



Središnja medicinska knjižnica

Marković-Pleše, Silva (2011) *Mehanizmi djelovanja interferona beta u liječenju pacijenata s multiplom sklerozom [Immunomodulatory mechanisms of interferon beta in patients with multiple sclerosis].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1014>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUCILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Silva Marković-Pleše

**MEHANIZMI DJELOVANJA INTERFERONA BETA U
LIJECANJU PACIJENATA S MULTIPLOM
SKLEROZOM**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011

Ovaj rad je izrađen u University of North Carolina at Chapel Hill

Voditelj rada: Dr. Sc. Vesna Brinar, dr.med.

Disertaciju posvećujem majci Barbari i ocu Marku!

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 6 |
| 1.1 Multipla skleroza | 6 |
| 1.2 Th17 stanice igraju ključnu ulogu u razvoju autoimunog odgovora u RR MS | 8 |
| 1.3 Signalizacija endogenog IFNβ igra ulogu u kontroli Th17-posredovanog autoimunog odgovora | 10 |
| 1.4 Terapeutski mehanizmi IFNβ-a protiv urođenog imunološkog odgovora | 11 |
| 2. CILJEVI I SVRHA RADA | 15 |
| 2.1. Značaj predloženog istraživanja | 17 |
| 3. ISPITANICI I METODE | 19 |
| 3.1 Ispitanici | 19 |
| 3.2 Metode | 20 |
| 4. REZULTATI | 29 |
| 4.1 Profiliranje ekspresije gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi otkriva povišenu ekspresiju Th17 staničnih gena kod bolesnika u ranom stadiju RR MS | 29 |
| 4.2. T-stanični infiltrati iz MS lezija sadrže Th17 stanice | 33 |
| 4.3. Imunoregulatorni efekti IFNβ-a inhibiraju diferencijaciju | |

| | |
|--|-----------|
| Th17 stanica | 36 |
| 4.4. IFNβ-posredovane promjene u izlučivanju citokina iz dendritičkih stanica inhibiraju diferencijaciju Th17 stanica. | 40 |
| 4.5. Imunoregulatorni učinci IFNβ-a na dendritičkim stanicama su pojačani upotrebom liganda za TLR7 | 45 |
| 4.6. IFNβ uzrokuje promjene u izlučivanju Th17-regulatornih citokina u B-stanicama | 45 |
| 4.7. IFNβ izravno inhibira diferencijaciju Th17 stanica | 49 |
| 5. RASPRAVA | 56 |
| 6. ZAKLJUČAK | 61 |
| 7. KRATKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU | 62 |
| 8. KRATKI SAŽETAK I NASLOV NA ENGLESKOM JEZIKU | 63 |
| 9. POPIS LITERATURE | 64 |
| 10. ŽIVOTOPIS AUTORA | 72 |

Popis kratica

| | |
|-------------|---|
| MS | multipla skleroza |
| SŽS | središnji živčani sustav |
| TLR | Toll-like receptor |
| IFN β | interferon beta |
| RR | relapsirajuća-remitirajuća |
| IL-23R | IL-23 receptor |
| EAE | eksperimentalni alergički encefalomijelitis |
| MR | magnetska rezonancija |
| IRF | IFN regulacijski factor |
| CIS | clinically isolated syndrome suggestive of MS |
| EDSS | expanded disability system score |
| HC | healthy control, zdravi ispitanik |
| PBMCs | peripheral blood mononuclear cells |
| NAWM | normal appearing white matter |
| SI | stimulacijski indeks |
| SN | supernatant |
| PLP | proteolipidni protein |
| MOG | mijelinski oligodendrocitni glikoprotein |
| MBP | mijelinski bazični protein |
| CNPase | ciklička nukleotidna fosfodiesteraza |

1. UVOD

1.1 Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS), u kojoj je autoimuni odgovor vjerojatno usmjeren protiv mijelinskih proteina središnjeg živčanog sustava (1). Jedno od obilježja bolesti je da inače nepropusna krvno moždana barijera propušta prolaz periferno aktiviranih upalnih stanice u SŽS. Tijekom epizoda aktivnosti bolesti, auto-reaktivne T-stanice migriraju u perivaskularna područja SŽS-a, gdje njihova ponovna aktivacija putem mijelinskih antigena dovodi do demijelinizacije aksona i posljedične aksonske degeneracije. Kronični upalni odgovor dovodi do deficita neuronske provodljivosti povezane sa neurološkim simptomima, te konačno do gubitka funkcionalnog neuronskog tkiva i astrocitne glioze - u kojoj sklerotični plak zamjenjuje funkcionalno neuronsko tkivo.

Iako je postignut značajan napredak u razumijevanju patogeneze MS tijekom proteklih desetljeća, karakter početnih imunoloških poremećaja koji potiču razvoj bolesti još uvijek nije rasvijetljen. Većina je studija pokazala da auto-reaktivne T-stanice, koje su zastupljene u normalnom T-staničnom repertoaru (2), pokreću autoimuni odgovor nakon aktiviranja u

perifernoj cirkulaciji. Pretpostavlja se da bakterijske i virusne infekcije mogu izazvati početak ili relapse bolesti putem mehanizama molekularne mimikrije (3) te putem indukcije toll-like receptor (TLR) signalizacije (4). Međutim, tek je nedavno utvrđeno da urođeni imuni odgovor, koji djeluje u prvoj liniji obrane od patogenih mikroba, igra ulogu u regulaciji antigen-specifičnog adaptivnog imunog odgovora u patogenezi autoimunog odgovora u MS (5). U tom kontekstu, imunoregulatorna svojstva TLR signalizacije mogu objasniti staru tvrdnju da bakterijske i parazitske infekcije potiču zaštitu protiv kasnijeg razvoja autoimunih bolesti (6). Ova "higijenska hipoteza" nudi objašnjenje za visoku učestalost autoimunih bolesti u razvijenim zemljama s niskom izloženosti infekcijama u djetinjstvu (7).

MS je trenutno jedna od najbolje karakteriziranih neuroloških bolesti. Dostupni lijekovi inhibiraju perifernu aktivaciju auto-reaktivnih T-stanica (Glatiramer acetat), migraciju upalnih stanica u SŽS (interferon beta, IFN β , Natalizumab i Fingolimod), te suzbijaju proliferaciju upalnih stanica (mitoxantrone) (8). Unatoč uspješnom suzbijanju upalnog procesa, bolest često napreduje, što odražava kompleksnu imunološku disregulaciju i neurodegenerativne procese, koji su samo djelomično blokirani anti-upalnim lijekovima. Stoga potraga za novim selektivnim i efikasnim terapijama traje sa još više entuzijazma, potaknuta novijim

spoznajama o razvoju bolesti.

1.2 Th17 stanice igraju ključnu ulogu u razvoju autoimunog odgovora u relapsirajućoj-remitirajućoj (RR) MS

Novija istraživanja ljudskih Th17 stanica pokazuju da učestalost T-stanica koje izlučuju IL-17 iznosi 1.4% u CD4⁺, te 1.1% u CD8⁺ limfocitima zdravih ispitanika (9). Učestalost Th17 stanica je veća kod bolesnika s autoimunim bolestima nego u zdravih osoba. Diferencijacija Th17 stanica je kontrolirana brojnim citokinima, uključujući IL-6, IL-1 β , TGF- β , IL-21 i IL-23, koji stimuliraju, te IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-10 i IL-27, koji inhibiraju diferencijaciju Th17 stanica. Novije studije su pokazale da postoje velike razlike između diferencijacije Th17 stanica kod miševa i ljudi. Nekoliko studija je izvijestilo da u suprotnosti sa studijama na životinjama, TGF- β kod ljudi ne potiče, nego inhibira Th17 diferencijaciju (10). Kao što je izvijestio Chen i sur. (11), IL-23 uzrokuje povećanu ekspresiju IL-23 receptora (IL-23R) na T-stanicama i povećava ekspresiju Th17 transkripcijskog faktora RORc i IL-17 kod ljudi, dok ne potiče Th17 staničnu diferencijaciju kod naivnih životinjskih stanica zbog nedostatka ekspresije IL-23R. Acosta-Rodriguez i sur. (10) su izvijestili da IL-1 β doprinosi IL-6-induciranoj ekspresiji RORc i IL-17 kod ljudi, u skladu sa

studijama na životinjama u kojima IL-1 djeluje proksimalno od IL-17 i ima sinergističko djelovanje sa IL-23 u promicanju Th17 diferencijacije (12, 13).

Ljudske Th17 stanice izražavaju specifični transkripcijski faktor RORc, ljudski ekvivalent mišjeg ROR γ T (10), čija transdukcija u naivne mišje T-stanice uzrokuje proizvodnju IL-17 (14). ROR γ T ekspresija je specifična za Th17 stanice, jer TGF- β i IL-6 stimulacija CD4 stanica uzrokuje ekspresiju ROR γ T. Miševi sa delecijom gena za ROR γ T imaju smanjen broj IL-17⁺ stanica i razvijaju blaži oblik eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE), životinjskog modela multiple skleroze. Međutim, u posljednjih nekoliko ljudskih studija je ustanovljeno da TGF- β i IL-6 ne izazivaju Th-17 staničnu diferencijaciju, iako promoviraju ekspresiju RORc, što znači da ekspresija RORc i IL-17 u ljudi nije tako usko povezana kao u miševa (11). U studijama na životinjama, Th1, Th2, a Th17 stanične loze se međusobno reguliraju. Dok je dokumentirano da Th1 transkripcijski faktor T-bet aktivno inhibira ekspresiju Th2 transkripcijskog faktora GATA-3, nije poznato da li T-bet negativno regulira ekspresiju ROR γ T, budući da Th1 citokin IFN- γ inhibira ROR γ T, ili potiče ekspanziju Th17 stanica putem pojačane ekspresije IL-23R, kao što su predložili Gocke i sur. (15).

Ekspresija IL-17 mRNA je povišena u aktivnim MS lezijama mozga,

kako su izvijestili Lock i sur. (16), što je potvrđeno i na razini proteina od Tzartos-a i sur. (17). Štoviše, ekspresija IL-17 gena je značajno viša u mononuklearnim stanicama iz krvi i iz cerebrospinalnog likvora, dobivenih od MS bolesnika, nego u zdravih ispitanika, a broj Th17 stanica je viši tijekom MS egzacerbacija u odnosu na periode remisije (18). Ekspresija IL-17 je također otkrivena u organima bolesnika sa drugim autoimunim bolestima, uključujući reumatoidni artritis, psorijazu i autoimuni uveitis, sugerirajući da Th17 stanice igraju važnu ulogu u razvoju ljudskih autoimunih bolesti (9). Unutar tkiva, Th17 stanice stimuliraju proizvodnju citokina, kemokina, metaloproteinaza i drugih proupalnih medijatora (14). Citokini koje promiču proizvodnju IL-17-a su također otkriveni u povišenoj razini u MS lezijama u SŽS. Li i sur. (19) su otkrili povišene razine IL-23 u aktivnim MS lezijama u odnosu na okolno i kontrolno moždano tkivo, sugerirajući da ekspresija IL-23p19 korelira sa aktivnošću lezija. Glavni izvori IL-23p19 u MS lezijama su aktivirani makrofazi/mikroglia i dendritičke stanice. Budući da IL-23 potiče ekspanziju Th17 stanica, kao što je dokumentirano u životinjskim modelima autoimunih bolesti, rezultati studije sugeriraju da IL-23/IL-17 osovina potiče patogenezu MS.

1.3 Signalizacija endogenog IFN β igra ulogu u kontroli Th17-posredovanog autoimunog odgovora

IFN β je citokin koji se izlučuje tijekom imunološkog odgovora protiv virusnih i bakterijskih patogena. TLR signalizacija daje najjači poticaj za izlučivanje IFN β tijekom antimikrobnog urođenog imunološkog odgovora (5), dok IFN β zauzvrat potiče ekspresiju TLR 1, 2, 3, 4, i 7 (5, 20), koji povećavaju izlučivanje endogenog IFN β -a. Međutim, fiziološke uloge endogenog tipa I IFN u održavanju periferne imunološke tolerancije i aktivnom suzbijanju patogenog autoimunog odgovora su nedovoljno poznati. Nedavna studija na miševima sa delecijom gena za IFN β (21), za tip I IFN receptor (22), te molekula koje sudjeluju u njegovoj signalizaciji (23) – je ustanovila veću sklonost ka EAE, zbog nedostatka endogene IFN β signalizacije. Ova povećana osjetljivost na autoimunu bolest SŽS-a je posredovana nedostatkom sekrecije IL-27 i IL-12p35, citokina koji aktivno suprimiraju diferencijaciju Th17 stanica.

1.4 Terapeutski mehanizmi IFN β -a protiv urođenog imunološkog odgovora

Suzbijanje upalnog odgovora, što dovodi do prevencije stvaranja lezija u SŽS, je učinkovit terapijski pristup koji suzbija progresiju invalidnosti kod velikog broja bolesnika sa RR MS. IFN β je korišten

tijekom proteklih 15 godina kao prva linija liječenja za RR MS. Njegova učinkovitost je dokumentirana značajnim smanjenjem broja kliničkih ataka i stvaranja novih lezija u SŽS, koje su dokumentirane magnetskom rezonancijom (MR) u velikim placebo-kontroliranim kliničkim studijama (24). Unatoč dokazanoj terapijskoj učinkovitosti, mehanizmi djelovanja IFN β -a još nisu sasvim razjašnjeni. Prijašnje studije su ustanovile da mehanizmi djelovanja IFN β -a uključuju inhibiciju ekspresije glavnog histokompatibilnog kompleksa klase II na monocitima i mikrogliji, suzbijanje T-stanične proliferacije, regulaciju transkripcije IL-12/IL-10 citokina, te inhibiciju migracije upalnih stanica u SŽS (21, 25). Međutim, efekti IFN β -a su složeni, i stanični odgovor na IFN β uključuje više od 500 gena (26), sugerirajući mogućnost da neki od relevantnih mehanizama djelovanja još uvijek nisu otkriveni.

Naše istraživanje učinaka IFN β -a je provedeno u kontekstu nedavnih spoznaja o ulozi Th17 stanica (10) i urođenog imunološkog odgovora (4) u razvoju autoimunih bolesti. Otkriće Th17 krvne loze obilježilo je novu eru u studijama autoimunog odgovora, te ponudilo rješenje za brojne kontroverzne nalaze, koji nisu bili u skladu sa Th1 paradigmom autoimunog odgovora (27). Slično tome, terapijski učinak IFN β kod bolesnika sa RR MS, koji je bio povezan sa povišenom ekspresijom IL-12R β 2 i CCR5 (28), je bilo teško pomiriti s prethodno

predloženim mehanizmom djelovanja IFN β -a protiv Th1-imunološkog odgovora. Naša istraživanja su ustanovila da IFN β izaziva ekspresiju TLR7, kao i nekoliko molekula koje sudjeluju u njegovom signaliziranju.

TLR signalizacija uzrokuje promjene u ekspresiji ko-stimulacijskih molekula i sekreciji citokina od strane dendritičkih stanica. TLR obitelj kod ljudi obuhvaća 10 receptora, koji prepoznaju molekularne uzorke patogena. TLR1, 2, 4, 5, 6 i 10 prepoznaju bakterijske proizvode, dok TLR 3, 7, 8, 9 prepoznaju virusne nukleinske kiseline. TLR aktivira dva signalna puta: MyD88-ovisan put koji vodi do aktivacije NF- κ B i transkripcije upalnih citokina, te signalnog puta koji vodi do proizvodnje tip I IFN-a, te indukcije IFN-posredovanih gena (23).

TLR7 je prvenstveno prisutan na plasmacitoidnim dendritičkim stanicama, koje proizvode visoke razine IFN β , ali i na dendritičkim stanicama monocitnog porijekla, koje luče citokine uključene u T-staničnu diferencijaciju (20). TLR7 je prisutan u endosomalnim vezikulama, gdje je njegov odgovor ograničen na guanozinom- i uridinom-bogatu ssRNA, proizvedenu tijekom virusne replikacije. TLR7 signalizira putem citosolnog proteina MyD88, koji se veže za receptorski kompleks, gdje djeluje kao adapter koji regrutira IRAK4 (29). Nakon fosforilacije, IRAK4 napuša kompleks i u interakciji sa TRAF6 u citoplazmi, dovodi do aktivacije NF- κ B-posredovane transkripcije citokina. Nedavno smo izvijestili da in-vitro

terapijsko djelovanje IFN β -a uvjetuje promjenu TLR7/IL-1R signalizacije, te inhibira IL-1 β , TGF- β , i IL-23, dok inducira sekreciju IL-27 od strane dendritičkih stanica monocitnog porijekla koje kolektivno inhibiraju diferencijaciju Th17 stanica (6). Naša studija je ustanovila novi terapijski mehanizam IFN β -a, karakteriziran TLR7-posredovanom regulacijom citokinske sekrecije dendritičkih stanica, koja inhibira diferencijaciju Th17 stanica u kontekstu autoimunog odgovora kod bolesnika sa MS.

2. CILJEVI I SVRHA RADA

MS je kronična upalna demijelinizirajuća bolest SŽS-a. MS je vodeći uzrok invaliditeta kod ljudi mlađe odrasle dobi (8). IFN β je korišten tijekom proteklog desetljeća kao učinkovita terapija protiv RR MS. Dok je efikasnost IFN β -a u suzbijanju aktivnosti bolesti potvrđena u velikim randomiziranim placebo-kontroliranim kliničkim ispitivanjima (24), njegovi in-vivo operativni mehanizmi djelovanja i biomarkeri terapijske učinkovitosti još nisu utvrđeni. Novije spoznaje o ulozi Th17 stanica u razvoju autoimunog odgovora nam omogućuju da ustanovimo biomarkere terapijskog djelovanja IFN β -a. Studije EAE-a, životinjskog modela MS, su nedavno razjasnile ulogu endogenog IFN β u aktivnom suzbijanju autoimunog odgovora. Miševi sa delecijom gena za IFN β (21), gena za IFN receptor (IFNAR), (21, 23) ili za distalne signalizirajuće molekule (22) su pokazali veću sklonost ka EAE. Autori su zaključili da nedostatak endogene IFN β signalizacije dovodi do veće osjetljivosti na bolest, zbog sniženog izlučivanja inhibitora Th17 stanične diferencijacije IL-27 i IL-12p35.

Cilj ovog rada je ustanoviti na uzorcima krvi bolesnika sa RR MS imunoregulatorne učinke IFN β -a na diferencijaciju Th17 stanica. Mi ćemo testirati naše hipoteze putem dolje navedenih eksperimenata:

1) Ustanoviti ulogu Th17 stanica u razvoju autoimunog odgovora kod bolesnika u ranom stadiju MS.

2) Otkriti molekularne mehanizme kojima IFN β mijenja sekreciju Th17-regulatornih citokina kod dendritičkih stanica.

3) Odrediti na koji način IFN β djeluje na proizvodnju citokina od strane B-limfocita kod bolesnika sa RR MS i zdravih ispitanika.

4) Utvrditi mehanizme kojima IFN β izravno spriječava diferencijaciju Th17 stanica.

Cilj budućih studija je ustanoviti do koje mjere bolesnici sa RR MS imaju nedostatne imunoregulatorne mehanizme endogenog IFN β -a, koji mogu utjecati na patogenezu bolesti. Naši rezultati indiciraju da terapijska aplikacija visokih doza rekombinantnog IFN β -a, koji ima snažan terapijski učinak, može korigirati ili nadomjestiti nedostatnu kontrolu autoimunog odgovora putem endogenog IFN β -a. U cilju pronalaženja pouzdanih prediktora terapijskog učinka IFN β -a, buduće studije će

identificirati biomarkere Th17-induciranog autoimunog odgovora, te parametre učinkovitosti terapije IFN β -a. Naša radna hipoteza je da IFN β negativno regulira Th17 stanični autoimuni odgovor u MS putem sljedećih mehanizama: 1) IFN β uzrokuje ekspresiju interferon regulatornih faktora (IRF)7, IRF2 i STAT1, koji reguliraju ekspresiju TLR7 i sekreciju Th17-regulatornih citokina od strane monocita, dendritičkih stanica i B-limfocita; 2) IFN β izravno inhibira Th17 staničnu diferencijaciju putem inhibicije RORc i IRF4, transkripcijskih faktora koji reguliraju diferencijacije ove stanične loze (30).

2.1. Značaj predloženog istraživanja

Predloženi projekt se temelji na ranije dobivenim rezultatima o ključnoj ulozi Th17 stanica u ranoj fazi RR MS i o selektivnom suzbijanju Th17 stanične diferencijacije putem IFN β . Prijedlog je razvijen u kontekstu novijih spoznaja o ulozi Th17 stanica u razvoju autoimunog odgovora i imunoregulatornog djelovanja endogenog IFN β , koji dovodi do supresije autoimunog odgovora u zdravih ispitanika.

Naše istraživanje je provedeno na ljudskim uzorcima ne-manipuliranih stanica koje igraju ulogu u razvoju autoimunog odgovora. Ova istraživanja pružaju uvid u djelovanje endogenog IFN β koji doprinosi

održavanju periferne imunološke tolerancije kod zdravih ispitanika. Rezultati doprinose objašnjenju niske prevalencije autoimunih bolesti u pojedinaca izloženih zaraznim bolestima u djetinjstvu, u skladu sa "higijenskom hipotezom" (7). Rezultati istraživanja će doprinijeti pronalasku selektivne terapije protiv Th17 stanica, koje uvjetuju razvoj autoimunih bolesti.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitanici

22 pacijenta sa klinički izoliranim sindromom koji upućuje na MS, clinically isolated syndrome suggestive of MS (CIS) i 14 zdravih ispitanika odgovarajuće dobi, spola i rase su bili uključeni u studiju nakon informiranog pristanka i potpisivanja dokumenta odobrenog od etičkog povjerenstva. CIS pacijenti su doživjeli svoju prvu kliničku prezentaciju demijelinizacijske bolesti u roku od godinu dana od davanja uzorka krvi, imali su najmanje dvije MR demijelinizirajuće lezije, te nisu liječeni imunomodulatornom ili imunosupresivnom terapijom prije uzimanja uzoraka krvi.

Studija je također uključila 45 bolesnika s potvrđenom dijagnozom RR MS i 16 odgovarajućih zdravih ispitanika. RR MS bolesnici su mali dijagnozu potvrđenu prema McDonald-ovim dijagnostičkim kriterijima (31), dob 18-55, te mjeru invaliditeta (expanded disability system score, EDSS) (32) 1.5-5.5, te nisu primali imunomodulatorne ili imunosupresivne lijekove u vrijeme uzimanja uzorka krvi, kako je određeno u našim prethodnim istraživanjima (33). Pacijenti su bili praćeni u MS klinici University of North Carolina, koja služi kao tercijarni referalni centar. Svaki ispitanik je

donirao krv (100 ml) za ovu laboratorijsku studiju. Klinički indicirano liječenje nije bilo uskraćeno ili odgođeno zbog sudjelovanje u ovom istraživanju.

3.2 Metode

3.2.1 Profiliranje genske ekspresije u mononuklearnim stanicama krvi dobivenih od bolesnika u ranoj fazi RR MS

Diferencijalna ekspresija gena između CIS pacijenata i zdravih ispitanika, healthy controls (HCs) je testirana korištenjem Affymetrix gene arrays U133 (HG-U133) (Affymetrix). Krvne mononuklearne stanice (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) su izdvojene iz krvi 15 CIS pacijenata i 7 zdravih ispitanika, te gdje je naznačeno uzgojene u kulturi nakon stimulacije sa anti-CD3+anti-CD28 monoklonalnim antitijelima (mAb) sa ili bez IFN β tijekom 24 sata. RNA je izolirana pomoću Rneasy kit-a (Quiagen). Hibridizacija je provedena tijekom 16 sati na 45°C. Rezultati su su skenirani Hewlett Packard GeneArray skener-om. Affymetrix GeneChip® Microarray Suite 5,0 software je korišten za pranje, skeniranje i osnovne analize. Za otkrivanje diferencijalnog profila ekspresije gena između CIS pacijenata i zdravih ispitanika, te između

stanica bolesnika uzgojenih sa ili bez IFN β -a korišten je t-test, $p < 0.05$ se smatrao značajnim.

Profiliranje genske ekspresije T-staničnih infiltrata iz akutne lezije i normalne okolne bijele moždane materije, normal appearing white matter (NAWM) je provedeno na sličan način, > 5-struka razlika u ekspresiji gena uključenih u imunloski odgovor je prikazana u rezultatima.

3.2.2 Protočna (flow) citometrija

Za intracelularno mjerenje citokina, PBMCs izdvojene iz krvi 18 CIS pacijenata i 18 odgovarajućih zdravih ispitanika su stimulirane s PMA (50 ng/ml) i Ionomycin-om (500 ng/ml) (Sigma) tijekom 2 sata i sa BFA (1:1000) (eBioscience) tijekom dodatna 3 sata. Stanice su obojene fluorescentno-konjugiranim antitijelima protiv IL-17A, IL-4 (eBioscience), IFN- γ (R & D Systems), te anti-CD4⁺ i anti-CD8⁺ antitijelima korištenim za određivanje staničnih podskupina. Postotak stanica koje pokazuju ekspresiju pojedinih citokina je određen pomoću BD FACSCalibur™ s CellQuest software-a (BD biosciences).

Svježe PBMCs izdvojene iz krvi 10 RR MS bolesnika i 10 zdravih ispitanika su korištene za određivanje ekspresije IL-23R i CCR6, Th17 staničnih markera na površini CD4⁺ limfocita. Rezultati su izraženi u

postotcima CD4 stanica kod kojih je otkrivena površinska ekspresija IL-23R i CCR6.

3.2.3 Imunohistološka analiza MS lezija

Tkivo mozga i leđne moždine je dobiveno šest sati poslije smrti 16-godišnje bolesnice koja je patila od agresivne RR MS. Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva i izvedeno po dobivanju suglasnosti od strane članova obitelji. Pet lezija u različitim fazama razvoja te područja NAWM su identificirane pomoću magnetske rezonancije. Posljednja MR studija, tri dana prije smrti, je uspoređena s ispitanim tkivom za vrijeme resekcije lezija. Tehnike bojenja tkiva hematoxylin-eozinom, LFB i impregnacijom srebrom su korištene za detekciju stanične morfologije, mijelina i aksona. Upalni infiltrati su imunohistokemijski karakterizirani bojenjem antitijelima protiv: CD68 za makrofage, te CD3, CD4 i CD8 za T-limfocite.

3.2.4 Proliferativni odgovor T-stanica protiv mijelinskih antigena

T-stanice izdvojene iz MS lezija i NAWM su podijeljene u triplikate u

mediju bez seruma (Opti MEM, Gibco, Grand Island, NY). Proliferativni odgovor T-stanica na mijelinske peptide u koncentraciji 10 µg/ml je određen, kao što je prethodno opisano (34). Ozračene PBMCs od donora, čiji je glavni histocompatibilni kompleks klase II DRB1*0701/09 odgovarao pacijentovom, su korištene kao stanice za prezentaciju antigena. Proliferativni odgovor se smatrao antigen-specifičnim kada je stimulacijski indeks (SI) = proliferativni odgovor na peptid/odgovor bez peptida bio > 2.

3.2.5 T-stanična receptorska spektotipija

Koncentracija i kvaliteta RNA-e ekstrahirane iz staničnih infiltrata MS lezija i NAWM je određena pomoću nanoRNA Chips (Agilent®, Edinburgh, UK). cDNA je dobivena od 2 g RNA sintezom cDNA pomoću Invitrogen kita (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). CDR3 je pojačan upotrebom PCR koristeći 26 Vβ probe (Applied Biosystems, Foster City, CA). Migracija PCR fragmenata u akrilamidnom gelu je prikazala raspodjelu različitih CDR3 dužina, a analize su izvedene putem Immunoscope® software-a (35). Veličina CDR3-LD promjena u odnosu na kontrole je prikazana kao dvosmjerni TopView i globalni trodimenzionalni TcLandscape® (36). MatLab® 5,3 software

(MathWorks Inc, Natick, MA) je korišten za izračunavanje i prikaz rezultata.

3.2.6 siRNA sprečavanje genske ekspresije

3×10^6 dendritičkin stanica od 6 RR MS bolesnika je tretirano sa TLR7 siRNA ili kontrolnom siRNA prema protokolu od proizvođača (Santa Cruz). TLR7 siRNA- i kontrolne siRNA-tretirane stanice su uzgojene u kulturi u odsutnosti ili prisutnosti IFN β -1a tijekom 24 sata, nakon čega su stimulirane sa LPS tijekom 5 sati prije ekstrakcije proteina, te tijekom 48 sati prije prikupljanja supernatanta (SN). Ekspresija TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6, IL-1R1, i β -aktin-a je mjerena Western blotting tehnikom, dok je koncentracija izlučenog IL-1 β , TGF- β 1, IL-23/p19, IL-27, IL-12p70 i IL-10 izmjerena metodom ELISA.

3.2.7 Western blotting

3×10^6 dendritičkih stanica je uzgojeno u kulturi monocita izdvojenih iz krvi 3 RR MS bolesnika. Stanice su tretirane sa IFN β tijekom 24 sata, a zatim sa LPS-om tijekom 5 sati prije ekstrakcije proteina. Proteini su denaturirani u SDS, te razdvojeni u SDS-PAGE-u za otkrivanje TLR7,

MyD88, IRAK4, TRAF6 i IL-1R1, nakon inkubacije sa specifičnim antitijelima (TLR7, Abcam Inc.; MyD88 i TRAF6, Santa Cruz Biotechnology; IRAK4, ProSci Inc; IL-1R1 i β -aktin, Santa Cruz). Membrane su oprane, te inkubirane sa IRDye 680 konjugiranim sekundarnim antitijelima (LI-COR Biosciences) tijekom 1 sata. Proteinske vrpce su kvantificirane pomoću Odisej Infrared Imaging System (LI-COR biosciences).

2×10^6 B-stanica dobivenih od tri RR MS pacijenta je stimulirano sa anti-IgG/IgM mAb i CD40L u odsutnosti ili prisutnosti IFN β -1 tijekom 1 ili 6 sati. Western blotting tehnika je korištena za analizu ekspresije ukupnog i aktiviranog/fosforiliranog STAT1 i STAT3, nakon inkubacije na 4°C sa primarnim antitijelima protiv pSTAT1, tSTAT1, pSTAT3, tSTAT3. Sva antitijela su kupljena od Cell Signaling Technology. Proteinske vrpce su otkrivene sa ECL Detection System-om (Santa Cruz Biotechnology).

3.2.8 RT-PCR

CD45RA⁺ T-stanice su izolirane iz periferne krvi 6 RR MS bolesnika (Miltenyi Biotec Inc). 2×10^6 CD45RA⁺ T-stanica je inkubirano sa supernatantima od alogeničkih dendritičkih stanica tretiranih sa siRNA TLR7 ili kontrolnim siRNA, uzgojenih u kulturi sa ili bez IFN β -1a, te stimulacijom sa LPS. CD45RA naivne T-stanice su stimulirane sa

imobiliziranim anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) i anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) mAb (BD Biosciences). Nakon 12 dana kulture, stanice su prikupljene za ekstrakciju RNA i supernatanti su prikupljeni za mjerenje IL-17A i IL-10 citokina. Ekspresija gena za IL-17A, RORc i 18S je mjerena pomoću RT-PCR (Applied Biosystems). Rezultati su izraženi kao relativna genska ekspresija, normalizirana nasuprot 18S mRNA za svakog ispitanika.

3×10^6 monocita izdvojenih iz krvi 6 pacijenata sa RR MS je uzgojeno u kulturi u prisutnosti GM-CSF i IL-4 tijekom 7 dana. Dobivene dendritičke stanice su potom uzgajane u odsutnosti ili prisutnosti IFN β i loxoribine-a (100 μM). Ekspresije gena za TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6 i IL-1R1 je mjerena pomoću RT-PCR nakon 6 sati. Rezultati su izraženi kao relativna ekspresija gena, normalizirana protiv 18S mRNA, za svakog od RR MS bolesnika.

B-stanice izdvojene iz krvi 10 RR MS bolesnika i 10 zdravih ispitanika su stimulirane sa anti-IgG/IgM mAb i rekombinantnim CD40L u odsutnosti ili prisutnosti IFN β -1 β tijekom 6 sati prije RNA izolacije s RNeasy kit-om (Qiagen). Svaki uzorak je analiziran u tri primjerka i relativna ekspresija IL-1 β , IL-23p19, IL-27p28 i IL-12p35 gena je normalizirana protiv 18S RNA.

Ukupna RNA je izolirana iz CD45RA⁺ stanica dobivenih iz krvi 10 RR MS bolesnika, koje su uzgajane tri dana nakon stimulacije sa anti-

CD3+anti-CD28 mAb i Th17 polarizirajućim citokinima sa ili bez IFN β .

QRT-PCR je proveden na ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). Probe za 18S RNA, RORc, IL-17A, IL-10 i IL-23R su kupljene od Applied Biosystems. Svaki je uzorak analiziran u tri primjerka. Relativna ekspresije gena je normalizirana protiv 18S RNA.

3.2.9 Mjerenje koncentracije citokina ELISA metodom

Supernatanti iz kultura dendritičkih stanica su prikupljeni i pohranjeni na -70° C do mjerenja citokina metodom ELISA. IL-1 β je mjereno sa ELISA kit-om kupljenim od BD biomedicine, IL-27 sa ELISA kit-om od R & D Systems, a IL-23 (p19/p40) sa ELISA kit-om od eBiosciences u duplikatima, slijedeći protokol proizvođača.

B-stanični supernatanti su prikupljeni 24 sata nakon anti-IgG/IgM mAb i CD40L aktivacije u odsutnosti ili prisutnosti IFN β . IL-1 β i IL-12p70 sekrecija je mjerena pomoću OptEIA kit-a (BD PharMingen), a IL-23p19/p40 koristeći kit eBioscience ELISA prema protokolu proizvođača. IL-27 je mjereno upotrebom ELISA metode nakon inkubacije uzoraka sa 0.4 μ g/ml anti-IL-27 mAb (R & D Systems), te otkrivanjem sa anti-IL-27 mAb tokom 1 sata na sobnoj temperaturi.

3.3 Statistička analiza

Statistička analiza rezultata FACS eksperimenata kod CIS i RR MS bolesnika je provedena pomoću Student t-test-a sa SigmaPlot 10,0 software-om (Systat Software Inc), Slike 1 i 3. Statistička analiza usporedbe više grupa (više od 2 grupe) provedena je pomoću ponovljenih mjera ANOVA s Graphpad INSTAT software-om (Graphpad Software Inc.), Slika 4, 5 i 6.

Analiza RT-PCR i ELISA rezultata u B-stanicama i naivnim CD45RA⁺ T-stanicama je provedena Wilcoxon test-om, Slika 7, 8 i 9. P vrijednost <0.05 je određena kao statistički značajna.

4. REZULTATI

4.1 Profiliranje ekspresije gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi otkriva povišenu ekspresiju Th17 staničnih gena kod bolesnika u ranom stadiju RR MS.

CIS je definiran kao prvi klinički napad uz MR nalaze SŽS demijelinizacijskih lezija (37). Budući da CIS bolesnici imaju visok rizik za razvijanje klinički definitivne RR MS (38), liječenje IFN β -om je indicirano u ovoj ranoj fazi bolesti, na temelju kliničkih ispitivanja koja su pokazala učinkovitost IFN β -a u odgađanju progresije bolesti (37). Dok je već nekoliko studija ispitalo IFN β -inducirane promjene u ekspresiji gena u PBMCs bolesnika sa RR MS (39), ovo je prva studija koja ispituje taj učinak kod CIS pacijenata, čiji su dijagnostički kriteriji, kao i odgovor na terapiju još nedovoljno ispitani. Da bismo obuhvatili kompleksne razlike u ekspresiji gena u PBMCs između 15 CIS bolesnika (dob: 38.4 ± 9.7 godina; spol: 8 ženskih, 2 muških; rasa: 9 bijelaca, 6 crnaca) i 7 zdravih ispitanika (dob: 36.8 ± 7.4 godina; spol: 5 ženskih, 2 muških; rasa: 5 bijelaca, 2 crnca), koristili smo Affymetrix Human Genome Array U133 (HG-U133). Gensko profiliranje PBMCs je otkrilo 277 različito izraženih

gena kod CIS bolesnika u odnosu na profil zdravih ispitanika, uključujući 21 gen sa povišenom ekspresijom te 8 gena sa sniženom ekspresijom koji sudjeluju u reguliranju imunološkog odgovora (immune response, IR).

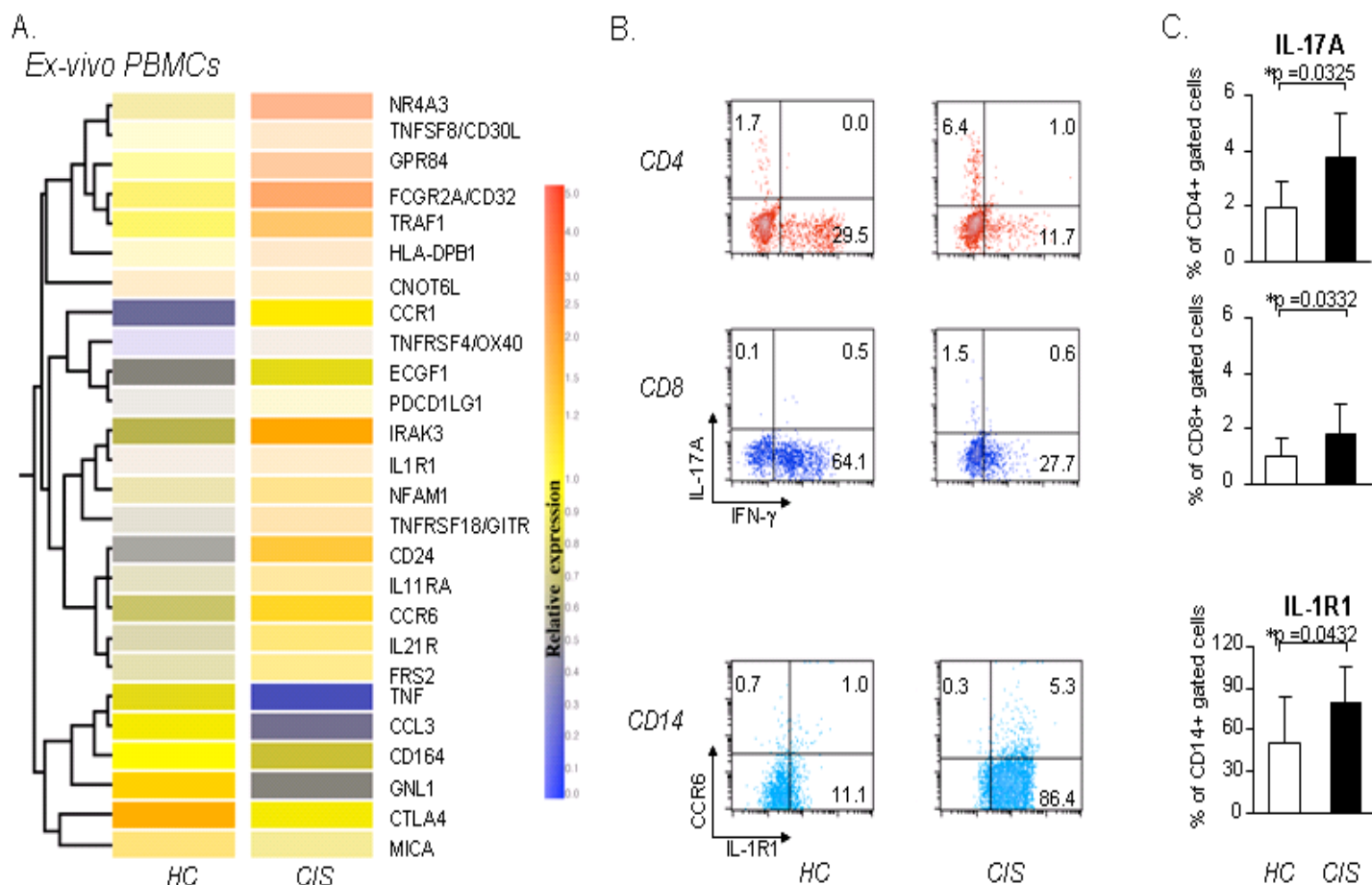
Među genima koji reguliraju imunološki odgovor sa povišenom ekspresijom kod CIS bolesnika u odnosu na zdrave isiptanike ($p < 0,05$, povišene > 1.5 puta) su IL-1R1, IL-21R, i CCR6, koji su ranije identificirani kao Th17 stanični markeri (Slika 1A). Rezultati su potvrđeni RT-PCR studijama i znatno viša ekspresija IL-1R1 gena u monocitima je potvrđena u neovisnoj skupini CIS bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike.

Navedeni rezultati ukazuju na ključnu ulogu Th17 stanica u razvoju autoimunog odgovora u ranoj fazi bolesti. Studije stanične proizvodnje citokina u skupini od 7 CIS bolesnika i 7 zdravih ispitanika podudarnih po dobi, spolu i rasi su potvrdile rezultate genskog profiliranja. Rezultati su pokazali povećanu proizvodnju IL-17A u $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocitima dobivenih od CIS bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (Slike 1B i 1C), dok promjene u IFN- γ i IL-4 proizvodnji nisu postigle statistički značajnu razliku (rezultati nisu prikazani). Mi smo također potvrdili rezultate studija genske ekspresije na razini proteina putem protočne (flow) citometrije.

Ekspresija IL-1R1, IL-21R i CCR6 kod CIS bolesnika je povišena na monocitima, B-stanicama, i T-stanicama. Statistički značajno viša ekspresija IL-R1-a je pronađena u monocitima od CIS bolesnika u odnosu

na zdrave ispitanike (Slika 1B i 1C).

Slika 1



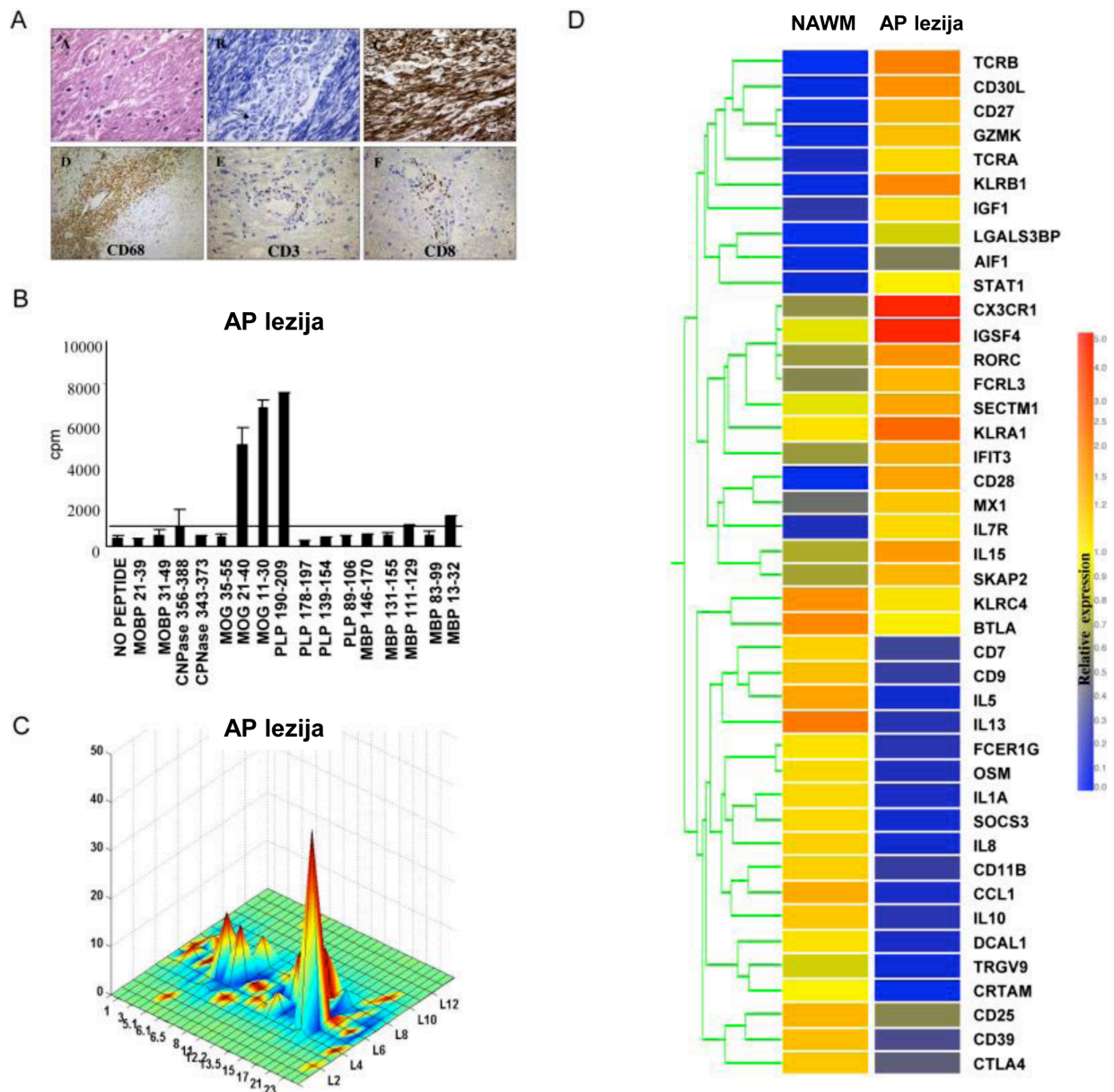
Slika 1. Th17 stanični geni pokazuju značajno višu ekspresiju u mononuklearnim krvnim stanicama CIS bolesnika nego zdravih ispitanika. A. 10^7 PBMCs su izolirani iz krvi 15 CIS pacijenata i 7 zdravih ispitanika (HCs), RNA je izolirana za mjerenje ekspresije gena s

Affymetrix HU-U133 Arrays, kao što je prethodno opisano (33). Grafikon prikazuje diferencijalnu ekspresiju gena ($p < 0,05$ i > 1.5 puta viša ekspresija) u CIS bolesnika u odnosu na zdrave kontrole. **B.** 1×10^6 /ml PBMCs izoliranih od 7 CIS pacijenata i 7 podudarnih zdravih ispitanika su stimulirane sa PMA (50 ng/ml) i Ionomycinom (500 ng/ml) tijekom 2 sata i sa BFA (1:1000) tijekom dodatna 3 sata prije mjerenja unutarstaničnih citokina. Stanice su korištene za mjerenja citokina upotrebom anti-IFN- γ (FITC), anti-IL-17A (PE) i anti-IL-4 (APC) mAb u anti-CD4 i CD8 anti-(PE-Cy5) mAb-određenim stanica. PBMCs su također obojeni sa anti-IL-1R1 (FITC), anti-CCR6 (PE) i anti-IL-21R (APC), te sa anti-CD14, anti-CD19, anti-CD4, CD8 ili anti-(PE -Cy5.5) monoklonalnim antitijelima (mAbs). Slika prikazuje primjer unutarstaničnog mjerenja citokina kod jednog CIS pacijenta i odgovarajućeg zdravog ispitanika. **C.** IL-17A proizvodnja u CD4⁺ i CD8⁺ stanicama je značajno viša u bolesnika nego u zdravih ispitanika. IL-1R1 ekspresija je značajno viša u monocitima izdvojenim iz krvi CIS bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike, dok promjene u B-limfocitima, CD4⁺ i CD8⁺ T-stanicama nisu postigle statistički značajnu razliku. Prikazan je sažetak rezultata dobivenih kod 7 CIS bolesnika i 7 podudarnih zdravih ispitanika. Statistička analiza provedena je pomoću Student t-testa.

4.2. T-stanični infiltrati iz MS lezija sadrže Th17 stanice.

U našim istraživanjima T-staničnih infiltrata izdvojenih iz post-mortem dobivenih MS lezija mozga i leđne moždine pacijenta s aktivnom RR MS, ispitali smo morfologiju MS lezija, sastav T-staničnog infiltrata, njihovu reaktivnost prema mijelinskim antigenima, TCRV β repertoar, te profil genske ekspresije (40). Rezultati prikazuju analizu infiltrata akutne lezije, čije se otkrivanje na MR podudaralo sa početkom fatalne kliničke egzacerbacije. Histološki, akutna lezija je karakterizirana perivaskularnim upalnim infiltratom (Slika 2A). Unatoč kratkom trajanju, akutna lezija pokazuje aktivnu demijelinizaciju sa makrofazima koji sadrže mijelinske proteine, smanjen broj oligodendrocita, i transekciju aksona, potvrđujući da demijelinizacija i transekcija aksona nastupaju rano tijekom formiranja MS lezije (41, 42).

Slika 2



Slika 2. Upalne T-stanice izolirane iz akutne MS lezije

odražavaju akumulaciju Th17 stanica. A. histopatološke karakteristike akutne pontine (AP) MS lezije pokazuju: A) perivaskularni upalni infiltrat

(otkriven putem H&E bojenja); B) aktivnu demijelinizaciju sa fagozitimim mijelinom unutar makrofaga (otkriven putem Luxol plavog bojenja); i C) relativno očuvanu mrežu aksona. D), E) i F) perivaskularni infiltrirati sadrže CD86⁺ makrofage i pretežno CD8⁺ limfocite. **B.** antigensko prepoznavanje T-stanica izdvojenih iz akutne lezije, testirane brojnim mijelinskim peptidima, otkriva proliferativni odgovor (stimulacijski indeks (SI) > 2 protiv proteolipidnog proteina (PLP), mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina (MOG), mijelinskog bazičnog proteina (MBP), te peptida cikličke nukleotidne fosfodiesteraze (CNPase). **C.** TCRV β repertoar T-stanica izdvojenih iz akutne MS lezije je prikazan u trodimenzionalnom grafu. Os X prikazuje 26 TCRV β obitelji, os Y 13 komplementarno-određenih područja (CDR3) u svakoj V β obitelji, te os Z omjer V β /HPRT transkripta. Promjene u odnosu na normalnu TCRV β distribuciju su prikazane u rasponu od plave (negativne) do crvene (pozitivne) boje. **D.** Profiliranje ekspresije gena u T-staničnim infiltratima iz akutne MS lezija u odnosu na NAWM. Grafikon prikazuje rezultate analize gena koji sudjeluju u imunološkom odgovoru sa > peterostrukom promjenom u akutnoj lezije u odnosu na NAWM (40).

Flow citometrijska analiza T-staničnih infiltrata je otkrila da CD45RO⁺ memorijske stanice čine većinu T-stanica izdvojenih iz MS lezija, sugerirajući da je njihova selektivna migracija u SŽS određena

prethodnim antigenskim prepoznavanjem. U prilog tome, otkrili smo visoku učestalost T-stanica koje prepoznaju mijelinske peptide u svim regijama središnjeg živčanog sustava. Najveći proliferativnom odgovor u akutnoj leziji je otkriven protiv PLP₁₉₀₋₂₀₉ (Slika 2B), peptida koji također uzrokuje proliferativni odgovor u kroničnim lezijama i NAWM. Naša istraživanja TCRV β repertoara u akutnoj i kroničnoj MS leziji i NAWM je otkrila vrlo specifičan repertoar u svakoj leziji, gdje dominira ograničeni broj klonova (Slika 2C). Vrlo visoki postotak specifičnih CDR3 klonova u T-staničnim kulturama iz MS lezija sugerira visok udio T-stanica koje prepoznaju zajednički antigen. U cilju profiliranja genske ekspresije u staničnim infiltratima MS lezija u odnosu na stanice izdvojene iz NAWM, proveli smo Affymetrix analizu genske ekspresije (Slika 2D). Akutna lezija pokazala je povećanu ekspresiju više Th17 staničnih gena. Povišena ekspresija RORc, transkripcijskog faktora za Th17 diferencijaciju koji inducira proizvodnju IL-17 (14), kao i citokina koje luče Th17 stanice (IL-17D i IL-26) (43) odražava akumulaciju Th17 stanica u akutnoj leziji. Nasuprot tome, utvrđena je relativno niža ekspresija citokina koji inhibiraju Th17 ekspanziju, uključujući IFN- γ , IL-4 i IL-10, te Th2 citokina IL-5 i IL-13 u akutnoj leziji u odnosu na NAWM.

4.3. Imunoregulatorni efekti IFN β -a inhibiraju diferencijaciju

Th17 stanica.

Naša nedavno objavljena studija je ustanovila da IFN β inhibira diferencijaciju Th17 stanica in-vitro (33). Sveobuhvatna analiza genske ekspresije nakon IFN β tretmana PBMCs izdvojenih iz 15 CIS pacijenata i 7 podudarnih zdravih ispitanika tijekom 24 sata je prikazana na Slici 3A. Mi smo fokusirali analizu IFN β -induciranih promjena u ekspresiji gena na one koji sudjeluju u urođenom imunološkom odgovoru, budući da oni također odražavaju učinak endogenog IFN β -a koji se proizvodi tijekom anti-mikrobijskog odgovora. Rezultati pokazuju znatno povećanu ekspresiju TLR7 kod CIS pacijenta i zdravih ispitanika. MyD88 je također značajno povišen kod CIS bolesnika i zdravih kontrola. Povišena ekspresija gena za signalizirajuće molekule IRAK4 i TRAF6 je inducirana samo u CIS bolesnika. IFN β -inducirana ekspresija IRF7 i IRF2 je ustanovljena kod CIS bolesnika i zdravih ispitanika.

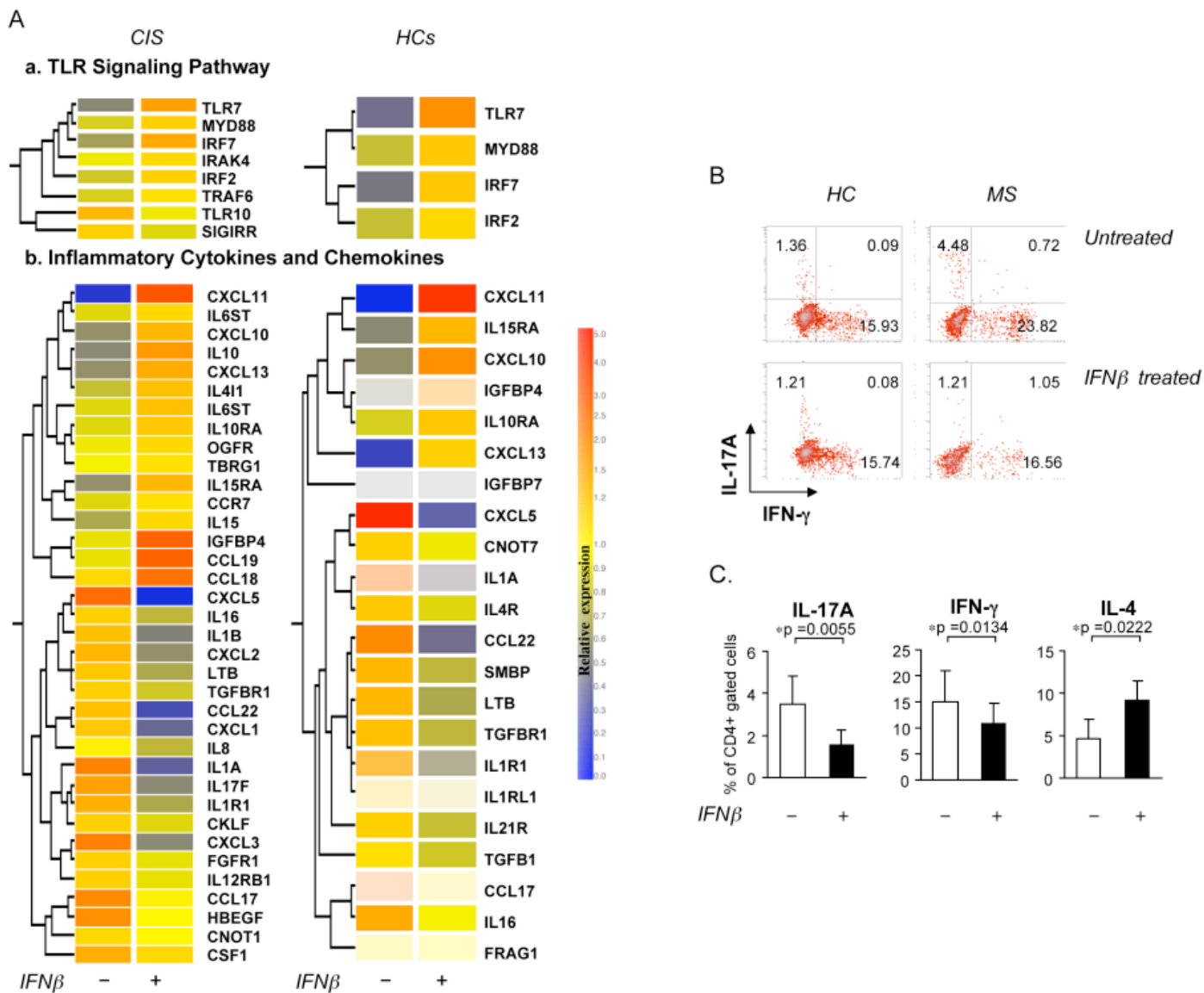
Studije genske ekspresije upalnih citokina i kemokina kod CIS bolesnika su pokazale da IFN β značajno inhibira ekspresiju IL-17F gena, te nekoliko citokina koji posreduju u diferencijaciji Th17 stanica - uključujući IL-1R1, IL-1 α , IL-1 β , i IL12R β 1, dok su IL-21R, IL-1 α , i IL-1R1 sniženi kod zdravih ispitanika (Slika 3A). IFN β također inhibira gensku ekspresiju kemokina koji sudjeluju u migraciji upalnih stanica u SŽS,

uključujući CXCL5, CCL22 i CCL17 kod CIS bolesnika i zdravih ispitanika, dok je genska ekspresija CXCL1, CXCL2, CXCL5 i CXCL8 snižena samo kod CIS bolesnika (Slika 3A). Identificirane promjene uzrokovane IFN β in vitro tretmanom krvnih mononuklearnih stanica poslužit će kao temelj za studije IFN β -a terapijskog djelovanja kod pacijenata sa RR MS.

Rezultati mjerenja unutarstaničnih citokina su potvrdili da IFN β in vitro tretman značajno inhibira proizvodnju IL-17A i IFN- γ , te uzrokuje proizvodnju IL-4 u CD4⁺ stanicama izdvojenih iz krvi 6 RR MS bolesnika i 6 podudarnih zdravih ispitanika (Student t-test, $p < 0,05$). Slika 3B prikazuje reprezentativne rezultate mjerenja unutarstaničnog IL-17A i IFN- γ u PBMCs tretiranih sa IFN β , dok Slika 3C predstavlja sažetak rezultata za 6 pacijenata i 6 podudarnih zdravih kontrola.

Slika 3.

Ex-vivo PBMCs



Slika 3. IFN β inhibira diferencijaciju Th17 stanica. A. 10^7

PBMCs je izdvojeno iz krvi 15 CIS pacijenata i 7 zdravih ispitanika (HCs), kao što je prikazano na Slici 1A i stimulirano sa imobiliziranim anti-CD3 i

anti-CD28 monoklonalnim antitijelima tijekom 24 sata sa ili bez IFN β . Stanična RNA je izolirana za mjerenje genske ekspresije. Grafikon prikazuje gene sa statistički značajnom ($p < 0,05$) promjenom u ekspresiji između staničnih kultura uzgojenih sa ili bez IFN β -a. **B.** 1×10^6 /ml PBMCs izdvojenih iz krvi 6 RR MS bolesnika i 6 podudarnih zdravih ispitanika su uzgojeni u odsutnosti ili prisutnosti IFN β tijekom 16 sati te stimulirani sa PMA, Ionomycinom i BFA kao što je opisano na Slici 1B. Unutarstanična sekrecija citokina je određena upotrebom anti-IFN- γ (FITC), anti-IL-17A (PE) i anti-IL-4 (APC) monoklonalnih antitijela u anti-CD4 (PE-Cy5.5) mAb-obojenim stanicama. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati mjerenja citokina u CD4⁺ stanicama nakon in-vitro kulture sa ili bez IFN β . **C.** Sažetak rezultata mjerenja unutarstaničnih citokina kod 6 RR MS bolesnika u CD4⁺ stanicama nakon in-vitro kulture sa ili bez IFN β . Statistička analiza provedena je pomoću Student t-testa.

4.4. IFN β -posredovane promjene u izlučivanju citokina iz dendritičkih stanica inhibiraju diferencijaciju Th17 stanica.

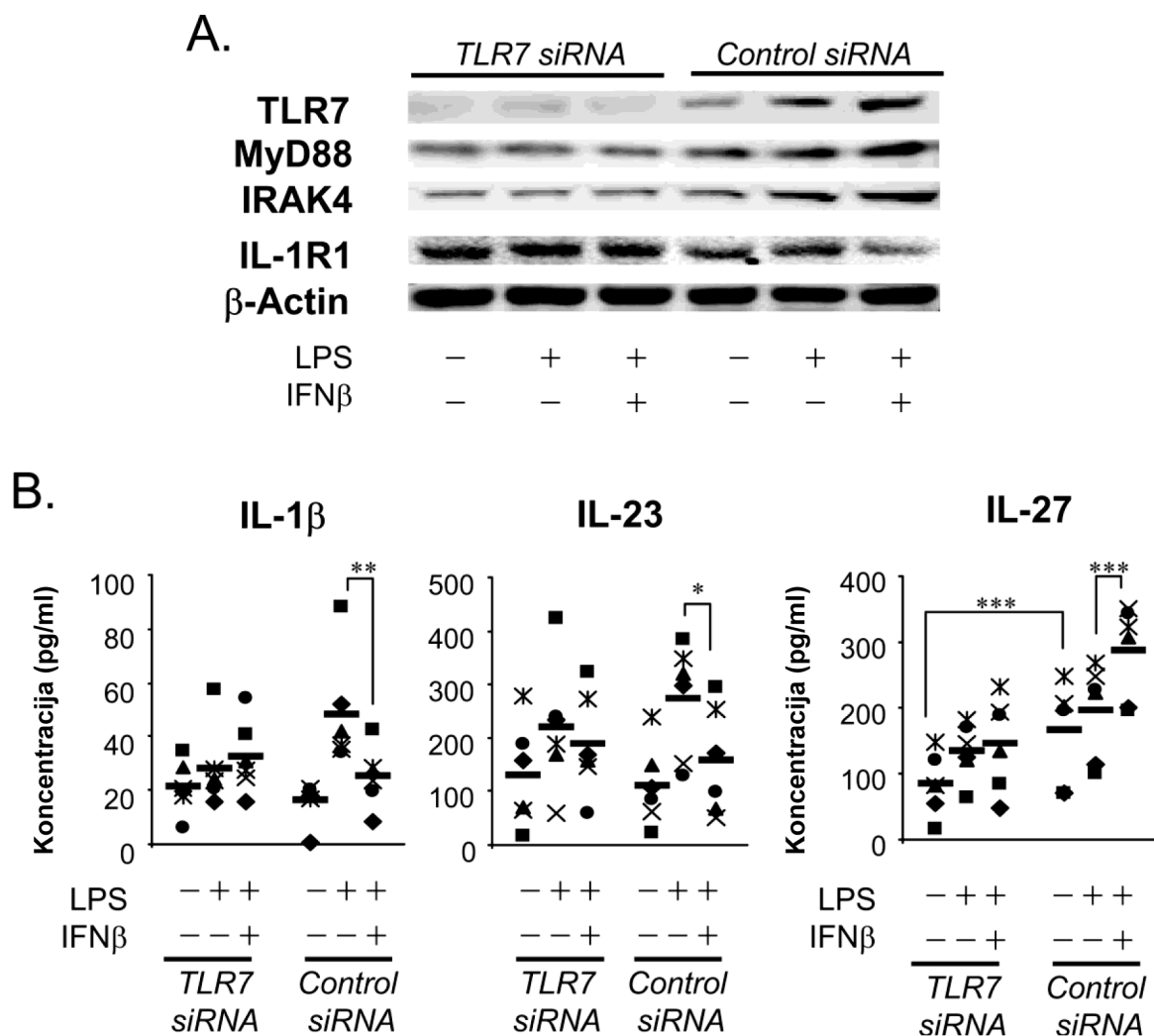
Studije monocitnih-dendritičnih stanica, koje su odabrane zbog visoke ekspresije TLR-a, su pokazale da IFN β in-vitro tretman inducira povišenu ekspresiju TLR7 i njegovih signalizirajućih molekula MyD88,

IRAK4 i TRAF6, te sniženu ekspresiju IL-1R1 (33). IFN β -inducirana ekspresija MyD88 i IRAK4, te snižena ekspresija IL-1R1 su posredovane putem IFN β -inducirane TLR7 ekspresije, što je potvrđeno gubitkom IFN β djelovanja u dendritičkim stanicama sa siRNA TLR7 inhibicijom genske ekspresije (Slika 4A). IFN β -inducirane promjene izlučivanja citokina od strane dendritičkih stanica, uključujući sprječavanje IL-1 β i IL-23, te indukciju IL-27, su također posredovane putem povišene ekspresije TLR7, jer su poništene putem siRNA TLR7 inhibicije genske ekspresije u dendritičkim stanicama (Slika 4B). IFN β -inducirane promjene u izlučivanju citokina od strane dendritičkih stanica inhibiraju diferencijaciju Th17 stanica, što je potvrđeno eksperimentima sa prijenosom supernatanta (SN) na CD4⁺ stanice. Naši rezultati su pokazali da supernatanti dendritičkih stanica tretiranih in-vitro sa IFN β -om inhibiraju ekspresiju gena za RORc (2.8-puta, p <0,05) i IL-17A (4.8-puta, p <0,05), te sekreciju IL-17A proteina (-2.2-fold, p <0,01). U skladu sa rezultatima o utjecaju IFN β -a na sekreciju citokina u dendritičkim stanicama (Slika 4A), supernatant TLR7 siRNA-transduciranih dendritičkih stanica nije uspio spriječiti diferencijaciju Th17 stanica (Slika 5). Rezultati potvrđuju da je inhibicijski učinak IFN β na Th17 diferencijaciju posredovan povišenjem ekspresije TLR7 u dendritičkim stanicama. Štoviše, TLR7-posredovane promjene u sekreciji citokina od dendritičkih stanica snažnije inhibiraju

Th17 staničnu diferencijaciju u odnosu na izravni učinak IFN β -a na diferencijaciju Th17 stanica.

Slika 4.

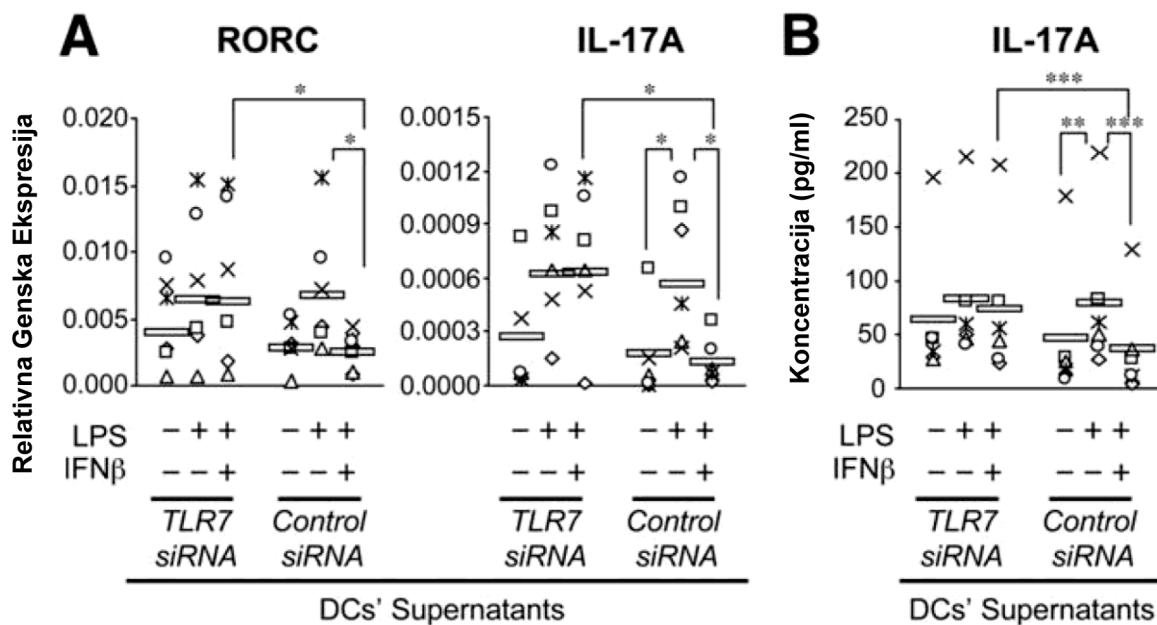
Dendritičke Stanice



Slika 4. IFN β mijenja proizvodnju citokina u dendritičkim stanicama putem indukcije ekspresije TLR7. siRNA-tretirane dendritičke stanice dobivene od 6 RR MS bolesnika su uzgojene u kulturi sa ili bez IFN β tijekom 24 sata, nakon čega je potaknuto sazrijevanje stanica sa LPS tijekom 5 sati. **A.** Proteinska ekspresija TLR7, MyD88, IRAK4, IL-1R1, i β -aktina je mjerena upotrebom Western blotting tehnike. Rezultati predstavljaju jedan od tri slična eksperimenata. **B.** Sekretija IL-1 β , IL-23/p19, i IL-27 je mjerena ELISA metodom nakon 48 sati. Rezultati predstavljaju šest eksperimenata izvedenih u tri primjerka. Statistička analiza je obavljena pomoću ANOVA analize. * označava $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, i *** $p < 0,001$ (33).

Slika 5.

CD45RA⁺ T Stanice



Slika 5. IFN β -inducirane promjene sekrecije citokina od

dendritičkih stanica inhibiraju Th17 diferencijaciju. 2×10^6 CD45RA⁺ T-stanice su inkubirane sa supernatantima TLR7 ili kontrolnih siRNA-tretiranih dendritičkih stanica, uzgojenih sa ili bez IFN β . CD45RA⁺ naivne T-stanice izdvojene iz 6 RR MS pacijenata su stimulirane sa imobiliziranim anti-CD3 i anti-CD28 monoklinalim antitijelima tijekom 12 dana, nakon čega su stanične kulture upotrijebljene za ekstrakciju RNA i prikupljanje supernatanta za mjerenje citokina. **A.** Genska ekspresija RORc, IL-17A, te 18S je mjerena sa QRT-PCR tehnikom. **B.** Mjerenje IL-17A citokina je

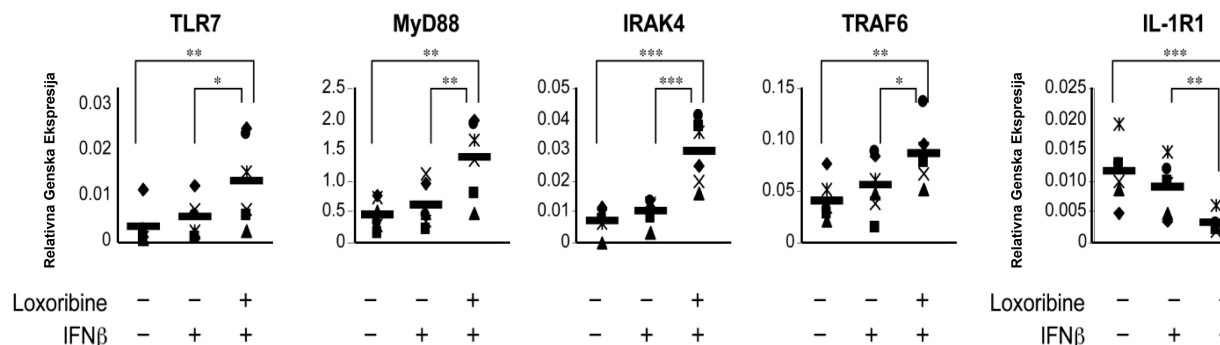
provedeno ELISA metodom.

4.5. Imunoregulatorni učinci IFN β -a na dendritičkim stanicama su pojačani upotrebom liganda za TLR7.

Navedeni rezultati sugeriraju novi mehanizam imunoregulatornih učinaka IFN β -a putem povišene ekspresije TLR7 i njegovih signalizirajućih molekula, koje izazivaju promjene u izlučivanju Th17-regulatornih citokina u dendritičkim stanicama. Mi smo stoga ispitali u kojoj je mjeri učinak IFN β -a pojačan induciranjem TLR7 signaliziranja sa selektivnim ligandom loxoribin-om. Naši rezultati pokazuju da upotreba loxoribin-a i IFN β , dovodi do pojačane promjene u ekspresiji svih prije navedenih gena, što znači da stimuliranje TLR7-a pojačava imunoregulatorni učinak IFN β -a, ili da IFN β senzibilizira dendritičke stanice za TLR7 signalizaciju. Ovi nalazi impliciraju da liječenje RR MS bolesnika može biti efikasnije upotrebom kombinacije trenutno odobrene terapije IFN β -om sa selektivnim TLR7 ligandima koji su već testirani za druge indikacije u kliničkim ispitivanjima.

Slika 6.

Dendritičke Stanice



Slika 6. TLR7 ligand loxoribin pojačava utjecaj IFNβ-a na TLR7

i njegove signalizirajuće molekule. 3×10^6 monocita je uzgojeno u prisutnosti GM-CSF i IL-4 tijekom 7 dana, nakon čega su dendritičke stanice uzgojene u kulturi sa IFNβ-a i loxoribin-om (100 μM), te je ekspresija TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6 i IL-1R1 gena mjerena nakon 6 sati pomoću RT-PCR. Rezultati su izraženi kao relativna ekspresija gena kod 6 RR MS bolesnika.

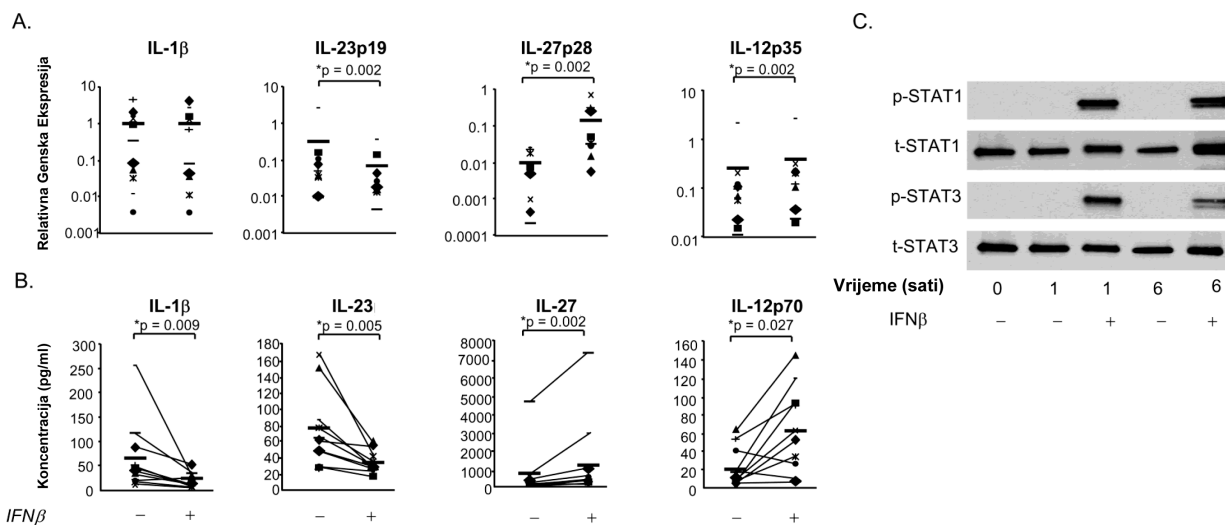
4.6. IFNβ uzrokuje promjene u izlučivanju Th17-regulatornih citokina u B-stanicama.

Naša je studija istražila utjecaj IFNβ-a na B-stanicama (44) u kontekstu djelovanja IFNβ-a na T-staničnu diferencijaciju. CD19 stanice

izdvojene iz krvi 10 bolesnika sa RR MS-om su stimulirane sa IgG/IgM i rekombinantnim CD40L u prisutnosti ili odsutnosti IFN β . IFN β je snizio ekspresiju gena (Slika 7A) i sekreciju citokina IL-1 β i IL-23 (Slika 7B), dok je povisio ekspresiju gena i izlučivanje citokina IL-27 i IL-12.

Karakterizacija mehanizama uključenih u IFN β -inducirane promjene u sekreciji citokina od strane B-stanica, pokazuje da, slično kao i kod dendritičkih stanica (47), IFN β izaziva STAT1 i STAT3 aktivaciju/fosforilaciju (Slika 7C). Naši rezultati impliciraju da je IFN β -inducirana IL-27p28 i IL-12p35 ekspresija posredovana putem fosforilacije STAT1 (45). Budući da aktivacija STAT3-a uzrokuje ekspresiju SOCS3-a (46), mi pretpostavljamo da STAT3 aktivacija uzrokuje ekspresiju SOCS3-a, koji pak inhibira izlučivanje IL-1 β i IL-23, kao što su pokazali naši prethodni rezultati sa dendritičkim stanicama (47).

Slika 7.

B Stanice**Slika 7. IFN β modificira proizvodnju Th17-regulatornih citokina**

od strane B-stanica. **A.** IFN β inhibira IL-1 β , IL-23 i uzrokuje povišenu ekspresiju IL-27 i IL-12 gena u B-stanicama. 2×10^6 CD19⁺ B-stanica izdvojenih iz krvi 10 MS bolesnika je stimulirano s kombinacijom anti-IgG/IgM mAb (0.5 μ g/ml) i CD40L (2.0 μ g/ml) u odsutnosti ili prisutnosti IFN β (1000 IU/ml). Relativna ekspresija gena je izmjerena nakon 6 sati upotrebom QRT-PCR. Rezultati prikazuju ekspresiju gena u odnosu na 18S RNA u logaritamskoj skali. Svaki simbol predstavlja srednju vrijednost od tri primjerka. Wilcoxon-test je korišten za utvrđivanje značaja razlika između netretiranih i IFN β -tretiranih kultura. **B.** IFN β mijenja sekreciju Th17-regulatornih citokina od strane B-stanica. Supernatanti su dobiveni iz iste kulture, i nakon 24 sata su mjerene

koncentracije citokina sa ELISA metodom. Rezultati su izraženi kao koncentracija citokina u pg/ml. **C.** IFN β uzrokuje fosforilaciju STAT1 i STAT3-a u B-stanicama izdvojenim iz krvi bolesnika sa MS. B-stanice su uzgajane u kulturi u odsutnosti ili prisutnosti IFN β tijekom 1 i 6 sati prije ekstrakcije proteina. STAT1 i STAT3 fosforilacija je mjerena Western blotting tehnikom. Prikazani reprezentativni rezultati predstavljaju jedan od tri slična eksperimenta.

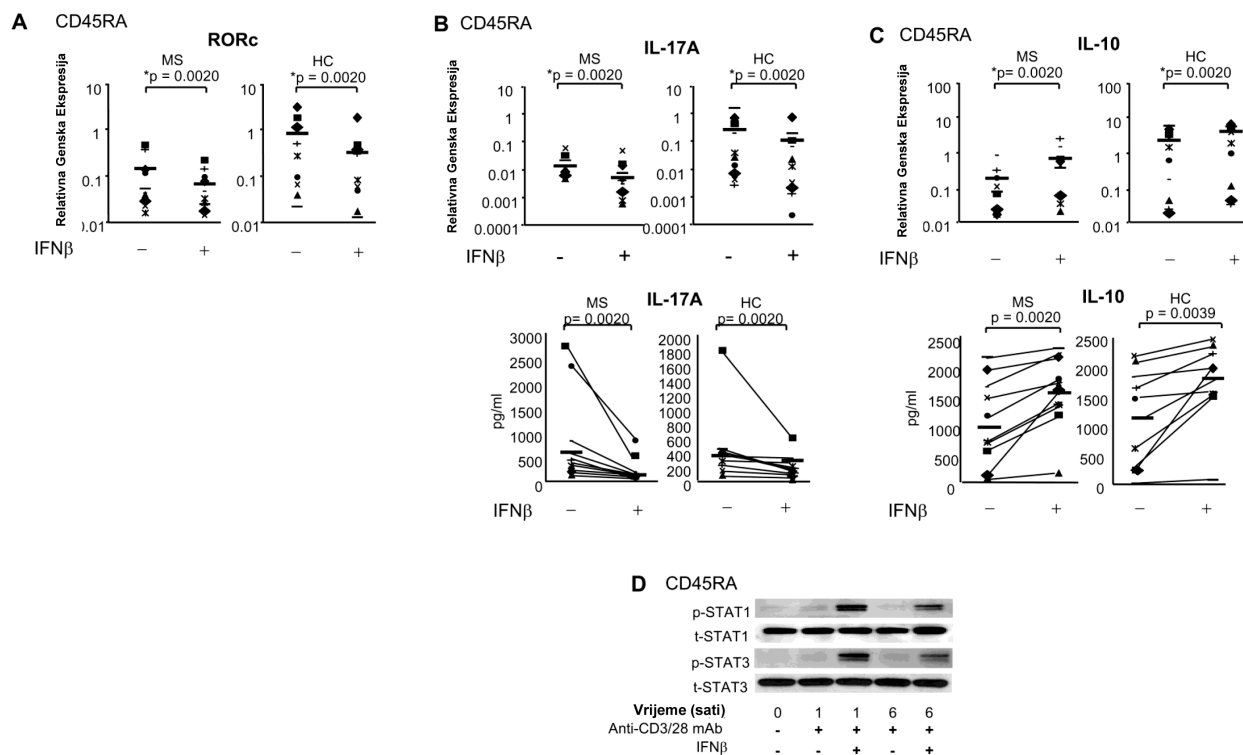
4.7. IFN β izravno inhibira diferencijaciju Th17 stanica.

Izravan učinak IFN β na diferencijaciju Th17 stanica je ispitan kod 10 RR MS bolesnika i 10 zdravih ispitanika upotrebom CD45RA⁺ T-staničnih kultura u prisustvu Th17-polarizirajući citokina IL-6 i IL-23. IFN β in-vitro inhibira ekspresiju RORc gena kod MS bolesnika (-2.2 puta) i zdravih ispitanika (-2.3 puta) (Slika 8A), dok ekspresija gena za T-bet i GATA-3 nije promijenjena (rezultati nisu prikazani).

Budući da ekspresija gena za RORc u ljudi, za razliku od miševa, ne potiče izravno lučenje IL-17 citokina (11), mi smo ispitali utjecaj IFN β na proizvodnju IL-17A. IFN β inhibira ekspresiju IL-17A gena kod MS bolesnika i zdravih ispitanika (-1.5 i -2.2 puta), kao i sekreciju IL-17A (-3.4 i -2.3 puta) (Slika 8B). Nasuprot tome, IFN β povišuje ekspresiju IL-10 gena

i sekreciju tog citokina od strane T-stanica kod MS bolesnika (3.7 i 1.5 puta) i zdravih ispitanika (2.0 i 1.6-puta), (Slika 8C). IFN β nije utjecao na ekspresija gena i izlučivanje citokina IFN- γ i IL-4 (rezultati nisu prikazani). U skladu sa ranijim studijama (28, 48), IFN β inducira ekspresiju IL-12R β 2 gena u CD45RA⁺ T-stanicama kod pacijenata sa MS, dok porast kod zdravih ispitanika nije postigao statistički značajnu razliku (rezultati nisu prikazani).

Slika 8.

Slika 8. IFN β izravno inhibira diferencijaciju Th17 stanica. A.

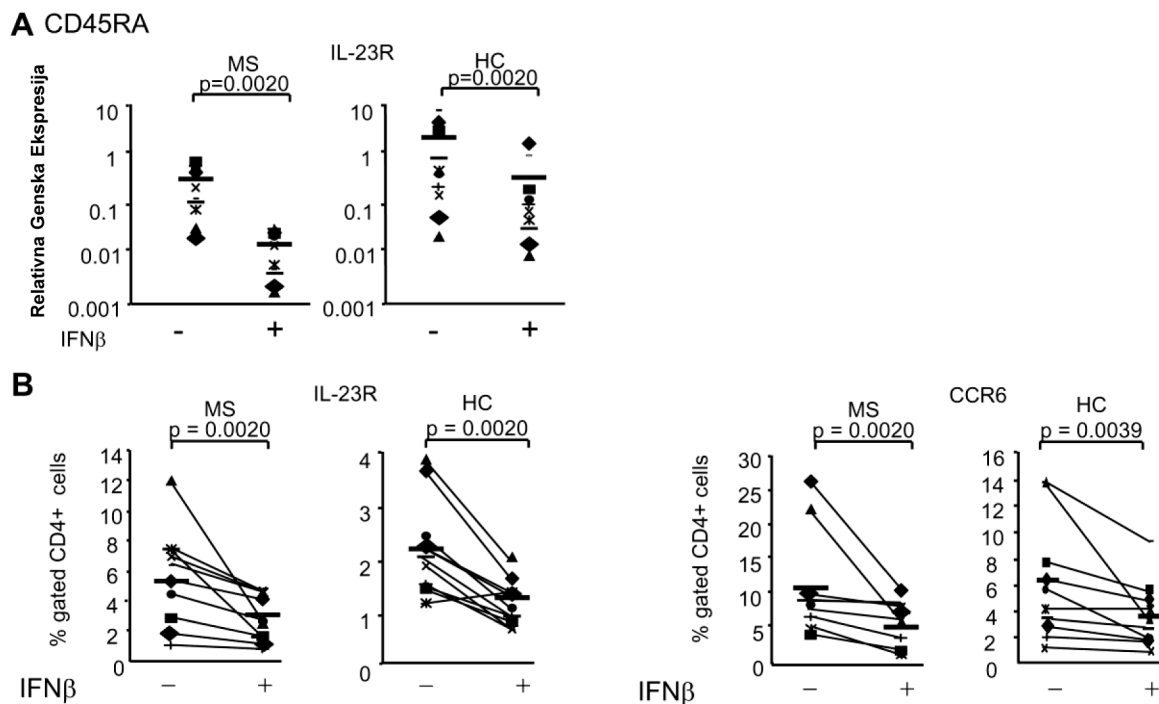
IFN β inhibira RORc ekspresiju u kulturi CD45RA⁺ T-stanica sa Th17-polarizacijskim citokinima. 2×10^6 izdvojenih CD45RA⁺ T-stanica su stimulirane s anti-CD3 i anti-CD28 mAbs u Th17-polarizirajućim uvjetima (IL-6, 50 ng/ml i IL-23, 10 ng/ml) u odsutnosti ili prisutnosti IFN β (1000 IU/ml) tijekom 3 dana. Ekspresija gena za RORc je mjerena QRT-PCR tehnikom. **B.** IFN β inhibira ekspresiju IL-17A gena i sekreciju tog citokina u CD45RA⁺ T-stanicama izdvojenim iz krvi MS bolesnika i zdravih ispitanika. Ekspresija IL-17A gena je mjerena QRT-PCR-om nakon trećeg dana, dok je sekrecija proteina izmjerena je u supernatantima prikupljenim nakon 12 dana kulture u Th17-polarizacijom uvjetima u odsutnosti ili prisutnosti IFN β , te re-stimulacije s anti-CD3 i anti-CD28 Abs tijekom 48 sati. **C.** IFN β uzrokuje ekspresiju IL-10 gena i sekreciju tog citokina u CD45RA⁺ T-stanicama izdvojenih iz krvi MS bolesnika i zdravih ispitanika. **D.** IFN β uzrokuje STAT1 i STAT3 fosforilaciju u CD45RA⁺ stanicama uzgojenim u Th17-polarizacijskim uvjetima. 2×10^6 CD45RA stanica je uzgojeno u Th17-polarizirajućim uvjetima tijekom 12 dana, a potom stimulirano s anti-CD3 i anti-CD28 mAbs u odsutnosti ili prisutnosti IFN β tijekom 1 i 6 sati. Ekspresija aktiviranog/fosforiliranog i ukupnog STAT1 i STAT3 proteina je određena Western blotting tehnikom. Rezultati prikazuju jedan od tri slična eksperimenta.

Istraživanja mehanizama uključenih u inhibiciju Th17 stanične

diferencijacije otkrivaju da IFN β tretman CD45RA⁺ stanica u kulturi u Th17-polarizirajućim uvjetima uzrokuje STAT1 i STAT3 fosforilaciju (Slika 8D), koji snizuju IL-17 (STAT1) i induciraju IL-10 (STAT3) (49, 50). U skladu sa rezultatima istraživanja na životinjama (50), naši rezultati impliciraju da kod ljudi STAT1 fosforilacija izravno inhibira diferencijaciju Th17 stanica, dok STAT3 fosforilacija inducira IL-10, koji pak inhibira ekspanziju Th17 stanica (51-53).

Mi smo takodjer ispitali učinak IFN β na ekspresiju Th17-staničnih markera IL-23R i CCR6 (54) na CD45RA⁺ stanicama izdvojenih iz krvi 10 RR MS bolesnika i 10 zdravih ispitanika. IFN β je značajno smanjio ekspresiju IL-23R gena kod MS bolesnika (-2.8 puta) i zdravih ispitanika (-5.8 puta) (Slika 9A). Promjene u ekspresiji IL-23R i CCR6 su potvrđene i na razini proteina protočnom (flow) citometrijom. Stanice tretirane sa IFN β su pokazale značajno smanjenu ekspresiju IL-23R i CCR6 kod MS bolesnika (-2.1 i 1.9 puta) i zdravih ispitanika (-2.1 i 1.7-puta) (Slika 9B).

Slika 9.

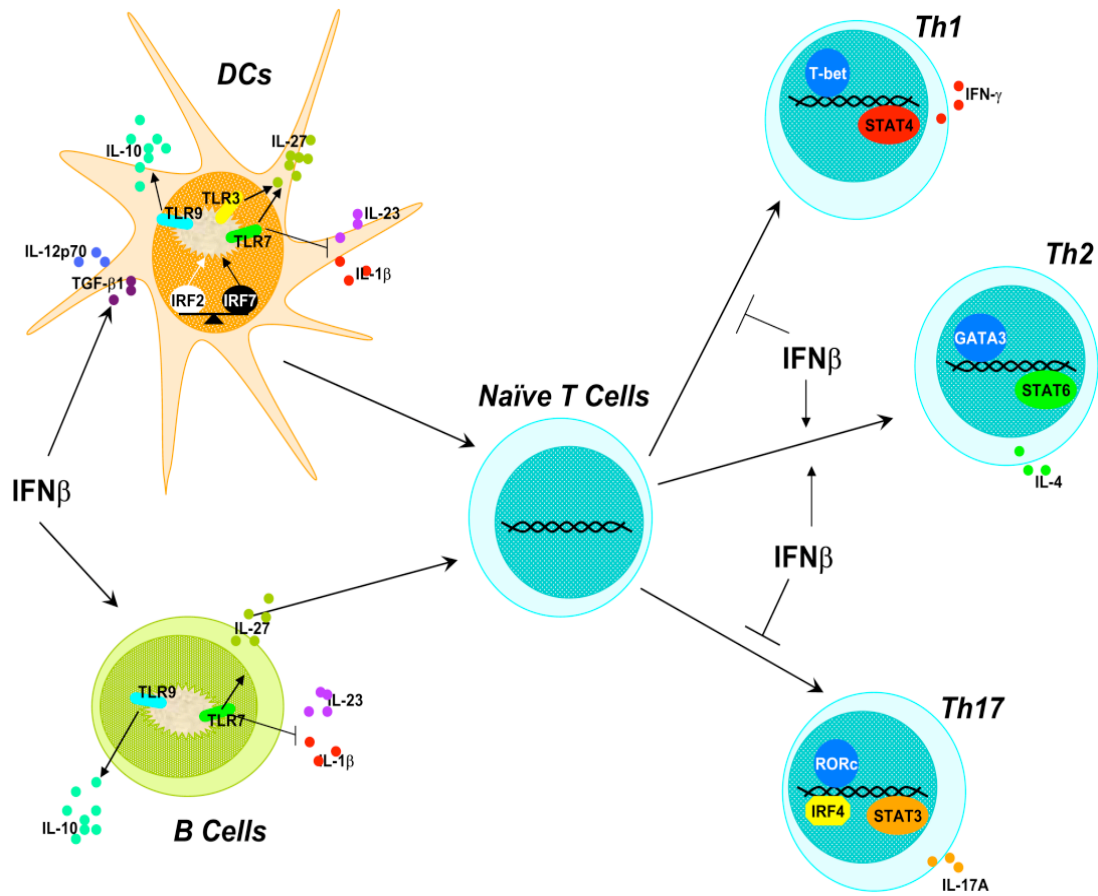


Slika 9. IFN β snizuje ekspresiju IL-23R i CCR6 u CD45RA⁺ T-stanicama u kulturi u Th17-polarizacijskim uvjetima. A. IFN β snizuje ekspresiju IL-23R gena u CD45RA⁺ stanicama izdvojenih is krvi MS bolesnika i zdravih ispitanika. Ekspresija IL-23R je mjerena QRT-PCR metodom. **B.** IFN β inhibira IL-23R i CCR6 ekspresiju na površini CD45RA⁺ T-stanica kod MS bolesnika i zdravih kontrola. IL-23R i CCR6 ekspresija na stanicnoj površini je mjerena metodom protočne citometrije nakon 12 dana kulture CD45RA⁺ stanica u Th17-polarizacijskim uvjetima u odsutnosti ili prisutnosti IFN β , te nakon 48 satne re-stimulacije s anti-CD3 i anti-CD28 mAbs. Rezultati su prikazani kao postotak pozitivnih

CD4⁺ stanica, svaki simbol predstavlja pojedinog bolesnika.

Ukratko, naša studija je pokazala da je terapijski učinak IFN β -a u MS povezan sa promjenama u ekspresiji citokina u dendritičkim i B-stanicama koji orkestriraju Th17 staničnu diferencijaciju. Nadalje, IFN β direktno inhibira diferencijaciju Th17 stanica, putem sniženja ekspresije RORc, IL-17A, i IL-23R, te indukcije ekspresije IL-10. Naša studija postulira nove mehanizme djelovanja IFN β , koji su specifično usmjereni protiv Th17 stanica i razvoja autoimunog odgovora u MS, što je diagramski prikazano na Slici 10.

Slika 10.



5. RASPRAVA

IFN β je korišten tijekom proteklih 15 godina kao prva linija terapije za RR MS, no njegov mehanizam djelovanja još uvijek nije potpuno razjašnjen. Nedavno otkrivene Th17 stanice igraju ključnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti, uključujući i MS. Studije iz našeg i drugih laboratorija su pokazale da IFN β inhibira diferencijaciju Th17 stanica, posredstvom njegovih učinaka na dendritičke stanice, B-stanice i T-stanice. IFN β uzrokuje proizvodnju Th17-supresivnih citokina interleukina IL-27 i IL-12 u dendritičkim stanicama i B-stanicama putem STAT1 fosforilacije. Njegova inhibicija Th17-stimulatornih citokina IL-1 β i IL-23 je posredovana putem indukcije ekspresije SOCS3. U naivnim CD45RA⁺ T-limfocitima, IFN β direktno inhibira diferencijaciju Th17 stanica, putem inhibicije Th17 transkripcijskog faktora RORc, citokina IL-17A i površinskih Th17 staničnih markera CCR6 i IL-23R. Opisani mehanizmi djelovanja IFN β -a selektivno inhibiraju Th17-posredovani autoimuni odgovor kod bolesnika sa RR MS.

Budući da je IFN β jedan od ključnih citokina koji se izlučuje tijekom urođenog imunološkog odgovora protiv virusnih i bakterijskih uzročnika, sredinom devedesetih je predloženo da manjak IFN β proizvodnja kod MS bolesnika može pridonijeti njihovoj predispoziciji na autoimuni odgovor.

Studije Wandinger i sur. (55, 56) su izvijestile da mononuklearne stanice izdvojene iz krvi pacijenata sa MS luče znatno niže razine IFN β kada su izložene stimulaciji virusnim antigenom, u odnosu na zdrave ispitanike. U novijim istraživanjima eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa, dodatno je ispitana uloga endogene IFN β signalizacije u aktivnom suzbijanje patogenog autoimunog odgovora (21-23, 57). Genska delecija IFN β (21), tip I IFN receptora (IFNAR) (22), ili signalnih molekula (23), je dovela do povećane osjetljivosti na EAE, što je poništeno administracijom rekombinantnog IFN β ili IL-27, čije je lučenje sniženo u nedostatku IFN β signalizacije. Stoga je moguće da visoke doze rekombinantnog IFN β , koji se parenteralno primjenjuju u liječenju RR MS, mogu kompenzirati nedostatak endogene IFN β signalizacije kod MS bolesnika.

Prethodne studije mehanizama djelovanja IFN β -a su ukazale da ovaj tretman inhibira sazrijevanje stanica koje prezentiraju antigen, snižuje T-staničnu proliferaciju, te regulira transkripciju citokina IL-12 i IL-10. IFN β također inhibira staničnu migraciju kroz krvno-moždanu barijeru putem utjecaja na VLA-4-posredovanu staničnu adheziju, i na aktivnost MMP9-e (25). Ranije se držalo da Th1 stanice igraju ključnu ulogu u razvoju MS, pri čemu se mislilo da je lučenje IFN- γ -a ključno za indukciju upalnog odgovora (1). Međutim, upravo je za IFN β ustanovljeno da kod MS bolesnika povećava ekspresiju Th1 staničnih markera IL-12R β 2 i CCR5,

što ukazuje na paradoksalno povišenje Th1-stanične reaktivnost (58). Nedavni napredak u razumijevanju patogeneze MS, točnije uloge Th17 stanica, koje su inhibirane IFN- γ -om proizvedenim od strane Th1 stanica, je omogućio da se razriješe prethodne kontroverze i točnije odrede IFN β terapijski ciljevi (50, 59).

Naši rezultati pokazuju da IFN β inhibira izlučivanje IL-1 β , TGF- β 1, i IL-23, i inducira proizvodnju IL-27 od strane dendritičkih stanica. Guo i sur. (23) su nedavno izvijestili da IFN β uzrokuje izlučivanje IL-27, što dodatno podupire studije Shinohara i sur. (57), koji su izvijestili da IFN β -ovisna inhibicija osteopontina potiče izlučivanje IL-27. Međutim, inhibitorni učinci IFN β -a na izlučivanje IL-1 β , TGF- β i IL-23-a nisu ranije objavljeni.

Korištenjem siRNA TLR7 genske supresije u ljudskim dendritičkim stanicama smo potvrdili da IFN β -inducirana povišena ekspresija MyD88 i IRAK4-a ovisi o ekspresiji TLR7, dok je IFN β -inducirana povišena ekspresija TRAF6-a zadržana čak i u odsutnosti ekspresije TLR7. IFN β -inhibirana ekspresija IL-1R je također ovisna o TLR7 ekspresiji.

Receptori TLR porodice i IL-1R koriste zajedničke signalne puteve. Ranije studije su izvijestile da aktivacija pojedinih TLR može izazvati unakrsnu toleranciju na aktivaciju ostalih TLR puteva (60, 61). Na temelju sličnosti u strukturi TLR7 i IL-1R i njihovih zajedničkih signalnih puteva, moguće je da IFN β -inducirana TLR7 ekspresija može inhibirati ekspresiju

IL-1R, kroz mehanizme analogne indukciji TLR unakrsne tolerancije.

Nakon siRNA TLR7 supresije genske ekspresije, izgubljene su IFN β -inducirane promjene u izlučivanju IL-1 β , IL-23 i IL-27, što znači da je imunomodulatorni mehanizam IFN β -a posredovan putem povišene ekspresije TLR7 signalnog puta. Dok je većina prijašnjih studija izvijestila da aktivacija TLR signalnih puteva rezultira u inhibiciji upalnog odgovora putem pojačane proizvodnje tip I IFN-a (5, 62, 63), naša je studija po prvi put identificirala učinak TLR7 signalnog puta koji vodi do promjene u izlučivanju imunoregulatornih citokina od strane dendritičkih stanica.

Iako novije studije pokazuju važnu ulogu B limfocita u razvoju autoimunog odgovora kod bolesnika sa RR MS, vrlo mali broj studija je ispitao učinak IFN β -a na B-stanice. Naši rezultati pokazuju da IFN β in vitro tretman inhibira sekreciju IL-1 β i IL-23, i povišuje sekreciju IL-12 i IL-27 od strane B limfocita. U studijama molekularnih mehanizama IFN β -inducirane promjene sekrecije citokina od strane B stanica smo pokazali da IFN β uzrokuje fosforilaciju STAT3-a, transkripcijskog faktora za SOCS3 (64). Stoga je moguće da se IFN β -posredovano suzbijanje sekrecije IL-1 β i IL-23 od strane B-stanica događa putem indukcije STAT3 fosforilacije i indukcije ekspresije SOCS3, dok je sekrecija IL-12 i IL-27 potaknuta IFN β -posredovanom STAT1 fosforilacijom. Sveukupno gledano, ovaj uzorak promjena kod B-stanica inhibira proizvodnju citokina koji uzrokuju Th17

staničnu diferencijaciju.

Izravno djelovanje IFN β na diferencijaciju CD45RA⁺ T-stanica također inhibira ekspresiju RORc, IL-17A, i IL-23R gena. Istraživanja mehanizama djelovanja na Th17 staničnu diferencijaciju sugeriraju da IFN β inhibira IL-17 putem STAT1 fosforilacije. Izravno djelovanje IFN β na inhibiciju Th17 stanične diferencijacije može predstavljati najvažniji mehanizam za selektivnu kontrolu autoimunog odgovora u MS.

6. ZAKLJUČAK

Prikazani rezultati pokazuju da IFN β snižava sekreciju IL-1 β , IL-23 i TGF- β , koji potiču diferencijaciju Th17 stanica, te da pojačava produkciju IL-27, IL-12p35 i IL-10, koji ju suprimiraju, od strane dendritičkih stanica i B-limfocita. Učinak na IL-1 β , IL-23 i IL-27 proizvodnju od strane dendritičkih stanica je posredovan povišenom ekspresijom TLR7 i distalnih signalizirajućih molekula. IFN β in-vitro također inhibira izlučivanje IL-1 β i IL-23, te inducira sekreciju IL-27 od strane B limfocita. Izravni utjecaj IFN β na in-vitro Th17 diferencijaciju je dokumentiran sniženjem ekspresije Th17 staničnih markera RORc, IL-17A, IL-23R i CCR6.

U zaključku, naši rezultati su identificirali nove mehanizme terapijskog djelovanja IFN β koji indirektno i direktno suzbijaju diferencijaciju Th17 stanica. Budući da su te stanice ključne za razvoj autoimunog odgovora kod RR MS bolesnika, navedeni mehanizmi odražavaju selektivno terapijsko djelovanje IFN β -a u liječenju RR MS bolesnika, te mogu poslužiti u klinčkom praćenju bolesnika i njihovog odgovora na terapiju IFN β -om.

7. KRATKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

IFN β je korišten tijekom proteklog desetljeća kao učinkovita prva linija terapije protiv RR MS, no njegovi mehanizmi djelovanja još nisu u potpunosti razjašnjeni. Naša in-vitro studija je karakterizirala imunoregulatorne efekte IFN β -a na proizvodnju Th17 regulatornih citokina od strane dendritičkih stanica i B-limfocita. IFN β inhibira IL-1 β , IL-23 i TGF- β koji potiču Th17 staničnu diferencijaciju, te inducira IL-27, IL-12p35 i IL-10, koje se suprimiraju. Naši rezultati impliciraju da administracija visokih doza rekombinantnog IFN β , koji ima dokazani terapijski učinak, može pojačati prirodnu IFN β -posredovanu kontrolu autoimunog odgovora. Navedeni rezultati su identificirali biomarkere Th17 stanične aktivnosti koji su povezani s kliničkom aktivnošću bolesti, te mogu poslužiti kao mjera učinkovitosti terapije IFN β -om.

8. KRATKI SAŽETAK I NASLOV NA ENGLESKOM JEZIKU

IMMUNOMODULATORY MECHANISMS OF INTERFERON BETA IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

IFN β has been used over the past decade as an effective first-line therapy for RR MS, but its mechanisms of action are not yet fully understood. Our in-vitro study has characterized the immunoregulatory effects of IFN β on the production of Th17 regulatory cytokines by dendritic cells and by B-lymphocytes. Our results have demonstrated that IFN β inhibits secretion of IL-1 β , IL-23 and TGF- β , which promote Th17 cell differentiation, and induces IL-27, IL-12p35 and IL-10, which suppress it. Our results imply that the administration of high doses of recombinant IFN β , which has a proven therapeutic effect, can increase the natural IFN β -mediated control of autoimmune responses. Our results have identified biomarkers of Th17 cell activity that correlate with clinical disease activity and may serve as a measure of the effectiveness of IFN β therapy.

9. POPIS LITERATURE

1. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
2. Zhang, J., S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179:973-984.
3. Zhang, X., Y. Tang, D. Sujkowska, J. Wang, V. S. Ramgolam, M. Sospedra,, J. Adams, R. Martin, C. Pinilla, and S. Markovic-Plese. 2008. Degenerate TCR recognition and dual DR2 restriction in auto-reactive T-cells: implications for the initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38:1297-1309.
4. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
5. Touil, T., D. Fitzgerald, G. X. Zhang, A. Rostami, and B. Gran. 2006. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol* 177:7505-7509.
6. Lehmann, D., and A. Ben-Nun. 1992. Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 5:675-690.
7. Bach, J. F. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 25 Suppl:74-80.
8. Hafler, D. A. 2004. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113:788-794.
9. Amadi-Obi, A., C. R. Yu, X. Liu, R. M. Mahdi, G. L. Clarke, R. B. Nussenblatt, I. Gery, Y. S. Lee, and C. E. Egwuagu. . 2007. Th-17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT-1. *Nat Med* 13:711-718.

10. Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.
11. Chen, Z., C. M. Tato, L. Muul, A. Laurence, and J. J. O'Shea. 2007. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 56:2936-2946.
12. Sutton, C., C. Brereton, B. Keogh, K. H. Mills, and E. C. Lavelle. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1685-1691.
13. Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30:576-587.
14. Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelletier, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
15. Gocke, A. R., P. D. Cravens, L. H. Ben, R. Z. Hussain, S. C. Northrop, M. K. Racke, and A. E. Lovett-Racke. 2007. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol* 178:1341-1348.
16. Lock, C., G. Hermans, R. Pedotti, A. Brendolan, E. Schadt, H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S. J. Galli, J. R. Oksenberg, C. S. Raine, R. Heller, and L. Steinman. . 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 8:451-453.
17. Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri, and L. Fugger. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155.
18. Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson, and H. Link. 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5:101-104.

19. Li, Y., N. Chu, A. Hu, B. Gran, A. Rostami, and G. X. Zhang. 2007. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 130:490-501.
20. Severa, M., M. E. Remoli, E. Giacomini, V. Annibali, V. Gafa, R. Lande, M. Tomai, M. Salvetti, and E. M. Coccia. 2007. Sensitization to TLR7 agonist in IFN-beta-preactivated dendritic cells. *J Immunol* 178:6208-6216.
21. Teige, I., A. Treschow, A. Teige, R. Mattsson, V. Navikas, T. Leanderson, R. Holmdahl, and S. Issazadeh-Navikas. 2003. IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170:4776-4784.
22. Prinz, M., H. Schmidt, A. Mildner, K. P. Knobloch, U. K. Hanisch, J. Raasch, D. Merkler, C. Detje, I. Gutcher, J. Mages, R. Lang, R. Martin, R. Gold, B. Becher, W. Brück, and U. Kalinke. 2008. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28:675-686.
23. Guo, B., E. Y. Chang, and G. Cheng. 2008. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest.* 118 1680-1690.
24. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. 1998. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352:1498-1504.
25. Byrnes, A. A., J. C. McArthur, and C. L. Karp. . 2002. Interferon-beta therapy for multiple sclerosis induces reciprocal changes in interleukin-12 and interleukin-10 production. *Ann Neurology* 51:165-174.
26. Weinstock-Guttman, B., D. Badgett, K. Patrick, L. Hartrich, R. Santos, D. Hall, M. Baier, J. Feichter, and M. Ramanathan. 2003. Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 171:2694-2702.
27. Iwakura, Y., and H. Ishigame. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116:1218-1222.
28. Wandinger, K. P., S. C. Stürzebecher, B. Bielekova, G. Detore, A. Rosenwald, L. M. Staudt, H. F. McFarland, and R. Martin. 2001. Complex immunomodulatory

- effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurology* 50:349-357.
29. Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
 30. Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8:958-966.
 31. McDonald, W. I., A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H. P. Hartung, F. D. Lublin, H. F. McFarland, D. W. Paty, C. H. Polman, S. C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. Thompson, S. van den Noort, B. Y. Weinschenker, and J. S. Wolinsky. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.
 32. Kurtzke, J. F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444-1452.
 33. Zhang, X., J. Jin, Y. Tang, D. Speer, D. Sujkowska, and S. Markovic-Plese. 2009. IFN-beta1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *J Immunol* 182:3928-3936.
 34. Markovic-Plese, S., H. Fukaura, J. Zhang, A. al-Sabbagh, S. Southwood, A. Sette, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler. 1995. T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. *J Immunol* 155:982-992.
 35. Pannetier, C., J. Even, and P. Kourilsky. 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16:176-181.
 36. Sebille, F., K. Gagne, M. Guillet, N. Degauque, A. Pallier, S. Brouard, B. Vanhove, M. A. Delsuc, and J. P. Soulillou. 2001. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol* 167:3082-3088.

37. Jacobs, L. D., R. W. Beck, J. H. Simon, R. P. Kinkel, C. M. Brownschidle, T. J. Murray, N. A. Simonian, P. J. Slasor, and A. W. Sandrock. 2000. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 343:898-904.
38. Barkhof, F., M. Filippi, D. H. Miller, P. Scheltens, A. Campi, C. H. Polman, G. Comi, H. J. Ader, N. Losseff, and J. Valk. 1997. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120:2059-2069.
39. Comabella, M., and R. Martin. 2007. Genomics in multiple sclerosis--current state and future directions. *J Neuroimmunol* 187:1-8.
40. Montes, M., X. Zhang, L. Berthelot, D. A. Laplaud, S. Brouard, J. Jin, S. Rogan, D. Armao, V. Jewells, J. P. Souliou, and S. Markovic-Plese. 2009. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol* 130:133-144.
41. Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork, and L. Bo. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338:278-285.
42. Barnett, M. H., and J. W. Prineas. 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55:458-468.
43. Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 8:950-957.
44. Urry, Z., E. Xystrakis, D. F. Richards, J. McDonald, Z. Sattar, D. J. Cousins, C. J. Corrigan, E. Hickman, Z. Brown, and C. M. Hawrylowicz. 2009. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J Clin Invest* 119:387-398.
45. Qin, H., C. A. Wilson, S. J. Lee, and E. N. Benveniste. 2006. IFN-beta-induced SOCS1 negatively regulates CD40 gene expression in macrophages and microglia. *FASEB J* 20:985-987.

46. Krebs, D. L., and D. J. Hilton. 2000. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113:2813-2819.
47. Ramgolam, V. S., Y. Sha, J. Jin, X. Zhang, and S. Markovic-Plese. 2009. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 183:5418-5427.
48. Krakauer, M., P. S. Sorensen, M. Khademi, T. Olsson, and F. Sellebjerg. 2006. Dynamic T-lymphocyte chemokine receptor expression induced by interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 64:155-163.
49. Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Turka, M. Ernst, S. J. Saris, J. J. O'Shea, and C. A. Hunter. . 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:1363-1371.
50. Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kijavlin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7:929-936.
51. Batten M., K. N. M., Li J., Walter M.J., de Sauvage F.J., and Ghilardi N. 2008. Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells. *J Immunol.* 180:2752-2756.
52. Stumhofer J.S., L. A., Wilson E.H., Huang E., Tato C.M., Johnson L.M., Villarino A.V., Huang Q., Yoshimura A., Sehy D., Saris C.J., O'Shea J.J., Hennighausen L., Ernst M., and Hunter C.A. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7:937-945.
53. Fitzgerald, D. C., B. Ciric, T. Touil, H. Harle, J. Grammatikopolou, J. Das Sarma, B. Gran, G. X. Zhang, and A. Rostami. 2007. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:3268-3275.
54. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th-17 cells. *J Exp Med* 204:1849-1861.

55. Wandinger, K. P., P. Reissland, H. Kirchner, K. Wessel, and M. Otto. 1998. Production of endogenous interferon-alpha and beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64:277-278.
56. Wandinger, K. P., K. Wessel, P. Neustock, A. Siekhaus, and H. Kirchner. 1997. Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 149:87-93.
57. Shinohara, M. L., J. H. Kim, V. A. Garcia, and H. Cantor. 2008. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* 29:68-78.
58. Wandinger, K. P., C. S. Sturzebecher, B. Bielekova, G. Detore, A. Rosenwald, L. M. Staudt, H. F. McFarland, and R. Martin. 2001. Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 50:349-357.
59. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. . 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
60. Bagchi, A., E. A. Herrup, H. S. Warren, J. Trigilio, H. S. Shin, C. Valentine, and J. Hellman. 2007. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol* 178:1164-1171.
61. Broad, A., J. A. Kirby, and D. E. Jones. 2007. Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production. *Immunology* 120:103-111.
62. Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotsu, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med* 201:915-923.
63. Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061-1068.

64. Frobose, H., S. G. Ronn, P. E. Heding, H. Mendoza, P. Cohen, T. Mandrup-Poulsen, and N. Billestrup. 2006. Suppressor of cytokine signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex. . *Mol Endocrinol.* 20:1587-1596.

10. ŽIVOTOPIS AUTORA

SILVA MARKOVIĆ-PLEŠE, dr. med.

OPĆI PODACI

Rođena 4. 5. 1963 u Livnu

Udata, majka jednog djeteta

EDUKACIJA

- | | | |
|-----------|---|--------------|
| 1983-1988 | Medicinski fakultet | Zagreb |
| | dvije godine demonstrator na Zavodu za patologiju | |
| 1988-1991 | postdiplomski studij iz neurobiologije pri Prirodoslovno matematičkom fakultetu | Zagreb |
| 1991-1995 | postdoktoralne studije iz neuroimunologije, Harvard Medical School | Boston, US |
| 1998-2001 | znanstveni suradnik, National Institute of Health, Neuroimmunology Branch | Bethesda, US |

RADNO ISKUSTVO

- | | |
|-----------|--|
| 1988-1989 | medicinski staž, Bolnica za psihijatrijske bolesti, Vrapče |
| 1989-1991 | Znanstveni pripravnik, KBC Rebro, Neurologija |

| | |
|---|-------------|
| | Zagreb |
| 1995-1998 specijalizant neurologije, Yale University | New Haven, |
| 2001-2003 asistent profesor neurologije, Yale University | New Haven |
| 2003-2011 izvanredni profesor neurologije, voditelj odsjeka za demijelinizacijske bolesti, director MS klinike, University of North Carolina, | Chapel Hill |
| 2004-2011 izvanredni professor mikrobiologije i imunologije, University of North Carolina | Chapel Hill |
| 2008-2011 permanent tenure, Department of Neurology, University of North Carolina, | Chapel Hill |

NAGRADE

| | |
|---|----------|
| 2000 nagrada za istraživački rad, poslijedoktorske studije, National Insitute of Health, National Institute of Neurological Diseases and Stroke | Bethesda |
| 2003-2008 Career Development Award, National Insitute of Health, National Institute of Neurological Diseases and Stroke | Bethesda |
| 2007 Distinguished Clinician Award, National MS Society, North Carolina | |