

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM**

Stwardnienie rozsiane (sclerosis multiplex, SM) jest przewlekłą zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Etiologia tej choroby nie jest w pełni poznana, wiadomo jednak, że mechanizmy odpowiedzialne za jej rozwój w znacznym stopniu zależą od procesów autoimmunologicznych. Uważa się, że jest to choroba wieloczynnikowa, która powstaje przy udziale czynników genetycznych, środowiskowych i epigenetycznych.

Jednym ze szczególnie znaczących odkryć na polu epigenetyki w ostatnich latach była identyfikacja małych niekodujących cząsteczek RNA - mikroRNA (miRNA). Wcześniejsze badania wykazały związek niektórych miRNA z regulacją autoimmunologicznej demielinizacji u chorych na SM. Ponieważ regulacja ekspresji miRNA jest procesem bardzo dynamicznym i złożonym, coraz więcej dowodów wskazuje na znaczenie kolejnego wyższego poziomu mechanizmu regulacyjnego miRNA. Coraz więcej danych wskazuje, że może nim być aktywność nowej unikalnej grupy cząsteczek – kolistych RNA (circular RNA; circRNA). circRNA reprezentują nową, unikalną klasę endogennych ncRNA kontrolujących ekspresję i funkcję miRNA. Nazywane są „naturalnymi gąbkami dla miRNA” ponieważ pojedyncza cząsteczka circRNA może wiązać się z kilkoma miRNA, przez co wpływa na ich dostępność i zmniejsza zdolność do kontroli transkrypcji. Wiele spośród circRNA jest tkankowo specyficznych lub pojawia się w konkretnym stadium rozwoju. Udowodniono, iż circRNA odgrywają rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych ośrodkowego układu nerwowego oraz układu immunologicznego, jednak ich rola w procesie autoimmunologicznej demielinizacji pozostaje wciąż nieodkryta.

Badania przeprowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej dotyczyły oceny ekspresji circRNA u pacjentów chorujących na SM, oceny korelacji z typem i aktywnością tej choroby oraz określeniem wpływu circRNA na regulację miRNA i transkryptów białkowych.

We wszystkich etapach badania wzięły udział łącznie 104 osoby, w tym 67 pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią SM (RRMS) oraz 37 zdrowych ochotników (grupa kontrolna). Wszyscy pacjenci z SM spełniali zmodyfikowane kryteria McDonald'a z 2017r. Tylko pacjenci z SM nie leczeni lekami immunomodulującymi w ciągu 3 miesięcy przed pobraniem próbek byli włączani do badania. Ocena stanu klinicznego była dokonywana za pomocą rozszerzonej skali nasilenia niepełnosprawności (Expanded Disability Status Scale - EDSS). Próbki krwi od wszystkich pacjentów w czasie rzutu choroby zostały pobrane przed podaniem metyloprednizolonu.

W pierwszym etapie badania (grupa odkrywczą) pobrano krew od 30 osób – w tym 20 pacjentów z postacią rzutową SM (RRMS-10 z rzutem i 10 w czasie remisji) i 10 zdrowych ochotników. Po uzyskaniu RNA z komórek jednojądrowych krwi (PBMC) przeprowadzono globalną analizę ekspresji circRNA przy pomocy mikromacierzy. Analiza ta dotyczyła prawie  $14 \times 10^3$  cząsteczek circRNA. W drugim etapie badania (grupa potwierdzająca) pobrano krew od nowej, niezależnej grupy 74 osób – w tym 47 pacjentów z RRSM (19 z rzutem i 28 w remisji) i 27 zdrowych ochotników. W tej grupie przeprowadzono analizę profilowania wybranych na podstawie wyników fazy odkrywczej circRNA metodą qPCR.

Wyniki uzyskane przy pomocy mikromacierzy potwierdziły, że PBMC są bogatym źródłem circRNA zarówno u osób zdrowych jak i chorych na RRMS. Na podstawie analizy zróżnicowanej ekspresji stwierdzono, że ekspresja poszczególnych

circRNA w grupach rzutów i remisji RRMS istotnie różniła się od tych stwierdzanych u zdrowych ochotników. Grupowanie hierarchiczne oparte na ekspresji circRNA pozwoliło na wyraźne zróżnicowanie profilu circRNA i rozdzielenie na podstawie ich profilu obu grup RRMS, rzutu i remisji, od kontroli. Analogiczna analiza grupowania hierarchicznego nie ujawniła znaczącej globalnej różnicy w ekspresji circRNA pomiędzy pacjentami z RRMS w remisji i trakcie rzutu. Zatem dane uzyskane z analizy mikromacierzy z zestawu odkrywczego pozwoliły na identyfikację grupy circRNA, które ulegają specyficznej i odmiennej ekspresji u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym.

W celu walidacji ulegających zwiększonej ekspresji circRNA wytypowano pięć circRNA wykazujących najbardziej znamienne odmienny profil ekspresji u pacjentów z RRMS w grupie odkrywczej badania. Wyniki pokazały, że poziomy ekspresji hsa\_circRNA\_101348, hsa\_circRNA\_102611 i hsa\_circRNA\_104361 były znacząco wyższe u pacjentów z RRMS podczas rzutu niż w grupie kontrolnej. Również znaczący wzrost tych 3 circRNA zaobserwowano w grupach rzutów w porównaniu do remisji.

Pacjenci w czasie rzutu z aktywnymi zmianami zapalnymi w badaniu MRI wychwytyjącymi gadolinę wykazywali wyższą ekspresję hsa\_circRNA\_101348, hsa\_circRNA\_102611 i hsa\_circRNA\_104361 niż pacjenci bez zmian wzmacniających się po podaniu kontrastu. Różnice dla hsa\_circRNA\_101348 i hsa\_circRNA\_104361 były istotne statystycznie. Analiza korelacyjna wszystkich trzech circRNA nie ujawniła związku poziomu ekspresji tych circRNA z czasem trwania choroby w analizowanym okresie czasu ani ze stopniem niepełnosprawności.

Aby dodatkowo scharakteryzować funkcję circRNA ulegających odmiennej ekspresji, przeanalizowano potencjalny wpływ tych circRNA na zdolność wiązania korespondencyjnych dla nich cząsteczek miRNA. Te cząsteczki miRNA ulegały

deaktywacji co prowadziło do uwolnienia translacji transkryptów kodujących białka kontrolowanych przez miRNA zależne od circRNA ulegających odmiennej ekspresji u pacjentów z RRSM.

Bioinformatyczna analiza w oparciu o bazy danych miRNA ujawniła szereg mRNA, będących celem dla miRNA, które są kontrolowane przez circRNA. Następnie, po analizie mRNA wspólnych dla wszystkich analizowanych circRNA stwierdzono, że pięć cząsteczek mRNA jest celem dla dwóch circRNA: hsa\_circRNA\_101348 i hsa\_circRNA\_104361. Grupa tych pięciu transkryptów składała się z AK2, CBX5, DGKH, IKZF3 i RNF24. Wśród tych pięciu transkryptów białkowych były dwa zaangażowane w funkcje limfocytów B – AK2 i IKZF3.

W celu potwierdzenia analizy bioinformatycznej dotyczącej wpływu hsa\_circRNA\_101348 i hsa\_circRNA\_104361 na profil mRNA u pacjentów z RRMS zmierzono bezpośrednio poziom ekspresji AK2, CBX5, DGKH, IKZF3 i RNF24. Stwierdzono, że trzy transkrypty wykazały znacznie wyższą ekspresję w PBMC u pacjentów z rzutem RRMS niż w grupie kontrolnej - AK2, IKZF3 i CBX5. Co bardzo istotne, wśród nich znajdowały się dwa transkrypty związane z funkcjonowaniem komórek B: AK2 i IKZF3.

Wyniki niniejszej pracy wykazały, że profilowanie kolistych RNA w komórkach PBMC pozwala na znamienne zróżnicowanie ekspresji circRNA u chorych z RRMS w stosunku do zdrowych ochotników. W grupie pacjentów rzutem choroby po fazie walidacji w niezależnej kohorcie zidentyfikowano trzy cząsteczki circRNA: hsa\_circRNA\_101348, hsa\_circRNA\_102611 i hsa\_circRNA104361 ulegające zwiększonej ekspresji. Dalsze analizy bioinformatyczne ujawniły grupę cząsteczek miRNA, które wykazywały specyficzne miejsca wiązania dla circRNA o zwiększonej

ekspresji tworząc podstawę biologicznego działania circRNA jako „gąbek” miRNA. Kolejne analizy bioinformatyczne i bezpośrednie pomiary transkryptów białkowych wykazały, iż kompleksy circRNA-miRNA zwiększały ekspresję trzech mRNA. Najważniejszą obserwacją tej pracy jest to iż wśród tych trzech transkryptów kodujących białka były dwa ściśle związane z funkcją limfocytów B. Mutacje w genie AK2 wiążą się z hamowaniem aktywacji limfocytów B i produkcji przeciwciał, natomiast gen IKZF odpowiada za funkcje dojrzałych komórek B w układzie immunologicznym i jest niezbędny do wytwarzania komórek plazmatycznych szpiku kostnego. W związku z tym wyniki tej pracy upoważniają do postawienia hipotezy, iż układ circRNA-miRNA może mieć wpływ na obserwowane w SM zaburzenie funkcji limfocytów B. Ponadto zidentyfikowane w badaniu circRNA mogą stanowić przydatne biomarkery służące identyfikacji chorych z RRMS.