

Streszczenie rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Rafalskiej

„Zmiany ekspresji mikroRNA w ciele szklistym w proliferacyjnych chorobach siatkówki”

Promotor: dr hab. n. med. Radosław Kaczmarek, prof. UMW

Wstęp

Witreoretinopatia proliferacyjna (PVR) to nieprawidłowy, nadmierny proces gojenia się i włóknienia siatkówki, który występuje jako powikłanie otworopochodnego odwarstwienia siatkówki. Stanowi on współcześnie główną przeszkodę w uzyskaniu dobrego anatomicznego i funkcjonalnego efektu po zaopatrzeniu chirurgicznym odwarstwienia siatkówki. Patogeneza PVR jest złożona, obejmuje odróżnicowanie dojrzałych komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE) i ich przeistoczenie w komórki o fenotypie mezenchymalnym oraz wytworzenie kurczliwych błon proliferacyjnych, co doprowadza do nawrotowego odwarstwienia siatkówki.

Ponieważ mechanizmy prowadzące do powstania błon proliferacyjnych nie są w pełni poznane, a skuteczne leczenie PVR stanowi poważne wyzwanie, konieczne jest poszukiwanie nowych czynników, mogących rzucić światło na skomplikowaną etiologię tego schorzenia. Na szczególną uwagę w tym względzie zasługuje aktualnie intensywnie badana, nowa klasa cząstek regulatorowych – mikroRNA (miRNA). Są to krótkie, jednoniciowe cząsteczki kwasu rybonukleinowego (RNA), które uważa się za kluczowy modulator ekspresji genów na etapie potranskrypcyjnym. Tylko niewielki odsetek dotychczas zidentyfikowanych miRNA został scharakteryzowany w kontekście ich roli biologicznej, a ich udział w patogenezie PVR jest słabo poznany.

Cel

Celem pracy było pogłębienie wiedzy na temat roli miRNA w patogenezie PVR. Badanie podzielono na dwa etapy – w pierwszym oceniano zmiany ekspresji miRNA w ciele szklistym u pacjentów z PVR względem grupie porównawczej, w drugim zaś analizowano rolę biologiczną wybranego miRNA, wytypowanego na podstawie pierwszego etapu eksperymentu (let-7b) w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) komórek RPE. Weryfikowano hipotezę, że wyłączenie funkcji let-7b pozwala na zmniejszenie indukcji EMT przez obecne w ciele szklistym mediatory – transformujący czynnik wzrostu β (TGF β).

Wyznaczono następujące cele szczegółowe badania:

1. Ocena zawartości miRNA w egzosomach ciała szklistego oraz przydatności ciała szklistego jako materiału diagnostycznego do badań nad rolą miRNA jako potencjalnych biomarkerów wystąpienia PVR.
2. Poznanie globalnego profilu ekspresji egzosomalnego miRNA w ciele szklistym u pacjentów z PVR oraz wytypowanie miRNA, których ekspresja różni się istotnie w stosunku do grupy porównawczej.
3. Ocena wpływu indukcji EMT w linii komórek RPE na ekspresję let-7b.
4. Określenie roli let-7b w procesie EMT komórek RPE poprzez ocenę wpływu transfekcji linii komórek RPE antagonistą let-7b na morfologię, apoptozę i proliferację komórek RPE oraz ekspresję markerów EMT.

Materiał i metody

Pierwszy etap eksperymentu obejmował profilowanie ekspresji egzosomalnego miRNA w próbkach ciała szklanego pobranych w trakcie zabiegu witrektomii od pięciu pacjentów z PVR oraz czterech w grupie porównawczej, którą stanowili pacjenci z otworem płamki. Do oznaczenia poziomu 372 miRNA zastosowano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qPCR). Dane zostały poddane normalizacji względem średniej z odczytów wykrytych we wszystkich próbkach. Do porównania ekspresji miRNA pomiędzy grupą badaną a porównawczą zastosowano t-test (poziom istotności $p < 0,05$) oraz korekcję na błędy fałszywie dodatnie metodą Benjamini Hochberg.

Drugim etapem eksperymentu była analiza funkcjonalna wytypowanego na podstawie etapu pierwszego miRNA o największej zmienności pomiędzy grupą badaną a porównawczą (let-7b). Użyto do tego celu modelu eksperymentalnego indukcji EMT w linii komórek RPE (ARPE-19) przy pomocy TGF β . Oceniano zmiany morfologii komórek RPE, ekspresji let-7b oraz wybranych genów – markerów EMT, a także apoptozę i proliferację komórek. Następnie, dokonano transfekcji linii ARPE-19 przy pomocy antagonisty let-7b. Oceniano zmiany ekspresji let-7b oraz markerów EMT, a także proliferację i apoptozę komórek.

Wyniki

1. Ciało szkliste zawiera niewielką ilość miRNA - średnio na próbkę wykryto zawartość 92 miRNA, a 25 miRNA było obecne we wszystkich przebadanych próbkach.
2. Ekspresja jednego spośród badanych 372 miRNA różniła się w sposób istotny między grupami – let-7b-5p ulegało istotnie wyższej ekspresji u pacjentów z PVR.
3. Ekspresja let-7b w komórkach RPE nie ulegała pod wpływem TGF β 2 istotnym zmianom.
4. Transfekcja linii ARPE-19 inhibitorem let-7b hamowała istotnie wywołany przez TGF β 2 proces EMT.

Wnioski

1. Ciało szkliste jest cennym materiałem do badań nad rolą miRNA jako biomarkerów w PVR, ale analiza ta jest technicznie wymagająca, między innymi ze względu na niską zawartość miRNA w tym materiale biologicznym. Nowatorskim aspektem niniejszej pracy jest przeprowadzenie izolacji miRNA z egzosomów ciała szklanego, co umożliwia uzyskanie większej ilości miRNA o wyższej jakości i stabilności oraz dostarcza cennych danych o komunikacji międzykomórkowej w PVR. Jest szczególnie istotne w kontekście najnowszych doniesień, wskazujących że egzosomy pośredniczą w przekazywaniu sygnału do EMT między komórkami RPE.
2. Jest to pierwsze badanie, które oceniało globalny profil ekspresji miRNA w ciele szklanym u chorych na PVR przy pomocy najdokładniejszej z dostępnych metod – qPCR. Wykazano, że w ciele szklanym u chorych na PVR dochodzi do wzmożonej ekspresji let-7b. Podobny trend do nadekspresji miRNA z rodziny let-7 pokazano w pracach innych autorów, ale bezpośrednie porównanie nie jest możliwe ze względu na zastosowanie odmiennej metodologii, a obserwacja ta wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach na szerszej populacji.
3. Indukcja EMT w komórkach RPE przy pomocy TGF β nie wpływała istotnie na ekspresję let-7b.
4. Wzmożona ekspresja let-7b może przy obecności mediatorów zapalnych w ciele szklanym korelować z rozwojem PVR. Ustalono, że wyłączenie funkcji let-7b w linii komórek RPE hamowało w nich indukowane przez TGF β 2 procesy EMT oraz namnażania się komórek i nie było dla nich toksyczne. Nasza praca otwiera ciekawą perspektywę na dalsze badania nad potencjalną rolą let-7b jako celu terapeutycznego w PVR.

Doctoral thesis abstract

by Agnieszka Rafalska, MD

‘Changes in microRNA expression profile in the vitreous in proliferative retinal disorders’

Supervisor: Radosław Kaczmarek, MD, PhD, Assoc. Prof.

Introduction

Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is characterized by excessive wound healing and fibrotic response following rhegmatogenous retinal detachment. It remains a major obstacle in providing good anatomical and functional outcomes in vitreoretinal surgery. The complex pathogenesis of PVR includes dedifferentiation of mature retinal pigment epithelium (RPE) cells and their transformation into mesenchymal cells. This leads to creation of contractile proliferative membranes and subsequently, to recurrent retinal detachment.

Since the onset mechanisms of retinal proliferation are not fully understood and effective treatment of PVR remains a challenge, further research into PVR pathogenesis is warranted. The last three decades have led to identification of a new class of regulatory molecules – microRNAs (miRNA). miRNAs are small, single-stranded ribonucleic acid (RNA) molecules that emerge as crucial modulators of gene expression. Only a small fraction of miRNAs identified so far has been characterized in terms of their biological role and their involvement in PVR pathogenesis is yet to be elucidated.

Aims

The aim of this study was to evaluate the role of miRNAs in PVR pathogenesis. The study has been divided into two parts. Firstly, we compared the miRNA expression profile in the vitreous samples acquired from patients with PVR and the control group in order to identify the differentially expressed miRNAs. Basing on this, we chose one miRNA (let-7b) for further functional analysis which included investigating the role of let-7b in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of RPE cells. We verified the hypothesis that silencing let-7b could downregulate the EMT process driven by growth factors found in the vitreous – transforming growth factor β (TGF β).

The specific aims of the study were as follows:

1. To assess the content of miRNAs in the exosomes of the vitreous body and to evaluate the diagnostic potential of vitreous specimens regarding the role of miRNAs as putative biomarkers in PVR.
2. To compare the global exosomal miRNA expression profile in the vitreous of patients affected with PVR and in the control group.
3. To study the correlation between EMT induction and let-7b expression in RPE cells.
4. To evaluate the impact of let-7b silencing on RPE cells morphology, proliferation and apoptosis, as well as EMT markers expression.

Materials and methods

The first phase of this study included intraoperative acquisition of vitreous samples from five patients with PVR and four patients with macular hole with subsequent isolation of exosomal RNA. 372 miRNAs were subjected to quantitative polymerase chain reaction (qPCR) expression profiling in order to identify the differentially expressed miRNAs. Data has been normalized to the average of readings detected in all samples. Statistical analysis was conducted using t-test and Benjamini-Hochberg correction for false positive errors.

In the second phase of the study, we sought to elucidate the biological role of let-7b in PVR pathogenesis by using an experimental model of PVR, including EMT induction in RPE cell line (ARPE-19) by stimulation TGF β . We analysed the changes in expression of EMT markers, RPE morphology, cell proliferation and apoptosis. ARPE-19 line was then transfected with let-7b antagonist to study its effect on EMT markers expression, cell proliferation and apoptosis.

Results

1. The vitreous contains a small number of miRNAs – on average, there were 92 miRNAs per sample. 25 miRNAs were detected in all samples.
2. MiRNA profiling revealed that let-7b-5p was significantly upregulated in the vitreous of PVR patients.
3. Stimulation with TGF β did not influence the expression of let-7b in RPE cells.
4. Transfection of ARPE-19 cell line with let-7b inhibitor reduced the EMT-promoting effect of TGF β on RPE cells.

Conclusions

1. Vitreous is a valuable diagnostic material to study the potential role of miRNAs as biomarkers in PVR, however it is a challenging specimen type owing to low miRNA content. One of the strengths of our study was performing the miRNA isolation from exosomes which allows for miRNA content enrichment as well as provides novel insights into cell signaling in PVR. It is especially important in the light of recent reports showing that exosomes mediate EMT cascade in RPE cells.
2. It was the first study to identify the global miRNA signature in the vitreous of PVR patients employing the most accurate of miRNA profiling method – qPCR. We demonstrated upregulation of let-7b in the vitreous of PVR patients. A similar trend towards upregulation of let-7 family members has been showed in the work of other authors but a direct comparison is impossible due to the use of different methodology and this area needs further research.
3. EMT induction in RPE cells by stimulation with TGF β did not significantly alter the expression of let-7b.
4. Let-7b overexpression may correlate with PVR development in the presence of growth factors in the vitreous. Let-7b silencing reduced the TGF β -induced EMT and proliferation of RPE cells and was not toxic to them. Our study outlines new perspectives for future research into the role of let-7b as a potential therapeutic target in PVR.