

mgr Justyna Kiszalkiewicz
promotor: prof. dr hab. n.med. Ewa Brzeziańska-Lasota
Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny
I Katedra Chorób Wewnętrznych
Wydział Lekarski
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena ekspresji wybranych klas miRNA oraz ich genów docelowych uczestniczących w szlaku sygnałowym TGF-β/SMAD oraz osi HIF-1α/VEGF/ING-4 w przebiegu sarkoidozy – poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych.”

STRESZCZENIE

Pomimo znacznego postępu jaki dokonał się w diagnozowaniu sarkoidozy układu oddechowego, molekularne mechanizmy regulujące powstawanie jak i przebieg choroby nie zostały jak dotąd w pełni poznane.

W mojej pracy doktorskiej dokonałam analizy zmian poziomu ekspresji/immunoekspresji genów/białek szlaku sygnałowego *TGF-β/SMAD* i osi *HIF-1α/ING-4/VEGF* oraz wybranych klas miRNA regulujących wyżej wymienione szlaki sygnałowe u chorych na sarkoidozę układu oddechowego.

Celem prezentowanej pracy doktorskiej była także ocena u chorych ze zdiagnozowaną sarkoidozą układu oddechowego poziomu względnej ekspresji wybranych klas miRNA: let-7-f, miR15b, miR-16, miR-20a, miR-27b, miRNA-128b, miR-130, miR-192, miR-221, miR-222, regulujących na drodze pośredniej lub/i bezpośredniej szlak sygnałowy TGF-β/SMAD oraz osi HIF-1α-VEGF-(ING)-4. Dokonałam także oceny analizy zależności pomiędzy poziomami ekspresji badanych genów oraz miRNA a: klasyfikacją sarkoidozy na podstawie badania radiologicznego, charakterystyką biologiczną pacjentów, postacią ostrą a przewlekłą choroby, wartościami parametrów klinicznych oceniających funkcje czynnościowe układu oddechowego, markerami biochemicznymi czy fenotypem immunologicznym (CD4⁺/CD8⁺)

Materiałem do badań były komórki BALF, PBMC jak i surowica uzyskane od pacjentów. Grupę badawczą stanowiło 94 pacjentów ze zdiagnozowaną sarkoidozą układu oddechowego, a grupę kontrolną 50 niepalących pacjentów skierowanych na bronchoskopię z powodu przewlekłego kaszlu lub nieokreślonych zmian RTG klatki piersiowej.

Z materiału biologicznego wyizolowałam całkowity RNA oraz miRNA a następnie dokonałam oceny względnego poziomu ekspresji genów jak i miRNA metodą łańcuchowej

reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time qPCR*), po uprzednim przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji. Reakcja qPCR została przeprowadzona w aparacie 7900 HT Fast Real-Time PCR System przy zastosowaniu swoistych dla genów sond fluorogenicznych, a dla miRNA przy pomocy 384-dołkowych płytek mikrofluidowych. W przeprowadzanych doświadczeniach kalibratorem był zakupiony RNA pochodzący z tkanki płucnej. Przeprowadzono także kontrolę negatywną (ang. *no template control* - NTC), w której cDNA zastępowano dejonizowaną wodą. Jako gen referencyjny (kontrolę endogenną) wybrano gen kodujący β -aktynę (ang. *Beta-actin* –ACTB). Względny poziom ekspresji genów obliczany był przy użyciu porównawczej metody CT (ang. *comparative CT method*), nazywanej również metodą $\Delta\Delta C_T$. W metodzie tej poziom ekspresji danego genu (wartość RQ) w badanej próbce normalizowany był względem kontroli endogennej. Natomiast w oznaczaniu stężenia białek zastosowano metodę „Sandwich” ELISA. Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

Oceniając ekspresję wybranych genów szlaku sygnałowego *TGF- β /SMAD* u chorych nie wykazałam istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genów *TGF- β* , *SMAD 2,3* oraz *SMAD7* w komórkach BALF u chorych w stosunku do grupy kontrolnej. W limfocytach krwi obwodowej zaobserwowałam natomiast istotnie statystycznie różnice pomiędzy chorymi, a grupą kontrolną dla genów *TGF- β* oraz *SMAD3* z wyższym poziomem ekspresji obu genów u chorych. Analiza chorych zgodnie z podziałem klinicznym oraz obrazem radiologicznym (RTG klatki piersiowej: I, II-IV) nie ujawniła istotnie statystycznie różnic ($P > 0.05$ test U Manna - Whitney’ a) w ekspresji badanych genów u pacjentów bez/z obecnością zmian miąższowych płuc oraz pomiędzy klinicznymi fenotypami choroby (ostra postać vs. przewlekła postać choroby) zarówno w BALF jak i w limfocytach krwi obwodowej. Statystycznie istotnie podwyższony poziom ekspresji genu *TGF- β* zaobserwowałam w komórkach BALF pacjentów z nieprawidłową spirometrią w stosunku do pacjentów z prawidłowymi parametrami spirometrii. Podobnie, zaobserwowałam statystycznie wyższy poziom ekspresji genów *TGF- β* i *SMAD3* w komórkach BALF w grupie chorych z podejrzeniem zaburzeń wentylacji o typie restrykcyjnym. Zaobserwowałam także ujemne korelacje pomiędzy poziomem ekspresji genów *SMAD 3* i *2* a wartościami parametrów czynnościowych płuc ocenianych podczas spirometrii.

Analiza ekspresji wybranych genów osi *HIF-1 α /ING-4/VEGF* ujawniła istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji *HIF-1 α* w PBMC pomiędzy grupą chorych, a grupą kontrolną, z wyższym poziomem ekspresji w grupie chorych.

Zaobserwowano także statystycznie wyższy poziom ekspresji *HIF-1 α* w komórkach BALF w grupie chorych z podejrzeniem zaburzeń wentylacji o typie restrykcyjnym jak i u chorych z nieprawidłową spirometrią w porównaniu do osób z prawidłową spirometrią.

Podczas oceny immunoekspresji odnotowałam wyższy poziom TGF- β , SMAD2 oraz VEGF w surowicy chorych w porównaniu z potencjalnie zdrowymi osobami, co wskazuje na znaczenie tych białek jako markerów o właściwości różnicującej.

Ocena ekspresji wybranych klas miRNA ujawniła istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną w komórkach BALF dla: miR-221, miR-192 z wyższym poziomem ekspresji miRNA w grupie pacjentów oraz dla miR-15b z niższym poziomem ekspresji miRNA w grupie chorych. Także istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji miRNA w komórkach BALF zaobserwowano pomiędzy chorymi w stadium RTG I vs. II-IV dla miR-27b, miR-192 oraz dla miR-221 z wyższym poziomem ekspresji tych miRNA u chorych w stadium I według obrazu RTG. Dodatkowo dla tych samych miRNA stwierdziłam istotne statystycznie różnice w średnich wartościach RQ pomiędzy grupą chorych z ostrą vs. przewlekłą postacią choroby z wyższym poziomem ekspresji miRNA u chorych z ostrą postacią choroby. Zaobserwowano również w komórkach BALF istotną statystycznie różnicę w średnich wartościach RQ pomiędzy chorymi z prawidłową spirometrią vs. chorzy z podejrzeniem zaburzeń wentylacji o typie restrykcyjnym dla miRNA-16 i miR-20a z wyższym poziomem ekspresji u chorych z zaburzeniami wentylacji o typie restrykcyjnym.

W limfocytach krwi obwodowej odnotowałam istotnie statystycznie różnice pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną dla miR-27b, miR-192, miR-221, miR-222 z wyższym poziomem ekspresji tych miRNA w grupie chorych oraz dla dla miR-let7f, miR-130a z wyższym poziomem ekspresji w grupie kontrolnej. Istotne statystycznie różnice pomiędzy chorymi w stadium RTG I vs. II-IV zaobserwowano dla miR-16, z wyższym poziomem ekspresji tego miRNA w stadium RTG I. Zaobserwowano także istotne statystycznie różnice pomiędzy chorymi z ostrą vs. przewlekłą postacią choroby dla miRNA-130 i miR-15b z wyższym poziomem ekspresji u chorych z ostrą postacią choroby. Zaobserwowano także istotnie statystycznie różnice w poziomie ekspresji miRNA-let7f pomiędzy chorymi z prawidłową spirometrią, a chorymi z obturacją płuc obserwowaną w badaniu spirometrycznym, z wyższym poziomem ekspresji miRNA-let-7f u pacjentów z występującą obturacją.

Pomiędzy komórkami BALF, a limfocytami krwi obwodowej odnotowano istotnie statystyczne różnice dla miRNA15b i miRNA-130a z wyższym poziomem ekspresji miRNA w limfocytach oraz dla miRNA-let7f – wyższa ekspresja w komórkach BALF.

Podsumowując otrzymane wyniki badań mogą wpłynąć na wiedzę na temat udziału czynników genetycznych w rozwoju sarkoidozy układu oddechowego i ewentualnym ich związku z różnym obrazem klinicznym i przebiegiem choroby. Wyniki wskazały także na znaczenie szlaków sygnałowych *TGF-β/SMAD* i oś *HIF-1A/VEGF/ING-4* oraz miRNA jako regulatorów zapalenia, remodelingu ECM/EMT jak i angiogenezy/angiostazy. Co więcej *TGF-β*, *SMAD3*, *HIF-1α* na poziomie mRNA oraz białka SMAD2, VEGF oraz miR-15b, miR-27b miR-192, miR-221, miR-222, miR-130a, miR-let7 mogą mieć potencjał różnicujący chorych od osób zdrowych, a miR-16, miR-20a, miR-27b, miR-let7f, miR-192, HIF-1A mogą mieć znaczenie jako marker diagnostyczny o negatywnej wartości prognostycznej

SUMMARY

Despite the significant advances that have been made in the diagnosis of pulmonary sarcoidosis, molecular mechanisms of the disease pathology and progression, so far, have not been fully understood.

In my dissertation I include the analysis of: (i) the expression/immunoexpression levels of genes/proteins associated with *TGF- β /SMAD* signaling pathway and *HIF-1 α /ING-4/VEGF* axis; (ii) the expression levels of selected classes of miRNAs (let-7-f, miR15b, miR-16, miR-20a, the miR-27 b, miRNA-128b, miR-130 miR -192, miR-221, miR-222) that regulate the aforementioned signaling pathways; (iii) the relationship between the gene expression levels, miRNAs expression levels and clinico-pathological parameters, such as: classification of sarcoidosis based on radiological examination, the characteristics of patients, acute and chronic form of disease, the values of respiratory function, biochemical markers and immunological phenotype (CD4⁺/CD8⁺).

The experimental material were BALF cells, PBMC and serum obtained from patients with pulmonary sarcoidosis. The study group consisted of 94 patients diagnosed with pulmonary sarcoidosis, and a control group: 50 non-smoking patients referred for bronchoscopy with chronic cough or unspecified changes in chest X-ray.

Total RNA and miRNA were isolated from biological material (BALF cells, PBMCs), then reverse transcription reactions were performed, followed by an assessment of gene and miRNA relative expression levels with the use of real time PCR method (qPCR). qPCR reactions were carried out in the 7900 HT Fast Real-Time PCR System using gene-specific fluorogenic probes and microfluidic 384-well plates for miRNAs. Commercially purchased RNA derived from the lung tissue was used as a calibrator and β -actin (ACTB) was selected as a reference gene (endogenous control). Negative control was also carried out (no template control - NTC), in which the cDNA was replaced with deionized water. The relative level of gene expression was calculated using the comparative C_T method also called the $\Delta\Delta C_T$ method. The determination of protein concentration in serum was performed by "sandwich" ELISA method. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

The expression levels of selected genes: *TGF- β* , *SMAD 2*, *3* and *SMAD7* in BALF cells did not show statistically significant differences when compared between patients and control group. However, in peripheral blood lymphocytes statistically significant differences were observed, with higher expression levels of *TGF- β* and *SMAD3* in patients than in controls.

Significantly increased expression level of *TGF-β* was also observed in BALF cells in patients with poor spirometry as compared with patients with normal spirometry. Likewise, statistically higher expression levels of *TGF-β* and *SMAD3* were found in BALF cells in patients with suspected restriction type of ventilation abnormalities. Also, a negative correlations between the gene expression level - in case of *SMAD 3* and *SMAD 2* - and the values of the pulmonary function parameters evaluated during spirometry were observed. Analysis performed in BALF cells and in PBMC of patients grouped according to the stages in X-ray of the chest (I, II-IV), patients with/without the parenchymal involvement and clinical phenotype of the disease (acute form vs. chronic form of the disease) did not reveal statistically significant differences in the expression levels of the studied genes.

Regarding the analysis of expression levels of the selected genes of *HIF-1α* / *ING-4* / *VEGF* axis, statistically higher *HIF-1α* expression level in patients' PBMC was found as compared with control group.

There was also a statistically higher expression level of *HIF-1α* in BALF cells in patients suspected of having restriction type of ventilation abnormalities and in patients with abnormal spirometry vs. normal spirometry.

Immunoexpression analysis revealed higher levels of TGF-β, SMAD2 and VEGF in the serum of patients as compared with potentially healthy subjects, indicating the importance of these proteins as markers with differentiation properties.

Expression analysis of selected classes of miRNA revealed statistically significant differences in BALF cells between patients and controls for miR-221, miR-192 with a higher expression levels of these miRNAs in patients and for miR-15b with lower expression level in patients. Also, statistically significant differences in the expression levels of miRNAs in BALF cells between patients with X-ray stage I vs. stage II-IV were observed for miR-27b, miR-192 and miR-221 with higher expression levels of these miRNAs in stage I patients. Additionally, the same miRNAs showed statistically higher RQ values in patients with acute vs. chronic form of the disease. Significantly higher expression levels in case of miRNA-16 and miR-20a was found in BALF cells in patients with impaired ventilation (patients suspected of having restriction type of ventilation abnormalities) vs. normal spirometry.

In PBMCs, statistically significant differences were observed between patients and controls for miR-27b, miR-192, miR-221, and miR-222 with higher expression levels of these miRNAs in patients and for miR-let7f, and miR-130a with higher expression levels in controls. Significantly higher miR-16 expression level was found in patients with X-ray stage I vs. stage II-IV. There were also statistically significant differences between patients with

acute vs. chronic form of the disease for miRNA-130 and miR-15b, with higher expression level in patients with acute form of disease. miRNA-let7f expression level was significantly higher in patients with lung obstruction (as observed during spirometry) vs. patients with normal spirometry.

When comparing BALF cells and PBMC, significantly higher expression levels of miRNA15b and miRNA-130a were observed in lymphocytes and of miRNA-let7f in BALF cells.

In conclusion, the obtained results extend the knowledge on the participation of genetic factors in the development of sarcoidosis, respiratory system and their possible association with different clinical picture and course of the disease. The results also indicate the importance of the studied signaling pathways: *TGF- β /SMAD* and the *HIF-1 α /VEGF/ING-4* and miRNAs as regulators of inflammation, remodeling, the ECM / EMT transition and angiogenesis/angiostasis. Moreover, *TGF- β* , *SMAD3*, *HIF-1 α* at the mRNA level and proteins: SMAD2, VEGF and miR-15b, miR-27b, miR-192, miR-221, miR-222, miR-130a, miR-let7 may play the potential role in differentiation of patients from healthy subjects and miR-16, miR-20a, miR-27b, miR-let7f, miR-192, *HIF-1 α* may be important as diagnostic markers with a negative prognostic value.