

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wydział Lekarski

mgr Paweł Piątek

**Interakcja pomiędzy mielino-specyficznymi limfocytami
CD49d⁺CD154⁺ a prekursorami oligodendrocytów jako kluczowy
proces odpowiedzialny za zakłócanie prawidłowej remielinizacji
w stwardnieniu rozsianym**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

wykonana w Katedrze i Klinice Neurologii

Promotor

dr hab. n. med. prof. uczelni

Przemysław Lewkowicz

Łódź, 2020

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (MS – *multiple sclerosis*) jest przewlekłą, demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN), której towarzyszy przebieg rzutowo-remisyjny (RR-MS) lub progresywny. W przebiegu SM wyróżnić można dwie synergistyczne drogi prowadzące do uszkodzeń neuronów. Pierwsza z nich to uszkodzenia osłonki mielinowej i tworzenie zmian w OUN, a druga to stan zapalny. Demielinizacja osłonki neuronów zwiększa możliwość aktywacji procesów zapalnych, prowadząc do uszkodzeń bariery krew- mózg (BBB), aktywacji makrofagów i ścieżek stresu oksydacyjnego. W skład mieliny wchodzi: cholesterol, glikosfingolipidy tj. galaktocerebrozydy i sulfatydy, fosfolipidy i gangliozydy tj. GM4 oraz białka. Ze względu na intensywne procesy komórkowe (w tym wytwarzanie mieliny), oligodendrocyty (OLs) są bardzo podatne na niedobory metabolizmu energetycznego. Regeneracja mieliny po utracie oligodendrocytów jest zależna od skutecznej wymiany uszkodzonych komórek. Zrozumiałym jest, że powrót do zdrowia jest ściśle związany z odnową osłonek mielinowych. Jednak zakres remielinizacji u każdego chorego jest inny. Ponadto, dostrzec można różnice w odtwarzaniu mieliny w zależności od lokalizacji zmian, nawet u tej samej osoby chorej na SM.

Cel badań: Celem badań było wskazanie mechanizmu odpowiedzialnego za nawroty choroby i postępującą degenerację OUN w stwardnieniu rozsianym. Przyjęta hipoteza zakładała, iż zmiany te muszą być uwarunkowane upośledzonym dojrzewaniem OPCs związanym z obecnością autoreaktywnych, mielino-specyficznych limfocytów. Fenotyp tych komórek, musi być związany z ich zdolnością do przechodzenia przez BBB oraz obecnością markera świadczącego o swoistości.

W trakcie różnicowania prekursorów oligodendrocytów (OPCs) do dojrzałych, mielinizujących oligodendrocytów, wytwarzane są chemokiny i cytokiny prozapalne, które mogą rekrutować i aktywować prozapalne limfocyty. Stężenia czynników prozapalnych w supernatantach pochodzących dojrzejących oligodendrocytów w obecności limfocytów RR-MS CD49d⁺CD154⁺ są podwyższone. Chociaż zarówno limfocyty RR-MS CD49d⁺CD154⁺, jak i dojrzewające OPCs mogą oddzielnie syntezować niektóre z nich, wzrost stężeń w hodowli mieszanej nie jest jedynie efektem addytywnym, ale wynikiem działania dodatniego sprzężenia zwrotnego pętli regulacyjnej. Deregulacja osi chemokin CXCL12/CXCR4/CXCR7, a także innych chemokin należących do rodziny CXCL12 poprzez limfocyty RR-MS CD49d⁺CD154⁺

sprawia, iż plaki są bardziej podatne na powtarzające się ataki komórek układu odpornościowego a tym samym nawracającą demielinizację. Ponadto, limfocyty te zaburzają migrację OPCs do plak demielinizacyjnych poprzez konkurencyjną neutralizację chemokin. Inną unikalną cechą limfocytów RR-MS CD49d⁺CD154⁺, w przeciwieństwie do komórek pochodzących od osób zdrowych, jest ich zdolność do proliferacji, podczas stymulacji peptydami mielinowymi, bądź po interakcji z dojrzewającymi OPCs wcześniej preinkubowanymi z peptydami mielinowymi. Może to wskazywać na fakt, iż dojrzewające OPCs, działając jako komórki prezentujące antygen, przedłużają stan zapalny, poprzez oddziaływanie z limfocytami i pośredniczenie w ich proliferacji.

W trakcie właściwej remielinizacji niezwykle ważny jest fizjologiczny proces dojrzewania OPCs. Istotną rolę w tym procesie odgrywają cząsteczki mikroRNA. Interakcja pomiędzy mysimi OPCs vs. BMC EAE pociąga za sobą zmiany potranskrypcyjne zależne od ich aktywności. Istnieje związek pomiędzy deregulacją białek procesujących miRNA na wczesnych etapach syntezy, a nadekspresją MBP. Obniżona synteza miRNA znajduje odzwierciedlenie w obniżonej ekspresji białek biogenezy miRNA. Transkrypcyjne miRNA są kontrolowane w reakcji sprzężenia zwrotnego, w którym czynniki transkrypcyjne, regulujące określone miRNA, same są celem tych miRNA. Dwa z nich miR-665 i miR21-3p są negatywnie i bezpośrednio związane z aktywnością polimerazy II i globalnym remodelowaniem chromatyny. Wykazano, że nadekspresja miR-665 wpływa na inne cząsteczki miRNA poprzez zakłócanie transkrypcji i wywiera pośredni wpływ na syntezę białek mieliny. Zgodnie z powyższym okazuje się, że mechanizm ten obejmuje nie tylko określone cząsteczki miRNA bezpośrednio związane z syntezą mieliny, ale także globalny profil miRNA na poziomie transkrypcyjnym. Widoczny jest także związek, między dysproporcjami w syntezie MBP i PLP podczas remielinizacji przez rozregulowanie miRNA w dojrzewających OPCs wywołane przez działanie limfocytów RR-MS CD49d⁺CD154⁺ specyficznych dla mieliny. Niewystarczająca remielinizacja jest wynikiem działania dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy dojrzewającymi OPCs, a limfocytami RR-MS CD49d⁺CD154⁺.

W związku z faktem, iż skład mieliny charakteryzuje się wyjątkowo wysoką zawartością lipidów, niezwykle istotna w trakcie prawidłowego dojrzewania OPCs jest obecność odpowiednich kwasów tłuszczowych tj. EPA (kwas eikozapentaenowy), DHA (kwas dokozaheksaenowy) i NA (kwas nerwonowy). Dojrzewające OPCs symulowane FOM (mieszkanką olei rybich) zawierającą metabolizowany NA, charakteryzują się prawidłową

morfologią i przedłużoną żywotnością dojrzałych OLs, które syntezują zwiększone ilości białek mieliny tj. MBP, PLP oraz MOG. Istotnym jest fakt, że w trakcie dojrzewania OPCs wytwarzają szereg cytokin prozapalnych, których stężenie zmniejsza się pod wpływem suplementacji hodowli mieszaniną FOM.

Powyższe badania pozwoliły na postawienie hipotezy na temat nieskutecznej remielinizacji i nawrotów choroby związanej z działaniem pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, w której dojrzewające OPCs są przeprogramowywane w reaktywne immunologicznie komórki OLs, niezdolne do skutecznego wytwarzania białek mielinowych. Zamiast tego wzmacniają rekrutację i pośredniczą w proliferacji limfocytów specyficznych dla mieliny w wyniku dwóch różnych mechanizmów. W pierwszym limfocyty mogą migrować z obwodowego układu krwionośnego, poprzez działanie chemokin uwalnianych w plakach remielinizacyjnych przez dojrzewające OPCs. Dodatkowo są stymulowane przez ich interakcję z immunoreaktywnymi OLs. Po drugie, limfocyty specyficzne dla mieliny mogą proliferować po bezpośrednim kontakcie z antygenami mielinowymi prezentowanymi przez dojrzewające OPCs, co prowadzi do rozwoju rezydentnych limfocytów CD49d⁺CD154⁺, które nie są całkowicie eliminowane po rzutach choroby i mogą trwale wpływać na proces remielinizacji. Ponadto, suplementacja FOM (zwierającą EPA, DHA i NA) dojrzewających OPCs poprawia zdolność dojrzałych OLs do syntezy białek mieliny, a także sfingomieliny. Dodatkowo FOM hamuje wydzielanie czynników prozapalnych przez OPCs, które mogą być potencjalnie zaangażowane w rekrutację komórek układu odpornościowego podczas remielinizacji, sprzyjając syntezie czynników wzrostu, co może stwarzać korzystne warunki dla regeneracji OUN.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, demyelinating disease of the central nervous system (CNS), which is accompanied by relapsing-remitting (RR-MS) or progressive disease. Two synergistic pathways leading to neuronal damage can be distinguished in the course of MS. The first is myelin sheath damage and CNS lesions, and the second is inflammation. The demyelination of myelin sheaths increases the possibility of activating inflammatory processes, leading to blood-brain barrier (BBB) damage, activation of macrophages and oxidative stress pathways. Myelin consists of: cholesterol, glycosphingolipids i.e. galactocerebrosides and sulfatides, phospholipids and gangliosides i.e. GM4 and proteins. Due to intense cellular processes (including myelin production), oligodendrocytes (OLs) are very susceptible to energy metabolism deficiencies. Regeneration of myelin after loss of oligodendrocytes is dependent on successful exchange of damaged cells. Thus, the recovery is closely related to the renewal of myelin sheaths. However, the extent of remyelination is different for each patient. What is more, differences in myelin regeneration can be seen depending on the location of the lesions, even in the same person with MS.

Aim of the study: The aim of the study was to identify the mechanism responsible for relapse and progressive CNS degeneration in multiple sclerosis. The adopted hypothesis assumed that these changes must be conditioned by impaired OPCs maturation associated with the presence of autoreactive, myelin-specific lymphocytes. The phenotype of these cells must be related to their ability to pass through BBB and the presence of a marker indicating specificity.

During the differentiation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) into mature, myelinating oligodendrocytes, pro-inflammatory chemokines and cytokines are produced that can recruit and activate proinflammatory lymphocytes. Concentrations of proinflammatory factors in postculture supernatants of maturing oligodendrocytes in the presence of RR-MS CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes are elevated. Although both RR-MS CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes and maturing OPCs can synthesize some of them separately, the increase in concentration observed in mixed culture is not only an additive effect, but a result of the regulatory loop's positive feedback. Deregulation of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis, as well as other chemokines belonging to the CXCL12 family through the RR-MS CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes makes the plaques more susceptible to repeated attacks of immune cells and thus recurrent demyelination. In addition, these lymphocytes interfere with

OPCs migration to demyelinating plaques by competitive chemokine neutralization. Another unique feature of RR-MS CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes, in contrast to cells from healthy individuals, is their ability to proliferate, when stimulated with myelin peptides, or after interacting with maturing OPCs previously preincubated with myelin peptides. This may indicate that maturing OPCs, acting as antigen presenting cells, prolong inflammation by interacting with lymphocytes and mediating their proliferation.

During proper remyelination, the physiological maturation process of OPCs is extremely important. MicroRNAs play an important role in this process. Interaction between mouse OPCs vs. BMC EAE involves post-transcriptional changes depending on their activity. There is a relationship between deregulation of miRNA processing proteins in the early stages of synthesis and overexpression of MBP. Reduced miRNA synthesis is reflected in reduced expression of miRNA for biogenesis proteins. Transcription miRNAs are controlled in a feedback reaction in which transcription factors, that regulate specific miRNAs, are themselves the target of these miRNAs. Two of them miR-665 and miR21-3p are negatively and directly related to polymerase II activity and global chromatin remodeling. Overexpression of miR-665 has been shown to affect other miRNAs by interfering with transcription and exerting indirect effects on myelin protein synthesis. Accordingly, it appears that this mechanism includes not only specific miRNAs directly associated with myelin synthesis, but also a global miRNA profile at the transcriptional level. The relationship between disproportions in MBP and PLP synthesis during remyelination by miRNA dysregulation in maturing OPCs induced by myelin-specific RR-MS CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes is also evident. Insufficient remyelination is the result of positive feedback between maturing OPCs and RR-MS CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes.

Due to the fact that the composition of myelin is characterized by an extremely high content of lipids, the most important thing during the proper OPC maturation is the presence of appropriate fatty acids, i.e. EPA (eicosapentaenoic acid), DHA (docosahexaenoic acid) and NA (nervonic acid). Maturing OPCs simulated with FOM (fish oil mix) containing metabolized NA, are characterized by normal morphology and extended life of mature OLs that synthesize increased amounts of myelin proteins, i.e. MBP, PLP and MOG. It is important that during the maturation of OPCs they produce a number of proinflammatory cytokines, whose concentration decreases under the influence of supplementation with a FOM mixture.

The obtained data allowed to hypothesize about the ineffective remyelination and recurrence of the disease associated with a positive feedback loop in which the maturing OPCs are reprogrammed into immunoreactive OLs, unable to successfully produce myelin proteins. Instead, they enhance recruitment and mediate the proliferation of myelin-specific lymphocytes as a result of two different mechanisms. In the first, lymphocytes can migrate from the peripheral circulatory system, through the chemokines released in remyelination plaques by maturing OPCs. In addition, they are stimulated by their interaction with immunoreactive OLs. Secondly, myelin-specific lymphocytes can proliferate after direct contact with myelin antigens presented by maturing OPCs, which leads to the development of resident CD49d⁺CD154⁺ lymphocytes, which are not completely eliminated after relapses and may permanently affect the remyelination process. In addition, FOM (containing EPA, DHA and NA) supplementation of maturing OPCs improves the ability of mature OLs to synthesize myelin as well as sphingomyelin proteins. In addition, FOM inhibits the secretion of proinflammatory factors by OPCs, which may be potentially involved in the recruitment of immune cells during remyelination, promoting the synthesis of growth factors, which may create favorable conditions for CNS regeneration.