

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

Ing. Klára Prajzlerová

### **Využití cirkulujících miRNA**

### **jako biomarkerů v diagnostice a terapii revmatických onemocnění**

*Circulating miRNAs as biomarkers in the diagnosis and treatment of rheumatic diseases*

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Mária Filková, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Ladislav Šenolt, Ph.D.

Praha, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. 6. 2021

Klára Prajzlerová

## **Identifikační záznam**

PRAJZLEROVÁ, Klára. *Využití cirkulujících miRNA jako biomarkerů v diagnostice a terapii revmatických onemocnění [Circulating miRNAs as biomarkers in the diagnosis and treatment of rheumatic diseases]*. Praha, 2021. 76 s., 6 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav a Revmatologická klinika. Školitel Filková, Mária.

## **Poděkování**

Velmi ráda bych poděkovala zejména své školitelce doc. MUDr. Márii Filkové, Ph.D. za její obětavý přístup, příkladné vedení a pomoc při mém studiu. Poděkovat bych také chtěla mému konzultantovi prof. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, Ph.D. za odborné rady, podporu v průběhu studia a umožnění mé účasti na mezinárodních kongresech. Mé díky patří i prof. MUDr. Jiřímu Vencovskému, DrSc. a prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., řediteli Revmatologického ústavu za podporu při studiu. Děkuji všem kolegům z Revmatologického ústavu, především MUDr. Olze Kryštůfkové, Ph.D., Mgr. Veronice Horváthové a Ing. Haně Hulejové za pomoc při laboratorních analýzách a zpracovávání výsledků.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu MZČR pro konceptuální rozvoj výzkumné organizace 00023728, grantů AZV-17-33127A, AZV-17-32612A, SVV LF1 UK (260373,260031, 260263), GAUK 367615 a projektu IGA NT-14498.

## **Abstrakt**

**Úvod:** MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující jednořetězcové RNA podílející se na inhibici genové exprese na posttranskripční úrovni, čímž ovlivňují řízení všech buněčných funkcí. Jejich dysregulace se podílí na patogenezi onemocnění, včetně revmatických. MiRNA se mohou vyskytovat i extracelulárně v tělních tekutinách, čímž představují nadějný diagnostický a prognostický ukazatel. Cílem práce bylo analyzovat expresi miRNA jako potenciálních biomarkerů stadia a aktivity nemoci a predikci terapeutické odpovědi u dvou nejčastějších zánětlivých revmatických onemocnění: spondyloartritidy (SpA) a revmatoidní artritidy (RA).

**Výsledky:** Prokázali jsme odlišnou expresi cirkulujících miRNA u pacientů se SpA, které se lišily podle závažnosti axiálního postižení a/nebo korelovaly s aktivitou nemoci. Míra poklesu cirkulující miR-145 v plazmě po 3 měsících léčby TNF inhibitory u pacientů s ankylozující spondylitidou predikovala dobrou terapeutickou odpověď a dosažení nízké aktivity nemoci po roce léčby. Hladiny cirkulující i buněčné miR-125b v periferních mononukleárních buňkách (PBMC) byly u neléčených pacientů s časnou RA nižší v porovnání se zdravými kontrolami a stoupaly po zahájení terapie. Exprese miR-125 v PBMC u těchto pacientů před zahájením léčby odlišovala pacienty s (ne)dostatečnou terapeutickou odpovědí. Dále jsme zjistili vyšší expresi miR-451 v PBMC u jedinců s artralgiemi v riziku rozvoje RA, která snížením proteinové exprese prozánětlivého CXCL16 pravděpodobně oddaluje manifestaci RA.

**Závěr:** Naše výsledky podporují využití cirkulujících i buněčných miRNA jako biomarkerů korespondujícími se stadiem a aktivitou nemoci a prediktorů terapeutické odpovědi u vybraných zánětlivých revmatických onemocnění, včetně jejich nejčasnějších fází.

**Klíčová slova:** miRNA, biomarker, axiální spondyloartritida, revmatoidní artritida

## **Abstract**

**Background:** MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding single-stranded RNAs involved in the posttranscriptional inhibition of gene expression and thereby regulating all cellular functions. Their dysregulation contributes to the pathophysiology of many diseases, including rheumatic diseases. MiRNAs can also be found extracellularly in body fluids and represent promising diagnostic and prognostic biomarkers. Our study aimed to investigate miRNAs as biomarkers of stage and activity and predictors of therapeutic response of two most common inflammatory rheumatic diseases: spondyloarthritis (SpA) and rheumatic arthritis (RA).

**Results:** We found several circulating miRNAs differentially expressed in SpA patients reflecting the severity of axial involvement and/or disease activity. The decrease in circulating miR-145 in plasma of patients with ankylosing spondylitis 3 months of anti-TNF therapy predicted a good therapeutic response and low disease activity after a year of therapy. Circulating and intracellular expression of miR-125b in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was lower in treatment-naïve patients with early RA than in healthy controls. Baseline expression of miR-125 in PBMC predicted a (non)adequate therapeutic response. We also found the increased expression of miR-451 in PBMC in individuals with arthralgia at risk of developing RA that subsequently reduced the expression of proinflammatory CXCL16, probably aiming to delay the development of RA.

**Conclusion:** Our data support the use of circulating and cellular miRNAs as biomarkers of the stage and activity of the disease and as predictors of therapeutic response in inflammatory rheumatic diseases, including their earliest phases.

**Key words:** miRNA, biomarker, axial spondyloarthritis, rheumatoid arthritis

## Obsah

1. ÚVOD.....	9
1.1. MiRNA.....	9
1.1.1 Biogeneze intracelulárních miRNA .....	10
1.1.2 Mechanismus regulace genové exprese pomocí miRNA.....	12
1.1.3 Cirkulující miRNA .....	13
1.1.3.1 MiRNA v tělních tekutinách.....	13
1.1.3.2 Sekreční mechanismy cirkulujících miRNA .....	15
1.1.3.3 Funkční důsledky cirkulujících miRNA a terapeutické využití.....	15
1.1.3.4 Analýza cirkulujících miRNA v praxi .....	18
1.2. Patogeneze vybraných zánětlivých onemocnění.....	20
1.2.1 Spondyloartritidy.....	20
1.2.2 Revmatoidní artritida.....	23
1.3. Cirkulující miRNA jako biomarkery revmatických onemocnění .....	27
1.3.1 Spondyloartritida.....	28
1.3.2 Revmatoidní artritida.....	29
1.3.3 Osteoartróza .....	30
1.3.4 Systémový lupus erythematoses .....	31
1.3.5 Systémová sklerodermie .....	32
1.3.6 Idiopatické zánětlivé myopatie.....	32
2. HYPOTÉZA A CÍLE.....	34
3. METODIKA A VÝSLEDKY .....	35
3.1. MiRNA a postižení páteře u pacientů s axiální spondyloartritidou .....	35
3.2. MiR-145 jako ukazatel léčebné odpovědi u pacientů s ankylozující spondylitidou .....	37
3.3. MiR-125b v predikci léčebné odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou.....	39
3.4. Význam miR-451 u jedinců v riziku rozvoje revmatoidní artritidy.....	42
4. DISKUZE .....	46

5. ZÁVĚR .....	50
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	51
7. POUŽITÁ LITERATURA .....	54
8. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	70
9. PŘÍLOHY .....	76



# 1. ÚVOD

## 1.1. MiRNA

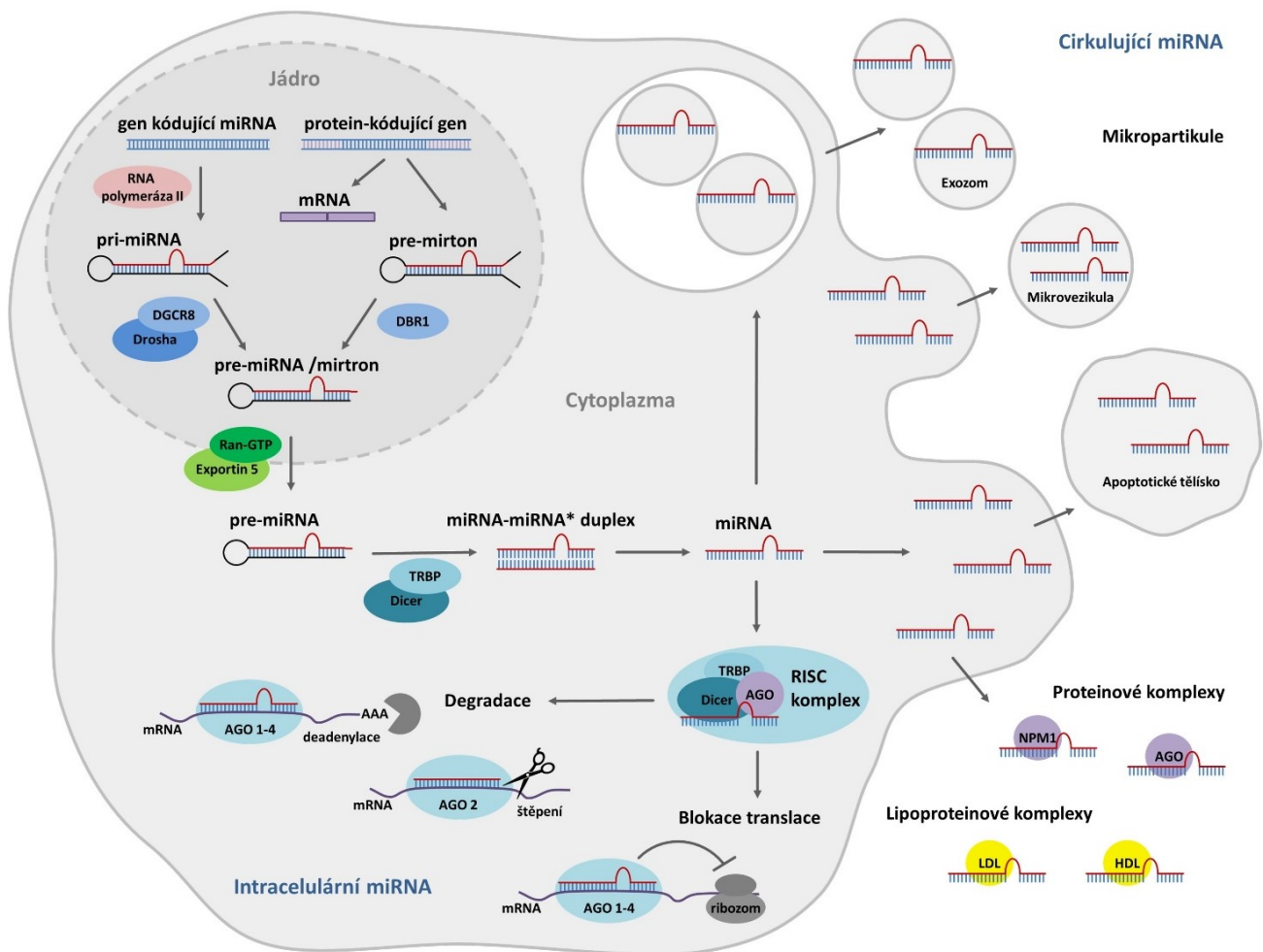
V roce 1993 byl studován gen *lin-4*, který se významně podílí na regulaci postembryonálního vývoje *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Bylo zjištěno, že gen *lin-4* namísto proteinu kóduje malou RNA komplementární k 3'UTR konci mRNA genu *lin-14*, která v rámci RNA-RNA interakce tlumí jeho translaci a brání tak progresi larválního vývoje *C. elegans* (Lee et al., 1993). Později byl u stejného modelového organismu popsán gen *let-7* kódující 21 nukleotidů dlouhou RNA ovlivňující několik genů regulujících larvální vývoj *C. elegans* (Reinhart et al., 2000). Tyto malé RNA byly později pojmenovány jako mikroRNA (miRNA) (Lagos-Quintana et al., 2001).

MiRNA jsou jednořetězcové RNA o velikosti přibližně 22 nukleotidů patřící do skupiny malých nekódujících RNA. Podílejí se na tlumení genové exprese na posttranskripční úrovni při procesu tzv. RNA interference (Filipowicz et al., 2008). Každá miRNA může ovlivňovat expresi několika genů a předpokládá se, že více než 50 % lidských genů je ovlivňováno alespoň jednou miRNA (Iorio and Croce, 2012). Změny v expresi miRNA a jejich cílových genů přispívají nejenom k udržování fyziologie buňky a organismu jako celku, ale k patofyziologii mnoha onemocnění.

MiRNA se vyskytují nejenom uvnitř buněk, ale i extracelulárně v tělních tekutinách. Značná stabilita těchto extracelulárních (cirkulujících) miRNA a jejich relativně snadná dostupnost z tělních tekutin z nich dělá potencionální diagnostické a prognostické biomarkery řady onemocnění, včetně autoimunitních (Zeng et al., 2014). V posledních letech probíhá také výzkum nových léků na bázi miRNA s využitím pro různá onemocnění, zejména rakovinné povahy (Rupaimoole and Slack, 2017).

### 1.1.1 Biogeneze intracelulárních miRNA

Vznik miRNA je poměrně složitý, několikastupňový proces (Obr. 1.1.).



**Obr. 1.1.** Biogeneze intracelulárních miRNA a sekreční mechanismy cirkulujících miRNA.

Geny pro miRNA se většinou nacházejí v oblastech nekódující DNA, mohou se však nacházet také v intronových nebo exonových oblastech jiných genů (Kabekkodu et al., 2018, Ying et al., 2010). Intronová miRNA se často nachází ve stejném primárním transkriptu jako její cílový gen. Celkové množství genů pro miRNA se liší mezi jednotlivými chromozomy a nekoreluje s jejich délkou (Ghorai and Ghosh, 2014). V jádře buňky jsou nejprve geny kódující miRNA přepsány pomocí RNA polymerázy II. Takto vzniklý až 1000 nukleotidů dlouhý primární transkript vlásečkového tvaru (pri-miRNA) je na svém 5' konci opatřen čepičkou a na druhé straně poly(A) koncem (Lee et al., 2004). Část miRNA, jejichž geny se nachází uvnitř Alu sekvencí (repetitivní sekvence DNA o délce 350 nukleotidů), mohou být přepisovány také RNA

polymerázou III (Borchert et al., 2006). Jeden primární transkript může obsahovat sekvence několika různých miRNA, hovoříme pak o tzv. klastru. Okolo 25 % genů pro miRNA je uloženo v těchto klastrech (Kabekkodu et al., 2018). V následujícím kroku je pri-miRNA štěpena pomocí nukleázy Drosha a proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) (Han et al., 2006), dohromady tvořící tzv. mikroprocesorový komplex (Gregory et al., 2004). DGCR8 se přímo váže na dvouvláknovou oblast pri-miRNA a určuje místo, kde proběhne štěpení nukleázou Drosha. Dojde tak ke vzniku 70 nukleotidové prekurzorové miRNA vlásenky (pre-miRNA) s 2-3 nukleotidovým přesahem na jedné straně (Han et al., 2006). Pre-miRNA je následně exportována ven z jádra do cytoplazmy pomocí Exportinu-5, který se váže na její nukleotidový přesah na 3' konci. K vazbě dochází pouze za přítomnosti kofaktoru Ran-GTP. V cytoplazmě interaguje pre-miRNA s enzymem Dicer kooperujícím s proteinem TRBP (the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein), které odstraní vlásenkovou smyčku a vznikne tak 20-22 nukleotidové dvojvlákno miRNA:miRNA\* (Lund et al., 2004, Kim, 2004). Následně je jedno vlákno začleněno do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který je schopen utlumovat expresi genů, zatímco druhé vlákno (passenger strand, často označováno \*) je obvykle degradováno. O tom, které vlákno zůstane a které bude degradováno, rozhoduje jejich termodynamická stabilita (Krol et al., 2010). V některých případech dojde ke vzniku zralé funkční miRNA z obou vláken (Filipowicz et al., 2008). Novější publikace používají pro odlišení jednotlivých miRNA nomenklaturu miR-3p/miR-5p. Přestože se jedná o miRNA pocházející ze stejného transkriptu, nejsou -3p a -5p navzájem plně komplementární a cílí tedy na jiné geny (Bhayani et al., 2012). Existuje několik studií popisující funkci „passenger strand“. Například u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) přispívá miR-34a\* k rezistenci synoviálních fibroblastů k apoptóze (Niederer et al., 2012). V jiné práci byl popsán opačný efekt miR-155 a miR-155\* na regulaci produkce interferonu (IFN) I plasmacytoidními dendritickými buňkami (Zhou et al., 2010).

Kromě výše popsané klasické biogeneze byl popsán způsob vzniku miRNA z intronových oblastí protein-kódujících genů. Sestřihem z intronových oblastí pre-mRNA s potenciálem tvořit vlásenky vznikne tzv. pre-mirton, ze kterého následně pomocí enzymu DBR1 (lariat debranching enzyme) vznikne mirtron vlásenkového tvaru. Mirtron je pak stejně jako pre-miRNA exportován ven z jádra pomocí Exportinu-5 a dále štěpen pomocí enzymem Dicer stejně jako konvenčně vzniklá miRNA (Okamura et al., 2007).

### 1.1.2 Mechanismus regulace genové exprese pomocí miRNA

RISC komplex má v tlumení genové exprese zásadní význam. Jeho hlavní složku tvoří proteiny z argonautové skupiny (AGO1 – AGO4). AGO obsahují dvě RNA vázající domény: PAZ (Piwi Argonaut and Zwillie protein) doména vázající se na 3'konec a Piwi (p-element induced wimply) doména interagující s 5'koncem zralé miRNA. Vazebná oblast miRNA (2-8 párů bází) směřuje ven z RISC komplexu (Pratt and MacRae, 2009) a váže se na cílovou mRNA, i když tato vazba není vždycky úplná. Komplementarita s miRNA nukleotidy 2-7 stačí k utlumení exprese cílové mRNA (Lewis et al., 2005). V případě úplné komplementarity s miRNA dojde k degradaci mRNA, v případě částečné komplementarity dojde pouze k blokadě translace mRNA. AGO2 má schopnost přímo štěpit mRNA (Filipowicz et al., 2008), zatímco AGO1, AGO3 a AGO4 tuto schopnost nemají (Kim et al., 2009). Ke štěpení mRNA obvykle dochází mezi 10. a 11. bází navázané miRNA (Pratt and MacRae, 2009). Ještě častější než přímé štěpení mRNA je snížení stability mRNA, která spočívá v deadenylaci poly(A) konce a hydrolýze 5'čepičky způsobená interakcí AGO s enzymem P-tělíska GW182 a její následné degradaci (Eulalio et al., 2009). P-tělíska jsou granulární útvary tvořené mRNA a mnohými proteiny a enzymy, které se podílí na posttranskripční regulaci genové exprese (Anderson and Kedersha, 2006). Krom funkce při tlumení exprese mRNA zajišťují AGO proteiny stabilitu miRNA a chrání jí před degradací exonukleázami (Vishnoi and Rani, 2017). Kromě výše zmíněných AGO proteinů podílejících se na regulaci pomocí miRNA a siRNA (small interfering RNA) existují ještě další dvě kategorie argonautových proteinů: Piwi, kteří regulují piRNA (piwi-interacting RNA) a argonautové proteiny specifické pro kmen červů (Tolia and Joshua-Tor, 2007). SiRNA jsou dvouvláknové RNA, které se podobně jako miRNA po navázání do komplexu RISC podílí na tlumení exprese mRNA (Tang, 2005). Hlavní rozdíl oproti miRNA je v tom, že každá siRNA má pouze jednu cílovou mRNA, se kterou tvoří úplnou vazbu, a tím dojde k jejímu štěpení (Lam et al., 2015).

Tím, jak miRNA regulují genovou expresi, zasahují prakticky do všech buněčných procesů včetně buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy (Esteller, 2011).

Expese samotných miRNA může být ovlivněna například chromosomovými abnormalitami, mutacemi v primárním transkriptu, jednonukleovým polymorfismem (SNP) nebo defekty ovlivňující proces biogeneze miRNA (například změny v aktivitě proteinů Dicer a Drosha) (Iorio and Croce, 2012). Většina miRNA slouží jako nádorové supresory, proto snížení exprese miRNA vede ke zvýšené expresi onkogenů a rozvoji malignit (Iorio and Croce, 2012).

Například u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií dochází k deleci oblasti chromozomu 13q14, která obsahuje i geny pro některé miRNA (miR-15 a miR-16) (Calin et al., 2002). Obě miR-15 a miR-16 negativně regulují antiapoptotický protein Bcl-2, a tím se podílí na indukci apoptózy. Snížení exprese těchto miRNA tak koreluje se zvýšením exprese Bcl-2 proteinu, který hraje roli v patogenezi chronické lymfatické leukemie (Cimmino et al., 2005). Rovněž epigenetické mechanismy (změny v genové expresi, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA) jako např. DNA metylace (připojení methylového zbytku na nukleovou bázi cytosin nebo adenin, které brání transkripci) nebo acetylace histonů (umožňující transkripci) ovlivňují expresi miRNA (Iorio et al., 2010). Bylo popsáno, že přibližně polovina genů pro miRNA se nachází v oblasti CpG ostrůvků, tedy oblastí s vysokým zastoupením CpG dinukleotidů náchylných k metylaci (Weber et al., 2007). Hypermetylace promotorových oblastí genů nádorových supresorů způsobí jejich útlum v rakovinných buňkách (Baylin and Jones, 2011). Nejenom metylace, ale také inhibice histonové deacetylázy může ovlivňovat expresi miRNA (Iorio and Croce, 2012). Množství miRNA pak může být ovlivněno také samotnými miRNA ovlivňujícími jejich biogenezi. Například miRNA let-7 mohou zpětně regulovat vznik nových miRNA tím, že se přímo vážou na enzym Dicer, který se podílí na biogenezi miRNA (Forman et al., 2008). Jednotlivé miRNA se dále mohou ovlivňovat i navzájem. Například myší miR-709 se v jádře buňky váže na pri-miR-15a/16-1, brání vznik pre-miR-15a/16-1, a tím potlačuje tvorbu těchto zralých miRNA (Tang et al., 2012).

Příklady regulace miRNA a jejich význam v patogenezi vybraných zánětlivých revmatických onemocnění jsou uvedeny dále v příslušných kapitolách.

### **1.1.3 Cirkulující miRNA**

#### **1.1.3.1 MiRNA v tělních tekutinách**

Dlouho byly miRNA detekovány pouze uvnitř buněk a analyzovány jejich intracelulární funkce. Velkou výzvu v oblasti výzkumu přinesl jejich objev v tělních tekutinách (Chen et al., 2008). Vzhledem k jejich dostupnosti se nabízí jejich využití jako biomarkerů a rozličné formy, které v extracelulárním prostředí zaručují jejich stabilitu, vedou k hypotézám o jejich funkci v mezibuněčné komunikaci. Přítomnost cirkulujících miRNA byla postupně popsána v séru, plazmě i v dalších tělních tekutinách (Chen et al., 2008, Mitchell et al., 2008). MiRNA v exozomech izolovaných ze slin jsou ideální neinvazivní biomarker patologii slinných žláz, například u Sjögrenova syndromu (Michael et al., 2010). MiRNA se vyskytují i v mateřském

mléce. Během prvních 6 měsíců laktace zde bylo nalezeno velké množství miRNA se vztahem k imunitě (Kosaka et al., 2010c). Přítomnost miRNA byla také popsána ve spermatu, vaginálním sekretu a menstruační krvi (Zubakov et al., 2010), dále pak v bronchoalveolární laváži, mozkomíšním moku a peritoneální tekutině, pleurálním výpotku, moči a slzách. Stanovení miRNA v slzách může pomoci v časně diagnostice glaukomu, makulární degenerace nebo malignit oka (Weber et al., 2010).

Cirkulující miRNA se vyskytují buďto v mikropartikulích (děleno podle velikosti na nejmenší exozomy o průměru 30-150nm, střední mikrovesikuly o průměru 100-1000nm a největší apoptotická tělíška s průměrem 50-5000nm), nebo jsou asociovány s proteiny vázající RNA (AGO2, NPM1-nucleophosmin), případně s lipoproteinovými komplexy (lipoproteiny s vysokou hustotou, high density lipoprotein, HDL, a lipoproteiny s nízkou hustotou, low density lipoprotein, LDL). To zajišťuje cirkulujícím miRNA vysokou stabilitu a ochranu před všudypřítomnými RNázami. Díky tomu se předpokládá, že mohou regulovat expresi genů i u vzdálených buněk a podílet se na intercelulární komunikaci (Kosaka et al., 2010a, Creemers et al., 2012, Cocucci et al., 2009). V současné době se nabízí možnost jejich terapeutického využití (Rani et al., 2015).

Přítomnost miRNA byla popsána v mikropartikulích pocházejících z různých buněčných linií, sekretované exozomy byly poprvé izolovány již v roce 1980 z ovčích retikulocytů (Pan and Johnstone, 1983). Při porovnání množství cirkulujících miRNA v supernatantech bylo prokázáno, že většina miRNA je z buňky exportována mimo exozomy (Wang et al., 2010b). Odhaduje se, že až 90 % cirkulujících miRNA je asociována s proteinovými komplexy, nejčastěji s proteinem AGO2 (Arroyo et al., 2011). Kromě AGO2 se mohou cirkulující miRNA vázat na AGO1, AGO3 a AGO4 (Turchinovich et al., 2011). Cirkulující miRNA se vyskytují také v komplexech s HDL cholesterolem (Vickers et al., 2011). U pacientů s familiární hypercholesterolémií byl rozdílný profil HDL-miRNA než u zdravých jedinců (Vickers et al., 2011). Přítomnost některých miRNA byla popsána také v komplexech s LDL cholesterolem, ale v řádově nižších koncentracích než u HDL. Nicméně například prozánětlivá miR-155 má 4x vyšší zastoupení u LDL než u HDL (Wagner et al., 2013). Dalším proteinem schopným vázat miRNA je NPM1, fosfoprotein exprimovaný proliferujícími buňkami sloužící jako regulátor exportu ribozomů (Maggi et al., 2008).

### 1.1.3.2 Sekreční mechanismy cirkulujících miRNA

Do sekrece miRNA do extracelulárního prostředí jsou zapojeny ceramid-sekreční mechanismy a enzym nSMase (neutral sphingomyelinase). Experimentální inhibice nSMase způsobuje snížení sekrece miRNA a opačně zvýšená exprese nSMase způsobuje zvýšení hladin cirkulujících miRNA (Kosaka et al., 2010b). Také bylo prokázáno, že inhibice nSMase nemá vliv na intracelulární obsah miRNA, ale ovlivňuje hladiny této miRNA v exozomech (Kogure et al., 2011). Přesné selekční mechanismy toho, jaké miRNA se dostávají z buněk do cirkulace, nejsou doposud zcela známé. Jedním z možných faktorů ovlivňující sekreci miRNA jsou postranskripční modifikace. MiRNA, jejichž 3'konec je adenylován, mají větší zastoupení uvnitř buněk, zatímco miRNA jejichž 3'konec je uridylován, se vyskytují více v exozomech (Koppers-Lalic et al., 2014). Určité sekvence miRNA (EXOmotif) mohou být rozpoznávány RNA vázajícími proteiny, které se podílí na jejich transportu do exozomů. Například protein hnRNPA2B1 v kooperaci s proteinem SUMO (proces sumoylace) se váže na GGAG oblast miRNA a pomáhá jejich transportu do mikrovezikul a dále ven z buňky (Villarroya-Beltri et al., 2013). K sekreci miRNA ale může docházet i nespecificky, například po smrti buňky (Turchinovich et al., 2013). V tom případě se miRNA dostává do cirkulace ve formě apoptotických tělísek vylučovaných buňkou během apoptózy (Zernecke et al., 2009). Existuje určitá podobnost mezi exozomy a apoptotickými buňkami. Fosfatidylserin, který se vyskytuje na povrchu apoptotických buněk a je rozpoznáván fagocyty, se vyskytuje také na povrchu exozomů (Kosaka et al., 2010a).

Existuje velký rozdíl v zastoupení miRNA vyskytujících se uvnitř mikropartikulí, nebo vázaných na proteiny: bylo zjištěno, že některé miRNA (např. let-7a) se vyskytují uvnitř mikrovesikul, některé je ale možné detekovat pouze v asociaci s proteiny (např. miR-122) (Arroyo et al., 2011). Některé miRNA byly více exprimovány v buňkách, některé v supernatantech (Valadi et al., 2007, Kogure et al., 2011) a některé miRNA byly detekovány výhradně v exozomech (Kogure et al., 2011). Rozdíly mohou být podmíněny tím, z jakých buněk jsou miRNA exportovány. Například pro játra specifická miR-122 může být exportována z hepatocytů společně s dalšími proteiny, zatímco let-7a pravděpodobně pochází z buněk produkujících mikrovesikuly (Arroyo et al., 2011).

### 1.1.3.3 Funkční důsledky cirkulujících miRNA a terapeutické využití

Experimentálně bylo prokázáno, že různé typy lidských buněk aktivně exportují miRNA ve formě mikropartikulí nebo v komplexech s proteiny a tyto miRNA mohou být dopravovány do

jiných buněk a zde být opět funkční (Wang et al., 2010b, Valadi et al., 2007, Vickers et al., 2011). B lymfocyty infikované virem Epstein-Barrové (EBV) sekretují exozomy obsahující miRNA. Tato EBV-miRNA se takto dostává do dendritických buněk, kde je schopna regulovat cílové geny (Pegtel et al., 2010). S ohledem na jejich funkce *in vitro* se nabízí i podobná funkce na úrovni organismu a využití cirkulujících miRNA v terapii např. maligních tumorů, zánětlivých revmatických onemocnění, diabetu mellitu, infekčních onemocnění a dalších. Funkční potenciál cirkulujících miRNA v cílových buňkách byl doposud prokázán pouze pro miRNA obsažené v mikropartikulích.

Bioaktivní obsah exozomů může mít imunomodulační potenciál, jak bylo prokázáno v *in vitro* experimentech transportu exosomálních miRNA z T lymfocytů do antigen prezentujících buněk, čímž dochází k ovlivnění imunitní reakce (Mittelbrunn et al., 2011). Dále se např. miRNA v exozomech uvolněných z nádorových buněk vážou na Toll-like receptory, indukují tvorbu pro-metastatických zánětlivých cytokinů s následným růstem tumorů a tvorbou metastáz, což potvrdily i *in vivo* experimenty (Fabbri et al., 2012). Potlačení růstu nádoru *in vivo* aplikací exosomů obohacených o miRNA, a tím i jejich funkci v intercelulární komunikaci, potvrdily i další studie (Iguchi et al., 2010).

Normální jaterní buňky produkují miR-26a, která se u nádorů podílí na brždění buněčného cyklu a u karcinomů je její produkce výrazně snížena. Na myším modelu bylo u nádorů po podání miR-26a pozorováno výrazné utlumení proliferace, indukce apoptózy, a tím i inhibice růstu nádoru (Kota et al., 2009).

Kromě nádorové terapie se nabízí i možnost využití miRNA také při léčbě zánětlivých revmatických onemocnění. Resistence k apoptóze je typickým znakem RA synoviálních fibroblastů (RASf) a dalších buněk podílejících se na patogenezi RA (Pope, 2002). MiR-15a se váže na mRNA antiapoptotického proteinu Bcl-2 a snížením jeho exprese tím následně indukuje apoptózu. V synoviální tkáni myši s artritidou indukovanou pomocí protilátek proti kolagenu (collagen induced arthritis, CIA) je exprese miR-15a snížena. *In vivo* aplikace této miRNA do kolenního kloubu u myšičího modelu CIA artritidy měla za následek snížení tvorby Bcl-2 a následnou indukci apoptózy v synoviální tkáni (Nagata et al., 2009). MiR-146a jako negativní regulátor imunitních dějů je zvýšeně exprimována u pacientů s RA jak lokálně (v synoviální tkáni), tak systémově (v periferních mononukleárních buňkách) (Stanczyk et al., 2008, Pauley et al., 2008). V *in vitro* experimentech byla potvrzena funkce této miRNA jako inhibitoru osteoklastogeneze (tvorby osteoklastů podílejících se na odbourávání kostní tkáně) a následně



bylo potvrzeno, že intravenózní podání miR-146a *in vivo* myším s rozvinutou CIA je chrání před destrukcí kloubu (Nakasa et al., 2011). Naopak miR-223, která je také zvýšená u pacientů s RA, diferenciaci osteoklastů stimuluje. Inhibice miR-223 u myši s CIA vedlo ke snížení tvorby kostních erozí a zmírnění lokálního zánětu (Li et al., 2012). Nižší hladiny miR-140-3p a miR-140-5p byly pozorovány v RASF i u myšího modelu CIA. Intraartikulární podání těchto miRNA u myšího modelu zmírnilo příznaky artritidy a snížilo počet synoviálních fibroblastů. Zároveň u synoviálních fibroblastů tyto miRNA indukovaly apoptózu a naopak potlačily proliferaci a migrační schopnosti (Peng et al., 2016).

U myšího modelu systémového lupusu se splenomegalií byly u B a T lymfocytů popsány vyšší hladiny miR-21, která je známá jako regulátor apoptózy a buněčné proliferace. *In vivo* inhibice této miRNA měla za následek zmenšení sleziny a potlačení autoimunitních projevů tohoto onemocnění (Garchow et al., 2011).

Terapeutické využití miRNA se nabízí i u diabetu mellitu, kde se např. miR-103 a miR-107 podílejí na regulaci inzulínové senzitivity tím, že snižují citlivost na inzulín a zvyšují produkci glukózy v játrech. *In vivo* podání miR-107 zhoršuje glukózovou toleranci a inzulínovou senzitivitu, zatímco podání inhibitorů těchto miRNA vede ke stabilizaci inzulínového receptoru, posílení signálních drah a zvýšení vychytávání glukózy stimulované inzulínem u obézních myši (Trajkovski et al., 2011).

Průlom ve využití miRNA v terapii bylo klinické hodnocení fáze II (NCT01200420) u pacientů s chronickou hepatitidou C, které testovalo bezpečnost, tolerabilitu, farmakokinetiku a antivirovou aktivitu antagonisty miR-122 s cílem léčby hepatitidy C (Janssen et al., 2013, Ottosen et al., 2015). Toto klinické hodnocení vycházelo z esenciální role jaterní miR-122 v replikaci viru hepatitidy C (HCV) a inhibice replikace viru a zlepšení jaterní léze u *in vivo* modelu (Jopling et al., 2005, Jopling et al., 2008, Lanford et al., 2010). V roce 2005 bylo zjištěno, že lidské jaterní buňky obsahují zvýšené množství miR-122 a inaktivace této miRNA snížila množství RNA HCV o 80 % (Jopling et al., 2005). O 4 roky později studie na šimpanzích potvrdila, že blokáce miR-122 vede k potlačení virulence HCV (Lanford et al., 2010). *In vitro* studie na lidských buněčných kulturách s použitím blokátoru miR-122 (Miravirsenu) potvrdila jeho antivirový efekt na HCV, a to jak samostatně, tak v kombinaci s dalšími dostupnými antivirovými látkami (Ottosen et al., 2015). Klinické hodnocení u pacientů s chronickou HCV infekcí již dříve potvrdilo, že podání Miravirsenu je bezpečné a že po jejím podání dochází k redukci HCV RNA (Janssen et al., 2013).

#### 1.1.3.4 Analýza cirkulujících miRNA v praxi

I přes značné pokroky v poznání cirkulujících miRNA je jejich využití jako biomarkerů ovlivňováno mnoha faktory zahrnující odběr a zpracování biologického materiálu, metodu izolace RNA, normalizaci, metody detekce a analýzu naměřených dat. Metodika jejich zpracování je doposud nejednotná a je předmětem dalších diskusí.

##### Preanalytická fáze

MiRNA se vyskytují jak v séru, tak plazmě a jejich hladiny spolu při správném zpracování navzájem korelují (Mitchell et al., 2008). Krevní vzorky se doporučuje zpracovat nejpozději 4 hodiny po odběru. Pro odběr plazmy není možné používat heparinové zkumavky, neboť by mohlo dojít k inhibici polymerázové řetězové reakce (PCR) (Kroh et al., 2010).

Cirkulující miRNA se vyznačují velkou stabilitou. Stabilita v plazmě byla potvrzena u vzorků opakovaně rozmrazených i u vzorků ponechaných 24 hodin při laboratorní teplotě (McDonald et al., 2011). U vzorků plazmy ponechaných 2 týdny při 4°C nebo 5 let při -20°C již došlo k degradaci miRNA. Nicméně miRNA z izolovaných exozomů zůstala i po 5 letech skladování nezměněná. Stejně tak opakované zamrazování a rozmrazování plazmy mělo výrazně menší vliv na koncentraci miRNA z izolovaných exozomů než na koncentraci miRNA izolovaných přímo z plazmy (Ge et al., 2014). Také sérové miRNA byly schopny odolat opakovanému rozmrazování (10x), varu a nízkému a vysokému pH, aniž by se lišily od miRNA z neošetřených sér (Chen et al., 2008). V jiném experimentu byla stabilita sérových miRNA u vzorků ponechaných 4 hodiny při laboratorní teplotě, ale u vzorků 2x zamrazených a rozmrazených již ke změně došlo (Gilad et al., 2008). V synoviální tekutině byla potvrzena stabilita miRNA u vzorků uchovávaných 7 dní při -20°C, ale opakované zamrazování a rozmrazování mělo vliv na stabilitu miRNA (Murata et al., 2010).

Buněčná kontaminace séra nebo plazmy má velký vliv na hladiny miRNA. Proto je vhodné při zpracování plazmy vzorky krve centrifugovat raději 2x. U vzorků srážlivé krve tento problém odpadá (Blondal et al., 2013). Vyšší koncentrace vybraných miRNA byly popsány v plazmě v porovnání se sérem. Při dalším stočení plazmy došlo však k redukci těchto miRNA, což poukazuje na to, že vyšší hladiny mohly být způsobeny právě buněčnou kontaminací (McDonald et al., 2011).

Hemolýza zvyšuje množství některých miRNA v cirkulaci, například miR-15b, miR-16 a miR-451 (McDonald et al., 2011, Kirschner et al., 2011). Exprese miR-16 a miR-451 se u některých

hemolyzovaných vzorků až 8x zvýšila (Kirschner et al., 2011). Proto je vhodné případnou hemolýzu u vzorků séra a plazmy sledovat. Nejjednodušší metodou je spektrofotometrické stanovení oxyhemoglobinu (absorpční maximum při 414nm) (Blondal et al., 2013). Další možností je sledování hladin miRNA, které regulují vývoj erytrocytů, například miR-144 a miR-451 (Rasmussen et al., 2010). Vhodné je porovnání hladin miR-451 například s miR-23a, která není ovlivňována hemolýzou. Výrazně vyšší hladiny miR-451 než miR-23a (delta Ct miR-23a-miR-451 větší než 8) značí vysoké riziko hemolýzy (Blondal et al., 2013). Další miRNA, která není ovlivněna buněčnou kontaminací, je miR-122 (Pritchard et al., 2012).

#### Normalizace miRNA mezi vzorky

I při použití stejného množství výchozího materiálu se množství celkové izolované RNA může značně lišit, a proto je potřeba použít vhodnou kontrolu pro normalizaci jejich hladin. Při stanovení buněčných miRNA je možné pro normalizaci použít nekódujících malých RNA molekul MammU6, RNU24, RNU43, RNU44, RNU48 nebo RNU6B, které se vyskytují v jádře buňky. Jejich přítomnost v séru nebo plazmě však není stabilní, a proto se nedají použít pro normalizaci miRNA v tělních tekutinách (Wang et al., 2012b, Turchinovich et al., 2011). Jako vhodná alternativa se jeví použití syntetických miRNA jiných živočišných druhů (např. *C. elegans*), které se přidávají do vzorků vyšetřovaného materiálu v průběhu procesu izolace RNA. Sekvence těchto miRNA se totiž neshodují s žádnou jinou miRNA v lidském organismu (Mitchell et al., 2008). Další možností je použít miRNA, která se běžně vyskytuje ve vzorcích a jejíž koncentrace je mezi vzorky neměnná. Například miR-16 a miR-223 jsou obě stabilně exprimovány ve vysokých koncentracích v séru i plazmě (Kroh et al., 2010), některé práce nicméně ukázaly, že hladiny miR-16 mohou být značně ovlivněny hemolýzou (McDonald et al., 2011, Kirschner et al., 2011). Další možností je normalizovat k průměru více naměřených miRNA. U sérových vzorků pacientů s RA byla použita např. normalizace k průměru 6 miRNA (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-24, miR-181d, miR-15b a miR-125b) (Duroux-Richard et al., 2014).

Je pravděpodobné, že stanovení miRNA uvnitř mikropartikulí nebo vázaných na proteiny vyžaduje rozdílný způsob normalizace (Creemers et al., 2012). Každý z doposud využívaných způsobů normalizace má svá úskalí a ideální způsob normalizace cirkulujících miRNA stále chybí.

## Metody detekce

MiRNA je možné izolovat společně s RNA metodou fenol-chloroformové extrakce (Filkova et al., 2014) nebo použitím komerčních kitů. Pro studium exprese miRNA existují 3 hlavní způsoby detekce: PCR, čipy a sekvenování. PCR je v současné době nejrozšířenější metoda detekce miRNA (Mi et al., 2013). PCR reakci předchází reverzní transkripce, kdy je RNA přepsána do cDNA (complementary DNA). Jednotlivé úseky cDNA jsou následně namnoženy pomocí DNA polymerázy a získaná cDNA je kvantifikována metodou PCR se specificky značenou fluorescenční sondou. Výsledný nárůst fluorescence je možné porovnat s hladinami miRNA vybraných pro normalizaci. Nevýhoda této senzitivní metody je nákladné vybavení a vysoká cena fluorescenčně značených sond. V případě využití čipů (microarrays) sondy imobilizované na povrchu čipu hybridizují s fluorescenčně značenou komplementární miRNA. Tato metoda umožňuje analýzu většího počtu vzorků najednou, nevýhodou kromě vysokých nákladů je větší náchylnost k chybám. Metody založené na sekvenování jsou velice časově i finančně náročné. Sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS) je moderní vysokokapacitní metoda, která je schopná určit až miliony sekvencí. Tato metoda pomohla objevit sekvence několika nových miRNA, nicméně nevýhodou zůstává její finanční nákladnost (Bartošík and Jiráková, 2018, de Planell-Saguer and Rodicio, 2013).

## 1.2. Patogeneze vybraných zánětlivých onemocnění

### 1.2.1 Spondyloartritidy

Spondyloartritidy (SpA) představují skupinu chronických zánětlivých onemocnění postihující axiální skelet (páteř, sakroiliakální skloubení), periferní klouby, enteze a mají řadu mimokloubních projevů (např. psoriáza, uveitida, idiopatický střevní zánět). Klasifikace axiálního postižení (AxSpA) rozlišuje pacienty a) s radiografickou formou (r-AxSpA) s rentgenologicky detekovatelnými změnami v oblasti sakroiliakálního kloubu a páteře (tzv. syndesmofyty), kam zařazujeme i pacienty s nejčastější ankylozující spondylitidou (AS), a b) pacienty s neradiografickou axiální spondyloartritidou (nr-AxSpA) se sakroiliitidou detekovatelnou pouze pomocí magnetické rezonance (MRI). Nemoc se obvykle projeví ve třetí dekádě života pacienta a postihuje častěji muže než ženy (Sieper and Poddubnyy, 2017).

Přesné mechanismy patogeneze SpA nejsou zcela známy, pravděpodobně se jedná o kombinaci vlivů vnějšího prostředí (např. častý mechanický stres způsobující mikroskopické poškození

tkání) a genetické predispozice (Watad et al., 2018). Existuje několik genů asociovaných s rozvojem AS, nejznámější je asociace s antigenem HLA-B27 (human leukocyte antigen B27). Antigen HLA-B27 je přítomen přibližně u 90 % pacientů s AS, zatímco ve zdravé populaci se jeho výskyt pohybuje v rozmezí 6-8 % (Bowness, 2015). HLA molekuly prezentují antigeny T lymfocytům. Existuje několik teorií, jak se HLA-B27 podílí na patogenezi AxSpA, mezi nimi hypotézy o prezentaci tzv. artritogenního peptidu CD8+ T lymfocytům, možná je i akumulace HLA-B27 molekul v endoplazmatickém retikulu, vznik HLA-B27 homodimeru na povrchu buňky, které aktivují CD8+ T lymfocyty a NK buňky ke zvýšené produkci interleukinu (IL)-23 a IL-17, nebo selhání prezentace mikrobiálního antigenu molekulou HLA-B27. S tím může souviset dysbióza střevního mikrobiomu jako důsledek poruchy slizniční imunity případně zvýšené propustnosti střevní bariéry přispívající ke zvýšené produkci IL-23 slizniční stěnou (Pedersen and Maksymowych, 2019). Rozsáhlé asociační studie odhalily další polymorfismy ve vztahu rozvoji nemoci, dobře známá je například spojitost s geny receptoru pro IL-23 (*IL-23R*) nebo aminopeptidázu endoplazmatického retikula (*ERAPI*), který se podílí na zpracování antigenů před vazbou na HLA molekuly (International Genetics of Ankylosing Spondylitis et al., 2013).

U pacientů se SpA dochází k hlavnímu zánětlivému procesu v oblasti entezí a přilehlé kosti. Zánětlivý infiltrát s osteoklasty iniciují lokální zánět kosti, který způsobí erozi a destrukci kosti, následně je zánětlivá tkáň nahrazena pomocí osteoblastů novou kostí (Lories et al., 2009). V místě zánětu tvoří dendritické buňky a makrofágy cytokin IL-23, který spolu s ostatními prozánětlivými cytokiny IL-1, IL-6, IL-21 a transformujícím růstovým faktorem  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zvyšuje expresi IL23R a aktivaci Th17 lymfocytů. Th17 lymfocyty spolu s  $\gamma\delta$ -T lymfocyty, neutrofilů a mastocytů produkují IL-17, ale také IL-22 a tumor nekrotizující faktor (TNF)  $\alpha$ . IL-17 se podílí na migraci neutrofilů a podporuje tvorbu chemokinů (IL-8, CXCL1), prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6) a granulocyty a makrofágy stimulující faktoru (GM-CSF), podílející se také na kostní remodelaci. Dochází tak ke zvýšené aktivitě osteoklastů, které se podílí na kostní resorpci. Jako reparativní proces sekundárně po proběhlém zánětu, nebo nezávisle na něm, dochází ke zvýšené aktivitě osteoblastů a kostní novotvorbě (Pedersen and Maksymowych, 2019, Ranganathan et al., 2017, Watad et al., 2018). Na zvýšené diferenciaci osteoblastů a tvorbě kostních výrůstků osteofytů se podílí také Wnt (wingless/Int-1) signální kaskáda (Corr, 2014). U více než poloviny pacientů se SpA jsou pozorovány mikroskopické známky střevního zánětu. V zánětlivé střevní sliznici se nachází zvýšené množství T lymfocytů a přirozených lymfoidních buněk typu 3 (ILC3), které po stimulaci IL-

23R zvýšeně tvoří IL-17, který výše popsanými mechanismy podporuje vznik chronického zánětu (Watad et al., 2018).

Stejně jako u řady onemocnění se i na patogenezi AxSpA podílí miRNA. MiR-130a přímo snižuje expresi TNF $\alpha$ . V periferních mononukleárních buňkách (PBMC) pacientů s AS byla popsána zvýšená exprese histon deacetylázy (HDAC) 3, která epigeneticky snížením acetylace histonů v promotoru snižuje expresi miR-130a, a tím nepřímo zvyšuje expresi TNF $\alpha$  (Jiang and Wang, 2016). Th17 lymfocyty pacientů s AS mají vyšší expresi miR-10b. Experimentálně zvýšená exprese této miRNA u CD4+ T lymfocytů snížila produkci IL-17A. Později bylo zjištěno, že miR-10b přímo inhibuje expresi genu enzymu MAP3K7 (mitogene-activated protein kinase kinase kinase 7) u CD4+ T lymfocytů, a tím snižuje produkci IL-17A, který se podílí na patogenezi AS (Chen et al., 2017). MiR-22-5p a miR-675-5p snižují expresi IL-17A a IL-23, naopak inhibice těchto miRNA zvyšuje expresi IL-17A a v případě miR-22 i expresi IL-23 (Zhang et al., 2020). MiRNA se podílí i na kostní remodelaci. RANKL- indukovaná osteoklastogeneze *in vitro* vedla ke zvýšené expresi miR-21. Po redukci exprese miR-21 došlo ke zvýšení exprese supresoru osteoklastogeneze PDCD4 (programmed cell death protein 4), a tím k potlačení osteoklastogeneze (Sugatani et al., 2011). MiR-29a přímo snižuje expresi genů proteinů DKK1 (dickkopf-related protein 1) a GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 beta), čímž aktivuje Wnt signální kaskádu, a tím dochází k podpoře osteoblastogeneze a následné kostní novotvorbě (Li et al., 2015).

Zánětlivé změny v oblasti sakroiliakálního skloubení u pacientů s AxSpA probíhají dlouho předtím, než je možné pozorovat změny na rentgenu. Klasifikace AS splněním modifikovaných Newyorských klasifikačních kritérií (van der Linden et al., 1984), která jsou založena na přítomnosti rentgenologických známek sakroiliitidy, je tak diagnózou pozdní. S cílem časně detekce a klasifikace AxSpA byla zavedena nová ASAS (Assessment of Spondyloarthritis International Score) klasifikační kritéria (Rudwaleit et al., 2009b), která využitím MRI pokrývají i časné formy nemoci (nr-AxSpA). Kratší doba trvání onemocnění, mladší věk pacienta, vyšší hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) a aktivní sakroiliitida jsou u pacientů s nr-AxSpA asociovány s lepší odpovědí na anti-TNF léčbu (Sieper et al., 2013, Dougados et al., 2014). Časná diagnostika, monitorování aktivity nemoci a predikce odpovědi na léčbu jsou klíčová pro úspěšné zvládnutí nemoci. U AxSpA bylo popsáno mnoho potencionálních biomarkerů, nicméně v běžné praxi se skutečně využívají pouze dva laboratorní parametry. Při stanovení diagnózy je využívána detekce antigenu HLA-B27, zatímco CRP slouží

k monitorování aktivity nemoci (Prajzlerova et al., 2016). Jako klinický biomarker aktivity se považuje i průkaz sakroiliitidy na MRI (Rudwaleit et al., 2009a).

Základem nefarmakologické léčby AS je každodenní cvičení za účelem zabránění ztuhnutí páteře a zmírnění bolesti. Lékem první volby pak jsou nesteroidní antirevmatika (NSA), které snižují bolest a ztuhlost, a některé zdroje uvádí i jejich vliv na zpomalení rentgenové progresy. Základem moderní léčby u pacientů s vysokou aktivitou nemoci, u kterých selhala klasická léčba, je biologická terapie pomocí inhibitorů TNF $\alpha$  (etanercept, infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab pegol) a IL-17 (secukinumab a ixekizumab). Syntetické choroby modifikující antirevmatické léky (DMARD) jsou vhodné pouze u pacientů s postižením periferních kloubů (Braun et al., 2011). V posledních letech se zkouší inhibitory JAK/STAT signalizační kaskády (JAKinibs) (Hammitzsch et al., 2020). Pro hodnocení aktivity nemoci se používá skóre BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), případně ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) a hodnota CRP. Za dobrou odpověď na léčbu je považováno alespoň 50% redukce skóre BASDAI nebo absolutní změna skóre o 2 body (Braun et al., 2011).

### 1.2.2 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění postihující typicky malé klouby rukou vedoucí v důsledku progresivní destrukce k postupné ztrátě jejich funkčnosti a snížení kvality života pacientů. Výskyt RA se v evropské a severoamerické populaci pohybuje mezi 0,5-1 % a postihuje až 3x častěji ženy než muže (Alamanos and Drosos, 2005). Vývoj RA je několikastupňový proces. Nejprve dojde vlivem environmentálních rizikových faktorů u geneticky predisponovaných jedinců k indukci autoimunitních procesů a produkci autoprotilátek (např. revmatoidních faktorů, RF nebo protilátek proti citrulinovaným proteinům, ACPA), následně k rozvoji symptomů (artralgie, ranní ztuhlost), pod vlivem spouštěče k indukci zánětu v synoviální tkáni a až posléze k manifestaci artritidy (Raza et al., 2016).

Riziko vzniku RA je spojeno s polymorfismy různých genů. V minulosti byla jako nejznámější popsána spojitost s genem *HLA-DRB1*, který kóduje tzv. sdílený epitop a podílí se na prezentaci antigenů T lymfocytům a má nejtěsnější vazbu k patogenezi RA, zejména ACPA pozitivní

formy (Weyand et al., 1992). Později byla prokázána spojitost RA s geny pro *TNF $\alpha$* , *PADI4*, *PTPN22*, *STAT4*, *CD244* a *CTLA4* (Mohan et al., 2014).

Hlavní environmentální rizikový faktor pro rozvoj RA je kouření (Sugiyama et al., 2010, Kallberg et al., 2011). Cigaretový kouř obsahuje až 4000 toxických látek, ovlivňuje buňky imunitního systému, mění produkci cytokinů a navozuje oxidativní stres. U kuřáků je také zvýšené množství sérového fibrinogenu, jehož citrulinované formy se u pacientů v RA nachází v synoviální tkáni (Baka et al., 2009). Vlivem kouření dojde v důsledku apoptózy s následným uvolněním iontů kalcia a aktivací peptidylarginin-deimináz (PAD) ke zvýšené citrulinaci proteinů v bronchoalveolární tekutině i v tkáních plic (Catrina et al., 2014). Posttranslační úpravy proteinů (např. citrulinace a karbamylace) se podílí na imunopatologickém zánětu, citrulinace se navíc podílí i na normálních fyziologických procesech. Karbamylované a citrulinované proteiny mohou být prezentovány vázané na molekulu HLA-DRB1 autoreaktivním T lymfocytům, nebo se mohou vázat na autoreaktivní B lymfocyty a způsobit jejich diferenciaci v plazmatické buňky tvořící autoprotilátky proti karbamylovaným proteinům a ACPA (Pruijn, 2015). Autoprotilátky v krvi asymptomatických jedinců se vyskytují již několik let před tím, než dojde k rozvoji RA (Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003). Navíc bylo popsáno, že ACPA pozitivní jedinci mají až 8x vyšší riziko rozvoje RA v porovnání se seronegativními jedinci a u 50 % ACPA pozitivních jedinců dojde k rozvoji artritidy do 2 let (Ten Brinck et al., 2017). Přesný spouštěcí faktor vedoucí k manifestaci RA není znám, nicméně v úvahu přichází infekce, např. EBV (Balandraud et al., 2004).

Typickým patogenetickým znakem RA je synovitida. V počáteční fázi artritidy dojde v synoviální tkáni k aktivaci dendritických buněk a makrofágů a tvorbě prozánětlivých cytokinů např. *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-18* a dalších. Chemotaktickým vlivem dojde k následné migraci dalších imunitních buněk (T lymfocytů) do synoviální tkáně (McInnes and Schett, 2007). V další fázi se T lymfocyty po aktivaci pomocí dendritických buněk diferencují na Th1 a prozánětlivé Th17 lymfocyty. Zároveň vlivem *TNF $\alpha$*  dochází u RA k tlumení aktivity regulačních T lymfocytů (Treg), které za normálních podmínek tlumí Th1 a Th17 lymfocyty. V počáteční fázi se uplatňuje také komplementový systém, který cytotoxicky poškozuje synoviální výstelku. Zároveň NK buňky a neutrofile pomocí netózy, při které tvoří síť rozvolněného chromatinu s navázanými enzymy, narušují synoviální tkáň. B lymfocyty se v zánětlivé synovii diferencují na plazmatické buňky, které produkují autoprotilátky proti citrulinovaným a karbamylovaným proteinům a proti Fc fragmentu imunoglobulinových molekul. Tyto protilátky představují výše zmíněné RF. Postupně dojde k chronickému zánětu



poškozujícímu celou kloubní výstelku. Th1 lymfocyty produkují  $\text{IFN}\gamma$ , který aktivuje makrofágy, synoviální fibroblasty a endotelové buňky, dochází k produkci dalších zánětlivých cytokinů  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 a IL-1 $\beta$  (Andersson et al., 2008). Synoviální fibroblasty pod vlivem těchto zánětlivých cytokinů produkují zvýšené množství matrixových metaloproteináz MMP1 a MMP3, proteolytických enzymů podílejících se na degradaci kolagenu, a tím ke ztrátě chrupavky (Ainola et al., 2005). Zároveň u fibroblastů tyto cytokiny indukují expresi proteinu RANKL, který aktivuje osteoklastogenezi a následnou kostní resorpci, na které se podílí osteoklasty vylučované enzymy například katepsin K a tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP) (Tateiwa et al., 2019). Samotné synoviální fibroblasty se podílí na rozvoji RA i nezávisle na T lymfocytech. *In vivo* aplikace RASF imunodeficientním myším způsobuje poškození chrupavky (Müller-Ladner et al., 1996). Později bylo u myšího modelu prokázáno, že implantované RASF jsou schopny aktivně migrovat krevním řečištěm do vzdálených chrupavek a ty následně poškozovat. Naopak fibroblasty od zdravých jedinců nebo pacientů s osteoartrózou (OA) tuto migrační schopnost neměly (Lefèvre et al., 2009).

Epigenetické mechanismy se velkou měrou podílí na patogenezi RA. U RA pacientů byla popsána snížená metylace DNA T lymfocytů, B lymfocytů, monocytů i synoviálních fibroblastů a naopak zvýšená metylace DNA Treg. Změněná aktivita HDAC, která brání transkripci genů byla popsána u PBMC i v synoviální tkáni pacientů s RA, zvýšená acetylace pak byla pozorována u synoviálních fibroblastů (Ospelt et al., 2017). Mezi epigenetické mechanismy patří i působení miRNA (Ospelt et al., 2017, Mousavi et al., 2018). U synoviálních fibroblastů stimulace cytokiny  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  a lipopolysacharidem (LPS) zvyšuje expresi miR-155, která následně redukuje hladiny MMP1 a MMP3 podílející se na destrukci kloubů (Stanczyk et al., 2008). V synoviální tekutině a u CD14+ makrofágů byly zvýšené hladiny miR-155 asociovány se sníženou expresí enzymu SHIP1, který slouží jako inhibitor zánětu. MiR-155 se tak podílí na produkci prozánětlivých cytokinů (Kurowska-Stolarska et al., 2011). Myši s utlumenou expresí miR-155 vykazovaly rezistenci k vývoji CIA. Došlo u nich k potlačení diferenciaci Th17 lymfocytů, a tím snížení tvorby IL-17 a  $\text{IFN}\gamma$  a také ke snížení diferenciaci autoreaktivních B a T lymfocytů, čímž došlo k inhibici zánětu (Kurowska-Stolarska et al., 2011, Blüml et al., 2011). V makrofázích a monocytech byla prokázána protizánětlivá role miR-146a, protože miR-146a snižuje expresi prozánětlivých proteinů (IRAK1, IRAK2 a TRAF6) (Hou et al., 2009). Intravenózní podání miR-146a u myši s CIA vedlo k inhibici osteoklastogeneze, a tím mírnilo kloubní destrukci (Nakasa et al., 2011). Stimulace synoviálních fibroblastů pomocí  $\text{TNF}\alpha$  indukovala expresi miR-18a. MiR-18a následně u fibroblastů zvyšuje produkci

prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 a enzymu MMP1 a tím se podílí na destrukci chrupavky (Trenkmann et al., 2013). MiR-124 přímo tlumí expresi transkripčního faktoru NFATc1, který se podílí na diferenciaci osteoklastů. Lokální injekční podání prekurzoru pre-miR-124 krysám s indukovanou artritidou snížila množství NFATc1 v synoviální tkáni a zmírnila příznaky nemoci (Nakamachi et al., 2016). Zvýšená exprese miR-124 tlumí expresi chemokinu MCP1 a enzymu CDK2, čímž snižuje proliferaci synoviálních fibroblastů (Nakamachi et al., 2009). Další miRNA se vztahem k osteoklastogenezi je miR-223, jejíž zvýšená exprese byla popsána v synoviální tkáni RA pacientů (Shibuya et al., 2013). MiR-223 tlumí expresi proteinu NF-1A, který fyziologicky blokuje diferenciaci osteoklastů. Utlumení exprese této miRNA u myši s CIA způsobilo utlumení osteoklastogeneze a následné snížení tvorby kostních erozí (Li et al., 2012). U T lymfocytů pacientů s RA miR-223 tlumí expresi protizánětlivého IL-10 (Lu et al., 2014). MiR-137 je zvýšené exprimovaná v synoviálních fibroblastech v experimentálním modelu krys s indukovanou artritidou. Bylo zjištěno, že miR-137 přímo reguluje expresi chemokinu CXCL12, silného chemoatraktantu zapojeného do patogeneze RA, a tím snižuje proliferaci a migraci fibroblastů (Du et al., 2018). Další miRNA, která je schopná snížit proliferaci a zvýšit apoptózu RASF, je miR-212-3p. Tato miRNA, jejíž snížená exprese byla pozorována v séru i synoviální tkáni RA pacientů, tlumí expresi SOX5, který se podílí na vzniku kostních erozí (Liu et al., 2018). Hladiny miR-29a byly sníženy v séru i RASF. Bylo zjištěno, že tato miRNA v synoviálních fibroblastech tlumí proliferaci, indukuje apoptózu a snižuje expresi zánětlivých cytokinů tím, že tlumí expresi transkripčního faktoru STAT3, který naopak u synoviálních fibroblastů zvyšuje proliferaci a inhibuje apoptózu (Liu et al., 2017). Již dříve bylo zmíněno, že také miR-34a\* přispívá k rezistenci synoviálních fibroblastů k apoptóze. MiR-34a\* cílí na inhibitor apoptózy XIAP, který blokuje kaspázy účastníci se procesu apoptózy (Niederer et al., 2012).

Dříve používaná klasifikační kritéria Americké koleje revmatologů (ACR) z roku 1987 (Arnett et al., 1988) nebyla vhodná pro odhalení časným stádií nemoci. Nová klasifikační kritéria Evropské ligy proti revmatismu (EULAR) a ACR z r. 2010 (Aletaha et al., 2010) umožňují stanovení diagnózy již v časných stádiích nemoci.

Základem v přístupu k pacientům s RA je nejenom časná diagnóza, ale i časné zahájení léčby. Časné zahájení terapie pomocí DMARDs výrazně snižuje aktivitu nemoci a zpomaluje progresi z časně RA do etablovaného stádia RA (Nell et al., 2004). Koncept adjustace léčby s ohledem na aktivitu a individuální charakteristiky pacienta s cílem dosažení remise nebo alespoň nízké aktivity nemoci je označován jako tzv. léčba k cíli (treat-to-target) (Smolen et al., 2020).

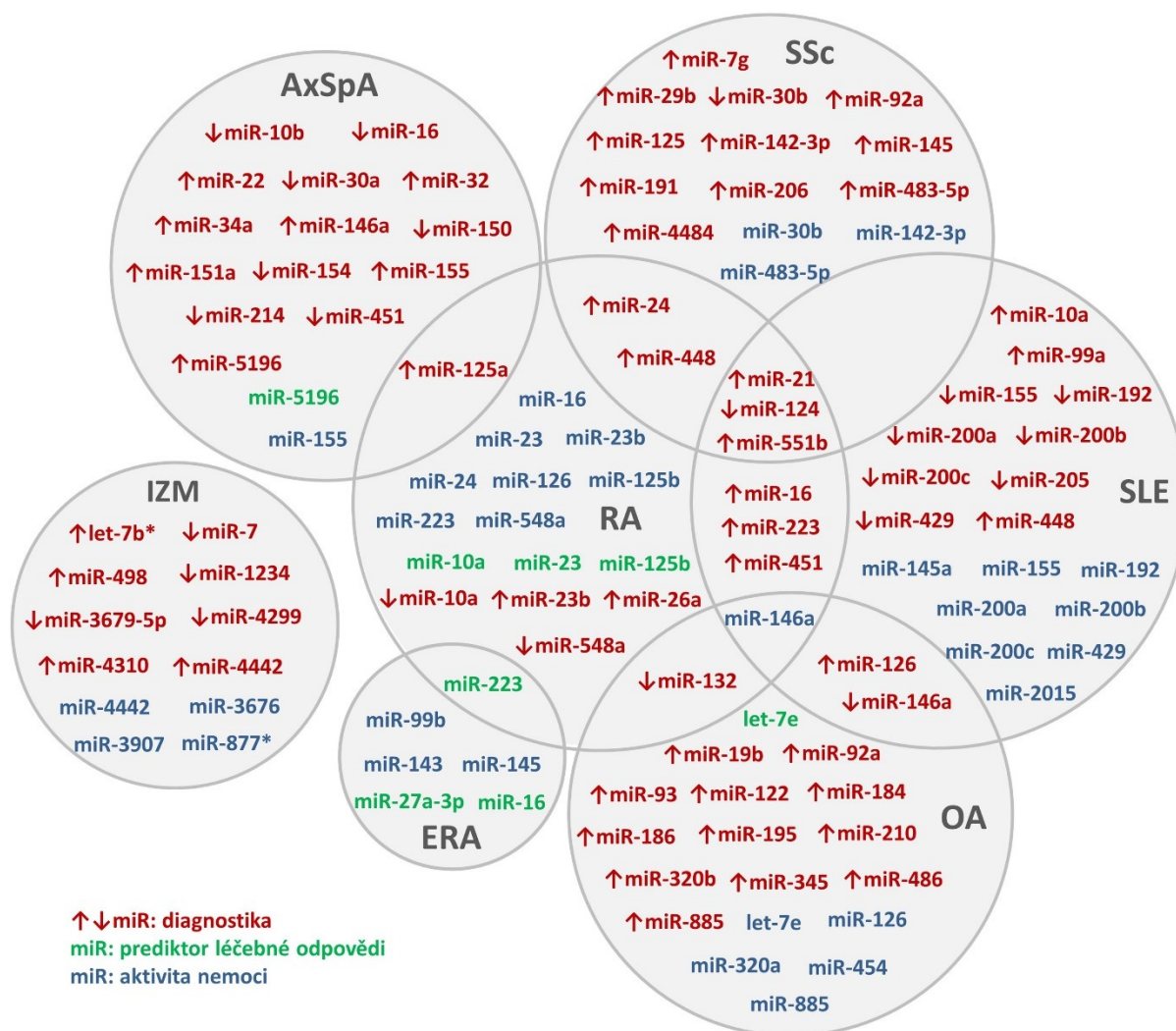
K hodnocení aktivity nemoci se používají kompozitní indexy aktivity, nejčastěji DAS28 (Disease Activity Score of 28 joints) nebo SDAI (Simply Disease Activity Index) (Smolen et al., 2020).

Základem léčby RA je terapie konvenčními syntetickými DMARD (csDMARD), přičemž jako kotevní lék slouží methotrexát, při nedostatečném efektu posléze biologická léčba (bDMARD) nebo léčba nejnovější skupinou cílených syntetických DMARD (tsDMARD), kam patří inhibitory Janusových kináz (JAK). Biologické DMARD inhibují TNF $\alpha$  (viz výše), receptor pro IL-6 (IL-6R inhibitory tocilizumab, sarilumab), dále CD20 (rituximab blokuje B lymfocyty) nebo CTLA4 (abatacept tlumí aktivaci T lymfocytů). Systémové glukokortikoidy používáme po co nejkratší dobu zejména v úvodu léčby nebo při relapsech nemoci. Součástí běžné praxe je intraartikulární podání glukokortikoidů.

V posledních letech roste úsilí o farmakologickou prevenci vzniku RA nebo alespoň oddálení její manifestace (Cope, 2017). První výsledky ukazují, že podání rituximabu ACPA pozitivním jedincům ještě před vznikem artritidy oddálí její manifestaci o jeden rok (Gerlag et al., 2019). S cílem sjednocení charakteristiky jedinců v riziku vzniku RA pro účely těchto „preventivních“ klinických hodnocení byla vytvořena kritéria jedinců s artralgiemi s rizikem rozvoje RA, tzv. klinicky suspektní artralgie (clinically suspect arthralgia, CSA). Tato kritéria jsou založena na klinické charakteristice bez ohledu na ACPA pozitivitu (van Steenbergen et al., 2017).

### **1.3. Cirkulující miRNA jako biomarkery revmatických onemocnění**

Funkce intracelulárních miRNA i jejich využití jako biomarkerů revmatických onemocnění byla popsána v mnoha publikacích, ale u cirkulujících miRNA je odborných prací výrazně méně. V této kapitole uvádíme přehled cirkulujících miRNA popsaných jako biomarkery u jednotlivých onemocnění, kde mohou sloužit v diagnostice, jako parametry odrážející aktivitu nemoci nebo odpovědi na léčbu (Obr. 1.2.).



**Obr. 1.2.** Schématické znázornění cirkulujících miRNA popsanych jako biomarkery revmatických onemocnění. RA; revmatoidní artritida, OA; osteoartróza, SLE; systémový lupus erythematoses, SSc; systémová sklerodermie, AxSpA; axiální spondyloartritidy, IZM; idiopatické zánětlivé myopatie.

### 1.3.1 Spondyloartritida

Základní charakteristika SpA byla popsána výše.

Zvýšené hladiny miR-146a a miR-155 popsané v séru pacientů s AS mohou na základě ROC (receiver operating characteristic) analýzy sloužit jako diagnostický biomarker schopný odlišit pacienty s AS od zdravých kontrol (ZK) (Qian et al., 2016). Sérové hladiny miR-214 byly naopak nižší u AS pacientů v porovnání se ZK (Kook et al., 2019). V plazmě pacientů s AS byly popsány miRNA se zvýšenou (miR-32, miR-34a, miR-146a-5p, miR-125a-5p, miR-151a-

3p a miR-22-3p) nebo se sníženou (miR-16, miR-10b, miR-30a, miR-154, miR-150, miR-451) expresí v porovnání se ZK (Perez-Sanchez et al., 2018, Magrey et al., 2016). Sérové hladiny miR-5196 byly v porovnání se ZK vyšší u pacientů s AS a po léčbě pomocí TNF inhibitorů došlo k jejich snížení. Míra poklesu navíc korelovala se zlepšením klinické odpovědi (Ciechomska et al., 2018).

### 1.3.2 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, jehož patogeneze byla popsána výše.

Porovnání hladin miRNA v plazmě a synoviální tekutině prokázalo vyšší hladiny miR-16, miR-132, miR-146a a miR-223 v plazmě než v synoviální tekutině u pacientů s etablovanou RA a OA, zatímco korelace mezi hladinami v plazmě a synoviální tekutině nalezena nebyla. V synoviální tekutině u RA byly nalezeny vyšší hladiny miR-16, miR-146a, miR-155 a miR-223 než u OA. Výrazně vyšší hladiny miR-132 byly v plazmě ZK v porovnání s RA i OA, které na základě ROC analýzy odlišily pacienty s RA a OA od ZK s vysokou senzitivitou i specificitou (Murata et al., 2010). Sérové hladiny miR-10a byly nižší u RA pacientů v porovnání se ZK a stouply u RA pacientů léčených methotrexátem v porovnání s neléčenými pacienty. ROC analýza následně potvrdila, že exprese miR-10a může u RA pacientů predikovat léčebnou odpověď na methotrexát (Hong et al., 2018). Také sérové hladiny miR-548a-3p byly nižší u RA pacientů s porovnání se ZK a jejich hladiny negativně korelovaly s hladinami CRP, RF a sedimentací erytrocytů (FW) (Wang et al., 2018). Naopak sérové hladiny miR-551b a miR-448 byly u RA pacientů zvýšené, zatímco hladiny miR-124 byly sníženy v porovnání se ZK (Jin et al., 2018). V jiné práci byly nalezeny výrazně vyšší hladiny miR-24, miR-26a a miR-125a-5p v plazmě RA oproti ZK schopné odlišit RA pacienty od ZK, zejména však kombinace obou miR-24 a miR-125a-5p. Sama miR-24 pak korelovala s CRP, se skóre bolesti dle vizuální analogové škály (VAS) a aktivitou onemocnění dle skóre DAS28, což naznačuje její potenciální využití jako biomarkerů aktivity nemoci (Murata et al., 2013). Nedávno byla v plazmě RA pacientů popsána korelace miR-23b s DAS28, CRP a FW. Hladiny miR-23b byly vyšší u RA pacientů v porovnání se ZK a po terapii DMARD a/nebo NSA došlo u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu k poklesu, zatímco u pacientů s nedostatečnou odpovědí k poklesu miR-23b nedošlo (Liu et al., 2019).

U pacientů s časnou RA (early RA, ERA) byly zjištěny nižší sérové hladiny miR-146a, miR-155 a miR-16 v porovnání s pacienty s etablovanou RA. U ERA byl sledován efekt terapie DMARD na sérové hladiny miRNA. Nárůst miR-16 z měsíce 0 do měsíce 3 koreloval s poklesem DAS28 z měsíce 3 na 12. Vyšší hladiny miR-223 u pacientů před zahájením léčby pozitivně korelovala s CRP a DAS28 a poklesem aktivity onemocnění v následujících 9 měsících (Filkova et al., 2014). Exprese miR-99b-5p, miR-143-3p a miR-145-5p v plazmě byla vyšší u pacientů s erozivní ERA v porovnání s neerozivní ERA. Exprese miR-99b-5p před léčbou navíc predikovala progresi erozí za 12 měsíců (Yue et al., 2019). MiR-27a-3p v plazmě se ukázala jako potencionální prediktivní biomarker dosažení remise pacientů s ERA léčenými adalimumabem v kombinaci s methotrexátem (Sode et al., 2018). Vyšší sérové hladiny miR-125b u pacientů s RA byly asociovány s dobrou odpovědí pacientů na léčbu rituximabem, naopak pacienti s nízkou expresí miR-125b měli menší šanci na klinické zlepšení po 3 měsících terapie (Duroux-Richard et al., 2014). V jiné studii se sérové hladiny miR-125b spolu s miR-16-5p, miR-23-3p, miR-126-3p, miR-146a-5p, a miR-223-3p zvýšily po podání šestiměsíční kombinované terapie inhibitory TNF a csDMARD u RA pacientů s dobrou odpovědí na léčbu. Výsledky ROC analýzy ukázaly jako ideální prediktor léčebné odpovědi kombinaci miR-23-3p a miR-223-3p (Castro-Villegas et al., 2015).

### 1.3.3 Osteoartróza

Osteoartróza je degenerativní kloubní onemocnění přibývajícím s věkem. Nejprve dojde k biochemickým změnám v chrupavce, následkem kterých dojde ke snížení její mechanické odolnosti a postupně k její ztrátě. V subchondrální kosti dochází ke sklerotizaci a vzniku cyst, posléze také k remodelaci a tvorbě osteofytů. Všechny tyto změny způsobují u pacienta bolest a postupnou ztrátu funkčnosti kloubů.

Při stanovení cirkulujících miRNA v séru pacientů s OA byly miRNA let-7e, miR-454 a 885-5p asociovány s těžkou OA kolenního a kyčelního kloubu. Zejména miRNA let-7e byla popsána jako negativní prediktor totální kloubní náhrady (Beyer et al., 2014). V nedávné studii byla v plazmě pozorována vyšší exprese miR-19b, miR-92a, miR-122-5p, miR-320b a miR-486-5p u pacientů s OA kolenního kloubu v porovnání se ZK. Další analýza potvrdila miR-19b, miR-122-5p a miR-486-5p jako rizikové pro rozvoj OA a jejich kombinace byla popsána jako potencionální biomarker pro diagnostiku a posouzení závažnosti tohoto onemocnění (Kong et al., 2017). V jiné studii byl popsán signifikantní rozdíl u 8 miRNA v plazmě pacientů s OA

v porovnání ze ZK (miR-93, miR-126, miR-146a, miR-184, miR-186, miR-195, miR-345, miR-885-5p). Predikční algoritmy zjistily, že minimálně 6 cílových genů těchto miRNA má etablovanou roli v patogenezi OA (Cuadra et al., 2014). V plazmě OA pacientů léčených 6 týdnů selektivními inhibitory enzymu COX-2 (celecoxib) došlo ke snížení exprese miR-126-5p a miR-320a a zvýšení exprese miR-146a-5p. Navíc změny v hladinách těchto miRNA korelovaly s léčebnou odpovědí na celecoxib (Dong et al., 2019b). V séru OA pacientů byla zvýšená exprese miR-146a-5p v porovnání s kontrolními vzorky a korelovala se zvýšenou expresí této miRNA ve vzorcích chrupavky (Skrzypa et al., 2019). V synoviální tekutině byla popsána vyšší exprese miR-210 u OA pacientů v časném i pozdějším stádiu nemoci v porovnání se ZK (Xie et al., 2019).

### 1.3.4 Systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) je autoimunitní multiorgánové systémové onemocnění. Základem patogeneze je tvorba autoprotilátek proti buněčným makromolekulám podmíněná polyklonální aktivací B lymfocytů a imunitní stimulací autoantigeny. Autoprotilátky se následně podílí na vzniku zánětlivé odpovědi nebo buněčné dysfunkci a tím k poškození tkání.

U pacientů se SLE byly popsány vyšší hladiny miR-21, miR-451, miR-223, miR-16 a miR-126 v porovnání se ZK. První čtyři zmiňované miRNA byly navíc vyšší i u RA. Bioinformatická analýza dále potvrdila, že tyto miRNA se podílí v regulaci transdukčních drah a buněčné interakci u SLE (Wang et al., 2012a). Také hladiny miR-551b a miR-448 byly zvýšeně exprimovány v séru SLE pacientů, zatímco hladiny miR-124 byly v porovnání se ZK snižené (Jin et al., 2018). V jiných pracích byly u SLE pacientů porovnávány sérové a močové hladiny miRNA. Několik miRNA (miR-146a, miR-155, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429, miR-205 a miR-192) mělo u pacientů se SLE nižší hladiny v séru v porovnání se ZK. Zatímco miR-200a, miR-200c, miR-141, miR-429 a miR-192 byly v moči SLE pacientů nižší, tak hladiny miR-146a v moči byly u SLE pacientů vyšší než u ZK. Sérové hladiny miR-145a, miR-155, miR-200b, miR-200c, miR-429, miR-2015 a miR-192 korelovaly s renálními funkcemi, sérové miR-146a a miR-200a negativně korelovaly s aktivitou nemoci dle indexu SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) a s proteinurií (Wang et al., 2010a, Wang et al., 2011). Snižená exprese miR-146a u SLE pacientů byla nalezena také v exozomech (Dong et al., 2019a). Ve vzorcích plazmy bylo několik miRNA exprimováno méně v porovnání se ZK. Expresse miR-92a, miR-27a, miR-19b, miR-23a, miR-223 a miR-16 byla nižší i

v porovnání s RA a je možné je využít pro odlišení SLE pacientů od RA (Zhang et al., 2018). Kromě dalších různě exprimovaných miRNA u pacientů se SLE je řada z nich zvýšena (např. miR-21, miR-183-5p, miR-375-3p, miR-423) nebo snížena (např. miR-20a, miR-107-3p, miR-141-5p, miR-150, miR-200b-5p, miR-200c-5p, miR-223, miR-342-3p) u SLE pacientů s aktivní nefritidou (Carlsen et al., 2013, Navarro-Quiroz et al., 2017, Nakhjavani et al., 2019, Zhang and Wang, 2018). Plazmatické hladiny miR-10a-5p, miR-99a-5p a miR-21-5p byly zvýšeny u pacientů se SLE bez ohledu na přítomnost glukokortikoidy indukovanou osteonekrózu hlavice femuru (Li et al., 2018). Nedávno provedená metaanalýza potvrdila, že cirkulující miRNA mohou sloužit jako diagnostické biomarkery SLE, zejména miR-21 (Zheng et al., 2019).

### **1.3.5 Systémová sklerodermie**

Systémová sklerodermie (SSc) je chronické onemocnění pojivové tkáně charakterizováno fibrotickou přestavbou kůže i vnitřních orgánů. Mezi hlavní patologické procesy v patogenezi SSc patří autoimunita a zánět, vaskulopatie a fibróza.

V séru pacientů se SSc byly popsány miRNA, které měly v porovnání se ZK vyšší (miR-7g, miR-21, miR-24-3p, miR-29b, miR-92a, miR-125, miR-142-3p, miR-145, miR-191-5p, miR-206, miR-448, miR-551b a miR-4484) nebo nižší expresi (miR-30b, miR-124). Navíc hladiny miR-142-3p korelovaly pozitivně a hladiny miR-30b negativně s mírou kožního postižení posuzovanou dle Rodnanova kožního skóre (Jin et al., 2018, Sing et al., 2012, Makino et al., 2012, Tanaka et al., 2013, Vistbakka and Sumelahti, 2018, Rusek et al., 2019, Koba et al., 2013). V nedávné práci byla zjištěna zvýšená exprese miR-483-5p u SSc pacientů, včetně časné fáze onemocnění, v porovnání se ZK, jejíž hladiny korelovaly s modifikovaným Rodnanovým kožním skóre. Její zvýšená exprese v dermálních fibroblastech a endoteliálních buňkách s vlivem na expresi profibrotických genů odráží fakt, že miR-483-5p by mohla sloužit jako biomarker u časných fází SSc (Chouri et al., 2018).

### **1.3.6 Idiopatické zánětlivé myopatie**

Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM) jsou zánětlivá onemocnění příčně pruhovaného svalstva s charakteristickými kožními projevy i multisystémovým postižením. Charakteristická je proximální svalová slabost a zvýšené hladiny svalových enzymů.



V séru IZM pacientů byla v porovnání se ZK popsána zvýšená exprese let-7b\*, miR-498 a miR-4310 a snížená exprese miR-1234, miR-3679-5p a miR-4299. Dále byly nalezeny 3 miRNA (miR-877\*, miR-3676 a miR-3907) s vyšší expresí u pacientů s vysokou aktivitou nemoci oproti pacientům s nízkou aktivitou (Misunova et al., 2016). V jiné studii u pacientů s IZM byly plazmatické hladiny miR-4442 výrazně vyšší než u pacientů s RA, SLE nebo u ZK, korelovaly s aktivitou onemocnění a hladiny signifikantně poklesly po účinné léčbě (Hirai et al., 2018). Plazmatické hladiny miR-7 a miR-21 byly popsány jako vhodný diagnostický biomarker IZM. MiR-7 je schopná odlišit IZM pacienty s plicním postižením od IZM pacientů bez plicního postižení (Yu et al., 2018).

## 2. HYPOTÉZA A CÍLE

MiRNA jsou malé nekódující RNA, které se na podkladě RNA interference podílí na posttranskripční regulaci genové exprese. MiRNA regulují nejenom fyziologické procesy, ale jejich dysregulace přispívá i ke vzniku onemocnění, včetně autoimunitních. MiRNA jsou uvolňovány z buněk aktivním i pasivním transportem a ve formě mikropartikulí nebo (lipo)proteinových komplexů se nachází v extracelulárním prostředí.

Vzhledem k jejich stabilitě v tělních tekutinách se o miRNA uvažuje jako o prostředku intercelulární komunikace a díky jejich lehké dostupnosti jsou předmětem zájmu jako biomarkery odrážející (pato)fyziologické procesy s využitím v diagnostice a klasifikaci onemocnění, monitorování aktivity nemoci, účinku terapie nebo predikce odpovědi na léčbu.

Předpokládáme, že výběr vhodných biomarkerů, jakými jsou potenciálně i miRNA, jejichž změny odráží patogenetické procesy, je tak nesmírně důležitý pro výběr správné terapie.

V této souvislosti byla předmětem této disertační práce analýza zejména cirkulujících, ale i intracelulárních miRNA u dvou nejčastějších autoimunitních zánětlivých revmatických onemocnění- revmatoidní artritidy a spondyloartritid

s cílem

1. vyhodnotit vztah cirkulujících miRNA k aktivitě a stadiu revmatoidní artritidy a spondyloartritid
2. monitorovat expresi miRNA v průběhu léčby a prozkoumat jejich využití v predikci odpovědi na léčbu
3. zjistit jejich potenciální vliv na patogenezi revmatických onemocnění, zejména ve fázi předcházející manifestaci revmatoidní artritidy.

### 3. METODIKA A VÝSLEDKY

(komentáře k publikacím zařazeným do dizertační práce)

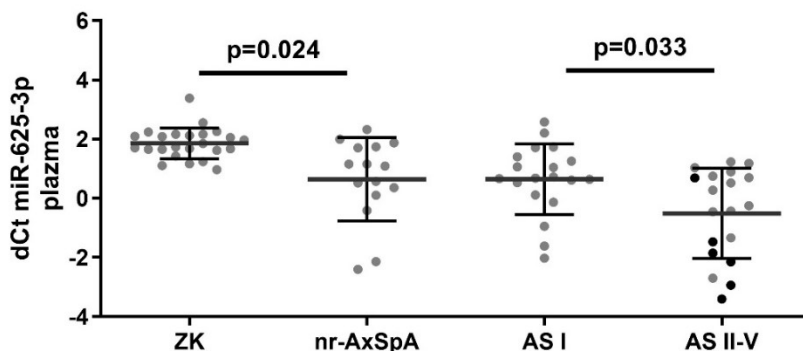
#### 3.1. MiRNA a postižení páteře u pacientů s axiální spondyloartritidou

Zatímco u RA je vztah cirkulujících miRNA s aktivitou nemoci dlouhodobě studován, u AxSpA je tato oblast málo probádána. Dle naší rešeršní vyplývá, že využití antigenu HLA-B27 je nejdůležitějším parametrem v diagnostice onemocnění a CRP je prozatím nejlepším ukazatelem aktivity nemoci (Prajzlerova et al., 2016). Cílem této práce bylo zhodnotit hladiny cirkulujících miRNA v plazmě ve vztahu k míře poškození páteře a aktivitě nemoci u pacientů s AxSpA.

Do studie bylo zahrnuto 20 pacientů s nr-AxSpA, 24 pacientů s přítomností sakroiliitidy bez postižení páteře (stádium AS I), 24 pacientů s postižením páteře a přítomností syndesmofytů (stádium AS II-V hodnoceno dle Braun et al. (Braun et al., 2002)), včetně 7 pacientů s tzv. bambusovou páteří a 29 ZK.

Nejprve jsme provedli rozsáhlou analýzu 760 miRNA u 5 vzorků z každé sledované skupiny metodou erejí TLDA (TaqMan low-density array). Celkem 21 miRNA s rozlišnou expresí mezi skupinami a potenciální funkcí v patogenezi AxSpA jsme následně validovali v celém souboru pacientů pomocí jednotlivých TaqMan Real-Time PCR (RT-PCR) esejí. U 14 z nich (miR-19a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-99b-5p, miR-133a-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-374a-5p, miR-375, miR-409-3p, miR-625-3p) byla nižší exprese u všech pacientů s AxSpA bez ohledu na stupeň poškození páteře v porovnání se ZK.

Následně byla porovnáována exprese jednotlivých miRNA ve vztahu k míře poškození páteře u jedinců s AxSpA. MiR-625-3p měla jako jediná nižší expresi u jedinců s nr-AxSpA v porovnání se ZK (Obr. 3.1.). U dalších miRNA se jejich exprese snižovala s mírou postižení páteře.



**Obr. 3.1.** Rozdíl v expresi cirkulující miRNA 625-3p u ZK, pacientů s nr-AxSpA a pacientů s AS se sakroiliitidou (AS I) a postižením páteře (AS II-V). Tmavé symboly značí pacienty s bambusovou páteří.

Následně jsme u pacientů s AxSpA zjišťovali asociaci mezi hladinami cirkulujících miRNA a aktivitou nemoci podle skóre BASDAI. Zejména u AS pacientů byla u několika miRNA nalezena korelace s CRP a/nebo indexem aktivity nemoci BASDAI.

Rozsáhlá analýza ukázala, že několik miRNA je odlišně exprimovaných u pacientů s AxSpA a liší se podle míry postižení páteře. MiR-625-3p byla odlišně exprimovaná i u jedinců s neradiografickým poškozením v porovnání s pacienty s radiografickým stadiem nemoci. Cirkulující miRNA tak mohou sloužit jako markery stadia postižení a aktivity nemoci pacientů s AxSpA.

Publikace k tématu:

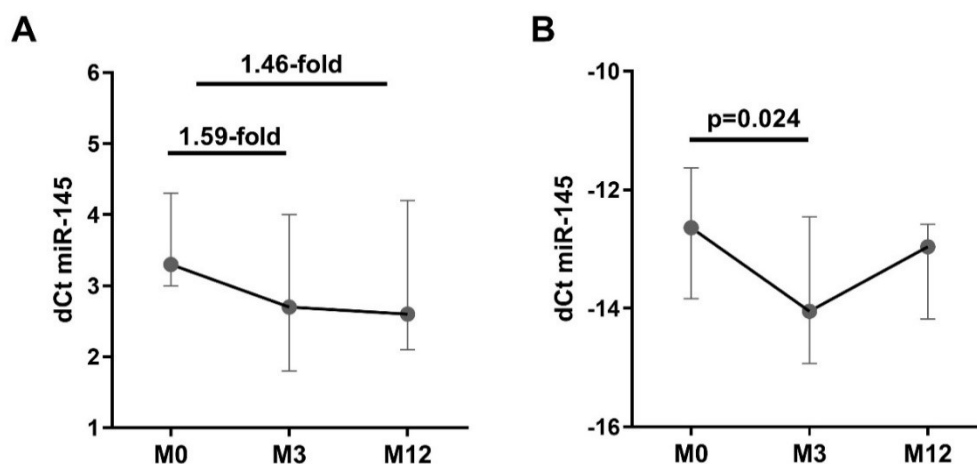
Prajzlerová k, Grobelná K, Hušáková M, Forejtová S, Jüngel A, Gay S, Vencovský J, Pavelka K, Šenolt L. Association between circulating miRNAs and spine involvement in patients with axial spondyloarthritis. PLoS ONE, 2017 Sep 22;12(9):e0185323. doi: 10.1371/journal.pone.0185323

### 3.2. MiR-145 jako ukazatel léčebné odpovědi u pacientů s ankylozující spondylitidou

U pacientů s RA bylo popsáno několik miRNA, které slouží jako ukazatele a prediktory léčebné odpovědi na terapii biologickou léčbou. Cílem naší práce bylo analyzovat cirkulující miRNA v plazmě před a po léčbě TNF-inhibitory a jejich význam v predikci terapeutické odpovědi u pacientů s AS.

Do studie bylo zařazeno 19 pacientů s AS, u kterých byla zahájena terapie TNF-inhibitory a terapeutická odpověď podle skóre BASDAI a ASDAS vyhodnocena po 3 a 12 měsících léčby. Nejprve bylo analyzováno 380 miRNA metodou TLDA v séru 3 pacientů před zahájením anti-TNF léčby (M0) a po 3 a 12 měsících léčby. Následně bylo 17 miRNA vybraných na základě zjištěných rozdílů v expresi mezi jednotlivými odběry analyzováno na rozšířeném souboru 19 pacientů pomocí TaqMan RT-PCR esejí.

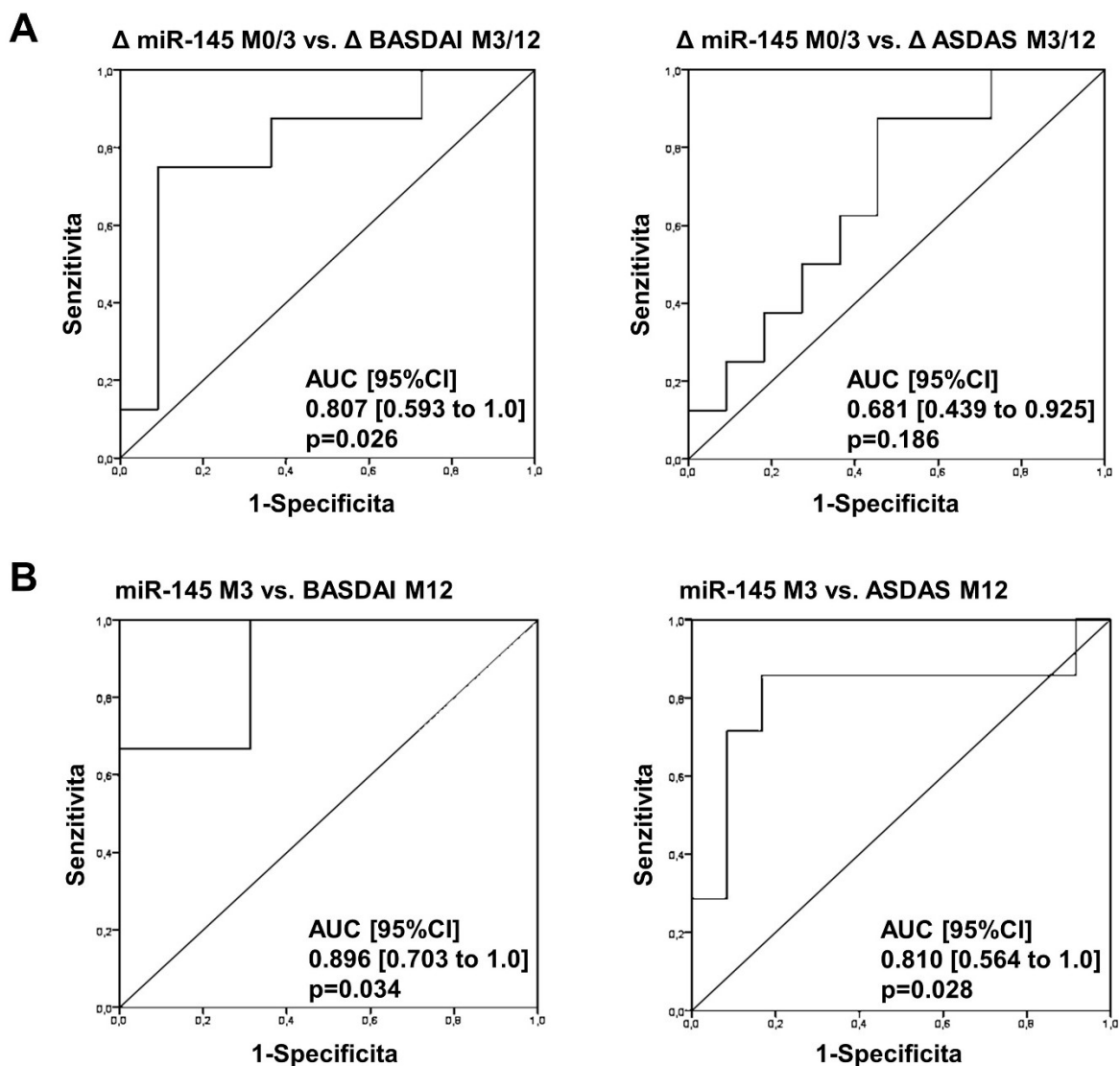
Komplexní TLDA analýza prokázala snížení exprese miR-145 v M3 (1,59x) a v M12 (1,46x) v porovnání s M0. Následná validační analýza potvrdila 1,62x snížení exprese miR-145 v M3 v porovnání s M0 (Obr. 3.2.).



**Obr. 3.2.** Expresie cirkulující miR-145 před léčbou a po 3 a 12 měsících anti-TNF terapie analyzované metodou TLDA (A) a pomocí TaqMan RT-PCR esejí (B).

Míra poklesu miR-145 z M0 do M3 korelovala s poklesem aktivity nemoci z M3 do M12 dle BASDAI i ASDAS, a nižší hladiny miR-145 v M3 korelovaly s následným dalším zlepšením aktivity nemoci z M3 do M12 a také s nižší aktivitou nemoci v M12 hodnocené dle BASDAI a ASDAS.

Následná ROC analýza potvrdila, že pokles miR-145 z M0 do M3 predikuje zlepšení z M3 do M12 dle ukazatele aktivity BASDAI a že nízké hladiny miR-145 v M3 predikují nízkou aktivitu nemoci v M12 hodnocenou dle BASDAI (jako vysoká aktivita je hodnoceno BASDAI skóre  $\geq 4$ ) a ASDAS (jako vysoká aktivita je hodnoceno ASDAS skóre  $\geq 2,1$ ) (Obr. 3.3.).



**Obr. 3.3.** ROC analýza změny exprese miR-145 z měsíce 0 do měsíce 3 (A) a exprese miR-145 v měsíci 3 (B) jako prediktor dobré léčebné odpovědi po terapii.

Efekt biologické léčby je hodnocen 3 měsíce od zahájení terapie a terapeutická odpověď v tomto časovém období je rozhodující pro pokračování nebo změnu biologické léčby.

Prokázali jsme, že sledování sérové hladiny miR-145 a zejména její pokles po 3 měsících od zahájení léčby slouží jako prediktor pozdější dobré odpovědi na léčbu.

Publikace k tématu:

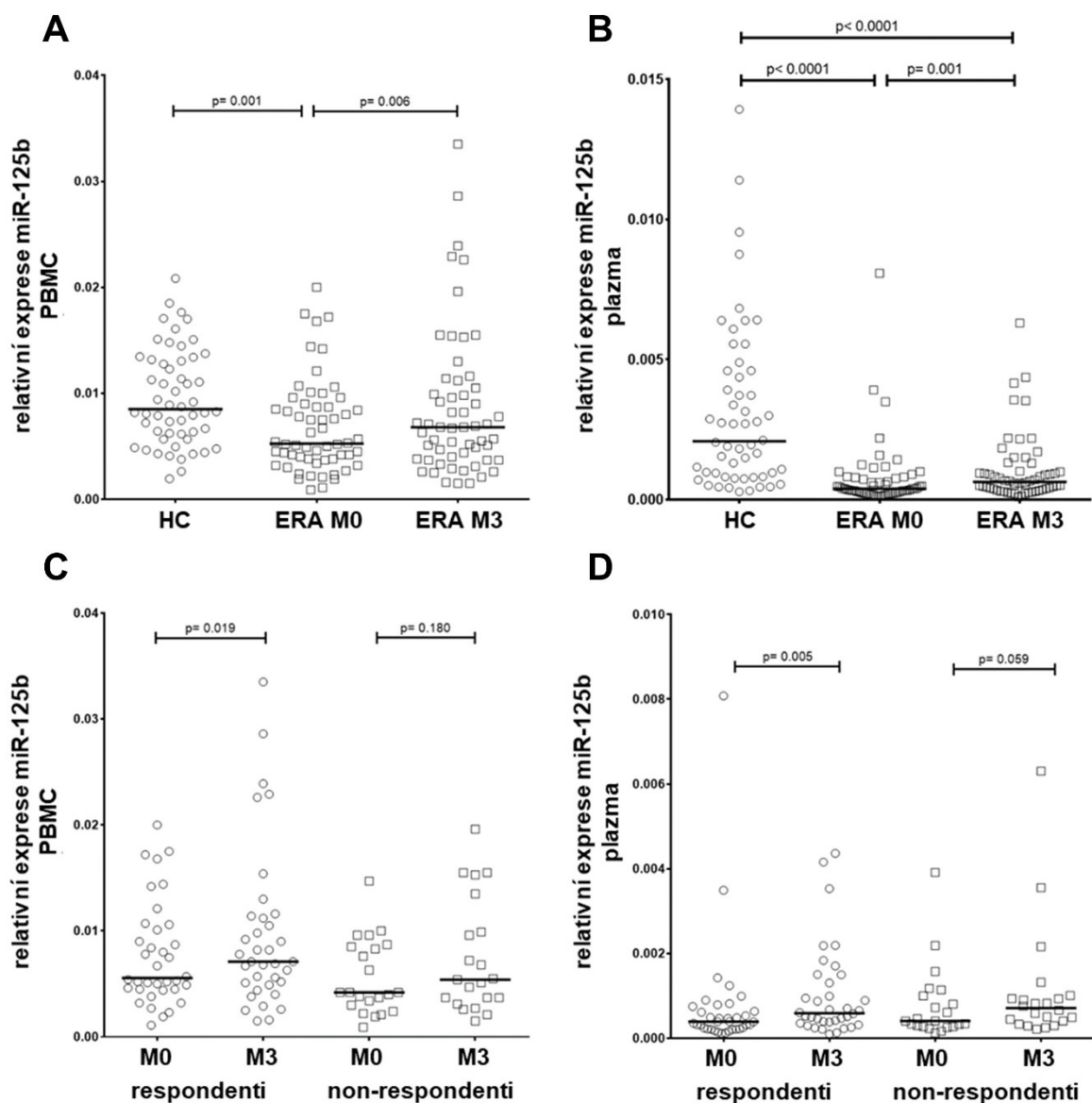
Prajzlerová K, Komarc M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Circulating miR-145 as a marker of therapeutic response to anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Physiol Res.* 2021 Apr 30;70(2):255-264. doi: 10.33549/physiolres.934542.

### **3.3. MiR-125b v predikci léčebné odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou**

Zvýšené sérové hladiny miR-125b u pacientů s etablovanou RA byli popsány jako prediktor dobré léčebné odpovědi na rituximab (anti-CD20 protilátka) (Duroux-Richard et al., 2014). Cílem naší práce bylo analyzovat plazmatickou cirkulující i v PMBC-obsaženou intracelulární expresi miR-125b u pacientů s ERA před a po zahájení iniciální léčby a její význam v predikci terapeutické odpovědi.

Do studie bylo zařazeno 58 pacientů s ERA před zahájením léčby csDMARD ev. v kombinaci s glukokortikoidy s prospektivním sledováním po 3 a 6 měsících a 54 ZK. ERA pacienti byli navíc rozděleni na tzv. respondenty s dobrou odpovědí na léčbu (definováno jako dosažení nízké aktivity  $\leq 3,2$  nebo remise  $\leq 2,6$  dle skóre DAS28 v měsíci 3 nebo 6) a tzv. non-respondenty s nedostatečnou terapeutickou odpovědí (definováno jako DAS28  $> 3,2$ ). Expresí miR-125 byla měřena metodou TaqMan RT-PCR.

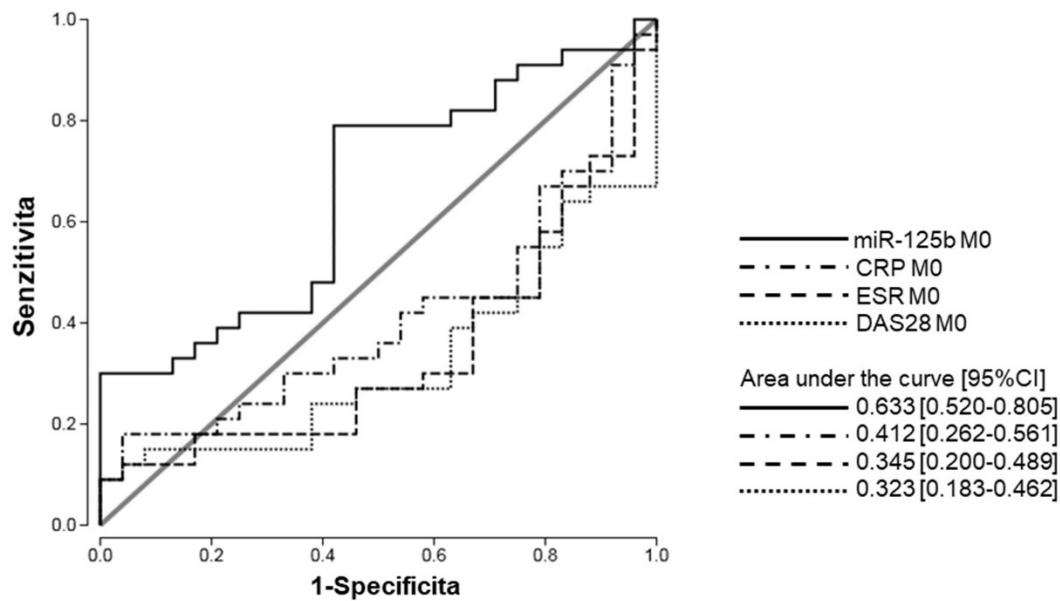
Hladiny miR-125b byly u pacientů s ERA před zahájením léčby nižší v plazmě i v PBMC v porovnání se ZK a stouply 3 měsíce po nasazení léčby. Při rozdělení pacientů podle míry odpovědi na léčbu byl vzestup hladiny miR-125b potvrzen pouze u těch pacientů, kteří dobře reagovali na léčbu, a to jak v plazmě, tak i v PBMC (Obr. 3.4.).



**Obr. 3.4.** Expresa miR-125b v PBMC (A) a plazmě (B) u pacientů s časnou RA v porovnání se ZK, porovnání exprese miR-125b mezi pacienty s dobrou a nedostatečnou odpovědí na léčbu v PBMC (C) a plazmě (D).

Před zahájením léčby hladiny buněčné miR-125b negativně korelovaly s DAS28, CRP i FW, byly tedy nižší u těch jedinců, kteří měli vyšší aktivitu nemoci. Dále byla zjištěna vyšší exprese buněčné miR-125b před zahájením léčby u pacientů, kteří v měsíci 3 dobře reagovali na léčbu v porovnání s těmi s nedostatečnou odpovědí. ROC analýza potvrdila, že exprese miR125b před léčbou predikuje dobrou léčebnou odpověď v měsíci 3 (Obr. 3.5.).





**Obr. 3.5.** ROC analýza exprese buněčné miR-125b v PBMC jako prediktor dobré léčebné odpovědi po 3 měsících terapie.

Prokázali jsme, že exprese cirkulující i buněčné miR-125b je u neléčených pacientů s ERA nižší v porovnání se ZK a stoupá po 3 měsících terapie, zejména u pacientů s dobrou terapeutickou odpovědí. Expresse miR-125b v PBMC před léčbou může navíc sloužit jako prediktivní biomarker léčebné odpovědi pacientů s časnou RA.

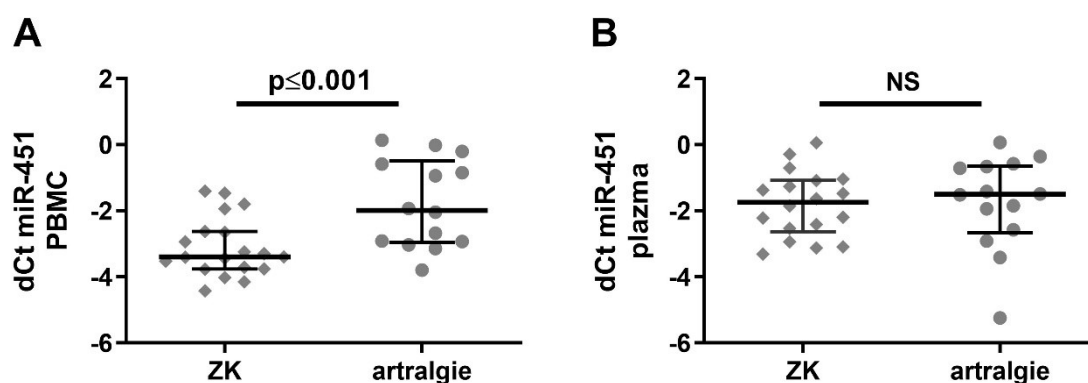
Publikace k tématu:

Hrušková V, Jandová R, Vernerová L, Mann H, Pecha O, Prajzlerová K, Pavelka K, Vencovský J, Filková M, Šenolt L. MicroRNA-125: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016 Jun 2;18(1):124. doi: 10.1186/s13075-016-1023-0.

### 3.4. Význam miR-451 u jedinců v riziku rozvoje revmatoidní artritidy

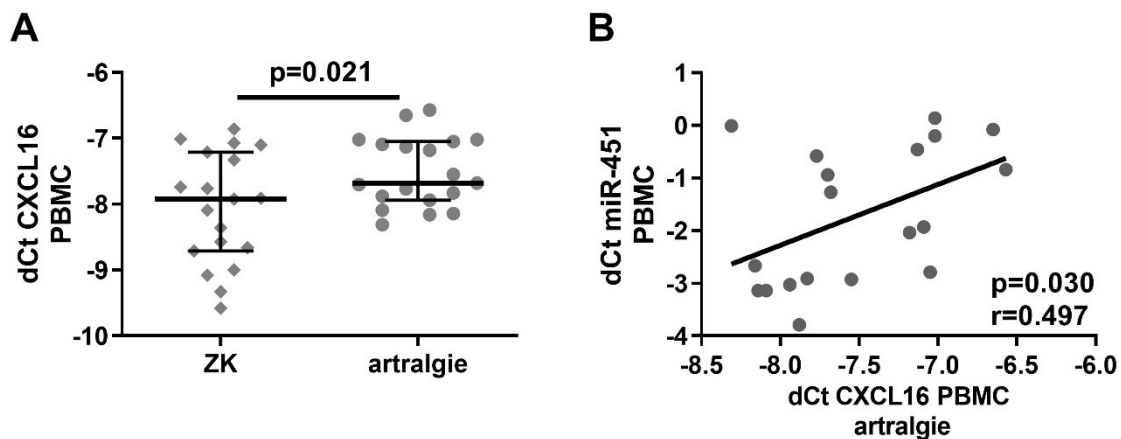
U geneticky predisponovaných jedinců se ACPA objevují dlouho před manifestací nemoci. ACPA pozitivní jedinci s artralgiemi mají až 8x vyšší riziko rozvoje RA v porovnání se seronegativními jedinci (Ten Brinck et al., 2017). Cílem naší práce bylo analyzovat cirkulující a buněčné miRNA u jedinců v preklinickém stádiu RA, porovnat je se ZK, zhodnotit expresi vybraných cílových genů těchto miRNA na transkripční i proteinové úrovni a potenciál této regulace v patogenezi RA.

Do první fáze studie bylo zařazeno 19 ACPA pozitivních jedinců s artralgiemi a 19 ACPA negativních ZK. Rozsáhlá analýza 380 miRNA pomocí TLDA u 5 jedinců z každé skupiny prokázala 2,43x vyšší expresi miR-451 ve vzorcích PBMC a 1,55x nižší expresi ve vzorcích plazmy u jedinců s artralgiemi v porovnání se ZK. Následná validační analýza na celém souboru pacientů potvrdila vyšší expresi miR-451 v PBMC jedinců s artralgiemi (Obr. 3.6.).



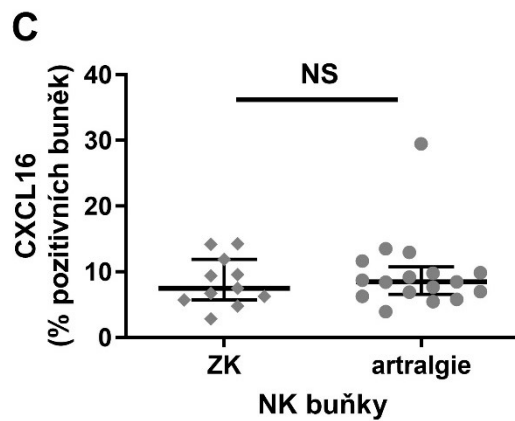
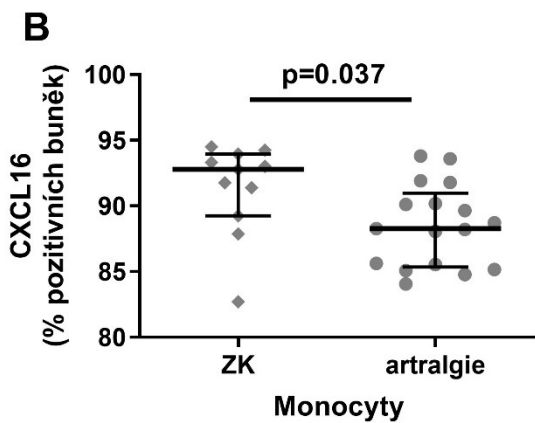
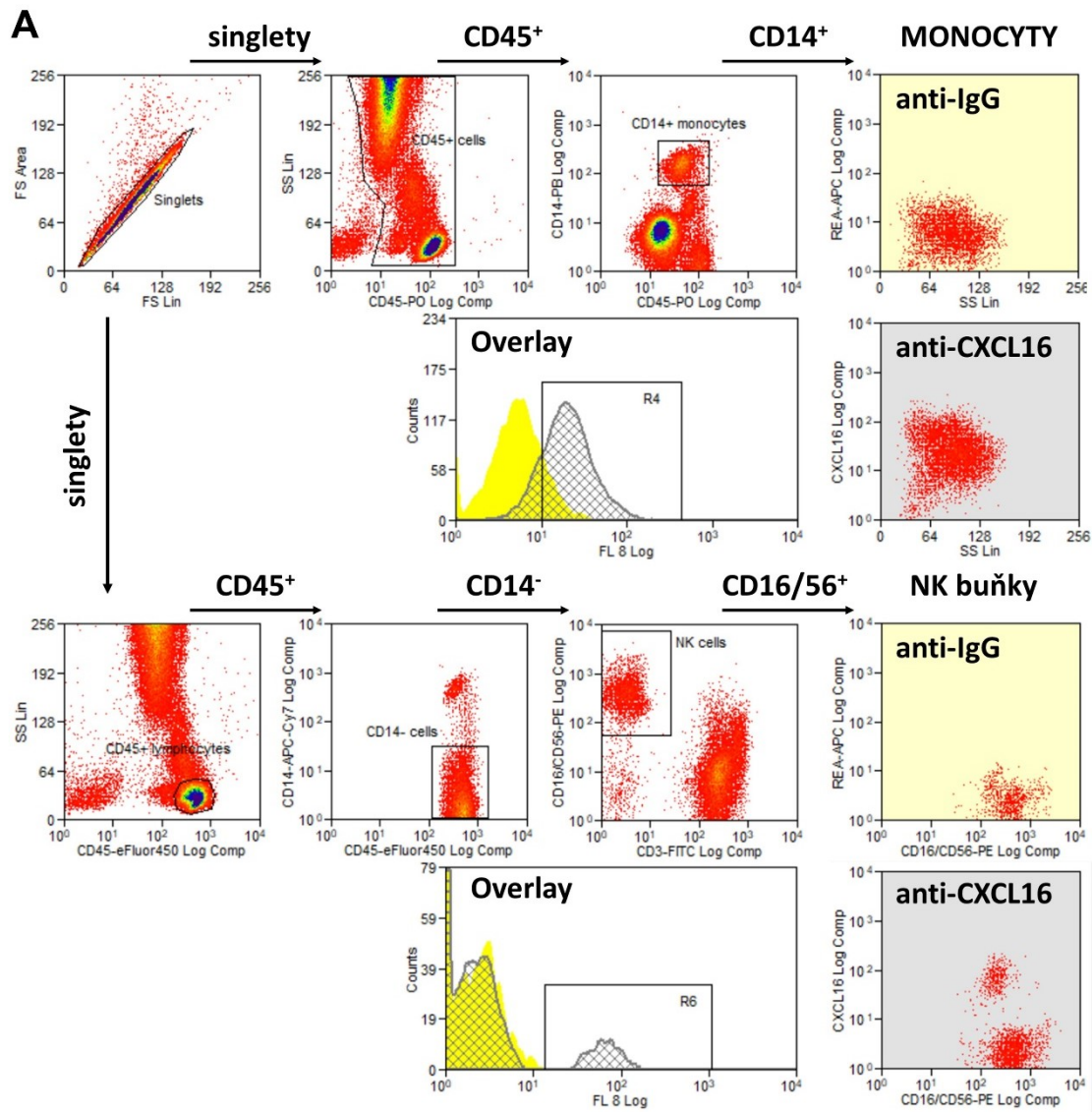
**Obr. 3.6.** Porovnání exprese buněčné a cirkulující miR-145 u jedinců s artralgiemi a ZK.

Jedním z genů, jehož translace je přímo ovlivněná miR-451 byl v minulosti popsán chemokin CXCL16 (Zhang et al., 2015). Navíc je známá role CXCL16 v patogenezi RA tím, že přispívá k migraci T lymfocytů do synoviální tkáně, kde se dále podílejí na zánětlivém procesu (Nanki et al., 2005). Exprese mRNA CXCL16 byla v PBMC jedinců s artralgiemi 1,47x vyšší v porovnání se ZK a navíc u jedinců s artralgiemi korelovala s expresí miR-451 v PBMC (Obr. 3.7.).



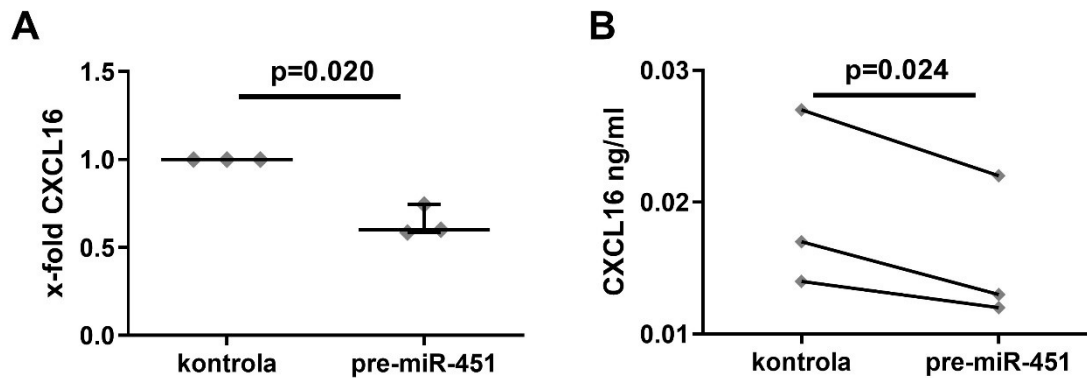
**Obr. 3.7.** Porovnání buněčné exprese CXCL16 v PBMC u jedinců s artralgiemi a ZK (A), korelace buněčné exprese CXCL16 s miR-451 (B).

Druhá fáze práce byla zaměřena na analýzu proteinové exprese CXCL16. Plazmatické hladiny CXCL16 jedinců s artralgiemi se nelišily od ZK, nicméně negativně korelovaly s expresí cirkulující miR-451. Následná analýza pomocí průtokové cytometrie u 17 ACPA pozitivních jedinců s artralgiemi a 11 ACPA negativních ZK odhalila expresi CXCL16 na povrchu monocytů a NK buněk. Jedinci s artralgiemi měli menší % zastoupení monocytů exprimujících CXCL16 než ZK (Obr. 3.8.).



**Obr. 3.8.** Cytometrická analýza exprese CXCL16 na povrchu monocytů a NK buněk (A), porovnání exprese CXCL16 u monocytů (B) a NK buněk (C) u jedinců s artralgiemi a ZK.

Následná analýza na izolovaných monocytech *in vitro* sice nepotvrdila korelaci mezi miR-451 a CXCL16 mRNA, ale transfekce monocytů pomocí pre-miR-451 prekurzoru snížila expresi CXCL16 na mRNA i proteinové úrovni měřené metodou ELISA v buněčných supernatantech (Obr. 3.9.). Naopak stimulace monocytů pomocí rekombinantního proteinu CXCL16 prokázala trend ke zvýšení exprese miR-451.



**Obr. 3.9.** Vliv transfekce pomocí pre-miR-451 na expresi CXCL16 na mRNA (A) a proteinové úrovni (B).

Z uvedených výsledků vyplývá, že zvýšená exprese miR-451 v buňkách periferní krve ACPA pozitivních jedinců v riziku vývoje RA snižuje proteinovou expresi CXCL16. Předpokládáme, že se může jednat o regulační mechanismus s cílem potlačení zánětu u jedinců v preklinickém stádiu RA ve snaze zabránit manifestaci artritidy.

Publikace k tématu:

Prajzlerová k, Kryštůfková O, Hánová P, Horváthová V, Gregové M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. High miR-451 expression in peripheral blood mononuclear cells from subject at risk of developing rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2021 Feb 25;11(1):4719. doi: 10.1038/s41598-021-84004-3

#### 4. DISKUZE

MiRNA jsou jednořetězcové RNA o velikosti přibližně 22 nukleotidů patřící do skupiny malých nekódujících RNA, které se na podkladě RNA interference podílí na posttranskripční inhibici genové exprese. MiRNA regulují nejenom fyziologické procesy, ale jejich dysregulace přispívá i ke vzniku onemocnění. MiRNA jsou zároveň uvolňovány z buněk do extracelulárního prostředí, kde jejich stabilitu umožňuje inkorporace do mikropartikulí nebo (lipo)proteinových komplexů. Doposud však nebyly objasněny přesné sekreční mechanismy cirkulujících miRNA, a tak není jasné, do jaké míry jsou vylučovány specifickou sekrecí nebo pasivně, co rozhoduje o tom, jaká miRNA se uvolní do cirkulace nebo zůstane intracelulárně, nebo do jaké míry dochází k sekreci nezralých miRNA a jestli jsou tyto schopny následného dozrávání. Také nejsou zcela jasné funkce jednotlivých cirkulujících miRNA, zda jsou orgánově nebo tkáňově specifické či nikoliv a v případě že ano, tak jakým mechanismem miRNA rozpoznávají cílovou buňku a jaké množství uvolněné miRNA již může mít funkční účinek. Všechny tyto otázky zůstávají víceméně nezodpovězené a další výzkum je potřeba pro jejich objasnění. Přestože převažují výzkumy týkající se buněčných miRNA, existuje mnoho prací poukazujících na potenciální využití cirkulujících miRNA jako diagnostických i prognostických biomarkerů.

MiRNA se podílí na patogenezi mnoha autoimunitních onemocnění, včetně revmatických, a monitorování jejich hladin představuje potenciální diagnostický a prognostický biomarker. V minulosti bylo popsáno několik buněčných miRNA odlišně regulovaných u pacientů s AS (Li et al., 2016, Mohammadi et al., 2018), nebo u pacientů s neradiografickou formou AxSpA (Li et al., 2019). Nicméně práce zabývající se cirkulující miRNA u pacientů s AxSpA s rozdílnou závažností axiálního postižení chyběla. V naší rozsáhlé studii bylo nalezeno 14 cirkulujících miRNA s nižší expresí u všech pacientů s AxSpA bez ohledu na míru postižení páteře v porovnání se ZK. Většina z těchto miRNA má dle literatury popsany určitý vztah k osteoblastogenezi, Wnt signalizaci nebo zánětlivé reakci, tedy procesů, které se podílí na patogenezi AxSpA (Poddubnyy and Sieper, 2017). Při podrobnější analýze zjišťující vztah k míře poškození páteře bylo nalezeno několik miRNA, jejichž exprese se snižovala s rostoucím rozsahem axiálního postižení. Z analyzovaných miRNA měla miR-625-3p jako jediná nižší expresi již u pacientů s neradiografickým poškozením páteře v porovnání se ZK. V minulosti byl prokázán vliv miR-625-3p na zvýšení migrace a proliferace a potlačení apoptózy (Zhao et al., 2019), jinde miR-625-3p migraci buněk naopak potlačuje (Li et al., 2020). Zvýšená proliferace a migrace imunitních buněk se podílí na patogenezi AxSpA, což by mohlo vysvětlovat, proč jsou změny v hladině této miRNA pozorovány již v časných stádiích

nemoci. Exprese několika miRNA pak korelovala s aktivitou nemoci hodnocenou dle CRP a/nebo skóre aktivity nemoci BASDAI.

V další studii jsme se zaměřili na vliv terapie TNF-inhibitory na expresi cirkulujících miRNA u pacientů s AS. Ukázali jsme pokles miR-145 v séru časně po zahájení anti-TNF terapie, kdy míra poklesu po zahájení léčby korelovala s pozdějším zlepšením aktivity nemoci. Také nižší hladiny miR-145 v séru 3 měsíce po zahájení léčby predikovaly nízkou aktivitu nemoci po roce léčby. Patogeneze axiálního postižení u SpA začíná zánětem, který aktivuje destrukci chrupavky a kosti a následně dochází ke kostní novotvorbě, při které hraje roli Wnt signalizace tím, že podporuje osteoblastogenezi (Cici et al., 2019). MiR-145 byla v minulosti popsána jako negativní regulátor kostní novotvorby (Fukuda et al., 2015, Hao et al., 2018) a zároveň podporuje kostní erozi tím, že se podílí na zvýšeném množství osteoklastů (Chen et al., 2018). Předpokládáme, že pokles hladiny miR-145 po zahájení anti-TNF terapie značí posun z aktivní erozivní fáze onemocnění do fáze reparačních procesů spojených s kostní novotvorbou. Tomu by odpovídal i výsledek naší výše zmíněné práce, kde hladiny miR-145 v séru byly vyšší u pacientů s neradiografickým postižením v porovnání s pacienty s radiografickou formou, tedy s vyšší kostní novotvorbou.

U pacientů s RA je prací studující miRNA jako potenciální diagnostické nebo prognostické biomarkery mnohem více, než je tomu u AxSpA (Mousavi et al., 2018). V minulosti byly ve vzorcích plné krve i séru pacientů s etablovanou RA popsány zvýšené hladiny miR-125b v porovnání se ZK (Duroux-Richard et al., 2014). V naší skupině neléčených pacientů s ERA byla v plazmě i PBMC nalezena naopak nižší hladina miR-125b v porovnání se ZK. Nižší hladiny této miRNA v minulosti popsány i u jiných autoimunitních onemocnění (Xu et al., 2011, Luo et al., 2013). Rozdíl může být podmíněn i tím, že se v našem případě jednalo o neléčené pacienty s ERA, zatímco jinde byli sledováni pacienti s etablovanou již léčenou RA. Vysoké sérové hladiny miR-125b u těchto pacientů sloužily jako prediktor dobré léčebné odpovědi na rituximab (Duroux-Richard et al., 2014). V našem případě byly vyšší hladiny miR-125b v PBMC u neléčených jedinců s ERA prediktory dobré léčebné odpovědi na csDMARD v monoterapii případně v kombinaci s glukokortikoidy. Navíc hladiny vyšší exprese miR-125b v PBMC před léčbou negativně korelovala s nižší aktivitou nemoci. To odpovídá známé funkci miR-125b v inhibici prozánětlivých cytokinů, včetně klíčového cytokinu TNF $\alpha$  (Tili et al., 2007, Huang et al., 2012, Rajaram et al., 2011, Rossi et al., 2011). Hladiny miR-125b v PBMC i cirkulující v plazmě se zvýšily po léčbě, zejména u pacientů s dobrou terapeutickou odpovědí. Již v minulosti bylo popsáno zvýšení exprese cirkulující miR-125 po anti-TNF léčbě (Castro-

Villegas et al., 2015). Předpokládáme, že jelikož miR-125b inhibuje expresi prozánětlivých cytokinů, tak vlivem zvýšení exprese miR-125b dochází k účinnějšímu potlačení zánětu a v souladu s tím k lepší terapeutické odpovědi (Tili et al., 2007, Huang et al., 2012, Rajaram et al., 2011, Rossi et al., 2011).

Analýza exprese miRNA u ACPA pozitivních jedinců s artralgiemi v riziku rozvoje RA má potenciál v odhalení role miRNA v patogenezi RA a pomoci tak pochopení mechanismů vedoucích k přesmyku z preklinické fáze do klinicky manifestní artritidy. V publikované práci u ACPA pozitivních jedinců s artralgiemi byly popsány 3 miRNA (miR-22, miR-486-3p a miR-382), jejichž sérové hladiny jsou asociovány s progresí do RA (Ouboussad et al., 2017). V naší rozsáhlé analýze miRNA u jedinců s artralgiemi v riziku rozvoje RA jsme našli vyšší expresi miR-451 v PBMC a nižší v plazmě v porovnání se ZK. Následná validační analýza potvrdila vyšší expresi této miRNA pouze v PBMC jedinců s artralgiemi v porovnání se ZK, nikoliv však v plazmě. U pacientů s etablovanou RA byly v minulosti vyšší exprese miR-451 popsány v plazmě a v T lymfocytech, kde navíc korelovaly s aktivitou nemoci dle DAS28, FW a IL-6 (Smigielska-Czepiel et al., 2014, Wang et al., 2012a). To, že se u jedinců s artralgiemi rozdíly v plazmě nepotvrdily, může být podmíněno tím, že u pacientů s RA již probíhá artritida a jedinci v naší kohortě dle principu neměli v době zařazení detekovatelnou klinickou artritidu. Chemokin CXCL16 byl v minulosti popsán jako přímo regulovaný miR-451 (Zhang et al., 2015). U jedinců s artralgiemi exprese miR-451 v PBMC korelovaly s expresí CXCL16 na transkripční úrovni. Následné funkční experimenty *in vitro* ale potvrdily přímou regulaci exprese CXCL16 pomocí miR-451. Pozitivní korelace může tak být dána neúplnou vazbou miRNA na cílovou mRNA, čímž dojde k utlumení translace proteinů bez snížení exprese mRNA CXCL16 (Iwakawa and Tomari, 2015). Pravděpodobně existují také různé mechanismy, kterými dochází ke zvýšené expresi miR-451 u jedinců v preklinickém stádiu RA, což potvrzuje i to, že exprese miR451 se zvyšuje po stimulaci CXCL16 *in vitro*. Samotná exprese CXCL16 může být také regulována jinými miRNA. Plazmatické hladiny se nelišily mezi jedinci s artralgiemi a ZK, nicméně u jedinců s artralgiemi korelovaly s hladinami CRP a FW, což naznačuje jisté zapojení do zánětlivých procesů již v preklinickém stádiu RA. V další analýze jsme posléze u ACPA pozitivních jedinců s artralgiemi prokázali nižší zastoupení monocytů s expresí CXCL16 na svém povrchu v porovnání se ZK. CXCL16 se podílí na patogenezi RA tím, že přispívá k migraci T lymfocytů do synoviální tkáně, kde se dále podílejí na patogenezi zánětu (van der Voort et al., 2005, Nanki et al., 2005). Předpokládáme, že imunitní systém ACPA pozitivních jedinců s artralgiemi v reakci na probíhající zánět zvyšuje



expresi miR-451, která následně redukuje expresi prozánětlivého CXCL16 v monocytech, a tím se podílí na zpoždění přechodu z preklinického stádia do klinicky manifestní artritidy.

## 5. ZÁVĚR

Naše výsledky podporují význam analýzy exprese miRNA jako biomarkerů korespondujícími se stadiem, aktivitou nemoci a s odpovědí na léčbu u RA a SpA, dvou nejčastějších zánětlivých revmatických onemocnění. Jako nejprínosnější považujeme průkaz toho, že některé miRNA jsou schopny predikovat terapeutickou odpověď a vývoj onemocnění, čímž mohou být nápomocny v individuálním přístupu k pacientům a k adjustaci jejich léčby. Odhalení funkce jednotlivých miRNA pomáhá, s ohledem na četné interakce s dalšími účastníky biologických pochodů, alespoň částečně pochopit jejich potenciální vztah k patogenezi jednotlivých onemocnění, včetně jejich časných fází. Naše práce obsahuje materiál s nutností validace na rozsáhlejších souborech pacientů pro širší využití v klinické praxi.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ACPA</b>	anti-citrullinated protein antibodies, protilátky proti citrulinovým proteinům
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology
<b>AGO</b>	Argonaut protein
<b>AS</b>	ankylozující spondylitida
<b>ASAS</b>	Assessment of spondyloarthritis international society
<b>ASDAS</b>	Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score
<b>AxSpA</b>	axiální spondyloartritida
<b>BASDAI</b>	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>CDK2</b>	cycline-dependent kinase 2
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CIA</b>	collagen induced arthritis, kolagenem indukovaná artritida
<b>COX-2</b>	cyclooxygenase-2
<b>CRP</b>	C-reaktivní protein
<b>CSA</b>	clinically suspect arthralgia, klinicky suspektní artralgie
<b>CTLA4</b>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
<b>CTX</b>	C-terminal telopeptide
<b>CXCL</b>	chemokine (C-X-C) ligand
<b>DAS28</b>	Disease Activity Score of 28 joints
<b>DBR1</b>	lariat debranching enzyme
<b>DGCR8</b>	DiGeorge syndrome critical region 8
<b>DKK1</b>	dickkopf-related protein 1
<b>DMARD</b>	disease-modifying anti-rheumatic drug, chorobu modifikující antirevmatické léky
<b>EBV</b>	Ebstein-Barr virus
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ERA</b>	early rheumatoid arthritis, časná revmatoidní artritida
<b>ERAP</b>	endoplasmic reticulum aminopeptidase
<b>EULAR</b>	European League Against Rheumatism
<b>FW</b>	sedimentace erytrocytů stanovena metodou podle Fåhræuse-Westergrena
<b>GM-CSF</b>	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>GSK3β</b>	glycogen synthase kinase 3 beta

<b>HCV</b>	hepatitis C virus
<b>HDAC</b>	histone deacetylase
<b>HDL</b>	high density lipoprotein, vysokodenzitní lipoprotein
<b>hnRNPA2B1</b>	heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2B1
<b>HLA</b>	human leukocyte antigen
<b>IFN</b>	interferon
<b>IL</b>	interleukin
<b>IL-23R</b>	receptor interleukinu 23
<b>ILC3</b>	innate lymphoid cells type 3, přirozené lymfoidní buňky typu 3
<b>IRAK</b>	interleukin-1 receptor associated kinase
<b>IZM</b>	idiopatické zánětlivé myopatie
<b>LDL</b>	low density lipoprotein, nízkodenzitní lipoprotein
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MAP3K7</b>	mitogene-activated protein kinase kinase kinase 7
<b>MCP</b>	metacarpophalangeal joints, metakarpofalangeální kloub
<b>MCP1</b>	monocyte chemoattractant protein 1
<b>miRNA</b>	mikroRNA
<b>MMP</b>	matrixová metaloproteináza
<b>MRI</b>	magnetická rezonance
<b>NF-1A</b>	nuclear factor 1-A-type
<b>NFATc1</b>	nuclear factor of activated T-cells 1
<b>NGS</b>	next generation sequencing, sekvenování nové generace
<b>NK</b>	natural killer
<b>NPM1</b>	nucleophosmin
<b>NSAID</b>	non-steroidal anti-inflammatory drug, nesteroidní antirevmatika
<b>nSMase</b>	neutral sphingomyelinase
<b>OA</b>	osteoartróza
<b>PAD</b>	protein-arginine deiminase
<b>PAZ</b>	Piwi Argonaut and Zwillie protein
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cells, periferní mononukleární buňky
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
<b>PDCD4</b>	programmed cell death protein 4

<b>piRNA</b>	piwi-interacting RNA
<b>Piwi</b>	p-element induced wimply
<b>RA</b>	revmatoidní artritida
<b>RANKL</b>	receptor activator NF- $\kappa$ B ligand
<b>RASF</b>	synoviální fobroblasty pacientů s revmatoidní artritidou
<b>RF</b>	revmatoidní faktor
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>ROC</b>	receiver operating characteristic
<b>SDAI</b>	Simple Disease Activity Index
<b>SHIP1</b>	src homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SLE</b>	systemový lupus erythematosus
<b>SLEDAI</b>	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
<b>SNP</b>	single nucleotide polymorphism, jednonukleový polymorfismus
<b>SOX5</b>	SRY-related HMG-box 5
<b>SSc</b>	systemová sklerodemie
<b>STAT3</b>	signal transducer and activator of transcription 3
<b>SUMO</b>	small ubiquitin-like modifier
<b>TGF</b>	transforming growth factor, transformující růstový faktor
<b>Th</b>	T helper
<b>TLDA</b>	TaqMan low-density array
<b>TLR</b>	toll-like receptor
<b>TNF</b>	tumour necrosis factor, tumor nektrizující faktor
<b>TRAF6</b>	TNF receptor associated factor 6
<b>TRAP</b>	tetrate-resistant acid phosphatase, tetrát rezistentní kyselá fosfatáza
<b>TRBP</b>	the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein
<b>Treg</b>	T regulační lymfocyt
<b>VAS</b>	visual analogue scale, vizuální analogová škála
<b>Wnt</b>	wingless/Int-1
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis protein
<b>ZK</b>	zdravá kontrola

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- AINOLA, M. M., MANDELIN, J. A., LILJESTROM, M. P., LI, T. F., HUKKANEN, M. V. & KONTTINEN, Y. T. 2005. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta. *Clin Exp Rheumatol*, 23, 644-50.
- ALAMANOS, Y. & DROSOS, A. A. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 4, 130-6.
- ALETAHA, D., NEOGI, T., SILMAN, A. J., FUNOVITS, J., FELSON, D. T., BINGHAM, C. O., 3RD, BIRNBAUM, N. S., BURMESTER, G. R., BYKERK, V. P., COHEN, M. D., COMBE, B., COSTENBADER, K. H., DOUGADOS, M., EMERY, P., FERRACCIOLI, G., HAZES, J. M., HOBBS, K., HUIZINGA, T. W., KAVANAUGH, A., KAY, J., KVIEN, T. K., LAING, T., MEASE, P., MENARD, H. A., MORELAND, L. W., NADEN, R. L., PINCUS, T., SMOLEN, J. S., STANISLAWSKA-BIERNAT, E., SYMMONS, D., TAK, P. P., UPCHURCH, K. S., VENCOVSKY, J., WOLFE, F. & HAWKER, G. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 62, 2569-81.
- ANDERSON, P. & KEDERSHA, N. 2006. RNA granules. *J Cell Biol*, 172, 803-8.
- ANDERSSON, A. K., LI, C. & BRENNAN, F. M. 2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10, 204.
- ARNETT, F. C., EDWORTHY, S. M., BLOCH, D. A., MCSHANE, D. J., FRIES, J. F., COOPER, N. S., HEALEY, L. A., KAPLAN, S. R., LIANG, M. H., LUTHRA, H. S. & ET AL. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31, 315-24.
- ARROYO, J. D., CHEVILLET, J. R., KROH, E. M., RUF, I. K., PRITCHARD, C. C., GIBSON, D. F., MITCHELL, P. S., BENNETT, C. F., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L. & STIREWALT, D. L. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 5003-5008.
- BAKA, Z., BUZAS, E. & NAGY, G. 2009. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther*, 11, 238.
- BALANDRAUD, N., ROUDIER, J. & ROUDIER, C. 2004. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 3, 362-7.
- BARTOŠÍK, M. & JIRÁKOVÁ, L. 2018. Current Methods of microRNA Analysis. *Klin Onkol*, 31, 93-101.
- BAYLIN, S. B. & JONES, P. A. 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*, 11, 726-34.
- BEYER, C., ZAMPETAKI, A., LIN, N.-Y., KLEYER, A., PERRICONE, C., IAGNOCCO, A., DISTLER, A., LANGLEY, S. R., GELSE, K. & SESSELMANN, S. 2014. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, annrheumdis-2013-204698.
- BHAYANI, M. K., CALIN, G. A. & LAI, S. Y. 2012. Functional relevance of miRNA sequences in human disease. *Mutat Res*, 731, 14-9.
- BLONDAL, T., JENSBY NIELSEN, S., BAKER, A., ANDREASEN, D., MOURITZEN, P., WRANG TEILUM, M. & DAHLSVEEN, I. K. 2013. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, 59, S1-6.

- BLÜML, S., BONELLI, M., NIEDERREITER, B., PUCHNER, A., MAYR, G., HAYER, S., KOENDERS, M. I., VAN DEN BERG, W. B., SMOLEN, J. & REDLICH, K. 2011. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, 63, 1281-8.
- BORCHERT, G. M., LANIER, W. & DAVIDSON, B. L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 1097-101.
- BOWNESS, P. 2015. Hla-B27. *Annu Rev Immunol*, 33, 29-48.
- BRAUN, J., VAN DEN BERG, R., BARALIAKOS, X., BOEHM, H., BURGOS-VARGAS, R., COLLANTES-ESTEVEZ, E., DAGFINRUD, H., DIJKMANS, B., DOUGADOS, M., EMERY, P., GEHER, P., HAMMOUDEH, M., INMAN, R. D., JONGKEES, M., KHAN, M. A., KILTZ, U., KVIEN, T., LEIRISALO-REPO, M., MAKSYMOWYCH, W. P., OLIVIERI, I., PAVELKA, K., SIEPER, J., STANISLAWSKA-BIERNAT, E., WENDLING, D., OZGOCMEN, S., VAN DROGEN, C., VAN ROYEN, B. & VAN DER HEIJDE, D. 2011. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 70, 896-904.
- BRAUN, J., VAN DER HEIJDE, D., DOUGADOS, M., EMERY, P., KHAN, M. A., SIEPER, J. & VAN DER LINDEN, S. 2002. Staging of patients with ankylosing spondylitis: a preliminary proposal. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 3, iii9-23.
- CALIN, G. A., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F. & CROCE, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15524-9.
- CARLSEN, A. L., SCHETTER, A. J., NIELSEN, C. T., LOOD, C., KNUDSEN, S., VOSS, A., HARRIS, C. C., HELLMARK, T., SEGELMARK, M. & JACOBSEN, S. 2013. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 65, 1324-1334.
- CASTRO-VILLEGAS, C., PEREZ-SANCHEZ, C., ESCUDERO, A., FILIPESCU, I., VERDU, M., RUIZ-LIMON, P., AGUIRRE, M. A., JIMENEZ-GOMEZ, Y., FONT, P., RODRIGUEZ-ARIZA, A., PEINADO, J. R., COLLANTES-ESTEVEZ, E., GONZALEZ-CONEJERO, R., MARTINEZ, C., BARBARROJA, N. & LOPEZ-PEDRERA, C. 2015. Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNFalpha. *Arthritis Res Ther*, 17, 49.
- CATRINA, A. I., YTTERBERG, A. J., REYNISDOTTIR, G., MALMSTRÖM, V. & KLARESKOG, L. 2014. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 10, 645-53.
- CICI, D., CORRADO, A., ROTONDO, C. & CANTATORE, F. P. 2019. Wnt Signaling and Biological Therapy in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. *Int J Mol Sci*, 20.
- CIECHOMSKA, M., BONEK, K., MERDAS, M., ZARECKI, P., SWIERKOT, J., GLUSZKO, P., BOGUNIA-KUBIK, K. & MASLINSKI, W. 2018. Changes in MiRNA-5196 Expression as a Potential Biomarker of Anti-TNF-alpha Therapy in Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 66, 389-397.
- CIMMINO, A., CALIN, G. A., FABBRI, M., IORIO, M. V., FERRACIN, M., SHIMIZU, M., WOJCIK, S. E., AQEILAN, R. I., ZUPO, S., DONO, M., RASSENTI, L., ALDER, H., VOLINIA, S., LIU, C. G., KIPPS, T. J., NEGRINI, M. & CROCE, C. M. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13944-9.

- COCUCCI, E., RACCHETTI, G. & MELDOLESI, J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19, 43-51.
- COPE, A. P. 2017. Emerging therapies for pre-RA. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 31, 99-111.
- CORR, M. 2014. Wnt signaling in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*, 33, 759-62.
- CREEMERS, E. E., TIJSEN, A. J. & PINTO, Y. M. 2012. Circulating microRNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation research*, 110, 483-495.
- CUADRA, V. M. B., GONZÁLEZ-HUERTA, N. C., ROMERO-CÓRDOBA, S., HIDALGO-MIRANDA, A. & MIRANDA-DUARTE, A. 2014. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PloS one*, 9, e97690.
- DE PLANELL-SAGUER, M. & RODICIO, M. C. 2013. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem*, 46, 869-78.
- DONG, C., ZHOU, Q. & FU, T. 2019a. Circulating Exosomes Derived-miR-146a from Systemic Lupus Erythematosus Patients Regulates Senescence of Mesenchymal Stem Cells. 2019, 6071308.
- DONG, Z., JIANG, H. & JIAN, X. 2019b. Change of miRNA expression profiles in patients with knee osteoarthritis before and after celecoxib treatment. 33, e22648.
- DOUGADOS, M., VAN DER HEIJDE, D., SIEPER, J., BRAUN, J., MAKSYMOWYCH, W. P., CITERA, G., MICELI-RICHARD, C., WEI, J. C., PEDERSEN, R., BONIN, R., RAHMAN, M. U., LOGEART, I., WAJDULA, J., KOENIG, A. S., VLAHOS, B., ALVAREZ, D. & BUKOWSKI, J. F. 2014. Symptomatic efficacy of etanercept and its effects on objective signs of inflammation in early nonradiographic axial spondyloarthritis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheumatol*, 66, 2091-102.
- DU, J., ZHANG, F. & GUO, J. 2018. miR-137 decreases proliferation, migration and invasion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Mol Med Rep*, 17, 3312-3317.
- DUROUX-RICHARD, I., PERS, Y.-M., FABRE, S., AMMARI, M., BAETEN, D., CARTRON, G., TOUITOU, I., JORGENSEN, C. & APPARAILLY, F. 2014. Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Mediators of inflammation*, 2014.
- ESTELLER, M. 2011. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12, 861-74.
- EULALIO, A., HUNTZINGER, E., NISHIHARA, T., REHWINKEL, J., FAUSER, M. & IZAUERRALDE, E. 2009. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA*, 15, 21-32.
- FABBRI, M., PAONE, A., CALORE, F., GALLI, R., GAUDIO, E., SANTHANAM, R., LOVAT, F., FADDA, P., MAO, C., NUOVO, G. J., ZANESI, N., CRAWFORD, M., OZER, G. H., WERNICKE, D., ALDER, H., CALIGIURI, M. A., NANA-SINKAM, P., PERROTTI, D. & CROCE, C. M. 2012. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2110-6.
- FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S. N. & SONENBERG, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102-14.
- FILKOVA, M., ARADI, B., SENOLT, L., OSPELT, C., VETTORI, S., MANN, H., FILER, A., RAZA, K., BUCKLEY, C. D., SNOW, M., VENCOSKY, J., PAVELKA, K., MICHEL, B. A., GAY, R. E., GAY, S. & JUNGEL, A. 2014. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 73, 1898-904.



- FORMAN, J. J., LEGESSE-MILLER, A. & COLLER, H. A. 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14879-84.
- FUKUDA, T., OCHI, H., SUNAMURA, S., HAIDEN, A., BANDO, W., INOSE, H., OKAWA, A., ASOU, Y. & TAKEDA, S. 2015. MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. *FEBS Lett*, 589, 3302-8.
- GARCHOW, B. G., BARTULOS ENCINAS, O., LEUNG, Y. T., TSAO, P. Y., EISENBERG, R. A., CARICCHIO, R., OBAD, S., PETRI, A., KAUPPINEN, S. & KIRIAKIDOU, M. 2011. Silencing of microRNA-21 in vivo ameliorates autoimmune splenomegaly in lupus mice. *EMBO Mol Med*, 3, 605-15.
- GE, Q., ZHOU, Y., LU, J., BAI, Y., XIE, X. & LU, Z. 2014. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*, 19, 1568-75.
- GERLAG, D. M., SAFY, M., MAIJER, K. I., TANG, M. W., TAS, S. W., STARMANS-KOOL, M. J. F., VAN TUBERGEN, A., JANSSEN, M., DE HAIR, M., HANSSON, M., DE VRIES, N., ZWINDERMAN, A. H. & TAK, P. P. 2019. Effects of B-cell directed therapy on the preclinical stage of rheumatoid arthritis: the PRAIRI study. *Ann Rheum Dis*, 78, 179-185.
- GHORAI, A. & GHOSH, U. 2014. miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Front Genet*, 5, 100.
- GILAD, S., MEIRI, E., YOGEV, Y., BENJAMIN, S., LEBANONY, D., YERUSHALMI, N., BENJAMIN, H., KUSHNIR, M., CHOLAKH, H. & MELAMED, N. 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PloS one*, 3, e3148.
- GREGORY, R. I., YAN, K. P., AMUTHAN, G., CHENDRIMADA, T., DORATOTAJ, B., COOCH, N. & SHIEKHATTAR, R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432, 235-40.
- HAMMITZSCH, A., LORENZ, G. & MOOG, P. 2020. Impact of Janus Kinase Inhibition on the Treatment of Axial Spondyloarthropathies. *Front Immunol*, 11, 591176.
- HAN, J., LEE, Y., YEOM, K. H., NAM, J. W., HEO, I., RHEE, J. K., SOHN, S. Y., CHO, Y., ZHANG, B. T. & KIM, V. N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125, 887-901.
- HAO, W., LIU, H., ZHOU, L., SUN, Y., SU, H., NI, J., HE, T., SHI, P. & WANG, X. 2018. MiR-145 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells through targeting FoxO1. 243, 386-393.
- HIRAI, T., IKEDA, K., TSUSHIMA, H., FUJISHIRO, M., HAYAKAWA, K., YOSHIDA, Y., MORIMOTO, S., YAMAJI, K., TAKASAKI, Y., TAKAMORI, K., TAMURA, N. & SEKIGAWA, I. 2018. Circulating plasma microRNA profiling in patients with polymyositis/dermatomyositis before and after treatment: miRNA may be associated with polymyositis/dermatomyositis. *Inflamm Regen*, 38, 1.
- HONG, H., YANG, H. & XIA, Y. 2018. Circulating miR-10a as Predictor of Therapy Response in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Methotrexate. *Curr Pharm Biotechnol*, 19, 79-86.
- HOU, J., WANG, P., LIN, L., LIU, X., MA, F., AN, H., WANG, Z. & CAO, X. 2009. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol*, 183, 2150-8.
- HUANG, H. C., YU, H. R., HUANG, L. T., HUANG, H. C., CHEN, R. F., LIN, I. C., OU, C. Y., HSU, T. Y. & YANG, K. D. 2012. miRNA-125b regulates TNF-alpha production in CD14+ neonatal monocytes via post-transcriptional regulation. *J Leukoc Biol*, 92, 171-82.

- CHEN, L., AL-MOSSAWI, M. H., RIDLEY, A., SEKINE, T., HAMMITZSCH, A., DE WIT, J., SIMONE, D., SHI, H., PENKAVA, F., KUROWSKA-STOLARSKA, M., PULYAKHINA, I., KNIGHT, J. C., KIM, T. J. & BOWNESS, P. 2017. miR-10b-5p is a novel Th17 regulator present in Th17 cells from ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 76, 620-625.
- CHEN, X., BA, Y., MA, L., CAI, X., YIN, Y., WANG, K., GUO, J., ZHANG, Y., CHEN, J. & GUO, X. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*, 18, 997-1006.
- CHEN, Y., WANG, X., YANG, M., RUAN, W., WEI, W., GU, D., WANG, J., GUO, X., GUO, L. & YUAN, Y. 2018. miR-145-5p Increases Osteoclast Numbers In Vitro and Aggravates Bone Erosion in Collagen-Induced Arthritis by Targeting Osteoprotegerin. *Med Sci Monit*, 24, 5292-5300.
- CHOURI, E., SERVAAS, N. H., BEKKER, C. P. J., AFFANDI, A. J., COSSU, M., HILLEN, M. R., ANGIOLILLI, C., MERTENS, J. S., VAN DEN HOOGEN, L. L., SILVA-CARDOSO, S., VAN DER KROEF, M., VAZIRPANA, N., WICHERS, C. G. K., CARVALHEIRO, T., BLOKLAND, S. L. M., GIOVANNONE, B., PORRETTI, L., MARUT, W., VIGONE, B., VAN ROON, J. A. G., BERETTA, L., ROSSATO, M. & RADSTAKE, T. 2018. Serum microRNA screening and functional studies reveal miR-483-5p as a potential driver of fibrosis in systemic sclerosis. *J Autoimmun*.
- IGUCHI, H., KOSAKA, N. & OCHIYA, T. 2010. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol*, 3, 478-81.
- INTERNATIONAL GENETICS OF ANKYLOSING SPONDYLITIS, C., CORTES, A., HADLER, J., POINTON, J. P., ROBINSON, P. C., KARADERI, T., LEO, P., CREMIN, K., PRYCE, K., HARRIS, J., LEE, S., JOO, K. B., SHIM, S. C., WEISMAN, M., WARD, M., ZHOU, X., GARCHON, H. J., CHIOCCHIA, G., NOSSENT, J., LIE, B. A., FORRE, O., TUOMILEHTO, J., LAIHO, K., JIANG, L., LIU, Y., WU, X., BRADBURY, L. A., ELEWAUT, D., BURGOS-VARGAS, R., STEBBINGS, S., APPLETON, L., FARRAH, C., LAU, J., KENNA, T. J., HAROON, N., FERREIRA, M. A., YANG, J., MULERO, J., FERNANDEZ-SUEIRO, J. L., GONZALEZ-GAY, M. A., LOPEZ-LARREA, C., DELOUKAS, P., DONNELLY, P., AUSTRALO-ANGLO-AMERICAN SPONDYLOARTHRITIS, C., GROUPE FRANCAISE D'ETUDE GENETIQUE DES, S., NORD-TRONDELAGE HEALTH, S., SPONDYLOARTHRITIS RESEARCH CONSORTIUM OF, C., WELLCOME TRUST CASE CONTROL, C., BOWNESS, P., GAFNEY, K., GASTON, H., GLADMAN, D. D., RAHMAN, P., MAKSYMOWYCH, W. P., XU, H., CRUSIUS, J. B., VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E., CHOU, C. T., VALLE-ONATE, R., ROMERO-SANCHEZ, C., HANSEN, I. M., PIMENTEL-SANTOS, F. M., INMAN, R. D., VIDEM, V., MARTIN, J., BREBAN, M., REVEILLE, J. D., EVANS, D. M., KIM, T. H., WORDSWORTH, B. P. & BROWN, M. A. 2013. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet*, 45, 730-8.
- IORIO, M. V. & CROCE, C. M. 2012. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J*, 18, 215-22.
- IORIO, M. V., PIOVAN, C. & CROCE, C. M. 2010. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1799, 694-701.
- IWAKAWA, H. O. & TOMARI, Y. 2015. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, 25, 651-665.
- JANSSEN, H. L., REESINK, H. W., LAWITZ, E. J., ZEUZEM, S., RODRIGUEZ-TORRES, M., PATEL, K., VAN DER MEER, A. J., PATICK, A. K., CHEN, A., ZHOU, Y.,

- PERSSON, R., KING, B. D., KAUPPINEN, S., LEVIN, A. A. & HODGES, M. R. 2013. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*, 368, 1685-94.
- JIANG, Y. & WANG, L. 2016. Role of histone deacetylase 3 in ankylosing spondylitis via negative feedback loop with microRNA-130a and enhancement of tumor necrosis factor-1alpha expression in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Med Rep*, 13, 35-40.
- JIN, F., HU, H., XU, M., ZHAN, S., WANG, Y., ZHANG, H. & CHEN, X. 2018. Serum microRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 9, 2381.
- JOPLING, C. L., SCHUTZ, S. & SARNOW, P. 2008. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, 4, 77-85.
- JOPLING, C. L., YI, M., LANCASTER, A. M., LEMON, S. M. & SARNOW, P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309, 1577-81.
- KABEKKODU, S. P., SHUKLA, V., VARGHESE, V. K., J, D. S., CHAKRABARTY, S. & SATYAMOORTHY, K. 2018. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. 93, 1955-1986.
- KALLBERG, H., DING, B., PADYUKOV, L., BENGTSSON, C., RONNELID, J., KLARESKOG, L., ALFREDSSON, L. & GROUP, E. S. 2011. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis*, 70, 508-11.
- KIM, V. N. 2004. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, 14, 156-9.
- KIM, V. N., HAN, J. & SIOMI, M. C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126-39.
- KIRSCHNER, M. B., KAO, S. C., EDELMAN, J. J., ARMSTRONG, N. J., VALLELY, M. P., VAN ZANDWIJK, N. & REID, G. 2011. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*, 6, e24145.
- KOBA, S., JINNIN, M., INOUE, K., NAKAYAMA, W., HONDA, N., MAKINO, K., KAJIHARA, I., MAKINO, T., FUKUSHIMA, S. & IHN, H. 2013. Expression analysis of multiple microRNAs in each patient with scleroderma. *Experimental dermatology*, 22, 489-491.
- KOGURE, T., LIN, W. L., YAN, I. K., BRACONI, C. & PATEL, T. 2011. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*, 54, 1237-48.
- KONG, R., GAO, J., SI, Y. & ZHAO, D. 2017. Combination of circulating miR-19b-3p, miR-122-5p and miR-486-5p expressions correlates with risk and disease severity of knee osteoarthritis. *Am J Transl Res*, 9, 2852-2864.
- KOOK, H. Y., JIN, S. H., PARK, P. R., LEE, S. J., SHIN, H. J. & KIM, T. J. 2019. Serum miR-214 as a novel biomarker for ankylosing spondylitis. 22, 1196-1201.
- KOPPERS-LALIC, D., HACKENBERG, M., BIJNSDORP, I. V., VAN EIJDHOVEN, M. A. J., SADEK, P., SIE, D., ZINI, N., MIDDELDORP, J. M., YLSTRA, B., DE MENEZES, R. X., WURDINGER, T., MEIJER, G. A. & PEGTEL, D. M. 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep*, 8, 1649-1658.
- KOSAKA, N., IGUCHI, H. & OCHIYA, T. 2010a. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101, 2087-92.

- KOSAKA, N., IGUCHI, H., YOSHIOKA, Y., TAKESHITA, F., MATSUKI, Y. & OCHIYA, T. 2010b. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 285, 17442-52.
- KOSAKA, N., IZUMI, H., SEKINE, K. & OCHIYA, T. 2010c. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1, 7.
- KOTA, J., CHIVUKULA, R. R., O'DONNELL, K. A., WENTZEL, E. A., MONTGOMERY, C. L., HWANG, H. W., CHANG, T. C., VIVEKANANDAN, P., TORBENSON, M., CLARK, K. R., MENDELL, J. R. & MENDELL, J. T. 2009. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, 137, 1005-17.
- KROH, E. M., PARKIN, R. K., MITCHELL, P. S. & TEWARI, M. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 298-301.
- KROL, J., LOEDIGE, I. & FILIPOWICZ, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
- KUROWSKA-STOLARSKA, M., ALIVERNINI, S., BALLANTINE, L. E., ASQUITH, D. L., MILLAR, N. L., GILCHRIST, D. S., REILLY, J., IERNA, M., FRASER, A. R., STOLARSKI, B., MCSHARRY, C., HUEBER, A. J., BAXTER, D., HUNTER, J., GAY, S., LIEW, F. Y. & MCINNES, I. B. 2011. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11193-8.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-8.
- LAM, J. K., CHOW, M. Y., ZHANG, Y. & LEUNG, S. W. 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4, e252.
- LANFORD, R. E., HILDEBRANDT-ERIKSEN, E. S., PETRI, A., PERSSON, R., LINDOW, M., MUNK, M. E., KAUPPINEN, S. & ORUM, H. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327, 198-201.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-60.
- LEFÈVRE, S., KNEDLA, A., TENNIE, C., KAMPMANN, A., WUNRAU, C., DINSER, R., KORB, A., SCHNÄKER, E. M., TARNER, I. H., ROBBINS, P. D., EVANS, C. H., STÜRZ, H., STEINMEYER, J., GAY, S., SCHÖLMERICH, J., PAP, T., MÜLLER-LADNER, U. & NEUMANN, E. 2009. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*, 15, 1414-20.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- LI, C., ZHANG, P. & GU, J. 2015. miR-29a modulates tumor necrosis factor-alpha-induced osteogenic inhibition by targeting Wnt antagonists. *Dev Growth Differ*, 57, 264-73.
- LI, X., LV, Q., TU, L., ZHAO, M., ZHANG, P., LI, Q., WEI, Q., CAO, S. & GU, J. 2019. Aberrant expression of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells as candidate biomarkers in patients with axial spondyloarthritis. *Int J Rheum Dis*, 22, 1188-1195.
- LI, Y., ZHOU, H. C., ZHANG, Y. & HUANG, H. 2020. MicroRNA-625-3p inhibits gastric cancer metastasis through modulating EZH2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24, 1177-1185.

- LI, Y. T., CHEN, S. Y., WANG, C. R., LIU, M. F., LIN, C. C., JOU, I. M., SHIAU, A. L. & WU, C. L. 2012. Brief report: amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223. *Arthritis Rheum*, 64, 3240-5.
- LI, Z., JIANG, C., YE, C., ZHU, S., CHEN, X., WU, W. K. & QIAN, W. 2018. miR-10a-5p, miR-99a-5p and miR-21-5p are steroid-responsive circulating microRNAs. *Am J Transl Res*, 10, 1490-1497.
- LI, Z., WONG, S. H., SHEN, J., CHAN, M. T. V. & WU, W. K. K. 2016. The Role of MicroRNAs in Ankylosing Spondylitis. *Medicine (Baltimore)*, 95, e3325.
- LIU, J., FEI, D., XING, J. & DU, J. 2017. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomed Pharmacother*, 96, 173-181.
- LIU, X., NI, S., LI, C., XU, N., CHEN, W., WU, M., VAN WIJNEN, A. J. & WANG, Y. 2019. Circulating microRNA-23b as a new biomarker for rheumatoid arthritis. *Gene*, 712, 143911.
- LIU, Y., ZHANG, X. L., LI, X. F., TANG, Y. C. & ZHAO, X. 2018. miR-212-3p reduced proliferation, and promoted apoptosis of fibroblast-like synoviocytes via down-regulating SOX5 in rheumatoid arthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22, 461-471.
- LORIES, R. J., LUYTEN, F. P. & DE VLAM, K. 2009. Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*, 11, 221.
- LU, M. C., YU, C. L., CHEN, H. C., YU, H. C., HUANG, H. B. & LAI, N. S. 2014. Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production. *Clin Exp Immunol*, 177, 641-51.
- LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E. & KUTAY, U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, 95-8.
- LUO, X., ZHANG, L., LI, M., ZHANG, W., LENG, X., ZHANG, F., ZHAO, Y. & ZENG, X. 2013. The role of miR-125b in T lymphocytes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*, 31, 263-71.
- MAGGI, L. B., KUCHENRUETHER, M., DADEY, D. Y., SCHWOPE, R. M., GRISENDI, S., TOWNSEND, R. R., PANDOLFI, P. P. & WEBER, J. D. 2008. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Molecular and cellular biology*, 28, 7050-7065.
- MAGREY, M. N., HAQQI, T. & HASEEB, A. 2016. Identification of plasma microRNA expression profile in radiographic axial spondyloarthritis-a pilot study. *Clin Rheumatol*, 35, 1323-7.
- MAKINO, K., JINNIN, M., KAJIHARA, I., HONDA, N., SAKAI, K., MASUGUCHI, S., FUKUSHIMA, S., INOUE, Y. & IHN, H. 2012. Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis. *Clinical and experimental dermatology*, 37, 34-39.
- MCDONALD, J. S., MILOSEVIC, D., REDDI, H. V., GREBE, S. K. & ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. 2011. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*, 57, 833-40.
- MCINNES, I. B. & SCHETT, G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7, 429-42.
- MI, S., ZHANG, J., ZHANG, W. & HUANG, R. S. 2013. Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases. *Microna*, 2, 64-72.
- MICHAEL, A., BAJRACHARYA, S. D., YUEN, P. S., ZHOU, H., STAR, R. A., ILLEI, G. G. & ALEVIZOS, I. 2010. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*, 16, 34-8.
- MISUNOVA, M., SALINAS-RIESTER, G., LUTHIN, S., POMMERENKE, C., HUSAKOVA, M., ZAVADA, J., KLEIN, M., PLESTILOVA, L., SVITALKOVA, T.,

- CEPEK, P., NOVOTA, P. & VENCovsky, J. 2016. Microarray analysis of circulating micro RNAs in the serum of patients with polymyositis and dermatomyositis reveals a distinct disease expression profile and is associated with disease activity. *Clin Exp Rheumatol*, 34, 17-24.
- MITCHELL, P. S., PARKIN, R. K., KROH, E. M., FRITZ, B. R., WYMAN, S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., PETERSON, A., NOTEBOOM, J., O'BRIANT, K. C., ALLEN, A., LIN, D. W., URBAN, N., DRESCHER, C. W., KNUDSEN, B. S., STIREWALT, D. L., GENTLEMAN, R., VESSELLA, R. L., NELSON, P. S., MARTIN, D. B. & TEWARI, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10513-8.
- MITTELBRUNN, M., GUTIERREZ-VAZQUEZ, C., VILLARROYA-BELTRI, C., GONZALEZ, S., SANCHEZ-CABO, F., GONZALEZ, M. A., BERNAD, A. & SANCHEZ-MADRID, F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2, 282.
- MOHAMMADI, H., HEMMATZADEH, M., BABAIE, F., GOWHARI SHABGAH, A., AZIZI, G., HOSSEINI, F., MAJIDI, J. & BARADARAN, B. 2018. MicroRNA implications in the etiopathogenesis of ankylosing spondylitis. *J Cell Physiol*, 233, 5564-5573.
- MOHAN, V. K., GANESAN, N. & GOPALAKRISHNAN, R. 2014. Association of susceptible genetic markers and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Genet*, 93, 597-605.
- MOUSAVI, M. J., JAMSHIDI, A., CHOPRA, A., ASLANI, S., AKHLAGHI, M. & MAHMOUDI, M. 2018. Implications of the noncoding RNAs in rheumatoid arthritis pathogenesis. *J Cell Physiol*, 234, 335-347.
- MÜLLER-LADNER, U., KRIEGSMANN, J., FRANKLIN, B. N., MATSUMOTO, S., GEILER, T., GAY, R. E. & GAY, S. 1996. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, 149, 1607-15.
- MURATA, K., FURU, M., YOSHITOMI, H., ISHIKAWA, M., SHIBUYA, H., HASHIMOTO, M., IMURA, Y., FUJII, T., ITO, H., MIMORI, T. & MATSUDA, S. 2013. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 8, e69118.
- MURATA, K., YOSHITOMI, H., TANIDA, S., ISHIKAWA, M., NISHITANI, K., ITO, H. & NAKAMURA, T. 2010. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*, 12, 1.
- NAGATA, Y., NAKASA, T., MOCHIZUKI, Y., ISHIKAWA, M., MIYAKI, S., SHIBUYA, H., YAMASAKI, K., ADACHI, N., ASAHARA, H. & OCHI, M. 2009. Induction of apoptosis in the synovium of mice with autoantibody-mediated arthritis by the intraarticular injection of double-stranded MicroRNA-15a. *Arthritis Rheum*, 60, 2677-83.
- NAKAMACHI, Y., KAWANO, S., TAKENOKUCHI, M., NISHIMURA, K., SAKAI, Y., CHIN, T., SAURA, R., KUROSAKA, M. & KUMAGAI, S. 2009. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 60, 1294-304.
- NAKAMACHI, Y., OHNUMA, K., UTO, K., NOGUCHI, Y., SAEGUSA, J. & KAWANO, S. 2016. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ann Rheum Dis*, 75, 601-8.
- NAKASA, T., SHIBUYA, H., NAGATA, Y., NIIMOTO, T. & OCHI, M. 2011. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 63, 1582-90.

- NAKHJAVANI, M., ETEMADI, J., POURLAK, T., MIRHOSAINI, Z., ZUNUNI VAHED, S. & ABEDIAZAR, S. 2019. Plasma levels of miR-21, miR-150, miR-423 in patients with lupus nephritis. *Iran J Kidney Dis*, 13, 198-206.
- NANKI, T., SHIMAOKA, T., HAYASHIDA, K., TANIGUCHI, K., YONEHARA, S. & MIYASAKA, N. 2005. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 52, 3004-14.
- NAVARRO-QUIROZ, E., PACHECO-LUGO, L., NAVARRO-QUIROZ, R., LORENZI, H., ESPANA-PUCCINI, P., DIAZ-OLMOS, Y., ALMENDRALES, L., OLAVE, V., GONZALEZ-TORRES, H., DIAZ-PEREZ, A., DOMINGUEZ, A., IGLESIAS, A., GARCIA, R. & AROCA-MARTINEZ, G. 2017. Profiling analysis of circulating microRNA in peripheral blood of patients with class IV lupus nephritis. *PLoS One*, 12, e0187973.
- NELL, V. P., MACHOLD, K. P., EBERL, G., STAMM, T. A., UFFMANN, M. & SMOLEN, J. S. 2004. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 43, 906-14.
- NIEDERER, F., TRENKMANN, M., OSPELT, C., KAROUZAKIS, E., NEIDHART, M., STANCZYK, J., KOLLING, C., GAY, R. E., DETMAR, M., GAY, S., JUNGEL, A. & KYBURZ, D. 2012. Down-regulation of microRNA-34a\* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum*, 64, 1771-9.
- OKAMURA, K., HAGEN, J. W., DUAN, H., TYLER, D. M. & LAI, E. C. 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130, 89-100.
- OSPELT, C., GAY, S. & KLEIN, K. 2017. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol*, 39, 409-419.
- OTTOSEN, S., PARSLEY, T. B., YANG, L., ZEH, K., VAN DOORN, L. J., VAN DER VEER, E., RANEY, A. K., HODGES, M. R. & PATICK, A. K. 2015. In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 599-608.
- OUBOUSSAD, L., HUNT, L., HENSOR, E. M. A., NAM, J. L., BARNES, N. A., EMERY, P., MCDERMOTT, M. F. & BUCH, M. H. 2017. Profiling microRNAs in individuals at risk of progression to rheumatoid arthritis. 19, 288.
- PAN, B. T. & JOHNSTONE, R. M. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33, 967-78.
- PAULEY, K. M., SATOH, M., CHAN, A. L., BUBB, M. R., REEVES, W. H. & CHAN, E. K. 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 10, R101.
- PEDERSEN, S. J. & MAKSYMOWYCH, W. P. 2019. The Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis: an Update. *Curr Rheumatol Rep*, 21, 58.
- PEGTEL, D. M., COSMOPOULOS, K., THORLEY-LAWSON, D. A., VAN EIJNDHOVEN, M. A., HOPMANS, E. S., LINDENBERG, J. L., DE GRUIJL, T. D., WURDINGER, T. & MIDDELDORP, J. M. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 6328-33.
- PENG, J. S., CHEN, S. Y., WU, C. L., CHONG, H. E., DING, Y. C., SHIAU, A. L. & WANG, C. R. 2016. Amelioration of Experimental Autoimmune Arthritis Through Targeting of Synovial Fibroblasts by Intraarticular Delivery of MicroRNAs 140-3p and 140-5p. *Arthritis Rheumatol*, 68, 370-81.
- PEREZ-SANCHEZ, C., FONT-UGALDE, P., RUIZ-LIMON, P., LOPEZ-PEDRERA, C., CASTRO-VILLEGAS, M. C., ABALOS-AGUILERA, M. C., BARBARROJA, N., ARIAS-DE LA ROSA, I., LOPEZ-MONTILLA, M. D., ESCUDERO-CONTRERAS,

- A., LOPEZ-MEDINA, C., COLLANTES-ESTEVEZ, E. & JIMENEZ-GOMEZ, Y. 2018. Circulating microRNAs as potential biomarkers of disease activity and structural damage in ankylosing spondylitis patients. *Hum Mol Genet*, 27, 875-890.
- PODDUBNYI, D. & SIEPER, J. 2017. Mechanism of New Bone Formation in Axial Spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 19, 55.
- POPE, R. M. 2002. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2, 527-35.
- PRAJZLEROVA, K., GROBELNA, K., PAVELKA, K., SENOLT, L. & FILKOVA, M. 2016. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun Rev*, 15, 501-9.
- PRATT, A. J. & MACRAE, I. J. 2009. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 284, 17897-901.
- PRITCHARD, C. C., KROH, E., WOOD, B., ARROYO, J. D., DOUGHERTY, K. J., MIYAJI, M. M., TAIT, J. F. & TEWARI, M. 2012. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5, 492-497.
- PRUIJN, G. J. 2015. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Front Immunol*, 6, 192.
- QIAN, B. P., JI, M. L., QIU, Y., WANG, B., YU, Y., SHI, W. & LUO, Y. F. 2016. Identification of Serum miR-146a and miR-155 as Novel Noninvasive Complementary Biomarkers for Ankylosing Spondylitis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 41, 735-42.
- RAJARAM, M. V., NI, B., MORRIS, J. D., BROOKS, M. N., CARLSON, T. K., BAKTHAVACHALU, B., SCHOENBERG, D. R., TORRELLES, J. B. & SCHLESINGER, L. S. 2011. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 17408-13.
- RANGANATHAN, V., GRACEY, E., BROWN, M. A., INMAN, R. D. & HAROON, N. 2017. Pathogenesis of ankylosing spondylitis - recent advances and future directions. *Nat Rev Rheumatol*, 13, 359-367.
- RANI, S., RYAN, A. E., GRIFFIN, M. D. & RITTER, T. 2015. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*, 23, 812-823.
- RANTAPAA-DAHLQVIST, S., DE JONG, B. A., BERGLIN, E., HALLMANS, G., WADELL, G., STENLUND, H., SUNDIN, U. & VAN VENROOIJ, W. J. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 48, 2741-9.
- RASMUSSEN, K. D., SIMMINI, S., ABREU-GOODGER, C., BARTONICEK, N., DI GIACOMO, M., BILBAO-CORTES, D., HOROS, R., VON LINDERN, M., ENRIGHT, A. J. & O'CARROLL, D. 2010. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med*, 207, 1351-8.
- RAZA, K., KLARESKOG, L. & HOLERS, V. M. 2016. Predicting and preventing the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 55, 1-3.
- REINHART, B. J., SLACK, F. J., BASSON, M., PASQUINELLI, A. E., BETTINGER, J. C., ROUGVIE, A. E., HORVITZ, H. R. & RUVKUN, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-6.
- ROSSI, R. L., ROSSETTI, G., WENANDY, L., CURTI, S., RIPAMONTI, A., BONNAL, R. J., BIROLO, R. S., MORO, M., CROSTI, M. C., GRUARIN, P., MAGLIE, S., MARABITA, F., MASCHERONI, D., PARENTE, V., COMELLI, M., TRABUCCHI, E., DE FRANCESCO, R., GEGINAT, J., ABRIGNANI, S. & PAGANI, M. 2011. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol*, 12, 796-803.



- RUDWALEIT, M., JURIK, A. G., HERMANN, K. G., LANDEWE, R., VAN DER HEIJDE, D., BARALIAKOS, X., MARZO-ORTEGA, H., OSTERGAARD, M., BRAUN, J. & SIEPER, J. 2009a. Defining active sacroiliitis on magnetic resonance imaging (MRI) for classification of axial spondyloarthritis: a consensual approach by the ASAS/OMERACT MRI group. *Ann Rheum Dis*, 68, 1520-7.
- RUDWALEIT, M., LANDEWE, R., VAN DER HEIJDE, D., LISTING, J., BRANDT, J., BRAUN, J., BURGOS-VARGAS, R., COLLANTES-ESTEVEZ, E., DAVIS, J., DIJKMANS, B., DOUGADOS, M., EMERY, P., VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E., INMAN, R., KHAN, M. A., LEIRISALO-REPO, M., VAN DER LINDEN, S., MAKSYMOWYCH, W. P., MIELANTS, H., OLIVIERI, I., STURROCK, R., DE VLAM, K. & SIEPER, J. 2009b. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis*, 68, 770-6.
- RUPAIMOOLE, R. & SLACK, F. J. 2017. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 203-222.
- RUSEK, M., MICHALSKA-JAKUBUS, M., KOWAL, M., BELTOWSKI, J. & KRASOWSKA, D. 2019. A novel miRNA-4484 is up-regulated on microarray and associated with increased MMP-21 expression in serum of systemic sclerosis patients. *Sci Rep*, 9, 14264.
- SHIBUYA, H., NAKASA, T., ADACHI, N., NAGATA, Y., ISHIKAWA, M., DEIE, M., SUZUKI, O. & OCHI, M. 2013. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod Rheumatol*, 23, 674-85.
- SIEPER, J. & PODDUBNYI, D. 2017. Axial spondyloarthritis. *Lancet*, 390, 73-84.
- SIEPER, J., VAN DER HEIJDE, D., DOUGADOS, M., MEASE, P. J., MAKSYMOWYCH, W. P., BROWN, M. A., ARORA, V. & PANGAN, A. L. 2013. Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Ann Rheum Dis*, 72, 815-22.
- SING, T., JINNIN, M., YAMANE, K., HONDA, N., MAKINO, K., KAJIHARA, I., MAKINO, T., SAKAI, K., MASUGUCHI, S. & FUKUSHIMA, S. 2012. microRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma. *Rheumatology*, kes120.
- SKRZYPA, M., SZALA, D., GABLO, N., CZECH, J., PAJAK, J., KOPANSKA, M., TRZECIAK, M., GARGASZ, K., SNELA, S. & ZAWLIK, I. 2019. miRNA-146a-5p is upregulated in serum and cartilage samples of patients with osteoarthritis. *Pol Przegl Chir*, 91, 1-5.
- SMIGIELSKA-CZEPIEL, K., VAN DEN BERG, A., JELLEMA, P., VAN DER LEI, R. J., BIJZET, J., KLUIVER, J., BOOTS, A. M., BROUWER, E. & KROESEN, B. J. 2014. Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes Immun*, 15, 115-25.
- SMOLEN, J. S., LANDEWE, R. B. M., BIJLSMA, J. W. J., BURMESTER, G. R., DOUGADOS, M., KERSCHBAUMER, A., MCINNES, I. B., SEPRIANO, A., VAN VOLLENHOVEN, R. F., DE WIT, M., ALETAHA, D., ARINGER, M., ASKLING, J., BALSAL, A., BOERS, M., DEN BROEDER, A. A., BUCH, M. H., BUTTGEREIT, F., CAPORALI, R., CARDIEL, M. H., DE COCK, D., CODREANU, C., CUTOLO, M., EDWARDS, C. J., VAN EIJK-HUSTINGS, Y., EMERY, P., FINCKH, A., GOSSEC, L., GOTTENBERG, J. E., HETLAND, M. L., HUIZINGA, T. W. J., KOLOUMAS, M., LI, Z., MARIETTE, X., MULLER-LADNER, U., MYSLER, E. F., DA SILVA, J. A. P., POOR, G., POPE, J. E., RUBBERT-ROTH, A., RUYSSSEN-WITRAND, A.,

- SAAG, K. G., STRANGFELD, A., TAKEUCHI, T., VOSHAAR, M., WESTHOVENS, R. & VAN DER HEIJDE, D. 2020. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*, 79, 685-699.
- SODE, J., KRINTEL, S. B., CARLSEN, A. L., HETLAND, M. L., JOHANSEN, J. S., HORSLEV-PETERSEN, K., STENGAARD-PEDERSEN, K., ELLINGSEN, T., BURTON, M., JUNKER, P., OSTERGAARD, M. & HEEGAARD, N. H. H. 2018. Plasma MicroRNA Profiles in Patients with Early Rheumatoid Arthritis Responding to Adalimumab plus Methotrexate vs Methotrexate Alone: A Placebo-controlled Clinical Trial. *J Rheumatol*, 45, 53-61.
- STANCZYK, J., PEDRIOLI, D. M., BRENTANO, F., SANCHEZ-PERNAUTE, O., KOLLING, C., GAY, R. E., DETMAR, M., GAY, S. & KYBURZ, D. 2008. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 58, 1001-9.
- SUGATANI, T., VACHER, J. & HRUSKA, K. A. 2011. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood*, 117, 3648-57.
- SUGIYAMA, D., NISHIMURA, K., TAMAKI, K., TSUJI, G., NAKAZAWA, T., MORINOBU, A. & KUMAGAI, S. 2010. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*, 69, 70-81.
- TANAKA, S., SUTO, A., IKEDA, K., SANAYAMA, Y., NAKAGOMI, D., IWAMOTO, T., SUZUKI, K., KAMBE, N., MATSUE, H. & MATSUMURA, R. 2013. Alteration of circulating miRNAs in SSc: miR-30b regulates the expression of PDGF receptor  $\beta$ . *Rheumatology*, 52, 1963-1972.
- TANG, G. 2005. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*, 30, 106-14.
- TANG, R., LI, L., ZHU, D., HOU, D., CAO, T., GU, H., ZHANG, J., CHEN, J., ZHANG, C. Y. & ZEN, K. 2012. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res*, 22, 504-15.
- TATEIWA, D., YOSHIKAWA, H. & KAITO, T. 2019. Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells*, 8.
- TEN BRINCK, R. M., VAN STEENBERGEN, H. W., VAN DELFT, M. A. M., VERHEUL, M. K., TOES, R. E. M., TROUW, L. A. & VAN DER HELM-VAN MIL, A. H. M. 2017. The risk of individual autoantibodies, autoantibody combinations and levels for arthritis development in clinically suspect arthralgia. *Rheumatology (Oxford)*, 56, 2145-2153.
- TILI, E., MICHAILLE, J. J., CIMINO, A., COSTINEAN, S., DUMITRU, C. D., ADAIR, B., FABBRI, M., ALDER, H., LIU, C. G., CALIN, G. A. & CROCE, C. M. 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*, 179, 5082-9.
- TOLIA, N. H. & JOSHUA-TOR, L. 2007. Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol*, 3, 36-43.
- TRAJKOVSKI, M., HAUSSER, J., SOUTSCHEK, J., BHAT, B., AKIN, A., ZAVOLAN, M., HEIM, M. H. & STOFFEL, M. 2011. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 474, 649-53.
- TRENKMANN, M., BROCK, M., GAY, R. E., MICHEL, B. A., GAY, S. & HUBER, L. C. 2013. Tumor necrosis factor alpha-induced microRNA-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF-kappaB signaling. *Arthritis Rheum*, 65, 916-27.

- TURCHINOVICH, A., SAMATOV, T. R., TONEVITSKY, A. G. & BURWINKEL, B. 2013. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*, 4, 119.
- TURCHINOVICH, A., WEIZ, L., LANGHEINZ, A. & BURWINKEL, B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39, 7223-33.
- VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. & LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- VAN DER LINDEN, S., VALKENBURG, H. A. & CATS, A. 1984. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*, 27, 361-8.
- VAN DER VOORT, R., VAN LIESHOUT, A. W. T., TOONEN, L. W. J., SLOETJES, A. W., VAN DEN BERG, W. B., FIGDOR, C. G., RADSTAKE, T. R. D. J. & ADEMA, G. J. 2005. Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 1381-1391.
- VAN STEENBERGEN, H. W., ALETAHA, D., BEAART-VAN DE VOORDE, L. J., BROUWER, E., CODREANU, C., COMBE, B., FONSECA, J. E., HETLAND, M. L., HUMBY, F., KVIEN, T. K., NIEDERMANN, K., NUNO, L., OLIVER, S., RANTAPAA-DAHLQVIST, S., RAZA, K., VAN SCHAARDENBURG, D., SCHETT, G., DE SMET, L., SZUCS, G., VENCOVSKY, J., WILAND, P., DE WIT, M., LANDEWE, R. L. & VAN DER HELM-VAN MIL, A. H. 2017. EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 76, 491-496.
- VICKERS, K. C., PALMISANO, B. T., SHOUCRI, B. M., SHAMBUREK, R. D. & REMALEY, A. T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 13, 423-433.
- VILLARROYA-BELTRI, C., GUTIERREZ-VAZQUEZ, C., SANCHEZ-CABO, F., PEREZ-HERNANDEZ, D., VAZQUEZ, J., MARTIN-COFRECES, N., MARTINEZ-HERRERA, D. J., PASCUAL-MONTANO, A., MITTELBRUNN, M. & SANCHEZ-MADRID, F. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4, 2980.
- VISHNOI, A. & RANI, S. 2017. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*, 1509, 1-10.
- VISTBAKKA, J. & SUMELAHTI, M. L. 2018. Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. 138, 130-136.
- WAGNER, J., RIWANTO, M., BESLER, C., KNAU, A., FICHTLSCHERER, S., ROXE, T., ZEIHNER, A. M., LANDMESSER, U. & DIMMELER, S. 2013. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 1392-400.
- WANG, G., TAM, L.-S., LI, E. K.-M., KWAN, B. C.-H., CHOW, K.-M., LUK, C. C.-W., LI, P. K.-T. & SZETO, C.-C. 2010a. Serum and Urinary Cell-free MiR-146a and MiR-155 in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 37, 2516-2522.
- WANG, G., TAM, L., LI, E., KWAN, B., CHOW, K., LUK, C., LI, P. & SZETO, C. 2011. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 20, 493-500.
- WANG, H., PENG, W., OUYANG, X., LI, W. & DAI, Y. 2012a. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res*, 160, 198-206.

- WANG, K., YUAN, Y., CHO, J. H., MCCLARTY, S., BAXTER, D. & GALAS, D. J. 2012b. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*, 7, e41561.
- WANG, K., ZHANG, S., WEBER, J., BAXTER, D. & GALAS, D. J. 2010b. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 38, 7248-59.
- WANG, Y., ZHENG, F., GAO, G., YAN, S., ZHANG, L., WANG, L., CAI, X., WANG, X. & XU, D. 2018. MiR-548a-3p regulates inflammatory response via TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rheumatoid arthritis.
- WATAD, A., BRIDGEWOOD, C., RUSSELL, T., MARZO-ORTEGA, H., CUTHBERT, R. & MCGONAGLE, D. 2018. The Early Phases of Ankylosing Spondylitis: Emerging Insights From Clinical and Basic Science. *Front Immunol*, 9, 2668.
- WEBER, B., STRESEMANN, C., BRUECKNER, B. & LYKO, F. 2007. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 6, 1001-5.
- WEBER, J. A., BAXTER, D. H., ZHANG, S., HUANG, D. Y., HUANG, K. H., LEE, M. J., GALAS, D. J. & WANG, K. 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56, 1733-41.
- WEYAND, C. M., HICOK, K. C., CONN, D. L. & GORONZY, J. J. 1992. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 117, 801-6.
- XIE, W., SU, W., XIA, H., WANG, Z., SU, C. & SU, B. 2019. Synovial Fluid MicroRNA-210 as a Potential Biomarker for Early Prediction of Osteoarthritis. 2019, 7165406.
- XU, N., BRODIN, P., WEI, T., MEISGEN, F., EIDSMO, L., NAGY, N., KEMENY, L., STAHL, M., SONKOLY, E. & PIVARCSI, A. 2011. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol*, 131, 1521-9.
- YING, S. Y., CHANG, C. P. & LIN, S. L. 2010. Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. *Methods Mol Biol*, 629, 205-37.
- YU, L., LI, J., CHEN, Y., JIANG, J., FANG, Q., JIANG, J., WANG, D. & LIU, M. 2018. hsa-miR-7 Is a Potential Biomarker for Idiopathic Inflammatory Myopathies with Interstitial Lung Disease in Humans. *Ann Clin Lab Sci*, 48, 764-769.
- YUE, J., LAU, T. C. K., GRIFFITH, J. F., XU, J., XIAO, F., SHI, L., WANG, D., WONG, P. C. H., LI, E. K., TAM, L. P., LI, M., LI, T. K., MAK, W. Y., HUNG, V., QIN, L. & TAM, L. S. 2019. Circulating miR-99b-5p as a novel predictor of erosion progression on high-resolution peripheral quantitative computed tomography in early rheumatoid arthritis: A prospective cohort study. 22, 1724-1733.
- ZENG, L., CUI, J., WU, H. & LU, Q. 2014. The emerging role of circulating microRNAs as biomarkers in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 47, 419-29.
- ZERNECKE, A., BIDZHEKOV, K., NOELS, H., SHAGDARSUREN, E., GAN, L., DENECKE, B., HRISTOV, M., KOPPEL, T., JAHANTIGH, M. N., LUTGENS, E., WANG, S., OLSON, E. N., SCHOBER, A. & WEBER, C. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2, ra81.
- ZHANG, F., HUANG, W., SHENG, M. & LIU, T. 2015. MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting CXCL16 and is associated with prognosis of osteosarcoma patients. *Tumour Biol*, 36, 2041-8.
- ZHANG, H., HUANG, X., YE, L., GUO, G., LI, X., CHEN, C., SUN, L., LI, B., CHEN, N. & XUE, X. 2018. B Cell-Related Circulating MicroRNAs With the Potential Value of Biomarkers in the Differential Diagnosis, and Distinguishment Between the Disease Activity and Lupus Nephritis for Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*, 9, 1473.

- ZHANG, X., JI, S., CAI, G., PAN, Z., HAN, R., YUAN, Y., XU, S., YANG, J., HU, X., CHEN, M., WU, M., MA, Y., DENG, J., GAO, X., GUAN, S., XU, S., SHUAI, Z., LASLETT, L. & PAN, F. 2020. H19 Increases IL-17A/IL-23 Releases via Regulating VDR by Interacting with miR675-5p/miR22-5p in Ankylosing Spondylitis. *Mol Ther Nucleic Acids*, 19, 393-404.
- ZHANG, Y. & WANG, Y. 2018. The correlation of plasma microRNA-200 family expressions with risk and disease severity of lupus nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22, 3118-3125.
- ZHAO, L., LIU, K., PAN, X., QUAN, J., ZHOU, L., LI, Z., LIN, C., XU, J., XU, W., GUAN, X., LI, H., NI, L., GUI, Y. & LAI, Y. 2019. miR-625-3p promotes migration and invasion and reduces apoptosis of clear cell renal cell carcinoma. *Am J Transl Res*, 11, 6475-6486.
- ZHENG, X., ZHANG, Y., YUE, P., LIU, L., WANG, C., ZHOU, K., HUA, Y., WU, G. & LI, Y. 2019. Diagnostic significance of circulating miRNAs in systemic lupus erythematosus. *PLoS One*, 14, e0217523.
- ZHOU, H., HUANG, X., CUI, H., LUO, X., TANG, Y., CHEN, S., WU, L. & SHEN, N. 2010. miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 116, 5885-94.
- ZUBAKOV, D., BOERSMA, A. W., CHOI, Y., VAN KUIJK, P. F., WIEMER, E. A. & KAYSER, M. 2010. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*, 124, 217-26.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ

### Publikace k tématu dizertační práce

S IF:

1. Prajzlerová K, Komarc M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Circulating miR-145 as a marker of therapeutic response to anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Physiol Res*. 2021 Apr 30;70(2):255-264. doi: 10.33549/physiolres.934542.
2. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Hánová P, Horváthová V, Gregové M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. High miR-451 expression in peripheral blood mononuclear cells from subject at risk of developing rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2021 Feb 25;11(1):4719. doi: 10.1038/s41598-021-84004-3.
3. Prajzlerová K, Grobelná K, Hušáková M, Forejtová S, Jüngel A, Gay S, Vencovský J, Pavelka K, Šenolt L. Association between circulating miRNAs and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis. *PLoS ONE*, 2017 Sep 22;12(9):e0185323. doi: 10.1371/journal.pone.0185323
4. Hrušková V, Jandová R, Vernerová L, Mann H, Pecha O, Prajzlerová K, Pavelka K, Vencovský J, Filková M, Šenolt L. MicroRNA-125: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2016 Jun 2;18(1):124. doi: 10.1186/s13075-016-1023-0.

Recenzované:

1. Prajzlerová K, Filková M. Extracelulární miRNA – biogeneze, funkce a využití jako biomarkerů u revmatických onemocnění. *Česká Revmatologie*, 2018 (16), č. 4, s. 171-180.

## Další práce:

1. Petrovská N, Prajzlerová K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. The pre-clinical phase of rheumatoid arthritis: From risk factors to prevention of arthritis. *Autoimmun Rev.* 2021 May;20(5):102797. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102797
2. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Komarc M, Mann H, Hulejová H, Petrovská N, Gregová M, Hánová P, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. The dysregulation of monocyte subpopulations in individuals at risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020 Oct 29;keaa518. doi: 10.1093/rheumatology/keaa518.
3. Bubová K, Prajzlerová K, Hulejová H, Gregová M, Mintálová K, Hušáková M, Forejtová Š, Filková M, Tomčík M, Vencovský J, Pavelka K, Šenolt L. Elevated Tenascin-C Serum Levels in Patients With Axial Spondyloarthritis. *Physiol Res.* 2020 Aug 31;69(4):653-660. doi: 10.33549/physiolres.934414.
4. Šumová B, Cerezo LA, Hulejová H, Prajzlerová K, Tomčík M, Bubová K, Štěpán J, Filková M, Kropáčková T, Grigorian M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. S100A4 is elevated in axial spondyloarthritis: a potential link to disease severity. *BMC Rheumatol.* 2020 Jan 31;4:13. doi: 10.1186/s41927-019-0110-7.
5. Šenolt L, Prajzlerová K, Hulejová H, Šumová B, Filková M, Veigl D, Pavelka K, Vencovský J. Interleukin-20 is triggered by TLR ligands and associates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2017 Sep;97:187-192. doi: 10.1016/j.cyto.2017.06.009.
6. Andrés Cerezo L, Šumová B, Prajzlerová K, Veigl D, Damgaard D, Nielsen CH, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Calgizzarin (S100A11): a novel inflammatory mediator associated with disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017 Apr 26;19(1):79. doi: 10.1186/s13075-017-1288-y.
7. Prajzlerová K, Grobelná K, Pavelka K, Šenolt L, Filková M. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun Rev.* 2016 Jun;15(6):501-9. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.002.
8. Filková M, Vernerová Z, Hulejová H, Prajzlerová K, Veigl D, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Pro-inflammatory effects of interleukin-35 in rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2015 May;73(1):36-43. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.019.

### Abstrakta (mezinárodní kongresy):

1. Prajzlerová K, Petrovská N, Gregová M, Baloun J, Hánová P, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Plasmatic Proteome in Individuals with Arthralgia at Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatol.* 2020; 72 (suppl 10);0763
2. Petrovská N, Prajzlerová K, Půtová I, Gregová M, Hánová P, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Anti-Peptidylarginine Deaminase Antibodies in the Individuals with Arthralgia at Risk of Progression to Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatol.* 2020; 72 (suppl 10); 0761
3. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Petrovská N, Hánová P, Hulejová H, Gregová M, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. The disproportion of NK cells, non-conventional NK-T cells and  $\gamma\delta$ -T cells in individuals at risk of developing rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2020;79(Suppl 1):249
4. Hánová P, Prajzlerová K, Petrovská N, Gregová M, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Ultrasound-detected synovitis among individuals at risk of rheumatoid arthritis increases the risk of developing clinical arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2020;79(Suppl 1):591
5. Baloun J, Pekáčová A, Kropáčková T, Horváthová V, Prajzlerová K, Filková M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Plasma miRNA profile in patients with hand osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2020;79(Suppl 1):1301
6. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Hánová P, Hulejová H, Gregová M, Petrovská N, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Lower count of NK cells and non-conventional NK-T and  $\gamma\delta$ -T cells in individuals at risk of developing rheumatoid arthritis. *EWRR* 2020.
7. Prajzlerová K\*, Kryštůfková O\*, Hánová P, Hulejová H, Gregová M, Petrovská N, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. The Dysregulation of NK Cells and Non-Conventional NK-T and  $\gamma\delta$ -T Cells in Individuals at Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatol.* 2019; 71 (suppl 10):0500
8. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Hánová P, Hulejová H, Gregová M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. The dysregulation of NK cells and non-classical and classical monocyte subpopulations in individuals at risk of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2019, volume 78, supplement 2, page A298



9. Hulejová J, Bubová K, Prajzlerová K, Hušáková M, Filková M, Tomčík M, Pavelka K, Šenolt L. Serum tenascin-C levels are elevated in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2019, volume 78, supplement 2, page A1496
10. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Hánová P, Hulejová H, Gregová M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Altered Count of NK Cells and Non-classical Monocyte Subpopulation in the Pre-clinical Phase of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatol.* 2018; 70 (suppl 9);1466
11. Prajzlerová K, Hrušková V, Komarc M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Circulating miR-145 as a marker of therapeutic response in patients with ankylosing spondylitis receiving anti-TNF therapy. *EWRR* 2018.
12. Prajzlerová K, Hrušková H, Komarc M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Circulating MiR-145 As a Marker of Therapeutic Response to Anti-TNF Therapy in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatol.* 2017; 69 (suppl 10);579
13. Hrušková V, Prajzlerová K, Komarc M, Vernerová L, Mann H, Filková M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Baseline Expression of Cellular microRNA-31 and micro-RNA-10a Predict Remission and Low Disease Activity in Patients with Early Rheumatoid Arthritis after Six and Twelve Months of Therapy. *Arthritis & Rheumatol.* 2017; 69 (suppl 10);2434
14. Prajzlerová K, Hulejová H, Kryštůfková O. The flow cytometric detection of HLA-B27 using DuraClone B27 kit. *International Conference Analytical Cytometry* 2017.
15. Prajzlerová K, Hánová P, Hrušková V, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. High levels of miR-451a differentiate patients with clinically suspect arthralgia from healthy controls. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2017;76:A20-A21.
16. Prajzlerová K, Hrušková V, Hánová P, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. MiR-451a differentiates patients with clinically suspect arthralgia from healthy controls. *CECR* 2016.
17. Prajzlerová K, Hrušková V, Hánová P, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. High levels of miR-451a differentiate patients at risk of developing RA from healthy controls. *Arthritis & Rheumatol.* 2016; 68(suppl 10);499
18. Andres Cerezo L, Šumová B, Prajzlerová K, Veigl D, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. S100A11 Protein Is Increased in Rheumatoid Arthritis and Is Associated with Disease Activity and Inflammation. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68 (suppl 10);2152

19. Prajzlerová K, Jandová R, Hrušková V, Hánová P, Mann H, Pavelka K, Vencovská J, Šenolt L, Filková M. Circulating MIR-126 Is A Marker of Disease Activity in Patients with Early RA but Does Not Differentiate Patients at Risk of Developing RA. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2016; 75(Suppl 2):689,2-689
20. Prajzlerová K, Andrés Cerezo L, Hánová P, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Serum calprotectin is elevated in patients with early rheumatoid arthritis but not in patients at risk of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:A36
21. Hulejová H, Prajzlerová K, Kryštůfková O, Grobelná K, Filkovi M, Mann H, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Serum Visfatin Levels in Patients with Axial Spondyloarthritis and Early Rheumatoid Arthritis: Relation to Inflammation and Bone Changes. *Arthritis & Rheumatology* 2015, Vol: 67, Issue S10;9
22. Hrušková V, Jandová R, Vernerová L, Mann H, Prajzlerová K, Filková M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. MicroRNA-125b Expression in PBMCs is Inversely Associated with Disease Activity in Patients with Early Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2015, Vol: 67, Issue S10;541
23. Štorkánová H, Hulejová H, Špiritovič M, Prajzlerová K, Skácelová S, Bečvář R, Pavelka K, Vencovský J, Distler JH, Šenolt L, Tomčík M. Heat Shock Protein 90 Plasma Levels Correlate with Disease Activity, Lung involvement and Skin Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015; 74(Suppl 1):A35-A35
24. Prajzlerová K, Fojtíková M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Analysis of circulating miRNAs in patients with axial spondyloarthritis with different spinal involvement. *EWRR* 2015.
25. Prajzlerová K, Fojtíková M, Forejtová Š, Jüngel A, Gay S, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Characterization of circulating miRNAs in patients with axial spondyloarthritis. *Springer; Supplement 05/2014; Pages: S208:P01.05*
26. Šenolt L, Prajzlerová K, Hulejová H, Veigl D, Pavelka K, Vencovský J. Interleukin-20 Is Triggered by TLR Ligands and Associates with Rheumatoid Arthritis Disease Activity. *Arthritis & Rheumatology* 2014; Vol: 66; Supplement: 11; Pages: S459:1039
27. Prajzlerová K, Fojtíková M, Forejtová Š, Jüngel A, Gay S, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Association of Circulating Mirnas with Spinal Involvement in Patients with Axial Spondyloarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2014; Vol: 66; Supplement: 11; Pages: S913:2085

28. Andres Cerezo L, Prajzlerová K, Veigl D, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Calcizzarin (S100A11) is up-regulated in rheumatoid arthritis. Springer; Supplement 05/2014; Pages: S208:P01.04
29. Prajzlerová K, Fojtíková M, Forejtová Š, Jünger A, Gay S, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Comprehensive analysis of circulating miRNAs in patients with axial spondyloarthritis. Ann Rheum Dis 2014; Vol: 73; Supplemen: 2; Pages: 856-857
30. Andrés Cerezo L, Prajzlerová K, Veigl D, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Calcizzarin (S100A11) is Upregulated in Rheumatoid Arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2014; 73(Supp 2);829-829.
31. Andrés Cerezo L, Prajzlerová K, Remáková M, Mann H, Tomčík M, Lukanidin E, Pavelka K, Grigorian M, Vencovský J, Šenolt L. The role of S100A4 as a biological marker of immune response in early rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism 2013; Vol:65;Supplemet 10; Pages:S409:957
32. Filková M, Aradi B, Šenolt L, Prajzlerová K, Vettori S, Mann H, Vencovský J, Pavelka K, Michael B, Gay R, Gay S, Jungel A. Levels Of Circulating Mirnas Before and After 12 Months Therapy With Dmards In Patients With Early Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatism 2013; Vol:65;Supplemet 10; Pages:S211:480

## 9. PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu disertační práce:

### Seznam příloh

1. Prajzlerová K, Grobelná K, Hušáková M, Forejtová S, Jüngel A, Gay S, Vencovský J, Pavelka K, Šenolt L. Association between circulating miRNAs and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis. PLoS ONE, 2017 Sep 22;12(9):e0185323. doi: 10.1371/journal.pone.0185323
2. Prajzlerová K, Komarc M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Circulating miR-145 as a marker of therapeutic response to anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis. Physiol Res. 2021 Apr 30;70(2):255-264. doi: 10.33549/physiolres.934542.
3. Hrušková V, Jandová R, Vernerová L, Mann H, Pecha O, Prajzlerová K, Pavelka K, Vencovský J, Filková M, Šenolt L. MicroRNA-125: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2016 Jun 2;18(1):124. doi: 10.1186/s13075-016-1023-0.
4. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Hánová P, Horváthová V, Gregové M, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. High miR-451 expression in peripheral blood mononuclear cells from subject at risk of developing rheumatoid arthritis. Sci Rep. 2021 Feb 25;11(1):4719. doi: 10.1038/s41598-021-84004-3.

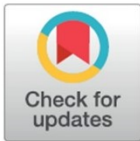
RESEARCH ARTICLE

# Association between circulating miRNAs and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis

Klára Prajzlerová<sup>1\*</sup>, Kristýna Grobelná<sup>1</sup>, Markéta Hušáková<sup>1</sup>, Šárka Forejtová<sup>1</sup>, Astrid Jüngel<sup>2</sup>, Steffen Gay<sup>2</sup>, Jiří Vencovský<sup>1</sup>, Karel Pavelka<sup>1</sup>, Ladislav Šenolt<sup>1</sup>, Mária Filková<sup>1</sup>

**1** Institute of Rheumatology and Department of Rheumatology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, **2** Center of Experimental Rheumatology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

\* [prajzlerova@revma.cz](mailto:prajzlerova@revma.cz)



## Abstract

### Objectives

Dysregulation of miRNAs and their target genes contributes to the pathophysiology of autoimmune diseases. Circulating miRNAs may serve as diagnostic/prognostic biomarkers. We aimed to investigate the association between circulating miRNAs, disease activity and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis (AxSpA).

### Methods

Total RNA was isolated from the plasma of patients with non-radiographic (nr)AxSpA, patients with ankylosing spondylitis (AS) and healthy controls (HC) via phenol-chloroform extraction. A total of 760 miRNAs were analysed with TaqMan<sup>®</sup> Low Density Arrays, and the expression of 21 miRNAs was assessed using single assays.

### Results

Comprehensive analysis demonstrated the differential expression of miRNAs among patients with progressive spinal disease. Of the 21 miRNAs selected according to their expression patterns, the levels of miR-625-3p were significantly different between nr-AxSpA patients and HCs. We found no correlation between miRNA levels and Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) in nr-AxSpA patients. Selected miRNAs, such as miR-29a-3p, miR-146a-5p or miR-222-3p with an established role in extracellular matrix formation and inflammation were associated with spinal changes and/or disease activity assessed by BASDAI in AS patients, including miR-625-3p reflecting disease activity in AS with spinal involvement.

### Conclusions

Our data indicate that circulating miRNAs play a role in the pathogenesis of AxSpA and are also suggestive of their potential as biomarkers of disease progression. We hypothesize

## OPEN ACCESS

**Citation:** Prajzlerová K, Grobelná K, Hušáková M, Forejtová Š, Jüngel A, Gay S, et al. (2017) Association between circulating miRNAs and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis. PLoS ONE 12(9): e0185323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323>

**Editor:** Yun Zheng, Kunming University of Science and Technology, CHINA

**Received:** April 7, 2017

**Accepted:** September 11, 2017

**Published:** September 22, 2017

**Copyright:** © 2017 Prajzlerová et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was financially supported by a project of the Ministry of Health of the Czech Republic for conceptual research development number 023728 and grant project 17-33127A. There is no financial support or other benefits from commercial sources for the work reported on in the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

that differential systemic levels of miRNA expression reflect miRNA dysregulation at sites of spinal inflammation or bone formation where these molecules contribute to the development of pathophysiological features typical of AxSpA.

## Introduction

Axial spondyloarthritis (AxSpA) is a chronic inflammatory disease that mainly affects the axial skeleton, sacroiliac joints and enthesal spinal structures. It encompasses patients with ankylosing spondylitis (AS) with radiographic sacroiliitis and syndesmophytes, as well as patients with early or abortive forms of spondyloarthritis (SpA) characterized by the presence of sacroiliac inflammation detected by magnetic resonance imaging (MRI) or the presence of HLA-B27 in combination with features characteristic of SpA [1, 2]. AS is an inflammatory disease characterized by new bone formation. Mononuclear cells and osteoclasts initiate local osteitis, which leads to cartilage erosion and bone destruction, as well as osteoblast differentiation and subsequent syndesmophyte formation [3, 4].

Inflammation develops several years before structural damage becomes visible on plain radiographs. Although patients may have longstanding symptoms, the diagnosis of AS based on the modified New York criteria delays early treatment, as radiographic sacroiliitis represents a late sign of disease. Therefore, the Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) developed new classification criteria for the diagnosis of AxSpA that takes non-radiographic (nr-AxSpA) findings into account [5]. Shorter disease duration, younger age, elevated baseline C-reactive protein (CRP) levels and active inflammatory changes involving the sacroiliac joint are associated with better responses to anti-TNF therapy in patients with nr-AxSpA [6]. Therefore, early diagnosis, disease monitoring and therapeutic response prediction are very important.

Several biomarkers have been tested regarding their usefulness in diagnosing disease, monitoring disease activity and predicting therapeutic responsiveness but have thus far not been implemented in clinical practice [7]. HLA-B27 remains the best genetic biomarker for diagnosing AxSpA, and CRP remains the best circulating marker for assessing disease activity and predicting treatment responsiveness and structural progression [7].

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that function as post-transcriptional regulators of gene expression. Altered miRNA expression and target gene dysregulation have been shown to contribute to the pathophysiology of many autoimmune diseases, including rheumatic diseases [8]. Although the (patho) physiological roles of circulating miRNAs remain largely unknown, cell-free circulating miRNAs appear to be promising disease biomarkers [9]. While rheumatoid arthritis (RA) has been extensively investigated, comprehensive studies regarding miRNAs in patients with AxSpA are lacking.

The aim of the present study was to identify circulating miRNAs in patients with AxSpA and to investigate their association with disease characteristics, including spinal disease severity.

## Material and methods

### Patients

This study included 20 patients with nr-AxSpA, 24 AS patients with isolated sacroiliitis without spinal involvement (AS stage I), 24 patients with AS with spinal involvement (presence of

**Table 1. Clinical characteristics of healthy controls and patients with axial spondyloarthritis.**

Variable	HC	nr-AxSpA	sacroiliitis	AS II-V
n	29	20	24	24
Gender, female//male, n	9/20	9/11	4/20	4/20
Age, years	34.0 ± 9.2 (20.7, 56.8)	34.9 ± 10.3 (21.3, 68.0)	32.6 ± 8.2 (22.1, 57.9)	40.0 ± 8.3 (25.2, 45.3)
HLA-B27 positivity, n	NA	20	22	21
Disease duration, years	NA	1.6 ± 2.5 (0, 9)	4.3 ± 3.7 (0, 14)	6.8 ± 4.3 (0, 17)
CRP, mg/l	NA	6.8 ± 7.5 (0.3, 29.0)	18.7 ± 26.3 (1.7, 117.0)	15.0 ± 16.3 (0.5, 77.5)
BASDAI score	NA	3.2 ± 2.3 (0.2, 6.7)	6.0 ± 2.6 (0.1, 9.4)	4.6 ± 2.5 (0.7, 8.2)
Peripheral arthritis, n	NA	4	3	1
Enthesitis, n	NA	9	2	8
Uveitis, n	NA	10	6	9
Treatment, n:				
NSAID	0	15	17	10
DMARDs	0	4	5	2
Biological therapy	0	1	2	12

Abbreviations: AS, ankylosing spondylitis; AS II-V, ankylosing spondylitis with spinal involvement; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs; HC, healthy controls; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; nr-AxSpA, non-radiographic axial spondyloarthritis; NA, not applicable;. Data are expressed as the mean±SD and minimum and maximum values (min, max).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323.t001>

syndesmophytes, AS stages II-V), including 7 patients with a bamboo spine, and 29 healthy controls (HC). Radiographic staging was performed as previously described [10]. All patients fulfilled the 2011 ASAS classification criteria for the diagnosis of AxSpA [11]. Disease activity was assessed using the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) [12] and CRP. The clinical characteristics of the patients and HCs are shown in Table 1. Patients were recruited from the outpatient clinic of the Institute of Rheumatology, Prague in 2013–2014. Written informed consent was obtained from all participants prior to enrolment, and the study was approved by the local Ethics committee at the Institute of Rheumatology in Prague.

### Samples and RNA isolation

Whole blood samples collected to EDTA tubes were obtained from all participants and plasma was separated by centrifugation within 4 hours of collection ensuring constant pre-analytical condition for all samples. All plasma samples were stored at -80°C and experienced no freeze-thaw cycles before use. Total RNA was extracted from plasma samples using phenol-chloroform extraction, as previously described [9]. Briefly, 500 µl of plasma was homogenized with 500 µl of Trizol LS reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and then centrifuged at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C. Three cycles of acid phenol-chloroform (Thermo Fisher Scientific) extraction were performed. RNA was precipitated by adding 5 µg of RNase-free glycogen (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 100% isopropanol and then incubated for 10 minutes at room temperature before being centrifuged at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C. The pellet was washed with 75% ethanol, and RNA was dissolved in RNase-free water. Three synthesized *C. elegans* miRNAs, cel-miR-39, cel-miR-54 and cel-miR-238 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), 25 fmol each, were spiked into plasma samples after denaturation and served as internal calibrators, as previously described [13]. RNA sample quality control was initially performed using Agilent 2100 Bioanalyser with

Agilent Small RNA kit (Agilent, CA, USA) as RNA isolation quality measure and then using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) in remaining samples.

### miRNA analysis

First, twenty non-pooled individual samples (5 samples from each group) were analysed using a TaqMan<sup>®</sup> Low Density Array (Thermo Fisher Scientific). Complementary DNA was obtained by reverse transcription using a TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit with Megaplex RT Primers with equal RNA input. cDNA was preamplified using 2x TaqMan<sup>®</sup> PreAmp Master Mix and Megaplex<sup>™</sup> PreAmp Primers (all Thermo Fisher Scientific) on a PCR thermocycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). The expression of 760 miRNAs was measured using Human Pool A+B TaqMan<sup>®</sup> Low Density Array platforms for microRNAs on a 7900RT-PCR thermocycler (Thermo Fisher Scientific). All steps were performed according to the manufacturer's instructions. Data were analysed with RQ Manager Software (Life Technologies). The dCt method was used for relative quantification as follows:  $dCt = Ct(\text{array average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ , followed by x-fold change calculations.

All miRNAs exhibiting a minimum 1.5 mean fold difference in expression between at least 2 groups according to across-group comparisons (HC vs. nr-AxSpA vs. AS) were taken forward for pathway analysis and literature search as explained below. In total, 21 miRNAs were selected for further validation using single assays. Total RNA from the remaining non-pooled samples was reverse-transcribed using TaqMan Real Time miRNA specific primers (including primers for cel-miR-39, cel-miR-54 and cel-miR-238) and then amplified by real-time PCR with TaqMan probes and TaqMan Universal PCR Master Mix on a 7900RT-PCR thermocycler (Thermo Fisher Scientific). Data were analysed with RQ Manager Software (Thermo Fisher Scientific). The dCt method was used for relative quantification as follows:  $dCt = Ct(\text{spike-in average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ ; therefore, higher dCt values represent higher expression levels of particular miRNAs.

### Statistical analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ SD. One-way ANOVA with post-hoc comparison for multiple comparisons or unpaired T test (with Welch's correction in case of homogeneity assumption violations) for comparisons between 2 groups were used where applicable. Pearson's correlation coefficient was used to correlate any two variables. P values less than 0.05 were considered statistically significant. All analyses and graphs were performed and generated, respectively, using GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

### Literature search

First, DIANA-mirPath tool was used to analyze clustering of miRNAs and pathways. In the next step, an online search (PubMed, performed in March 2016) of the functions of miRNAs was performed and 21 miRNAs with a hypothesized role in the pathogenesis of AxSpA were selected.

## Results

### Comprehensive analysis of circulating miRNAs

A comprehensive screening of 760 miRNAs was performed using TaqMan Low Density Arrays, as described above. Only miRNAs expressed in all 5 samples were taken forward for the analysis. Overall, 162 miRNAs were detected in HCs, 154 miRNAs were detected in patients with nr-AxSpA, 110 miRNAs were detected in patients with sacroiliitis, and 110



miRNAs were detected in AS patients with spinal involvement (AS II-V). Of those miRNAs, 92 were detected in all tested samples, 10 were detected in HCs, nr-AxSpA patients and AS patients with sacroiliitis and 25 were shared by HC and nr-AxSpA patients (S1 Fig). We found no miRNA unique to AxSpA.

Using the approach described in the Methods, miRNAs exhibiting a minimum 1.5 mean fold difference in expression between at least 2 groups according to across-group comparisons (HC vs. nr-AxSpA vs. AS with sacroiliitis and with spinal involvement) were considered for further analysis (S1 Table).

DIANA mir-Path cluster analysis and literature review enabled selection of 21 miRNAs for further validation (Fig 1, S2 Table).

## Differential expression of circulating miRNAs between HC and patients with AxSpA

As mentioned above, 21 selected miRNAs were analysed using single assays to confirm their differential expression (S3 Table).

The expression was compared between HC and patients with AxSpA as follows:

Significantly lower expression (from 1.6 to 3.9 times) of 14 miRNAs most of which are involved in osteoblast differentiation or the Wnt signalling pathway, were noted in all patients with AxSpA irrespective of patient radiographic findings compared to HC (Table 2, extended results shown in S4 Table).

As the group of AxSpA is heterogeneous, we next compared patients with AxSpA according to radiographic damage with HC (Table 2, S4 Table, Fig 2):

In patients with nr-AxSpA, only miR-625-3p appeared significantly different and exhibited 2.3 times lower expression levels than in HC. Eighteen miRNAs exhibited 2.1 to 5.6 times lower expression levels in radiographic disease irrespective of spinal involvement than in HC, and 14 miRNAs were 2.0–3.9 times lower in AS patients than in patients with non-radiographic disease (Table 2, S4 Table).

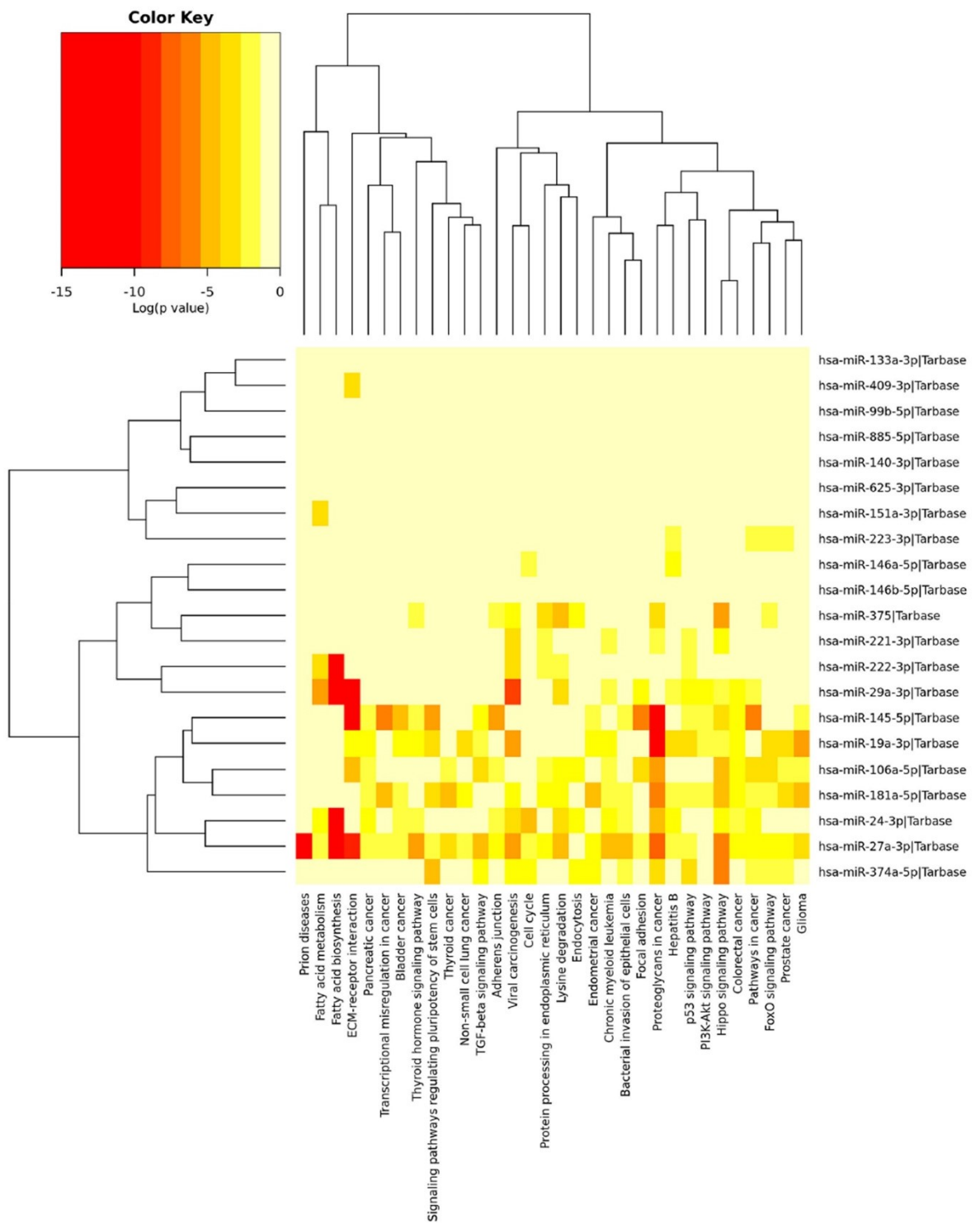
These results indicate that some differences exist in the levels of circulating miRNAs between HC and patients with non-radiographic disease, while more differences exist at radiographic stage reflecting bony changes in patients with more advanced disease.

## Effects of spinal involvement on circulating miRNA expression

Next, we evaluated the differences in circulating miRNA levels between patients with nr-AxSpA and definite radiographic disease in patients with isolated sacroiliitis and with spinal involvement (classified as AS II-V) as follows (Fig 2):

**nr-AxSpA vs. AS:** The vast majority of miRNAs (miR-19a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-106a-5p, miR-140-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-151a-3p, miR-221-3p, miR-223-3p, miR-374a-5p) exhibited 2.0–5.2 times lower expression levels in both AS groups than in the nr-AxSpA patients. As most of them are associated with bone remodelling, these data indicate that an inverse association exists between radiographic bone formation and circulating miRNA levels.

**Sacroiliitis vs. AS II-V:** However, there were no significant differences in the levels of abovementioned 12 miRNAs between sacroiliitis and AS II-V groups. MiR-99b-5p, miR-625-3p and miR-885-5p exhibited significantly lower expression (2.3 times, 2.2 times, 3.3 times, respectively) in AS patients with spinal involvement (AS II-V) than in those with sacroiliitis. Interestingly, we found no data regarding the roles of miR-625-3p and miR-885-5p in bone formation or inflammation (S2 Table).



**Fig 1. Significance cluster analysis of selected miRNAs using DIANA mirPath tool showing the involvement of miRNAs in different signalling and pathogenic pathways.** Although the involvement in certain pathways of several miRNAs overlapped, the function of few miRNAs was unknown and required manual search for their function.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323.g001>

**Table 2. Summary of expression and function of selected miRNAs as markers of disease activity and hypothesized role in AxSpA.**

miRNA	Diagnosis				Disease activity				Treatment response		Hypothesized role in AxSpA
	HC vs. AxSpA <sup>T</sup>	HC vs. nr-AxSpA	HC vs. AS	nr-AxSpA vs. AS	nr-AxSpA	AS	sacroiliitis	AS II-V	NSAID vs. antiTNF	DMARDs. vs. antiTNF	
miR-19a-3p	*	-	**	*	-	-	-	-	-	**	bone formation
miR-24-3p	*	-	**	**	-	-	-	-	***	***	bone formation
miR-27a-3p	**	-	***	**	-	-	-	-	***	**	bone formation
miR-29a-3p	**	-	***	*	-	-	-	BASDAI, CRP	*	**	bone formation,
miR-99b-5p	**	-	***	*	CRP	BASDAI	-	-	***	**	bone formation
miR-106a-5p	-	-	**	**	-	-	-	-	***	***	bone formation
miR-133a-3p	*	-	*	-	-	BASDAI	-	CRP	-	*	differentiation?
miR-140-3p	-	-	*	**	CRP	-	-	-	**	**	inflammation
miR-145-5p	-	-	*	-	CRP	-	-	-	**	*	bone formation
miR-146a-5p	*	-	**	*	-	CRP	-	-	*	*	inflammation
miR-146b-5p	*	-	**	**	-	-	-	-	**	***	migration, invasion
miR-151a-3p	-	-	*	*	-	CRP	-	CRP	-	-	migration
miR-181a-5p	-	-	-	-	-	CRP	-	-	-	-	?
miR-221-3p	-	-	**	*	-	CRP	-	-	-	*	immunopathogenesis
miR-222-3p	***	-	***	*	-	-	-	BASDAI	-	-	bone formation
miR-223-3p	*	-	**	*	-	-	-	-	**	**	bone formation
miR-374a-5p	**	-	***	*	CRP	-	-	-	*	*	bone formation
miR-375	*	-	-	-	-	-	-	BASDAI	-	-	bone formation
miR-409-3p	**	-	***	-	-	-	-	CRP	-	-	proliferation, invasion
miR-625-3p	***	*	***	-	-	BASDAI	-	BASDAI	-	-	?
miR-885-5p	-	-	-	-	-	BASDAI	-	BASDAI	-	-	?

Abbreviations: HC, healthy controls; nr-AxSpA, non-radiographic axial spondyloarthritis; AS, ankylosing spondylitis; AS II-V, ankylosing spondylitis with spinal involvement; DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs; T, T test; -, not significant;

\*p<0.05,

\*\*p<0.01,

\*\*\*p<0.001.

Statistical significance was calculated using ANOVA unless stated otherwise.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323.t002>

Moreover, patients with a bamboo spine exhibited 1.6–8.0 times significantly lower expression levels of some of the miRNAs mentioned above (miR-19a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-99b-5p, miR-106a-5p, miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-374a-5p, miR-375), including miR-625-3p and miR-885-5p than AS patients with less severe spinal damage (Fig 2).

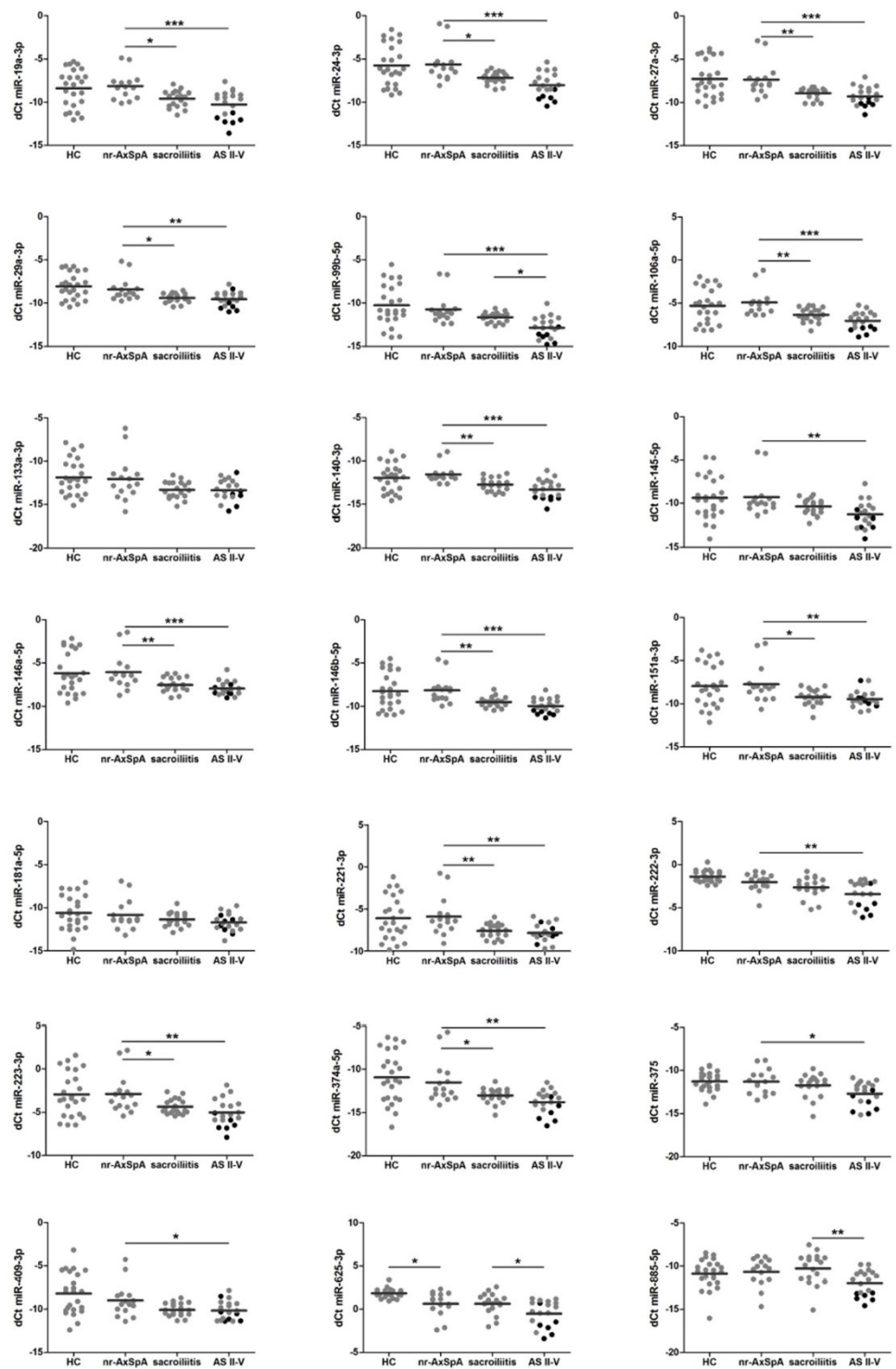
### Association between circulating miRNAs and disease activity

We next aimed to analyse the associations between circulating miRNA levels and disease activity parameters (Fig 3).

In patients with nr-AxSpA, no significant associations between miRNA levels and BASDAI were noted. CRP was positively correlated with the levels of miR-99b-5p, miR-140-3p, miR-145-5p and miR-374a-5p expression (Fig 3A).

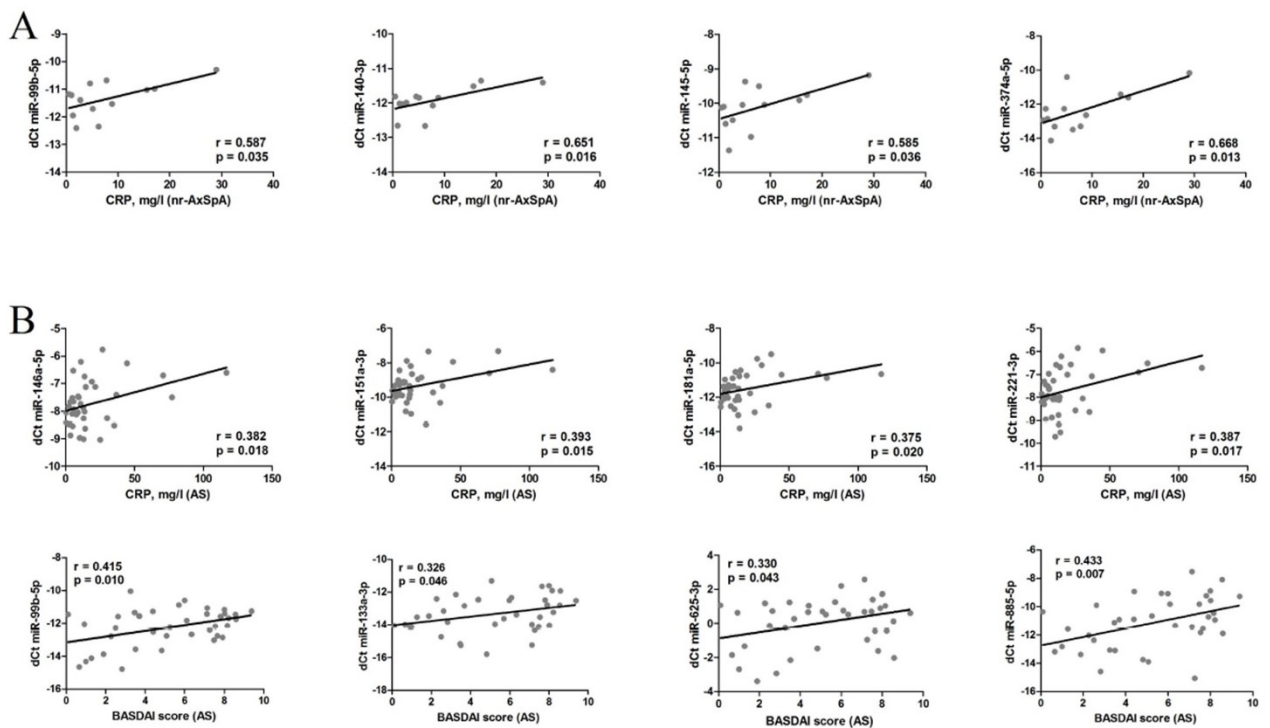
In all AS patients, BASDAI positively correlated with the levels of miR-99b-5p, miR-133a-3p, miR-625-3p and miR-885-5p, while CRP was correlated with the levels of miR-146a-5p, miR-151a-3p, miR-181a-5p and miR-221-3p (Fig 3B).

When further sub-analysis was performed, we noted no correlations between miRNAs and CRP or BASDAI in patients with sacroiliitis. However, in AS patients with spinal involvement



**Fig 2.** Differences in the levels of circulating miRNAs between healthy controls, patients with non-radiographic AxSpA (nr-AxSpA) and patients with ankylosing spondylitis (AS) with isolated sacroiliitis and spinal involvement (AS II-V). Black symbols indicate patients with bamboo spine. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323.g002>



**Fig 3. Correlation between circulating miRNAs, CRP and BASDAI in nr-AxSpA (A) and AS patients (B).**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323.g003>

(AS II-V), we noted a positive correlation between BASDAI and mi-29a-3p, miR-222-3p, miR-375, miR-625-3p and miR-885-5p levels and a positive correlation between CRP and miR-29a-3p, miR-133a-3p, miR-151a-3p and miR-409-3p levels.

We then considered different HLA-B27 status, peripheral arthritis or extraarticular manifestations on levels of miRNAs but no effect was found in any of these confounders. While no significant differences were noted in miRNA levels between patients receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) or disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs), the patients receiving anti-TNF therapy exhibited significantly lower levels of all remaining miRNAs than anti-TNF naïve patients (Table 2, S4 Table).

## Discussion

To our knowledge, this is the first study to perform comprehensive analyses of 760 circulating miRNAs in patients with various stages of AxSpA. We observed differential expression of some miRNAs in patients with more advanced spinal disease.

Circulating miRNAs have been shown to be unexpectedly stable, which makes them accessible via body fluid sampling and potentially useful as biomarkers [13]. Some associations between circulating miRNA levels and disease activity e.g., in early RA [9] or systemic lupus erythematosus [14], have previously been shown; however, data on circulating miRNAs in AxSpA are lacking.

Of 760 screened miRNAs, 21 exhibiting differential expression among patients at various disease stages were selected. We confirmed that 14 miRNAs (miR-19a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-99b-5p, miR-133a-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-374a-5p, miR-375, miR-409-3p and miR-625-3p) had lower expression

levels in all AxSpA patients, irrespective of radiographic findings, than in HC. Most of them were shown to be associated with osteoblast differentiation or the Wnt signalling pathway, while others participate in cell differentiation and proliferation or inflammation. These data support our hypothesis that dysregulation of circulating miRNA occurs in patients with AxSpA.

Interestingly, only miR-625-3p was significantly different in nr-AxSpA patients compared to HC. Eighteen miRNAs were confirmed to have lower expression levels in AS patients than in HCs. Of these, 14 exhibited lower expression levels in AS patients with radiographic disease than in AS patients with non-radiographic disease. The levels of 9 miRNAs (miR-19a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-106a-5p, miR-140-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-223-3p, miR-374a-5p) were lower in patients with a bamboo spine than in other patients with AS. Interestingly, these 9 miRNAs that exhibited differential expression in conjunction with progressive spinal damage, 6 miRNAs (miR-19a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-106a-5p, miR-223-3p, miR-374a-5p) play roles in bone formation by mediating Wnt signalling pathway activity, and 3 (miR-140-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p) play roles in inflammation or cell migration that may be related to the pathogenesis of AxSpA.

At present, it is not technically feasible to show the effect of native biofluid circulating miRNA on target genes in tissues using functional experiments due to lack of data on their specific source, trafficking and targeting mechanisms. Drawing firm conclusions on the role of circulating miRNAs in the pathogenesis is therefore difficult and these are mostly inferred from data published on intracellular miRNAs reviewed by literature and databases search. Similarly, we inferred the potential of differentially expressed circulating miRNAs in the pathogenesis of AxSpA based on published data on other diseases.

Many miRNAs shown here to be differentially expressed are involved in bone turnover. MiR-19a was described as a negative regulator of the Wnt signalling pathway in endothelial cells [15]. MiR-24 overexpression significantly inhibited osteogenic differentiation in osteoblastic cells [16]. Runx2, a transcription factor essential for osteoblastogenesis, was shown to negatively regulate the expression of miR-27a [17]. Another study showed that miR-27 promote osteoblast differentiation by modulating Wnt signalling [18]. MiR-106a inhibits osteogenesis in mesenchymal stem cells [19] and is a negative regulator of IL-8, the levels of which are known to be elevated in AS patients [20, 21]. MiR-223 affects bone metabolism, especially osteoclast and osteoblast differentiation [22] and blocking miR-223 inhibits osteoclastogenesis [23]. Moreover, miR-223 appears to be a biomarker of disease activity and treatment response in RA [9, 24]. MiR-374a has been shown to be an activator of the Wnt signalling pathway [25]. In summary, we believe that lower systemic levels of miRNAs may reflect their low local expression levels. Our data show a trend towards lower levels according the extent of spine involvement with the lowest levels in patients with most advanced disease. We hypothesize that lower systemic levels of miRNAs negatively correlate with new bone formation promoted by induction of osteoblastogenesis and to lesser extend also by local inflammation or osteitis initiated by osteoclast infiltration. However, the data regarding miR-27a and miR-374a remain controversial and do not entirely support our theory.

In addition, several miRNAs modulate inflammatory process. IL-1 $\beta$  suppressed miR-140 expression and induced ADAMTS5, a member of the extracellular protease enzyme family. Conversely, transfection of chondrocytes with miR-140 downregulated IL-1 $\beta$ -induced ADAMTS5 expression [26]. In keeping with these findings, miR-140-3p was shown to ameliorate autoimmune arthritis [27]. Administration of miR-146a prevents joint destruction in arthritic mice presenting miR-146a as a negative regulator of inflammation [28]. These data suggest that miR-140-3p and miR-146a dysregulation may be associated with the

proinflammatory state characteristic of AxSpA. Also, miR-146a polymorphisms have been suggested to be a potential pathogenic factor for AS [29].

Here we propose circulating miRNAs as markers of disease activity. In nr-AxSpA patients, miR-140-3p, miR-223-3p, miR-99b-5p and miR-145-5p levels correlated with CRP. Both miR-99b and miR-145 were shown to be associated with osteoclast/osteoblast differentiation [30, 31]. However, no associations with BASDAI were observed in these patients or those with sacroiliitis.

Furthermore, in AS patients with spinal involvement, we observed correlations between miR-29a-3p and both BASDAI and CRP, as well as associations between miR-222-3p, miR-625-3p and miR-885-5p and BASDAI. The data on miR-29a levels in AS are rather inconsistent. While miR-29a expression in peripheral blood mononuclear cells was lower in active AS patients than in controls and decreased after anti-TNF therapy [32], another showed otherwise [33]. TGF- $\beta$ , an important stimulator of bone formation [34], inhibits miR-29a expression [35, 36]. In addition, miR-29a has been described as a negative regulator of Wnt signalling and production of extracellular matrix [35, 36]. We hypothesize that advanced-stage AS patients with extensive bone formation have higher levels of TGF- $\beta$ , which ultimately results in miR-29a suppression and increased bone formation. MiR-222 has been predicted to exert inhibitory effects on genes associated with osteogenic differentiation [37], and low levels of miR-222 may result in increased MMP-13 expression in osteoarthritic cartilage [38]. As mentioned above, miR-625-3p was significantly decreased in nr-AxSpA and may be associated with early disease. There is no pathophysiologic explanation for this finding, nor is there an explanation for its association with BASDAI in advanced AS patients. Similarly, data regarding the potential role of miR-885-5p in AxSpA are lacking.

There are some limitations in our study. The selection of miRNAs for validation analysis may appear biased. The initial mirPath screen of all miRNAs of 1.5 mean fold difference obtained by TLDA provided us with a broad-spectrum unspecific data since such an online tool is based on validated/predicted targets genes coming from different fields (mostly cancer) that may be yet largely unknown in AxSpA. Due to practical reasons, it was not feasible to validate all miRNAs fulfilling the abovementioned cut-off. Therefore, a manual review was implemented to narrow down the list of miRNAs taken forward for further analysis and to enable drawing hypotheses. Next, two different normalization methods were used in our study. Array data were normalized to Ct average of all miRNAs as miRNAs of non-human origin are not included on the array platform, while the normalization to the average of 3 spike-in controls was performed in single-assay analysis. At present, there is no consensus on normalization of cell-free miRNAs. As the normalization to endogenous cell-free miRNAs may be conditioned by their altered expression due to (patho)physiological condition of each individual, the use of spike-in controls of non-human origin appears an acceptable alternative. Moreover, this approach reflects potential errors during the workflow, although these were minimized. We appreciate that the differential expression pattern based on TLDA analysis was not always reflected in single assay analysis. More studies involving larger patient cohorts are needed to confirm these data, as only a small proportion of the circulating mirnome has been analysed, and the functions of many miRNAs remain unknown. Moreover, due to nature of circulating miRNAs direct functional experiments are not feasible and the involvement of miRNAs in the pathogenesis of AS was hypothesized based on published data.

## Conclusions

We have shown for the first time the differential expression levels of several circulating miRNAs in radiographic AxSpA patients compared to non-radiographic disease patients and HC.

Moreover, the levels of these miRNAs appear to reflect progressive spinal involvement. Interestingly, while some of these miRNAs play roles in bone formation and associated signalling pathways, others play roles in inflammation. It can be hypothesized that differential systemic miRNA expression levels reflect their dysregulation at sites of spinal inflammation or bone formation where they contribute to the development of pathophysiological features characteristic of AS. However, only miR625-3p, whose role in AS is unknown, exhibited significantly different expression levels in nr-AxSpA patients compared to HC and, interestingly, correlated with disease activity in AS. Our data support the role of circulating miRNAs in the pathogenesis of AxSpA and their potential as biomarkers of disease progression. Additional studies involving larger patient cohorts are needed to confirm these data, as only a small proportion of the circulating mirnome has been analysed, and the functions of many miRNAs remain unknown.

## Supporting information

**S1 Fig. The expression of miRNAs in healthy controls (HC) and patients with non-radiographic axial spondyloarthritis (nr-AxSpA), sacroiliitis and ankylosing spondylitis with spinal involvement (AS II-V) using TaqMan Low Density Array and their shared expression among groups.**

(TIF)

**S1 Table. Original Taq Man Low Density Array (TLDA) data obtained in 5 healthy controls (HC), and 5 patients with non-radiographic axial spondyloarthritis (nr-AxSpA), 5 patients with sacroiliitis and 5 patients with ankylosing spondylitis with spinal involvement (AS II-V). The statistical analysis was performed as described in Methods paragraph.**

(XLSX)

**S2 Table. Functions of the 21 miRNAs selected for further analysis based on a literature search as explained in Methods paragraph.**

(DOCX)

**S3 Table. Data obtained from single assay analysis of 21 miRNAs.** The data are provided as mean $\pm$ SD calculated from data obtained from 29 healthy controls (HC), 20 patients with non-radiographic axial spondyloarthritis (nr-AxSpA), 24 patients with sacroiliitis and 24 patients with ankylosing spondylitis with spinal involvement (AS II-V). The statistical analysis was performed as described in Methods paragraph. Abbreviations: HC, healthy controls; nr-AxSpA, non-radiographic axial spondyloarthritis; AS, ankylosing spondylitis.

(DOCX)

**S4 Table. Extended summary of expression and function of selected miRNAs as markers of disease activity and hypothesized role in AxSpA.** Abbreviations: HC, healthy controls; nr-AxSpA, non-radiographic axial spondyloarthritis; AS, ankylosing spondylitis; AS II-V, ankylosing spondylitis with spinal involvement; DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs; T, T test; -, not significant. Statistical significance was calculated using ANOVA unless stated otherwise.

(DOCX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Klára Prajzlerová, Astrid Jüngel, Steffen Gay, Jiří Vencovský, Karel Pavelka, Ladislav Šenolt, Mária Filková.

**Data curation:** Klára Prajzlerová, Kristýna Grobelná, Markéta Hušáková, Šárka Forejtová.



**Formal analysis:** Klára Prajzlerová, Kristýna Grobelná.

**Investigation:** Klára Prajzlerová, Kristýna Grobelná, Markéta Hušáková, Šárka Forejtová, Mária Filková.

**Methodology:** Klára Prajzlerová, Astrid Jüngel, Karel Pavelka, Ladislav Šenolt, Mária Filková.

**Supervision:** Steffen Gay, Jiří Vencovský, Karel Pavelka, Ladislav Šenolt, Mária Filková.

**Writing – original draft:** Klára Prajzlerová, Mária Filková.

**Writing – review & editing:** Klára Prajzlerová, Kristýna Grobelná, Markéta Hušáková, Šárka Forejtová, Astrid Jüngel, Steffen Gay, Jiří Vencovský, Karel Pavelka, Ladislav Šenolt, Mária Filková.

## References

1. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70(6):896–904. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.151027> PMID: [21540199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21540199/)
2. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011; 377(9783):2127–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60071-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60071-8) PMID: [21684383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21684383/).
3. Sieper J, Appel H, Braun J, Rudwaleit M. Critical appraisal of assessment of structural damage in ankylosing spondylitis: implications for treatment outcomes. *Arthritis and rheumatism*. 2008; 58(3):649–56. <https://doi.org/10.1002/art.23260> PMID: [18311819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18311819/).
4. Lories RJ, Luyten FP, de Vlam K. Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009; 11(2):221. <https://doi.org/10.1186/ar2642> PMID: [19439035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439035/)
5. Rudwaleit M, Landewe R, van der Heijde D, Listing J, Brandt J, Braun J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(6):770–6. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.108217> PMID: [19297345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297345/).
6. Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, Mease PJ, Maksymowych WP, Brown MA, et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Annals of the rheumatic diseases*. 2013; 72(6):815–22. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201766> PMID: [22772328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22772328/)
7. Prajzlerova K, Grobelna K, Pavelka K, Senolt L, Filkova M. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmunity reviews*. 2016; 15(6):501–9. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.002> PMID: [26851549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26851549/).
8. Filkova M, Jungel A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2012; 26(3):131–41. <https://doi.org/10.2165/11631480-000000000-00000> PMID: [22494429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494429/).
9. Filkova M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014; 73(10):1898–904. Epub 2013/07/31. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202815> PMID: [23897768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897768/)
10. Braun J, van der Heijde D, Dougados M, Emery P, Khan MA, Sieper J, et al. Staging of patients with ankylosing spondylitis: a preliminary proposal. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002; 61 Suppl 3:iii9–23. Epub 2002/10/17. [https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl\\_3.iii9](https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl_3.iii9) PMID: [12381507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12381507/)
11. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70(1):25–31. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.133645> PMID: [21109520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21109520/).
12. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *The Journal of rheumatology*. 1994; 21(12):2286–91. PMID: [7699630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7699630/).
13. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(30):10513–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105> PMID: [18663219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18663219/)

14. Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, Lood C, Knudsen S, Voss A, et al. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2013; 65(5):1324–34. Epub 2013/02/13. <https://doi.org/10.1002/art.37890> PMID: [23401079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401079/).
15. Landskroner-Eiger S, Qiu C, Perrotta P, Siragusa M, Lee MY, Ulrich V, et al. Endothelial miR-17 approximately 92 cluster negatively regulates arteriogenesis via miRNA-19 repression of WNT signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112(41):12812–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507094112> PMID: [26417068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26417068/)
16. Zhao W, Wu C, Dong Y, Ma Y, Jin Y, Ji Y. MicroRNA-24 Regulates Osteogenic Differentiation via Targeting T-Cell Factor-1. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16(5):11699–712. <https://doi.org/10.3390/ijms160511699> PMID: [26006243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26006243/)
17. Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24~2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(46):19879–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007698107> PMID: [20980664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20980664/)
18. Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 402(2):186–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.031> PMID: [20708603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20708603/).
19. Li H, Li T, Wang S, Wei J, Fan J, Li J, et al. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research*. 2013; 10(3):313–24. Epub 2013/02/13. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.11.007> PMID: [23399447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399447/).
20. Hong Z, Hong H, Liu J, Zheng X, Huang M, Li C, et al. miR-106a Is Downregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronic Hepatitis B and Associated with Enhanced Levels of Interleukin-8. *Mediators of inflammation*. 2015; 2015:629862. <https://doi.org/10.1155/2015/629862> PMID: [26265888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26265888/)
21. Azevedo VF, Faria-Neto JR, Stingen A, Lorencetti PG, Miller WP, Goncalves BP, et al. IL-8 but not other biomarkers of endothelial damage is associated with disease activity in patients with ankylosing spondylitis without treatment with anti-TNF agents. *Rheumatology international*. 2013; 33(7):1779–83. Epub 2013/01/09. <https://doi.org/10.1007/s00296-012-2631-x> PMID: [23297014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23297014/).
22. Xie Y, Zhang L, Gao Y, Ge W, Tang P. The Multiple Roles of MicromiR-223 in Regulating Bone Metabolism. *Molecules*. 2015; 20(10):19433–48. <https://doi.org/10.3390/molecules201019433> PMID: [26512640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26512640/).
23. M'Baya-Moutoula E, Louvet L, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; 1852(10 Pt A):2202–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.003> PMID: [26255635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26255635/).
24. Castro-Villegas C, Perez-Sanchez C, Escudero A, Filipescu I, Verdu M, Ruiz-Limon P, et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNFalpha. *Arthritis research & therapy*. 2015; 17:49. Epub 2015/04/11. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0555-z> PMID: [25860297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25860297/)
25. Cai J, Guan H, Fang L, Yang Y, Zhu X, Yuan J, et al. MicroRNA-374a activates Wnt/beta-catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123(2):566–79. Epub 2013/01/17. <https://doi.org/10.1172/JCI65871> PMID: [23321667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23321667/)
26. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis and rheumatism*. 2009; 60(9):2723–30. Epub 2009/08/29. <https://doi.org/10.1002/art.24745> PMID: [19714579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19714579/)
27. Peng JS, Chen SY, Wu CL, Chong HE, Ding YC, Shiau AL, et al. Amelioration of Experimental Autoimmune Arthritis Through Targeting of Synovial Fibroblasts by Intraarticular Delivery of MicroRNAs 140-3p and 140-5p. *Arthritis & rheumatology*. 2016; 68(2):370–81. <https://doi.org/10.1002/art.39446> PMID: [26473405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26473405/).
28. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2011; 63(6):1582–90. Epub 2011/03/23. <https://doi.org/10.1002/art.30321> PMID: [21425254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21425254/).
29. Xu HY, Wang ZY, Chen JF, Wang TY, Wang LL, Tang LL, et al. Association between ankylosing spondylitis and the miR-146a and miR-499 polymorphisms. *PloS one*. 2015; 10(4):e0122055. Epub 2015/04/04. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122055> PMID: [25836258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25836258/)
30. de la Rica L, Garcia-Gomez A, Comet NR, Rodriguez-Ubreva J, Ciudad L, Vento-Tormo R, et al. NF-kappaB-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome biology*. 2015; 16:2. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0561-5> PMID: [25601191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601191/)

31. Fukuda T, Ochi H, Sunamura S, Haiden A, Bando W, Inose H, et al. MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. *FEBS letters*. 2015; 589(21):3302–8. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.024> PMID: [26450370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26450370/).
32. Lv Q, Li Q, Zhang P, Jiang Y, Wang X, Wei Q, et al. Disorders of MicroRNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells: As Novel Biomarkers of Ankylosing Spondylitis and Provocative Therapeutic Targets. *BioMed research international*. 2015; 2015:504208. <https://doi.org/10.1155/2015/504208> PMID: [26273623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273623/)
33. Huang J, Song G, Yin Z, Luo X, Ye Z. Elevated miR-29a expression is not correlated with disease activity index in PBMCs of patients with ankylosing spondylitis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2014; 24(2):331–4. <https://doi.org/10.3109/14397595.2013.854077> PMID: [24593209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24593209/).
34. Noda M, Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. 1989; 124(6):2991–4. <https://doi.org/10.1210/endo-124-6-2991> PMID: [2721454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2721454/).
35. Le LT, Swingler TE, Crowe N, Vincent TL, Barter MJ, Donell ST, et al. The microRNA-29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Journal of molecular medicine*. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1374-z> PMID: [26687115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26687115/).
36. Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2010; 62(6):1733–43. <https://doi.org/10.1002/art.27443> PMID: [20201077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20201077/).
37. Yu F, Cui Y, Zhou X, Zhang X, Han J. Osteogenic differentiation of human ligament fibroblasts induced by conditioned medium of osteoclast-like cells. *Bioscience trends*. 2011; 5(2):46–51. Epub 2011/05/17. PMID: [21572246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21572246/).
38. Song J, Jin EH, Kim D, Kim KY, Chun CH, Jin EJ. MicroRNA-222 regulates MMP-13 via targeting HDAC-4 during osteoarthritis pathogenesis. *BBA clinical*. 2015; 3:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2014.11.009> PMID: [26673737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26673737/).

## Circulating miR-145 as a Marker of Therapeutic Response to Anti-TNF Therapy in Patients With Ankylosing Spondylitis

Klára PRAJZLEROVÁ<sup>1,2</sup>, Martin KOMARC<sup>3</sup>, Šárka FOREJTOVÁ<sup>1,2</sup>, Karel PAVELKA<sup>1,2</sup>, Jiří VENCOVSKÝ<sup>1,2</sup>, Ladislav ŠENOLT<sup>1,2</sup>, Mária FILKOVÁ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Department of Anthropometrics and Methodology, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, Prague, Czech Republic

Received July 15, 2020

Accepted February 11, 2021

Epub Ahead of Print March 8, 2021

### Summary

Circulating miRNAs appear promising therapeutic and prognostic biomarkers. We aimed to investigate the predictive value of circulating miRNAs on the disease outcome following anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis (AS). Our study included 19 AS patients assessed at baseline (M0), after three (M3) and twelve months (M12) of therapy. Total RNA was isolated from plasma. A comprehensive analysis of 380 miRNAs using TaqMan Low Density Array (TLDA) was followed by a single assay validation of selected miRNAs. All AS patients had high baseline disease activity and an excellent response to anti-TNF therapy at M3 and M12. TLDA analysis revealed the dysregulation of 17 circulating miRNAs, including miR-145. Single assay validation confirmed that miR-145 is significantly downregulated at M3 compared to baseline. The decrease in the levels of miR-145 from M0 to M3 negatively correlated with the change in BASDAI from M0 to M3; and positively correlated with disease activity improvement from M3 to M12 as per BASDAI and ASDAS. The predictive value of the early change in miR-145 and levels of miR-145 at M3 were further validated by Receiver operating curves analysis. We show that the early change in circulating miR-145 may be a predictor for the future outcome of AS patients treated with TNF inhibitors. Patients with a more significant decrease in miR-145 levels may show further significant improvement of disease activity after 12 months. Monitoring the expression of miR-145 in plasma in AS patients may, therefore, influence our therapeutic decision-making.

### Key words

miRNA • Ankylosing spondylitis • anti-TNF therapy • Biomarker

### Corresponding author

K. Prajzlerová, Institute of Rheumatology, Na Slupi 4, 128 00 Prague, Czech Republic. Email: [prajzlerova@revma.cz](mailto:prajzlerova@revma.cz)

### Introduction

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory disease that mainly affects the axial skeleton and typically presents with inflammatory back pain (Taurog *et al.* 2016). Inflammatory back pain, reduced mobility of the spine, and radiographic evidence of sacroiliitis are all part of the modified New York diagnostic criteria for AS (van der Linden *et al.* 1984). The new ASAS (The Assessment of SpondyloArthritis International Society) classification criteria for axial spondyloarthritis (AxSpA) use magnetic resonance imaging (MRI) of sacroiliac joints to detect spinal inflammation in patients with the non-radiographic stage of the disease and to enable earlier diagnosis (Rudwaleit *et al.* 2009). The most widely used tool for measuring disease activity of patients with AS is the BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) that reflects the disease activity from the patient's perspective (Garrett *et al.* 1994). Later, the ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) for the assessment of disease activity was developed (Lukas *et al.* 2009). This includes C-reactive protein (CRP) or erythrocyte sedimentation rate (ESR) as laboratory markers of disease activity. The worsening of spinal mobility is influenced by inflammation in the early disease and structural

damage in the radiographic phase (Machado *et al.* 2010). The first evidence of good treatment response to anti-TNF (tumor necrosis factor) agents in patients with AS was described almost 20 years ago (Brandt *et al.* 2000). Current data suggest that the early initiation of therapy may reduce the radiographic progression in AS (Haroon *et al.* 2013). Significant improvement of disease activity, functional outcomes and inhibition of radiographic progression have been shown in patients treated with anti-TNF biologic drugs (Taurog *et al.* 2016).

There are several biomarkers of activity or treatment response being tested in AxSpA, but more studies in large patient cohorts are needed for their implementation in the clinical practice (Prajzlerova *et al.* 2016, Prajzlerova *et al.* 2017). CRP remains the best circulating marker for assessing disease activity and predicting treatment response and structural progression (Prajzlerova *et al.* 2016). MicroRNA (miRNAs) are small, non-coding RNAs important for post-transcriptional regulation of gene expression. Moreover, cell-free circulating miRNAs are released from the cells, are stable in body fluids, and may serve as promising therapeutic and prognostic biomarkers, e.g., in rheumatoid arthritis, AxSpA, or other non-rheumatic diseases (Filkova *et al.* 2014, Hruskova *et al.* 2016, Prajzlerova *et al.* 2017, Dlouha and Hubacek 2017). We have previously presented circulating miRNAs as markers of spinal involvement and disease activity in patients with AxSpA (Prajzlerova *et al.* 2017). The aim of the current study was to investigate miRNAs as predictors of treatment response to anti-TNF therapy in patients with AS.

## Methods

### Patients

This study included 19 patients who fulfilled the New York classification criteria for AS (van der Linden *et al.* 1984): 3 patients had stage I AS, 2 had stage II AS, 4 had stage III AS, 9 had stage IV AS, and 1 had a bamboo spine – stage V AS (Braun *et al.* 2002). All patients commenced treatment with anti-TNF therapy: 6 received infliximab, 3 adalimumab, 5 golimumab, and 5 were treated with etanercept. Clinical and laboratory parameters of disease activity were assessed using BASDAI (Garrett *et al.* 1994), ASDAS-CRP (Lukas *et al.* 2009), ESR and CRP at baseline (M0) prior to the start of treatment and after three (M3) and twelve months (M12) of therapy. Clinical characteristic is provided in

Table 1. Patients were recruited from the outpatient clinic of the Institute of Rheumatology in Prague. Written informed consent was obtained from all participants prior to enrolment. The study was approved by the local Ethics committee at the Institute of Rheumatology in Prague.

### Samples and RNA isolation

Whole blood samples collected in EDTA tubes were obtained from all participants at baseline, at M3 and M12 of therapy. Plasma was separated by centrifugation within four hours of collection, ensuring constant pre-analytical conditions for all samples. All plasma samples were stored at -80 °C, and no freeze-thaw cycles occurred before use. Total RNA, including the miRNA fraction, was extracted from plasma samples (100µl) using miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) according to manufacturer's instructions. Spike-in non-human synthetic miRNA (*C. elegans* cel-miR-36, cel-miR-54, and cel-miR-238, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) were added to the samples after the initial denaturation for further normalization. Total RNA was eluted in 24µl of RNase-free water and stored at -80 °C. Total RNA concentration was measured using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in all samples.

### miRNA expression analysis

First, non-pooled individual plasma RNA samples (M0, M3, and M12 from randomly selected 3 patients) were used. Complementary DNA was obtained by reverse transcription using a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit with Megaplex RT Primers (Thermo Fisher Scientific) with equal RNA input. cDNA was preamplified using 2x TaqMan® PreAmp Master Mix and Megaplex™ PreAmp Primers (all Thermo Fisher Scientific) on a PCR thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The expression of 380 miRNAs was measured using Human Pool A TaqMan® Low Density Array (TLDA) platforms for microRNAs on QuantStudio 7Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). All steps were performed according to the manufacturer's instructions. The dCt method was used for relative quantification as follows:  $dCt = Ct(\text{array average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ , followed by x-fold change calculations.

For further single assay validation, total RNA from 19 non-pooled samples was reverse-transcribed using TaqMan Real Time miRNA specific primers

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with ankylosing spondylitis

Variable	M0	M3	M12	P value
Gender; Female/Male	6/13	-	-	NA
Age; years	38.16 [15.22]	-	-	NA
HLA-B27 positivity; n (%)	19 (100 %)	-	-	NA
CRP; mg/l	22.61 [29.47]	3.09 [8.01]	3.96 [5.70]	<0.001 <sup>a,b</sup> NS <sup>c</sup>
ESR; mm/h	36 [26]	6 [18]	11 [23]	<0.001 <sup>a,b</sup> NS <sup>c</sup>
BASDAI	6.45 [3.05]	2.40 [1.92]	1.67 [1.40]	<0.001 <sup>a,b</sup> NS <sup>c</sup>
ASDAS-CRP	4.15 [0.93]	2.28 [0.92]	1.63 [0.84]	<0.001 <sup>a,b</sup> NS <sup>c</sup>
Anti-TNF therapy; n (%)				
Adalimumab	3 (16 %)	-	-	NA
Infliximab	6 (32 %)	-	-	NA
Golimumab	5 (26 %)	-	-	NA
Etanercept	5 (26 %)	-	-	NA
AS stage; n (%)				
Stage I	3 (16 %)	-	-	NA
Stage II	2 (10 %)	-	-	NA
Stage III	4 (21 %)	-	-	NA
Stage IV	9 (48 %)	-	-	NA
Stage V	1 (5 %)	-	-	NA

Abbreviations: AS, ankylosing spondylitis; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity index; CRP, C-reactive protein; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; NA, not applicable; NS, not significant; Data are presented as a median and interquartile range [IQR]. a, comparison between M0 and M3; b, comparison between M0 and M12; c, comparison between M3 and M12.

(including cel-miR-39, cel-miR-54, and cel-miR-238) and then amplified by real-time PCR with TaqMan probes and TaqMan Universal PCR Master Mix on QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (all Thermo Fisher Scientific). The dCt method was used for relative quantification as follows:  $dCt = Ct(\text{spike-in average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ ; higher dCt values represent the higher expression of particular miRNAs. All data were analyzed with QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System Software (Thermo Fisher Scientific).

#### ELISA

The levels of VEGF in plasma were measured using a commercially available ELISA kit (Human VEGF Quantikine ELISA, R&D systems, Inc., Minneapolis, MN) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was quantified using a Sunrise ELISA reader (Tecan Group Ltd., Zürich, Switzerland) with 450 nm as the primary wavelength, and the data were analyzed using Kim version 5.43.01 software (Daniel Kittrich – Software Production, Prague, Czech Republic).

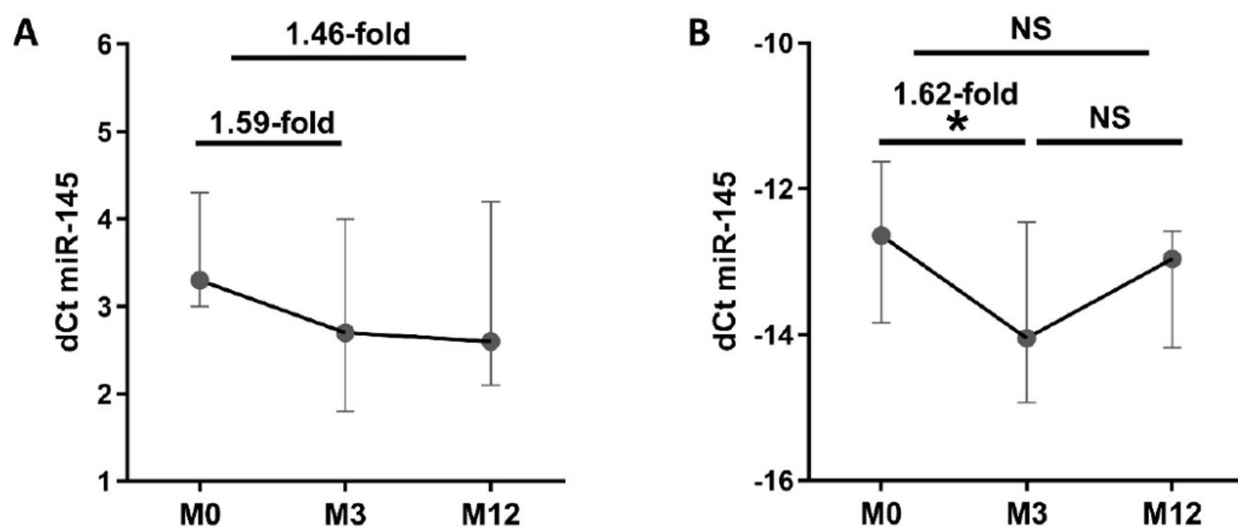
#### Statistical analysis

The normality assumption was assessed using the Shapiro-Wilk test. Data are presented as the median with interquartile range (IQR). ANOVA with Bonferroni corrections, Spearman's correlation coefficient, Receiver operating curves (ROC), Area under the curve (AUC), and Fisher's exact test were used. P values less than 0.05 were considered statistically significant. All analyses and graphs were performed using GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## Results

#### Clinical characteristic and treatment response

All AS patients had high disease activity before commencing the anti-TNF therapy (BASDAI > 4 and abnormal CRP) with a good therapeutic response at M3 and M12 based on CRP, ESR, BASDAI, and ASDAS (Table 1). All these parameters decreased significantly from M0 to M3 ( $p < 0.001$  for all comparisons) and remained significantly low at M12 ( $p < 0.001$  for all comparisons). As expected, there were no significant



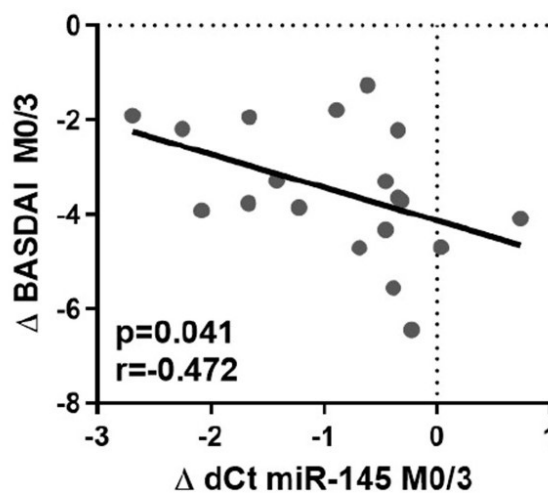
**Fig. 1.** Plasma expression of miR-145 at baseline, month 3, and month 12 of anti-TNF therapy. (A) Expression analyzed using comprehensive TaqMan Low Density array and (B) single assay validation. Data expressed as median with interquartile range. NS, not significant. \*  $p \leq 0.05$  dCt was calculated as follows: (A)  $dCt = Ct(\text{array average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$  and (B)  $Ct(\text{spike-in average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ . Higher dCt values represent, therefore a higher expression of miR-145.

differences between M3 and M12 in any monitored parameters of disease activity ( $p > 0.05$  for all comparisons).

#### Analysis of miRNAs

A comprehensive analysis of 380 circulating miRNAs in 3 patients was performed using TLDA, as described above. Out of the 380 miRNAs, 125 miRNAs were detected in all samples, while 148 miRNAs were detected at M0, 154 at M3, and 151 at M12. Only miRNAs expressed consistently in all samples below Ct cycle 30 and showing  $>1.5$ -fold change between at least 2 groups in initial analysis were taken for further validation (17 miRNAs in total). Single assay validation confirmed any difference between groups in the expression of 9 miRNAs (Thermo Fisher Scientific Assay Name: miR-16, miR-26b, miR-29a, miR-140, miR-142-3p, miR-145, miR-150, miR-192, miR-374). However, only miR-145 (miRBase ID: has-miR-145-5p) showed significant changes from baseline to M3.

Given our interest in the predictive value of baseline or early change in miRNA expression for future outcomes in AS patients, only miR-145 was taken for further extended analysis. TLDA analysis of 3 samples revealed lower levels of circulating miR-145 at M3 (1.59-fold) and M12 (1.46-fold) compared to baseline (Fig. 1A). Next, single assay validation in 19 samples confirmed 1.62-fold lower expression of miR-145 at M3 compared to baseline ( $p = 0.024$ ), but there were no significant differences after 12 months of therapy ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1B).



**Fig. 2.** Negative correlation between the change in miR-145 levels and BASDAI from month 0 to month 3.  $\Delta dCt \text{ miR-145 M0/M3}$  is calculated as  $M3 - M0$  (numbers  $< 0$  represent decreasing miRNA expression),  $\Delta \text{BASDAI M0/M3}$  is calculated as  $M3 - M0$  (numbers  $< 0$  represent the improvement of disease activity).

#### Early change in the expression of circulating miR-145 as a predictor of future outcome

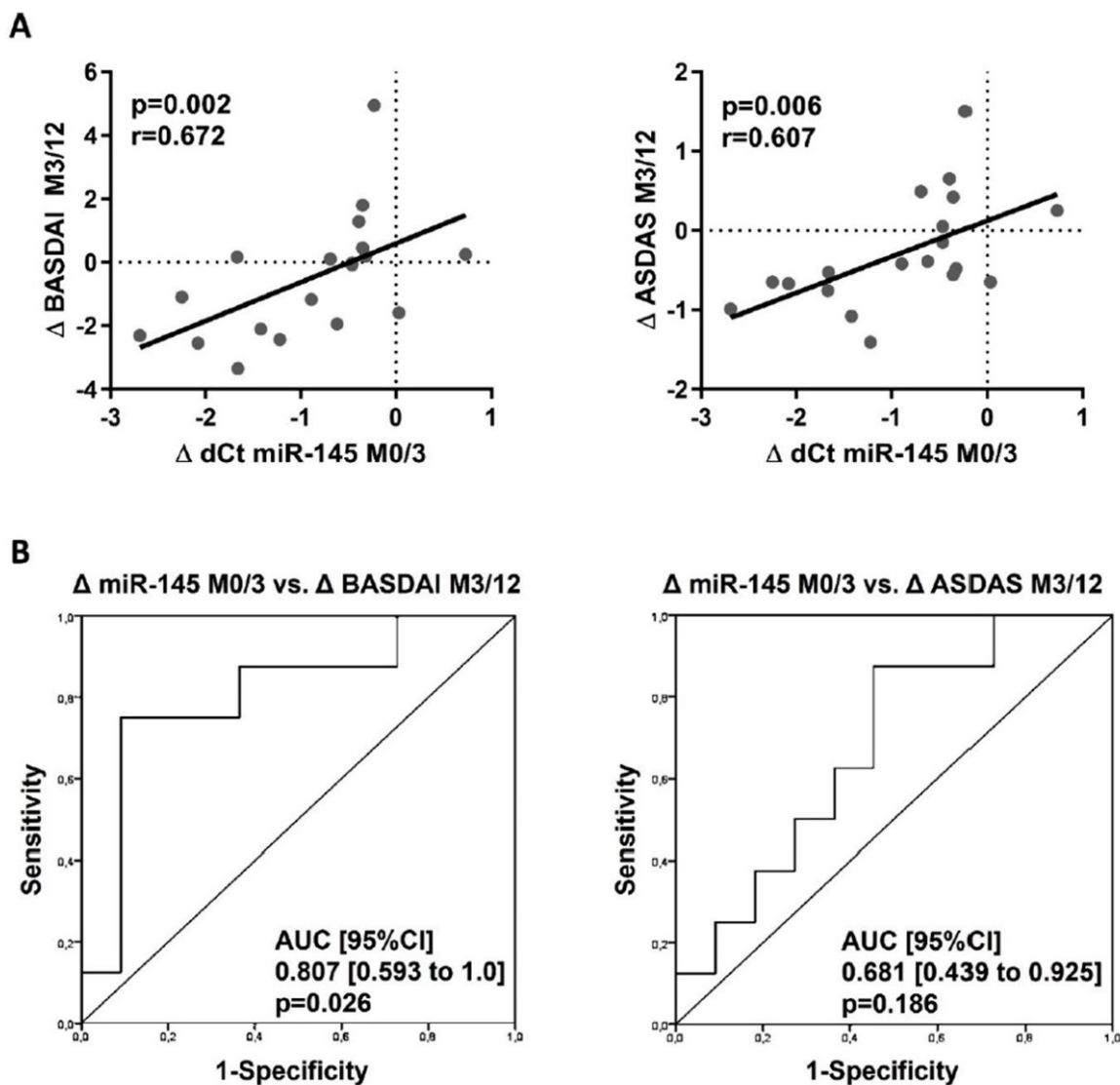
The decrease in the levels of miR-145 from M0 to M3 in plasma is negatively associated with the change in BASDAI from M0 to M3 ( $p = 0.041$ ;  $r = -0.472$ ) (Fig. 2): the more significant decrease in miR-145 levels, the less improvement in BASDAI ( $\Delta \text{BASDAI}$ ).

The disease outcome at M12 proved that the decrease in the miR-145 levels from M0 to M3 significantly positively correlated with disease activity improvement over time from M3 to M12 as per BASDAI

( $p=0.002$ ;  $r=0.672$ ) and ASDAS ( $p=0.006$ ;  $r=0.607$ ) (Fig. 3A). Therefore, patients with a more significant decrease in miR-145 levels associated with less initial improvement in BASDAI until M3 may show further significant improvement of BASDAI (and ASDAS) at M12. Importantly, this was further confirmed by ROC analysis. The ROC curves showed that the decrease in the miR-145 expression from M0 to M3 predicts the disease activity improvement from M3 to M12 defined by BASDAI (AUC [95 %CI] 0.807 [0.593 to 1.0],  $p=0.026$ ), but not by ASDAS (AUC [95 %CI] 0.601 [0.439 to 0.925],  $p=0.186$ ) (Fig. 3B).

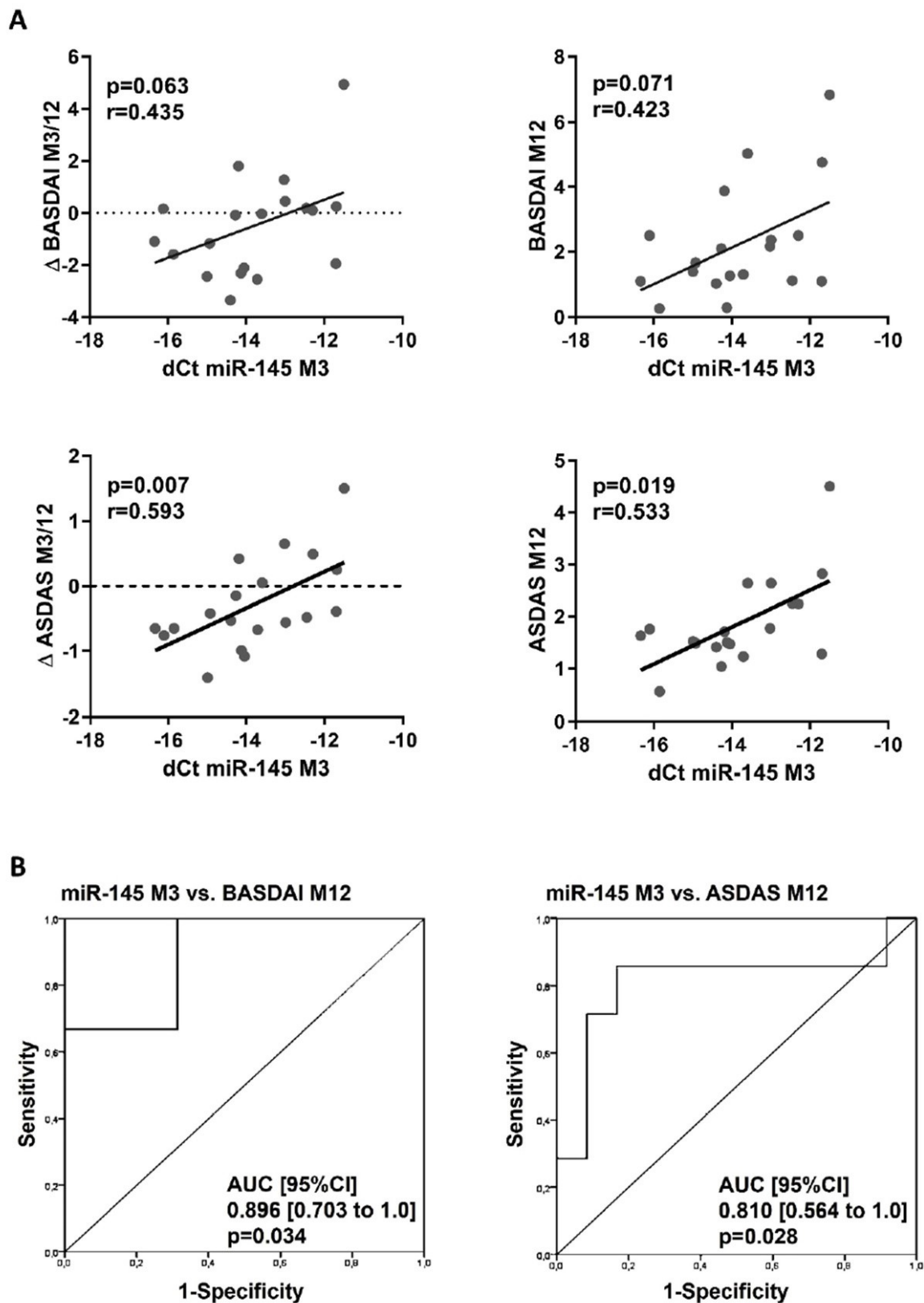
Furthermore, there was a positive correlation between the levels of miR-145 at M3 and disease

outcome at M12: the lower levels of miR-145 at M3, the more improvement of disease activity from M3 to M12 and disease activity at M12 assessed by both BASDAI ( $\Delta$  BASDAI:  $p=0.063$ ;  $r=0.435$  and BASDAI:  $p=0.071$ ;  $r=0.423$ ) and ASDAS ( $\Delta$  ASDAS:  $p=0.007$ ;  $r=0.593$  and ASDAS:  $p=0.019$ ;  $r=0.533$ ) (Fig. 4A). ROC analysis confirmed, that plasma levels of miR-145 at M3 significantly predicted low disease activity at M12 defined by BASDAI (cut off 4) (AUC [95 % CI] 0.896 [0.703 to 1.0];  $p=0.034$ ) and ASDAS (cut of 2.1) (AUC [95 % CI] 0.810 [0.564 to 1.0];  $p=0.028$ ) (Fig. 4B), nevertheless it did not predict remission defined by ASDAS (cut off 1.3) (data not shown).



**Fig. 3.** Relationship between the early change in miR-145 expression from month 0 to month 3 and further clinical improvement from month 3 to 12. (A) Correlation of decreasing in miR-145 expression from M0 to M3 with disease activity improvement from M3 to M12. (B) ROC curves analysis of the change in miR-145 expression from M0 to M3 as a predictor of disease activity improvement from M3 to M12 defined by BASDAI and ASDAS.  $\Delta$  dCt miR-145 M0/M3 is calculated as M3-M0 (numbers <0 represent decreasing miRNA expression),  $\Delta$  BASDAI, and  $\Delta$  ASDAS M3/M12 are calculated as M12-M3 (numbers <0 represent the improvement of disease activity).





**Fig. 4.** Relationship between the expression of miR-145 in month 3 and disease activity outcome at month 12. **(A)** Correlation of expression of miR-145 at M3 with disease activity outcome at M12. **(B)** Receiver operator characteristic (ROC) curves analysis of expression of miR145 at M3 as a predictor for the low disease activity at M12 defined by BASDAI (<4) and ASDAS (<2.1).  $\Delta$  BASDAI and  $\Delta$  ASDAS are calculated as BASDAI/ASDAS M12-M3 (numbers <0 represent the improvement of disease activity).

Overall, as shown in Fig. 1, there was no significant change in miR-145 levels from M3 to M12. However, the plasma expression of miR-145 increased from M3 to M12 in 10 patients ( $p < 0.001$ ). In comparison to the remaining 9 patients whose miR-145 expression decreased from M3 to M12 ( $p = 0.004$ ), these patients had significantly lower levels of miR-145 at M0 ( $p = 0.044$ ) and M3 ( $p = 0.002$ ), although the levels of miR-145 at M12 were comparable ( $p = 0.164$ ). Moreover, these patients had lower ASDAS at M0 ( $p = 0.028$ ), M3 ( $p = 0.006$ ), and M12 ( $p = 0.010$ ) and CRP at M12 ( $p = 0.043$ ), but there were no differences in BASDAI at any time (data not shown). There were no differences secondary to the biological agents used or between patients treated with monoclonal antibodies and etanercept ( $p > 0.05$ ). In the first group with increasing levels of miR-145 from M3 to M12, 7 patients were treated with monoclonal antibodies (2 with adalimumab, 4 with golimumab, and 1 with infliximab) and the remaining 3 with etanercept. In the second group, 7 patients were treated with monoclonal antibodies (1 with adalimumab, 1 with golimumab, and 5 with infliximab), and 2 were treated with etanercept.

#### *VEGF and association with circulating miR-145 and treatment response*

As VEGF was shown as a direct target of miR-145 (Fan *et al.* 2012), we were interested in its association with circulating miR-145 in plasma. There was a trend towards the decrease in VEGF levels from M0 to M3 ( $p = 0.069$ ), but there was no further change at M12 compared to M3. Levels of VEGF do not correlate with disease activity or its change at any time; however, the decrease in VEGF from M0 to M3 correlated with decreased CRP ( $p = 0.001$ ;  $r = 0.733$ ) and ESR ( $p = 0.023$ ;  $r = 0.517$ ) from M0 to M3. There was no correlation between the levels of VEGF and miR-145 at any time ( $p > 0.1$  for all comparisons) (data not shown).

## Discussion

MicroRNAs are essential regulators of gene expression and therefore contribute to the physiology in health as well as to the pathophysiology of diseases, including inflammatory conditions (Filkova *et al.* 2012). Circulating miRNAs were shown to be very stable and easily accessible that makes them potential biomarkers (Cortez *et al.* 2011). Circulating miRNAs miR-23a-3p and miR-223-3p were previously described as biomarkers

of therapeutic response to anti-TNF treatment in RA patients (Castro-Villegas *et al.* 2015). Regarding individuals with AS treated with anti-TNF therapy, however, there are only a few studies available related to miRNAs (Lv *et al.* 2015). Recently, circulating miR-5196 was shown to be decreased after anti-TNF therapy in AS patients, and change in the expression of miR-5196 correlated with disease activity improvement after treatment (Ciechomska *et al.* 2018). However, other studies on circulating miRNAs as markers of therapeutic response are lacking.

We analyzed the effect of anti-TNF therapy in AS patients on the expression of a wide range of circulating miRNAs. From the comprehensive analysis of miRNAs isolated from plasma, 17 miRNAs of a minimum 1.5-fold change difference were selected for further validation. From selected miRNAs, only miR-145 revealed a significant decrease from baseline to month three. There was still a significant decrease at month 12 compared to baseline, but there was no difference compared to month three.

Next, we validated the pilot data and assessed the relationship between miR-145 and the disease activity and treatment response in a larger patient cohort. We confirmed the decrease of miR-145 from baseline to M3 but no change from M3 to M12. We found that the more significant decrease in miR-145 expression correlated with poorer improvement of disease activity during the first 3 months. Importantly, our data showed that patients with a more significant reduction in miR-145 levels that is associated with the little improvement in BASDAI until month 3 may develop further significant improvement and better disease outcomes after 12 months of therapy based on BASDAI and ASDAS. The assessment of treatment response to anti-TNF treatment after 3 months is essential for further treatment decision making: whether the switch is indicated or the patient remains on the same drug. Based on our miR-145 data, we propose that the therapeutic switch after 3 months would be premature as some patients will improve significantly after 12 months on the same therapy.

We hypothesized a potential link between circulating miR-145 (and its reflection of disease outcome) in our AS patients with its possible involvement in the pathogenesis of AS. MiR-145 is known mainly as a tumor suppressor that mediates cell growth, invasion, and metastasis (Sachdeva and Mo, 2010). VEGF was shown to be increased in patients with

AS compared to healthy controls and decreased following anti-TNF therapy (Pedersen *et al.* 2010). VEGF is a crucial mediator in angiogenesis, is involved in osteogenesis, and, therefore, bone remodeling (Hu and Olsen 2016) and was previously described as a direct target gene of miR-145 (Fan *et al.* 2012). Although we proved the decrease in systemic VEGF after anti-TNF therapy, as shown previously (Pedersen *et al.* 2010), we showed no associations between circulating miR-145 and VEGF.

The characteristic inflammation of spondyloarthritis occurs at the interface between cartilage and bone in the sacroiliac joints, the spine, and the entheses. The mechanisms of interaction between inflammation, paradoxical bone destruction, and new bone formation are still not completely understood. However, studies have suggested that the initial inflammation (in which TNF is the principal cytokine involved) causes erosions in cartilage and bone; these lesions are then filled in by fibrous tissue, that is later ossified, leading to abnormal bony growth (syndesmophytes, bone bridges, and complete ankyloses) (Sieper and Poddubnyy 2017, Watad *et al.* 2018, Cici *et al.* 2019). Undoubtedly, the Wnt (Wingless) signaling pathway is considered one of the primary regulators of bone metabolism. It is involved in osteoblast differentiation from mesenchymal precursors and osteoprogenitor cells, osteoblast regulation, proliferation, and survival (Cici *et al.* 2019). MiR-145 was shown to negatively regulate chondrogenesis and bone formation (osteogenic differentiation, osteoblastogenesis or bone regeneration) at multiple levels of Wnt signaling and other bone-homeostasis related mechanisms (Jia *et al.* 2013, Yang *et al.* 2011, Hao *et al.* 2018, Fukuda *et al.* 2015) and to aggravate bone erosions by promoting osteoclastogenesis (Chen *et al.* 2018). We, therefore, suggest that our data may reflect the involvement of miR-145 in bone-remodeling in AS. In fact, in our previous work, we showed lower levels of miR-145 in plasma of AS patients than healthy controls and between non-radiographic AxSpA and advanced AS stages (Prajzlerova *et al.* 2017). We hypothesize that the decrease in miR-145 levels in the first 3 months of anti-TNF therapy can reflect the shift from the initial erosive process to the induction of reparative mechanisms represented by new bone formation. In our study, these could be reflected by further improvement in BASDAI score during follow-up.

Despite presenting miR-145 as a predictor of future response to anti-TNF therapy, our study has some limitations. Firstly, our data show the association of miR-145 with a short-term disease outcome in advanced disease (most AS patients had cervical spine involvement). The predictive value of miR-145 for radiographic progression is missing and would need long-term follow up. Similarly, analysis of miR-145 in the non-radiographic disease would undoubtedly be of interest as well, although our previous study showed no difference in miR-145 between healthy controls and non-radiographic AxSpA. Our data also need validation in larger patient cohorts. The data from published *in vitro* and *in vivo* studies show different roles of miR-145 in inflammation or bone formation. Our data are descriptive and show no association with selected mediators of inflammation or tissue remodeling (e.g., CRP or VEGF). We can only hypothesize the exact role of miR-145 in the pathogenesis of AS and, especially, which pathophysiologic aspect of TNF inhibition is reflected by changes in circulating miR-145 in patients with AS. Although bone-remodeling appears suggestive, we are unable to directly prove this as we didn't look directly at the tissues of interest, and also, when circulating miRNAs are studied, they may originate from different cells or tissues and reflect various more or less specific tissue-related pathways.

To conclude, we show that the early change in circulating miR-145 may be a predictor for the future outcome of AS patients treated with anti-TNF inhibitors. Patients with a more significant decrease in miR-145 levels may show further significant improvement of disease activity after 12 months. Monitoring the expression of miR-145 in plasma in AS patients may, therefore, influence our therapeutic decision-making.

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by a grant 17-33127A of the Agency for Healthcare Research of the Czech Republic and a project of the MHCR for conceptual research development No. 023728.

There is no financial support or other benefits from commercial sources for the work reported in the manuscript.

## References

- BRANDT J, HAIBEL H, CORNELLY D, GOLDER W, GONZALEZ J, REDDIG J, THRIENE W, SIEPER J, BRAUN J: Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum* 43: 1346-1352, 2000. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200006\)43:6<1346::AID-ANR18>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200006)43:6<1346::AID-ANR18>3.0.CO;2-E)
- BRAUN J, VAN DER HEIJDE D, DOUGADOS M, EMERY P, KHAN MA, SIEPER J, VAN DER LINDEN S: Staging of patients with ankylosing spondylitis: a preliminary proposal. *Ann Rheum Dis* 61 (Suppl 3): iii9-iii23, 2002. [https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl\\_3.iii19](https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl_3.iii19)
- CASTRO-VILLEGAS C, PEREZ-SANCHEZ C, ESCUDERO A, FILIPESCU I, VERDU M, RUIZ-LIMON P, AGUIRRE MA, JIMENEZ-GOMEZ Y, FONT P, RODRIGUEZ-ARIZA A, PEINADO JR, COLLANTES-ESTEVEZ E, GONZALEZ-CONEJERO R, MARTINEZ C, BARBARROJA N, LOPEZ-PEDRERA C: Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNFalpha. *Arthritis Res Ther* 17: 49, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0555-z>
- CICI D, CORRADO A, ROTONDO C, CANTATORE FP: Wnt Signaling and Biological Therapy in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. *Int J Mol Sci* 20: 5552 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20225552>
- CIECHOMSKA M, BONEK K, MERDAS M, ZARECKI P, SWIERKOT J, GLUSZKO P, BOGUNIA-KUBIK K, MASLINSKI W: Changes in MiRNA-5196 Expression as a potential biomarker of anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 66: 389-397, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0513-y>
- CORTEZ MA, BUESO-RAMOS C, FERDIN J, LOPEZ-BERESTEIN G, SOOD AK, CALIN GA: MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Onco* 8: 467-477, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.76>
- DLOUHA D, HUBACEK JA: Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res* 66: S21-S38, 2017. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933588>
- FAN L, WU Q, XING X, WEI Y, SHAO Z: MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44: 407-414, 2012. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms019>
- FILKOVA M, ARADI B, SENOLT L, OSPELT C, VETTORI S, MANN H, FILER A, RAZA K, BUCKLEY CD, SNOW M, VENCOSKY J, PAVELKA K, MICHEL BA, GAY RE, GAY S, JUNGEL A: Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 73: 1898-1904, 2014. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202815>
- FILKOVA M, JUNGEL A, GAY RE, GAY S: MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs* 26: 131-141, 2012. <https://doi.org/10.2165/11631480-000000000-00000>
- FUKUDA T, OCHI H, SUNAMURA S, HAIDEN A, BANDO W, INOSE H, OKAWA A, ASOU Y, TAKEDA S: MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. *FEBS Lett* 589: 3302-3308, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.024>
- GARRETT S, JENKINSON T, KENNEDY LG, WHITELOCK H, GAISFORD P, CALIN A: A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 21: 2286-2291, 1994.
- HAO W, LIU H, ZHOU L, SUN Y, SU H, NI J, HE T, SHI P, WANG X: MiR-145 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells through targeting FoxO1. *Exp Biol Med (Maywood)* 243: 386-393, 2018. <https://doi.org/10.1177/1535370217746611>
- HAROON N, INMAN RD, LEARCH TJ, WEISMAN MH, LEE M, RAHBAR MH, WARD MM, REVEILLE JD, GENSLER LS: The impact of tumor necrosis factor alpha inhibitors on radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 65: 2645-2654, 2013. <https://doi.org/10.1002/art.38070>
- HRUSKOVA V, JANDOVA R, VERNEROVA L, MANN H, PECHA O, PRAJZLEROVA K, PAVELKA K, VENCOSKY J, FILKOVA M, SENOLT L: MicroRNA-125b: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 18: 124, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1023-0>

- HU K, OLSEN BR: The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* 91: 30-38, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>
- CHEN Y, WANG X, YANG M, RUAN W, WEI W, GU D, WANG J, GUO X, GUO L, YUAN Y: miR-145-5p increases osteoclast numbers *in vitro* and aggravates bone erosion in collagen-induced arthritis by targeting osteoprotegerin. *Med Sci Monit* 24: 5292-5300, 2018. <https://doi.org/10.12659/MSM.908219>
- JIA J, TIAN Q, LING S, LIU Y, YANG S, SHAO Z: miR-145 suppresses osteogenic differentiation by targeting Sp7. *FEBS Lett* 587: 3027-3031, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.030>
- LUKAS C, LANDEWE R, SIEPER J, DOUGADOS M, DAVIS J, BRAUN J, VAN DER LINDEN S, VAN DER HEIJDE D: Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 68: 18-24, 2009. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2008.094870>
- LV Q, LI Q, ZHANG P, JIANG Y, WANG X, WEI Q, CAO S, LIAO Z, LIN Z, PAN Y, HUANG J, LI T, JIN O, WU Y, GU J: Disorders of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells: as novel biomarkers of ankylosing spondylitis and provocative therapeutic targets. *Biomed Res Int* 2015: 504208, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/504208>
- MACHADO P, LANDEWE R, BRAUN J, HERMANN KG, BAKER D, VAN DER HEIJDE D: Both structural damage and inflammation of the spine contribute to impairment of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 69: 1465-1470, 2010. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.124206>
- PEDERSEN SJ, HETLAND ML, SORENSEN IJ, OSTERGAARD M, NIELSEN HJ, JOHANSEN JS: Circulating levels of interleukin-6, vascular endothelial growth factor, YKL-40, matrix metalloproteinase-3, and total aggrecan in spondyloarthritis patients during 3 years of treatment with TNFalpha inhibitors. *Clin Rheumatol* 29: 1301-1309, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10067-010-1528-x>
- PRAJZLEROVA K, GROBELNA K, HUSAKOVA M, FOREJTOVA S, JUNGEL A, GAY S, VENCOVSKY J, PAVELKA K, SENOLT L, FILKOVA M: Association between circulating miRNAs and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis. *PLoS One* 12: e0185323, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185323>
- PRAJZLEROVA K, GROBELNA K, PAVELKA K, SENOLT L, FILKOVA M: An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun Rev* 15: 501-509, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.002>
- RUDWALEIT M, LANDEWE R, VAN DER HEIJDE D, LISTING J, BRANDT J, BRAUN J, BURGOS-VARGAS R, COLLANTES-ESTEVEZ E, DAVIS J, DIJKMANS B, DOUGADOS M, EMERY P, VAN DER HORST-BRUIJNSMA IE, INMAN R, KHAN MA, LEIRISALO-REPO M, VAN DER LINDEN S, MAKSYMOWYCH WP, MIELANTS H, OLIVIERI I, STURROCK R, DE VLAM K, SIEPER, J: The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 68: 770-776, 2009. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.108217>
- SACHDEVA M, MO YY: miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am J Transl Res* 2: 170-180, 2010.
- SIEPER J, PODDUBNY D: Axial spondyloarthritis. *Lancet* 390: 73-84, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31591-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31591-4)
- TAUROG JD, CHHABRA A, COLBERT RA: Ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *N Engl J Med* 375: 1303, 2016. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1609622>
- VAN DER LINDEN S, VALKENBURG HA, CATS A: Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 27: 361-368, 1984. <https://doi.org/10.1002/art.1780270401>
- WATAD A, BRIDGEWOOD C, RUSSELL T, MARZO-ORTEGA H, CUTHBERT R, MCGONAGLE D: The early phases of ankylosing spondylitis: emerging insights from clinical and basic science. *Front Immunol* 9: 2668, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02668>
- YANG B, GUO H, ZHANG Y, CHEN L, YING D, DONG S: MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *PLoS One* 6: e21679, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021679>

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# MicroRNA-125b: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis

Veronika Hruskova<sup>1,2\*</sup>, Romana Jandova<sup>1</sup>, Lucia Vernerova<sup>1</sup>, Herman Mann<sup>1</sup>, Ondrej Pecha<sup>3</sup>, Klara Prajzlerova<sup>1</sup>, Karel Pavelka<sup>1</sup>, Jiri Vencovsky<sup>1</sup>, Maria Filkova<sup>1</sup> and Ladislav Senolt<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that regulate gene expression by targeting mRNA. It was proved that some miRNAs are significantly deregulated in rheumatoid arthritis (RA). MicroRNA-125b negatively regulates expression of TNF- $\alpha$ , which plays a crucial role in RA pathogenesis. The aim of this study was to determine the treatment outcome of patients with early RA based on the expression of circulating and cellular miR-125b.

**Methods:** Total RNA was isolated from the plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 58 patients with early RA before and three months after treatment initiation and of 54 age- and sex-matched healthy controls (HC). The expression of miR-125b was measured by TaqMan quantitative PCR. The treatment responders were defined as patients achieving remission or low disease activity (28-joint count disease activity score (DAS28) <3.2). Receiver operating characteristic (ROC) curve and stepwise backward multivariable logistic regression analyses of miR-125b expression were used to predict the disease outcome at three and six months after initiation of treatment.

**Results:** The expression of miR-125b in the PBMCs and plasma of treatment-naïve early RA patients was significantly lower than that of HC and increased significantly after three months of treatment, particularly in responders. However, only the cellular expression of miR-125b was inversely correlated with disease activity. MiR-125b expression in PBMCs was higher in responders than in non-responders after three months ( $p = 0.042$ ). Using ROC analysis, the cellular expression of miR-125b, but not the disease activity at baseline, predicted the treatment response after three months of therapy (area under the curve 0.652 (95 % CI 0.510 to 0.793);  $p = 0.048$ ).

**Conclusion:** The expression of miR-125b in PBMCs of treatment-naïve patients may present a novel biomarker for monitoring the treatment outcome during the early phase of RA.

**Keywords:** MicroRNA-125b, Early rheumatoid arthritis, Treatment outcome, Disease activity

## Background

Rheumatoid arthritis (RA), which affects approximately 1 % of the world population, is an autoimmune disease that if not treated effectively is associated with persistent synovitis, leading to severe joint destruction, development of joint deformities, and increased risk of cardiovascular diseases [1]. A targeted therapy approach is an

optimal treatment strategy providing the best results for suppressing inflammation, thus avoiding irreversible joint damage and the development of comorbidities in patients with RA [2]. Some patients achieve remission or at least low disease activity shortly after the initiation of treatment with conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (cs-DMARDs), whereas others do not respond despite combination therapy or the use of biologic DMARDs. Despite tremendous progress in the treatment of RA, long-term remission in many patients and complete cure remain elusive [3, 4].

\* Correspondence: hruskova@revma.cz

<sup>1</sup>Institute of Rheumatology and Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Slupi 4, 12850 Prague 2, Czech Republic

<sup>2</sup>Faculty of Science Charles University in Prague, Prague, Czech Republic  
Full list of author information is available at the end of the article



One of the factors contributing to a lack of therapeutic response may be the epigenetic regulation of gene expression that seems to escape current targeted therapies [5]. Epigenetic modification is characterized by changes in gene expression without alteration of the nucleotide sequence. This process results from the posttranslational modification of DNA-binding molecules and from the posttranscriptional repression of targeted protein-coding genes [6]. The latter mechanism is mediated by a large number of small non-coding RNAs, including microRNA (miRNAs). MicroRNAs can degrade/destabilize targeted mRNA (gene interference) or inhibit protein synthesis and thereby regulate crucial pathways and cellular processes such as cell growth, differentiation, proliferation, and cell death [7, 8]. Deregulation of some miRNAs has been found in many diseases [9, 10], including autoimmune inflammatory disorders such as RA [11–13]. There is evidence that miRNAs can be secreted extracellularly and can be present in plasma or serum in a stable form that is protected from endogenous RNase activity [14]. Furthermore, several circulating miRNAs have already been suggested as potential biomarkers of disease activity in RA [15, 16].

The identification of sensitive biomarkers that predict the response to therapy during the early phases of RA remains challenging. Recently, the circulating miR-125b levels have been associated with chemotherapeutic resistance in breast cancer patients [17], and an elevated serum level of miR-125b has been suggested to be a potential predictive biomarker of the treatment response to rituximab in patients with RA [18]. To date, no study has investigated the expression of miR-125b in patients with treatment-naïve early RA. Therefore, the aim of our study was to determine whether the expression of cellular or circulating miR-125b may predict the outcome of treatment in patients with early RA.

## Methods

### Patients

Fifty-eight patients with early RA who fulfilled the 2010 American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) classification criteria for RA [19], with a duration of symptoms <6 months were included in this study and were prospectively followed in the Prague Early RA Clinic (PERAC) at the Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic as previously described [20]. The control group consisted of 54 age-matched and sex-matched healthy individuals.

Disease activity was assessed using the 28-joint count disease activity score-erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR) at baseline and at 3 and 6 months after the initiation of treatment. The patients were categorized into non-responders if they had moderate to high disease activity (DAS28  $\geq$  3.2) and into responders if they

achieved low disease activity or remission after 3 or 6 months of treatment.

### RNA isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by standard Ficoll (Greiner Bio-one, Leipzig, Germany) density gradient centrifugation, and pellets were snap frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Plasma samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Total cellular RNA was isolated by miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to protocol. Residual DNA contamination was removed using the RNase-Free DNase Set (Qiagen) as recommended by the manufacturer. Circulating miRNAs were isolated from plasma samples using phenol-chloroform extraction as previously described [16]. Plasma samples were spiked with 25 fmol each of 3 synthetic miRNAs of *Caenorhabditis elegans* origin (cel-miR-39, cel-miR-54, cel-miR-238) (Qiagen) after denaturation with Trizol LS (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) [16]. The concentration of total RNA was measured using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

### Reverse transcription and quantification of miRNAs

The expression of miR-125b in PBMCs and plasma samples of all patients with early RA at baseline and at 3 months of therapy was analyzed and compared to the expression in PBMCs and plasma of HC. Overall, 5 ng of total RNA was reverse-transcribed using TaqMan microRNA Assays (Life Technologies) and TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) in a Thermocycler MyCycler (Biorad, Hercules, CA, USA). Next, TaqMan microRNA Assays (Life Technologies) and TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Life Technologies) were used to quantify miRNA expression by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Small nucleolar RNA RNU44 for cellular miRNAs or the average of cel-miR-39, cel-miR-54 and cel-miR-238 for circulating miRNAs (Life Technologies) were used to normalize data in PBMCs or plasma samples, respectively.  $X$ -fold calculation using the delta cycle threshold (dCt) method was used for calculating the relative expression of miR-125b as follows:

$$2^{-\left(\text{Ct miR-125b} - \text{Ct RNU44} / \text{average of cel-miR-39, cel-miR-54, and cel-miR-238}\right)}$$

### Statistical analysis

The Mann-Whitney  $U$  test and Wilcoxon matched-pairs signed rank test were used where appropriate. Spearman's correlation test and the Fisher transformation were applied for analysis of correlation and partial correlation. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of

miR-125b expression was performed to predict disease outcome, and the area under the curve (AUC) with 95 % confidence interval (CI) was calculated. To confirm the ROC analysis, stepwise backward multivariable logistic regression was performed. Data were presented as the mean (SD) or median (range). *P* values <0.05 were considered statistically significant. GraphPad Prism, version 6 software was used for the statistical analyses.

## Results

### Clinical characteristics

The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Prior to treatment, 37 patients had high disease activity (DAS28 > 5.1), 15 patients had moderate disease activity (DAS28 3.2–5.1), and 6 patients had low disease activity (DAS28 < 3.2). Treatment with cs-DMARDs was initiated in 56 patients at baseline: 49 patients were treated with methotrexate (mean weekly dose of 15 mg at 3 months), 1 patient was treated with leflunomide, 4 patients were treated with sulfasalazine (mean daily dose of 2 g at 3 months), 2 patients were treated with anti-malarial drugs (mean hydroxychloroquine dose 200 mg), 1 patient received a combination of methotrexate and sulfasalazine, and 46 patients received glucocorticoids (mean daily dose of 5 mg of prednisone or equivalent at 3 months). Two patients were receiving only glucocorticoids at 3 months either due to liver toxicity (methotrexate was temporarily discontinued) or planned pregnancy (cs-DMARD was not initiated within the 3 months).

After 3 months of treatment, there was significant reduction in disease activity served (DAS28 decreased from  $5.6 \pm 1.6$  to  $3.1 \pm 1.4$  and C-reactive protein (CRP) decreased from 9.2 (0.3–152.2) to 3.1 (0.2–23.9) mg/l; *p* < 0.001 for all comparisons). After 3 months of treatment, 24 patients were in remission, 12 patients had low disease activity, 18 patients had moderate disease activity, and 4 patients had high disease activity. The improvement continued: after 6 months of treatment, 28 patients were in remission, 15 patients had low disease activity, 12 patients had moderate disease activity, and 3 patients had high disease activity.

### The expression of miR-125b is lower in patients with early RA

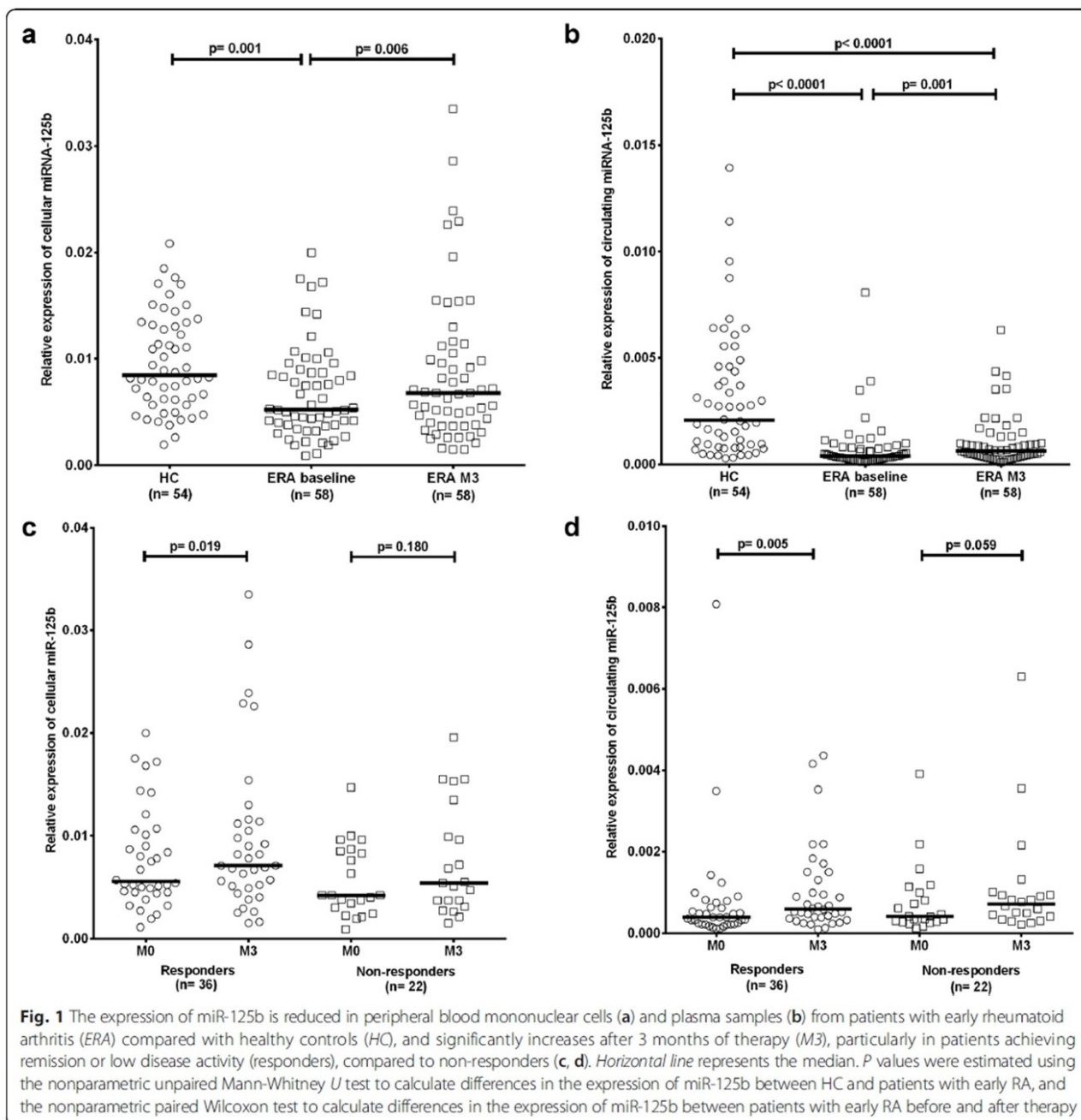
First, we determined miR-125b expression in patients with early RA and in HC and the effect of treatment on the expression of miR-125b. The baseline expression of miR-125b in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (*p* = 0.001) and in plasma (*p* < 0.0001) was significantly lower in patients with early RA than in HC and increased significantly after 3 months of therapy (*p* = 0.006 and *p* = 0.001, respectively) (Fig. 1a, b). There was a significant increase in miR-125b expression in responders only, compared to patients who did not achieve remission or low disease activity (Fig. 1c, d). Similar changes in the miR-125b expression profile were observed after 3 months in responders and non-responders after 6 months of treatment (*p* = 0.006 and *p* = 0.001, respectively). Increase in miR-125b expression over time was not associated with the dose of glucocorticoids or methotrexate. Furthermore,

**Table 1** Characteristics of patients with early rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls (HC)

	Early RA			HC
Number	58			54
Sex, female/male, <i>n</i>	42/16			41/13
Age, years	54.93 ± 16.18			50.87 ± 15.11
Disease duration	<6 months			
Treatment after 3 months				
Glucocorticoids	46			
Methotrexate	49			
Leflunomide	1			
Sulfasalazine	4			
Hydroxychloroquine	2			
Clinical characteristic	Baseline	3 months	6 months	
RF IgM positivity, %	52	NA	NA	NA
Anti-CCP positivity, %	66	NA	NA	NA
DAS28	5.56 ± 1.56	3.05 ± 1.42	2.86 ± 1.25	NA
CRP, mg/l	9.16 (0.30, 152.20)	3.10 (0.21, 23.85)	2.83 (0.24, 44.44)	1.02 (0.22, 4.36)
ESR, mm/h	27.00 (4.00, 107.00)	15.50 (2.00, 54.00)	14.00 (2.00, 74.00)	NA

Data are expressed as the mean ± SD or median (range) according to the distribution. Anti-CCP anti-citrullinated antibodies, CRP C-reactive protein, DAS28 disease activity score, ESR erythrocyte sedimentation rate, HC healthy controls, NA not analyzed, RF rheumatoid factor

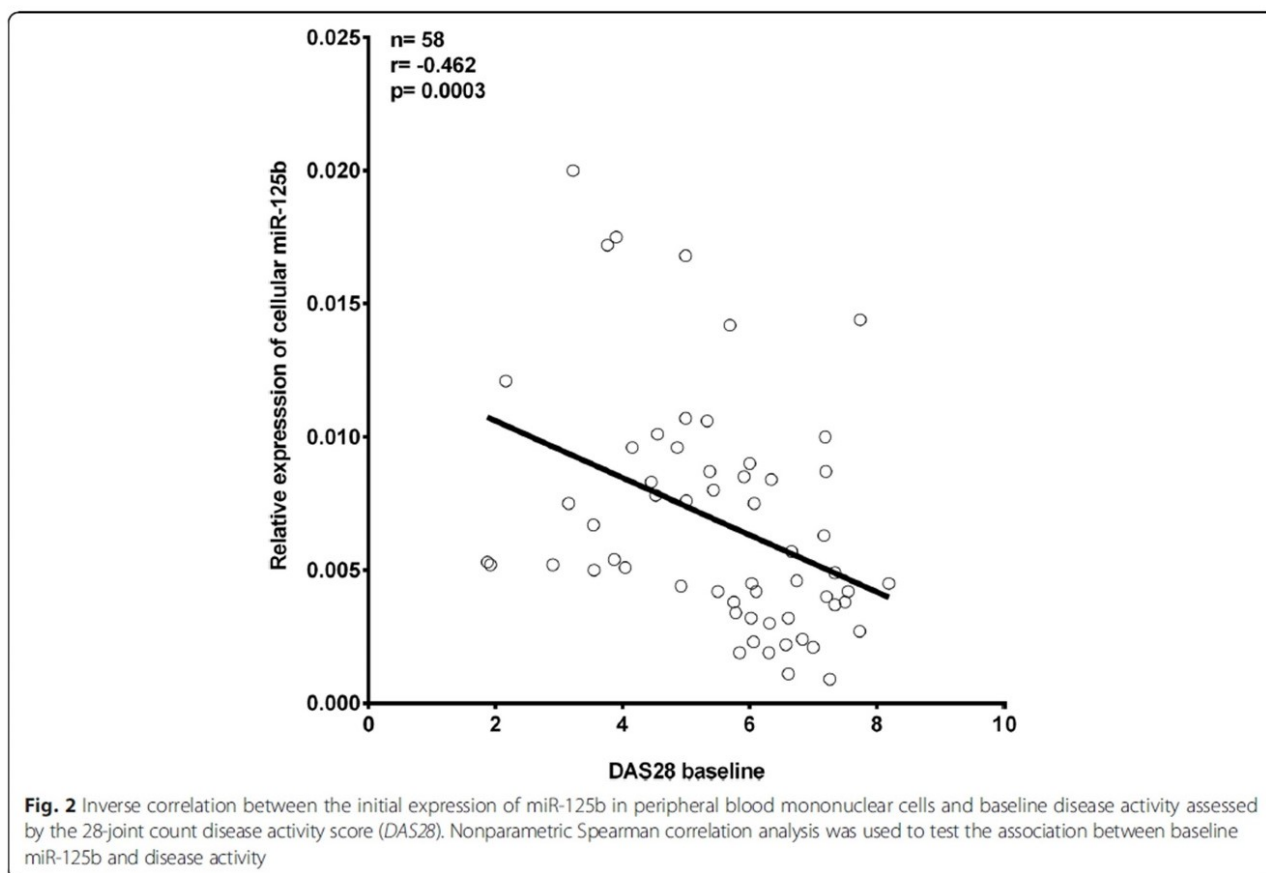




miR-125b expression in PBMCs also increased in the few responders who were naïve to glucocorticoids (data not shown). However, there was no association between cellular and circulating miR-125b ( $r = -0.222, p = 0.094$ ) and no association between the change in cellular or circulating miR-125b and an improvement in disease activity (data not shown).

**Cellular miR-125b is inversely correlated with disease activity**  
 Next, we analyzed whether the expression of miR-125b is associated with disease activity in patients with early

RA. We found that the baseline expression of cellular miR-125b was inversely correlated with the DAS28 at baseline ( $r = -0.407; p = 0.001$ ) (Fig. 2), with baseline ESR ( $r = -0.375; p = 0.003$ ) and with CRP levels ( $r = -0.270; p = 0.035$ ). Using age-adjusted analysis, the inverse correlation between miR-125b and disease activity remained significant for DAS28 ( $r = -0.276; p = 0.032$ ) and ESR ( $r = -0.268; p = 0.042$ ) but not for CRP levels ( $r = -0.194; p = 0.137$ ). No such correlations were demonstrated for circulating miR-125b ( $r = 0.117, p = 0.384$ ). These data show that lower intracellular expression of



miR-125b in PBMCs is present in treatment-naïve patients with early RA, who have higher disease activity.

#### Baseline expression of cellular miR-125b predicts treatment response

We also hypothesized that baseline expression of miR-125b may predict treatment response. We demonstrated that baseline cellular (but not circulating) expression of miR-125b was higher in responders to treatment at 3 months than in non-responders ( $p=0.042$ ) (Fig. 3). However, baseline miR-125b expression did not differ between responders and non-responders to treatment at the 6-month follow up ( $p=0.321$ ), probably due to the small number of non-responders ( $n=15$ ).

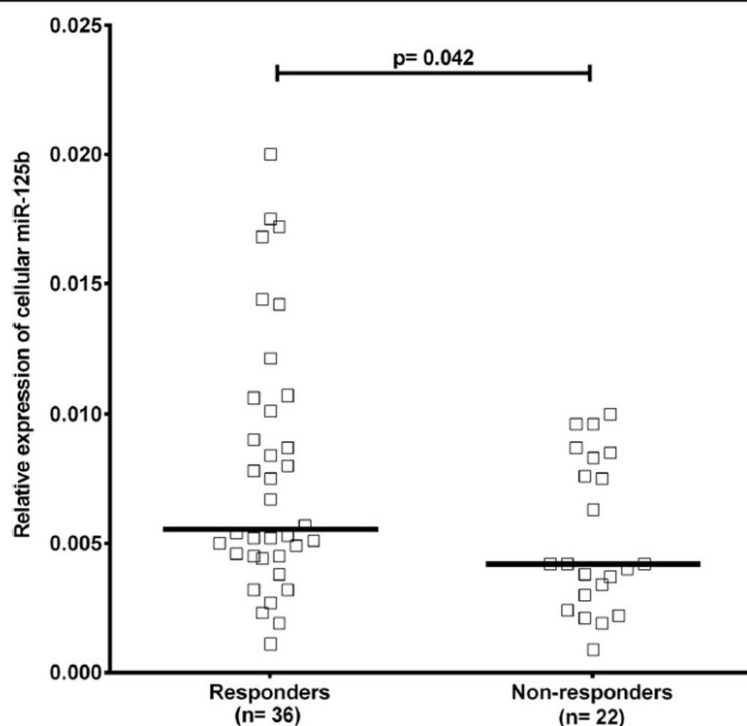
Based on the data showing that baseline miR-125b expression is higher in responders than in non-responders at 3 months, we performed ROC curve analysis to determine the predictive value of baseline miR-125b expression and conventional baseline parameters of disease activity, including DAS28, CRP levels and ESR, in separating patients with early RA who achieve an optimal treatment outcome (remission or low disease activity) from those who do not have such a response. This analysis showed that baseline miR-125b expression in PBMCs was the only predictor of achieving an optimal treatment outcome after

3 months (Fig. 4). The AUC for baseline miR-125b expression was 0.663 (95 % CI 0.520 to 0.805;  $p=0.048$ ). We then performed stepwise backward multivariate logistic regression analysis of baseline cellular miR-125b expression in combination with DAS28 at 3 months. This analysis confirmed the ROC analysis outcomes and showed that baseline miR-125b expression was a significant and independent predictor of treatment response at 3 months (OR 3.717 95 % CI 1.005 to 13.745;  $p=0.049$ ).

#### Discussion

In the present study, we report that (1) baseline miR-125b expression is lower in patients with early RA than in healthy subjects, (2) cellular miR-125b expression is inversely correlated with RA disease activity, (3) miR-125b expression increased after 3 months of conventional therapy, and (4) higher baseline cellular miR-125b expression predicts the early optimal therapeutic response (DAS28 < 3.2).

The expression of several miRNAs is altered in patients with RA compared to the healthy population [21]. Consistent with previous studies demonstrating reduced expression of miR-125b in some autoimmune diseases, particularly in psoriatic keratinocytes and systemic lupus erythematosus (SLE) CD4+ T lymphocytes [22, 23], we



**Fig. 3** Baseline expression of miR-125b in peripheral blood mononuclear cells is higher in responders than in non-responders. Patients with early rheumatoid arthritis were categorized as non-responders if they had moderate to high disease activity assessed by the 28-joint count disease activity score (DAS28  $\geq 3.2$ ) and as responders if they achieved low disease activity or remission (DAS28  $< 3.2$ ) after 3 months of treatment. Horizontal line represents the median. *P* values were estimated using the nonparametric unpaired Mann-Whitney *U* test to calculate differences in the expression of miR-125b between responders and non-responders

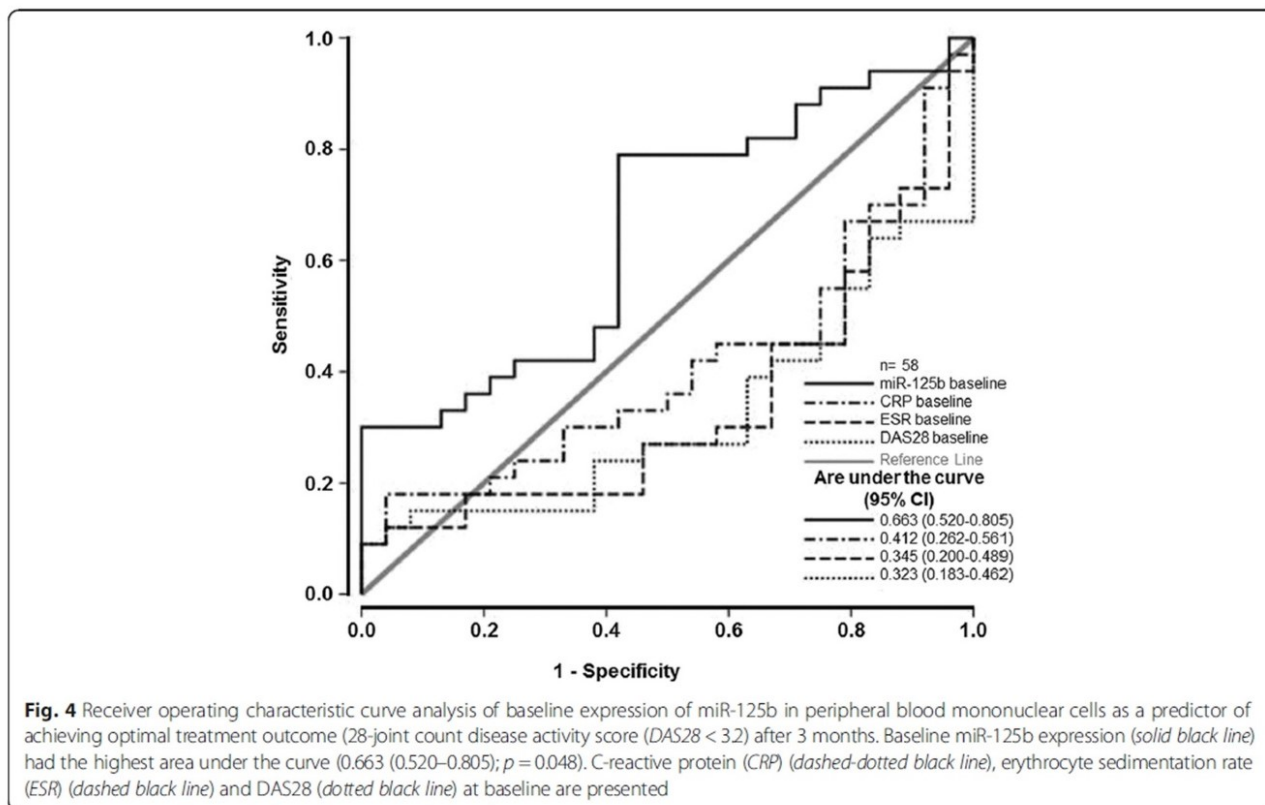
found that the expression of miR-125b in both PBMCs and plasma is lower in treatment-naïve patients with early RA than in HC.

MiR-125b has been described as a negative regulator of TNF $\alpha$  and other pro-inflammatory cytokines such as interferon (IFN) $\gamma$ , chemokine CCL4 and matrix metalloproteinase (MMP)-13 [24–27]. Thus, we hypothesize that reduced expression of miR-125b could be associated with increased inflammation in RA. However, Duroux-Richard et al. [18] reported increased expression of miR-125b in whole blood and serum from patients with established RA. The discrepancy between this report [18] and our data may be explained by the different material used for miRNA analysis and particularly by the different stages of the disease. It was previously shown that the expression profile of miRNAs is different in whole blood and PBMCs [28]. Moreover, although our study included treatment-naïve patients with RA of short disease duration, Duroux-Richard et al. [18] studied patients with established and long-lasting RA, consistent with our recent study that showed differential expression of circulating miRNAs in early and in established RA [16].

We observed inverse correlation between baseline expression of cellular miR-125b and the parameters of disease activity in patients with early RA. This result is

consistent with an inhibitory effect of miR-125b on the expression of pro-inflammatory cytokines, cell proliferation, and apoptosis [24–27, 29]. miR-125b has been inversely associated with age, as its expression is higher in the immune cells of young donors than in older donors [29]. Considering age as a potential confounder, age-adjustment confirmed our data, and the association between baseline miR-125b expression in PBMCs and clinical disease activity remained significant. Furthermore, we demonstrated upregulation of miR-125b in PBMCs from patients with early RA after 3 months of therapy, which was particularly pronounced in responders. This finding may be due to stronger inhibition of pro-inflammatory cytokines, which would lead to a better clinical outcome over time. This hypothesis is supported by a recent observation of increased levels of circulating miR-125b in RA responders to anti-TNF $\alpha$ /DMARD combination therapy [30], though the source of miRNA was not cellular.

Although one study demonstrated upregulation of miR-125b in human B lymphoblast cells after exposure to dexamethasone [31], this upregulation was transient. In our study, we found no association between the dose of glucocorticoids and change in miR-125b expression over time. Furthermore, miR-125b expression in PBMCs also increased in the few responders who were naïve to



glucocorticoids. We also did not observe association between the dose of methotrexate and change in miR-125b over time, therefore, it can be speculated that the change in miR-125b expression may not be influenced by the type of therapy, but rather by improvement in disease activity.

To determine the treatment outcome, we performed a predictive analysis by plotting an ROC curve and by logistic regression analysis of the baseline expression of miR-125b and disease activity over time. We demonstrated that higher baseline expression of miR-125b predicts remission or low disease activity after 3 months of therapy. Crucial pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  or IL-6 [24–27, 32] are known downstream targets of miR-125. Therefore, we suggest that the higher cellular miR-125b expression contributes to the achievement of lower inflammatory status and thus, could serve as a biomarker for the early treatment response in patients with early RA. However, no such finding was observed for circulating miR-125b or for miR-125b in PBMCs at the 6-month follow up. We found no correlation between circulating and miR-125b containing PBMCs; therefore, other compartments or mechanisms may influence the levels of circulating miRNAs. Because miR-125b has been demonstrated to be a biomarker of resistance to chemotherapy in pancreatic cancer [32] and circulating miR-125b has been demonstrated to be a predictive biomarker of response to biologic

treatment in established RA [18, 30], further studies evaluating the role of miR-125b in RA are needed.

## Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that the expression of miR-125b in PBMCs is lower in treatment-naïve patients with early RA and mainly in patients who do not reach the optimal therapeutic outcome at 3-month follow-up. The expression of cellular, but not circulating, miR-125b is inversely associated with RA disease activity and may serve as a potential biomarker of treatment response in early RA.

## Abbreviation

ACR, American College of Rheumatology; Anti-CCP, anti-citrullinated antibodies; AUC, area under the curve; CCL4, C-C motif chemokine ligand 4; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; cs-DMARDs, conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; DAS28, 28-joint count disease activity score; DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs; ESR, erythrocyte sedimentation rate; EULAR, European League Against Rheumatism; HC, healthy controls; IFN $\gamma$ , interferon gamma; IL-6, interleukin 6; miR, miRNA, microRNA; MMP-13, matrix metalloproteinase 13; NA, not analyzed; OR, odds ratio; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; PERAC, Prague Early RA Clinic; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; ROC, receiver operating characteristic curve; SD, standard deviation; SLE, systemic lupus erythematosus; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha

## Acknowledgements

We thank all the rheumatologists and patients involved in the study for their participation. The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article. This work was supported by IGA project No. NT

14498, by project No. 023728 for the conceptual development of research organization, by the Ministry of Health, Czech Republic and by GAUK-367615 Charles University in Prague, Czech Republic and Research Project SW 260263.

#### Authors' contributions

VH made substantial contributions to data acquisition, analysis, and interpretation, and drafted the manuscript. RJ and KP made substantial contributions to data acquisition and analysis, and revised the manuscript critically. LV and OP made substantial contributions to statistical analysis and interpretation of the data and helped to revise the manuscript critically. HM made substantial contributions to data acquisition and revised the manuscript critically. KP, JV, and MF revised the manuscript critically for important intellectual content. LS made substantial contributions to study design, and helped with data analysis and interpretation, and drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Institute of Rheumatology and Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Slupi 4, 12850 Prague 2, Czech Republic. <sup>2</sup>Faculty of Science Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>Technology Centre ASCR, Prague, Czech Republic.

Received: 7 April 2016 Accepted: 17 May 2016

Published online: 02 June 2016

#### References

- McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1898–906.
- Stoffer MA, Schoels MM, Smolen JS, Aletaha D, Breedveld FC, Burmester G, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search update. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:16–22.
- van Eijk IC, Nielen MM, van der Horst-Bruinsma I, Tjhuis GJ, Boers M, Dijkmans BA, et al. Aggressive therapy in patients with early arthritis results in similar outcome compared with conventional care: the STREAM randomized trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51:686–94.
- Hobbs KF, Cohen MD. Rheumatoid arthritis disease measurement: a new old idea. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51 Suppl 6:vi21–7.
- Migliore C, Giordano S. Resistance to targeted therapies: a role for microRNAs? *Trends Mol Med*. 2013;19:633–42.
- Jüngel A, Ospelt C, Gay S. What can we learn from epigenetics in the year 2009? *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22:284–92.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
- O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:295–312.
- Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012;482:347–55.
- Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101:921–8.
- Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*. 2012;64:11–20.
- Baxter D, McInnes IB, Kurowska-Stolarska M. Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: a role for microRNA. *Immunol Cell Biol*. 2012;90:288–92.
- Filková M, Jüngel A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*. 2012;26:131–41.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:10513–8.
- Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R86.
- Filková M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1898–904.
- Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7:e34210.
- Duroux-Richard I, Pers YM, Fabre S, Ammari M, Baeten D, Cartron G, et al. Circulating miR-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:342524.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham 3rd CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1580–8.
- Sglunda O, Mann H, Hulejová H, Kuklová M, Pecha O, Pleštilová L, et al. Decreased circulating visfatin is associated with improved disease activity in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort. *PLoS One*. 2014;9:e103495.
- Churov AV, Oleinik EK, Knip M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun Rev*. 2015;14:1029–37.
- Xu N, Brodin P, Wei T, Meisgen F, Eidsmo L, Nagy N, et al. MiR-125b, a MicroRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1521–9.
- Luo X, Zhang L, Li M, Zhang W, Leng X, Zhang F, et al. The role of miR-125b in T lymphocytes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31:263–71.
- Tili E, Michaille J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179:5082–9.
- Rajaram MV, Ni B, Morris JD, Brooks MN, Carlson TK, Bakthavachalu B, et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:17408–13.
- Huang HC, Yu HR, Huang LT, Huang HC, Chen RF, Lin IC, et al. miR-125b regulates TNF- production in CD14<sup>+</sup> neonatal monocytes via post-transcriptional regulation. *J Leukoc Biol*. 2012;92:171–82.
- Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, Bonnal RJ, et al. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4<sup>+</sup> T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol*. 2011;12:796–803.
- Atarod S, Smith H, Dickinson A, Wang XN. Important considerations for microRNA extraction methods from whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *F1000Res*. 2014;3:183.
- Cheng NL, Chen X, Kim J, Shi AH, Nguyen C, Wersto R, et al. MicroRNA-125b modulates inflammatory chemokine CCL4 expression in immune cells and its reduction causes CCL4 increase with age. *Aging Cell*. 2015;14:200–8.
- Castro-Villegas C, Pérez-Sánchez C, Escudero A, Filipescu I, Verdu M, Ruiz-Limón P, et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF $\alpha$ . *Arthritis Res Ther*. 2015;17:49.
- Murray MY, Rushworth SA, Zaitseva L, Bowles KM, MacEwan DJ. Attenuation of dexamethasone-induced cell death in multiple myeloma is mediated by miR-125b expression. *Cell Cycle*. 2013;12:2144–53.
- Yin H, Sun Y, Wang X, Park J, Zhang Y, Li M, et al. Progress on the relationship between miR-125 family and tumorigenesis. *Exp Cell Res*. 2015;339:252–60.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





OPEN

## High miR-451 expression in peripheral blood mononuclear cells from subjects at risk of developing rheumatoid arthritis

Klára Prajzlerová<sup>1,2✉</sup>, Olga Kryštůfková<sup>1,2</sup>, Petra Hánová<sup>1,2</sup>, Veronika Horváthová<sup>1,3</sup>, Monika Gregová<sup>1,2</sup>, Karel Pavelka<sup>1,2</sup>, Jiří Vencovský<sup>1,2</sup>, Ladislav Šenolt<sup>1,2</sup> & Mária Filková<sup>1,2</sup>

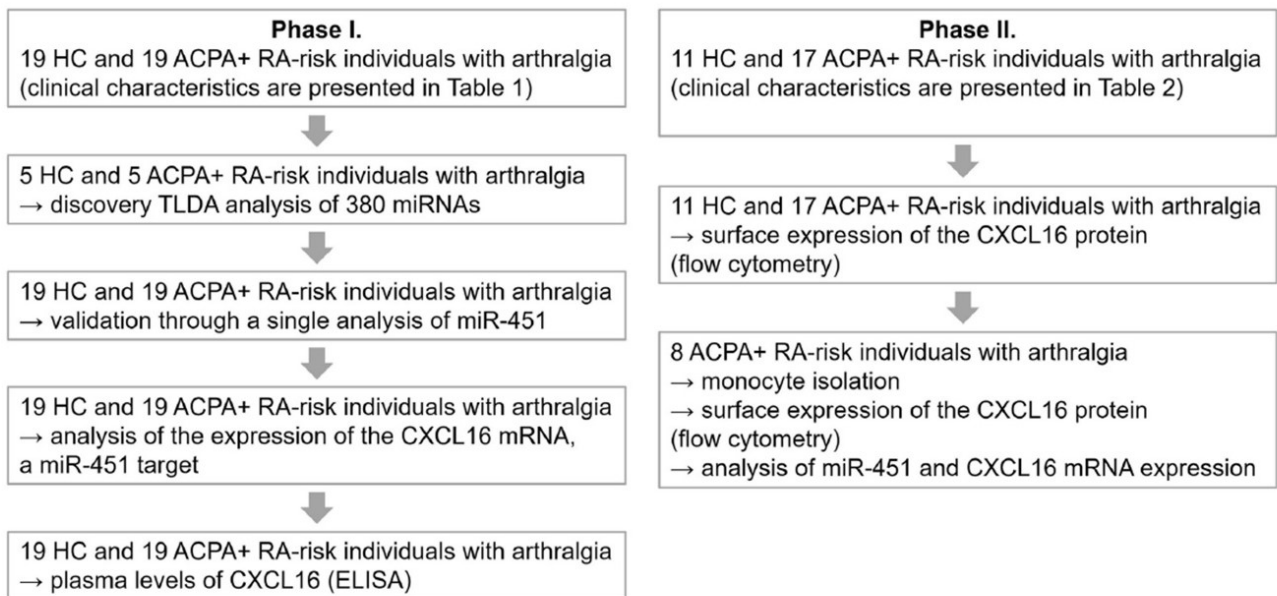
Individuals carrying anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) are considered at high risk of developing rheumatoid arthritis (RA). The altered expression of miRNAs contributes to the pathogenesis of RA. We aimed to identify differentially expressed miRNAs in the peripheral blood of ACPA-positive individuals with arthralgia at risk of RA compared to healthy controls (HC) and to determine their implications in the preclinical phase of RA. A comprehensive analysis of miRNAs revealed the dysregulation of miR-451 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma from RA-risk individuals. Higher miR-451 expression in PBMC from RA-risk individuals was further validated. Notably, miR-451 was previously shown to regulate CXCL16, a protein involved in RA pathogenesis. The expression of miR-451 in PBMC positively correlated with the CXCL16 mRNA, which could be secondary to the inflammation-induced expression of miR-451. Transfection of monocytes with pre-miR-451 in vitro resulted in the downregulation of CXCL16. Moreover, flow cytometry revealed a lower count of CXCL16-positive monocytes in RA-risk individuals. We propose that the constitutive or inflammation-induced upregulation of miR-451 in PBMC downregulates the expression of CXCL16, reduces the inflammatory milieu and thereby strives to delay the shift from the preclinical phase to the clinical manifestation of RA. This hypothesis warrants further investigation.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease that is typically characterized by joint destruction and deformities. The presence of autoantibodies, such as anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) or rheumatoid factor (RF), may precede the clinical manifestation of RA by many years<sup>1</sup>. The pathogenesis of RA begins in asymptomatic individuals with certain genetic or environmental risk factors for RA that cause the development of systemic autoimmunity. This asymptomatic phase is followed by arthralgia without clinical arthritis and finally by the manifestation of clinically detectable arthritis<sup>2</sup>. Classification criteria for RA published in 2010 enabled the early recognition of the disease<sup>3</sup>. Since individuals with both ACPA and RF have a 10.5 times higher risk of developing RA than seronegative individuals<sup>4</sup>, researchers are currently focused on targeting individuals at risk of developing RA (the preclinical phase of RA) to delay or even prevent the onset of RA<sup>5</sup>.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that, depending upon base pairing to messenger RNA (mRNA), mediate mRNA cleavage, translational repression or mRNA destabilization. The altered expression of miRNAs and subsequent dysregulation of their target genes have been shown to contribute to the pathophysiology of many autoimmune diseases, including RA<sup>6</sup>. In addition to their intracellular expression, miRNAs are present in body fluids in a stable form that is protected from endogenous RNase activity<sup>7</sup>. Extracellular miRNAs are actively secreted in microvesicles or incorporated into complexes with Argonaute 2 and high-density lipoproteins<sup>8–10</sup>. Therefore, extracellular miRNAs may represent a versatile communication tool, and their accessibility in body fluids or the expression signature in the tissue makes them potential clinical biomarkers<sup>6</sup>.

The aim of the present study was to identify a differentially expressed miRNA in the peripheral blood from individuals with arthralgia at risk of developing RA compared to healthy controls (HC) and to determine its potential implications in the preclinical phase of RA.

<sup>1</sup>Institute of Rheumatology, Prague 128 50, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Rheumatology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague 128 00, Czech Republic. <sup>3</sup>Faculty of Science, Charles University, Prague 128 00, Czech Republic. ✉email: prajzlerova@revma.cz



**Figure 1.** Workflow of our study. In Phase I, miRNAs in plasma and PBMC from ACPA-positive individuals with arthralgia at risk of developing RA and healthy controls (HC) were analysed. Phase II included a further analysis of target genes of selected miRNAs.

Variable	RA-risk individuals	HC	<i>p</i> Value
n	19	19	–
Gender, female/male	13/6	12/7	NS
Age, years	39.72 [33.16–48.13]	43.00 [31.92–58.88]	NS
CRP, mg/l	2.70 [0.87–6.93]	1.42 [0.54–2.20]	0.05
ESR, mm/h	11.00 [6.00–19.00]	*	–
VAS, mm	10.00 [0.00–50.00]	NA	–
TJC, n	0.00 [0.00–1.00]	NA	–
RF positivity, n (%)	12 (63%)	0 (0%)	<0.001
ACPA positivity, n (%)	19 (100%)	0 (0%)	<0.001
Anti-CCP, U/ml	91.00 [34.70–800.00]	15.13 [13.42–17.30]	0.002
Anti-MCV, U/ml	41.40 [20.90–199.50]	8.20 [5.9–9.80]	<0.001

**Table 1.** Clinical characteristics of ACPA-positive individuals with arthralgia at risk of RA and healthy controls (Phase I). Abbreviations: ACPA, anti-citrullinated protein antibodies (positive for at least one of the following antibodies: anti-CCP or anti-MCV); CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HC, healthy controls; NA, not applicable; NS, not significant; RF, rheumatoid factor (positivity of at least one of the following: IgG, IgA, or IgM RF assessed using an ELISA); TJC, 68 tender joint count; VAS, visual analogue scale (patient's global health assessment). Data are presented as medians and interquartile ranges [IQRs]. \*Missing data.

## Results

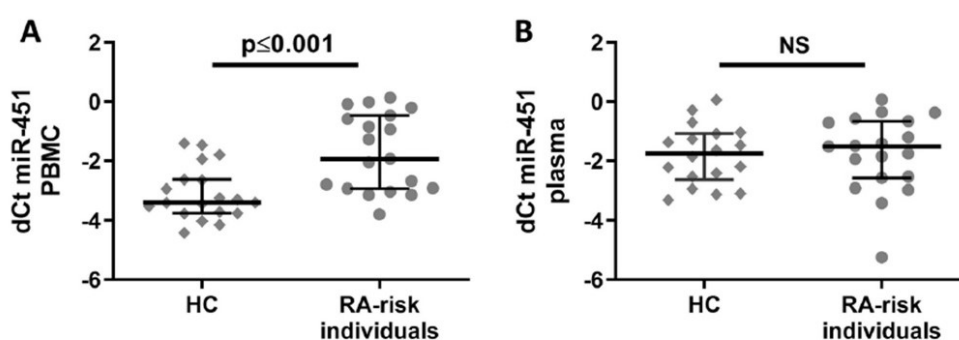
**Clinical characteristics.** The study was divided into Phase I and Phase II, and the workflow is presented in Fig. 1.

Our Phase I study included 19 RA-risk individuals with arthralgia; all of these patients were ACPA-positive (Table 1). The median duration of arthralgia at inclusion was 18.38 [13.80–49.79] months. All RA-risk individuals were followed prospectively, with a median follow-up of 43.17 [28.58–96.54] months, and 6 individuals were lost to follow-up. Five RA-individuals developed arthritis within 39.67 [23.77–66.04] months of follow-up, with CRP levels of 3.15 [1.14–22.07] mg/l and a DAS28-CRP score of 3.41 [2.53–4.50] at the time of arthritis manifestation.

Our Phase II study involved 17 RA-risk individuals with arthralgia that were not included in Phase I (Table 2). The median duration of arthralgia in ACPA-positive RA-risk individuals at inclusion in Phase II was 48.43 [24.59–93.45] months. All RA-risk individuals were followed prospectively, with a median follow-up of 31.20 [22.54–34.29] months, and 2 individuals were lost to follow-up. Two individuals developed arthritis within 16.61 [8.91–24.30] months of follow-up, with CRP levels of 31.54 [14.50–48.57] mg/l and a DAS28-CRP score of 4.79 [4.71–4.87] at the time of arthritis manifestation.

Variable	RA-risk individuals	HC	p Value
n	17	11	–
Gender, female/male	15/2	11/0	NS
Age, years	45.55 [39.54–53.15]	39.67 [31.26–47.82]	NS
CRP, mg/l	2.69 [1.25–3.46]	*	–
ESR, mm/h	9.00 [5.50–11.50]	*	–
VAS, mm	10.00 [0.00–25.00]	NA	–
TJC, n	0.00 [0.00–2.50]	NA	–
RF positivity, n (%)	6 (35%)	1 (9%)	NS
ACPA positivity, n (%)	17 (100%)	0 (0%)	<0.001
Anti-CCP, U/ml	664.00 [37.40–744.30]	13.48 [12.38–15.81]	<0.001
Anti-MCV, U/ml	31.10 [10.10–338.9]	7.70 [6.08–10.70]	0.006

**Table 2.** Clinical characteristics of ACPA-positive individuals with arthralgia at risk of RA and healthy controls (Phase II).



**Figure 2.** Expression of miR-451 in (A) PBMC and (B) plasma from healthy controls (HC) and RA-risk individuals with arthralgia in the validation cohort using single assays. NS, not significant.

**Identification of the differential expression of miR-451.** First, we employed a comprehensive discovery analysis of miRNAs in plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 5 ACPA-negative healthy controls (HC) and 5 ACPA-positive RA-risk individuals with arthralgia (3 developed arthritis within 62.25 [15.29–69.83] months of follow-up). Subjects included in this discovery analysis were randomly selected from all subjects participating in the Phase I study. None of the patients had any clinical evidence of arthritis at the time of inclusion in the study or a medical history of musculoskeletal, inflammatory or autoimmune conditions. The clinical characteristics of these selected individuals were not significantly different from all Phase I subjects.

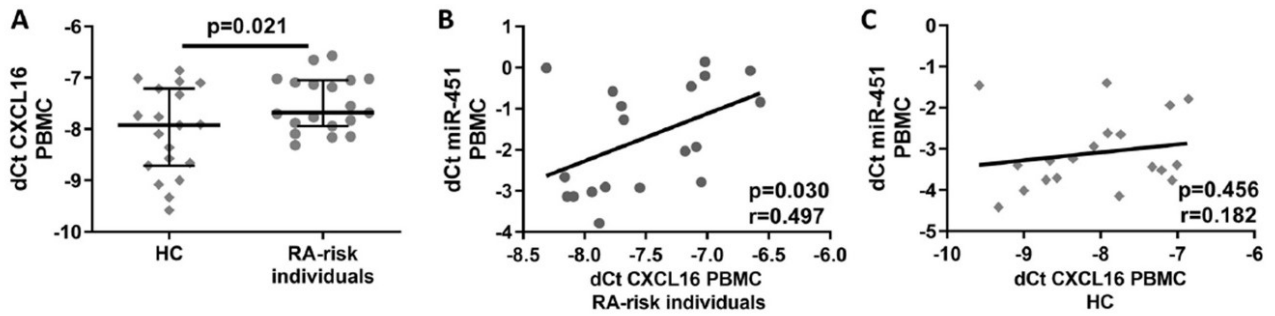
This comprehensive analysis of 380 miRNAs in plasma and PBMC was performed using Human Pool A TaqMan Low-Density Array (TLDA). Of the 380 analysed miRNAs, 231 miRNAs were detected in PBMC from at least 1 RA-risk individual with arthralgia, and 225 miRNAs were detected in at least 1 HC. For comparison, 125 extracellular circulating miRNAs were detected in the plasma of at least 1 RA-risk individual with arthralgia, and 124 circulating miRNAs were detected in at least 1 HC sample. No miRNA was expressed in any of the five samples in the patient group and was completely absent in the comparator group. Only miRNAs expressed in all plasma or PBMC samples at a Ct cycle of less than 30 with more than a 1.5-fold difference between the groups were predefined for inclusion in the next validation step.

Of all tested miRNAs, only miR-451 fulfilled these predefined criteria. The TLDA analysis revealed 2.43-fold higher expression of miR-451 in PBMC ( $p=0.199$ ) and 1.55-fold lower levels of circulating miR-451 ( $p=0.606$ ) in RA-risk individuals with arthralgia compared to HC. Next, single assay validation in larger Phase I cohorts ( $n=19$  individuals in each group, clinical characteristics are provided in Table 1) confirmed the 3.19-fold higher expression of miR-451 in PBMC from RA-risk individuals with arthralgia compared to HC ( $p \leq 0.001$ ). However, the plasma levels of circulating miR-451 were comparable between the groups ( $p=0.968$ ) (Fig. 2).

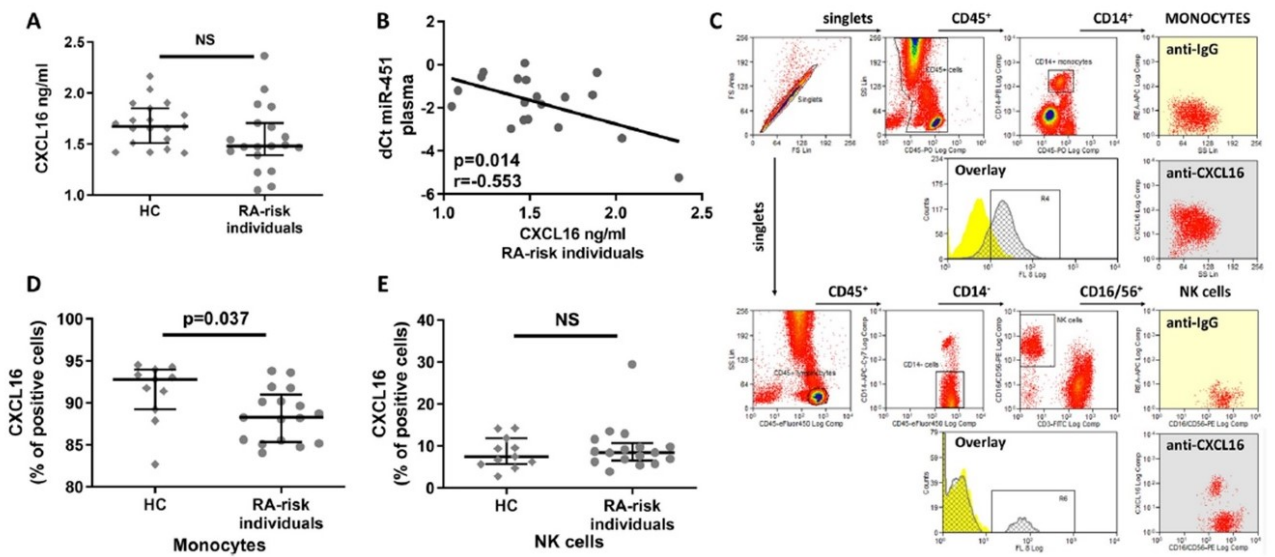
The expression of miR-451 in PBMC from RA-risk individuals with arthralgia positively correlated with the visual analogue scale (VAS) score of the patient's global health ( $r=0.484$ ;  $p=0.036$ ), and a trend towards an association with the tender joint count (TJC) ( $r=0.401$ ;  $p=0.089$ ) was observed. Nonetheless, no correlations with inflammatory markers, the erythrocyte sedimentation rate (ESR) ( $r=-0.043$ ;  $p=0.869$ ) or C-reactive protein (CRP) levels ( $r=0.238$ ;  $p=0.328$ ) were observed.

No associations were observed between the plasma levels of circulating miR-451 with the VAS score ( $r=-0.071$ ;  $p=0.773$ ), TJC ( $r=0.010$ ;  $p=0.967$ ), ESR ( $r=-0.413$ ;  $p=0.099$ ), CRP level ( $r=-0.162$ ;  $p=0.507$ ) or with the expression of miR-451 in corresponding PBMC samples.





**Figure 3.** (A) Higher expression of the CXCL16 mRNA in PBMC from RA-risk individuals with arthralgia compared to HC. (B) A positive correlation between CXCL16 and miR-451 expression in PBMC from RA-risk individuals with arthralgia was observed. (C) CXCL16 expression was not correlated with miR-451 expression in PBMC from HC.



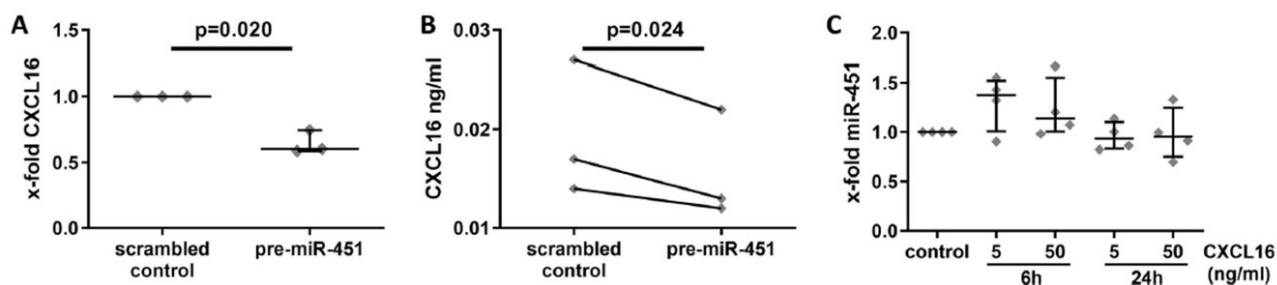
**Figure 4.** Analysis of CXCL16 levels in PBMC and plasma. (A) Plasma levels of CXCL16 were not different between HC and RA-risk individuals. (B) The negative correlation between plasma levels of CXCL16 and circulating miR-451 levels in RA-risk individuals with arthralgia. (C) Flow cytometry gating strategy and identification of the transmembrane form of CXCL16 in monocytes and NK cells. (D) Lower count of CXCL16-positive monocytes in RA-risk individuals with arthralgia compared to HC. (E) No differences in the numbers of CXCL16-positive NK cells were observed between RA-risk individuals with arthralgia and HC. NS, not significant. The gating strategy was created in Summit V4.3.01 software (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO, USA).

**Analysis of CXCL16 as a potential miR-451 target gene.** Given the dysregulation of miR-451 in PBMC from ACPA-positive RA-risk individuals, we searched for potential miR-451 target genes with a plausible role in the development of RA. Prediction algorithms based on potential complimentary binding sites and in vitro gene reporter assays confirmed that CXCL16 is a direct target of miR-451<sup>11</sup>. This molecule is involved in RA pathogenesis<sup>12</sup> and was therefore taken subjected to further analysis.

At the mRNA level, CXCL16 was expressed at 1.47-fold higher levels in PBMC from RA-risk individuals with arthralgia compared to HC ( $p=0.021$ ) (Fig. 3A) in Phase I cohort and positively correlated with the TJC ( $r=0.576$ ;  $p=0.010$ ), but not with the VAS score ( $r=0.126$ ;  $p=0.606$ ), ESR ( $r=-0.084$ ;  $p=0.749$ ) or CRP level ( $r=0.018$ ;  $p=0.943$ ). The expression of the CXCL16 mRNA positively correlated with miR-451 expression ( $r=0.497$ ;  $p=0.030$ , Fig. 3B) in RA-risk individuals with arthralgia, but a correlation was not observed in HC ( $r=0.182$ ;  $p=0.456$ ) (Fig. 3C).

The CXCL16 protein exists in 2 forms: a secreted form present in plasma or serum and a cell membrane-bound protein<sup>13</sup>.

In plasma, the levels of CXCL16 measured using an ELISA were not different between RA-risk individuals with arthralgia ( $n=19$ ) and HC ( $n=19$ ,  $p=0.110$ ) (Fig. 4A) in Phase I cohort, whose clinical characteristics are shown in Table 1. We identified a negative correlation between plasma CXCL16 levels and circulating miR-451 levels ( $r=-0.553$ ,  $p=0.014$ ) (Fig. 4B) and a positive correlation with the ESR ( $r=0.570$ ,  $p=0.017$ ) and CRP levels



**Figure 5.** Regulation of miR-451 and CXCL16 in monocytes. Transfection of monocytes with pre-miR-451 downregulates the expression of CXCL16 at the (A) mRNA and (B) protein levels. (C) Stimulation of monocytes with CXCL16 tends to upregulate miR-451.

( $r = 0.599$ ,  $p = 0.007$ ), but not with the VAS score ( $r = 0.078$ ;  $p = 0.750$ ) or TJC ( $r = -0.288$ ;  $p = 0.234$ ) in RA-risk individuals with arthralgia. In contrast, we did not find a significant correlation between plasma levels of CXCL16 and circulating miR-451 ( $r = 0.257$ ;  $p = 0.336$ ) or CRP ( $r = 0.408$ ,  $p = 0.083$ ) in HC.

Next in Phase II, we further analysed the expression of the transmembrane protein and identified which cell subsets among PBMC expressed CXCL16. A flow cytometry analysis of different leucocyte subpopulations revealed that CXCL16 was expressed on the surface of monocytes and natural killer (NK) cells (Fig. 4C), but not on the surface of T and B lymphocytes. Moreover, a lower count of CXCL16-positive monocytes was observed in RA-risk individuals with arthralgia than in HC ( $p = 0.037$ , Fig. 4D), while no difference in the number of CXCL16-positive NK cells was observed ( $p = 0.696$ , Fig. 4E).

**Association between CXCL16 and miR-451 expression in monocytes.** These differences in the levels of the CXCL16 protein in monocytes prompted us to further analyse the association between miR-451 and the expression of the CXCL16 mRNA and protein in isolated monocytes ( $n = 8$ ). Unfortunately, a correlation was not observed between miR-451 and the CXCL16 mRNA ( $r = -0.084$ ,  $p = 0.825$ ). Similar to the association between miR-451 and CXCL16 in PBMC mentioned above, the transcriptional data point towards either indirect regulation of CXCL16 by miR-451 or an additional regulatory mechanism in PBMC from RA-risk individuals with arthralgia. We explored these regulatory mechanisms by conducting proof-of-concept experiments in vitro.

We first transfected monocytes ( $n = 3$ ) with pre-miR-451 and observed the downregulation of CXCL16 at both the mRNA ( $p = 0.020$ ) (Fig. 5A) and protein levels in cell culture supernatants ( $p = 0.024$ ) (Fig. 5B). Next, we analysed whether CXCL16 regulates the expression of miR-451 in monocytes. Stimulation of monocytes ( $n = 4$ ) with recombinant CXCL16 tended to upregulate miR-451 in monocytes in vitro after 6 h of stimulation ( $p = 0.250$  for both concentrations) (Fig. 5C).

## Discussion

Roles for miRNAs in the development and maintenance of many autoimmune diseases, including RA, have been reported<sup>6</sup>. The identification of differentially expressed miRNAs in individuals with arthralgia at risk of progression to RA may provide a new perspective on the role of miRNAs in the development of RA. Recently, the first study on miRNAs in ACPA-positive individuals with arthralgia at risk of developing RA showed that serum levels of miR-22, miR486-3p, and miR-382 in these RA-risk individuals were associated with progression from systemic autoimmunity to clinical arthritis<sup>14</sup>. Here, we document the differential expression of miR-451 in PBMC from ACPA-positive RA-risk individuals with arthralgia compared to HC and its regulation of chemokine CXCL16.

Validation of our preliminary data from the comprehensive discovery miRNA analysis confirmed higher expression of miR-451 in PBMC from ACPA-positive RA-risk individuals with arthralgia compared to HC. The upregulation of miR-451 in PBMC might be either constitutive and represent a biomarker of the preclinical phase or might be increased in response to mild systemic inflammation, as evidenced here by higher CRP levels and supported by in vitro stimulation with CXCL16. However, we did not verify any difference in miR-451 expression in plasma samples from our validation cohort, although circulating miR-451 expression was previously shown to be increased in patients with established RA<sup>15</sup>. This discrepancy might be explained by the established clinical arthritis in patients with an advanced phase of RA. The lack of correlation between miR-451 expression in PBMC and plasma is not surprising, as extracellular circulating miRNAs may also originate from cells/organs other than PBMC, and cells may employ different priming or secretion mechanisms for various miRNAs<sup>9</sup>.

The overexpression of miR-451 in T cells and the correlation with the Disease Activity Score of 28 joints (DAS28), ESR, or IL-6 level was previously reported in treatment-naïve patients with early RA and patients with established RA compared to HC<sup>16</sup>. Since individuals with arthralgia at risk of developing RA do not have clinically defined arthritis, DAS28 is not applicable in our study population. A composite measure of “activity” in individuals at risk of RA is not available, and the global VAS score or even TJC might be considered a subjective assessment of discomfort in these individuals. ACPA antibodies induce joint pain in murine models<sup>17</sup>. Notably, miR-451 is also involved in the mechanism regulating pain<sup>18</sup>. We hypothesize that the correlation of miR-451 expression in PBMC with the VAS score may therefore reflect an unknown mechanism by which miR-451 regulates pain in ACPA-positive individuals with arthralgia.

The anti-inflammatory and anti-migratory effects of miR-451 mediated by the suppression of IL-6, TNF- $\alpha$ , or RANTES expression have been described in vitro in dendritic cells<sup>19</sup> and synovial fibroblasts<sup>20</sup> and in vivo

in mice with collagen-induced arthritis<sup>21</sup>. Based on these findings, miR-451 potentially represents a biomarker with a functional role in inflammation or chemotaxis in individuals with RA, and thus we were interested in identifying the potential target genes of miR-451 with implications in the preclinical phase of RA. Based on the literature search, we selected CXC-motif ligand (CXCL) 16 as a gene of interest. Moreover, prediction algorithms and *in vitro* gene reporter assays confirmed that CXCL16 is a direct target of miR-451<sup>11</sup>.

Unexpectedly, we found a positive correlation between miR-451 and the CXCL16 mRNA in PBMC and a lack of correlation in monocytes from RA-risk individuals with arthralgia. Although our proof-of-concept *in vitro* experiments supported a direct regulatory mechanism, protein translation may also be reduced by partial binding of the miRNA to the mRNA without mRNA decay<sup>22</sup>, which might explain this positive correlation. In addition, these data suggest the presence of additional and more complex regulatory mechanisms *in vivo*. Different stimuli, such as increased systemic inflammation, upregulate miR-451 in the preclinical phase of RA, as shown here by the induction of miR-451 expression by CXCL16 *in vitro*. We admit that CXCL16 expression is also regulated by other miRNAs or triggers of different origins.

CXCL16 is a chemokine that is synthesized as a transmembrane protein by dendritic cells, macrophages, B and T lymphocytes, endothelial cells, and RA synovial fibroblasts or is cleaved by ADAM-10 and subsequently secreted in a soluble form<sup>12,13,23–27</sup>.

The data on serum CXCL16 levels in patients with RA and HC remain inconsistent<sup>12,26,28</sup>. Our data did not reveal a difference in plasma CXCL16 levels between individuals with arthralgia at risk of RA and HC; however, higher CRP levels and the positive correlation between CXCL16 with the CRP levels and ESR shown here in RA-risk individuals with arthralgia may reflect an inflammatory milieu in the preclinical phase. Similar to miR-451, CXCL16 may be secreted into the plasma from various cells, and the lack of a difference between our groups does not reflect the lack of regulation by miR-451 at the cellular level.

Consistent with the *in vitro* transfection experiments, the flow cytometry analysis of the CXCL16 protein in leukocyte subpopulations revealed lower transmembrane CXCL16-positive monocyte counts in RA-risk individuals with arthralgia compared to HC. The transmembrane CXCL16 protein was previously shown to stimulate inflammation by interacting with inflammatory cells, including macrophages<sup>29</sup>.

While monocytes from patients with active, established RA showed similar surface expression of CXCL16 as HC<sup>23</sup>, CXCL16 was expressed at high levels locally in the synovial tissue and synovial fluid of patients with RA<sup>12,24–26</sup>. During inflammation in the joint, locally activated cells express increased levels of adhesion molecules and chemokines that increase the influx of monocytes into the joint<sup>26,30</sup>. Monocytes differentiate into macrophages by entering the synovial tissue, which further triggers CXCL16 expression and contributes to the upregulation of CXCL16 and ADAM-10 in the RA synovium<sup>26</sup>. These changes result in increased concentrations of cleaved CXCL16 in the synovial fluid and the recruitment of CXCL16 receptor (CXCR6+)-expressing T cells to the synovial tissue, contributing to the inflammatory cascade associated with RA<sup>24,26</sup>. We hypothesize that the immune system of ACPA-positive individuals at risk of developing RA strives to reduce inflammation by upregulating miR-451, which subsequently downregulates CXCL16 expression in monocytes and thereby delays the shift from the preclinical phase to the clinical manifestation of arthritis.

Our study has several limitations. As mentioned above, the expression of CXCL16 in PBMC/monocytes is also regulated by miRNAs other than miR-451 or other stimuli. We are also aware that the local expression of CXCL16 in inflammatory cells present in the synovial tissue may not necessarily correspond with the expression of CXCL16 in peripheral blood leukocytes described here. Similar immunohistochemical features of synovial biopsy samples between ACPA-positive individuals without arthritis at risk of RA and controls (unlike patients with RA) have been reported<sup>31</sup>. However, the expression of CXCL16 in the synovial tissue of individuals in the preclinical phase of RA has not yet been shown. Since we are unable to obtain synovial fluid and synovial tissue from individuals at risk of RA who do not yet present with arthritis, we are unable to directly verify our hypothesis of the protective effect of miR-451 mediated by CXCL16 on the development of RA at the site of inflammation in the synovium. Additionally, we performed a cross-sectional analysis, and the comparison between the preclinical phase and the time of manifestation of clinical arthritis is missing. Only long-term follow-up and the collection of longitudinal data, including the collection of fresh samples from large cohorts of subjects who develop clinical arthritis in the future would truly verify our hypothesis.

In conclusion, we suggest that the upregulation of miR-451 in PBMC is either constitutive or increased in response to mild systemic inflammation in the preclinical phase, as evidenced here by higher CRP levels and a positive correlation between CXCL16 and CRP levels. Subsequently, miR-451 downregulates the expression of CXCL16 in monocytes and reduces the inflammatory milieu in the preclinical phase of RA, thereby attempting to delay the shift from the preclinical phase to the clinical manifestation of arthritis. With the increasing cascade of inflammatory stimuli, this protective mechanism may become insufficient to prevent the manifestation of arthritis. This hypothesis, however, warrants further investigation.

## Methods

**Study population.** Our study included ACPA-positive RA-risk individuals with arthralgia and HC. By definition, all RA-risk individuals with arthralgia had no clinical evidence of arthritis at the time of inclusion in the study or any defined systemic inflammatory rheumatic disease, and all individuals were ACPA positive. Individuals at risk of RA were defined as ACPA-positive if they were positive for either an antibody against the cyclic citrullinated protein (anti-CCP) or modified citrullinated vimentin (anti-MCV) (further details are provided in the Methods—Protein analysis). All HC were healthy employees and their family members with no history of musculoskeletal, inflammatory, or autoimmune conditions or cancer, and were all ACPA-negative.

Our initial analysis (Phase I, Fig. 1) included 19 ACPA-positive RA-risk individuals with arthralgia and 19 HC. The clinical characteristics are shown in Table 1.

The flow cytometry analysis (Phase II, Fig. 1) involved samples from 17 ACPA-positive RA-risk individuals with arthralgia and 11 HC included during further recruitment. No subject included in Phase II overlapped with the subjects involved in Phase I. The clinical characteristics are shown in Table 2. Significant differences were not observed in any clinical characteristics among individuals with arthralgia at risk of RA who were included in Phase I and Phase II.

All RA-risk individuals with arthralgia and HC were recruited from the outpatient clinic of the Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic. Written informed consent was obtained from all participants prior to enrolment. The study was approved by the local ethics committee at the Institute of Rheumatology in Prague. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

**Analysis of miRNA and gene expression.** Whole blood samples from all participants were collected in EDTA-containing tubes. All plasma samples were separated by centrifugation within 4 h of collection to ensure constant preanalytical conditions. PBMC were isolated by Ficoll–Paque density gradient centrifugation. CD14+ cells were labelled with magnetic StraightFrom Whole Blood CD14 MicroBeads and then separated using a Whole Blood Column Kit (both Miltenyi Biotec Inc., Gladbach, Germany). Plasma samples and cell culture samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . PBMC and freshly isolated monocytes were snap-frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . No freeze–thaw cycles occurred before use.

**Monocyte culture and in vitro stimulation and transfection.** For proof-of-concept experiments, monocytes were isolated from the blood of healthy donors using StraightFrom Whole Blood CD14 MicroBeads and Whole Blood Column Kit as described above. Cells were seeded in 24-mm diameter culture plates at a density of  $7 \times 10^5$  cells/well in RPMI 1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Lonza, Verviers, Belgium) and 1% Pen-Strep (Lonza).

For transfection experiments, cells seeded in 750  $\mu\text{l}$  of RPMI 1640 (GIBCO) were transfected with Lipofectamine RNAiMAX Reagent using either Pre-miR miRNA Precursor Negative Control as a scrambled control or Pre-miR-hsa-miR-451a Precursor (30 pmol) (all Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  for 24 h. For stimulation experiments, the cells were stimulated with 5 or 50 ng of CXCL16 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) or the corresponding control and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  for 6 and 24 h. Cell culture supernatants were separated after centrifugation for 10 min and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**RNA isolation.** Total RNA was extracted from plasma samples using phenol–chloroform, as previously described<sup>32</sup>. Plasma was homogenized with TRIzol LS reagent (Thermo Fisher Scientific), centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and subjected to three cycles of acid phenol–chloroform (Thermo Fisher Scientific) extraction. RNA was precipitated by adding RNase-free glycogen (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 100% isopropanol, incubated at room temperature and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The pellet was washed with 75% ethanol, and RNA was dissolved in RNase-free water. Three synthetic *C. elegans* miRNAs, cel-miR-39, cel-miR-54 and cel-miR-238 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), 25 fmol each, were spiked into plasma samples after denaturation and served as internal calibrators, as previously described<sup>7</sup>.

PBMC and freshly isolated and cell culture harvested monocytes were lysed with 700  $\mu\text{l}$  of QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Düsseldorf, Germany). Total RNA was then isolated using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations in all samples were measured using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

**Analysis of miRNA expression.** The expression of miRNAs was analysed as previously described<sup>33</sup>. First, total RNA was isolated from individual plasma and PBMC samples (5 samples from each group), and complementary DNA templates were obtained by reverse transcription using a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and Megaplex RT Primers with equal amounts of RNA input. The cDNA templates were preamplified using 2 $\times$  TaqMan PreAmp Master Mix and Megaplex PreAmp Primers (all Thermo Fisher Scientific) with a PCR thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A Human Pool A TaqMan Low-Density Array (TLDA) platform for microRNAs was selected for the discovery analysis of 380 miRNAs using the QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). All steps were performed according to the manufacturer's instructions. The dCt method was used for relative quantification:  $dCt = Ct(\text{array average}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ , followed by the x-fold change calculation.

Total RNA was reverse transcribed from the remaining non-pooled plasma and PBMC samples for subsequent single assay validation or from cultured monocytes using TaqMan Real-Time miRNA specific primers (including primers for cel-miR-39, cel-miR-54 and cel-miR-238 in plasma or RNU44 in PBMC and monocytes that were used for normalization) and then amplified by Real-Time PCR with TaqMan probes and TaqMan Universal PCR Master Mix using the QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (all Thermo Fisher Scientific). The dCt method was used for relative quantification:  $dCt = Ct(\text{spike-in average or RNU44}) - Ct(\text{miRNA of interest})$ . Lower dCt values represent lower expression levels of particular miRNAs. All data were analysed with QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System Software (Thermo Fisher Scientific).

**Analysis of protein-coding gene expression.** Total RNA was reverse transcribed from PBMC or monocytes using a High-capacity cDNA Reverse Transcription kit, and PCR was performed using a standard protocol with a QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System. Predeveloped TaqMan probes were used to detect CXCL16 and beta-actin (ACTB), which was used for normalization (all Thermo Fisher Scientific). The dCt

method was used for relative quantification as follows:  $dCt = Ct(\text{ACTB}) - Ct(\text{studied gene})$ . Higher  $dCt$  values represent higher expression levels.

**Protein analysis by ELISA.** The levels of CXCL16 in plasma and supernatant samples were measured using a commercially available ELISA kit (Human CXCL16 Quantikine ELISA, R&D Systems, Inc.) according to the manufacturer's protocol. Rheumatoid factor IgA, IgG, IgM and anti-CCP titres were measured using commercial ELISAs (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.) with a cut-off of 22.0 U/ml and anti-MCV titres were measured using an ELISA (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) with a cut-off of 19.9 U/ml. Absorbance at a primary wavelength of 450 nm was detected using a Sunrise ELISA reader (Tecan Group Ltd., Zürich, Switzerland), and the data were quantified using Kim version 5.43.01 software (Daniel Kittrich—Software Production, Prague, Czech Republic).

**Flow cytometry analysis.** Whole blood samples from both groups were collected in EDTA-containing tubes. The presence of CXCL16 on the surface of cells was analysed by performing direct staining of 100  $\mu\text{l}$  of whole blood or 50  $\mu\text{l}$  of isolated monocytes resuspended in Whole Blood Column Elution Buffer (Miltenyi Biotec Inc.). After 20 min of incubation with conjugated antibodies for membrane staining (Supplementary Table 1), whole blood samples were lysed with a  $1 \times$  BD Lysing solution (Becton Dickinson), and all samples were washed twice with PBS (Thermo Fisher Scientific).

Monocytes were defined as  $\text{CD}45^+\text{CD}14^+$  cells. Lymphocyte subpopulations ( $\text{CD}45^+\text{CD}14^-$ ) were defined as  $\text{CD}19^+\text{CD}3^-$  B lymphocytes,  $\text{CD}3^+$  T lymphocytes and  $\text{CD}16/56^+\text{CD}3^-$  NK cells. Surface expression of CXCL16 in leukocyte populations was compared to the universal isotype control (REA Control (S)-APC) staining (Miltenyi Biotec Inc.). The gating strategy is provided in Fig. 4A. A list of antibodies used for the flow cytometry analysis is provided in Supplementary Table 1.

Stained samples were quantified using a CyAnADP flow cytometer (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO, USA). The stable setting of photomultipliers was preserved with the daily setting calibrated on Rainbow Calibration Particles (SPHERO Rainbow Calibration Particles, Spherotech, Lake Forest, IL, USA).

**Statistical analysis.** Data are presented as medians and interquartile ranges [IQRs]. Two-sample T tests or Mann–Whitney tests were used for comparisons between 2 groups, and Fischer's exact test was used where appropriate. Pearson's or Spearman's correlation coefficients were calculated to determine the correlation between any two variables. P values less than 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed and graphs were generated using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Received: 7 February 2020; Accepted: 4 January 2021

Published online: 25 February 2021

## References

- Rantapaa-Dahlqvist, S. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2741–2749 (2003).
- Raza, K., Klareskog, L. & Holers, V. M. Predicting and preventing the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 1–3 (2016).
- Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **62**, 2569–2581 (2010).
- Ten Brinck, R. M. *et al.* The risk of individual autoantibodies, autoantibody combinations and levels for arthritis development in clinically suspect arthralgia. *Rheumatology (Oxford)* **56**, 2145–2153 (2017).
- Gerlag, D. M. *et al.* Effects of B-cell directed therapy on the preclinical stage of rheumatoid arthritis: The PRAIRI study. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 179–185 (2019).
- Filkova, M., Jungel, A., Gay, R. E. & Gay, S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs* **26**, 131–141 (2012).
- Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–10518 (2008).
- Hunter, M. P. *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE* **3**, e3694 (2008).
- Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–5008 (2011).
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 423–433 (2011).
- Zhang, F., Huang, W., Sheng, M. & Liu, T. MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting CXCL16 and is associated with prognosis of osteosarcoma patients. *Tumour Biol.* **36**, 2041–2048 (2015).
- Li, C. H. *et al.* CXCL16 upregulates RANKL expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the JAK2/STAT3 and p38/MAPK signaling pathway. *Inflamm. Res.* **65**, 193–202 (2016).
- Abel, S. *et al.* The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* **172**, 6362–6372 (2004).
- Ouboussad, L. *et al.* Profiling microRNAs in individuals at risk of progression to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 288 (2017).
- Wang, H., Peng, W., Ouyang, X., Li, W. & Dai, Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl. Res.* **160**, 198–206 (2012).
- Smigielska-Czepiel, K. *et al.* Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes Immun.* **15**, 115–125 (2014).
- Wigerblad, G. *et al.* Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 730–738 (2016).

18. Sun, X. & Zhang, H. miR-451 elevation relieves inflammatory pain by suppressing microglial activation-evoked inflammatory response via targeting TLR4. *Cell Tissue Res.* 374, 487–495 (2018).
19. Rosenberger, C. M. *et al.* miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *J. Immunol.* 189, 5965–5975 (2012).
20. Wang, Z. C. *et al.* MiR-451 inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 14562–14567 (2015).
21. Murata, K. *et al.* MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis Rheumatol.* 66, 549–559 (2014).
22. Iwakawa, H. O. & Tomari, Y. The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol.* 25, 651–665 (2015).
23. van Lieshout, A. W. *et al.* Regulation of CXCL16 expression and secretion by myeloid cells is not altered in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1036–1043 (2009).
24. Nanki, T. *et al.* Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 3004–3014 (2005).
25. Ruth, J. H. *et al.* CXCL16-mediated cell recruitment to rheumatoid arthritis synovial tissue and murine lymph nodes is dependent upon the MAPK pathway. *Arthritis Rheum.* 54, 765–778 (2006).
26. van der Voort, R. *et al.* Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum.* 52, 1381–1391 (2005).
27. Wilbanks, A. *et al.* Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J. Immunol.* 166, 5145–5154 (2001).
28. van Lieshout, A. W. T. *et al.* Circulating levels of the chemokine CCL18 but not CXCL16 are elevated and correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1334–1338 (2007).
29. Zhang, L. *et al.* Chemokine CXCL16 regulates neutrophil and macrophage infiltration into injured muscle, promoting muscle regeneration. *Am. J. Pathol.* 175, 2518–2527 (2009).
30. Isozaki, T., Rabquer, B. J., Ruth, J. H., Haines, G. K. 3rd & Koch, A. E. ADAM-10 is overexpressed in rheumatoid arthritis synovial tissue and mediates angiogenesis. *Arthritis Rheum.* 65, 98–108 (2013).
31. van de Sande, M. G. *et al.* Different stages of rheumatoid arthritis: Features of the synovium in the preclinical phase. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 772–777 (2011).
32. Filkova, M. *et al.* Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1898–1904 (2014).
33. Prajzlerova, K., Grobelna, K., Pavelka, K., Senolt, L. & Filkova, M. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun. Rev.* 15, 501–509 (2016).

### Acknowledgements

This study was financially supported by grant number AZV-17-32612A, SVV 260 523 and a project of the MHCR for conceptual research development No. 023728.

### Author contributions

K.P. performed the majority of the molecular biology analyses, in vitro experiments, and flow cytometry analyses, interpreted the data, performed statistical analyses and prepared the manuscript. O.K. was involved in the flow cytometry analysis and data interpretation. P.H. and M.G. were involved in enrolling the patients, performing clinical assessments and interpreting the statistical analyses. V.H. assisted with the molecular biology analysis. J.V. and K.P. contributed to the design of the study and writing of the manuscript. L.Š. and M.F. were responsible for the conception and design of the study, assessment of the patients, interpretation of the data, writing the manuscript and providing final approval of the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84004-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.P.

Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021