

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

**Využití cirkulujících miRNA**

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

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

Ing. Klára Prajzlerová

Praha, 2021

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Školící pracoviště: Revmatologický ústav a Revmatologická klinika 1. LF UK,

Na Slupi 4, 128 00 Praha 2

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

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## **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. Expese 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 .....	7
2. HYPOTÉZA A CÍLE.....	9
3. METODIKA A VÝSLEDKY .....	10
3.1. MiRNA a postižení páteře u pacientů s axiální spondyloartritidou .....	10
3.2. MiR-145 jako ukazatel léčebné odpovědi u pacientů s ankylozující spondylitidou	12
3.3. MiR-125b v predikci léčebné odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou.....	14
3.4. Význam miR-451 u jedinců v riziku rozvoje revmatoidní artritidy .....	17
4. DISKUZE .....	21
5. ZÁVĚR .....	24
6. POUŽITÁ LITERATURA .....	25
7. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	29

## 1. ÚVOD

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). V závislosti na komplementaritě vazby mezi miRNA a cílovou mRNA dochází v rámci inhibičního komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) buď ke štěpení, nebo destabilizaci mRNA, případně k inhibici translace. 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). Tím, jak miRNA regulují genovou expresi, zasahují prakticky do všech buněčných procesů včetně buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy (Esteller, 2011), jejich dysregulace se podílí na patofyziologii řady onemocnění, včetně revmatických.

MiRNA se vyskytují nejenom uvnitř buněk, ale byly objeveny i extracelulárně. Přítomnost těchto tzv. cirkulujících miRNA byla postupně popsána v séru, plazmě a dalších tělních tekutinách (Chen et al., 2008, Weber et al., 2010). Inkorporace v mikroparticulích nebo asociace s proteiny vázající RNA (AGO2, nucleophosmin 1), případně s lipoproteinovými komplexy (HDL, LDL) zajišťuje cirkulujícím miRNA ochranu před všudypřítomnými RNázami a vysokou stabilitu. Navíc cirkulující miRNA mohou být v *in vitro* prostředí vychytávány dalšími buňkami a mohou regulovat expresi genů i u vzdálených buněk. Podílejí se tak na mezibuněčné komunikaci (Kosaka et al., 2010, Creemers et al., 2012, Cocucci et al., 2009). Značná stabilita a jejich relativně snadná dostupnost z tělních tekutin dělá z cirkulujících miRNA 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).

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 s radiografickou formou (r-AxSpA) a pacienty s neradiografickou AxSpA (nr-AxSpA). Nemoc se obvykle projeví ve třetí dekádě života pacienta a postihuje častěji muže než ženy (Sieper and Poddubnyy, 2017). U pacientů se SpA dochází k hlavnímu zánětlivému procesu v oblasti entezií a přilehlé kosti. Zánětlivý infiltrát

s osteoklasty iniciují lokální zánět, který vede k erozím a destrukci kosti, následně je zánětlivá tkáň nahrazena pomocí osteoblastů novou kostí (Lories et al., 2009).

Do patogeneze SpA je zapojeno mnoho buněk imunitního systému a jimi produkováných zánětlivých cytokinů, které mohou být ovlivňovány miRNA. Například miR-130a přímo snižuje expresi cytokinu TNF $\alpha$  (Jiang and Wang, 2016), miR-22-5p a miR-675-5p zase snižují expresi IL-17A a IL-23 (Zhang et al., 2020) a miR-10b nepřímo snižuje produkci IL-17A (Chen et al., 2017), tedy cytokinů podílejících se na patogenezi SpA. Jiné miRNA zase ovlivňují kostní remodelaci, která je významným patogenetickým znakem nemoci. MiR-21 potlačuje osteoklastogenezi (Sugatani et al., 2011) a miR-29a snižuje expresi proteinů DKK1 (dickkopf-related protein 1) a GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 beta), čímž nepřímo podporuje kostní novotvorbu (Li et al., 2015).

Revmatoidní artritida (RA) 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. Typickým patogenetickým znakem je zánět synoviální tkáně v kloubu. Postupným zapojením různých buněk imunitního systému a synoviálních fibroblastů dochází k invazi synoviální tkáně do chrupavky a subchondrální kosti a ke vzniku erozí (Andersson et al., 2008). Stejně jako u SpA je i patogeneze RA ovlivněna působením miRNA. Například miR-146a působí protizánětlivě a mírní kloubní destrukce (Nakasa et al., 2011), naopak miR-155 se nepřímo podílí na produkci prozánětlivých cytokinů, její inhibice snižuje tvorbu prozánětlivých cytokinů a diferenciaci autoreaktivních B a T lymfocytů (Kurowska-Stolarska et al., 2011, Blüml et al., 2011). Stimulace synoviálních fibroblastů pomocí TNF $\alpha$  indukuje expresi miR-18a, která následně zvyšuje produkci dalších prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 a enzymu MMP1 podílejícím se na destrukci chrupavky (Trenkmann et al., 2013). V synoviálních fibroblastech zvýšeně exprimovaná miR-223 nepřímo podporuje osteoklastogenezi a vznik kostních erozí (Shibuya et al., 2013, Li et al., 2012).

Krom výše zmíněných miRNA se známou rolí v patogenezi revmatických onemocnění bylo popsáno mnoho cirkulujících miRNA, jejichž exprese se u jednotlivých pacientů liší. Stanovení hladin cirkulujících miRNA u jednotlivých onemocnění je tak teoreticky možné využít v diagnostice choroby, při monitorování aktivity nemoci nebo pro predikci léčebné odpovědi (Zeng et al., 2014, Prajzlerova and Filkova, 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)

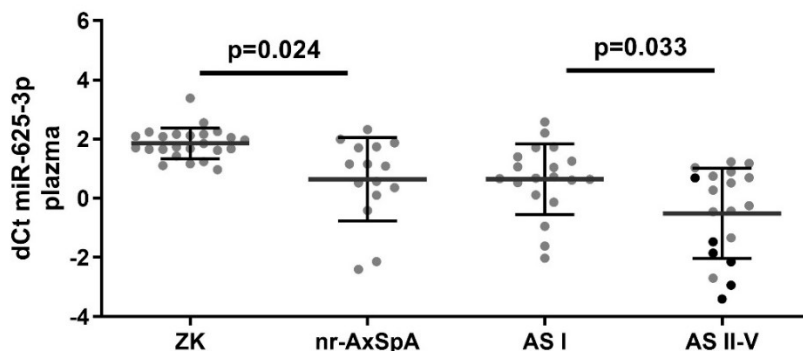
#### 3.1. MiRNA a postižení páteře u pacientů s axiální spondyloartritidou

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:

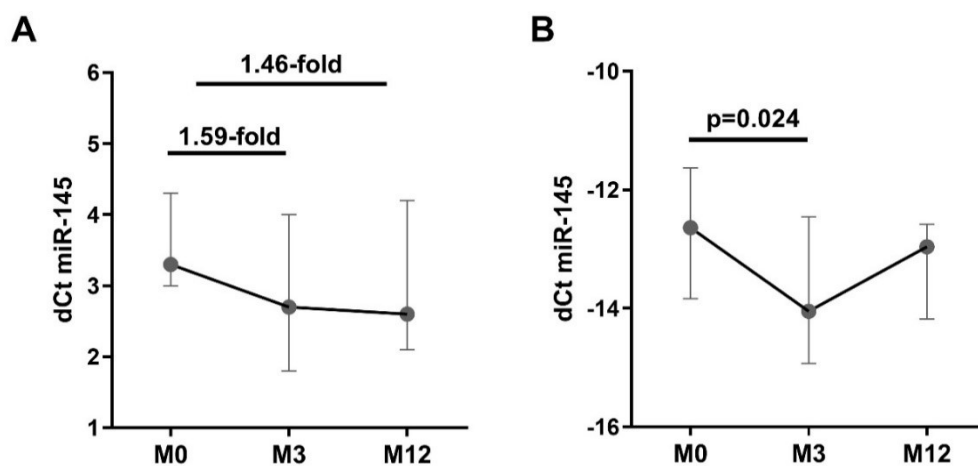
Prajzlerová k, Grobelná K, Hušáková M, Forejtová S, Jünger A, Gay S, Vencovský J, Pavelka K, Šenolt L. Association between circulating miRNAs and spine involvement in patients with axial spondyloarthritis. PLoS ONE, 2017 Sep 22;12(9):e0185323. doi: 10.1371/journal.pone.0185323

### 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.

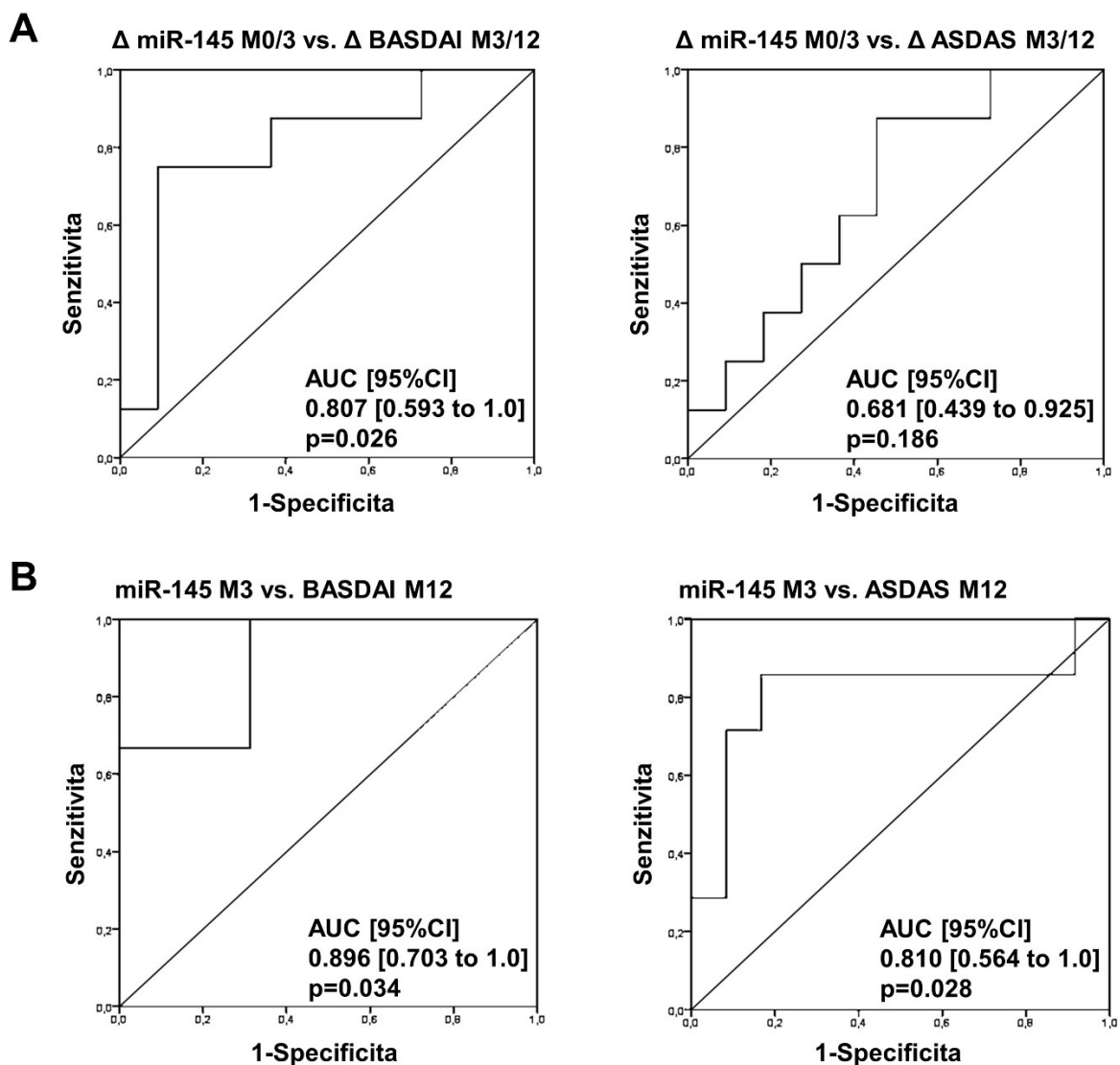
Komplexní TLDA analýza prokázala snížení exprese miR-145 v M3 (1,59x) a v M12 (1,46x) v porovnání s M0. Následná validační analýza potvrdila 1,62x snížení exprese miR-145 v M3 v porovnání s M0 (Obr. 3.2.).



**Obr. 3.2.** Expresce 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:

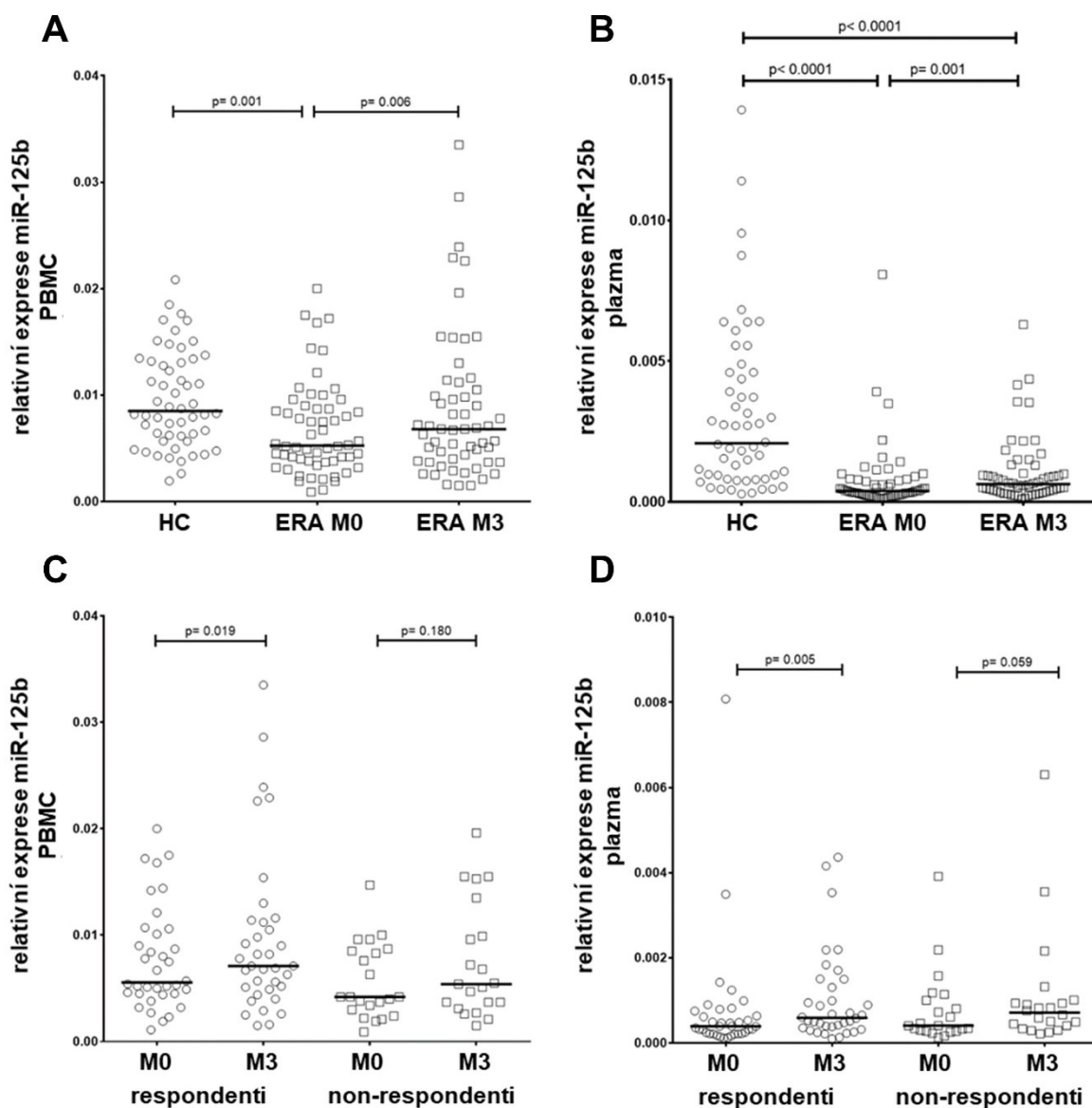
Prajzlerová K, Komarc M, Forejtová Š, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. Circulating miR-145 as a marker of therapeutic response to anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Physiol Res.* 2021 Apr 30;70(2):255-264. doi: 10.33549/physiolres.934542.

### **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.

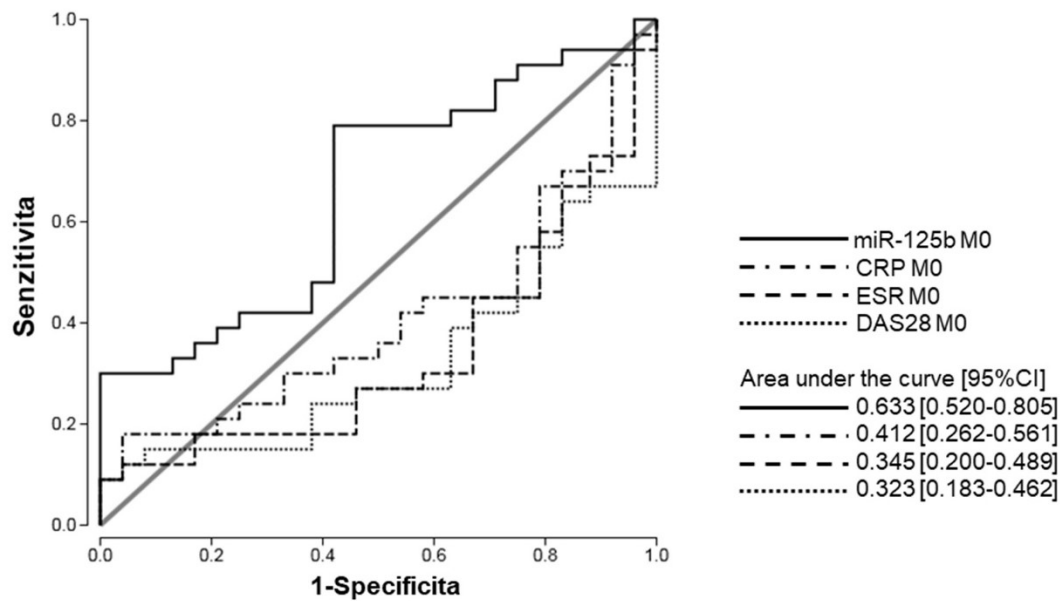
Do studie bylo zařazeno 58 pacientů s ERA před zahájením léčby csDMARD ev. v kombinaci s glukokortikoidy s prospektivním sledováním po 3 a 6 měsících a 54 ZK. ERA pacienti byli navíc rozděleni na tzv. respondenty s dobrou odpovědí na léčbu (definováno jako dosažení nízké aktivity  $\leq 3,2$  nebo remise  $\leq 2,6$  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:

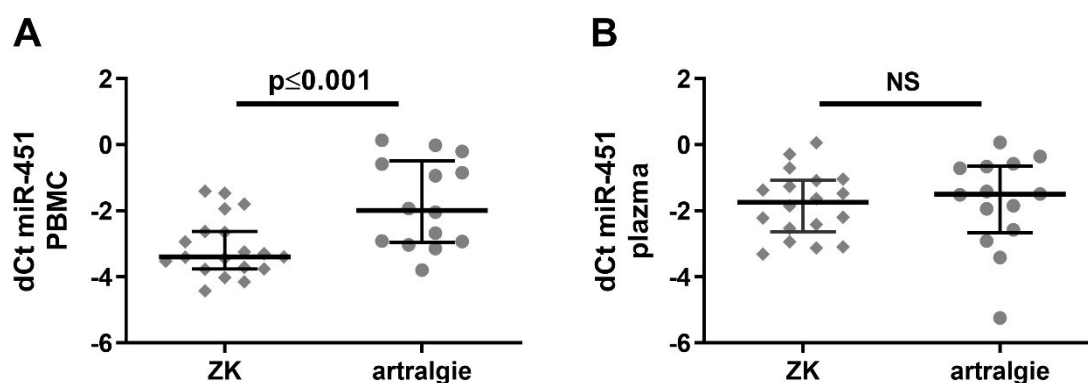
Hrušková V, Jandová R, Vernerová L, Mann H, Pecha O, Prajzlerová K, Pavelka K, Vencovský J, Filková M, Šenolt L. MicroRNA-125: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016 Jun 2;18(1):124. doi: 10.1186/s13075-016-1023-0.



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

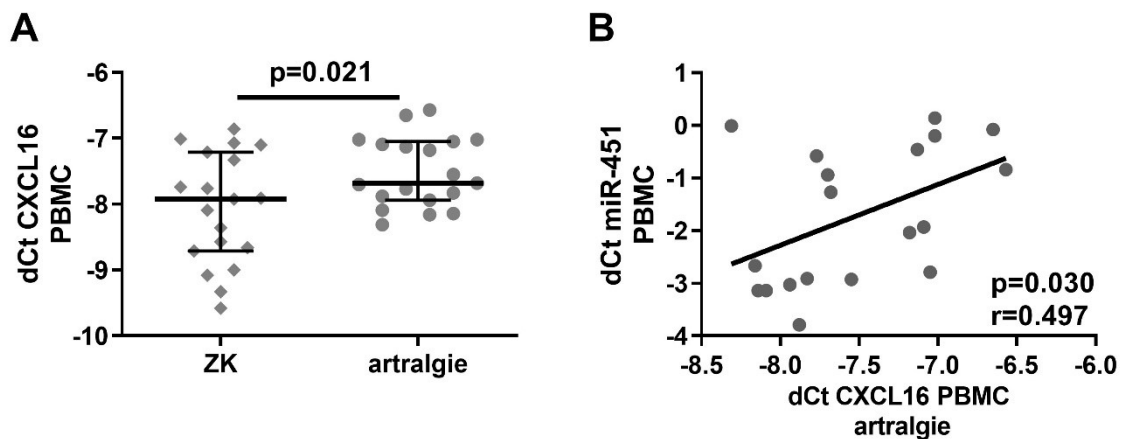
U geneticky predisponovaných jedinců se ACPA objevují dlouho před manifestací nemoci. ACPA pozitivní jedinci s artralgiemi mají až 8x vyšší riziko rozvoje RA v porovnání se seronegativními jedinci (Ten Brinck et al., 2017). Cílem naší práce bylo analyzovat cirkulující a buněčné miRNA u jedinců v preklinickém 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.).



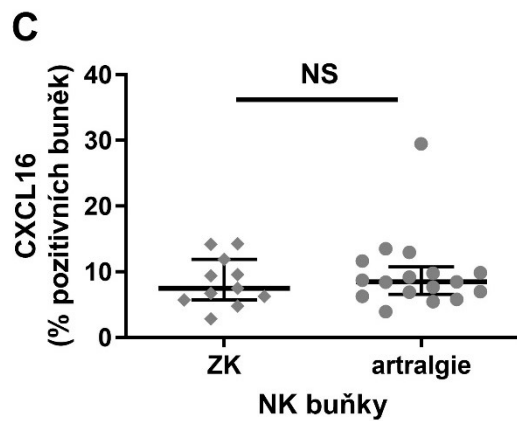
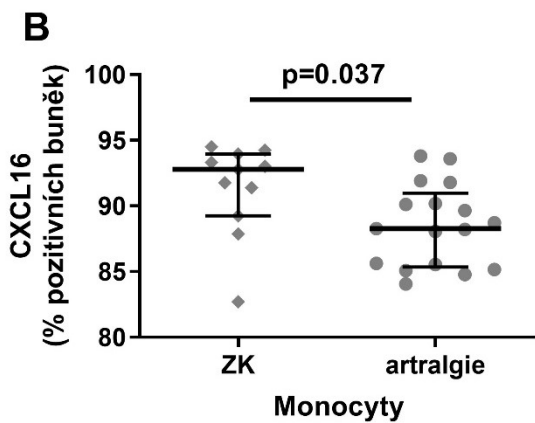
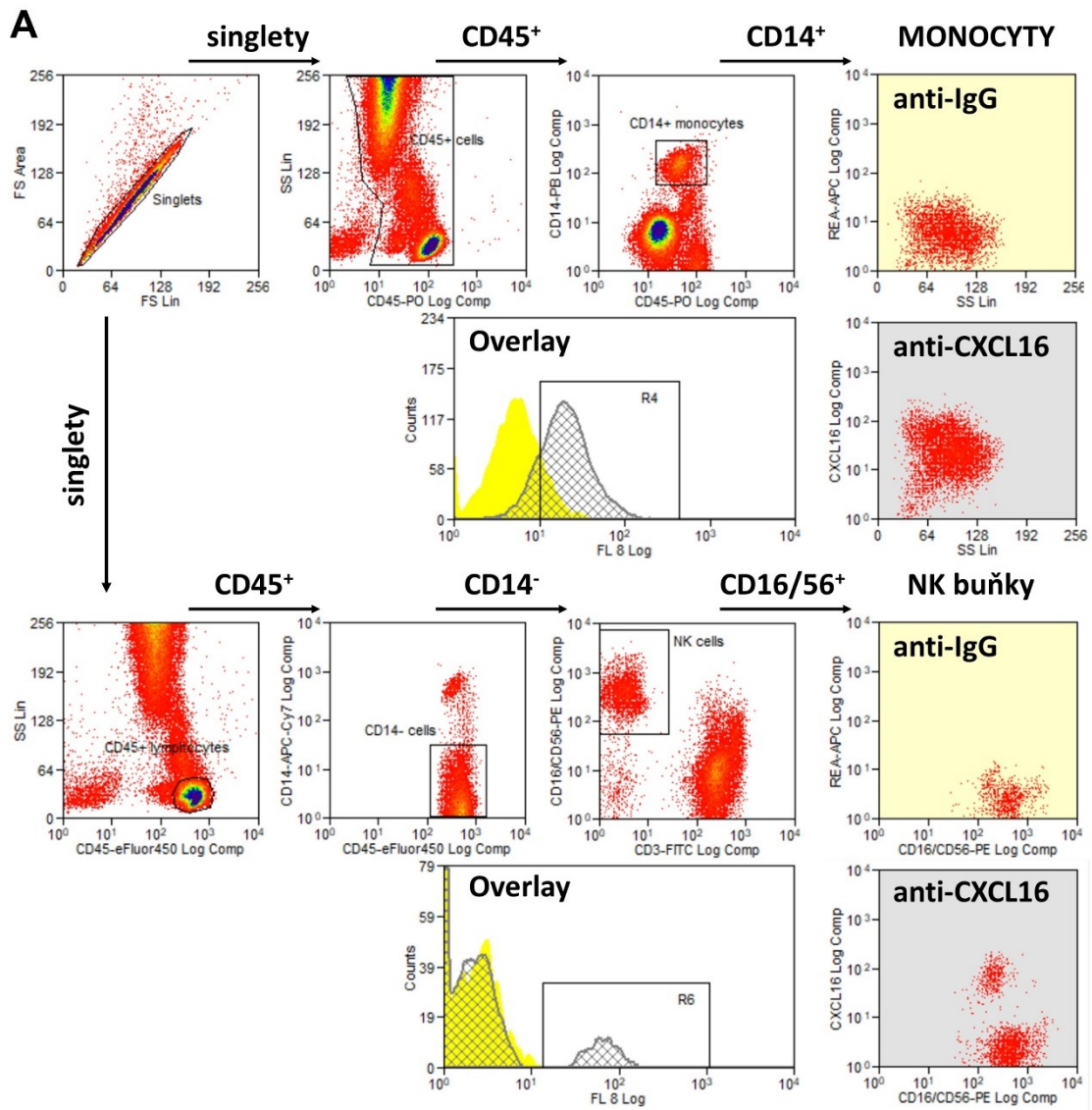
**Obr. 3.6.** Porovnání exprese buněčné a cirkulující miR-145 u jedinců s artralgiemi a ZK.

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.).



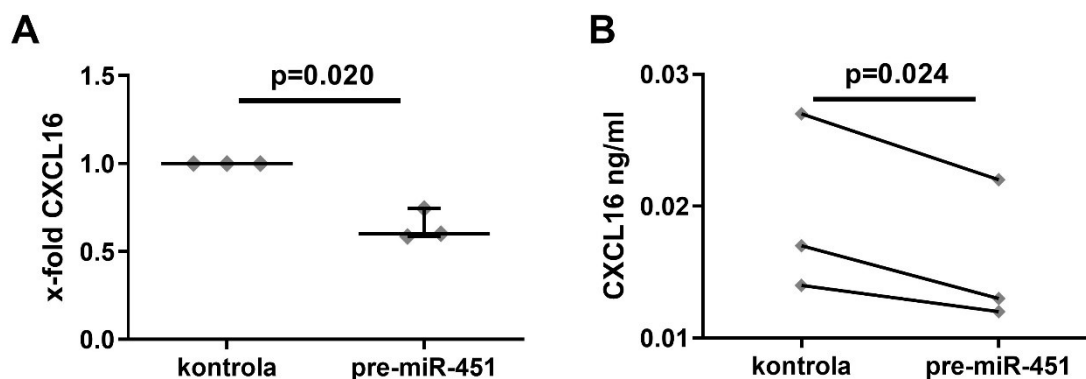
**Obr. 3.7.** Porovnání buněčné exprese CXCL16 v PBMC u jedinců s artralgiemi a ZK (A), korelace buněčné exprese CXCL16 s miR-451 (B).

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 monocyttech *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., 2012). 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 nejpřínosnější 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. POUŽITÁ LITERATURA

- ANDERSSON, A. K., LI, C. & BRENNAN, F. M. 2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10, 204.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- COCUCCI, E., RACCHETTI, G. & MELDOLESI, J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19, 43-51.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- IORIO, M. V. & CROCE, C. M. 2012. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J*, 18, 215-22.
- IWAKAWA, H. O. & TOMARI, Y. 2015. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, 25, 651-665.
- 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.
- KOSAKA, N., IGUCHI, H. & OCHIYA, T. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101, 2087-92.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- PODDUBNY, D. & SIEPER, J. 2017. Mechanism of New Bone Formation in Axial Spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 19, 55.
- PRAJZLEROVA, K. & FILKOVA, M. 2018. Extracelulární miRNA - biogeneze, funkce a využití jako biomarkerů u revmatických onemocnění. *Česká revmatologie*, 26, 171-179.
- PRAJZLEROVA, K., GROBELNA, K., PAVELKA, K., SENOLT, L. & FILKOVA, M. 2016. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun Rev*, 15, 501-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. & PODDUBNY, D. 2017. Axial spondyloarthritis. *Lancet*, 390, 73-84.
- 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.
- SUGATANI, T., VACHER, J. & HRUSKA, K. A. 2011. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood*, 117, 3648-57.
- 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.

- 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.
- 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.
- WANG, H., PENG, W., OUYANG, X., LI, W. & DAI, Y. 2012. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res*, 160, 198-206.
- 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.
- 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.
- ZENG, L., CUI, J., WU, H. & LU, Q. 2014. The emerging role of circulating microRNAs as biomarkers in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 47, 419-29.
- 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, 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.
- 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.

## 7. 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.