

Sekvenování mikroRNA v mozkových metastázách jako nový diagnostický nástroj

Sequencing of microRNAs in brain metastases as a new diagnostic tool

Večeřa M.¹, Radová L.¹, Siegl F.¹, Smrčka M.², Jančálek R.³, Hermanová M.⁴, Hendrych M.⁴, Křen L.⁵, Šána J.^{1,6}, Slabý O.^{1,7}

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

² Neurochirurgická klinika LF MU a FN Brno

³ Neurochirurgická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

⁴ I. Ústav patologie, LF MU a FN u sv. Anny v Brně

⁵ Ústav patologie, LF MU a FN Brno

⁶ Klinika komplexní onkologické péče LF MU a MOÚ, Brno

⁷ Biologický ústav, LF MU, Brno

Souhrn

Východiska: Mozkové metastázy (BM) jsou nejčastějšími intrakraniálními nádory u dospělých onkologických pacientů. Zatímco dříve byly BM léčeny pouze symptomaticky, přístup k terapii se mění v důsledku zvyšující se incidence, vyplývající z efektivnější léčby primárních nádorů a časnějšího zachytu malých asymptomatických BM. Protože prognóza pacientů s BM je vysoce variabilní, bylo by užitečné zlepšit diagnostické a prognostické nástroje začleněním nových výkonných biomarkerů. MikroRNA (miRNA) jsou v tomto ohledu slibné a díky své vysoké stabilitě vhodné jak pro sekvenování (RNA-Seq), tak pro retrospektivní analýzy v tkáních fixovaných formalinem a zalitých v parafinu (formalin-fixed and paraffin embedded – FFPE). **Materiál a metody:** Celková RNA obohacená o miRNA byla izolována ze 71 čerstvě zmrazených histopatologicky potvrzených tkání BM s původem v pěti typech nádorů (karcinom plic, 37 %; melanom, 23 %; karcinom prsu, 18 %; renální karcinom, 15 %; kolorektální karcinom, 7 %). Před léčbou byl od každého pacienta získán informovaný souhlas schválený místní etickou komisí. Z RNA byly připraveny knihovny pro sekvenování na platformě NextSeq 500 (Illumina). Mapování čtení na referenci bylo provedeno pomocí nástroje miraligner a databáze miRBase a diferenciální analýza pro 2 437 maturovaných miRNA pomocí nástroje limma. Molekuly miRNA ze vzorků celkové RNA izolovaných z retrospektivního souboru 119 FFPE tkání byly reverzně transkribovány a exprese vybraných diferenciálně exprimovaných miRNA (miR-122-5p, miR-141-3p, miR-146a-5p, miR-194-5p, miR-200c-3p, miR-211-3p, miR-215-5p, miR-514b-3p, miR-934, miR-1270) byla validována pomocí qPCR. **Výsledky:** Diferenciální analýzou bylo identifikováno 373 miRNA s významně odlišnou expresí mezi pěti skupinami BM ($p < 0,001$). Následnou validací byla ověřena významně odlišná exprese vybraných miRNA v pěti skupinách BM. **Závěr:** Prezentované výsledky potvrzují důležitost studia dysregulované exprese miRNA v BM a diagnostický potenciál validovaných miRNA.

Klíčová slova

nádory mozku – metastázy nádorů – mikroRNA – sekvenování nové generace – biomarkery

Studie byla vypracována s grantovou podporou Ministerstva zdravotnictví ČR – grant č. NV18-03-00398 a RVO (Masarykův onkologický ústav – MOÚ, 00209805; a Fakultní nemocnice Brno – FNBr, 65269705).

This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. NV18-03-00398 and by the conceptual development of research organizations (Masaryk Memorial Cancer Institute – MOÚ, 00209805; and University Hospital Brno – FNBr, 65269705).

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.



Mgr. Marek Večeřa
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: marek.vecera@ceitec.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 15. 7. 2022

Přijato/Accepted: 15. 8. 2022

Summary

Background: Brain metastases (BM) are the most common intracranial tumors in adult cancer patients. While previously BMs were only treated symptomatically, the approach to therapy is changing due to the increasing incidence resulting from more effective treatment of primary tumors and earlier detection of small asymptomatic BMs. As the prognosis of patients with BM is highly variable, it would be useful to improve diagnostic and prognostic tools by incorporating new powerful biomarkers. MicroRNAs (miRNAs) are promising in this regard and, due to their high stability, suitable both for sequencing (RNA-Seq) and for retrospective analyses in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues. **Material and methods:** Total RNA enriched for miRNAs was isolated from 71 fresh-frozen histopathologically confirmed BM tissues originating from 5 tumor types (lung cancer, 37%; melanoma, 23%; breast cancer, 18%; renal cell carcinoma, 15%; colorectal carcinoma, 7%). Informed consent approved by the local ethics committee was obtained from each patient before treatment. Libraries were prepared from RNA for sequencing on the NextSeq 500 platform (Illumina). Read-to-reference mapping was performed using the tool miraligner and the database miRBase, and differential analysis for 2 437 matured miRNAs was done using the tool limma. MiRNA molecules from total RNA samples isolated from a retrospective set of 119 FFPE tissues were reverse transcribed and the expression of selected differentially expressed miRNAs (miR-122-5p, miR-141-3p, miR-146a-5p, miR-194-5p, miR-200c-3p, miR-211-3p, miR-215-5p, miR-514b-3p, miR-934, miR-1270) was validated by qPCR. **Results:** Differential analysis identified 373 miRNAs with significantly different expression between the five BM groups ($P < 0.001$). Subsequent pilot validation verified significantly different expression of selected miRNAs in five BM groups. **Conclusion:** The presented results confirm the importance of studying dysregulated miRNA expression in BM and the diagnostic potential of validated miRNAs.

Key words

brain neoplasms – neoplasm metastasis – microRNAs – next-generation sequencing – biomarkers

Úvod

Metastatická stadia nádorových onemocnění patří mezi nejnáročnější výzvy moderní medicíny. Mozkové metastázy (BM) jsou nejčastějšími intrakraniálními nádory u dospělých onkologických pacientů, přičemž vzdálené metastázy v mozku tvoří odhadem 9–17 % nádorů [1,2]. Zatímco dříve byly BM léčeny pouze symptomaticky, přístup k terapii těchto nádorů se v současnosti mění v důsledku zvyšující se incidence. Ta je zapříčiněna jednak větší dostupností citlivějších metod zachycujících malé asymptomatické BM a jednak efektivnější léčbou primárních nádorů, která sice prodlužuje přežití pacientů, ale zároveň zvyšuje riziko rozvoje metastatického onemocnění. Navzdory implementaci nových metod vedoucích ke zlepšení diagnostiky a léčby pacientů a vývoje nových terapeutik jsou BM nadále fatální událostí v progresi nádorů s přežitím pacienta obvykle < 10 měsíců od stanovení diagnózy BM [3–5].

Nejčastěji do mozku metastazují plicní karcinomy (16,3–36 %), prsní karcinomy (5–30 %), melanomy (6–11 %), renální karcinomy (2–16 %) a kolorektální karcinomy (1–4 %) [6–8]. U této geneticky heterogenní skupiny nádorů se prognóza pacientů velmi liší a bylo by užitečné vylepšit v současnosti používané diagnostické a prognostické nástroje [9] začleněním nových výkonných biomarkerů, které by umožnily časné sta-

novení diagnózy a identifikaci pacientů s nejhorší prognózou. V tomto ohledu se jako slibná jeví skupina krátkých nekódujících RNA zvaných mikroRNA (miRNA). Jejich velikou výhodou je vysoká stabilita v různých biologických materiálech vč. čerstvé tkáně a formalinem fixované tkáně z parafinových bloků (FFPE). Tyto molekuly jsou tudíž vhodné jak pro sekvenování (RNA-Seq), tak pro analýzy s využitím archivních FFPE tkání [10,11].

Z malého počtu publikovaných studií orientovaných na analýzu exprese miRNA v BM lze zmínit studii od Daugaard et al, kteří v rámci své práce identifikovali devět miRNA s dysregulovanou expresí v tkáních metastazujícího plicního adenokarcinomu (metastatic lung adenocarcinoma – MLA) v porovnání s nemetastazujícím plicním adenokarcinomem (non-metastatic lung adenocarcinoma – NMLA). Podobné trendy pozorovali mezi párovými vzorky MLA a BM odvozených od těchto nádorů. Expresi vybraných miRNA pak analyzovali pomocí kvantitativní PCR (qPCR) v rozšířených kohortách NMLA, MLA, BM odvozených od MLA a vzorků zdravé plicní tkáně a pozorovali signifikantně zvýšenou expresi miR-210-3p ve vzorcích plicního adenokarcinomu v porovnání se zdravou tkání i ve vzorcích MLA v porovnání s NMLA, která vysoce korelovala s výskytem distálních metastáz [12]. An et al pomocí sekvenování identifikovali 115 miRNA s dysregu-

lovanou expresí v metastatické buněčné linii 231-BR v porovnání s mateřskou linií MDA-MB-231 s původem v triple-negativním karcinomu prsu. Pomocí qPCR pak potvrdili dysregulovanou expresi vybraných miRNA [13]. Hanniford et al se zaměřili na prognostický potenciál miRNA u pacientů s kožním melanomem tvořícím BM. Expresi miRNA analyzovali v tréninkové kohortě s využitím miRNA mikročipů a pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik zahrnujícího klinické stadium nádorů a expresi miRNA identifikovali čtyři miRNA asociované s délkou doby přežití bez BM. Autoři pak pro pacienty definovali rizikové skóre, které úspěšně validovali pomocí mikročipové analýzy ve validační kohortě a pomocí qPCR v další nezávislé kohortě [14].

Materiál a metody

V naší práci jsme se zaměřili na analýzu miRNA v 71 vzorcích čerstvé histopatologicky potvrzené tkáně BM odvozených od karcinomu plic (BML, 37 %), melanomu (BMM, 23 %), karcinomu prsu (BMB, 18 %), renálního karcinomu (BMR, 15 %) a kolorektálního karcinomu (BMC, 7 %). Informovaný souhlas schválený etickou komisí byl obdržán od pacientů před započatím léčby. Celková RNA obohatená o krátké RNA byla izolována ze vzorků tkáně. Molekulární knihovny pro RNA-Seq byly připraveny ze vzorků RNA a sekvenovány na platformě NextSeq 500 (Illumina). Mapování čtení na refe-

renci bylo provedeno pomocí nástroje miraligner a databáze miRBase. Diferenciální analýza byla provedena pro 2 437 maturovaných miRNA pomocí nástroje limma. Validace výsledků RNA-Seq byla provedena pomocí qPCR na nezávislém souboru, který zahrnoval 119 vzorků FFPE tkáně (BML, 23 %; BMM, 24 %; BMB, 18 %; BMR, 20 %; BMC, 15 %). Výsledky PCR byly normalizovány a poté analyzovány pomocí Mann-Whitneyho U testu.

Výsledky

Z výše uvedeného počtu hodnocených molekul bylo statistickou analýzou identifikováno 373 miRNA s významně odlišnou expresí mezi pěti skupinami BM ($p < 0,001$). Deset signifikantně diferenciatně exprimovaných miRNA (miR-122-5p, miR-141-3p, miR-146a-5p, miR-194-5p, miR-200c-3p, miR-211-3p, miR-215-5p, miR-514b-3p, miR-934, miR-1270) bylo vybráno pro následnou validaci výsledků RNA-Seq v nezávislém retrospektivním souboru. Signifikantní diferenciální expresi vybraných miRNA v pěti typech BM jsme částečně nebo úplně potvrdili u 9 z 10 miRNA. Konkrétně hsa-miR-141-3p a hsa-miR-200c-3p byly vysoce exprimovány v BML ($p < 0,0001$), BMB ($p < 0,0001$) a BMC ($p < 0,001$) v porovnání s BMR a BMM. Hsa-miR-122-5p a hsa-miR-1270 byly vysoce exprimovány v BMR v porovnání s ostatními BM. Zatímco hsa-miR-194-5p byla vy-

soce exprimována v BMC v porovnání se všemi ostatními skupinami ($p < 0,0001$), u hsa-miR-215-5p byla signifikantně vysoká exprese v BMC pozorována jen v porovnání s BMB ($p < 0,0001$) a BMM ($p < 0,0001$). Statisticky významně zvýšená exprese hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-211-3p a hsa-miR-514b-3p byla pozorována v BMM. V případě miR-934 byl pozorován signifikantní rozdíl mezi BMM a BML ($p < 0,01$), zatímco u miR-552-3p nebyl pozorován žádný rozdíl mezi porovnávanými BM.

Diskuze a závěr

Po statistickém zpracování sekvenčních dat a validaci pomocí qPCR potvrdily uvedené výsledky statisticky významnou dysregulaci exprese miRNA v BM. Tyto RNA mají značný potenciál stát se vhodnými diagnostickými biomarkery a do budoucna bude taky přínosné korelovat jejich expresi s klinicko-patologickými daty pro ověření jejich prognostického potenciálu.

Literatura

1. Nayak L, Lee EQ, Wen PY. Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep* 2012; 14(1): 48–54. doi: 10.1007/s11912-011-0203-y.
2. Sacks P, Rahman M. Epidemiology of brain metastases. *Neurosurg Clin N Am* 2020; 31(4): 481–488. doi: 10.1016/j.nec.2020.06.001.
3. Niemiec M, Głogowski M, Tyc-Szczepaniak D et al. Characteristics of long-term survivors of brain metastases from lung cancer. *Rep Pract Oncol Radiother* 2011; 16(2): 49–53. doi: 10.1016/j.rpor.2011.01.002.

4. Sperduto PW, Kased N, Roberge D et al. Summary report on the graded prognostic assessment: an accurate and facile diagnosis-specific tool to estimate survival for patients with brain metastases. *J Clin Oncol* 2012; 30(4): 419–425. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0527.
5. Wu K, Sharma S, Venkat S et al. Non-coding RNAs in cancer brain metastasis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2016; 8(1): 187–202. doi: 10.2741/s457.
6. Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG et al. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol* 2004; 22(14): 2865–2872. doi: 10.1200/JCO.2004.12.149.
7. Ostrom QT, Wright CH, Barnholtz-Sloan JS. Brain metastases: epidemiology. *Handb Clin Neurol* 2018; 149: 27–42. doi: 10.1016/B978-0-12-811161-1.00002-5.
8. Schouten LJ, Rutten J, Huveneers HA et al. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer* 2002; 94(10): 2698–2705. doi: 10.1002/cncr.10541.
9. Kazda T, Kuklova A, Pospisil P et al. Utilization of prognostic indexes for patients with brain metastases in daily radiotherapy routine – is the complexity and intricacy still an issue? *Klin Onkol* 2015; 28(5): 352–358. doi: 10.14735/amko2015352.
10. Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H et al. MicroRNA stability in FFPE tissue samples: dependence on GC content. *PLoS One* 2016; 11(9): e0163125. doi: 10.1371/journal.pone.0163125.
11. Peiró-Chova L, Peña-Chilet M, López-Guerrero JA et al. High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Arch* 2013; 463(6): 765–774. doi: 10.1007/s00428-013-1485-2.
12. Dugaard I, Venø MT, Yan Y et al. Small RNA sequencing reveals metastasis-related microRNAs in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(16): 27047–27061. doi: 10.18632/oncotarget.15968.
13. An M, Zang X, Wang J et al. Comprehensive analysis of differentially expressed long noncoding RNAs, miRNAs and mRNAs in breast cancer brain metastasis. *Epigenomics* 2021; 13(14): 1113–1128. doi: 10.2217/epi-2021-0152.
14. Hanniford D, Zhong J, Koetz L et al. A miRNA-based signature detected in primary melanoma tissue predicts development of brain metastasis. *Clin Cancer Res* 2015; 21(21): 4903–4912. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2566.