

Optimalizácia izolácie exozomálnej miRNA z ľudskej plazmy

Kristína Alföldiová¹, Eva Struhárňanská^{1,2}, Martin Šafranek^{2,3}, Juraj Bugala^{2,4}, Ivan Juráš², Regina Lohajová^{2,5,6}

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava, Slovenská republika,

²Lambda Life, a. s., Levočská 3, 851 01 Bratislava 5, Slovenská republika

³SAV, Centrum biológie rastlín a biodiverzity, Botanický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava 4, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského, Vedecký park, Ilkovičova 8, 84104 Bratislava, Slovenská republika

⁵Slovenská zdravotnícka univerzita, Lekárska fakulta, Ústav genetiky a molekulovej medicíny, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika

⁶Onkologický ústav Svätej Alžbety, Heydukova 10, 812 50 Bratislava, Slovenská republika

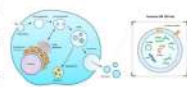


Úvod a ciele

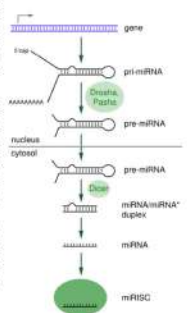
Onkologické ochorenia sú komplexné, systémové, genetické ochorenia, pričom maligna transformácia bunky je viacstupeňový proces spojený s akumuláciou mnohých molekulárnych zmien.

Exozómy sú membránou obalené extracelulárne vezikuly (EV), ktoré sú produkované väčšinou eukaryotických buniek. Exozómy hrajú dôležitú úlohu v komunikácii medzi bunkami tým, že nesú svoj obsah vrátane proteínov, metabolitov, RNA (mRNA, miRNA, dlhé nekódujúce RNA), DNA (mtDNA, ssDNA, dsDNA) a lipidov (Obr. 1). Práve miRNA (Obr. 2) zo skupiny malých nekódujúcich RNA predstavujú sľubný biomarker v diagnostike ako aj liečbe onkologických ochorení. Je známe, že deregulácia expície rôznych typov miRNA je priamo spojená so vznikom a vývojom mnohých nádorových ochorení. Neinvasívna detekcia cirkulujúcich exozomálnych miRNA a sledovanie ich expície môže poskytnúť cenné informácie v diagnostike, v určení prognózy ochorenia ako aj v predikcii k cieľovej liečbe onkologických pacientov. Napriek tomu sa exozomálna miRNA zatiaľ ako biomarker nevyužíva, pretože sa v krvi nachádzajú aj voľne cirkulujúce miRNA a na hladiny oboch typov môžu mať vplyv tiež rôzne environmentálne faktory, preto je základný výskum dôležitý pre ich ďalšie využitie v neinvazívnej diagnostike a personalizovanej medicíne.

Naším cieľom bolo optimalizovať izoláciu exozomálnej miRNA zo vzoriek ľudskej plazmy a metódou absolútnej kvantifikácie na platforme RT-qPCR stanoviť vybrané typy miRNA v zdravých a chorých jedincoch.



Obr. 1. Tvorba exozómov [1]



Obr. 2. Tvorba miRNA [2]

Podakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektu LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Referencie

[1] Soltész B., Buglyó G., Németh N., et al. (2022) Int. J. Mol. Sci. 23(1), p. 8
[2] Esquela-Kerscher A., Slack F. J. (2006) Nat. Rev. Cancer. 6(4), p. 259.

Materiál a metódy

Vzorky: Na izoláciu miRNA sme využívali periférnu krv od dobrovoľníkov odoberanú do skúmaviek BD Vacutainer® s prídavkom EDTA proti zraženiu krvi. Po odobratí sa krv nechala stať pri laboratórnej teplote 30 minút. Nasledovala centrifugácia pri 300 g/ 4 °C/ 10 min na oddelenie plazmy od krvinky. Plazmu sme prepipetovali do čistých skúmaviek a centrifugovali pri 5000 g/ 4 °C/ 20 min na sedimentovanie doštičiek a apoptických teliesok. Opätovne sme plazmu prepipetovali do čistých skúmaviek a centrifugovali pri 16000 g/ 4 °C/ 30 min na sedimentovanie väčších extracelulárnych vezikul. Odobratý supernatant sme rozdelili na alikvóty po 500 µl a uskladnili na -80 °C do ďalšieho použitia.

Izolácia exozómov: Na izoláciu exozómov sme využili Exo-spin™ Exosome Kit (Cell Guidance Systems) a postupovali podľa priloženého postupu. V prípade, ak sme v ďalšom postupe potrebovali pelet exozomov, získaný eluát z kitu sme prežrážali s 10 % PEG8000 a 1 M NaCl pri 0 °C cez noc, následne sme suspenziu centrifugovali pri 20000g/ 4 °C/ 30 min a pelety uchovali pri -80 °C.

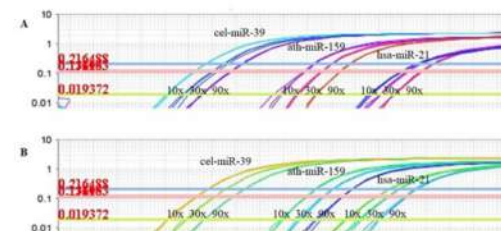
Izolácia miRNA: Pred izoláciou miRNA sme k vzorkám plazmy pridali exogénnu kontrolu syntetickej ath-miR-159 v množstve 1 pmol. Na izoláciu miRNA z exozomov získaných z Exo-spin™ Exosome Kit sme použili PureLink™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen). Alternatívne sme exozomálnu miRNA izolovali priamo z plazmy pomocou Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit (Norgen). Získaným vzorkám miRNA sme stanovili koncentráciu použitím Qubit™ microRNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) a uskladnili sme ich na -80 °C do ďalšieho použitia.

Prepis do cDNA: Na prepis miRNA do cDNA sme použili TaqMan™ Advanced miRNA Assays (ThermoFisher Scientific). K vzorkám sme pred prepisom pridali druhú exogénnu kontrolu cel-miR-39 a postupovali sme podľa priloženého protokolu, ktorý zahŕňa polyadenyláciu, ligáciu adaptérov, reverznú transkripciu a predamplifikáciu miRNA. Získané vzorky sme uskladnili na -20 °C do ďalšieho použitia.

Real-time qPCR: Pri absolútnej kvantifikácii exozomálnej miRNA real-time PCR sme využili TaqMan™ Advanced miRNA Assays (ThermoFisher Scientific) na prístroji Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System. Vzorky sme po predamplifikácii naředili najskôr 10x (na nariadenie inhibitorov reakcie) a potom sme vzorku naředili 30x a 90x, a každá vzorka bola analyzovaná v triplikátoch.

Výsledky a diskusia

Plazmu dobrovoľníkov sme spracovali dvoma spôsobmi. V prvom prípade sme najskôr izolovali exozómy a následne sme izolovali miRNA, v druhom prípade sú oba kroky zahrnuté v jednom izoláčnom sete. V takto získaných vzorkách sme stanovili koncentráciu miRNA na 0,1 – 0,2 ng/ µl, pričom podľa dostupných informácií celkové množstvo malých RNA izolovaných z exozomov predstavuje 6 – 12 ng, čomu zodpovedajú aj naše výsledky. Na verifikáciu zistenia, či izolácia a prepis prebehli správne, sme využili absolútne kvantifikáciu pomocou RT-qPCR. Vždy sme porovnávali vzorku zdravého dobrovoľníka s pacientom, pričom vzorky boli spracované rovnakým spôsobom. Na obr. 3 môžeme vidieť, že pri porovnaní exogénnych kontrol zdravého a pacienta nie je badať rozdiely v ct hodnotách, preto predpokladáme, že izolácia aj prepis do cDNA s predamplifikáciou prebehli správne.



Obr. 3. Analýza vzoriek použitím RT-qPCR. A) Zdravý jedinec, B) Pacient. V oboch prípadoch použité exogénne kontroly pred izoláciou a prepisom do cDNA a testovacia hsa-miR-21.

Mnoho štúdií popisuje diagnostický potenciál hsa-miR-21 v spojitosti s rôznymi ochoreniami, preto sme sa rozhodli hsa-miR-21 pri absolútnej kvantifikácii pri porovnávaní medzi zdravým jedincem a pacientom (Tab. 1), výsledky však nepreukázali štatisticky významné rozdiely. Napriek nejednoznačným výsledkom vieme podľa účinnosti RT-qPCR (97 – 103 %) určiť, že metóda je nastavená správne a zmeny je potrebné urobiť v iných krokoch, okrem iného bude dôležité stanovenie endogénnych kontrol, na základe ktorých sa bude dať vyhodnotiť aj prípadná zmena v expícii miRNA spojených s onkologickými ochoreniami.

Tab. 1. Porovnanie ct hodnôt pri absolútnej kvantifikácii miRNA z rôznych druhov vzoriek. Pre zjednodušenie tabuľky uvádzame len riedenie 30x.

vzorka	ct		
	ath-miR-159	cel-miR-39	hsa-miR-21
Zdravý jedinec: izolácia miRNA cez Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	21,44	15,15	28,77
Pacient: izolácia miRNA cez Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	21,30	15,09	30,41
Pacient: izolácia miRNA cez Exo-spin™ Exosome Kit a PureLink™ miRNA Isolation Kit	-	15,29	29,75

Záver

Podarilo sa nám izolovať exozomálnu miRNA zvolenými postupmi, napriek tomu sú doteraz získané dáta z absolútnej kvantifikácie miRNA nejednoznačné, preto sa do budúcnosti zameriame nielen na optimalizáciu predamplifikácie a zníženia koncentrácie inhibitorov RT-qPCR ale aj odhalenie endogénnych kontrol, ktoré by mali slúžiť pri relatívnej kvantifikácii miRNA spojených s onkologickými ochoreniami.