

Streszczenie rozprawy na stopień Doktora Nauk Medycznych “Znaczenie mikroRNA w rozwoju eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym” mgr Dominiki Justyny Książek-Winiarek

Stwardnienie rozsiane (SM) jest autoimmunizacyjną demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w której obserwuje się reaktywność komórek odpornościowych względem własnych białek osłonek mielinowych. Nacieki komórkowe obserwowane w OUN osób chorych odpowiedzialne są za rozwój przewlekłej reakcji zapalnej prowadzącej do uszkodzenia mieliny, zaburzonego przewodnictwa sygnałowego oraz obumarcia komórek nerwowych. Procesy te w konsekwencji prowadzą do rozwoju postępującej niepełnosprawności u pacjentów z SM.

SM jest chorobą wieloczynnikową, w której zależności między czynnikami genetycznymi, środowiskowymi, a epigenetycznymi zdają się odgrywać istotną rolę. MikroRNA są to stosunkowo niedawno zidentyfikowane czynniki epigenetyczne modulujące ekspresję genów poprzez regulację procesu translacji. Są to wysoce konserwatywne małe RNA, które poprzez wiązanie się do komplementarnej sekwencji obecnej najczęściej w regionie 3'UTR regulowanego mRNA prowadzą do represji translacji, deadenylacji lub rozpadu mRNA. miRNA regulują wiele procesów komórkowych, jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza. Ich niewłaściwe funkcjonowanie bądź zaburzona biogeneza mogą prowadzić do rozwoju procesów patologicznych takich, jak neurodegeneracja, autoagresja czy neurozapalenie. Wykazano ponadto, że mikroRNA oraz różnorodne cytokiny wydzielane przez aktywowane komórki odpornościowe mogą się wzajemnie regulować.

Komórki Th17 oraz wydzielana przez nie IL-17A uznawane są za jedno z głównych patogennych czynników rozwoju SM. Odpowiedzialne są one za uszkodzenie bariery krew-mózg czy stymulację astrocytów i mikrogleju do produkcji mediatorów zapalenia. Indukują wydzielanie różnorodnych czynników zapalnych, jak GM-CSF, IL-1 β , IL-6 czy MCP-1, prowadząc do napływu kolejnych komórek odpornościowych do OUN. IL-17A rekrutuje m.in. neutrofile do miejsca zapalenia poprzez regulację ekspresji CXCL-1 oraz CXCL-2, które są głównymi chemoatraktantami dla tych komórek. Neutrofile poprzez wydzielanie metaloproteinaz macierzy oraz proteaz uczestniczą w dalszym przełamaniu bariery krew-mózg, sprzyjając rozwojowi uszkodzeń w OUN. Neutrofile ponadto wpływają na różnicowanie i aktywację komórek T i monocytów poprzez interakcje z komórkami dendrytycznymi.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena wpływu czynników modulujących reakcję zapalną, tj. IL-17A oraz CXCL-1, na poziom ekspresji mikroRNA w zwierzęcym modelu SM – autoimmunizacyjnym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (EAE). Kolejnym etapem badań była ocena wpływu zmian profilu ekspresji wyselekcjonowanych miRNA na funkcjonowanie wybranych szlaków komórkowych.

Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy sugerują protekcyjną funkcję IL-17A w fazie przedklinicznej EAE. Wykazano bowiem obniżenie ekspresji prozapalnego miR-155-5p pod wpływem działania tej cytokiny w środowisku zapalnym. Ponadto wykazano wzrost ekspresji mRNA dla białek uczestniczących w szlaku sygnałowym neurotrofin, tj. *BDNF*, *HRAS*, *BCL2*. Dodatkowa analiza wykazała istnienie negatywnej korelacji pomiędzy tymi mRNA, a poziomem miR-155-5p. Wzrost poziomu białka HRas oraz Bcl-2 w grupie zwierząt poddanych iniekcji IL-17A sugeruje jej potencjalną anty-apoptotyczną funkcję. Dodatkowo wykazano, że domózgowe podanie tej cytokiny skutkowało obniżeniem ilości komórek Th17 w mózgu, przy niezmienionej liczbie neutrofilów, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rola miR-155-5p w SM i EAE jest dość dobrze poznana. miR-155-5p odpowiedzialny jest m.in. za regulację różnicowania komórek Th17, reaktywację encefalitogennych komórek T CD4+, aktywację jednojądrzastych fagocytów, hamowanie przeciwzapalnej aktywności astrocytów oraz indukcję aktywności zapalnej mikrogleju. W prezentowanej pracy analiza profilu ekspresji miRNA w różnych fazach EAE wykazała znaczny wzrost poziomu miR-155-5p dla każdej z badanych faz, potwierdzając jego rolę w patogenezie tej choroby. Obniżenie jego ekspresji pod wpływem działania IL-17A może więc skutkować zmniejszeniem nasilenia procesu zapalnego w OUN, bądź aktywacją szlaków przeciwzapalnych.

Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację nowego miR potencjalnie zaangażowanego w patogenezę EAE – miR-144-3p. Analiza faz choroby wykazała wzrost poziomu tego miR w fazie przedklinicznej, natomiast w fazie zaostrzenia objawów zaobserwowano spadek jego ekspresji. Również iniekcje domózgowe IL-17A i CXCL-1 wpływały na jego poziom, gdyż zaobserwowano wzrost ekspresji miR-144-3p u myszy immunizowanych. Nie udało się jednak zidentyfikować w prezentowanej pracy potencjalnego szlaku, ani docelowych mRNA regulowanych przez miR-144-3p. Liczne dane literaturowe wskazują na udział tego mikroRNA w procesach proliferacji, migracji i naciekania komórek nowotworowych. Jego rola w innych procesach dopiero jest odkrywana. Wyniki badań sugerują, że miR-144-3p reguluje dojrzewanie DC i makrofagów, wydzielanie cytokin, czy proces apoptozy. Ponadto miR-144-3p badany był również w kontekście procesu starzenia się, a wzrost jego poziomu związany był z wyższym ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera.

Jednym z genów regulowanych przez to mikroRNA jest Nfe212, kodujący białko NRF2, pełniące funkcje antyoksydacyjne. Białko to jest celem wielu terapii stosowanych w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym również w SM (lek Tecfidera). Może to pośrednio dowodzić roli miR-144-3p w patogenezie SM, jednak niezbędne są dalsze badania.

Uzyskane wyniki wskazują na protekcyjny wpływ IL-17A w fazie bezobjawowej EAE, głównie poprzez deregulację miR-155-5p. Ponadto wykazano nadekspresję białek HRas oraz Bcl-2, sugerując anti-apoptotyczną funkcję dla IL-17A. Zaprezentowane badania są jednymi z nielicznych wskazujących na protekcyjną funkcję tej cytokiny w EAE, i prawdopodobnie są jedynymi wykazującymi związek pomiędzy taką rolą IL-17A, a modulacją profilu ekspresji miR-155-5p w OUN.

Summary

Multiple sclerosis (SM) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system (CNS), in which immune cells' reactivity is directed towards the host myelin sheath proteins. Cellular infiltrates, observed within patients' CNS, are responsible for the development of chronic inflammation resulted in myelin damage, altered signal conduction, and neuronal death. Such pathological processes result in the development of progressive disability in MS patients.

MS is a multifactorial disease, where complex interplay between genetic, environmental and epigenetic factors is thought to play important role. microRNAs are relatively newly identified epigenetic factors modulating gene expression via regulation of translation. miRNAs are highly conserved small RNAs, which bind to their complementary sequence located mostly in the 3'UTR of targeted mRNA, leading to translational repression, deadenylation or mRNA decay. miRNA regulate many cellular processes, such as proliferation, differentiation or apoptosis. Their aberrant function or altered biogenesis may result in the development of pathologic processes e.g. neurodegeneration, autoimmunity or neuroinflammation. Moreover, it has been shown that microRNAs and various cytokines produced by activated immune cells may regulate each other.

Th17 cells, and its hallmark cytokine IL-17A, are thought to be one of the main pathogenic factors for MS development. They are implicated in the blood-brain barrier (BBB) destruction and they stimulate astrocytes and microglia for inflammatory mediators production. They induce secretion of various inflammatory stimuli, as GM-CSF, IL-1 β , IL-6

or MCP-1, resulting in additional cells migration into the CNS. IL-17A recruits to the site of inflammation e.g. neutrophils through the regulation of CXCL-1 and CXCL-2 expression, which are the main chemoattractants of these cells. Neutrophils produce matrix metalloproteinases or proteases participating in additional BBB break-down, mediating CNS damage. Moreover, neutrophils interact with dendritic cells leading to the T cells and monocytes differentiation and activation.

The main aim of this work was to evaluate the impact of inflammation-modulating factors, such as IL-17A and CXCL-1, on the microRNA expression level in animal model of MS – experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The next step was the assessment of the impact of altered expression profile of selected miRNAs on cellular pathways' function.

Results obtained in this work have suggested protective function for IL-17A in the preclinical phase of EAE. The decreased expression of pro-inflammatory miR-155-5p, induced by this cytokine in the inflammatory environment, has been observed. Moreover, it was shown that the expression level of *BDNF*, *HRAS* and *BCL2* mRNAs, all participating in the neurotrophin signaling pathway, was increased. Additional analysis has pointed that the negative correlation between these mRNAs and the level of miR-155-5p is present. Increase in the protein level of HRas and Bcl-2 in the animal group subjected to the IL-17A injection suggested potential anti-apoptotic function for this cytokine. Additionally, it was shown that intracerebral injection of IL-17A results in decreased amount of Th17 cells in the brain, with no alteration in neutrophils level, as compared to the control group.

The miR-155-5p role in MS and EAE is widely known. miR-155-5p is responsible e.g. for regulation of Th17 cells differentiation, reactivation of encephalitogenic CD4+ T cells, activation of mononuclear phagocytes, inhibition of anti-inflammatory response of astrocytes and induction of pro-inflammatory response in microglia. In the presented work, the analysis of miRs expression profile in various EAE stages has revealed considerable increase in the miR-155-5p level in every EAE phase, further supporting the role for this miR in the pathogenesis of EAE. Thus, decreased expression level of miR-155-5p induced by IL-17A action, may results in decreased inflammatory process, or activated anti-inflammatory pathways.

Studies presented here result in the identification of a new miR potentially implicated in the pathogenesis of EAE – miR-144-3p. Analysis of disease phases revealed that the level of this miR was up-regulated in the preclinical phase, whereas it was down-regulated during EAE relapse. Also intracerebral injections of IL-17A and CXCL-1 have modified its level, as

it was observed that the expression of miR-144-3p was elevated by these cytokines in the immunized mice. However, there were no identified potential cellular pathways or targeted mRNAs for this miR in the presented work. Numerous data from literature suggested that miR-144-3p participate in the proliferation, migration and invasion of tumor cells. The role for this miR in other processes has started to being unraveled. Obtained results suggest, that miR-144-3p regulate DC and macrophages development, cytokine production, and apoptosis. Additionally, miR-144-3p was studied in the context of ageing process, and its elevated expression was related to the higher risk of AD development. One of the genes regulated by the miR-144-3p is Nfe212, coding for NRF2, an antioxidant protein. This protein is a therapeutical target in many treatments applied in neurodegenerative disorders, also in MS (Tecfidera drug). This may indirectly prove the role for miR-144-3p in the pathogenesis of MS, however additional studies are necessary.

Results obtained in this work indicated that IL-17A may have protective role in the preclinical phase of EAE, mainly via miR-155-5p de-regulation. Moreover, it was shown that protein level for HRas and Bcl-2 was elevated, suggesting anti-apoptotic function for IL-17A. Studies presented here are one of the sparse pointed to the protective function of this cytokine in EAE, and probably this is the only work linking such IL-17A function with alteration in miR-155-5p expression profile in CNS.