

DISS. ETH NO. 25969

**Transcriptome dynamics in the conceptus and cell type-specific gene expression in the endometrium during the preimplantation period in the pig**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**SHUQIN ZENG**

MSc Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China

born on 19.07.1988

citizen of China

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Susanne E. Ulbrich, examiner  
PD Dr. Stefan Bauersachs, co-examiner  
Prof. Dr. Hubert Pausch, co-examiner

2019

## Summary

---

Establishment of pregnancy comprises maternal recognition of pregnancy, embryo implantation, and placentation. Porcine blastocysts are hatching from the zona pellucida on Day 8 of gestation, and transform into an elongated filamentous trophoblast between Days 11-12. Along with the physiological elongation process, the embryo secretes hormones to establish a series of biological signals which provide a stimulation to the maternal organism. Once the uterus receives the signals produced by the elongating conceptus, the uterine endometrial surface reacts immediately to support conceptus growth and development, and its attachment. However, the rapid trophoblast elongation during the preimplantation period and the complexity of the endometrial tissue make the study of the embryo-maternal interactions complicated. To uncover the dynamic transcriptome changes of preimplantation embryos at the onset of elongation together with the transient X-linked gene expression, RNA-seq analysis of individual female and male embryos from Days 8, 10, and 12 of gestation was performed. Endometrial tissue samples were collected on Days 12 and 14 both in pregnant and cyclic pigs to study endometrial cell type-specific functional regulation during early pregnancy. Laser capture microdissection (LCM) was used to isolate specific endometrial cells or compartments (luminal epithelium (LE), glandular epithelium (GE), blood vessels (BV), and stroma (S)) for gene expression analyses. With respect to the RNA-seq data from embryos, a large number of genes were detected as differentially expressed (DE) along with the embryo elongation, and many of these differentially expressed genes (DEGs) were associated to embryo elongation, development, and embryo-maternal interaction. In contrast to the comparison of different embryo developmental stages, the number of DEGs between female and male embryos was much lower (137, 37, and 56 on Day 8, 10, and 12, respectively). The majority of the DEGs on Day 8 of pregnancy (96) were located on the X chromosome. Strikingly, the number of X-linked DEGs dramatically decreased from Day 10 to Day 12. The obtained datasets of the uterine cell type-specific gene expression were compared to a RNA-seq dataset from complete endometrial tissue samples collected in our previous studies. The highest number of DEGs in comparison of samples from pregnant and cyclic gilts was obtained for LE both on Day 12 and 14. Overrepresentation analysis of functional categories and molecular pathways performed for the individual endometrial compartments revealed for the genes upregulated in LE the terms immune activation, estrogen signaling pathway, embryo development, and cell proliferation as highly enriched. Sterol biosynthetic and metabolic processes and extracellular matrix were obtained for genes

upregulated in stroma. Besides, cell communication (via exosomes and vesicles) was found as overrepresented for LE, GE, and stroma. For Day 14, Gene Ontology (GO) classification for the DEGs detected in the individual endometrial compartments revealed that the majority of DEGs in LE were related to cell communication, such as extracellular exosome, extracellular vesicle, and homeostatic process, whereas functional categories such as response to organic substance and regulation of cell migration categories were overrepresented for GE. The functional categories membrane-bounded vesicle, cell junction, cell development, cell adhesion, and blood vessel morphogenesis were enriched for BV, while in stromal regions, most DEGs were assigned to cell communication and secretion. Generally, the obtained results from the developing embryos revealed large temporary transcriptomic changes during the transition from the hatched blastocyst to the filamentous conceptus, meanwhile the number of X-linked genes differently expressed between female and male embryos decreased with development showing the time course of X chromosome compensation in the porcine female preimplantation embryos. The maternal response to conceptus signals during maternal recognition of pregnancy and preparation for conceptus attachment and implantation involves specific changes of the transcriptome of individual endometrial compartments/cell types associated with the regulation of their specific functions in these processes.

## Zusammenfassung

---

Die Etablierung der Trächtigkeit umfasst die maternale Erkennung der Trächtigkeit, die Implantation des Embryos und die Plazentation. Beim Schwein schlüpfen die Blastozysten aus der Zona pellucida am Tag 8 der Trächtigkeit. Zwischen den Tagen 11-12 verändert sich die Form des Konzeptus von ovoid über tubulär zu filamentös. Während der Elongation werden Hormone vom Embryo ausgeschieden, als eine Reihe von biologischen Signalen an den mütterlichen Organismus. Als Reaktion des Uterus auf die Signale vom elongierten Konzeptus unterstützt das Endometrium das Wachstum und die Entwicklung des Konzeptus, und bereitet sich auf die Implantation vor. Die Untersuchung der Embryo-maternalen Kommunikation ist kompliziert aufgrund der schnellen Elongation des Trophoblasten während der Präimplantationsphase und des komplexen Aufbaus des Endometriums. Um die dynamischen Transkriptomveränderungen der Embryonen zu Beginn der Elongation im Zusammenhang mit der transienten X-Chromosom-gekoppelten Genexpression aufzuklären, wurde eine RNA-Sequenzierung (RNA-seq) von einzelnen weiblichen und männlichen Embryonen von Tag 8, 10 und 12 der Trächtigkeit durchgeführt. An Tag 12 und 14 nach Ovulation wurden bei trächtigen und zyklischen Sauen Endometriumproben untersucht, um die zelltypspezifische funktionelle Regulation während der frühen Trächtigkeit aufzuklären. Mit Hilfe der „Laser-Capture-Microdissection“ (LCM)-Methode wurden spezifische endometrielle Zelltypen bzw. Kompartimente (luminales Epithel (LE), glanduläres Epithel (GE), Blutgefäße (BV) und Stroma (S)) für Genexpressionsanalysen isoliert. Die Analyse von RNA-Sequenzierungsdaten der Embryonen ergab eine grosse Anzahl an differentiell exprimierten Genen (DEGs) im Zusammenhang mit der embryonalen Elongation. Viele dieser DEGs waren mit der Elongation, der Embryonalentwicklung und der Embryo-maternalen Kommunikation assoziiert. Im Gegensatz zum Vergleich der verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien war die Anzahl der DEGs zwischen weiblichen und männlichen Embryonen wesentlich niedriger (137, 37 und 56 an Tag 8, 10 bzw. 12). Die meisten DEGs an Tag 8 der Trächtigkeit (96) befinden sich auf dem X-Chromosom. Auffallend war, dass die Anzahl an auf dem X-Chromosom lokalisierten DEGs von Tag 10 bis Tag 12 deutlich abnahm. Die erhaltenen Datensätze der zelltypspezifischen Genexpression im Endometrium wurden mit einem RNA-seq-Datensatz von kompletten Gewebeproben des Endometriums verglichen, der in einer vorherigen Studie erzeugt wurde. Die jeweils höchste Anzahl an DEGs beim Vergleich von Proben aus trächtigen und zyklischen Jungsauen wurde für LE an Tag 12 und 14 erhalten. Die

Überrepräsentationsanalysen für funktionelle Kategorien und molekulare Pathways, welche für die einzelnen Kompartimente im Endometrium durchgeführt wurden, zeigten eine starke Anreicherung der im LE hochregulierten Gene in den GO-terms “immune activation”, “estrogen signaling pathway”, “embryo development” und “cell proliferation”. Die im Stroma hochregulierten Gene waren überrepräsentiert in den GO-terms “Sterol biosynthetic” und “metabolic processes” als auch “extracellular matrix”. “cell communication” (mittels “exosomes” und “vesicles”) war in LE, GE und Stroma überrepräsentiert. An Tag 14 ergab die Gene Ontology (GO)-Klassifizierung für die in den einzelnen Endometriumkompartimenten identifizierten DEGs, dass die Mehrheit der DEGs im LE in Prozessen “cell communication” involviert war, wie z.B. “extracellular exosome”, “extracellular vesicle” und “homeostatic process”, während funktionale Kategorien, wie “response to organic substance” und “regulation of cell migration”, für GE überrepräsentiert waren. Die funktionalen Kategorien, “membrane-bounded vesicle”, “cell junction”, “cell development”, “cell adhesion” und “blood vessel morphogenesis”, waren in BV angereichert, während in den Stromaregionen die meisten DEGs der “cell communication” und “secretion” zugeordnet werden konnten. Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse, der sich entwickelnden Embryonen, grosse temporäre Veränderungen des Transkriptoms im Übergang von der geschlüpften Blastozyste zum filamentösen Konzeptus. Gleichzeitig nahm die Anzahl der X-gekoppelten Gene, die zwischen weiblichen und männlichen Embryonen unterschiedlich exprimiert waren, mit der Entwicklung ab, was den zeitlichen Verlauf der X-Chromosomenkompensation in weiblichen Schweineembryonen während der Preimplantation widerspiegelt. Bei der maternalen Reaktion auf die Signale des Konzeptus während der Phase der Erkennung der Trächtigkeit und der Vorbereitung auf die Implantation, stehen die spezifischen Veränderungen des Transkriptoms der einzelnen Endometriumkompartimente / Zelltypen mit der Regulierung ihrer spezifischen Funktionen im Zusammenhang.