

**Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

**Wydział Lekarski**

**Lekarz medycyny Igor Selmaj**

**Rola mechanizmów eksportu zewnątrzkomórkowego małych  
niekodujących RNA w przebiegu autoimmunologicznej  
demyelinizacji w stwardnieniu rozсіяnym**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Neuroimmunologii

Katedrze i Klinice Neurologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**Promotor: dr hab. n. med. Marcin Mycko**

**Katedra i Klinika Neurologii**

**Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**Łódź, 2017**



## **II. STRESZCZENIE**

Stwardnienie rozsiane (sclerosis multiplex - SM) jest przewlekłą autoimmunologiczną i neurodegeneracyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w przebiegu której dochodzi do zmian zapalnych, demielinizacyjnych, uszkodzenia oligodendrocytów, uszkodzenia aksonów oraz dysfunkcji bariery krew-mózg. Szacuje się, że na całym świecie choruje na SM około 2,5 mln ludzi. Skutki ekonomiczne i społecznej tej choroby są bardzo wysokie. Dlatego SM od lat stanowi intensywne pole badań naukowych. Patofizjologia SM polega na generacji autoreaktywnych limfocytów w stosunku do składników mieliny, a następnie atakowaniu i niszczeniu osłonek mielinowych otaczających aksony przez te limfocyty. Pomimo licznych badań, dokładne mechanizmy SM wciąż pozostają nie w pełni wyjaśnione, dlatego niezbędne są dalsze badania, które umożliwią lepsze zrozumienie tej choroby. Niedawno udowodniono, że posttranskrypcyjne mechanizmy molekularne, w tym cząsteczki mikroRNA (miRNA) mogą wpływać na procesy immunologiczne i kontrolować odpowiedź immunologiczną. Pierwsze publikowane wyniki sugerują, iż mechanizmy zależne od miRNA mogą istotnie oddziaływać również na proces demielinizacji w OUN, co znacząco wpływa na kierunek dalszych badań w tej dziedzinie. MiRNA to jednoniciowe niekodujące cząsteczki RNA, które regulują ekspresję genów kodujących białka oraz biorą udział w wielu innych podstawowych procesach biologicznych. Uważa się, że mogą odgrywać kluczową rolę w modulowaniu funkcji układu immunologicznego oraz w regulacji funkcji komórek immunokompetentnych ze znaczącym wpływem na rozwój reakcji autoimmunologicznych. Ostatnie odkrycia wykazały, że miRNA istnieją także w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jako zawartość egzosomów. Egzosomy to małe błoniaste pęcherzyki transportujące, powstające z błon komórkowych prawie wszystkich żywych komórek. Biorą one udział w wysoce selektywnej komunikacji pomiędzy komórkami. Okazuje się, że wewnątrz egzosomów, zlokalizowane są duże ilości cząsteczek miRNA. Taka lokalizacja miRNA powoduje, iż są one odseparowane od środowiska zewnątrzkomórkowego i znajdujących się tam enzymów zdolnych do degradacji RNA. Egzosomalne miRNA okazują się więc cechować wyjątkową stabilnością. Stwarza to podstawy dla zupełnie nowego

zjawiska - możliwości przekazywania fragmentów transkryptomu z jednej komórki do drugiej. Znaczenie tego wyjątkowego fenomenu jest w dużej mierze nieznane.

W świetle ostatnio opublikowanych dowodów wskazujących na potencjalną rolę egzosomów i miRNA w regulacji układu immunologicznego, w niniejszym projekcie zbadano sekwencje i profile egzosomalnego miRNA obecnego w surowicy pacjentów chorych na SM. Założono, że analizując profil sekwencji miRNA w egzosomach obecnych w surowicy chorych na SM, będzie możliwe uzyskanie wiedzy na temat roli eksportowanych fragmentów transkryptomu w patomechanizmie SM. W pierwszym etapie pracy krew została pobrana od 19 pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią SM, wliczając w to 9 pacjentów z rzutem choroby i 10 pacjentów w remisji. Grupa kontrolna składała się z 10 zdrowych ochotników w podobnym wieku i rozkładzie płci jak grupa SM. Wszyscy pacjenci pozostawali wolni od leczenia immunomodulującego w okresie 6 miesięcy przed pobraniem próbek. Rzut został zdefiniowany jako pojawienie się nowych lub nasilenie starych objawów neurologicznych trwające co najmniej 48 godzin, przy założeniu okresu przynajmniej 30 dni ze stacjonarnym stanem neurologicznym sprzed pogorszenia. Określenia jakościowego i ilościowego profilu egzosomalnego RNA dokonano posługując się techniką wysokoprzepustowego sekwencjonowania (next generation sequencing, NGS). Następnie wyniki sekwencjonowania NGS zostały poddane weryfikacji w drugiej grupie badanej tj. 33 pacjentów z rzutem SM, 30 pacjentów z remisją SM i grupie kontrolnej 32 zdrowych ochotników, przy pomocy techniki cyfrowej ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (digital PCR, dPCR).

Egzosomy zostały wyizolowane z surowicy metodą immunoprecypitacji (polimer formulation method) przy pomocy zestawów ExoQuick (SBI System Biosciences). Liczba egzosomów i ich parametry morfologiczne zostały określone w oparciu o analizę nanocząsteczek techniką nanoparticle tracking analysis (NTA). Wyizolowane egzosomy zostały zweryfikowane poprzez wykazanie ekspresji molekuł Alix i CD9, typowych białek egzosomalnych. Całkowite egzosomalne RNA zostało następnie wyizolowane za pomocą kitów SeraMir Exosome RNA (System Biosciences). Ilość oraz jakość wyizolowanego egzosomalnego RNA zostało ocenione za pomocą techniki Agilent i bioanalyzera (Agilent Technologies). Sekwencjonowanie techniką NGS przeprowadzono za pomocą platformy HiSeq

(Illumina). W wyniku przeprowadzonej analizy bioinformatycznej wytypowano cztery miRNA, które wykazały statystycznie znamienne zróżnicowanie ekspresji w grupach SM i kontroli. Wyniki tej analizy zostały potwierdzone poprzez analizę materiału uzyskanego w niezależnej, dużej kohorcie pacjentów z SM (n= 63) i zdrowych osób w grupie kontrolnej (n= 32), wykorzystując technikę dPCR (digital PCR).

Zastosowanie techniki NGS pozwoliło uzyskać pełny (globalny) profil sekwencji RNA obecnych w egzosomach. W sumie uzyskano ok. 5 milionów odczytów sekwencji. Sekwencjonowanie NGS ujawniło obecność 50 000 różnych sekwencji RNA ze znaczącą frakcją krótkich RNA u pacjentów z SM i u zdrowych osobników. Analiza bioinformatyczna z wykorzystaniem dostępnych baz danych ujawniła, że zawartość RNA w egzosomach jest wysoce zróżnicowana, zawiera wiele różnych frakcji RNA takich jak: miRNA, tRNA, scaRNA, rRNA, piRNA, lincRNA, CDBox, HAcaBox, LINE, LTR, RefSeq eksony i introny. Pomimo istnienia pewnych różnic w liczbie sekwencji pomiędzy grupami badanymi (rzut/remisja/kontrola) w analizowanych klasach, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ich ekspresji. Analiza w kierunku identyfikacji unikalnego profilu egzosomalnego miRNA ujawniła, iż w każdej z próbek egzosomów surowicy znajduje się od 350 do 400 różnych sekwencji miRNA. W ten sposób potwierdzone zostało, że egzosomy są bogatym źródłem tych małych niekodujących RNA. Globalna analiza statystyczna umożliwiła wiarygodną identyfikację zróżnicowanej ekspresji poszczególnych sekwencji miRNA. Metoda ta doprowadziła do wykrycia czterech sekwencji miRNA w egzosomach surowicy krwi prezentujących znacząco zróżnicowaną ekspresję w zależności od grupy badanej: rzut SM, remisja SM, grupa kontrolna. Były to: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p and hsa-miR-532-5p.

Celem potwierdzenia swoistości tych czterech sekwencji egzosomalnego miRNA wykazujących obniżoną ekspresję u chorych z SM, wykrytych w trakcie badania pierwszej kohorty pacjentów, przeprowadzono drugi etap badania analizując materiał od niezależnej kohorty pacjentów składającej się łącznie z 63 osób. Wyniki tej drugiej, weryfikującej analizy, za pomocą dPCR, potwierdziły znaczące zróżnicowanie ekspresji wszystkich czterech miRNA pomiędzy kontrolami a rzutami i remisjami SM. Co ważne, zgodnie z danymi z sekwencjonowania NGS, wszystkie

cztery miRNA cechowała obniżona ekspresja w rzutach SM w porównaniu do poziomów u osób z grupy kontrolnej. Ponadto dla hsa-miR-122-3p, hsa-miR-196b-5p i hsa-miR-532-5p stwierdzono również znacząco obniżoną ekspresję w rzucie SM względem remisji SM. W przypadku hsa-miR-122-3p obniżenie ekspresji pomiędzy remisjami SM a kontrolą także osiągnęło znamienność statystyczną. Przeprowadzono również analizę korelacji tych sekwencji miRNA z radiologicznym obrazem aktywności choroby przy użyciu rezonansu magnetycznego. Okazało się, że u pacjentów z aktywnymi zmianami, tj. ulegającymi wzmocnieniu po podaniu gadoliny, stężenie wszystkich tych miRNA jest znacząco niższe niż w grupie bez zmian aktywnych, tj. bez cech wzmocnienia po podaniu gadoliny. Uzyskano w ten sposób potwierdzenie w niezależnej analizie korelacyjnej, iż niższe poziomy egzosomalnych miRNA, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-532-5p są związane z aktywnością choroby. Nie znaleziono jednak powiązania z czasem trwania choroby ani z poziomem niepełnosprawności (ocenianego skalą EDSS).

Celem identyfikacji potencjalnego źródła krążących w surowicy krwi egzosomów zawierających hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-532-5p, wykonano ocenę produkcji tych egzosomów przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells, PMBC). Udało się potwierdzić *in vitro*, że egzosomy produkowane przez PMBC zawierają analizowane cztery miRNA. Ponadto, wszystkie cztery sekwencje badanych miRNA wydzielane przez komórki PMBC miały znacząco obniżoną ekspresję w rzutowej postaci SM w porównaniu do zdrowych kontrol. Otrzymane dane wskazują, iż komórki PMBC stanowią potencjalne źródło badanych egzosomalnych miRNA oraz wydzielanie tych egzosomów jest obniżone u pacjentów z rzutową postacią SM.

Podjęto również próbę wyjaśnienia w jaki sposób obniżona ekspresja w/w czterech miRNA może wpływać na mechanizmy SM. Przy użyciu analizy bioinformatycznej z wykorzystaniem dedykowanych bazy danych, udało się znaleźć 74 sekwencje mRNA jako domniemane wspólne cele molekularne dla wszystkich czterech badanych miRNA. Największą klasę kodowanych białek, w ramach tych 74 sekwencji, stanowiły czynniki transkrypcyjne oraz białka wiążące DNA. Wyniki te sugerują znaczący wpływ tych miRNA na regulację ekspresji genów

zaangażowanych w regulację rozwoju procesów autoimmunologicznych. Szczególnie znaczące było, iż w grupie potencjalnych mRNA regulowanych przez wszystkie cztery miRNA, były transkrypty dla dwóch czynników transkrypcyjnych, STAT3 i AHR. Aktywność obu tych czynników transkrypcyjnych jest krytycznie, istotnie powiązana z procesem różnicowania limfocytów Th17 i komórek regulatorowych (Treg). Stwierdzona w tej pracy obniżona ekspresja czterech egzosomalnych miRNA u pacjentów z SM (głównie w rzucie) może więc prowadzić do zaburzenia kontroli nad procesami autoimmunologicznymi i promować rozwój SM.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, iż cztery miRNA: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-532-5p, wykazują istotne obniżenie ekspresji w egzosomach surowicy pacjentów z SM. Tym samym ocena poziomów tych miRNA w egzosomach surowicy może stać się biopskaźnikiem aktywności tej choroby. Ponadto, uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, iż niedobór ekspresji w egzosomach hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-532-5p u chorych na rzutową postać SM może być jednym ze składowych mechanizmów promujących rozwój tej choroby, na skutek zaburzenia transportu między komórkowego zależnego od egzosomów i uwolnienia kontroli nad procesami autoimmunologicznymi.

### **III. STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM / SUMMARY**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS), characterized by inflammation, demyelination, oligodendrocyte disruption, axonopathy and dysfunction of the blood-brain barrier. The disease has a prevalence estimated at 2.5 million individuals worldwide. The economic and social impact of this disease is very high. That is why MS has been intensively studied within the last several years. MS pathophysiology depends on generation of autoreactive lymphocytes that attack and destroy the myelin sheath leading to, leading to demyelination and axonal damage. Despite the unequivocal progress that has been made in the understanding of the immunology of MS in recent years, the precise mechanisms underlying the development of autoimmune demyelination remains to be clarified.

Recent data suggest that posttranscriptional modifications with microRNAs (miRNA) might influence immune mechanisms and contribute to generation of autoimmune reactions. In addition, recently published studies indicate that miRNA dependent mechanisms might also influence myelination and demyelination processes within CNS. Thus, a new direction of research was opened in the field of multiple sclerosis. MiRNA are single stranded, small non-coding RNA molecules that regulate gene expression and protein synthesis and are involved in many fundamental biological processes. It is believed, that miRNAs can play a central role in modulating the immune system and they might account for a critical level of regulation of key cellular functions with particular relevance for the development of autoimmunity. Despite general instability of RNA, unexpectedly recent findings showed that miRNA demonstrate extraordinary stability in serum within exosomes. Exosomes are a subtype of membrane vesicle released from the endocytic compartment of almost all live cells. Exosomes appear as highly selective and influential way of cell-to-cell communication. These small extracellular vesicles contain a wide array of biological material including proteins, lipids, transcriptional factors and a large variety of RNA, including miRNA, and DNA. Importantly, the transport of miRNA within exosomes allows the spread of genetic information beyond the borders of individual cells The significance of this extraordinary phenomenon is

largely unknown. In the light of the accumulating evidence for potential role of exosomes and miRNA in the regulation of immune system function, in this project I have undertaken the studies on the exosomal miRNA in serum of MS patients. The primary approach was to globally analyzed all miRNA sequences in serum exosomes in MS patients v. healthy controls. I hypothesed that global analysis of miRNA sequence profile in serum exosomes will allow to obtain a better insight into the role of exported genome portions in MS pathogenesis. In addition, in the light of the high miRNA stability within exosomes I intended to test the hypothesis that miRNA might represent a good diagnostic and prognostic biomarker of MS.

In first stage of our research blood samples were collected from 19 remitting relapsing MS patients (RRMS) including 9 patients with clinical relapse, and 10 with remission (discovery cohort). Control group consisted of 10 healthy individuals aged and gender matched with both MS groups. All MS patients were free from immunoregulatory treatment within 6 months prior to sample collection. Relapse was defined as new neurological symptoms or worsening of the existing neurological signs (lasting at least 48 hours) with at least 30 day stable condition prior to blood sampling Exosomes and RNA isolation was performed by precipitation method using ExoQuick kits (SBI System Bioscences). Information about particle size, concentration and distribution was provided by nanoparticle tracking analysis performed using a NanoSight NS500 instrument (NanoSight, Malvern Instruments). Isolated exosomes were verified by expression of alix and CD9 molecules, a standard exosomal markers. Next, isolated exosomes were processed for total exosomal RNA extraction using SeraMir Exosome RNA Amplification kit (System Biosciences). After the isolation, the level of RNA and its purity was analyzed by an Agilent RNA 6000 Pico Kit for Small RNA (Bioanalyzer; Agilent Technologies) on Agilent Bioanalyzer 2100 system. The isolated exosomal RNA was subjected to next generation sequencing (NGS) with MiSeq platform (Illumina). The generation of the sequencing libraries werw obtained with TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina) for all individual RNA samples. Bioinformatic and statistical analysis of NGS results discovered four miRNA that were significantly differentially expressed in the RRMS patients and controls. The use of Next Generation Sequencing allowed us to obtain complete variation of miRNA sequences present in exosomes. Thus, using the



NGS it was possible to cover all spectrum of miRNAs, already described in literature as well as new and unknown miRNA's.

NGS of exosomal RNA samples yielded 4-5 million reads aligned to the reference human genome sequence. These reads corresponded to more than 50,000 different RNA sequences. We categorized the obtained exosomal RNA sequences into the following 15 different classes: tRNA, tRNA-like, rfam, miRNA, lincRNA, lincRNA antisense, HAcaBox, CDBox, scaRNA, refseq, refseq antisense, rRNA, piRNA, other ncRNA, other ncRNA antisense. There was no significant difference in the number sequences of RNA in the exosomes from RRMS patients and controls, or between RRMS in relapse and in remission. There was also no obvious differences in the presence of the obtained RNA subclasses in all studied groups. We have found 350 to 400 different miRNA sequences in serum exosomes per sample confirming significant presence of miRNA within exosomes. Next, we have performed a global statistical analysis to detect true differentially expressed miRNA sequences. This approach yielded four miRNA that were significantly differentially expressed in the RRMS patients in remission, relapse and control serum exosome samples. These were: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p and hsa-miR-532-5p. We have also performed bioinformatic analysis towards identification of potential targets for these four miRNA.

To confirm the NGS findings from the discovery cohort of 4 differentially expressed serum exosomal miRNAs in RRMS patients and controls we validated these data in an independent group of 95 subjects. This cohort consisted from 33 patients in relapse, 30 in remission and 32 healthy controls. , The expression of the 4 miRNA identified in the NGS studies was measured by digital quantitative PCR All four miRNA were again found to be significantly differentially expressed between controls and RRMS in remission and relapse. Interestingly, in agreement with the NGS data, all these miRNA were significantly downregulated in the RRMS relapse samples when compared to controls. Furthermore, for hsa-miR-122-3p, hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-532-5p their expression in the sera were significantly downregulated in RRMS relapse samples when compared to patients in remission. In the case of hsa-miR-122-3p the downregulation of its expression reached statistical significance also between MS patients in remission and controls.

Additionally we performed analysis of correlation between expression these four miRNA sequences with the MRI evidence of disease activity. We found that MS patients with gadolinium enhancing lesions had significantly lower serum level of all these miRNA. Thus we have confirmed using an independent MRI measure that lower levels of circulating exosomal hsa-miR- 122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p and hsa-miR-532-5p were related to disease activity. No correlation was found between exosomal levels of these miRNA sequences with disease duration and disability assessed by the EDSS.

In order to identify the potential source of the circulating exosomes containing hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p and hsa-miR-532-5p we assessed the production of these exosomes by PBMCs. Indeed, we found *in vitro* that PBMCs did produce exosomes containing all four miRNA. Moreover, the PBMCs secretion of all four miRNA was significantly downregulated in RRMS patients compared to healthy controls. These data demonstrate that PBMCs might represent a potential source of these exosomal miRNA sequences and that the secretion of these exosomes is decreased in RRMS patients.

We have also attempted to characterize the function of the four miRNA with decreased expression in MS. For that, we performed bioinformatic analysis of potential targets for these miRNAs. The database search revealed that 74 protein coding transcripts shared putative targets for all these four miRNA. Within the identified targets, the largest class of encoded proteins belonged to transcriptional and DNA-interacting factors. However, particularly important was the finding, that within the targets recognized by all four miRNA there was a signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) as well as the cell cycle regulator aryl hydrocarbon receptor (AHR) transcripts. These two transcription factors represent the critical regulators of differentiation of Th17 cells as well as development of immunoregulatory T cell populations – (Treg). Thus, these findings suggest that the identified miRNAs with decreased expression in MS might control critical elements of MS mechanisms. The reduced expression of these miRNAs might decreased the control over transcriptional processes leading to autoimmune reaction in MS.

In summary, we provide results demonstrating deficiency in circulating levels of exosomal hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p and hsa-miR-532-5p in RRMS. These data may point at new biomarkers of RRMS and indicate a disturbed intercellular communication mediated by exosomes in this disease.