

Využití sekvenování nové generace v analýze cirkulujících mikroRNA jako prediktivních biomarkerů u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem rekta

Utilization of Next Generation Sequencing in Analysis of Circulating MicroRNAs as Predictive Biomarkers for Patients with Locally Advanced Rectal Carcinoma

Macháčková T.¹, Grolich T.², Fiala L.³, Procházka V.², Škrovina M.⁴, Kala Z.², Slabý O.¹

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

² Chirurgická klinika LF MU a FN Brno

³ Oddělení chirurgické onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴ Chirurgické oddělení, Komplexní onkologické centrum, Nemocnice Nový Jičín

Souhrn

Východiska: MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA podílející se na posttranskripční regulaci genové exprese. Jsou esenciálními regulátory fyziologických procesů, podílejí se na patogenezi mnoha onemocnění a jejich deregulace byla prokázána u řady nádorových onemocnění vč. karcinomu rekta. Cirkulující miRNA přítomné v krevní plazmě by mohly být vhodnými kandidáty na neinvazivní prediktivní biomarkery odpovědi na neoadjuvantní chemoradioterapii u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem rekta. Předkládaná pilotní studie se zabývá využitím sekvenování nové generace k analýze cirkulujících miRNA. **Materiál a metody:** K analýze miRNA expresních profilů byly použity vzorky RNA izolované z krevní plazmy pacientů odebrané v době TNM restagingu po neoadjuvantní chemoradioterapii, a párové vzorky RNA z plazmy odebrané před zahájením neoadjuvantní chemoradioterapie. K přípravě sekvenčních knihoven bylo využito kitu, který do knihoven implementuje univerzální molekulární index, jenž napomáhá citlivějšímu oddělení biologického šumu při analýze dat. Sekvenční data byla zpracována multidimenzionálními biostatistickými přístupy. **Závěr:** Byl stanoven expresní profil miRNA u pacientů s karcinomem rekta, který umožňoval odlišit pacienty s různou léčebnou odpovědí na neoadjuvantní chemoradioterapii.

Klíčová slova

mikroRNA – karcinom rekta – prediktivní biomarker

Tento projekt byl uskutečněn z podpory grantu Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 16-31765A.

This work was supported by the Czech Ministry of Health grant No. 16-31765A.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: on.slaby@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 22. 2. 2019

Přijato/Accepted: 27. 2. 2019

Summary

Background: MicroRNAs (miRNA) are short non-coding RNAs involved in post-transcriptional regulation of gene expression. MiRNAs are essential regulators of both physiological processes as of pathogenesis of many diseases, and their dysregulation was observed in many malignancies including rectal cancer. Circulating miRNAs presented in blood plasma could be potential candidates for non-invasive predictive biomarkers of the response of patients with locally advanced rectal cancer to chemoradiotherapy. Presented study aims to evaluate the potential of next-generation sequencing in the analysis of circulating miRNAs. **Material and methods:** MiRNA expression profiles were done using samples of RNA isolated from blood plasma collected during TNM restaging and paired samples collected before initiation of neoadjuvant chemoradiotherapy. Sequencing libraries were prepared using kit which implements universal molecular indices that help to sensitively filter biological bias during data analysis. Sequencing data were processed by multidimensional biostatistical approaches. **Conclusion:** We identified specific miRNA profile enabling to distinguish the patients accordingly to their response to chemoradiotherapy.

Key words

microRNA – rectal cancer – predictive biomarker

Východiska

Kolorektální karcinom je třetí nejčastější nádorové onemocnění celosvětově a druhá nejčastější příčina úmrtí spojená s nádorovým onemocněním dospělé populace. ČR se bohužel řadí mezi státy s nejvyšší incidencí kolorektálního karcinomu a karcinomu rekta a rektosigmoideální junkce (dále již jen jako karcinom rekta) tvoří přibližně 40 % všech případů kolorektálního karcinomu [1,2]. Zhruba polovina pacientů s karcinomem rekta je diagnostikována v lokálně pokročilém stadiu onemocnění, které představuje tumory v klinickém stadiu II a III definované jako cT3 a cT4 a/nebo tumory s metastatickým postižením regionálních uzlin. Na rozdíl od karcinomů lokalizovaných v tlustém střevě karcinomy lokalizované v oblasti rekta obecně vykazují vyšší invazivitu a častější relaps po chirurgickém zákroku. Tudiž tato onemocnění vyžadují rozdílné léčebné postupy [3]. Podání neoadjuvantní chemoradioterapie (NCHRT) před chirurgickým výkonem významně zlepšilo prognózu pacientů a jejich celkovou dobu přežívání. Cílem NCHRT je pokud možno co nejvíce zmenšit rozsah samotného nádoru, a tím pádem umožnit co nejvíce zachovnou operaci. Bohužel odpověď na léčbu se mezi jednotlivými pacienty výrazně liší. Zatímco někteří pacienti dosáhnou kompletní patologické odpovědi na léčbu nebo alespoň výrazného zmenšení tumoru, část pacientů vykazuje primární rezistenci vůči NCHRT a je tak zbytečně vystavována toxickým účinkům léčby. Stav postižení pacientů po NCHRT a před operací je v dnešní době založen výhradně na zobrazovacích metodách.

Ty ale nedosahují dostatečné citlivosti. Proto je komplikované přesně určit TNM stadium v době restagingu [4]. Přídavný biomarker by mohl výrazně zpřesnit ycTNM klasifikaci či příp. již předem určit, zda pacient z léčby bude profitovat či ne. MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA schopné posttranskripční regulace genové exprese. Jejich přítomnost byla prokázána i v tělních tekutinách, což je předurčuje k využití jako neinvazivních biomarkerů. MiRNA navíc vykazují výjimečnou stabilitu v tělních tekutinách a je možné je studovat pomocí konvenčních metod molekulární biologie [5,6]. Nicméně studium expresních profilů z tělních tekutin je technologicky náročné a přináší mnoho výzev. Tato studie se zabývá využitím metody sekvenování nové generace pro stanovení globálního miRNA profilu krevní plazmy pacientů s karcinomem rekta, kteří profitovali z NCHRT, a pacientů, kteří neměli z léčby dostatečný benefit.

Materiál a metody

TNM klasifikace nádoru byla stanovována v období před terapií (klinický staging TNM – cTNM), po neoadjuvantní terapii (ycTNM) a po samotné resekci nádoru (patologický staging TNM – pTNM). Všichni pacienti zařazení do studie podepsali informovaný souhlas. Z odebraných vzorků krevní plazmy byla izolována celková RNA obohacená o frakci krátkých RNA pomocí miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen). Čistota a kvantita získané RNA byly stanoveny spektrofotometricky a fluorimetricky. K analýze miRNA expresních profilů krevní plazmy byly použity vzorky RNA

z plazmy odebrané pacientům v době ycTNM restagingu (56), a párové vzorky RNA z plazmy odebrané pacientům před zahájením NCHRT v době cTNM (40). K analýze miRNA expresních profilů byl použit Qiaseq miRNA Library Kit (Qiagen), který umožňuje přípravu miRNA obohacených cDNA knihoven, a tudíž daleko citlivější analýzu globálního miRNA profilu. Příprava tímto způsobem zahrnuje použití univerzálních molekulárních indexů, které také umožňují odstranění problému s extrémní abundancí miR-486-5p ve vzorcích krevní plazmy. Ta je běžným kontaminantem, s nímž se dnešní sekvenování nové generace krevního séra a plazmy potýká. Kvalita cDNA knihoven byla stanovována pomocí přístroje TapeStation 2200 System (Agilent) a Qubit® 2.0 Fluorimeter (Life Technologies). Sekvenování nové generace bylo provedeno za použití přístroje NextSeq 500/550 (Illumina) a chemie High Output Kit v2, 75 cycles (Illumina). Expresní data byla analyzována pomocí online nástroje Chimera a získaná data byla statisticky zhodnocena pomocí nástroje Bioconductor edgeR a balíčku DESeq2.

Výsledky

Byly srovnány expresní profily získané sekvenováním nové generace RNA izolované z krevní plazmy odebrané před terapií. Pacienti byli rozděleni do skupin s dobrou odpovědí na léčbu (stupeň regrese nádoru [tumor regression grade – TRG] 3 + 4) a špatnou nebo žádnou odpovědí na léčbu (TRG 0 + 1 + 2). Pomocí statistické analýzy bylo takto identifikováno 52 miRNA s významně deregulovanou expresí ($p < 0,05$). Celkem 21 miRNA

vykazovalo zvýšenou expresi (např. hsa-miR-450a-1-3p, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-937-3p, hsa-miR-1233-5p) a 31 miRNA vykazovalo sníženou expresi (např. hsa-miR-320d, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-10a-3p, hsa-miR-206, hsa-miR-200a-5p) ve vzorcích krevní plazmy pacientů s TRG 0 + 1 + 2 oproti vzorkům pacientů s TRG 3 + 4. Při srovnání profilů vzorků plazmy odebraných po terapii v době ycTNM restagingu a rozdělených do skupin pacientů s metastatickým postižením uzlin (pN+) a pacientů bez postižení uzlin (pN-) bylo identifikováno 65 miRNA s významně rozdílnou expresí ($p < 0,05$), 37 se zvýšenou (např. hsa-miR-192-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-217-5p) a 28 se sníženou (např. hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-383-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-509-3p) ve vzorcích pacientů pN+ oproti vzorkům pacientů pN-. Při analýze expresních profilů vzorků plazmy odebraných po terapii a rozdělených do skupin pacientů s pT3 a pT1 + pT2 bylo nalezeno 58 miRNA s rozdílnou expresí ($p < 0,05$), 37 miRNA se zvýšenou expresí (např. hsa-miR-508-3p, hsa-miR-187-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-214-5p) a 21 miRNA se sníženou expresí (např. hsa-miR-378e, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-106a-5p) ve vzor-

cích pacientů s pT3 na rozdíl od pacientů s pT1 + pT2.

Diskuze a závěr

V současné době není k dispozici žádný prediktivní biomarker odpovědi pacientů s karcinomem rekta na NCHRT i přesto, že se již několik studií zabývalo deregulací miRNA v plazmě pacientů s karcinomem rekta v závislosti na jejich odpovědi na NCHRT a metastatickým postižením uzlin [7–9]. Námi získané výsledky odhalily deregulovanou expresi miRNA ve vzorcích krevní plazmy pacientů vykazujících patologickou odpověď na léčbu oproti pacientům s nízkou či žádnou odpovědí. Po validaci výsledků na vzorcích nezávislé skupiny pacientů by mohla být identifikována cirkulující miRNA či panel cirkulujících miRNA, které by sloužily jako neinvazivní prediktivní biomarker odpovědi na NCHRT. Rozdíly v expresních profilech cirkulujících miRNA byly navíc prokázány i mezi pacienty s metastatickým postižením lokálních uzlin a bez metastatického postižení. Nakonec byla zjištěna deregulace miRNA v závislosti na patologickém rozsahu nádoru. MiRNA deregulované u pacientů s pN+ a u pacientů s pT3 na rozdíl od pacientů s pN- a pT1 + pT2 by mohly sloužit jako přídatný ukazatel při určování ycTNM a tím výrazně napomoci

plánování chirurgického zákroku a dalších léčebných postupů.

Literatura

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
2. Zavoral M, Suchanek S, Majek O et al. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3825. doi:10.3748/wjg.v20.i14.3825.
3. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(6): 1471–1474. doi:10.1245/s10434-010-0985-4.
4. Jhaveri KS, Hosseini-Nik H. MRI of rectal cancer: an overview and update on recent advances. *Am J Roentgenol* 2015; 205(1): W42–W55. doi:10.2214/AJR.14.14201.
5. Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Achiev Life Sci* 2016; 10(2): 175–186. doi:10.1016/j.als.2016.11.007.
6. Ishikawa H, Yamada H, Taromaru N et al. Stability of serum high-density lipoprotein-microRNAs for preanalytical conditions. *Ann Clin Biochem* 2017; 54(1): 134–142. doi:10.1177/0004563216647086.
7. Yu J, Li N, Wang X et al. Circulating serum microRNA-345 correlates with unfavorable pathological response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7(39): 64233–64243. doi:10.18632/oncotarget.11649.
8. Hiyoshi Y, Akiyoshi T, Inoue R et al. Serum miR-143 levels predict the pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8(45): 79201–79211. doi:10.18632/oncotarget.16760.
9. Azizian A, Kramer F, Jo P et al. Preoperative prediction of lymph node status by circulating mir-18b and mir-20a during chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *World J Surg* 2015; 39(9): 2329–2335. doi:10.1007/s00268-015-3083-8.