субъекта.

44. Способ по п.43, в котором величина, выражающая общий уровень экспрессии в выбранных информативных локусах по отношению к экспрессии вторых аллелей в указанных выбранных информативных локусах у второго субъекта, равна 2.

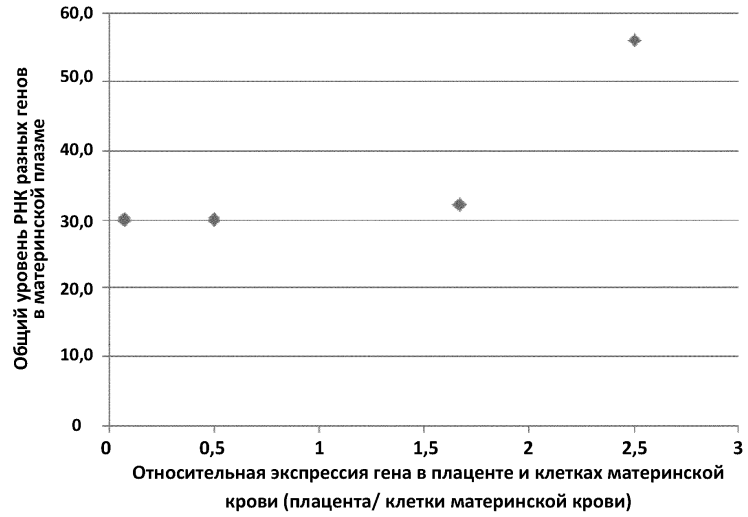
45. Способ по п.43, дополнительно включающий определение части РНК, происходящей от первого субъекта, путем вычитания части РНК, происходящей от второго субъекта, из 1.

46. Система, содержащая один или большее количество процессоров, обеспечивающих возможность осуществления любого из способов по пп.1-45.

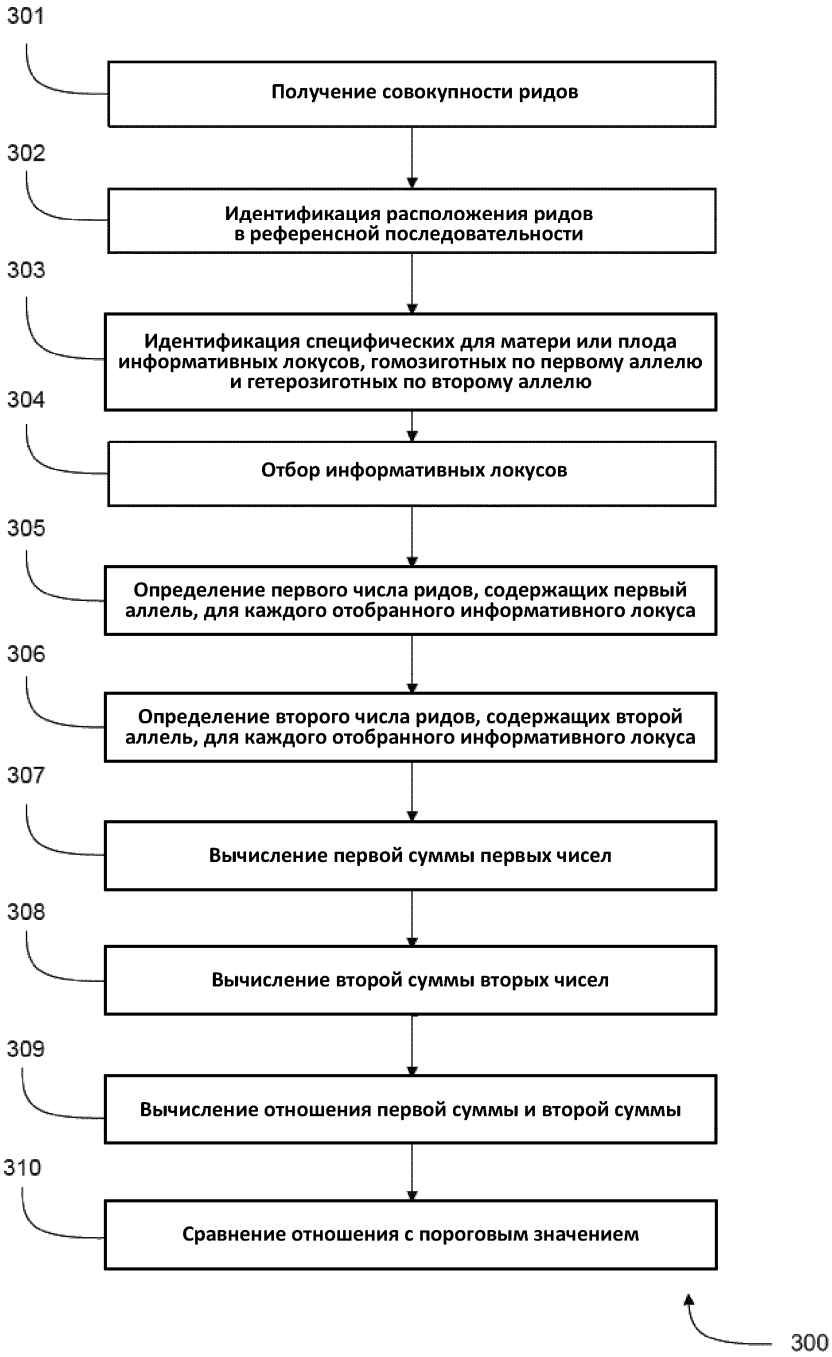
47. Компьютерный продукт, содержащий машиночитаемый носитель, где хранится множество инструкций для управления процессором для осуществления операции согласно любому из способов по пп.1-45.


0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Аллельное отношение (B/A) в материнской плазме
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
Относительная экспрессия гена в плаценте и клетках материнской крови (плацента/ клетки материнской крови)

Фиг. 1


60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0
Общий уровень РНК разных генов в материнской плазме
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
Относительная экспрессия гена в плаценте и клетках материнской крови (плацента/ клетки материнской крови)

Фиг. 2


301
Получение совокупности ридов
302
Идентификация расположения ридов в референсной последовательности
303
Идентификация специфических для матери или плода информативных локусов, гомозиготных по первому аллелю и гетерозиготных по второму аллелю
304
Отбор информативных локусов
305
Определение первого числа ридов, содержащих первый аллель, для каждого отобранного информативного локуса
306
Определение второго числа ридов, содержащих второй аллель, для каждого отобранного информативного локуса
307
Вычисление первой суммы первых чисел
308
Вычисление второй суммы вторых чисел
309
Вычисление отношения первой суммы и второй суммы
310
Сравнение отношения с пороговым значением
300

Фиг. 3

Тип образца	Образец	Необработанные риды	Предварительно обработанные риды[a]	(%)[b]	Картируемые риды[c]	(%)[d]
Плазма небеременной женщины	CTR081	180 080 810	23 012 332	12,78%	7 708 011	33,50%
	CTR082	132 567 446	20 559 146	15,51%	6 848 249	33,31%
Дородовая материнская плазма	M9600P	367 301 939	45 255 199	12,32%	16 849 461	37,23%
	M9549P	597 724 438	151 243 195	25,30%	34 627 313	22,90%
	M9356P	820 742 404	190 030 278	23,15%	14 091 631	7,42%
	M9415P	970 145 241	143 615 377	14,80%	41 517 504	28,91%
Послеродовая материнская плазма	M9356BP	587 698 232	132 012 632	22,46%	7 828 124	5,93%
	M9415BP	853 401 365	101 070 496	11,84%	26 707 674	26,42%
Плацента	N9356	202 711 386	169 500 629	83,62%	160 417 620	94,64%
	N9415	257 219 381	203 094 642	78,96%	193 126 555	95,09%
Клетки материнской крови	M9600W	163 832 386	38 707 658	23,63%	11 348 398	29,32%
	M9549W	240 383 043	83 922 150	34,91%	73 117 147	87,12%
	M9356W	208 400 902	60 851 642	29,20%	54 974 1 58	90,34%
	M9415W	265 636 207	49 943 628	18,80%	42 670 781	85,44%

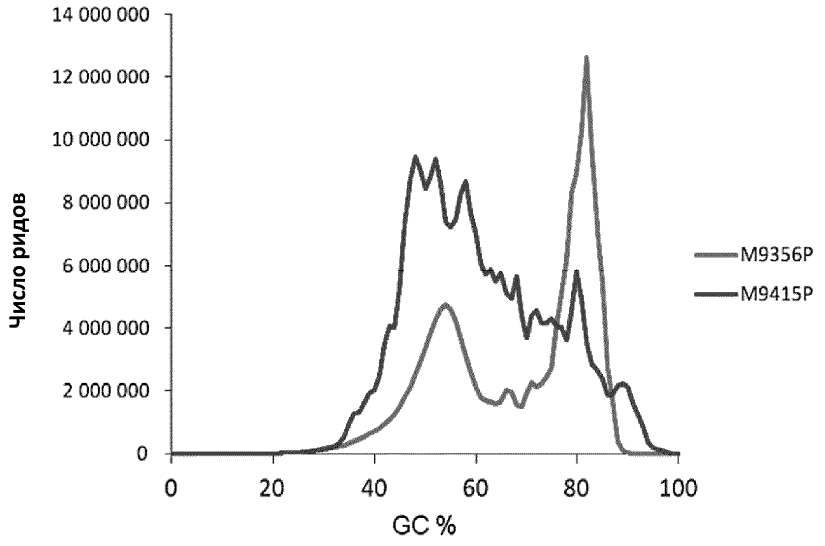
a. Оставшиеся риды после удаления часто повторяющихся ридов.
b. % необработанных ридов.
c. См. дополнительную таблицу 2B с подробной расшифровкой.
d. % предварительно обработанных ридов.

Фиг. 4

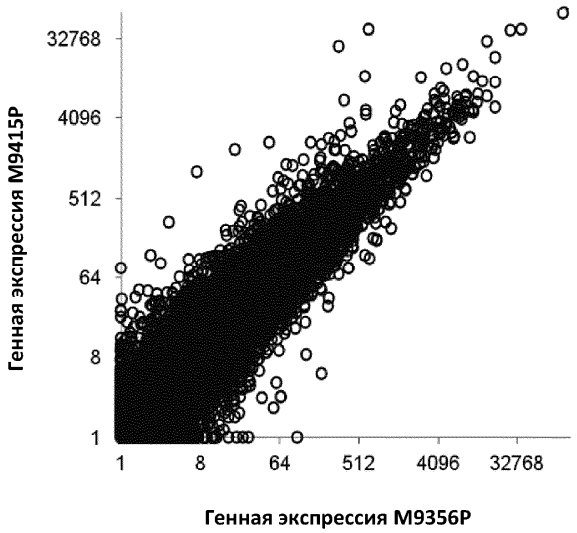
Тип образца	Образец	Отобранные риды[a]	Пригодные для анализа риды[b]	Экзон (%)	Интрон (%)	Межгенная область (%)[c]
Плазма небеременной женщины	CTR081	4 186 990	3 521 021	64,00%	6,47%	29,53%
	CTR082	3 594 966	3 253 283	61,93%	7,29%	30,78%
Дородовая материнская плазма	M9600P	7 711 430	9 138 031	64,42%	6,47%	29,10%
	M9549P	20 481 388	14 145 925	41,84%	13,16%	45,00%
	M9356P	1 683 896	12 407 735	56,80%	30,76%	12,45%
	M9415P	23 164 778	18 352 726	53,61%	10,80%	35,59%
Послеродовая материнская плазма	M9356BP	988 066	6 840 058	50,41%	38,15%	11,44%
	M9415BP	15 853 377	10 854 297	50,12%	13,68%	36,19%
Плацента	N9356	3 204 907	157 212 713	31,18%	55,89%	12,93%
	N9415	4 186 711	188 939 844	26,51%	59,59%	13,90%
Клетки материнской крови	M9600W	854 869	10 493 529	69,71%	23,50%	6,79%
	M9549W	8 120 655	64 996 492	66,98%	26,67%	6,36%
	M9356W	4 255 081	50 719 077	69,13%	24,70%	6,16%
	M9415W	5 318 314	37 352 467	85,68%	10,74%	3,58%

a. Отобранные риды в основном представляют ядерные и митохондриальные рРНК и тРНК.
b. Пригодные для анализа риды = общее число картируемых ридов минус отобранные риды.
c. % ридов, выравнивающихся с областями вне экзонов и интронов референсных генов.

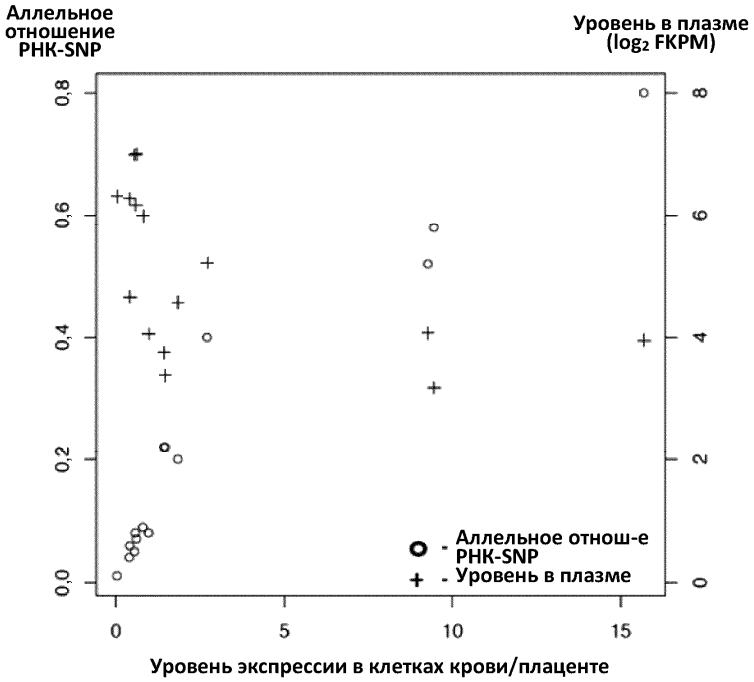
Фиг. 5



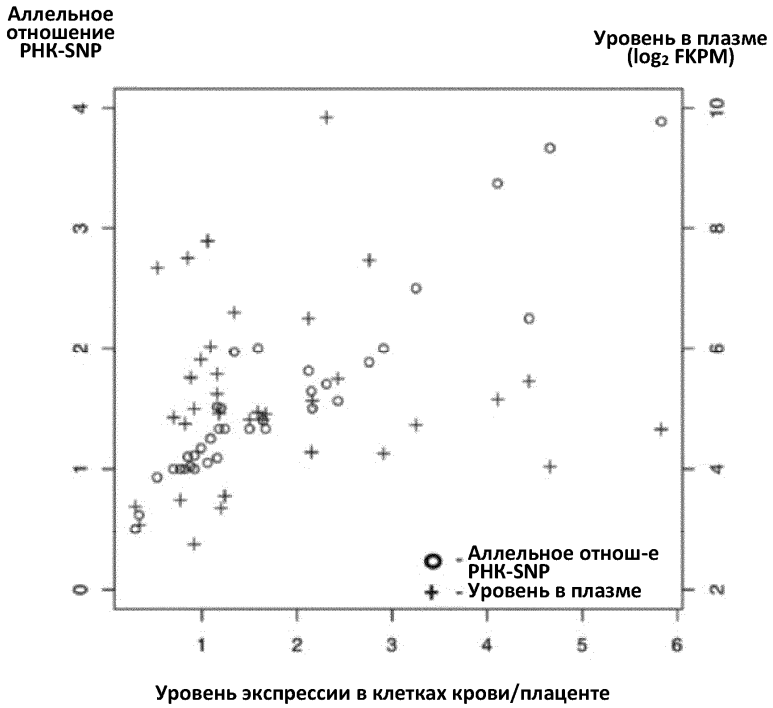
Фиг. 6A


Генная экспрессия M9415P
32768
4096
512
64
8
1
1
8
64
512
4096
32768
Генная экспрессия M9356P

Фиг. 6В


Аллельное отношение РНК-SNP
Уровень в плазме (log2 FKPM)
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
0
2
4
6
8
0
5
10
15
Уровень экспрессии в клетках крови/плаценте
- Аллельное отнош-е РНК-SNP
- Уровень в плазме

Фиг. 7



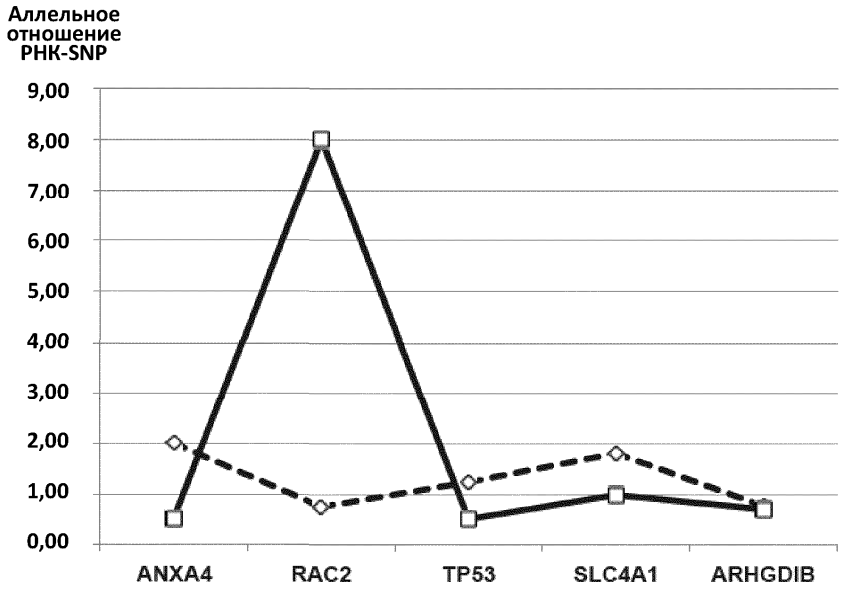
Фиг. 8

Специфические для плода аллели SNP (мать: AA, плод: AB)	SNP	Отношение плодный/ общий аллель	Среднее отношение РНК-SNP на ген	FPKM плаценты	FPKM клеток крови	Кратность различия (плацента/клетки крови)	FPKM плазмы
AFF1	SNP 7:rs342462	0,28	**0,52**	149,731	16,1598	**9,27**	**16,7037**
	SNP 8:rs342459	1					
	SNP 9:rs10029915	0,29					
SH3BGRL2	SNP 13:rs1507	0,07	**0,07**	24,7477	40,3078	**0,61**	**128,2908**
SLC38A1	SNP 3:rs3742058	0,17	**0,58**	142,8723	15,1123	**9,45**	**9,0209**
	SNP 4:rs3742059	1					
PTTG1IP	SNP 6:rs873317	0,4	**0,4**	152,8104	56,4153	**2,71**	**37,1191**
GIMAP1-GIMAP5	SNP 14:rs1046355	0,04	**0,04**	15,9771	39,9271	**0,4**	**77,4282**
CTSS	SNP 1:rs3754212	0,01	**0,01**	11,0084	382,8589	**0,03**	**79,3012**
RHOBTB3	SNP 10:rs34896	1	**0,8**	338,5763	21,5841	**15,69**	**15,4046**
	SNP 11:rs34898	0,6					
	SNP 12:rs34899	0,8					
ARHGEF12	SNP 2:rs192719576	0,09	**0,09**	88,5256	110,1833	**0,8**	**63,7037**
TXNRD1	SNP 5:rs11111979	0,2	**0,2**	65,9309	35,795	**1,84**	**23,6787**
HPCAL1	SNP 11:rs2270302	0,06	**0,06**	17,2498	42,5469	**0,41**	**25,2768**
RAB4A	SNP 2:rs15452	0,08	**0,08**	12,7741	22,2066	**0,58**	**72,2382**
PGM2	SNP 13:rs3752683	0,22	**0,22**	33,0576	23,045	**1,43**	**13,4293**
PSMB3	SNP 10:rs228274	0,05	**0,05**	65,0683	117,5188	**0,55**	**127,3262**
ADIPOR2	SNP 4:rs12342	0,08	**0,08**	18,1942	18,7699	**0,97**	**16,5717**
	SNP 5:rs1044471	0,08					
CHFR	SNP 9:rs35011845	0,22	**0,22**	21,9501	15,0583	**1,46**	**10,3748**

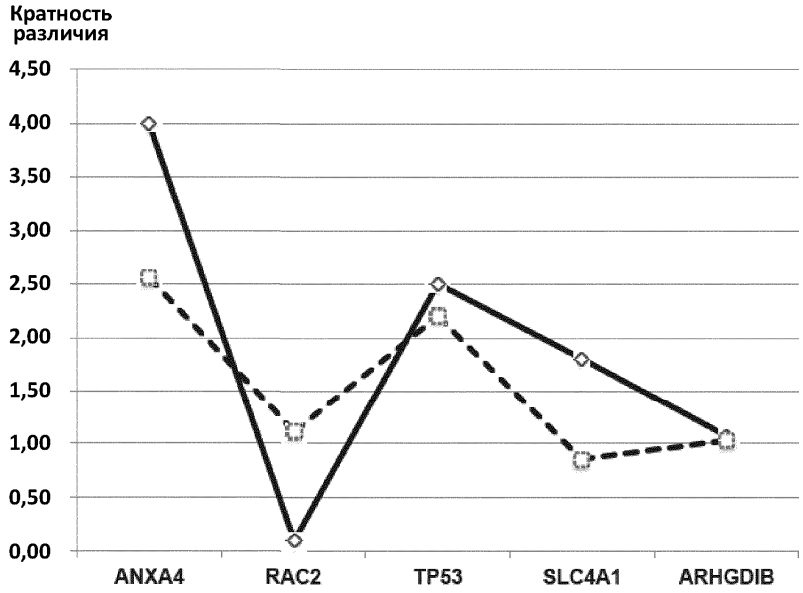
Фиг. 9

Специфические для матери аллели SNP (Мать: AB, Плод: AA)	SNP	Отношение материнский аллель/общий аллель	Среднее отношение RNA-SNP на ген	FPKM плаценты	FPKM клеток крови	Кратность различия (клетки крови/Плацента)	FPKM плазмы
AKAP10	SNP 18:rs2108978	1,33	**1,33**	22,414	18,1324	**1,24**	**11,7168**
EIF2S2	SNP 37:rs4911406	1,25	**1,25**	39,3008	35,9748	**1,09**	**65,1988**
JHDM1D	SNP 51:rs76676651	1,4	**1,4**	43,0656	26,1836	**1,64**	**28,1734**
	SNP5:rsll022O79	0,5	**0,5**	10,735	36,1867	**0,3**	**10,3945**
USP47	SNP 6: rs 148238084	0,5					
PPP4R2	SNP40:rs61188513	1,09	**1,09**	80,3628	69,563	**1,16**	**47,4149**
	SNP 15:rs4779520	0,78	**1,64**	22,9283	10,6869	**2,15**	**19,3486**
KLF13	SNP 16: rs 6493629	2,5					
FAM107B	SNP4:rsll259151	2	**2**	24,1097	15,1776	**1,59**	**30,5864**
APOL2	SNP 39:rs 132759	1,33	**1,33**	17,9996	12,0226	**1,5**	**28,1601**
	SNP 10:rs2389910	1,56	**1,11**	27,2282	29,7396	**0,92**	**31,7672**
RAP2A	SNP ll:rsl2873919	0,67					
	SNP l:rsll7963129	4	**3,37**	48,3896	11,7589	**4,11**	**35,3443**
	SNP 2:rs 1055184	5					
RIT1	SNP 3:rs493446	1,12					
STK17A	SNP48:rs56286238	1,33	**1,33**	61,0052	36,447	**1,67**	**30,0074**
	SNP 23:rsl4031	0,5	**0,62**	11,0432	32,3155	**0,34**	**8,3988**
C19orf63	SNP24:rsl046246	0,75					
SMEK1	SNP 14:rsl0135595	1	**1**	27,1212	33,0441	**0,82**	**26,8366**
	SNP 42:rs3797341	1,5	**1,02**	26,837	30,3427	**0,88**	**45,4491**
	SNP43:rs3203922	0,78					
TNFAIP8	SNP44:rsl045242	0,79					
CPEB4	SNP46:rsl2659398	1	**1**	28,4523	40,5723	**0,7**	**28,802**
PTPRJ	SNP7:rsll7902837	2	**2**	59,7568	20,5437	**2,91**	**19,0642**
RPL36	SNP22:rs3810220	1,7	**1,7**	152,2501	65,9528	**2,31**	**921,8925**
	SNP25:rsll37288	1,62	**1,88**	114,7107	41,6213	**2,76**	**176,8333**
	SNP 26:rs3087895	2,17					
	SNP 27:rs3768670	1,86					
YPEL5	SNP28:rs3768671	1,86					
	SNP53:rsll4261839	1	**1,33**	51,7974	43,9599	**1,18**	**30,1847**
	SNP 54:rs208753	1,4					
	SNP55:rsl7635381	2,27					
PCM1	SNP 56:rs6991775	0,67					
UBR2	SNP47:rs6916713	2,25	**2,25**	102,9892	23,2007	**4,44**	**43,5569**
	SNP 32:rs3747	1,22	**1,97**	50,467	37,5349	**1,34**	**96,8859**
	SNP 33:rs9579	2,17					
	SNP 34:rs3088214	2,89					
TNS1	SNP35:rsl063281	1,62					
EIF4A1	SNP 17:rsl057086	0,93	**0,93**	70,1974	132,2932	**0,53**	**161,6599**
BACH1	SNP 38:rs 15092	2,5	**2,5**	112,4409	34,6219	**3,25**	**26,4284**
	SNP 49:rs6850	1,11	**1,05**	66,7742	62,9202	**1,06**	**220,7639**
PPIA	SNP 50:rs6904	1					
TMX1	SNP 12:rs7160810	1	**1**	11,8758	12,8978	**0,92**	**6,7127**
ANKRD44	SNP 29:rs3731569	3,67	**3,67**	65,5013	14,0504	**4,66**	**16,412**
	SNP 57:rs3398	0,33	**1,51**	43,1289	37,048	**1,16**	**37,6685**
ZFAND5	SNP 58:rs969	2,69					
	SNP 19:rs 12327477	0,67	**3,89**	171,6269	29,4281	**5,83**	**25,153**
	SNP 20:rs2304859	7					
SMCHD1	SNP 21:rs7238459	4					
NR3C1	SNP 45:rs6191	1	**1**	28,0561	36,5516	**0,77**	**11,2138**
CRNKL1	SNP 36:rs2255255	1,5	**1,5**	15,8244	13,148	**1,2**	**10,1897**
CALM1	SNP 13:rs5871	1,1	**1,1**	76,0647	89,0949	**0,85**	**181,3474**
FDFT1	SNP 52:rs79708434	1,56	**1,56**	83,9629	34,6215	**2,43**	**44,9826**
	SNP 30:rsl051677	1	**1,17**	74,6452	75,2029	**0,99**	**55,8144**
XRCC5	SNP 31X52440	1,33					
	SNP 8:rs3741380	2,75	**1,81**	29,7293	14,0146	**2,12**	**90,3776**
EHBP1L1	SNP 9:rs6591182	0,88					
OPA1	SNP 41:rs7643844	1,5	**1,5**	49,1647	22,7367	**2,16**	**34,8335**

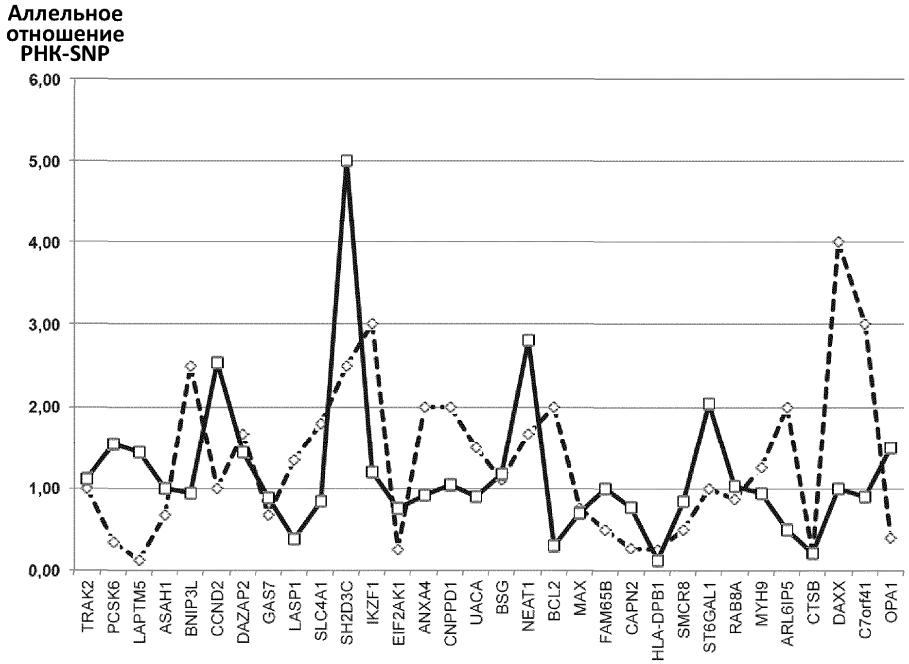
Фиг. 10



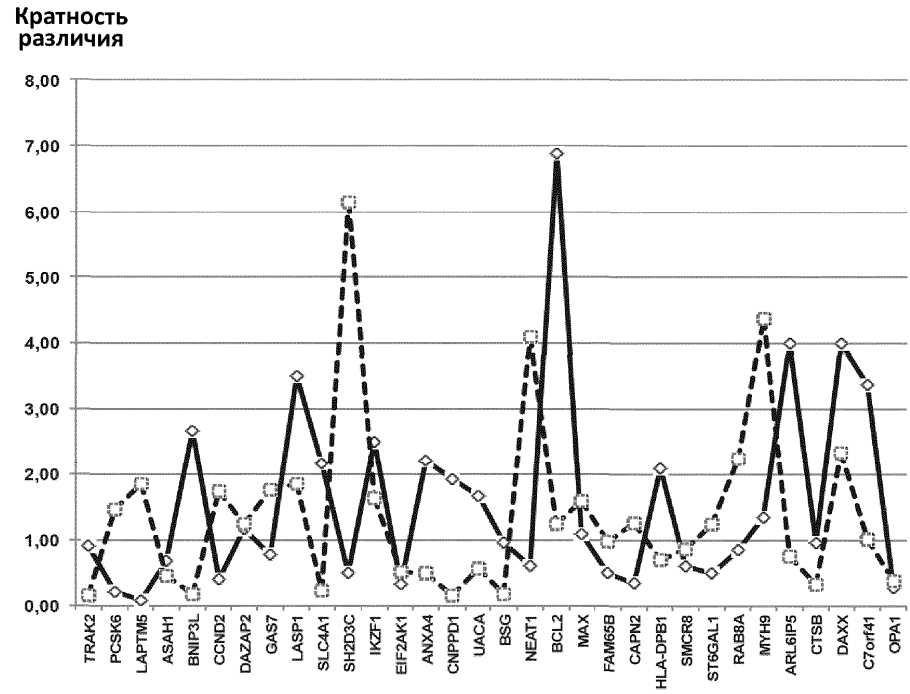
Фиг. 11A



Фиг. 11B



Фиг. 12A



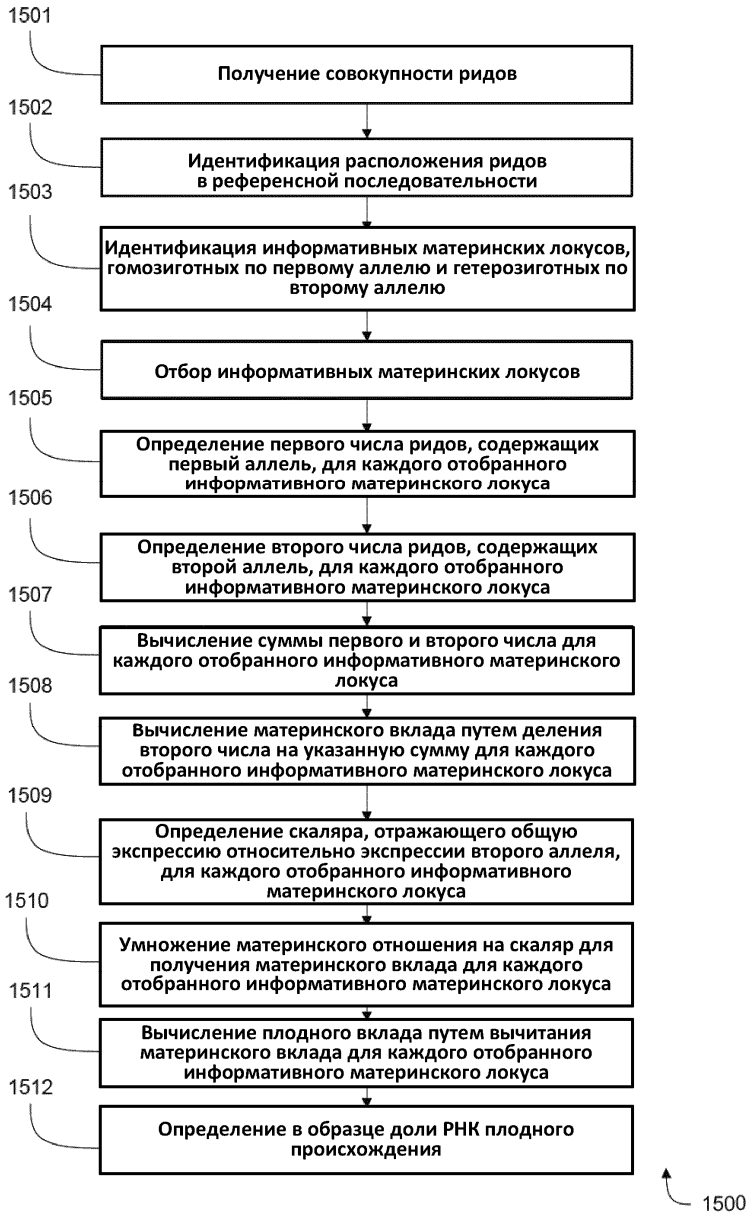
Фиг. 12B

	5641 (PET) (GA: 36 6/7)			7171 (Норма) (GA: 36 6/7)			Кратность изменения отношения RNA-SNP для каждого гена (5641 и 7171)	Уровень экспрессии в плазме		
Специфические для матери аллели SNP (Мать: AB, Плод: AA)	SNP	Отношение материнский аллель/общий аллель	Среднее отношение RNA-SNP на ген	SNP	Отношение материнский аллель/общий аллель	Среднее отношение RNA-SNP на ген		5641 FPKM	7171 FPKM	Кратность изменения FPKM (5641 и 7171)
ANXA4	SNP 1:kgp9682337	2	**2**	SNP 9:rs6546548	0,5	**0,5**	**4**	12,1379	4,7565	**2,551855356**
RAC2	SNP 3:rs6572	0,75	**0,75**	SNP 8:rs2239774	8	**8**	**0,09375**	319,973	288,0231	**1,110928255**
TP53	SNP 2:rs17879353	0,5	**1,25**	SNP 4:rs1042522	0,5	**0,5**	**2,5**	28,9503	13,1548	**2,200740414**
	SNP 4:rs1042522	2								
SLC4A1	SNP 5:rs5035	1,8	**1,8**	SNP 7:rs2072081	1	**1**	**1,8**	165,1352	192,3307	**0,858600317**
ARHGDIB	SNP 6:kgp6869929	0,76	**0,76**	SNP 6:kgp686992	0,71	**0,71**	**1,070422535**	665,6615	640,9633	**1,038532939**

Фиг. 13

	5641 (PET) (GA: 36 6/7)			9356 (Норма) (GA37 2/7)			Кратность изменения отношения RNA-SNP для каждого гена (5641 и 7171)	Уровень экспрессии в плазме		
Специфические для матери аллели SNP (Мать: AB, Плод: AA)	SNPs	Отношение материнский аллель/общий аллель	Среднее отношение RNA-SNP на ген	SNP	Отношение материнский аллель/общий аллель	Среднее отношение RNA-SNP на ген		5641 FPKM	9356 FPKM	Кратность изменения FPKM (5641 и 7171)
TRAK2	SNP2:kgp14544935	1	**1**	SNP 62:rs11898629	0,8	**1,11**	**0,900900901**	95,0691	618,1783	**0,153789125**
				SNP 63:rs3795966	1,47					
				SNP 64:rs13022344	1,04					
PCSK6	SNP26:kgp8258505	0,33	**0,33**	SNP 48:rs1058260	1,54	**1,54**	**0,214285714**	22,3438	15,3949	**1,451376755**
LAPTM5	SNP 7:kgp15703090	0,12	**0,12**	SNP 38:rs8048	1,43	**1,43**	**0,083916084**	215,8869	117,3578	**1,83956158**
ASAH1	SNP 3:kgp3689333	0,67	**0,67**	SNP 85:rs71526182	1	**1**	**0,67**	35,6956	78,8371	**0,452776675**
BNIP3L	SNP 5:rs17310286	2,5	**2,5**	SNP 5:rs17310286	1,09	**0,94**	**2,659574468**	139,6533	783,6419	**0,178210609**
				SNP 86:rs1042992	0,78					
CCND2	SNP 11 :rs1049606	1	**1**	SNP 11:rs1049606	1,07	**2,54**	**0,393700787**	39,864	22,9748	**1,735118478**
				SNP 42:rs3217925	4					
DAZAP2	SNP 25:kgp1918624	1,67	**1,67**	SNP 43:rs1049467	1,43	**1,43**	**1,167832168**	104,3778	84,1193	**1,240830582**
GAS7	SNP31:rs2240739	0,67	**0,67**	SNP49:rs14383	0,25	**0,88**	**0,761363636**	12,6931	7,2272	**1,756295661**
				SNP 50:rs16958968	1,5					
LASP1	SNP 29:kgp8909974	1,33	**1,33**	SNP 53:rs11539845	0,38	**0,38**	**3,5**	72,976	39,5819	**1,843670971**
SLC4A1	SNP 4:rs5035	1,8	**1,8**	SNP 54:rs13306788	0,83	**0,83**	**2,168674699**	165,1352	726,2616	**0,227377022**
SH2D3C	SNP 17:rs514024	2,5	**2,5**	SNP 87:rs35019975	5	**5**	**0,5**	31,7735	5,1573	**6,160878754**
IKZF1	SNP 21 :kgp5028738	3	**3**	SNP 82:rs72645704	1,6	**1,2**	**2,5**	45,9371	28,2684	**1,625033606**
				SNP 83:rs72645705	0,8					
EIF2AK1	SNP 22:rs2639	0,25	**0,25**	SNP 79:rs2640	0,8	**0,75**	**0,333333333**	69,0985	133,6252	**0,517106803**
				SNP 22:rs2639	0,71					
ANXA4	SNP1:kgp9682337	2	**2**	SNP 61 :rs2228203	0,91	**0,91**	**2,197802198**	12,1379	24,8486	**0,4884742**
CNPPD1	SNP8:rs1043160	2	**2**	SNP 65:rs11236	1,1	**1,04**	**1,923076923**	26,7431	163,7143	**0,163352255**
				SNP 66:rs1127102	1,08					
				SNP8:rs1043160	1,36					
				SNP 67:rs1127101	0,61					
UACA	SNP 16:rs934005	1,5	**1,5**	SNP 16:rs934005	1,6	**0,9**	**1,666666667**	12,9841	23,1721	**0,560333332**
				SNP 47:rs4776525	0,2					
				SNP 47:rs4776525	0,2					
BSG	SNP 10:rs2229664	1,1	**1,1**	SNP 56:rs4682	1,2	**1,16**	**0,948275862**	151,0873	867,8964	**0,174084488**
				SNP 57:rs8637	1,32					
				SNP 58:rs8259	0,96					
NEAT1	SNP 32:rs680413	1,67	**1,67**	SNP 32:rs680413	1,12	**2,81**	**0,59430605**	83,9749	20,5134	**4,093660729**
				SNP41:rs2239895	4,5					
BCL2	SNP 36:rs1564483	2	**2**	SNP 55:rs4987857	0,29	**0,29**	**6,896551724**	13,6149	11,001	**1,237605672**
MAX	SNP 18:rs4902359	0,75	**0,75**	SNP 44:rs4902357	0,62	**0,69**	**1,086956522**	186,4324	117,3962	**1,588061624**
				SNP 45:rs1957949	0,75					
				SNP 46:rs1957948	0,74					
				SNP 18:rs4902359	0,64					
FAM65B	SNP 12:rs12183109	0,5	**0,5**	SNP 77:rs11285	1	**1**	**0,5**	38,6914	39,9277	**0,969036534**
CAPN2	SNP6:rs17598	0,33	**0,27**	SNP 39:rs3738383	0,92	**0,77**	**0,350649351**	59,5279	47,4986	**1,253255885**
	SNP 13:kgp4535923	0,2		SNP 6:rs17598	0,48					
				SNP 40:rs10961	0,93					
HLA-DPB1	SNP 27:kgp4559778	0,25	**0,25**	SNP 78:rs41558014	0,12	**0,12**	**2,083333333**	62,8314	90,6768	**0,692915939**
SMCR8	SNP 35:rs3829956	0,5	**0,5**	SNP 51 :rs1563632	1	**0,83**	**0,602409639**	4,3801	5,1181	**0,855805865**
				SNP 52:rs921985	0,67					
ST6GAL1	SNP 19:rs2284749	1	**1**	SNP 19:rs2284749	1,27	**2,04**	**0,490196078**	15,0179	12,2028	**1,230692956**
				SNP 73:rs4686848	2					
				SNP74:rs1801380	4,5					
				SNP 75:rs7559	0,4					
RAB8A	SNP 9:rs3745314	0,71	**0,87**	SNP 59:rs3745313	1,86	**1,02**	**0,852941176**	150,8067	67,5592	**2,232215598**
	SNP 20:rs17722795	1,33		SNP 9:rs3745314	0,92					
	SNP 30:rs10409364	0,44		SNP 20:rs17722795	1,17					
	SNP 37:rs1043346	1		SNP 37:rs1043346	0,38					
				SNP 60:rs1043407	0,78					
MYH9	SNP28:kgp7015684	1,25	**1,25**	SNP 68:rs2481	1,39	**0,93**	**1,344086022**	547,5822	125,4471	**4,365044708**
				SNP 69:rs7078	0,48					
				SNP 70:rs12107	0,47					
				SNP 71 :rs11089787	1,38					
ARL6IP5	SNP 33:rs7038	2	**2**	SNP 72:rs60050966	0,5	**0,5**	**4**	57,8305	77,8228	**0,743104848**
CTSB	SNP 34:kgp8442325	0,2	**0,2**	SNP 84:rs138489258	0,21	**0,21**	**0,952380952**	40,7539	124,8545	**0,326411143**
DAXX	SNP 23:rs1059231	4	**4**	SNP 23:rs1059231	1	**1**	**4**	33,1412	14,2532	**2,325176101**
C7orf41	SNP 15:rs2110394	3	**3**	SNP 80:rs702829	0,67	**0,89**	**3,370786517**	87,1367	86,8271	**1,003565707**
				SNP 81 :rs3750089	1,11					
OPA1	SNP 14:kgp7301324	0,4	**0,4**	SNP 76:rs7643844	1,5	**1,5**	**0,266666667**	13,0804	34,8335	**0,375512079**
	SNP 24:kgp8804496	0,4								

Фиг. 14


1501
Получение совокупности ридов
1502
Идентификация расположения ридов в референсной последовательности
1503
Идентификация информативных материнских локусов, гомозиготных по первому аллелю и гетерозиготных по второму аллелю
1504
Отбор информативных материнских локусов
1505
Определение первого числа ридов, содержащих первый аллель, для каждого отобранного информативного материнского локуса
1506
Определение второго числа ридов, содержащих второй аллель, для каждого отобранного информативного материнского локуса
1507
Вычисление суммы первого и второго числа для каждого отобранного информативного материнского локуса
1508
Вычисление материнского вклада путем деления второго числа на указанную сумму для каждого отобранного информативного материнского локуса
1509
Определение скаляра, отражающего общую экспрессию относительно экспрессии второго аллеля, для каждого отобранного информативного материнского локуса
1510
Умножение материнского отношения на скаляр для получения материнского вклада для каждого отобранного информативного материнского локуса
1511
Вычисление плодного вклада путем вычитания материнского вклада для каждого отобранного информативного материнского локуса
1512
Определение в образце доли РНК плодного происхождения
1500

Фиг. 15

	Ранние сроки беременности			Поздние сроки беременности		
	кол-во SNP	кол-во генов[a]		кол-во SNP	кол-во генов	
Специфические для плода аллели SNP (плод=AB, мать=AA):						
Общее число информативных SNP/генов	16 051	6 714		20 643	7 788	
SNP/гены после отбора	H/O[b]			19 463	7,581	
Транскрипты в материнской плазме	4 470	2 647	(39,43%)[c]	7 114	3 813	(48,96%)
Вклад плода (общий)	109	98	(3,70%)[d]	504	430	(11,28%)
Высокий вклад плода	25	24	(0,91 %)[e]	112	96	(2,52%)
Специфические для матери аллели SNP (плод=AA, мать=AB):						
Общее число информативных SNP/генов	15 962	6 753		19 833	7 761	
SNP/гены после отбора	H/O			19 343	7 656	
Транскрипты в материнской плазме	4 414	2 654	(39,30%)	6 995	3 717	(47,89%)
Вклад матери (общий)	3 156	2 041	(76,90%)	5 023	2 911	(78,32%)
Высокий вклад матери	1 634	1 130	(42,58%)	3 002	1 895	(50,98%)

a. Количество генов, которые содержали информативные SNP.
b. Отбор по аллелеспецифической экспрессии (ASE) не проводили для образцов, полученных на ранних сроках беременности.
c. % от общего количества информативных генов, присутствовавших в материнской плазме.
d. % транскриптов материнской плазмы, внесенных плодом.
e. % транскриптов материнской плазмы, в значительной степени внесенных плодом.

Фиг. 16

	Поздние сроки беременности		
	кол-во SNP	кол-во генов[a]	
Специфические для плода аллели SNP (плод=AB, мать=AA):			
Общее число информативных SNP/генов	20 643	7 788	
Транскрипты в материнской плазме	7 303	3 839	(49,29%)[b]
Вклад плода (общий)	581	485	(12,63%)[c]
Высокий вклад плода	132	111	(2,89%)[d]
Специфический материнский аллели SNP (плод=AA, мать=AB):			
Общее число информативных SNP/генов	19 833	7 761	
Транскрипты в материнской плазме	7 365	3 829	(49,34%)
Вклад матери (общий)	5 326	3 014	(78,72%)
Высокий вклад матери	3 321	1 986	(51,87%)

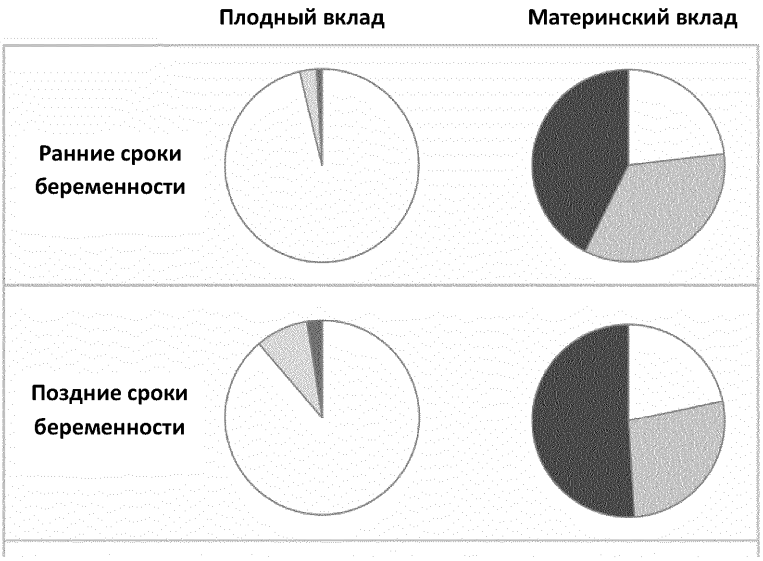
a. Количество генов, содержавших информативные SNP .

b. *%* от общего количества информативных генов, присутствовавших в материнской плазме.

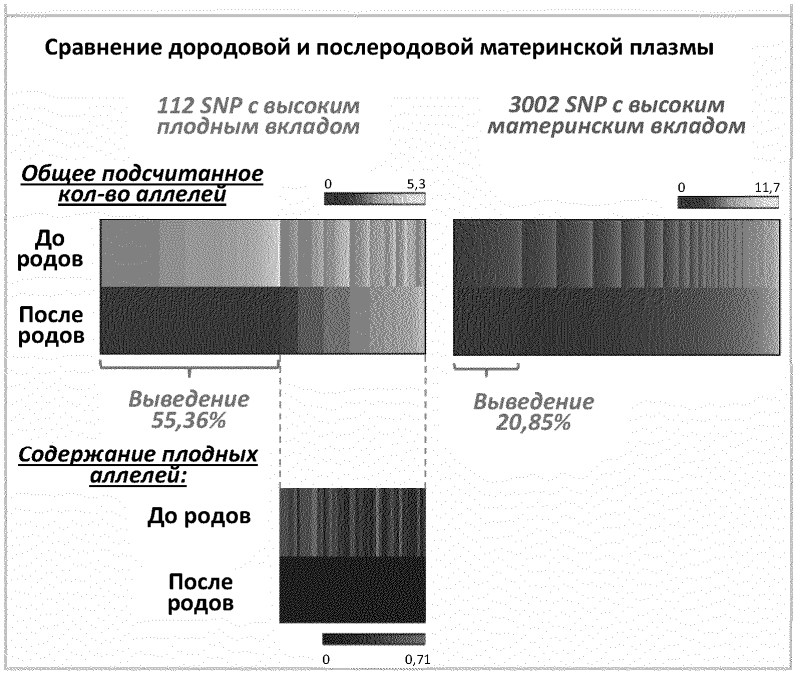
c. *%* транскриптов материнской плазмы, внесенных плодом.

d. *%* транскриптов материнской плазмы, в значительной степени внесенных плодом.

Фиг. 17



Фиг. 18A

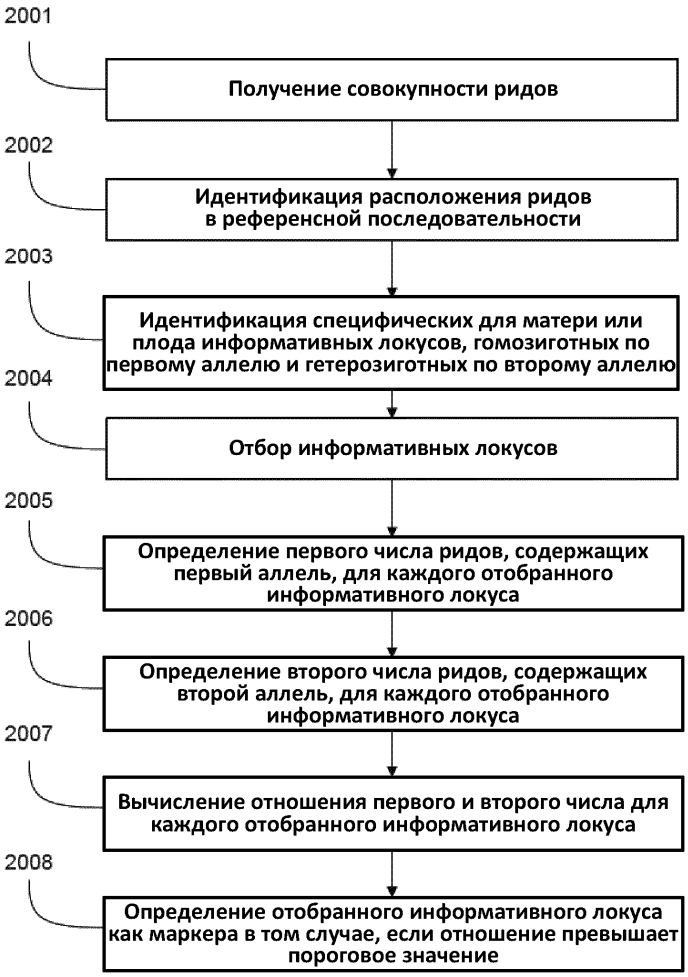


Фиг. 18B

GNAS (локус SNP: rs7121)	Генотипирование	Подсчитанное количество аллеля A (общего аллеля)	Подсчитанное количество аллеля B (специфического для матери)	Относительный вклад матери, M = 2*Материнский аллель / Материнский + плодный аллель	Относительный вклад плода, F = 1-M	FPKM
7171 (Контроль)	Мать: AB, Плод: AA	7	6	0,92	0,08	310,3

GNAS (локус SNP: rs7121)	Генотипирование	Подсчитанное количество аллеля A (общего аллеля)	Подсчитанное количество аллеля B (Специфического плодного)	Относительный вклад плода, F = 2*Плодный аллель/Материнский + плодный аллель	Относительный вклад матери, M = 1-F	FPKM	% изменения Относительного материнского вклада по сравнению с контролем	% изменения Относительного плодного вклада по сравнению с контролем
5641 (PET)	Мать: AA, Плод: AB	81	4	0,09	0,91	376,2	(0,91-0,92)/(0,92)*100 =-1,09%	(0,09-0,08)/(0,08)*100 = +12,5%

Фиг. 19


2001
Получение совокупности ридов
2002
Идентификация расположения ридов в референсной последовательности
2003
Идентификация специфических для матери или плода информативных локусов, гомозиготных по первому аллелю и гетерозиготных по второму аллелю
2004
Отбор информативных локусов
2005
Определение первого числа ридов, содержащих первый аллель, для каждого отобранного информативного локуса
2006
Определение второго числа ридов, содержащих второй аллель, для каждого отобранного информативного локуса
2007
Вычисление отношения первого и второго числа для каждого отобранного информативного локуса
2008
Определение отобранного информативного локуса как маркера в том случае, если отношение превышает пороговое значение
2000

Фиг. 20

Ген	Случай 9356			Случай 9415			Примечание (лит. источники)
	Плазма до родов (уровень транскрипции)	Плазма после родов (уровень транскрипции)	Кратность изменения	Плазма до родов (уровень транскрипции)	Плазма после родов (уровень транскрипции)	Кратность изменения	
CSH1	1391,00	17,66	78,78	796,21	1,13	704,89	*a*(1)
KISS1	433,89	8,25	52,56	147,36	7,26	20,29	*a* (2)
STAT1	227,34	104,49	2,18	275,22	85,30	3,23	*b*
CGA	270,02	6,98	38,67	134,19	1,00	134,19	
CSH2	136,04	3,89	34,96	185,78	2,74	67,84	
TFPI2	216,09	15,11	14,30	85,16	3,55	24,02	*a* (2)
GBP1	99,47	45,89	2,17	153,00	63,58	2,41	*b*
PLAC4	177,67	1,03	172,41	69,32	1,00	69,32	*a* (3)
HSD17B1	140,14	5,94	23,58	93,76	25,56	3,67	*b*
CSHL1	140,57	1,00	140,57	66,97	1,00	66,97	*a* (4)
KRT8	86,47	23,42	3,69	76,78	13,28	5,78	*c*
KRT18	86,76	25,92	3,35	64,11	20,27	3,16	*b*
HPGD	87,76	38,45	2,28	39,05	13,36	2,92	*d*
GADD45G	48,82	20,75	2,35	73,22	23,37	3,13	*b*
LGALS 14	56,55	1,00	56,55	62,86	1,00	62,86	
HSD3B1	60,62	3,51	17,28	48,26	1,00	48,26	
KRT19	77,95	24,04	3,24	30,71	3,52	8,71	
SERPINE1	37,39	15,29	2,45	60,90	12,71	4,79	*a* (5)
GDF15	62,32	3,68	16,92	33,52	12,10	2,77	
CYP19A1	70,84	4,90	14,47	18,65	1,00	18,65	
PSG4	36,10	1,45	24,89	47,82	1,00	47,82	
PSG3	53,00	1,00	53,00	23,03	1,00	23,03	
CRYAB	15,46	1,00	15,46	58,22	4,50	12,93	
HSPB8	35,57	6,62	5,37	36,79	13,47	2,73	
PKIB	45,08	8,79	5,13	26,12	8,09	3,23	
PGF	44,72	5,40	8,29	24,94	3,80	6,57	
CYP11A1	40,77	3,64	11,20	28,04	1,71	16,41	
PSG5	42,56	1,00	42,56	25,66	1,00	25,66	
PSG1	37,70	1,49	25,29	28,17	1,00	28,17	
PAP PA	40,90	5,91	6,92	20,03	1,00	20,03	*a* (6)
ADAM12	44,48	4,01	11,09	15,16	1,00	15,16	*a* (7)
PSG2	29,16	1,00	29,16	29,95	1,00	29,95	
VGLL3	34,80	1,98	17,54	20,36	1,80	11,34	
KRT7	27,20	10,39	2,62	26,54	9,75	2,72	
TMEM54	32,99	5,94	5,56	18,70	5,22	3,58	
PRKCZ	28,22	10,05	2,81	23,12	8,76	2,64	
SDC1	30,62	2,62	11,68	17,43	1,84	9,45	
LGALS 13	32,32	1,00	32,32	15,60	1,00	15,60	
EFHD1	15,55	2,80	5,56	30,55	3,94	7,76	
CAPN6	23,18	1,64	14,14	22,90	1,00	22,90	
XAGE3	25,08	2,59	9,67	13,08	1,00	13,08	
EBI3	18,79	6,48	2,90	17,96	7,30	2,46	
GH2	19,16	1,00	19,16	17,22	1,00	17,22	*a* (7)
PAGE4	28,89	2,99	9,67	6,28	1,00	6,28	

	Случай 9356			Случай 9415			
Ген	Плазма до родов (уровень транскрипции)	Плазма после родов (уровень транскрипции)	Кратность изменения	Плазма до родов (уровень транскрипции)	Плазма после родов (уровень транскрипции)	Кратность изменения	Примечание (лит. источники)
ALPP	19,62	1,54	12,73	14,03	1.00	14.03	
INHBA	18,99	2,71	7,01	14,51	4.29	3.38	*a* (6)
LOC100505659	17,53	1,00	17,53	15,65	1.00	15.65	
FBLN1	10,12	2,12	4,76	20,01	1.28	15.62	
SEMA3B	16,06	2,52	6,38	12,90	1.00	12.90	
GPC3	18,22	1,00	18,22	10,12	1.00	10.12	
PLAC2	19,86	1,99	9,96	8,04	1.97	4.09	
PSG9	7,10	1,00	7,10	20,32	1.00	20.32	*a* (8)
FN1	17,30	6,57	2,63	9,72	3.81	2.55	
NOS3	10,01	3,45	2,90	16,07	7.08	2.27	
LOC100506655	12,29	1,00	12,29	13,53	1.00	13.53	
PSG11	19,48	1,83	10,63	5,77	1.00	5.77	
SPTLC3	19,82	1,00	19,82	4,99	1.00	4.99	
EXPH5	12,58	4,48	2,81	12,09	2.24	5.40	
HSPA2	12,86	5,85	2,20	1140	4.87	2.34	
PSG6	10,66	1,00	10,66	13,38	1.00	13.38	
PLAC1	17,08	1,00	17,08	6,60	1.00	6.60	*a* (3)
TACC2	5,93	1,61	3,69	16,24	1.64	9.89	
PRPF40B	8,27	3,98	2,08	12,53	5.32	2.36	
LOC388948	12,97	1,00	12,97	7,71	1.00	7.71	
SERPINB2	13,48	1,36	9,91	6,86	1.44	4.77	*a* (9)
CRH	15,40	1,00	15,40	4,75	1.00	4.75	*a* (10)
GBP1P1	6,35	1,19	5,32	13,04	5.04	2.59	
CLDN4	12,50	1,00	12,50	6,45	2.84	2.27	
C2orf72	11,14	3,29	3,38	7,26	1.74	4.18	
PAPPA2	10,92	1,53	7,13	7,48	1.00	7.48	
HIST2H3A	14,75	7,27	2,03	2,44	1.02	2.39	
HIST2H3C	14,75	7,27	2,03	2,44	1.02	2.39	
TCL6	12,92	1,00	12,92	3,93	1.00	3.93	
MFSD2A	8,09	3,35	2,42	8,72	1.00	8.72	
ZFAT-AS1	9,10	3,14	2,90	7,25	3.31	2.19	
INSL4	13,90	2,40	5,80	2,01	1.00	2.01	
DHRS2	12,24	6,11	2,00	3,30	1.00	3.30	
HES2	11,03	3,11	3,54	4,50	1.46	3.08	
WLS	11,06	4,77	2,32	4,40	1.68	2.63	
PLCXD3	10,49	3,62	2,90	4,88	2.01	2.43	
LOC100505483	5,40	1,00	5,40	9,39	2.62	3.58	
C1orf130	11,60	1,85	6,28	2,48	1.00	2.48	
FOSB	3,02	1,00	3,02	10,65	4.94	2.16	
GCM1	5,93	1,60	3,71	6,94	1.00	6.94	*a* (8)
TRPV6	9,31	1,00	9,31	3,41	1.00	3.41	
TFAP2A	4,02	1,00	4,02	8,59	1.46	5.87	
MMP11	10,08	1,96	5,16	2,46	1.00	2.46	
TUSC3	9,90	2,66	3,73	2,55	1.00	2.55	
HMGCR	7,15	2,25	3,18	5,13	2.26	2.27	

Ген	Случай 9356			Случай 9415			
	Плазма до родов (уровень транскрипции)	Плазма после родов (уровень транскрипции)	Кратность изменения	Плазма до родов (уровень транскрипции)	Плазма после родов (уровень транскрипции)	Кратность изменения	Примечание (лит. источники)
CCK	7,06	1,00	7,06	4,98	1,00	4,98	
LOC100129935	8,56	1,61	5,32	3,38	1,00	3,38	
C8orf39	4,02	1,00	4,02	7,86	2,93	2,69	
GLDN	9,39	1,00	9,39	2,44	1,00	2,44	
PGAP3	6,10	2,19	2,78	4,84	2,32	2,09	
MSX2P1	3,63	1,00	3,63	6,87	3,36	2,05	
GH1	4,33	1,00	4,33	6,02	1,00	6,02	
SVEP1	7,79	2,98	2,61	2,26	1,00	2,26	
PPP1R32	2,78	1,00	2,78	7,24	1,35	5,37	
PSG8	5,01	1,00	5,01	4,94	1,00	4,94	
ENDOU	7,24	2,40	3,02	2,27	1,00	2,27	
EGFR	6,83	1,00	6,83	2,54	1,00	2,54	
DUSP4	5,24	1,61	3,26	4,13	1,41	2,92	
PHYHIPL	5,53	1,00	5,53	3,48	1,39	2,51	
CTSF	6,01	1,00	6,01	2,77	1,03	2,69	
TRIM29	3,54	1,00	3,54	5,13	1,00	5,13	
RCN3	3,07	1,00	3,07	5,34	1,12	4,77	
SPIRE2	5,93	2,27	2,61	2,48	1,00	2,48	
LOC100216001	4,60	1,06	4,35	3,55	1,49	2,39	
FAM176A	5,76	2,10	2,74	2,36	1,00	2,36	
SCIN	5,18	1,00	5,18	2,82	1,00	2,82	
ZNF500	2,41	1,00	2,41	5,52	2,23	2,47	
PRR16	2,83	1,00	2,83	4,91	1,18	4,18	
LOC100128054	4,55	1,05	4,35	3,08	1,00	3,08	
OLR1	4,53	1,17	3,87	2,71	1,00	2,71	
SLC30A2	5,18	1,00	5,18	2,00	1,00	2,00	
LOC285972	3,49	1,00	3,49	3,64	1,02	3,58	
HESX1	4,25	1,26	3,38	2,64	1,00	2,64	
TMEM139	4,61	1,00	4,61	2,25	1,00	2,25	
ZNF727	3,82	1,00	3,82	2,58	1,24	2,09	
TM4SF19	4,04	1,39	2,90	2,34	1,00	2,34	
EFS	3,88	1,00	3,88	2,38	1,00	2,38	
TIMD4	2,08	1,00	2,08	3,62	1,51	2,39	
ALDH3B2	2,91	1,00	2,91	2,76	1,00	2,76	
KRT81	2,61	1,00	2,61	2,92	1,00	2,92	
MUC15	2,94	1,00	2,94	2,19	1,00	2,19	
PRSS8	2,20	1,00	2,20	2,87	1,00	2,87	
SH2D5	2,41	1,00	2,41	2,42	1,00	2,42	
LOC728175	2,28	1,00	2,28	2,31	1,10	2,09	
GRHL2	2,45	1,00	2,45	2,13	1,00	2,13	
PABPN1L	2,18	1,00	2,18	2,37	1,00	2,37	
CORO6	2,08	1,00	2,08	2,07	1,00	2,07	

Примечание:

a. Транскрипты, ранее описанные как связанные с беременностью в материнской плазме

b. Транскрипты, впервые идентифицированные в настоящем исследовании посредством RNA-seq материнской плазмы и подтвержденные с применением ОТ-ПЦР в реальном времени (фиг. 6 с дополнительными данными)

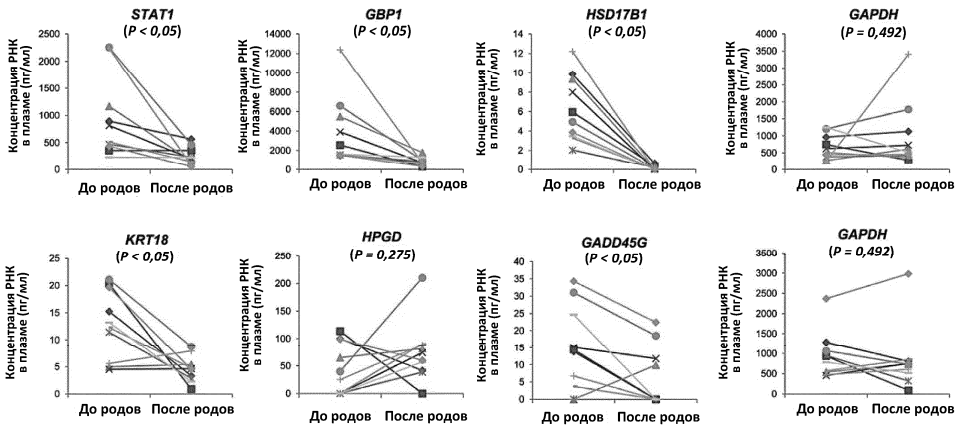
c. мРНК *KRT8* не была исследована ОТ-ПЦР в реальном времени, т.к. отсутствует возможности разработки анализов на детекцию.

d. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени показали, что паттерн клиренса мРНК *HPGD* в материнской плазме после родов не наблюдается (фиг. 6 с дополнительными данными)

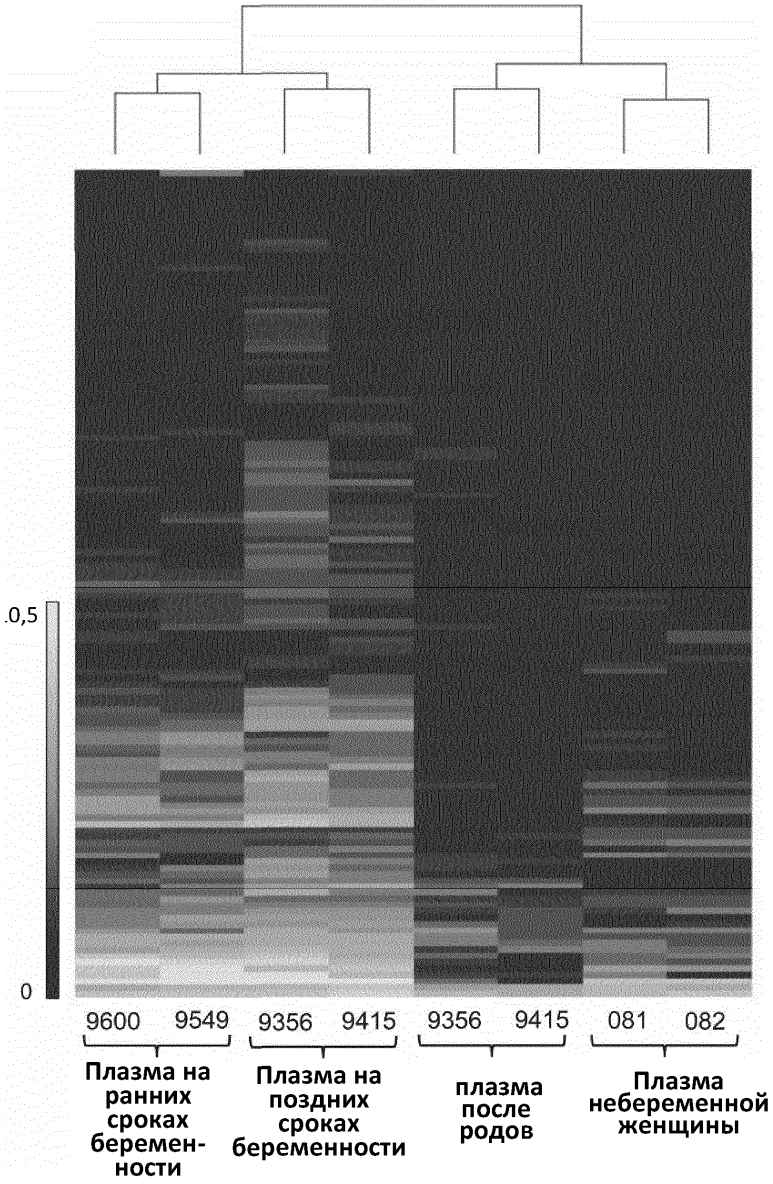
Литературные источники:

1. Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:4748-53.
2. Tsui NBY, Chim SSC, Chiu RWK, Lau TK, Ng EKO, Leung TN, et al. J Med Genet 2004;41:461-7.
3. Lo YMD, Tsui NBY, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MMS, et al. Nat Med 2007;13:218-23.
4. Heung MMS, Jin S, Tsui NBY, Ding C, Leung TY, Lau TK, et al. PLoS One 2009;4:e5858.
5. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjosastro GH, et al. Clin Chem 2007;53:399-404.
6. Wong BCK, Chiu RWK, Tsui NBY, Chan KCA, Chan LW, Lau TK, et al. Clin Chem 2005;51:1786-95.
7. Pang WWI, Tsui MHY, Sahota D, Leung TY, Lau TK, Lo YMD, Chiu RWK. Prenat Diagn 2009;29:495-504.
8. Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, Van Vugt JM, Oudejans CB. Clin Chem 2004;50:1413-4.
9. Tsui NBY, Wong BCK, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. Prenat Diagn 2009;29:1031-7
10. Ng EKO, Leung TN, Tsui NBY, Lau TK, Panesar NS, Chiu RWK, Lo YMD. Clin Chem 2003;49:727-31.

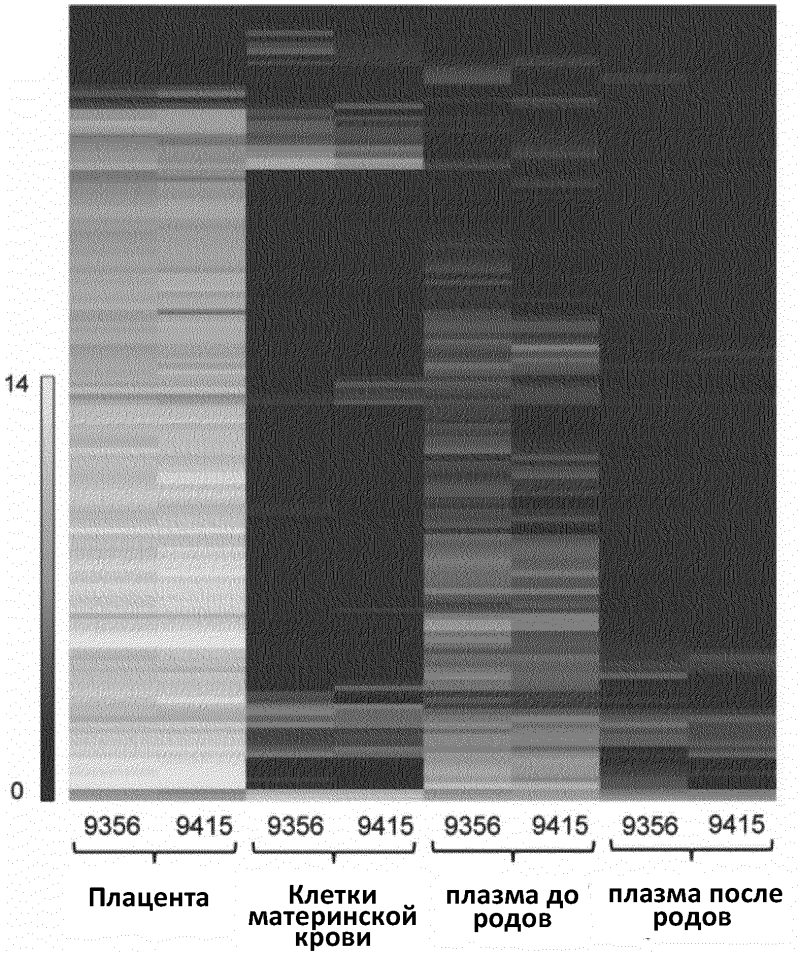
Фиг. 21



Фиг. 22

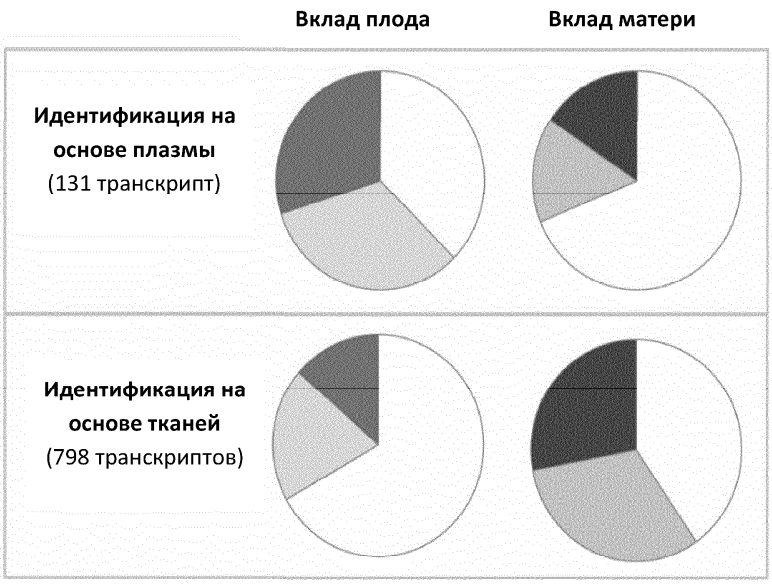

.0,5
0
9600
9549
9356
9415
9356
9415
081
082
Плазма на ранних сроках беремен-ности
Плазма на поздних сроках беременности
плазма после родов
Плазма небеременной женщины

Фиг. 23



Фиг. 24A

Фиг. 24B


Вклад плода
Вклад матери
Идентификация на основе плазмы (131 транскрипт)
Идентификация на основе тканей (798 транскриптов)

Фиг. 25

РНК	Преэклампсия	Норма	РНК	Преэклампсия	Норма
ADAM9	26,78	11,26	LY6E	84,52	31,38
AGBL5	144,47	65,14	MEIS1	79,49	18,77
APOBR	64,12	26,31	MLH3	150,61	36,10
APOL2	59,24	29,05	MYADM	51,11	16,60
APP	212,58	84,93	NCF1	107,35	41,90
ASAH1	167,14	47,38	NCF1B	34,80	9,41
ATP5I	23,85	9,20	NDUFA1	20,73	7,36
ATP6V0E1	60,73	20,56	NES	176,78	58,83
B2M	1765,75	654,19	NFAM1	49,17	17,91
BCAP31	42,85	14,86	NGFRAP1	106,72	19,52
BRK1	91,46	41,63	NPTN	80,63	29,97
C12orf76	16,97	4,56	NT5C3	173,39	65,34
C19orf59	22,94	6,42	OST4	404,86	100,63
C19orf79	13,22	3,00	PARK7	97,39	40,79
C1orf151-NBL1	25,89	11,19	PARP10	52,41	19,75
C21orf7	308,80	83,41	PDGFA	55,19	24,29
C7orf53	8,04	0,73	PF4	680,43	208,45
CARD16	85,90	29,13	PGRMC1	332,76	78,90
CD97	59,09	28,74	PRIC285	72,34	20,44
CEBPD	147,37	44,30	PSMB9	73,17	34,36
CTSA	341,67	138,37	RAB32	51,90	25,20
CYB5R1	25,14	10,12	RABAC1	25,10	7,80
DDX11L10	38,97	7,34	RBX1	36,44	15,06
DUSP1	168,06	30,57	RNF213	316,69	147,00
DYNLRB1	166,30	59,63	RPPH1	242,37	63,73
EMP3	99,80	39,75	S100P	48,92	14,31
ENKUR	64,87	15,45	S1PR3	9,45	1,41
GALM	31,68	5,09	SAT1	213,55	100,86
GDI1	91,22	41,05	SEPT3	14,54	6,35
HIST1H2AC	271,60	72,77	SERF2	310,66	144,79
HIST1H3H	131,91	40,96	SHISA5	141,53	59,85
HIST1H4A	20,40	5,53	SIGLEC1	18,55	3,32
HIST1H4B	25,44	5,58	SIGLEC14	10,79	0,95
HIST1H4E	74,16	26,59	SNN	348,09	171,73
HIST1H4H	69,35	18,31	SOD2	569,41	229,85
HIST1H4L	20,99	6,89	SPARC	914,92	286,17
HLA-C	417,81	203,10	TIMP1	76,27	27,68
HLA-L	11,78	3,90	TMEM140	121,93	29,08
HRC	14,87	0,16	TMEM185A	36,93	12,09
HSPA1A	37,29	14,90	TMEM50A	139,68	32,72
IFI6	171,27	18,29	TRIM22	135,78	58,79
ISG20	86,19	23,09	TSC22D3	330,23	108,27
JAM3	121,57	52,31	UBE2L6	171,88	63,40
KLF6	127,12	62,64	VKORC1L1	63,06	25,17
LEPR	43,19	17,71	VTRNA1-1	7,23	0,08
LEPROT	70,13	34,38	YIF1B	36,33	16,96
LILRA5	31,45	11,05	YPEL3	150,75	73,23
LOC146336	13,75	4,89	YWHAH	236,85	116,18
LRRC32	102,05	34,23	ZNF485	15,35	6,38

Фиг. 26

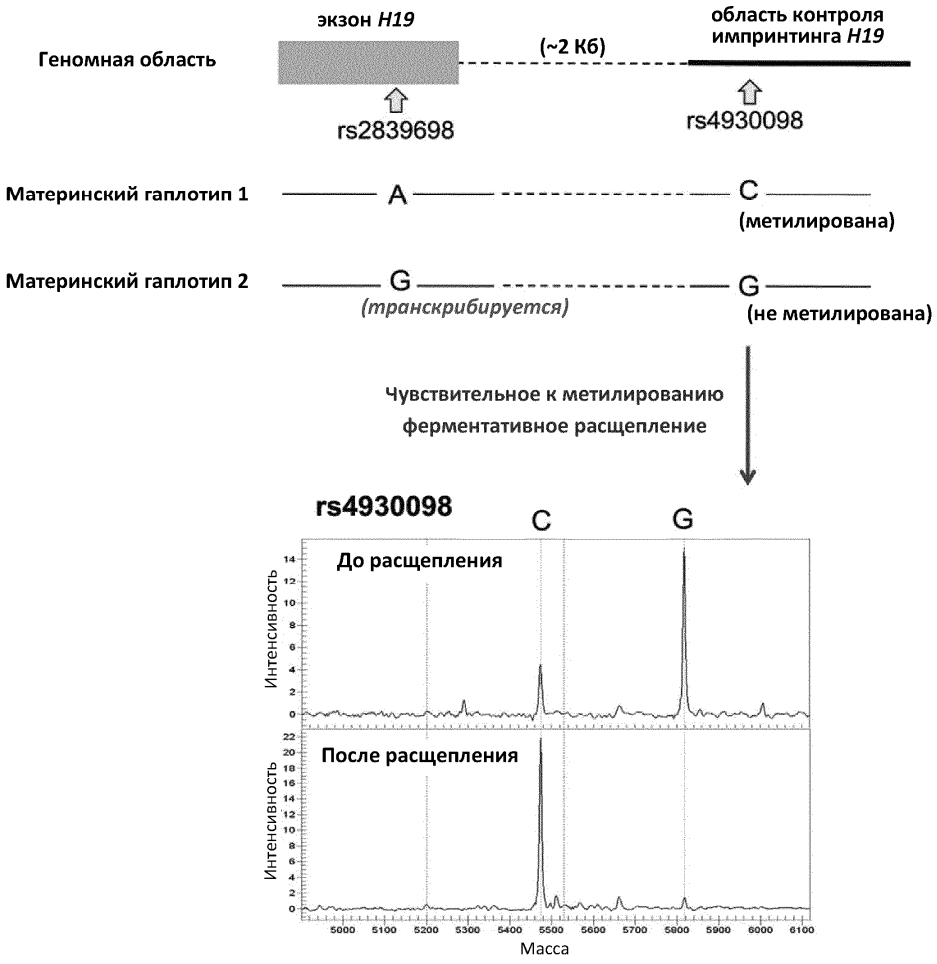
Идентификатор SNP (rsID) *PAPPA*	ДНК-генотип		Плацента		Клетки материнской крови		Дородовая материнская плазма		Послеродовая материнская плазма	
	Плод	Мать	A	G	A	G	A	G	A	G
rs386088	GA	AA	2421	2164	0	0	16	21	0	0

Фиг. 27

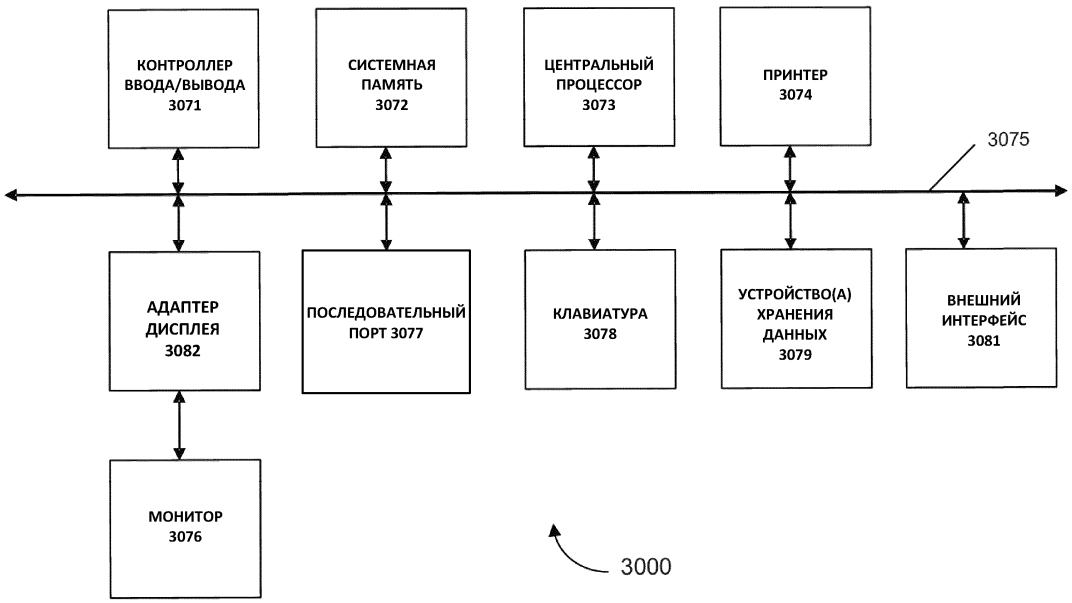
Идентификатор SNP (rsID) *H19*	ДНК-генотип		Плацента		Клетки материнской крови		материнская плазма до родов		материнская плазма после родов	
	Плод	Мать	Общий	Специфический материнский	Общий	Специфический материнский	Общий	Специфический материнский	Общий	Специфический материнский
rs2839698[a]	AA	AG	3418 (A)	10 (G)	0 (A)	0 (G)	246 (A)	1679 (G)	0 (A)	808 (G)
rs2839701	GG	CG	4959 (G)	8 (C)	0 (G)	0 (C)	33 (G)	219 (C)	1 (G)	78 (C)
rs2839702	CC	AC	4996 (C)	8 (A)	0 (C)	0 (A)	38 (C)	233 (A)	2 (C)	92 (A)
rs3741219	GG	AG	2255 (G)	15 (A)	0 (G)	0 (A)	17 (G)	158 (A)	0 (G)	96 (A)

a: Общий аллель A импринтирован, а Специфический материнский аллель G транскрибировался.
Подробная информация о статусе метилирования приведена на фиг. 5 с дополнительными данными.

Фиг. 28



Фиг. 29


КОНТРОЛЛЕР ВВОДА/ВЫВОДА 3071
СИСТЕМНАЯ ПАМЯТЬ 3072
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ПРОЦЕССОР 3073
ПРИНТЕР 3074
3075
АДАПТЕР ДИСПЛЕЯ 3082
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЙ ПОРТ 3077
КЛАВИАТУРА 3078
УСТРОЙСТВО(А) ХРАНЕНИЯ ДАННЫХ 3079
ВНЕШНИЙ ИНТЕРФЕЙС 3081
МОНИТОР 3076
3000

Фиг. 30