

УДК 616-006.5, 616-006.66

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РНК-БИОМАРКЕРОВ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.С. Никитина^{1,2}, В.В. Бабенко¹, К.А. Бабалян², А.О. Васильев³, А.В. Говоров³,
Е.А. Прилепская³, С.А. Даниленко¹, О.В. Селезнева¹, Е.И. Шарова¹*

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а; эл. почта: quokka.smiles@gmail.com

²Московский физико-технический институт (государственный университет),
г. Долгопрудный

³Кафедра урологии Московского государственного медико-стоматологического
университета имени А.И. Евдокимова, Москва

Показана принципиальная возможность поиска кандидатных РНК-биомаркеров рака простаты в биоматериале, получаемом малоинвазивными манипуляциями – моче и плазме крови. Установлено, что у пациентов с доброкачественной гиперплазией (аденомой) простаты в моче и плазме крови обнаруживается значительное количество РНК-биомаркеров, потенциально ассоциированных, по литературным данным, с раком простаты. Продемонстрирована зависимость количества обнаруживаемых маркеров от метода транскриптомного профилирования. Обнаружение в исследуемых образцах плазмы крови и мочи известных РНК-биомаркеров, ассоциированных с РПЖ, методом RNA-seq позволяет сделать вывод о пригодности такого подхода при поиске новых РНК-маркеров для малоинвазивной диагностики. При этом сам факт присутствия известных РНК-маркеров РПЖ в образцах от пациентов с ДГПЖ может свидетельствовать об их недостаточной специфичности и подтверждает необходимость дальнейших исследований в этой области.

Ключевые слова: рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РНК биомаркеры, RNA-seq

DOI: 10.18097/PBMC20156106781

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой в диагностике рака предстательной железы (РПЖ) является недостаточная чувствительность и специфичность существующих скрининговых тестов, в частности ПСА [1].

Активные исследования по выбору кандидатных биомаркеров, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью для диагностики РПЖ, идут постоянно. В идеале такие маркеры должны обеспечивать возможность дифференциальной диагностики РПЖ от доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ). Именно недостаточное число пациентов с ДГПЖ в группах контроля при проведении соответствующих исследований может являться причиной, обуславливающей низкую чувствительность и специфичность вновь разрабатываемых тестов [2, 3].

Особый интерес для малоинвазивной диагностики РПЖ представляет возможность выявления биомаркеров в моче, в том числе собранной после

массажа простаты. Последние исследования показали, что уровень мРНК и длинных некодирующих РНК также имеет прогностическое значение при РПЖ [4, 5]. Предпочтительным для поиска потенциальных биомаркеров данного типа является метод высокопроизводительного параллельного секвенирования РНК (RNA-seq), позволяющий одновременно определять присутствие как мРНК, так и длинных некодирующих РНК в анализируемом образце.

В настоящем исследовании продемонстрирована применимость метода RNA-seq для поиска кандидатных РНК-биомаркеров РПЖ в получаемом малоинвазивном биоматериале – моче и плазме крови.

МЕТОДИКА

В исследовании участвовали четыре пациента с ДГПЖ из группы низкого риска (уровень ПСА крови 0,8-3,5 нг/мл), давшие информированное согласие на участие (табл. 1).

* - адресат для переписки

Таблица 1. Общая характеристика пациентов.

№ пациента	Код образца	Дата рождения пациента	Диагноз	ПСА общий, нг/ мл	Тип анализируемого биоматериала	Возраст на момент забора, лет
P001	П1	03.09.1951	ДГПЖ	3,5	Плазма	63,5
P005	П2	02.08.1953	ДГПЖ	0,8	Плазма	61,6
P013	М3	19.03.1944	ДГПЖ	2,6	Моча	70,9
A50_001	М4	25.19.1947	ДГПЖ	1,5	Моча	67,4

Кровь, собранную в 10 мл вакуумные контейнеры с ингибитором свертывания Na₂ EDTA (“BD”, США), в течение 1 ч от момента сбора центрифугировали при 2500 g 15 мин, плазму отбирали 6 порциями по 500 мкл в микропробирки и немедленно замораживали. Микропробирки с плазмой хранили и транспортировали при температуре -80°C.

Сбор мочи осуществляли после массажа простаты (3 массажных движения справа и слева). Мочу собирали в 250 мл контейнеры, аккуратно перемешивали и переливали в контейнер с консервантом Urine Preservative (“Norgen Biotek”, Канада) до метки 50 мл. Контейнеры с мочой хранили и транспортировали при температуре +4-8°C.

Тотальную РНК из плазмы крови выделяли с использованием набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (“Qiagen”, Германия). Тотальную РНК из мочи выделяли с использованием Urine RNA Concentration, Preservation and Isolation Kit (“Norgen Biotek”). Концентрацию выделенной РНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Двухцепочечную кДНК для образцов П1, П2 и М3 получали с применением набора Mint-2 cDNA synthesis kit (“Евроген”, Россия) согласно инструкции производителя с модификациями: вместо олигонуклеотидного адаптера CDS-4-M использовали оригинальный адаптер CDS-4-N 5'-AAGCAGTG-GTATCAACGCAGAGTGGCCGAGGCGGCC(N)9-3', что позволило использовать в качестве матрицы для синтеза кДНК не только полноразмерные транскрипты мРНК, сохранившие в своём составе полиА хвост, но и другие типы рибонуклеиновых кислот.

Фрагментные библиотеки из двухцепочечной кДНК готовили с использованием Ion Xpress Plus Fragment Library Kit и Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit (“Life Technologies”, США) согласно инструкции производителя.

Транскриптомную библиотеку из тотальной РНК образца М4 готовили с использованием Ion Total RNA-Seq Kit v2 и Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode 01-16 Kit (“Life Technologies”) согласно инструкции производителя.

Секвенирование библиотек осуществляли с использованием генетического анализатора Ion Proton и наборов ION PI HI-Q Sequencing 200 Kit и Ion PI™ Chip Kit v2 (“Life Technologies”) согласно инструкциям производителя.

Анализ данных секвенирования проводили с помощью программ TopHat (выравнивание прочтений на геном) [6] и HTseq (подсчет количества прочтений, соответствующих транскрипту конкретного гена) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе анализировали полученный малоинвазивными манипуляциями биоматериал от пациентов с ДГПЖ – мочу, собранную после массажа простаты, и плазму крови. Количество выделенной тотальной РНК, экстрагированной из этих образцов, соответствовало значениям, известным по литературным данным [8], и составило 487 нг для образца П1, 73 нг для образца П2, 255 нг для образца М3 и 60 нг для образца М4. Для каждого из образцов был подготовлен один из вариантов библиотеки для RNA-seq – фрагментная на основе двухцепочечной кДНК (П1 и П2 – плазма крови, М3 – моча), либо транскриптомная непосредственно на основе РНК (М4 – моча) (рис. 1) и проведено секвенирование.

Полученные в результате прочтения были проанализированы путём первичного выравнивания на референсный геном человека hg19 (табл. 2). Как и в случае фрагментов тканей и органов человека, свыше 90% транскриптов приходились на долю рибосомной РНК (рРНК). Помимо них, в образцах в различных пропорциях присутствовали РНК-транскрипты генов и псевдогенов, длинные некодирующие РНК и микроРНК, то есть все классы РНК, среди которых встречались уже известные потенциальные маркеры РПЖ [9, 10]. Обращает на себя внимание низкая представленность прочтений, соответствующих микроРНК, в образцах П1, П2 и М3, что объясняется особенностями процедуры приготовления библиотек. Напротив, присутствие прочтений, соответствующих длинным некодирующим РНК, существенно во всех образцах, причём их относительная представленность значительно выше в образце М4 по сравнению с образцами П1, П2 и М3.

Среди идентифицированных транскриптов мы прицельно провели поиск РНК-биомаркеров, по литературным данным ассоциированных с РПЖ, их список приводится в Приложении. Всего обнаружено 48 транскриптов, в том числе белок-кодирующих последовательностей (среди них KLK3 (PSA), NCOR1, NCOA2, SPOP, AMACR), длинных некодирующих РНК (MALAT1, NEAT1, PCAT1) и псевдогена PTENP1. Количество

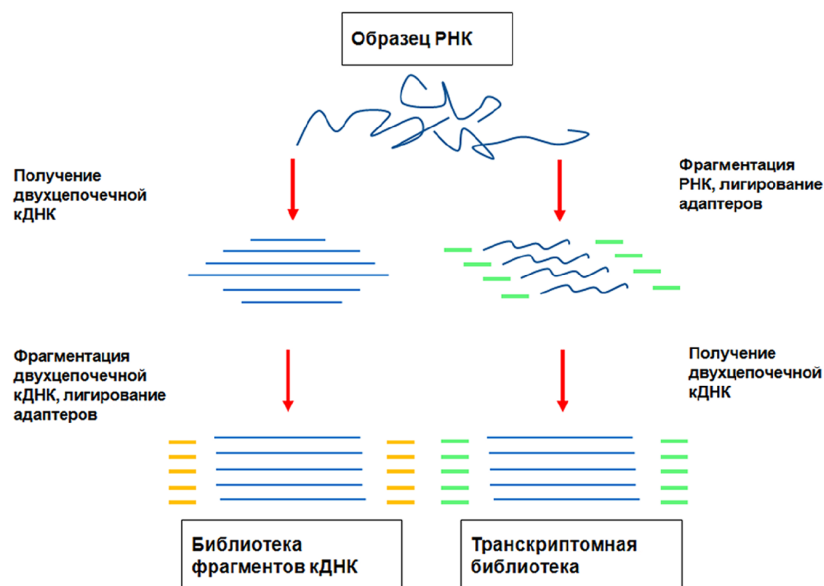


Рисунок 1. Подготовка библиотек для RNA-seq.

Таблица 2. Количество прочтений, выровненных на геном человека, для каждого образца. Приведены соответствующие величины для различных типов транскриптов.

	П1	П2	М3	М4
Всего прочтений	3330146	2286974	8499416	21125590
рРНК	3156814	2199155	7679297	19753529
Белок-кодирующие РНК	168379	84013	784253	1079227
Длинные некодирующие РНК	1756	1698	29172	240712
Псевдогены	3155	2082	6660	18534
Малые некодирующие РНК	42	26	34	33588

выявленных транскриптов так же значительно выше в образце М4 по сравнению с образцами П1, П2 и М3 (рис. 2). Обращает на себя внимание отсутствие во всех четырёх образцах прочтений, соответствующих транскрипту PCA3 (prostate cancer antigen 3), который рекомендован сегодня как РНК-маркер РПЖ в клинической диагностике [11].

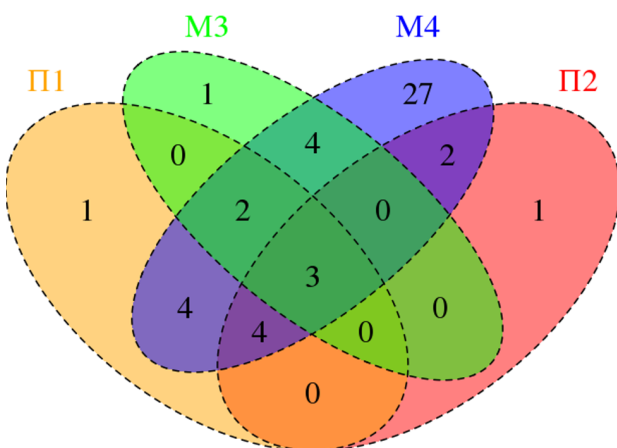


Рисунок 2. Диаграмма Эйлера-Венна, отображающая число известных РНК-биомаркеров РПЖ, транскрипты которых были выявлены в одном или нескольких образцах.

Все вышеперечисленное свидетельствует о преимуществах транскриптомной библиотеки по сравнению с библиотеками фрагментов двухцепочечной кДНК при отборе кандидатных РНК-биомаркеров для дифференциальной диагностики РПЖ и ДГПЖ. Закономерным образом увеличение глубины покрытия при секвенировании повышает разнообразие детектируемых РНК-биомаркеров, влияя тем самым на чувствительность выбранного метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Обнаружение в исследуемых образцах плазмы крови и мочи известных РНК-биомаркеров, ассоциированных с РПЖ, методом RNA-seq позволяет сделать вывод о пригодности такого подхода при поиске новых РНК-маркеров для малоинвазивной диагностики. При этом сам факт присутствия известных РНК-маркеров РПЖ в образцах от пациентов с ДГПЖ может свидетельствовать об их недостаточной специфичности и подтверждает необходимость дополнительных изысканий в этой области.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0068 от 23 сентября 2014 года), уникальный идентификатор ПНИ RFMEFI60714X0068.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thompson I.M., Pauler D.K., Goodman P.J., Tangen C.M., Lucia M.S., Parneset H.L., Minasian L.M., Ford L.G., Lippman S.M., Crawford E.D., Crowley J.J., Coltman C.A. (2004) *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2239-2246.
2. Hessel D., van Gils M.P., van Hooij O., Jannink S.A., Witjes J.A., Verhaegh G.W., Schalken J.A. (2010) *Prostate*, **70**, 10-16.
3. Catalona W., Partin A., Sanda M., Wei J., Klee G., Bangma C., Slawin K.M., Marks L.S., Loeb S., Broyles D.L. et al. (2011) *J. Urol.*, **185**, 1650-1655.
4. Ross-Adams H., Lamba A.D., Dunninga M.J., Halima S., Lindberg J., Massie C.M., Egevad L.A., Russell R., Ramos-Montoya A., Vowler S.L. et al. (2015) *EBioMedicine*, **2**, 1133-1144.
5. Tomlins S.A., Alshalalfa M., Davicioni E., Erho N., Yousefi K., Zhao S., Haddad Z., Den R.B., Dicker A.P., Trock B.J. et al. (2015) *Eur. Urol.*, **68**, 555-567.
6. Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., Pimentel H., Salzberg S.L., Rinn J.L., Pachter L. (2014) *Nat. Protoc.*, **7**, 562-578.
7. Anders S., Pyl P.T., Huber W. (2014) *Bioinformatics*, **31**, 166-169.
8. Ren S.I., Wang F., Shen J., Sun Y., Xu W., Lu J., Wei M., Xu C., Wu C., Zhang Z. et al. (2013) *Eur. J. Cancer*, **49**, 2949-2959.
9. You J., Cozzi P., Walsh B., Willcox M., Kearsley J., Russell P., Li Y. (2010) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **73**, 10-22.
10. Rönna C.G.H., Verhaegh G.W., Luna-Velez M.V., Schalken J.A. (2014) *BioMed. Research International*, 591703.
11. Mottet N., Bellmunt J., Briers E., van den Bergh R.C.N., Bolla M., van Casteren N.J. (2015) Guidelines on prostate cancer, European Association of Urology, p. 22.

Поступила: 05. 10. 2015.

PRIMARY CANDIDATE RNA BIOMARKER SCREENING BY RNA-SEQ FOR PROSTATE CANCER DIAGNOSTICS

A.S. Nikitina^{1,2}, V.V. Babenko¹, K.A. Babalyan², A.O. Vasiliev³, A.V. Govorov³, E.A. Prilepskaya³, S.A. Danilenko¹, O.V. Selezneva¹, E.I. Sharova¹

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya, Moscow, 119435, Russia; e-mail: quokka.smiles@gmail.com

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudniy, Russia

³Department of Urology, Moscow State Medical Stomatological University, Moscow, Russia

The RNA-seq approach for prostate cancer candidate RNA biomarkers screening in plasma and urine obtained by minimally invasive or noninvasive methods is proved to be feasible. Significant amount of RNA biomarkers associated with prostate cancer according to the literature were found in plasma and urine samples obtained from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). The number of detected markers was shown to vary in accordance with method of library preparation used for transcriptome profiling.

The detection of known RNA biomarkers for prostate cancer in urine and plasma samples shows the feasibility of such method for minimally invasive diagnostics. The fact of presence of the same RNA biomarkers in samples from patients with BPH suggests their possible lack of specificity and confirms the need for further research in this area.

Key words: prostate cancer, RNA biomarkers, RNA-seq