

MikroRNA jako potenciální prognostické a prediktivní biomarkery u pacientů s atypickým meningeomem

MicroRNAs as potential prognostic and predictive biomarkers in patients with atypical meningioma

Al Tukmachi D.¹, Naar O.¹, Fadrus P.³, Vybíhal V.³, Slabý O.^{1,2,4}, Šána J.^{1,2,5}

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU Brno

² Ústav patologie, LF MU a FN Brno

³ Neurochirurgická klinika LF MU a FN Brno

⁴ Biologický ústav, LF MU Brno

⁵ Klinika komplexní onkologické péče LF MU a MOÚ Brno

Souhrn

Východiska: Meningeomy jsou nejčastější primární intrakraniální nádory a jsou rozděleny do tří patologických stupňů. Přestože se většina těchto nádorů vyznačuje mírným průběhem a má relativně příznivou prognózu, meningeomy klasifikované Světovou zdravotnickou organizací jako stupeň 2 (atypické) a stupeň 3 (anaplastické) vykazují znaky invazivity a jsou často spojeny s vyšší pravděpodobností relapsu. Management agresivnějších tumorů vyššího stupně zůstává i nadále výzvou. Atypické meningeomy (AM) recidivují až u 40 % pacientů do 5 let od chirurgického zákroku, a to i přes totální resekci. Adjuvantní radioterapie (ART) je standardní léčbou anaplastických meningeomů, u AM však v současné době konsenzus neexistuje a v klinické praxi je obtížné identifikovat radiorezistentní pacienty. Je proto nutné najít prognostické a prediktivní biomarkery, které by byly schopny pacienty odlišit. Velmi slibnou skupinu biomarkerů představují mikroRNA (miRNA). Tyto krátké nekódující RNA regulují většinu biologických procesů vč. buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Předchozí výzkum popsal významnou dysregulaci miRNA v nádorových tkáních meningeomů a také prokázal jejich zapojení do nádorové radiorezistence. Cílem studie je identifikovat tkáňové miRNA schopné predikovat pacienty s AM, kteří by mohli mít prospěch z ART. Dále předpokládáme, že existují miRNA se schopností předpovídat riziko recidivy nezávisle na stupni meningeomu a stupni resekce dle Simpsona. **Materiál a metody:** Studie zahrnuje 80 pacientů s meningeomem v explorativní fázi a 400 pacientů ve validační fázi. Globální profil exprese miRNA byl vytvořen pomocí TaqMan Array Human MicroRNA Cards. **Výsledky a závěr:** Studie identifikovala významně dysregulované miRNA u pacientů s AM, u kterých nastal a nenastal relaps ($p < 0,01$). Byl také detekován dysregulovaný expresní profil miRNA u pacientů s AM s indikovanou ART, u kterých došlo a nedošlo k rekurenci ($p < 0,01$). Výsledky mohou pomoci přesněji předpovědět prognózu chirurgicky intervenovaných pacientů a určit, kteří pacienti mohou těžit z ART.

Klíčová slova

meningeom – mikroRNA – biomarkery

Tento výzkum je podpořen grantem AZV MZ ČR, reg. č. NV19-03-00559.

This research is supported by the AZV grant of the Ministry of Health of the Czech Republic, reg. No. NV19-03-00559.

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

The authors declare that 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.



MUDr. Dagmar Al Tukmachi
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: dasa.altukmachi@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 15. 7. 2022

Přijato/Accepted: 1. 9. 2022

Summary

Background: Meningiomas are the most common primary intracranial tumors divided into three pathological grades. Most of these tumors are characterized by a slow progression and a relatively favorable prognosis. Meningiomas classified by the World Health Organization as grade 2 (atypical) and grade 3 (anaplastic) show signs of invasiveness and are often associated with a higher probability of relapse. The management of more aggressive, higher-grade tumors remains a challenge. Atypical meningiomas (AM) recur in as many as 40% of patients within 5 years following surgery, despite total resection. Adjuvant radiotherapy (ART) is the standard treatment for anaplastic meningiomas, but in AM, there is currently no consensus, and it is challenging to identify radioresistant patients in clinical practice. It is, therefore, necessary to find prognostic and predictive biomarkers that would be able to differentiate patients. MicroRNAs (miRNAs) represent a very promising group of biomarkers. These short non-coding RNAs regulate most biological processes, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Previous research has described a significant dysregulation of miRNAs in meningioma tumor tissues and demonstrated their involvement in tumor radioresistance. The study aims to identify tissue miRNAs capable of predicting AM patients who might benefit from ART. Furthermore, we hypothesize that there are miRNAs with the ability to predict recurrence risk independently of meningioma grade and Simpson's grade of resection. **Material and methods:** The study includes 80 meningioma patients in the exploratory phase and 400 patients in the validation phase. A global miRNA expression profile was generated using TaqMan Array Human MicroRNA Cards. **Results and conclusion:** The study identified significantly dysregulated miRNAs in AM patients who did and did not relapse ($P < 0.01$). The data also demonstrated a dysregulated miRNA expression profile in ART-indicated AM patients with and without recurrence ($P < 0.01$). The results may help to predict the prognosis of surgically intervened patients more accurately and determine which patients may benefit from ART.

Key words

meningioma – microRNA – biomarkers

Úvod

Meningeomy (MNG) představují 38,3 % všech histologicky potvrzených nádorů mozku a centrální nervové soustavy (CNS), přičemž jejich incidence roste s věkem [1]. Světová zdravotnická organizace (WHO) tyto tumory definuje jako pomalu rostoucí, většinou nezhoubné a léčitelné totální resekci. Přibližně 20 % MNG, označovaných jako WHO grade 2 (atypické – AM) a WHO grade 3 (anaplastické), je však charakterizováno nepříznivým klinickým průběhem s lokální recidivou nebo progresí do vyššího nádorového stupně, často spojenou s invazí do mozku [2]. Věk, stupeň nádoru a rozsah chirurgické resekce zůstávají nejdůležitějšími prognostickými faktory souvisejícími s přežitím pacienta s MNG [3,4]. Ačkoliv jsou jednotlivé podtypy a stupně MNG stále definovány na základě histologických kritérií, klasifikace WHO z roku 2021 zahrnuje pro jejich lepší charakterizaci i molekulární biomarkery, jejichž příkladem může být aktivační mutace TERT (telomeráza reverzní transkriptáza), která je pozorována u MNG vyššího stupně a je považována za rizikový faktor progresu MNG, spojený s krátkou dobou přežití [5,6]. Je známo, že u AM a anaplastických MNG existuje 7–8× vyšší riziko recidivy a mortality ve srovnání s benigními MNG. I přes tuto skutečnost je adjuvantní radioterapie (ART) součástí standardního

pooperačního managementu pouze u anaplastických meningeomů, u AM v současné době konsensus neexistuje. Je proto důležité najít nové biomarkery schopné identifikovat rizikovou skupinu pacientů s AM, která bude mít z ART největší prospěch [4,5].

Jedním z kandidátních biomarkerů jsou mikroRNA (miRNA), které regulují posttranskripční genovou expresí komplementárním navázáním na 3'-UTR (3'-untranslated region – 3'-nepřekládaná oblast) cílové mRNA. Tyto nekódující RNA dlouhé 19–25 nukleotidů hrají klíčovou roli ve většině biologických procesů vč. buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy a jejich dysregulace může vést ke vzniku nádorového onemocnění [7]. Nedávná studie podala důkaz o významně dysregulovaném expresním profilu miRNA detekovaném v mozkomíšním moku pacientů s MNG ve srovnání se zdravými kontrolami [8]. Také ve vzorcích FFPE (formalin fixed paraffin-embedded – fixované ve formalínu a archivované v parafínu) tkáně pacientů s MNG byly identifikovány prognostické miRNA schopné přesně predikovat čas do relapsu, a tím pomoci určit optimální pooperační management MNG [9]. Publikované studie potvrzují účast těchto molekul v mnohých nádorových biologických procesech vč. ovlivnění výskytu a vývoje MNG, regulace proliferace, invazivity, apoptózy, reci-

divy a tvorby metastáz a indikují, že dysregulovaná exprese miRNA v MNG může poskytnout potenciální prognostické a prediktivní biomarkery a diagnostické cíle, které by mohly lépe definovat rizikové pacienty s AM [10].

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno 80 pacientů z Fakultní nemocnice Brno a Fakultní nemocnice u sv. Anny, kteří podstoupili chirurgickou resekci AM. Klinická data a informace o indikované adjuvantní RT byla získána z registru AMIS a z lékařských záznamů. V době operace měli všichni pacienti podepsaný informovaný souhlas schválený etickou komisí a po chirurgickém zákroku byli sledováni až po dobu 10 let. Pět let od chirurgické resekce bylo stanoveno jako doba sledování, která pacienty rozděluje na ty, u kterých ne/došlo k rekurenci.

V explorativní fázi studie byly použity vzorky FFPE tkáně primárních tumorů, ze kterých byla po deparafinovací xylenem izolována celková RNA obohacená o miRNA pomocí komerčně dostupného izolačního kitu mirVana miRNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Celková RNA byla eluována do 30 nebo 50 µl elučního roztoku a poté uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čistota a koncentrace RNA byla detekována pomocí přístroje Nanodrop 2000c a Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scien-

tific, USA). K získání vysokokapacitního profilu miRNA exprese v FFPE tkáních byla vybrána detekce pomocí TaqMan™ Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0 (ThermoFisher Scientific, USA) umožňující detekci až 759 miRNA. Do reverzní transkripce bylo jako vstupní množství použito 500 ng celkové RNA a bylo postupováno dle protokolu výrobce. Kvantitativní PCR (qPCR) byla detekována na přístroji QuantStudio™ 12K Flex (ThermoFisher Scientific, USA).

K normalizaci mezi měřeními kartami byla použita inter-plate kontrola a byly vyřazeny miRNA, které u více než poloviny měřených vzorků nabývaly Ct hodnot vyšších než 35. Následně byla pomocí software GenEx (MultiD Analyses AB, Sweden) vybrána vnitřní referenční kontrola. Statistická analýza relativně kvantifikovaných dat byla provedena za použití jazyka R (balík limma) a ROC analýzou v software GraphPad Prism 5. Za statisticky významnou byla považována hladina hodnoty $p < 0,01$ a $-1 > \log_{2}FC > 1$.

Výsledky

Ve výsledcích je zahrnuto celkem 41 pacientů s AM, u nichž byl pomocí vysokokapacitní technologie analyzován expresní profil miRNA z tkáňových FFPE vzorků tumorů odebraných během chi-

urgické resekce a před zahájením ART. Medián věku pacientů v čase diagnózy byl $60,4 \pm 12,8$ roku (23,4–79,4 roku) a průměrný čas do relapsu byl 38,9 měsíce. Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin dle indikované ART a času do recidivy. Do výsledků bylo zařazeno 18 pacientů s indikovanou ART (13 s relapsem a 5 bez relapsu) a 23 pacientů bez indikované ART (11 s relapsem a 12 bez relapsu).

Z měření 759 miRNA bylo detekováno 277 miRNA. Následná analýza prokázala tři statisticky významně dysregulované miRNA – hsa-miR-150, hsa-miR-214 a hsa-miR-483-3p u pacientů bez indikované ART. U pacientů s indikovanou ART byla detekována statisticky významná dysregulace 3 miRNA – hsa-miR-454, hsa-miR-99b* a hsa-miR-21*.

Diskuze a závěr

Výsledky prokázaly statisticky významnou dysregulaci tkáňových miRNA mezi definovanými skupinami pacientů s AM a potvrdily, že tyto molekuly představují vhodnou skupinu potenciálních prognostických a prediktivních biomarkerů. Dosažené výsledky je nutné validovat na širším nezávislém souboru vzorků pacientů s MNG. Validované miRNA pak mohou sloužit jako jeden z nástrojů personalizované medicíny

a precizně detekovat rizikové pacienty s AM.

Literatura

- Ostrom QT, Nirav P, Patil N, Cioffi G et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol* 2020; 22 (12 Suppl 2): iv1–iv96. doi: 10.1093/neuonc/noaa200.
- Harter PN, Braun Y, Plate KH. Classification of meningiomas – advances and controversies. *Chin Clin Oncol* 2017; 6 (Suppl 1): S2. doi: 10.21037/cco.2017.05.02.
- Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; 20(1): 22–39. doi: 10.1136/jnnp.20.1.22.
- Delgado-López PD, Corrales-García EM. Role of adjuvant radiotherapy in atypical (WHO grade II) and anaplastic (WHO grade III) meningiomas: a systematic review. *Clin Transl Oncol* 2021; 23(2): 205–221. doi: 10.1007/s12094-020-02434-3.
- Goldbrunner R, Stavrinou P, Jenkinson MD et al. EANO guideline on the diagnosis and management of meningiomas. *Neuro Oncol* 2021; 23(11): 1821–1834. doi: 10.1093/neuonc/noab150.
- Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer* 2022; 128(1): 47–58. doi: 10.1002/cncr.33918.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281–297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Kopkova A, Sana J, Machackova T et al. Cerebrospinal fluid microRNA signatures as diagnostic biomarkers in brain tumors. *Cancers (Basel)* 2019; 11(10): 1546. doi: 10.3390/cancers11101546.
- Slavik H, Balik V, Vrbkova J et al. Identification of meningioma patients at high risk of tumor recurrence using MicroRNA profiling. *Neurosurgery* 2020; 87(5): 1055–1063. doi: 10.1093/neuros/nyaa009.
- Wang L, Shengpan C, Liu Y et al. The biological and diagnostic roles of MicroRNAs in meningiomas. *Rev Neurosci* 2020; 31(7): 771–778. doi: 10.1515/revneuro-2020-0023.