

УДК 577.2

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ микроРНК ИЗ ТКАНИ АДЕНОМЫ ГИПОФИЗА И ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АКРОМЕГАЛИЕЙ НА ПЛАТФОРМЕ Illumina: ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ

© 2025 г. Е. В. Игнатьева*, Е. С. Нерубенко, О. А. Иванова,
У. А. Цой, Р. И. Дмитриева

*Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197341 Россия
e-mail: lefutr@mail.ru

Поступила в редакцию 08.06.2024 г.
После доработки 19.08.2024 г.
Принята к публикации 09.09.2024 г.

МикроРНК в тканях и биологических жидкостях рассматриваются как диагностические биомаркеры и терапевтические мишени многих, в том числе онкологических заболеваний. Особую ценность имеют биомаркеры, присутствующие в легкодоступных биологических жидкостях, в первую очередь, в крови. Потенциал микроРНК как предиктивных онкомаркеров и терапевтических мишеней изучают с использованием глобального профилирования, которое обеспечивается секвенированием нового поколения (NGS). NGS обладает высокой чувствительностью, однонуклеотидным разрешением и позволяет одновременно профилировать большое число образцов. Несмотря на многообещающий потенциал микроРНК как биомаркеров и рост числа работ в этом направлении, недостаточно освещенными остаются проблемы, связанные с методами подготовки образцов, спецификой получения библиотек для секвенирования, сложностями количественного анализа. Подготовка библиотек микроРНК для секвенирования имеет определенные трудности и требует подбора условий для каждого типа биологического материала. В настоящей работе подробно описано приготовление библиотек микроРНК из опухолевой ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией для секвенирования на платформе Illumina. Рассмотрены сложности и ограничения методов, а также оценена эффективность секвенирования образцов плазмы и мозга. Работа может служить руководством для исследователей, изучающих механизмы регуляции микроРНК при эндокринных заболеваниях гипофиза, а также позволит адаптировать технические процедуры к разным биологическим образцам и разным патологиям.

Ключевые слова: микроРНК, библиотеки для секвенирования, аденома гипофиза, молекулярный биомаркер

DOI: 10.31857/S0026898425020121, **EDN:** GFUSPR

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК – класс некодирующих РНК, которые участвуют в контроле посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. На сегодняшний день описано около 3000 микроРНК человека, которые состоят из 18–24 нуклеотидов и характеризуются эволюционной консервативностью [1]. Классический механизм функционирования этих малых молекул включает взаимодействие с 3'-нетранслируемой

областью мРНК-мишени, которое приводит к ее деградации или подавлению трансляции [2]. Таким образом, выступая в качестве посттранскрипционного регулятора экспрессии генов, микроРНК играют ключевую роль в контроле тканевого гомеостаза и клеточной сигнализации в физиологических условиях. Аберрантная экспрессия микроРНК может быть ассоциирована с разными заболеваниями, в том числе с возникновением, ростом и метастазированием опухолей [3].

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция; NGS – секвенирование нового поколения (next generation sequencing); ПААГ – полиакриламидный гель.

МикроРНК обладают рядом преимуществ, которые делают их многообещающими диагностическими и прогностическими биомаркерами опухолевых заболеваний [4]. МикроРНК характеризуются высокой стабильностью, их экспрессия часто тканеспецифична [5] и изменяется в процессе развития заболевания. Таким образом, в каждом конкретном случае профиль микроРНК может служить маркером стадии опухолевой трансформации и ответа на проводимую терапию. Поскольку микроРНК могут воздействовать на несколько компонентов одного сигнального пути одновременно, привлекательной представляется возможность терапевтического использования конкретных микроРНК [1]. Однако еще не найдены микроРНК, которые могут служить надежными биомаркерами опухолевых заболеваний.

Для получения целостного представления о патогенезе заболевания наиболее эффективно изучение не отдельных ассоциированных с патологией микроРНК, а совместного действия многих микроРНК, что связано с особенностями их функционирования. Принцип действия микроРНК основан на их избыточности и плейотропности: одна микроРНК контролирует несколько мРНК-мишеней, а экспрессия одной мРНК может регулироваться многими микроРНК. Таким образом, каждая микроРНК участвует в регуляции экспрессии сразу нескольких генов, а эффект ее действия зависит от других микроРНК, в результате чего строится сложная регуляторная сеть. Это приводит к “ситуационному эффекту”, когда одна и та же микроРНК в одной ткани может выступать в качестве онкогена, а в другой – опухолевого супрессора [3], а также менять свою роль на протяжении болезни [6]. Еще одним следствием такой организации микроРНК-сети является то, что каждая микроРНК оказывается ассоциированной со множеством заболеваний. Так, микроРНК miR-1-3p действует как опухолевый супрессор при онкологических заболеваниях разных органов и тканей, в том числе мозга [7], и, помимо того, ассоциирована с развитием сердечно-сосудистых заболеваний (рис. 1).

По этой причине для выявления потенциальных терапевтических мишеней в случае каждой конкретной патологии необходимо изучать функционирование микроРНК непосредственно в их предполагаемом источнике (опухолевой ткани) на разных стадиях болезни. Кроме того, при поиске микроРНК, которые можно использовать в качестве диагностических и/или прогностических маркеров, маркеров опухолевой трансформации и успешности выбранной терапии, важно научиться с высокой степенью достоверности и воспроизводимости выявлять

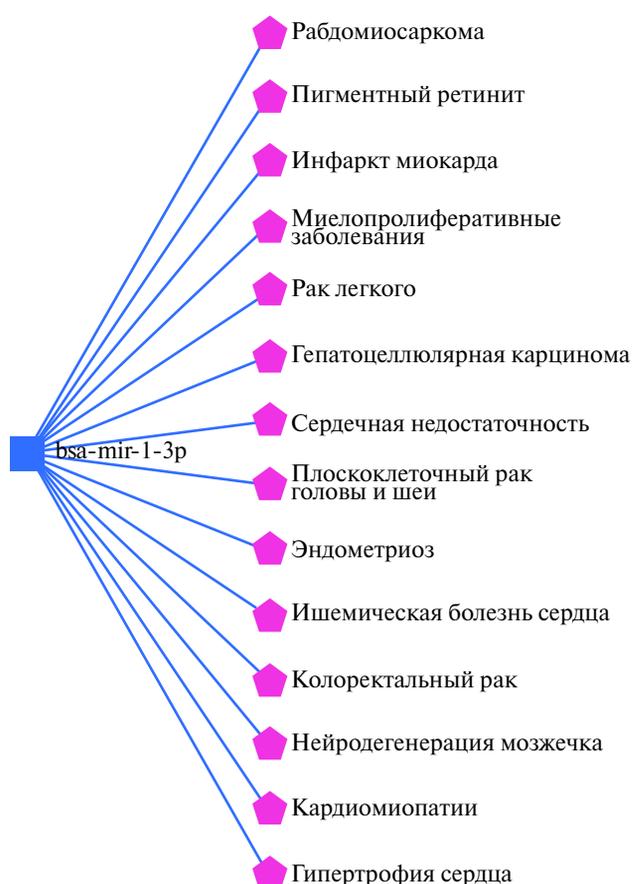


Рис. 1. Ассоциация микроРНК hsa-mir-1-3p с заболеваниями человека (согласно данным визуально-аналитической платформы miRNet 2.0).

эти молекулы в доступных биологических жидкостях.

Транскрипты микроРНК предположительно выделяются опухолями и попадают в кровоток, они несут информацию о месте своего происхождения, а опухолеспецифичные изменения профилей микроРНК, полученных из плазмы онкологических больных, могут иметь диагностическую ценность [8]. МикроРНК обнаруживаются в циркулирующей крови (как в сыворотке, так и в плазме) либо в свободном виде, либо в составе микровезикул [9]. Поскольку микроРНК в плазме стабильны и их легко извлечь, потенциально они могут использоваться в качестве относительно легкодоступных биомаркеров развития и прогрессирования опухолей.

В целом, для выявления терапевтических мишеней в ткани опухоли и диагностических/прогностических маркеров в доступных биологических жидкостях необходимо параллельное комплексное изучение микроРНК (внутри- и внеклеточных – свободных или связанных

с везикулами) в тканях и биологических жидкостях.

При этом в силу сложности регуляторной сети микроРНК очевидна важность исследования не точечных мишеней, а профилирование всего спектра этих молекул. Масштабное профилирование микроРНК обеспечивается применением технологии секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing).

Акромегалия – тяжелое нейроэндокринное состояние, причиной которого в большинстве случаев является избыточная продукция соматотропного гормона аденомой передней доли гипофиза у взрослых. В нашей лаборатории методом NGS проанализирована экспрессия и сопоставлены профили микроРНК в крови и опухолевой ткани пациентов с разными видами аденомы гипофиза с целью выявления как потенциальных диагностических/прогностических маркеров, так и мишеней для таргетной терапии. Протоколы подготовки библиотек для секвенирования микроРНК требуют адаптации к разным видам биологического материала и имеют некоторые отличия от конструирования библиотек для секвенирования мРНК. Описана подготовка библиотек для секвенирования микроРНК на платформе Illumina, особенности работы с биологическими образцами разных типов: ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией. Проведен сравнительный анализ качества секвенирования библиотек, полученных из разных видов биологического материала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение РНК из ткани аденомы гипофиза.

Образцы биопсии новообразований передней доли гипофиза немедленно после операционного извлечения замораживали в жидком азоте, после чего хранили при -80°C . Суммарную РНК из ткани аденомы гипофиза выделяли с применением реагента TRIzol[®] (15596018, “Thermo Fisher Scientific”, США) по протоколу производителя с некоторыми модификациями (рис. 2). Для выделения РНК ткань подвергали механическому разрушению в шаровой мельнице TissueLyser LT (“Qiagen”, США) путем высокоскоростного встряхивания образцов в течение 5 мин в микропробирках с шариками из нержавеющей стали и 1 мл реагента TRIzol[®]. Качество РНК анализировали методом электрофореза на микрофлюидном чипе с помощью системы 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit, 5067-1511, “Agilent Technologies”, США). Количество РНК оценивали с применением флуориметра Qubit 2.0 (Qubit RNA HS Assay Kit, Q32852, “Life Technologies”, США).

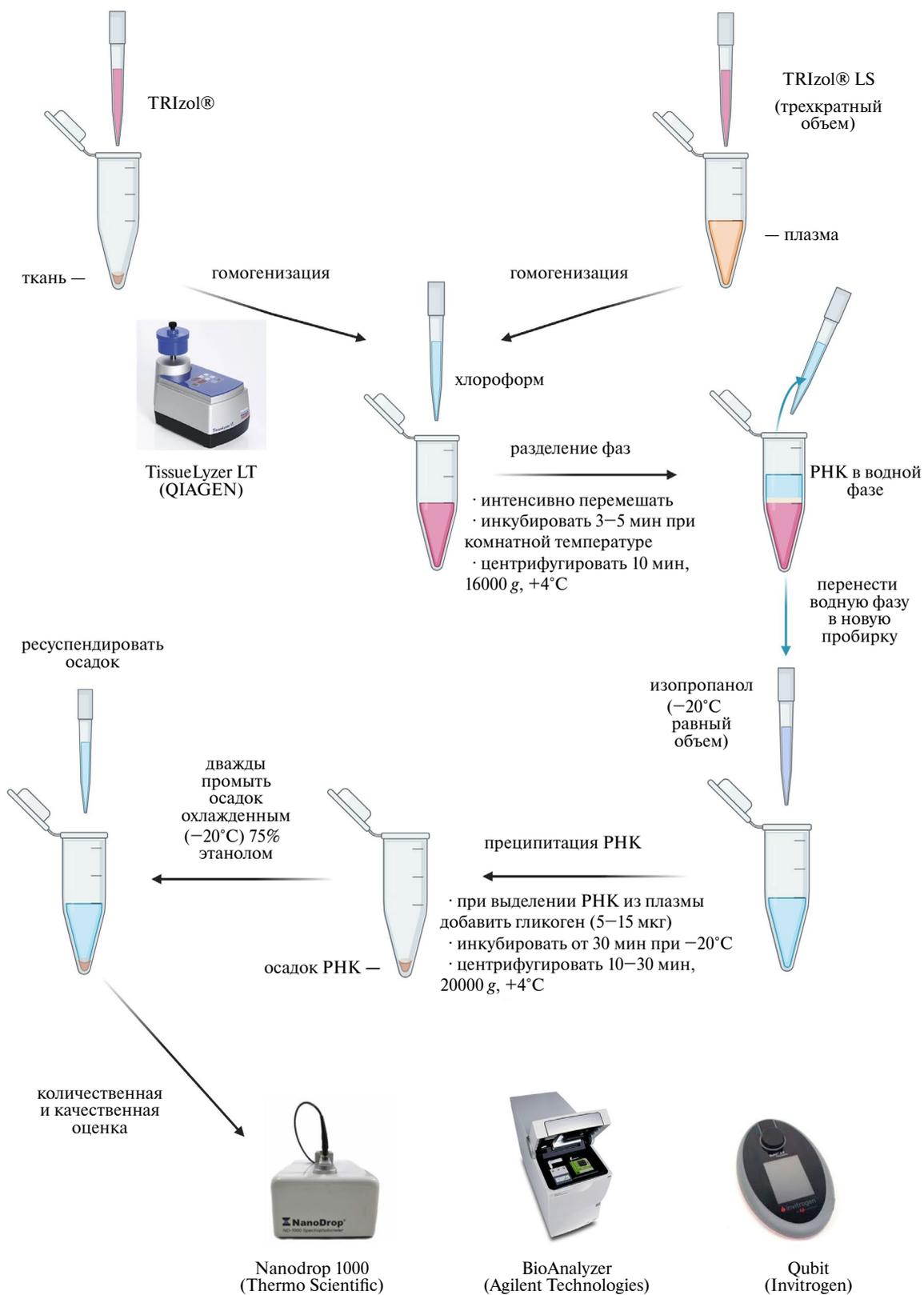
Выделение РНК из плазмы крови пациентов с акромегалией. Цельную кровь центрифугировали при температуре 18°C в течение 10 мин при 1500 g для осаждения клеток. Затем для удаления из жидкой фракции остаточных клеточных фрагментов плазму центрифугировали еще раз (10 мин/1500 g). Аликвоты очищенной плазмы замораживали. РНК из плазмы крови выделяли с использованием реагента TRIzol[®] LS (10296010, “Thermo Fisher Scientific”), предназначенного для обработки биологических жидкостей, по протоколу производителя с некоторыми модификациями (рис. 2). Количество РНК оценивали с использованием микрофлюидного анализатора 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Pico Kit, 5067-1513, “Agilent Technologies”).

Приготовление библиотек малых РНК из образцов ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией. Библиотеки микроРНК конструировали с применением набора Small RNA-Seq Library Preparation Kit (Cat. No. 052, “Lexogen”, Австрия). Количественный и качественный выход оценивали по показаниям микрофлюидного анализатора 2100 Bioanalyzer (Agilent High Sensitivity DNA Kit, 5067-4626, “Agilent Technologies”).

Очистка библиотек в полиакриламидном геле.

Библиотеки пулировали исходя из эквиволярных соотношений целевых микроРНК-библиотек, рассчитанных по показаниям микрофлюидного анализатора 2100 Bioanalyzer. Для электрофоретического разделения пула библиотек использовали 6%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) и Трис-боратный буфер (ТБЕ). Желаемый набор молекул ДНК экстрагировали из геля с применением Gel Extraction Module, Small RNA-Seq Library Preparation Kit (Cat. No. 054, “Lexogen”).

Анализ качества секвенирования. Образцы секвенировали на приборе Illumina MiSeq в режиме одноконцевого чтения по 12 образцов на запуск. Для библиотек микроРНК из опухоли и крови длина прочтений составила 50 и 75 нуклеотидов соответственно. При обработке данных был адаптирован подход с использованием выравнивания прочтений на библиотеку микроРНК miRBase и на геном с последующим объединением таблиц экспрессии [10]. Такой подход позволяет дополнить таблицу экспрессии микроРНК, полученную классическим способом выравнивания на miRBase, геномными данными, а также оценить эффективность подготовки библиотек, предварительной обработки ридов и выравнивания на miRBase. Так, качество прочтений проверяли с помощью программы FastQC v0.11.7 [11]. Программой cutadapt v4.8 [12] обрезали адаптеры с 3'-конца, используя последовательности TruSeq адаптера



Created with BioRender.com

Рис. 2. Схема выделения РНК из ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией методом фенольной экстракции с использованием реагентов TRIzol®/TRIzol® LS.

AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA и TGGAATGCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC; прочтения фильтровали по длине ≥ 16 и ≤ 30 нуклеотидов. Отфильтрованные прочтения выравнивали с помощью программы bowtie v1.2.3 [13] на известные последовательности зрелых микроРНК человека из базы данных miRBase v22 [14] по принципу полного совпадения (ключи -n 0 -l 30 -nocg -best -strata -m 1). В ключах количество микроРНК рассчитывали с помощью samtools idxstats v1.9. Невыравненные последовательности затем выравнивали на геном человека GRCh38 с помощью bowtie с позволением одной ошибки (ключи -n 1 -l 30 -nocg -best -strata -m 1). Количество прочтений, уникально выравненных на геном, в местах, кодирующих микроРНК, считали с помощью программы featureCounts v2.0.6 [15] (-s 1 -t 'miRNA' -g 'Name') и аннотации генома hsa.gff3 из miRBase v22. Полученные таблицы экспрессии микроРНК объединяли в одну, суммируя прочтения для зрелых микроРНК и геномных. Статистику по всем шагам обработки считали программой MultiQC v1.21 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности выделения и оценка качества РНК из ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией

Коммерчески доступный реагент TRIzol®/TRIzol® LS представляет собой монофазную смесь фенола и гуанидинизотиоцианата и является мощным денатурирующим агентом, который расщепляет белковые компоненты и инактивирует все клеточные ферменты, включая РНКазы.

При работе с образцами тканей критически важно не допустить размораживания образца на воздухе, поскольку это приводит к быстрой деградации РНК. Для этого замороженный образец переносят в пробирку объемом 2 мл с двумя стальными шариками и реагентом TRIzol®. В результате оттаивание и разрушение ткани происходят с одновременным переходом РНК в монофазный раствор фенол/гуанидинизотиоцианата. После встряхивания на мельнице с металлическими шариками реагент с растворенными клеточными компонентами переносится в другую пробирку. При выделении РНК из плазмы 200 мкл образца сразу после размораживания смешивают с трехкратным объемом TRIzol® LS. После гомогенизации с реагентами TRIzol®/TRIzol® LS РНК выделяют из образцов ткани и плазмы хлороформом в соответствии с рекомендациями производителя (рис. 2).

Добавление хлороформа к образцу, гомогенизированному в реагенте TRIzol®/TRIzol® LS, и центрифугирование приводит к разделению образца на три фазы: органическую (фенол-хлороформную), интерфазу и верхнюю РНК-содержащую водную. Затем РНК осаждают из водной фазы изопропанолом и дважды промывают 75%-ным этиловым спиртом (однократной промывки, рекомендуемой протоколом, недостаточно для достижения чистоты образца, требуемой для последующих ферментативных реакций). В нашей лаборатории протокол используется с некоторыми температурными модификациями, в частности, спирты для преципитации РНК всегда охлаждаются и осаждение происходит не при комнатной температуре, а при -20°C (рис. 2). При работе с экстремально низкими количествами РНК, как при выделении ее из плазмы, для визуализации осадка РНК при осаждении изопропанолом в него добавляется 5–15 мкг гликогена (рис. 2). Визуализация осадка предохраняет от потери РНК при последующих манипуляциях. Кроме того, для получения максимально возможных количеств РНК можно увеличить длительность преципитации (до нескольких часов) и центрифугирования (до 30 мин).

Требования к образцу РНК для NGS-секвенирования включают обязательное измерение концентрации, чистоты и целостности. Первые два параметра – количественный выход и химическую чистоту образцов тотальной РНК после экстракции, как правило, оценивают спектрофотометрически (например, при помощи спектрофотометра для микрообъемов Nanodrop, “Thermo Fisher Scientific”), измеряя оптическое поглощение образца. Для более точного определения концентрации используют метод флуориметрии, в котором РНК окрашивают специфичными флуоресцентными красителями. Для контроля этого параметра подходит флуориметр Qubit (“Thermo Fisher Scientific”). Целостность РНК анализируют методом капиллярного электрофореза на чипе с помощью системы 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Assay; “Agilent Technologies”). Прибор позволяет оценить степень деградации РНК, присваивая каждому образцу индекс целостности (RIN – RNA integrity number) по шкале от 1 до 10. Высококачественная РНК, полученная из клеточных культур и образцов тканей, характеризуется двумя отчетливыми пиками 18S и 28S рРНК. На рис. 3а,б представлены репрезентативные электрофореграммы образцов суммарной РНК из ткани аденомы гипофиза. Значение параметра RIN у исследуемых образцов составило 7.8–10, что указывает на высокое качество полученной РНК и ее пригодность для последующего NGS-анализа.

Бесклеточные биологические жидкости содержат очень небольшие количества РНК, ко-

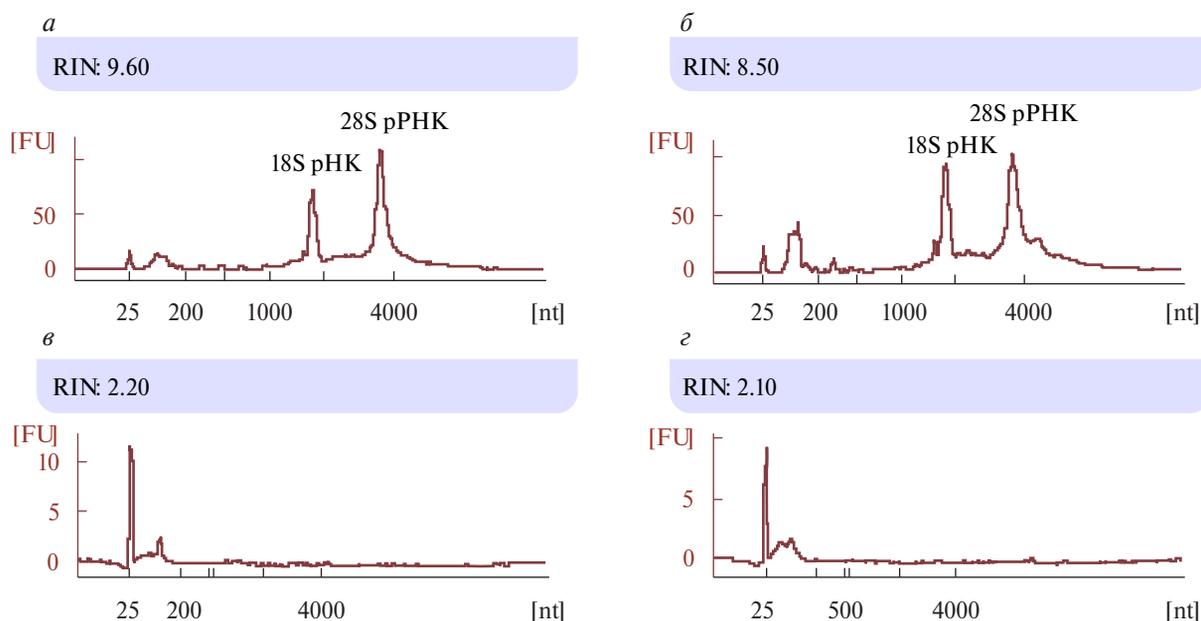


Рис. 3. Анализ суммарной РНК из образцов ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией. *a, б* – Анализ качества РНК, выделенной из тканей опухолей гипофиза пациентов с акромегалией, на биоанализаторе 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit, “Agilent Technologies”). Высококачественная РНК из тканей характеризуется двумя отчетливыми пиками 18S и 28S рРНК (RIN = 7.8–10). *в, з* – Анализ качества РНК, выделенной из плазмы крови пациентов с акромегалией, на биоанализаторе 2100 Bioanalyzer. РНК фрагментирована и концентрирована в низкомолекулярной области (< 200 нуклеотидов, RIN около 2).

торые сложно точно оценить традиционными спектрофотометрическими и флуориметрическими методами. Приборы, которые используются для измерения концентрации РНК при стандартном выделении из тканей (спектрофотометр Nanodrop и флуориметр Qubit), оказываются недостаточно чувствительными при работе с экстремально низкими количествами РНК. Методом фенольной экстракции из 200 мкл плазмы крови можно извлечь около 100–500 пг РНК (по показаниям микрофлюидного анализатора 2100 Bioanalyzer). Поскольку большая часть циркулирующих в крови нуклеиновых кислот образуется при разрушении клеток, выделенная из плазмы РНК фрагментирована до молекул длиной менее 200 нуклеотидов, для нее не характерны четкие пики рРНК (рис. 3*в,з*). Принятые оценки целостности РНК (такие, как RIN) при этом оказываются значительно ниже, чем в случае РНК из тканей и клеточных культур.

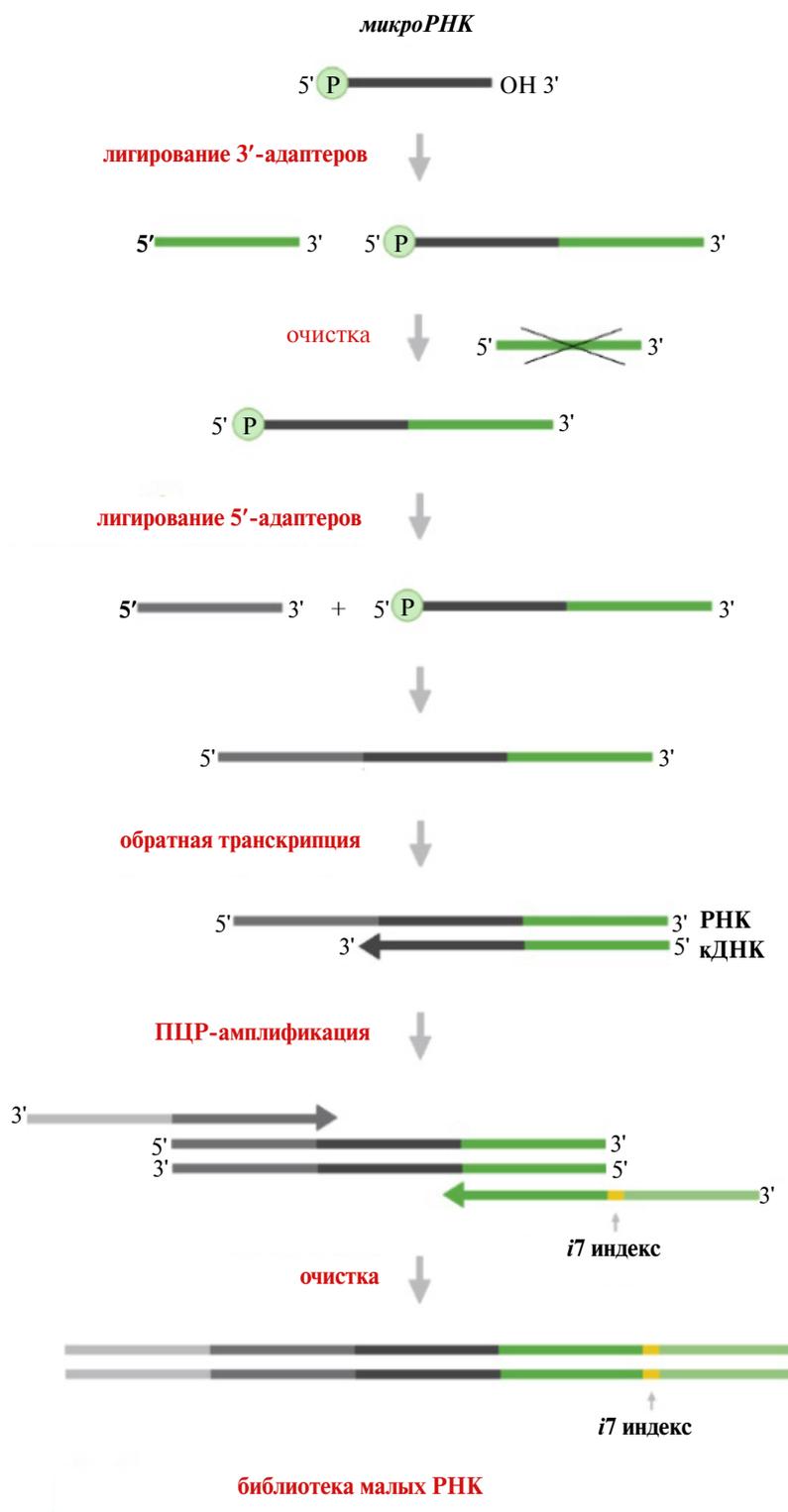
Особенности приготовления библиотек малых РНК из образцов ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией

Для секвенирования микроРНК использовали суммарную РНК, выделенную из образцов ткани аденомы гипофиза пациентов и плазмы

крови пациентов с акромегалией. С этой целью на основе транскриптов малых РНК получают библиотеки комплементарных ДНК со служебными линкерными последовательностями Шуптина и присвоенными каждому образцу индексами. Схема реакций приготовления библиотек представлена на рис. 4. Это традиционный протокол конструирования библиотек малых РНК, основанный на последовательном лигировании адаптеров к 3'- и 5'-концам молекул.

МикроРНК отличаются сложным биогенезом и многоэтапным процессом созревания [2]. Зрелые микроРНК с характерными 5'-фосфатными и 3'-гидроксильными концами образуются в результате расщепления предшественников микроРНК РНК-процессирующими ферментами – сначала рибонуклеазой Drosha в ядре, а затем в цитоплазме рибонуклеазой Dicer.

Создание библиотеки начинается с лигирования адаптера к 3'-гидроксильному концу РНК. 3'-Адаптер специальным образом модифицирован для взаимодействия с 3'-ОН-группой в реакции с мутантной лигазой T4, не требующей АТФ для своей активности. Модификация фермента и адаптерных олигонуклеотидов позволяет избежать образования нежелательных продуктов лигирования. 3'-Адаптер содержит участки связывания с праймерами для обратной транскрипции и соответствует поверхностно-связанному



Created with Biorender.com

Рис. 4. Схема приготовления библиотеки малых РНК.

амплификационному праймеру на проточной ячейке, в которой происходит секвенирование на платформе Illumina. Фрагменты библиотеки прикрепляются к поверхности ячейки за счет гибридизации 3'-адаптера с комплементарным одноцепочечным олигонуклеотидом и удлиняются в процессе ПЦР. Таким образом в проточной ячейке образуются миллионы кластеров, каждый из которых представляет собой множество копий единичной молекулы.

Избыток несвязавшихся 3'-адаптеров удаляется из реакционной смеси, после чего адаптер пришивается РНК-лигазами к 5'-концу микроРНК. 5'-Адаптер присоединяется к фосфатной группе на 5'-конце молекулы и необходим для последующей амплификации фрагментов библиотеки. После присоединения адаптеров продукты подвергаются обратной транскрипции. На заключительном этапе происходит ПЦР-амплификация кДНК-библиотек, во время которой в них встраиваются образец-специфичные индексы. Целевые конструкции содержат служебные линкерные последовательности для генерации кластеров в системе Illumina (по 60 п.н. с 3'- и 5'-концов) и вставку, соответствующую последовательности микроРНК (18–24 п.н.), и, таким образом, имеют длину 140–145 п.н.

Приготовление библиотек малых РНК из образцов ткани аденомы гипофиза. Для приготовления библиотек малых РНК использовали максимальное рекомендованное протоколом количество суммарной РНК – 1 мкг. Для повышения точности оценки концентрацию РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (набор для анализа Qubit RNA HS Assay Kit, “Life Technologies”). Флуориметрический метод определения концентрации намного более чувствителен и точен, чем традиционный спектрофотометрический метод. Библиотеки анализируют при помощи системы 2100 Bioanalyzer (Agilent High Sensitivity DNA Analysis; “Agilent Technologies”), использующей электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот на микрофлюидном чипе. На рис. 5а,б представлены репрезентативные профили библиотек малых РНК из образцов аденомы гипофиза пациентов с акромегалией. Видно, что библиотеки тканевых малых РНК с наличием целевого пика в районе 145 п.н. отличаются большим разбросом длин представленных в них молекул. Поскольку в методе используются РНК-лигазы, которые распознают гидроксильную группу на 3'-конце и фосфатную группу на 5'-конце молекулы РНК, в профиль библиотеки включаются все виды РНК с такими модификациями. При этом при приготовлении библиотеки микроРНК из тканей величина пика, представляющего димеры адаптеров (конструкции

длиной около 120 п.н., не содержащие вставки), как правило, меньше величины целевого пика в силу достаточной представленности мишенной лигаз.

Приготовление библиотек малых РНК из плазмы крови пациентов с акромегалией. Получение пригодных для проведения NGS-анализа библиотек малых РНК из биологических жидкостей существенно затруднено небольшим количеством этих молекул. Вследствие ограниченности исходного материала для получения достаточного количества NGS-библиотеки приходится при амплификации увеличивать количество циклов ПЦР. При этом синтез библиотек сопровождается чрезмерным образованием димеров адаптеров. Чтобы избежать этого, на каждом из этапов приготовления библиотеки предлагается использовать разведение адаптеров и праймеров с учетом количества исходной матрицы.

На рис. 5в,г представлены репрезентативные профили библиотек малых РНК из образца плазмы крови пациента с акромегалией, ассоциированной с аденомой гипофиза. Для генерации библиотек использовали приблизительно 300 пг суммарной РНК плазмы (рассчитано по показаниям анализа Agilent RNA 6000 Pico Assay (2100 Bioanalyzer, “Agilent Technologies”), максимальные рекомендованные протоколом разведения адаптеров ($\times 0.3$) и число циклов ПЦР (20–22).

Как видно из рис. 5, величины целевого пика (около 145 п.н.) и пика, соответствующего димерам адаптеров (около 120 п.н.), обратно пропорциональны друг другу. Это значит, что при ограничении исходного материала (содержания микроРНК в образце) адаптеры не контактируют с целевыми молекулами, а преимущественно образуют димеры между собой. Сравнение профилей библиотек, полученных из РНК плазмы крови и из образцов тканей, выявляет явные различия, а именно отсутствие множественных пиков, в силу ограниченной представленности видов РНК в плазме (рис. 5в,г).

Очистка библиотек в полиакриламидном геле

Поскольку в библиотеках малых РНК обнаруживаются артефакты типа линкер-линкер (пик в районе 120 п.н.), а часто и множественные пики (как в библиотеках, приготовленных из суммарной РНК тканей), то для получения образца, пригодного для секвенирования, требуется дополнительный этап очистки целевых фрагментов. С этой целью полученные библиотеки пулируют исходя из эквимольных соотношений целевых пиков (наборов фрагмен-

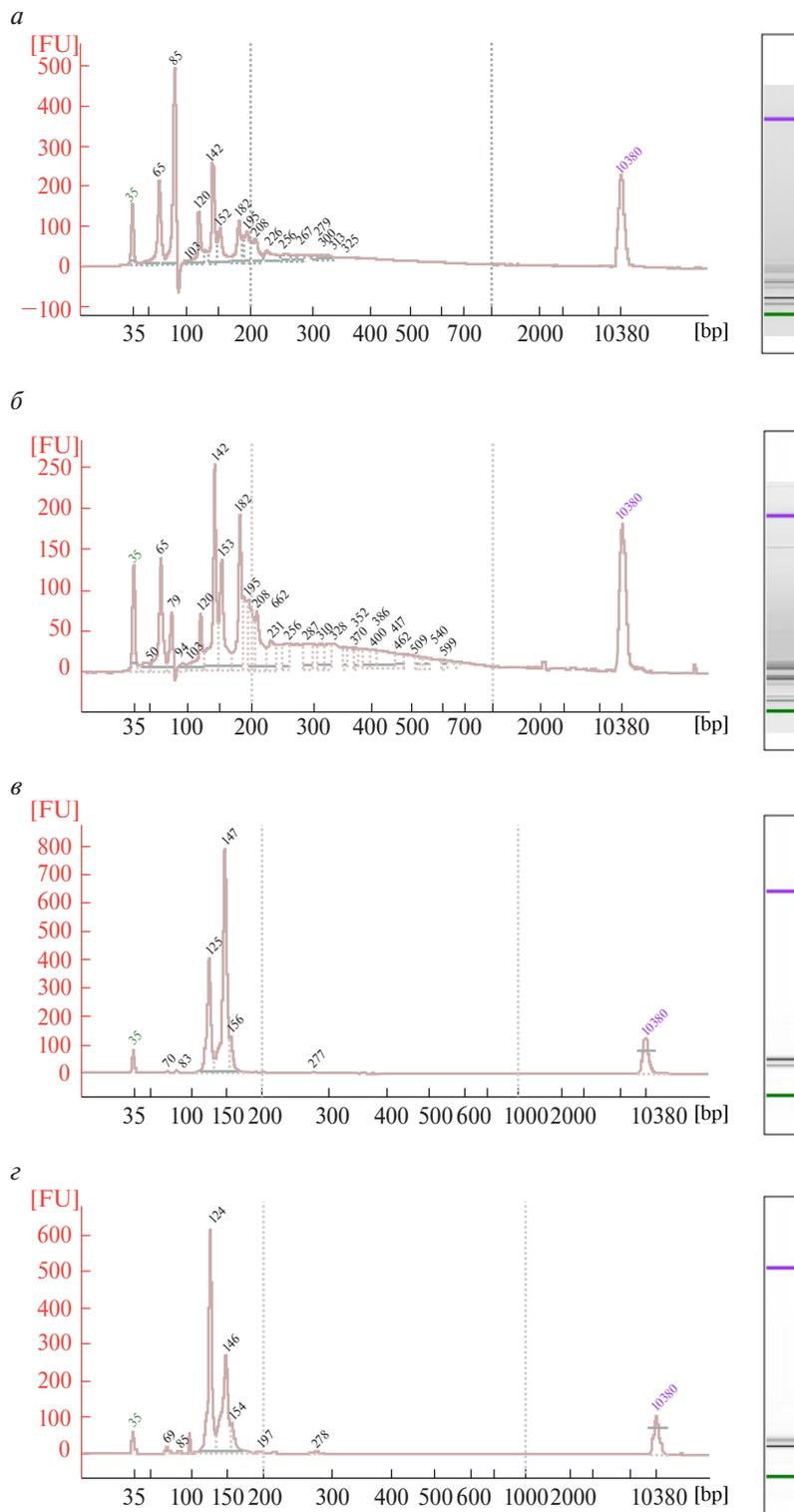


Рис. 5. Анализ библиотек малых РНК из образцов ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией. *а, б* – Электрофореграммы образцов библиотек малых РНК из ткани опухолей гипофиза пациентов с акромегалией, полученные на биоанализаторе 2100 Bioanalyzer. Библиотеки характеризуются множественными пиками. Пик 142 п.н. представляет собой целевой набор фрагментов, содержащих последовательности, соответствующие микроРНК. Пики 65–85 п.н. соответствуют остаточным праймерам. *в, з* – Электрофореграммы, полученные на биоанализаторе 2100 Bioanalyzer, образцов библиотек малых РНК из плазмы крови пациентов с акромегалией. Пик 146/147 п.н. – целевой набор фрагментов, содержащих последовательности, соответствующие микроРНК, и готовых для высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Величины целевого пика и пика 124/125 п.н., содержащего адаптерные последовательности, обратно пропорциональны друг другу.

тов в районе 145 п.н., поскольку они содержат вставки, соответствующие последовательностям микроРНК).

После электрофореза фрагмент геля, содержащий целевые конструкции (длиной около 145 п.н.), вырезается; при этом важно избежать одновременного извлечения части фрагмента с димерными линкерными последовательностями (120 п.н.). Затем желаемый набор молекул ДНК экстрагируется из геля любым удобным способом. На рис. 6а приведена схема электрофоретического разделения в ПААГ пула библиотек малых РНК, полученных из образцов плазмы крови пациентов с акромегалией (в случае библиотек малых РНК из тканей набор полос может быть разнообразнее). Как правило, в пуле различаются целевая полоса (содержит фрагменты со вставками, соответствующими микроРНК, в районе около 140 п.н.) и полоса, представляющая димеры адаптеров (около 120 п.н.). На рис. 6б представлена электрофореграмма финальной микроРНК-библиотеки после экстракции из геля по протоколу Small RNA-Seq Library Preparation Kit (Gel Extraction Module, “Lexogen”). Пик 145 п.н. представляет целевой набор фрагментов, содержащих последовательности, соответствующие микроРНК, и готовый для NGS-секвенирования на платформе Illumina.

Результаты секвенирования микроРНК из образцов плазмы и опухолевой ткани

Полученные библиотеки пригодны для секвенирования на любом генетическом анализаторе Illumina (MiSeq, NextSeq, HiSeq). В нашем случае использовали секвенатор MiSeq в двух запусках для библиотек из плазмы и в трех — из опухолевой ткани гипофиза.

Качество секвенирования микроРНК из разных биологических источников существенно различалось. Для каждого запуска получено около 22 млн прочтений, по 1.9 млн на образец в среднем. В результате удаления адаптерных последовательностей и последующей фильтрации по длине 16–30 нуклеотидов осталось 73% прочтений. Из них на библиотеку известных микроРНК человека по базе miRBase v22 выравнились в среднем 83% последовательностей из опухоли и 55% последовательностей из плазмы (65.67 и 45.5% по отношению к общему числу ридов соответственно). Из оставшихся прочтений около 35 и 18% для опухоли и плазмы, соответственно, уникально выравнялось на геном в местах, кодирующих микроРНК (рис. 7). В сумме для каждого запуска подсчитано 12.5 млн микроРНК, по 1 млн на образец в среднем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ профиля экспрессии микроРНК методом NGS включает четыре этапа: экстракция РНК, подготовка библиотек, секвенирование и биоинформатический анализ последовательности РНК.

Коммерчески доступные методики выделения РНК не всегда одинаково эффективны в отношении к анализу экспрессии микроРНК. Содержание фракции малых РНК при разных способах выделения РНК нередко может различаться [17], поэтому необходимо тщательно подходить к выбору методов выделения и оптимизировать их для применения в конкретных экспериментах, в зависимости от решаемых задач. Экстракция РНК из тканей и жидких сред с применением единой методики (реагента TRIzol®/TRIzol® LS) позволяет корректно сопоставить дифференциальную экспрессию РНК в разных органах и тканях одного пациента. Реагент обеспечивает быстрый и эффективный лизис биологических образцов и дает возможность получения РНК высокого качества.

Один из критических параметров для получения высококачественных библиотек — качество исходной РНК, поскольку именно целостность и чистота РНК принципиальны для успешной детекции транскриптов и достоверной количественной оценки. Есть ряд экспериментальных доказательств (хотя это не признано однозначно), что фракция микроРНК более стабильна в биологических образцах, чем мРНК [18, 19]. Тем не менее деградация РНК не позволяет корректно измерить экспрессию, поэтому для высокопроизводительного секвенирования следует использовать РНК максимально возможной сохранности. В связи с этим на этапе выделения и очистки РНК могут возникнуть существенные технические ограничения. При работе с тканями критически важно максимально быстро заморозить операционные образцы в жидком азоте. При этом в дальнейшем можно обрабатывать одновременно набор образцов, что снижает вариации, связанные с техническими манипуляциями.

При работе с бесклеточными образцами основной риск состоит в возможном засорении проб контаминантами, содержащими РНК, такими как интактные, апоптотические клетки или клеточные фрагменты. Присутствие загрязнений или лизис клеток крови с последующим выделением их содержимого в плазму может повлиять на профиль экспрессии РНК. Несмотря на крайне низкие количества РНК, экстрагируемой из плазмы, протоколы не рекомендуют увеличивать изначальный объем образца. При экстракции РНК из образца плазмы, объемом

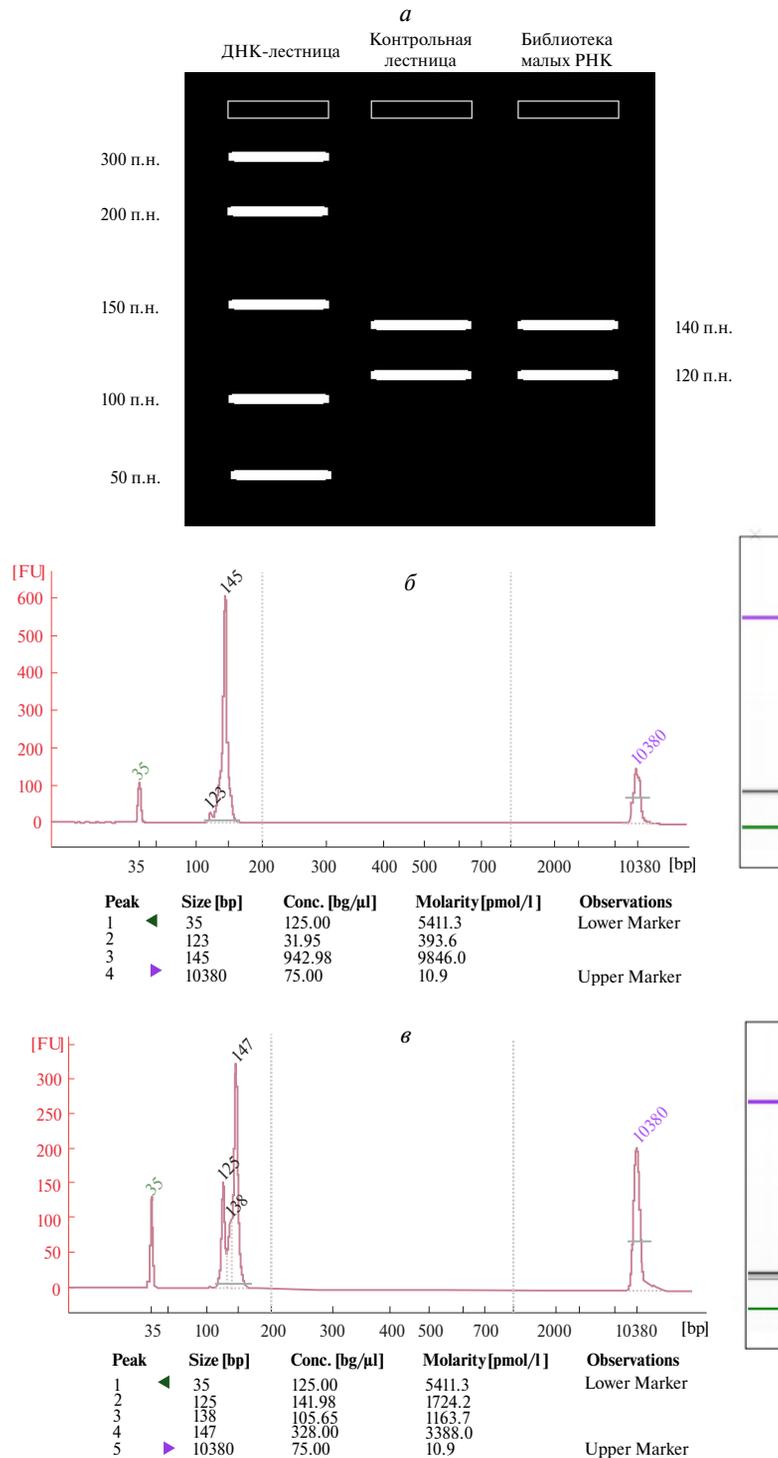


Рис. 6. Разделение в полиакриламидном геле (ПААГ) пула библиотек малых РНК и экстракция из геля набора целевых фрагментов ДНК, содержащих последовательности, соответствующие микроРНК. *а* – Схема электрофоретического разделения в ПААГ пула библиотек малых РНК, полученных из плазмы крови пациентов с акромегалией. Как правило, при электрофорезе в готовом пуле библиотек различаются целевая полоса (около 140 п.н., содержащая фрагменты со вставками, соответствующими микроРНК) и полоса адаптерных димеров (около 120 п.н.). *б, в* – Пул библиотек микроРНК на электрофореграмме (биоанализатор 2100 Bioanalyzer), полученный путем очистки в ПААГ по протоколу Small RNA-Seq Library Preparation Kit (“Lexogen”). Пик 145/147 п.н. представляет целевой набор фрагментов, содержащих последовательности, соответствующие микроРНК, готовый для высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Пики 123/125 п.н. образованы димерами адаптеров. При высоком (более 50%) содержании адаптерных димеров в пуле не обеспечивается эффективное разделение фрагментов в ПААГ, вследствие чего экстрагированная из геля финальная библиотека содержит большое количество конструкций типа линкер-линкер (*в*).

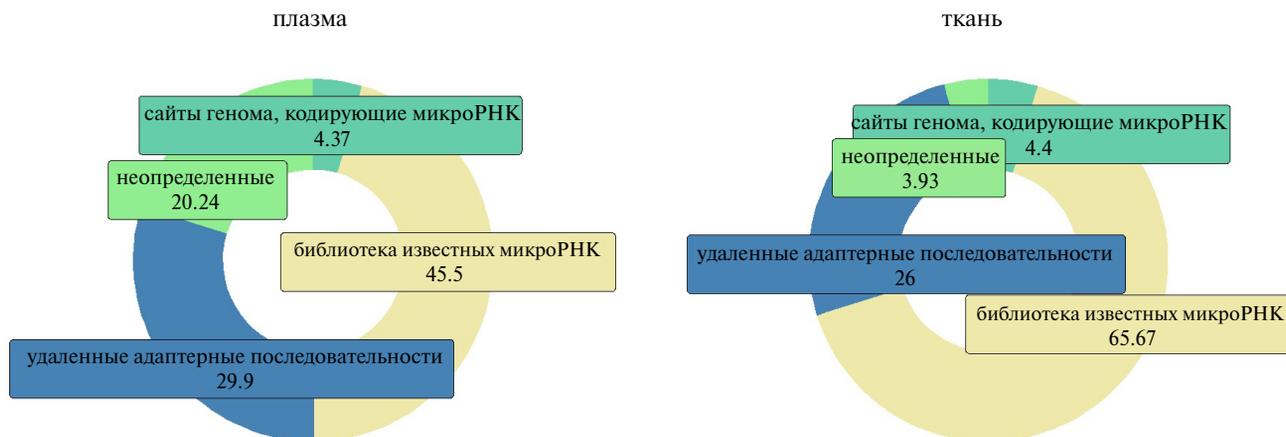


Рис. 7. Общая эффективность секвенирования образцов ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией. Для оценки эффективности секвенирования рассчитан процент ридов, прошедших фильтрацию при удалении адаптеров и выравнивании. Распределение полученных при секвенировании прочтений показано как средний процент ридов: исключенных после удаления адаптеров; выровненных на известные микроРНК человека (по базе miRBase v22); уникально выровненных на геном в местах, кодирующих микроРНК, по отношению к общему количеству ридов для микроРНК-библиотек из ткани мозга и плазмы. $n = 34$ для образцов опухоли мозга, $n = 23$ для образцов плазмы (семь образцов крови здоровых доноров и 16 – пациентов с акромегалией).

более 200 мкл, потенциально возрастает риск повышения концентрации ингибиторов последующих ферментативных реакций. Кроме того, следует избегать обработки плазмы гепарином (либо проводить дегепаринизацию образцов), поскольку его наличие в образце также ингибирует активность ферментов в последующих реакциях [20].

Подготовка библиотек для секвенирования микроРНК сопряжена со значительными техническими трудностями, такими как нецелевое связывание адаптеров, образование димеров адаптеров, необходимость селекции по размеру библиотек малых РНК и оптимизация технических условий, используемых для работы с очень малыми исходными количествами РНК, как в случае анализа биологических жидкостей. Кроме того, приготовление библиотек малых РНК из разных биологических образцов требует применения собственной стратегии для каждого типа исследуемого материала. При секвенировании микроРНК из образцов тканей оптимальным представляется внесение максимально допустимого протоколом количества исходной РНК, что позволяет минимизировать число циклов ПЦР при финальной амплификации библиотек. Минимизация числа циклов является общим принципом оптимизации при конструировании NGS-библиотек, поскольку снижает количество секвенируемых дубликатов ПЦР и вероятность внесения дополнительных вариаций в нуклеотидные последовательности. При приготовлении библиотек из плазмы крови более оправдана другая стратегия. Учитывая ограниченность исходного материала, для полу-

чения необходимого для секвенирования количества ДНК, напротив, требуется увеличивать число циклов финальной ПЦР. Кроме того, мы рекомендуем на всех стадиях конструирования библиотеки применять максимально возможные разведения праймеров и адаптеров, чтобы избежать чрезмерного образования нецелевых продуктов. Библиотеки малых РНК из тканей и плазмы крови имеют очевидно разные профили, что, вероятно, определяется многообразием РНК в исходном материале: библиотеки из плазмы содержат, как правило, два отчетливых пика (соответствующих димерам адаптеров и набору целевых молекул с нужной вставкой), тогда как профиль библиотек из тканей разнообразнее (рис. 5).

Дополнительную техническую сложность при получении микроРНК-библиотек представляет этап очистки целевой библиотеки из геля. Возможно выделение как всего пула библиотеки, так и каждой библиотеки в отдельности. Первый вариант более предпочтителен, так как гарантирует унификацию процессинга образцов. Следует учитывать, что при экстракции нуклеиновых кислот из ПААГ потери составляют 60–80%, поэтому перед загрузкой образца в гель необходимо рассчитать количество исходной ДНК, необходимое для получения требуемой для секвенирования концентрации целевой библиотеки. Экстракция проходит тем эффективнее, чем более сконцентрирован образец, поскольку выделение при этом происходит из меньшего объема геля. Кроме того, при невысокой концентрации библиотеки целевая полоса не всегда бывает видна в ультрафиолете; поэтому при вырезании

нужного фрагмента геля следует ориентироваться на соответствующий ему фрагмент контрольной лестницы известной длины (140 п.н.; рис. 6а). Еще одна возможная трудность заключается в том, что при высоком (больше 50%) содержании линкерных димеров в пуле часть этих молекул меньшей длины при электрофоретическом разделении может “растекаться” по гелю и загрязнять вышележащую зону. Вследствие этого выделенный из геля пул будет дополнительно содержать димеры адаптеров (рис. 6б). Это особенно вероятно при работе с библиотеками из плазмы и других видов биологических образцов с невысоким содержанием РНК, поскольку при ограниченности исходного материала возрастает степень генерации побочных конструкций – не имеющих вставки продуктов реакций лигирования и ПЦР. Эффективность кластеризации при секвенировании в значительной степени зависит от размера библиотеки. Поскольку фрагменты библиотеки, содержащие только адаптеры, немного меньше, чем содержащие вставку микроРНК, они обладают конкурентным преимуществом и будут кластеризоваться более эффективно, чем целевая составляющая библиотеки. Это, в свою очередь, приведет к снижению глубины секвенирования за счет уменьшения количества пригодных для анализа ридов.

Применение описанных протоколов позволяет успешно конструировать и секвенировать библиотеки микроРНК из образцов опухолевой ткани и плазмы крови пациентов с акромегалией. Наиболее важным критерием при анализе эффективности выбранных протоколов пробоподготовки для профилирования микроРНК является процент прошедших фильтрацию ридов, которые впоследствии сопоставляются с референсными последовательностями микроРНК. Фильтрация ридов в основном происходит за счет удаления адаптеров и других побочных продуктов (слишком короткие риды или риды без адаптеров) и выравнивания (некартированные или мультикартированные риды). Поскольку при секвенировании микроРНК генерируются очень короткие считывания, точное выравнивание требует строгих параметров, чтобы избежать множественных совпадений в референсной базе данных. Количество ридов, прошедших через эти фильтры, указывает на долю прочтений, пригодных для последующего анализа, и дает представление об эффективности секвенирования.

Количество выравненных на микроРНК последовательностей в библиотеках из плазмы оказалось ниже, чем в библиотеках, полученных из образцов ткани (55 против 83% из ткани применительно к числу прочтений после удаления адаптеров, или 45 против 65% по отношению

к общему числу ридов). Вероятно, это обусловлено большим количеством фрагментированной РНК в русле кровообращения, что препятствует обогащению последовательностями, соответствующими микроРНК, в сконструированных библиотеках. Этот результат согласуется с данными [21].

Согласно опубликованным данным, количество выравненных на микроРНК прочтений, полученных в секвенировании с использованием наборов разных производителей, отличается крайне большим разбросом. Так, соотношение “сырых” ридов, соответствующих микроРНК, может варьировать от 1 до 28% в случае крови человека (по усредненным показателям для сыворотки и плазмы) и от 6 до 69% в ткани мозга мыши по отношению к общему числу ридов [21]. Общая эффективность секвенирования микроРНК также зависит от вида ткани [22]. Мы предлагаем читателям ознакомиться с несколькими работами, в которых оценивается эффективность коммерческих наборов для конструирования микроРНК-библиотек из тканей [22], плазмы [23] и клеток крови [24]. Полученные нами данные дополняют имеющуюся картину. Таким образом, использованная методика подготовки образцов и библиотек для секвенирования микроРНК может эффективно применяться для профилирования микроРНК в плазме и ткани мозга человека, а полученные данные пригодны для последующего анализа дифференциальной экспрессии микроРНК.

С ростом числа исследований все более многообещающим представляется клинический потенциал экзосомных микроРНК в качестве биомаркеров и терапевтических мишеней [25]. Основным преимуществом экзосом в качестве инструмента диагностики является их присутствие в различных жидкостях организма, что позволяет легко и неинвазивно собирать их и использовать в клинических исследованиях. По опыту нашей лаборатории приготовление библиотек РНК экзосом соответствует описанной нами схеме подготовки библиотек из образцов с малым количеством РНК, таких как плазма [26]. Изучение состава экзосом осложняется отсутствием стандартизированных методов подготовки и анализа образцов, позволяющих корректно сравнивать результаты разных исследовательских групп. Кроме того, важно учитывать вклад микроРНК, соосаждающихся с популяцией внеклеточных везикул, поскольку абсолютное количество микроРНК внутри везикул может быть соизмеримым с количеством микроРНК того же типа, прикрепленных к их внешней стороне [27]. Как следствие, прикрепленные к внеклеточным везикулам и осаждаемые совместно с ними молекулы РНК вносят вклад в суммарную оценку. Поэтому необходи-

мо принимать во внимание, что результаты количественного анализа микроРНК в экзосомах зависят от протокола выделения и ферментативной обработки.

ВЫВОДЫ

Секвенирование микроРНК может служить мощным инструментом для выявления диагностических и прогностических биомаркеров онкозаболеваний. Применение этого инструмента для исследования экспрессии микроРНК требует поиска дифференцированных подходов к работе с разными типами биологического материала. Получение высококачественных библиотек для NGS-секвенирования микроРНК остается непростой задачей. Каждый вид биологических образцов требует оптимальной стратегии пробоподготовки и настройки параметров протоколов. Описанные нами особенности подготовки NGS-библиотек для секвенирования микроРНК из ткани аденомы гипофиза и плазмы крови пациентов с акромегалией могут быть полезными исследователям, столкнувшимся с такого рода задачами, при изучении подобных или других патологий, при работе с другими видами биологических образцов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Протокол исследования (№ 193-4) одобрен этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России 11.04.2016). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iacomino G. (2023) miRNAs: the road from bench to bedside. *Genes*. **14**, 314.
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, 402.
- Svoronos A.A., Engelman D.M., Slack F.J. (2016) OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Res.* **76**, 3666–3670.
- Chakraborty A., Patton D.J., Smith B.F., Agarwal P. (2023) miRNAs: potential as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Genes*. **14**, 1375.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* **12**, 735–739.
- Si W., Shen J., Zheng H., Fan W. (2019) The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin. Epigenetics*. **11**, 25.
- Dai S., Li F., Xu S., Hu J., Gao L. (2023) The important role of miR-1-3p in cancers. *J. Transl. Med.* **21**, 769.
- Jurj A., Zanoaga O., Braicu C., Lazar V., Tomuleasa C., Irimie A., Berindan-Neagoe I.A Comprehensive picture of extracellular vesicles and their contents. Molecular transfer to cancer cells. (2020) *Cancers*. **12**, 298.
- Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A.V. (2014) Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosoph. Transact. Royal Soc. B: Biol. Sci.* **369**, 1652.
- Potla P., Ali S.A., Kapoor M. (2020) A bioinformatics approach to microRNA-sequencing analysis. *Osteoarthritis. Cartil. Open*. **3**, 100131.
- Andrews S. (2010) FastQC – a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **17**, 10.
- Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25.
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucl. Acids Res.* **47**(D1), D155–D162.
- Liao Y., Smyth G.K., Shi W. (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. **30**, 923–930.
- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Käller M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. **32**, 3047.
- Brown R.A.M., Epis M.R., Horsham J.L., Kabir T.D., Richardson K.L., Leedman P.J. (2018) Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. *BMC Biotechnol.* **18**, 16.
- Aryani A., Denecke B. (2015) *In vitro* application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability. *BMC Res. Notes*. **8**, 164.
- Li Z., Chen D., Wang Q., Tian H., Tan M., Peng D., Tan Y., Zhu J., Liang W., Zhang L. (2021) mRNA and microRNA stability validation of blood samples under different environmental conditions. *Forensic Sci. Int. Genet.* **55**, 102567.
- Kondratov K., Kurapeev D., Popov M., Sidorova M., Minasian S., Galagudza M., Kostareva A., Fedorov

- A. (2016) Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol. Detect. Quantif.* **8**, 9.
21. Coenen-Stass A.M.L, Magen I., Brooks T., Bendov I.Z., Greensmith L., Hornstein E., Fratta P. (2018) Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA Biol.* **15**, 1133.
 22. Yeri A., Courtright A., Danielson K., Hutchins E., Alsop E., Carlson E., Hsieh M., Ziegler O., Das A., Shah R.V., Rozowsky J., Das S., Van Keuren-Jensen K. (2018) Evaluation of commercially available small RNAseq library preparation kits using low input RNA. *BMC Genomics.* **19**, 331.
 23. Androvic P., Benesova S., Rohlova E., Kubista M., Valihrach L. (2022) Small RNA-sequencing for analysis of circulating miRNAs: benchmark study. *J. Mol. Diagnostics.* **24**, 386–394.
 24. Heinicke F., Zhong X., Zucknick M., Breidenbach J., Sundaram A.Y.M., T. Flåm S., Leithaug M., Dalland M., Farmer A., Henderson J.M., Husson M.A., Moll P., Nguyen L., McNulty A., Shaffer J.M., Shore S., Yip H.K., Vitkovska J., Rayner S., Lie B.A., Gilfillan G.D. (2020) Systematic assessment of commercially available low-input miRNA library preparation kits. *RNA Biol.* **17**, 75–86.
 25. Alotaibi F. (2023) Exosomal microRNAs in cancer: potential biomarkers and immunotherapeutic targets for immune checkpoint molecules. *Front. Genet.* **14**, 1052731.
 26. Kalinina O.V., Khudiakov A.A., Panshin D.D., Nikitin Yu. V., Ivanov A.M., Kostareva A.A., Golovkin A.S. (2022) Small non-coding RNA profiles of sorted plasma extracellular vesicles: technical approach. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **58**, 1847–1864.
 27. Petrova T., Kalinina O., Aquino A., Grigoryev E., Dubashynskaya N.V., Zubkova K., Kostareva A., Golovkin A. (2024) Topographic distribution of miRNAs (miR-30a, miR-223, miR-let-7a, miR-let-7f, miR-451, and miR-486) in the plasma extracellular vesicles. *Non-Coding RNA.* **10**(1), 15.

Sample Preparation and Sequencing Efficiency of microRNA Libraries from Pituitary Adenoma Tissue and Blood Plasma of Patients with Acromegaly for Illumina Platform

© 2025 E. V. Ignatieva*, E. S. Nerubenko, O. I. Ivanova, U. A. Tsoy, R. I. Dmitrieva

Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, 197341 Russia

**e-mail: lefut@mail.ru*

MicroRNAs in tissues and biological fluids represent a promising class of biomarkers for the molecular diagnostics and therapy of numerous diseases, including oncological diseases. Biomarkers based on easily accessible biological fluids, primarily blood-based biomarkers, are of particular value for diagnostic and prognostic purposes. To explore the potential of microRNAs as prognostic cancer markers and targets for molecular therapy, global microRNA profiling is required, which is provided by next-generation sequencing (NGS). NGS offers high sensitivity, single nucleotide resolution, and the possibility of profiling a large number of samples in parallel. Despite the promising potential of microRNAs as biomarkers and the growing number of works in this area, the literature does not sufficiently address in detail the problems associated with sample preparation methods, the specifics of library preparation for microRNA sequencing, and the difficulties of quantitative analysis. Protocols for creating libraries for microRNA sequencing present specific challenges and require selecting conditions for each type of biological sample. Here, we present in detail the preparation of libraries for microRNA sequencing from pituitary adenoma tumor tissue and blood plasma of patients with acromegaly on the Illumina platform. We discuss the difficulties and limitations of the methods and evaluate the effectiveness of sequencing plasma and brain samples. The work can serve as a guide for researchers studying the mechanisms of microRNA regulation in endocrine diseases of the pituitary gland and will also allow for the adaptation of technical procedures for various biological samples in relation to other pathologies.

Keywords: microRNA, NGS libraries, pituitary adenoma, molecular biomarker