TEZĂ DE DOCTORAT

Studiul mecanismelor patogenetice în sclerodermia sistemică

Doctorand **Iulia-Elisabeta Rotaru (căs. Szabo)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Simona Rednic**

UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE 15

STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII

1. Introducere 19

2. Etiologia sclerodermiei sistemice 21

2.1. Susceptibilitatea genetică 21

2.2. Factori de risc infecțioşi și non-infecțioşi 21

2.3. Controlul epigenetic al expresiei genice 22

2.3.1. Rolul miARN-urilor 24

2.3.1.1. MiARN-urile profibrotice și antifibrotice 24

2.3.1.2. MiARN-urile implicate în disfuncția sistemului imunitar 26

3. Patogeneza sclerodermiei sistemice 27

3.1. Vasculopatia 29

3.2. Disfuncția imună 30

3.3. Fibrogeneza 32

CONTRIBUŢIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective 35

2. Studiul 1 - Analiza răspunsurilor imune înnăscute și dobândite în celulele mononucleare din sângele periferic al pacienților cu sclerodermie sistemică 37

2.1. Introducere 37

2.2. Ipoteza de lucru/obiective 38

2.3. Material şi metodă 38

2.3.1. Designul studiului, participanți și variabile 38

2.3.2. Izolarea celulelor și condițiile de cultivare 39

2.3.3. Măsurarea concentrațiilor citokinice 39

2.3.4. Analiza statistică 40

2.4. Rezultate 41

2.4.1. Date demografice, clinice și de laborator ale pacienților incluși în studiu 41

2.4.2. Producția *ex vivo* de citokine este amplificată la pacienții cu SSc 44

2.4.3. Evaluarea producției de citokine pro- și antiinflamatorii în asociere cu durata bolii 46

2.4.4. Evaluarea producției de citokine în raport cu diverse fenotipuri de boală 48

2.5. Discuţii 49

2.6. Concluzii 52

3. Studiul 2 - Caracterizarea profilului imun al pacienților cu sclerodermie sistemică utilizând analiza proteomică țintită 55

3.1. Introducere 55

3.2. Ipoteza de lucru/obiective 56

3.3. Material şi metodă 56

3.3.1. Designul studiului și participanți 56

3.3.2. Definirea variabilelor și colectarea datelor 57

3.3.3. Colectarea probelor și efectuarea analizei proteomice 57

3.3.4. Analiza statistică 58

3.4. Rezultate 58

3.4.1. Caracteristicile demografice și clinice ale participanților la studiu 58

3.4.2. Pacienții cu SSc prezintă un profil proteomic distinct 60

3.4.3. Reprezentarea endotipurilor inflamatorii pe baza semnăturii proteice identificate 63

3.4.4. Expresia proteinelor inflamatorii crește odată cu progresia bolii 65

3.4.5. Performanța proteinelor exprimate diferențiat în diagnosticul SSc 67

3.5. Discuţii 67

3.6. Concluzii 72

4. Studiul 3 - Rolul miARN-urilor în modularea răspunsurilor inflamatorii în celulele mononucleare periferice ale pacienților cu sclerodermie sistemică 73

4.1. Introducere 73

4.2. Ipoteza de lucru/obiective 75

4.3. Material şi metodă 75

4.3.1. Participanţii la studiu şi definirea variabilelor 75

4.3.2. Izolarea celulelor și determinarea concentrațiilor citokinice 75

4.3.3. Izolarea ARN-ului total şi cuantificarea miARN-urilor 76

4.3.4. Analiza statistică 77

4.4. Rezultate 77

4.4.1. Expresia miARN-urilor în celulele mononucleare periferice primare 79

4.4.2. Rolul miR-26a-5p în modularea inflamației din SSc 80

4.4.3. Expresia diferențiată a miR-26a-5p în relație cu diferite fenotipuri clinice 82

4.5. Discuţii 83

4.6. Concluzii 85

5. Studiul 4 - Investigarea contribuției căii de semnalizare IL-1 în medierea disfuncției imune din sclerodermia sistemică 87

5.1. Introducere 87

5.2. Ipoteza de lucru/obiective 88

5.3. Material și metodă 88

5.3.1. Designul studiului și participanți 88

5.3.2. Stimularea PBMCs și măsurarea concentrațiilor citokinice 89

5.3.3. Analiza statistică 90

5.4. Rezultate 90

5.4.1. Secreția IL-1Ra este augmentată în SSc consecutiv stimulării cu agoniști PRRs 90

5.5. Discuții 93

5.6. Concluzii 94

6. Discuţii generale 97

7. Concluzii generale 101

8. Originalitatea şi contribuţiile inovative ale tezei 103

REFERINŢE 105

Cuvinte cheie: sclerodermie sistemică, epigenetică, miARN, disfuncție imună, imunitate înnăscută, imunitate antrenată, proteomică, interleukina-1

INTRODUCERE

Sclerodermia sistemică (SSc) este o boală rară a țesutului conjunctiv, grevată de complicații severe de organ care determină o morbiditate și mortalitate ridicate. Fiziopatologia bolii se distinge prin interacțiunea complexă a unor căi patogenetice distincte care conduc spre inflamație, alterări microvasculare funcționale și structurale, respectiv depunere de colagen în piele și organele interne. Evoluția cronică, alături de caracterul progresiv și invalidant, scad semnificativ calitatea vieții acestor pacienți, mai ales din pricina dispneei, a simptomelor digestive și a manifestărilor vasculare periferice. Miriada mediatorilor solubili, sintetizați preponderent de celulele sistemului imunitar, asigură comunicarea în cadrul triadei patogenetice. Mai mult, studiile efectuate pe modele animale au demonstrat că dezvoltarea manifestărilor fibrotice de organ necesită o cooperare strânsă și sincronizată a răspunsurilor imune înnăscute și dobândite. Faptul că singura opțiune terapeutică eficientă în SSc este transplantul autolog de celule stem, ilustrează gravitatea SSc și rolul vital al disfuncției imune în cadrul acestei patologii.

În această teză de doctorat ne-am propus investigarea contribuției mecanismelor imune în patogeneza SSc și în definirea fenotipurilor clinice, prin studii exploratorii funcționale ale răspunsurilor imune, completate de cuantificarea miARN-urilor prin reacția de polimerizare în lanț cu detecție în timp real (qPCR) și tehnologii "omice" de tipul analizei proteomice țintite în celulele mononucleare din sângele periferic (PBMCs) izolate de la pacienți cu SSc. Aceste experimente pot aduce contribuții inovative în SSc, prin înțelegerea mecanismelor patogenetice, creșterea performației diagnostice și generarea de noi ținte fezabile în domeniul terapeutic, conferind lucrării elemente de originalitate.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Mecanismele fiziopatologice care guvernează patogeneza SSc, îndeosebi activarea răspunsurilor imune înnăscute și adaptative, vasculopatia și fibroza, contribuie în mod variabil la conturarea fenotipurilor clinice distinctive ale acestei boli. Inflamația și disfuncția endotelială sunt considerate evenimente timpurii, care prin sinteza aberantă de citokine, molecule de adeziune și factori de creștere perturbă homeostazia tisulară și stabilesc interacțiuni intercelulare complexe, determinând activarea persistentă a miofibroblastelor și producția în exces de proteine matriceale. Asocierea SSc cu alele de risc HLA comune altor boli autoimune, respectiv cu gene non-HLA implicate în reglarea răspunsurilor imune sau în definirea seturilor specifice de autoanticorpi, subliniază rolul central al sistemului imunitar în dezvoltarea bolii. Totodată, pe acest fond genetic predispozant, diverși factori declanșatori își exercită efectele prin mecanisme de tipul mimetismului molecular sau reactivității încrucișate, instigând la pierderea toleranței imune. Cu toate acestea, în mod surprinzător, terapiile imunomodulatoare au demonstrat o eficacitate modestă în tratamentul SSc, sugerând faptul că disfuncția imună nu este o cauză reversibilă a vasculopatiei și fibrozei, ci un fenomen care contribuie în tandem cu celelalte procese fiziopatologice la apariția și progresia bolii.

Studiul epigeneticii în SSc s-a concretizat în argumente solide ale contribuției fragmentelor ARN non-codante în conturarea ansamblului de trăsături caracteristice bolii. MiARN-urile, în particular, pe lângă rolul în modularea diverselor căi patogenetice, s-au dovedit utile și ca biomarkeri diagnostici sau prognostici, respectiv ca potențiale ținte terapeutice. Semnături miARN distincte au fost identificate în serul, tegumentul și fibroblastele cultivate *ex vivo* ale pacienților cu SSc, demonstrând că expresia diferențiată a miARN-urilor nu doar distinge subiecții bolnavi de cei sănătoși, ci poate deosebi formele difuze de boală de cele limitate sau să identifice manifestări specifice de organ, precum fibroza pulmonară sau hipertensiunea arterială pulmonară. În ceea ce privește contribuția miARN-urilor în promovarea disfuncției imune din SSc, acestea orchestrează răspunsurile sistemului imunitar prin reglarea principalelor căi de semnalizare și a factorilor de transcripție, influențând astfel diferențierea celulelor imune și sinteza de citokine.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Contribuția personală s-a materializat în desfășurarea a patru studii prospective, transversale, de tip caz-control, care s-au axat pe investigarea profilului citokinic în PBMCs izolate de la pacienții sclerodermici, a impactului miARN-urilor asupra sintezei de mediatori proinflamatori, a semnăturii proteice din SSc și a rolului căii de semnalizare a interleukinei-1 în patogeneza bolii.

Studiul 1 - Analiza răspunsurilor imune înnăscute și dobândite în celulele mononucleare din sângele periferic al pacienților cu sclerodermie sistemică

Acest prim studiu a fost conceput ca proiect pilot a cărui obiectiv principal a fost identificarea profilului de citokine secretate de PBMC-urile pacienților cu SSc în urma stimulării cu lipopolizaharide (LPS) și *Candida albicans* inactivată termic. Concomitent, am investigat nivelele de expresie ale acestor mediatori în corelație cu durata de evoluție a bolii și am explorat potențialele asocieri dintre concentrațiile citokinice și variate fenotipuri clinice.

Studiul nostru a demonstrat o capacitate de sinteză citokinică sporită a PBMCs aparținând pacienților cu SSc în comparație cu voluntarii sănătoși, în urma expunerii la LPS sau *Candida albicans* inactivată termic. O diferență majoră în producția de citokine a fost decelată în cazul IL-1β și IL-6, în timp ce alți mediatori (IL-1Ra, TNF, IL-17, IL-10), deși au prezentat concentrații mai mari în rândul bolnavilor cu SSc, nu au atins semnificație statistică. Deopotrivă, secreția de IFN-γ a fost similară între grupuri. O observație neașteptată a fost menținerea unor nivele persistent crescute de citokine în cohorta de pacienți cu SSc în pofida progresiei bolii. Acest curs stabil al producției de citokine a fost decelat în marea majoritate a acestor mediatori, excepție făcând IL-10 a cărei concentrație scade pe măsură ce boala avansează. Este de remarcat faptul că în studiul nostru, nu au putut fi identificate semnături citokinice distinctive în asociere cu diferitele fenotipuri clinice ale bolii. Cu toate acestea, nivelele IL-6 au fost mai ridicate la pacienții cu antecedente anterioare sau actuale de ulcere digitale, cu o valoare p apropiată de limita de semnificație statistică, de 0,055. De asemenea, pacienții cu boală incipientă (≤ 3 ani de la diagnosticare) au prezentat concentrații mai mari de IL-10 ($p = 0{,}056$).

În concluzie, această lucrare a evidențiat importanța imunității mediate celular în patogeneza SSc prin identificarea unui răspuns citokinic amplificat și persistent la pacienți față de martori atât în fazele incipiente, cât și în cele tardive ale bolii. Reactivitatea susținută a PBMCs observată în cazul paciențiilor noștri până la 16 ani de la diagnostic susține ipoteza unei memorii imune înnăscute care le conferă pacienților abilitatea de a genera un răspuns inflamator marcat la insulte ulterioare. Trebuie subliniat că acest studiu a avut mai multe limitări ce au împiedicat capacitatea noastră de a stabili corelații relevante din punct de vedere clinic sau de a defini subtipuri de boală pe baza semnăturii lor citokine. Prin urmare, replicarea acestor rezultate în cohorte mai mari de pacienți și extinderea experimentelor funcționale prin utilizarea biotehnologiilor moleculare avansate vor putea oferi nu doar o mai bună înțelegere a SSc, ci și identificarea unor noi biomarkeri sau a unor noi ținte terapeutice.

Studiul 2 - Caracterizarea profilului imun al pacienților cu sclerodermie sistemică utilizând analiza proteomică țintită

Cel de-al doilea studiu a avut ca obiective: (a) evaluarea profilului proteinelor plasmatice în rândul pacienților cu SSc în comparație cu subiecții sănătoși, (b) identificarea endotipurilor bolii pe baza unor semnături proteice unice și, (c) analizarea performanței proteinelor circulante ca biomarkeri de diagnostic.

Astfel, analiza proteomică țintită a celor 92 analiți inflamatori incluși în panelul Olink®, tehnologie bazată pe anticorpi, a arătat că pacienții cu SSc au o semnătură proteică distinctă în comparație cu subiecții sănătoși. Este important de remarcat faptul că un subset de 5 persoane cu SSc a prezentat profiluri proteice asemănătoare cu cele ale grupului control, subliniind astfel heterogenitatea din cadrul scleordermiei și sugerând prezența potențială a diferitelor subtipuri moleculare sau endotipuri de boală. Cele 17 proteine diferențiat exprimate aparțin familiilor de chemokine CXC și CC, puternici mediatori moleculari ai angiogenezei cu rol în promovarea disfuncției și remodelări vasculare în SSc, împreună cu membri ai superfamiliilor TNFSF și ai TNFRSF. Expresia crescută a citokinelor și a receptorilor costimulatori ai TNFSF și TNFRSF observată în cohorta noastră, precum și evidențele din literatura de specialitate privind implicarea lor în activarea și reconfigurarea metabolică a celulelor imune înnăscute, sugerează un potențial rol al imunității antrenate în dezvoltarea SSc. Nivelele de expresie ale biomarkerilor identificați au fost utilizate ulterior pentru a clasifica pacienții în baza endotipurilor inflamatorii, scăzut sau ridicat. Este interesant faptul că pacienții aparținând endotipului inflamator ridicat au fost mai în vârstă și au avut o durată mai lungă de evoluție a bolii, în timp ce esofagita a fost mai puțin prevalentă. Corelațiile efectuate au susținut suplimentar aceste rezultate, deoarece mai multe proteine (TNF, CXCL9, TNFRSF9 și CXCL10) au fost asociate cu progresia bolii, sugerând un răspuns persistent al limfocitelor Th1 pe măsură ce boala progresează. În schimb, în mod surprinzător, nu s-a identificat nicio diferență semnificativă în ceea ce privește nivelele de expresie ale proteinelor din rândul pacienților cu boală timpurie (≤ 3 ani) comparativ cu cei cu boală tardivă (> 3 ani). Totodată, TNF, CXCL9, CXCL10 și CX3CL1 au demonstrat o bună capacitate de discriminare, cea mai înaltă acuratețe diagnostică fiind obținută prin folosirea panelului multiproteic.

În concluzie, chiar dacă aceste date necesită o validare suplimentară în cohorte mai mari, proteinele decelate exercită funcții importante în răspunsurile imune înnăscute și în vasculopatie, care pot fi revelatoare pentru patogeneza SSc.

Studiul 3 - Rolul miARN-urilor în modularea răspunsurilor inflamatorii în celulele mononucleare periferice ale pacienților cu sclerodermie sistemică

Scopul celui de-al treilea studiu a fost de a investiga rolul miR-92a, miR-21-5p, miR-let-7a-3p și miR-26a-5p în reglarea proceselor imune înnăscute și adaptative prin analiza secreției de citokine a PBMCs și implicit, a contribuției acestora în patogeneza SSc. Totodată, datorită abilității miARN-urilor studiate de a controla sinteza de colagen, am presupus că nivelele de expresie ale miR-92a, miR-21-5p, miR-let-7a-3p și miR-26a-5p în PBMCs recoltate de la pacienții cu SSc sunt corelate cu un fenotip clinic mai sever, definit prin prezența fibrozei pulmonare și a unei indurări cutanate extinse.

În urma analizei grupate a probelor prin tehnica qPCR, doar miR-26a-5p a fost ulterior cuantificat în mostre individuale în baza diferenței în ΔCt comparativ cu lotul control. Cu toate că a existat o tendință spre valori mai scăzute ale miR-26a-5p în PBMCs izolate de la pacienții cu SSc, această diferență nu a atins semnificație statistică. De asemenea, miR-26a-5p nu a influențat sinteza de IL-1β, IL-6 și IL-17 în urma stimulării PBMCs cu LPS și *Candida albicans* inactivată termic. Luând în considerare rolul demonstrat al miR-26a-5p în modelarea fibrozei, am evaluat relația dintre acest miARN și manifestările fibrotice ale SSc, precum pneumopatia interstițială difuză și scleroza cutanată. Deși nu am putut demonstra o corelație între parametrii studiați, am remarcat totuși o orientare către nivele de expresie mai reduse în rândul pacienților cu afectare pulmonară și a celor cu indurare tegumentară mai extinsă.

În concluzie, absența unei expresii diferențiate a miARN-urilor studiate ar putea fi explicată atât de numărul mic al pacienților incluși în analiza, cât și de abundența diferită a miARN-urilor între diversele compartimente celulare și țesuturi. Cu toate că miR-26a-5p s-a dovedit a avea un important rol antiinflamator în cadrul altor patologii, în SSc acest miARN este inert în ceea ce privește influența asupra sintezei de citokine. Merită însă menționat că expresia miR-26a-5p în PBMCs a fost cuantificată în condiții bazale, și că mai probabil abundența miR-26a-5p este diferită în PBMCs activate. În schimb, tendința spre valori mai scăzute în rândul pacienților cu PID și a celor cu forme difuze de boală, sugerează că miR-26a-5p ar putea fi un marker de severitate în SSc, ipoteză ce necesită validare in cohorte mai mari și mai omogene de pacienți.

Studiul 4 - Investigarea contribuției căii de semnalizare IL-1 în medierea disfuncției imune din sclerodermia sistemică

Producția amplificată de IL-1β și IL-6 observată în studiul pilot în rândul pacienților cu SSc a reprezentat premisa pentru experimentele din cadrul acestui studiu unde s-a urmărit capacitatea unor agoniști diversi, infecțioși și endogeni, ai receptorilor imunității înnăscute de a stimula eliberarea de IL-1β și a antagonistului său natural, IL-1Ra, din PBMCs recoltate de la acești bolnavi în analogie cu un grup martor.

Așadar, s-a remarcat o tendință spre valori mai ridicate ale IL-1β în rândul pacienților sclerodermici, în timp ce valorile bazale ale IL-1Ra (RPMI), la fel ca și cele rezultate în urma incubării cu LPS, *Candida albicans* inactivată termic, Poly(I:C), Influenza B și RSV-A au fost semnificativ crescute în lotul SSc. Aceste rezultate subliniază pe de o parte contribuția compartimentului mieloid și implicit, a imunității înnăscute în patogeneza SSc, iar pe de altă parte reprezintă argumente indirecte ale rolului imunității antrenate în determinismul bolii. Totodată, studiul actual relevă un dezechilibru al raportului IL-1Ra/IL-1β în SSc ilustrat prin rapoartele obținute consecutiv expunerii PBMCs la LPS (IL-1Ra/IL-1β = 19) și *Candida albicans* inactivată termic (IL-1Ra/IL-1β = 7), sugerând astfel că producția inadecvată de IL-1Ra ar putea întreține cascada inflamatorie și statusul persistent activ al celulelor stromale.

În concluzie, experimentele realizate susțin contribuția căii de semnalizare IL-1 în patogeneza SSc prin demonstrarea unui răspuns citokinic înnăscut crescut al PBMCs la liganzii TLRs. Această reactivitate a immunității înnăscute observată inclusiv în condiții bazale sugerează un efect de amorsare a răspunsurilor imune prin stimulări antigenice anterioare, concept cunoscut sub denumirea de imunitate antrenată. Explorarea rolului memoriei imune antrenate în patogeneza SSc necesită extinderea experimentelor spre studiul integrat al datelor genomice, trascriptomice, precum și a reprogramărilor metabolice și epigenetice. Raportul scăzut IL-1Ra/IL-1β, observat în studiul nostru, denotă o sinteză endogenă de IL-1Ra mai probabil insuficientă pentru a surmonta inflamația sistemică precipitată de agoniștii IL-1 și subliniază în acest fel potențialul terapeutic al inhibării acestei citokine.

DISCUȚII GENERALE

Studiile desfășurate în cadrul acestei teze dezvăluie o serie de constrângeri care compromit validitatea și generalizabilitatea rezultatelor. În primul rând, dimensiunile reduse ale eșantioanelor afectează puterea statistică și reprezentativitatea populației SSc. Mai mult, cu excepția studiului patru, recrutarea exclusivă a pacienților de sex feminin dintr-un centru de îngrijire terțiară, ar putea determina un prejudiciu de eșantionare și o subreprezentare a diversității bolii. În al doilea rând, utilizarea unui număr limitat de stimuli și citokine măsurate, precum și restricționarea evaluării proteomului plasmatic la analiții incluși în panelul inflamator Olink®, împiedică identificarea unor noi biomarkeri sau a unor căi moleculare relevante. Această limitare este accentuată în studiul doi de o metodologie statistică strictă care, deși reduce riscul de descoperiri false, poate exclude proteine circulante revelatoare care nu ating semnificația statistică. În al treilea rând, toate studiile se bazează pe un design transversal, ceea ce nu permite urmărirea dinamică a modificărilor profilurilor citokinice sau a nivelelor de expresie proteică pe parcursul evoluției bolii, limitând înțelegerea evoluției răspunsurilor imune și a potențialelor ținte terapeutice. Mai mult, studiul trei evidențiază limitările investigării selective a unor miARN-uri, ceea ce poate restricționa identificarea unor miARN-uri de interes major în discriminarea pacienților cu SSc. Absența experimentelor funcționale adecvate îngreunează interpretarea contribuției miR-26a-5p în imunopatogeneza SSc. O ultimă limitare care merită atenție este existența în studiul patru a unui decalaj semnificativ de vârstă între grupul pacienților cu SSc și grupul martor, ceea ce ar putea influența răspunsurile citokinice observate. Aceste limitări subliniază necesitatea unor studii viitoare mai ample și cu abordări metodologice mai complexe pentru a clarifica pe deplin rolul biomarkerilor și a profilurilor imunologice în SSc.

CONCLUZII GENERALE

Experimentele realizate în cadrul acestei teze oferă o analiză cuprinzătoare asupra mecanismelor patogenetice implicate în SSc și evidențiază importanța imunității înnăscute și a mediatorilor inflamatori solubili. Așadar, în studiile conduse am obiectivat un răspuns citokinic amplificat și persistent la pacienții cu SSc consecutiv expunerii la variați agoniști TLRs, observabil atât în fazele incipiente, cât și în cele tardive ale bolii. Rolul inflamației în SSc a fost suplimentar susținut de analiza proteomică țintită care a identificat o semnătură proteică individuală în SSc, incluzând chemokine și membri ai superfamiliilor TNFSF și TNFRSF, factori implicați în procesele de angiogeneză și în declanșarea răspunsurilor imune înnăscute. O observație neașteptată a fost decelarea unui endotip inflamator ridicat în rândul pacienților cu vârste mai înaintate și a celor cu durată mai lungă de evoluție a bolii, ceea ce a permis lansarea a două ipoteze: existența unui proces de senescență imună accelerată în SSc, respectiv menținerea unui fenotip Th1 inclusiv în stadiile tardive ale bolii, contrar conceptului tradițional al virării în timp spre un profil Th2. În plus, proteinele circulante au prezentat o acuratețe diagnostică ridicată, însă necesită validare suplimentară în cohorte mai mari.

Reactivitatea susținută a PBMCs până la 16 ani de la diagnostic, evidențiată prin capacitatea de a genera o producție bazală și stimulată sporită de citokine, alături de expresia crescută a proteinelor inflamatorii cu rol în activarea și reconfigurarea metabolică a celulelor imune înnăscute, sugerează o posibilă contribuție a imunității antrenate, conferind pacienților abilitatea de a genera un răspuns inflamator accentuat la insulte ulterioare.

Expresia miR-26a-5p nu a exercitat un efect reglator asupra sintezei de IL-1β, IL-6 și IL-17, și implicit asupra răspunsurilor imune înnăscute și dobândite. Totuși, miR-26a-5p ar putea fi un marker de severitate în SSc, aspect sugerat de tendința spre valori mai scăzute în rândul pacienților cu pneumopatie interstițială difuză și a celor cu forme difuze de boală.

În final, cultivarea PBMCs în medii îmbogățite cu liganzi PRRs infecțioși și endogeni a determinat o creștere semnificativă a IL-1Ra în SSc comparativ cu grupul control, dezvăluind astfel un răspuns inflamator înnăscut viguros în SSc care este mediat, cel puțin parțial, de calea de semnalizare IL-1.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Această teză se remarcă în primul rând prin abordarea complexă a studiului mecanismelor imune, prin experimente funcționale *ex vivo* pe celule imune, cuplate cu tehnici avansate de analiză proteomică și qPCR, aducând contribuții semnificative în înțelegerea patogenezei și diagnosticului SSc, deschizând astfel noi căi pentru cercetări viitoare.

Alături de aportul semnificativ adus în caracterizarea mecanismelor moleculare ale bolii prin identificarea și caracterizarea detaliată a unui răspuns inflamator înnăscut amplificat și persistent în rândul pacienților cu SSc, decelarea potențialul miR-26a-5p ca marker de severitate, sublinierea importanței căii de semnalizare IL-1β în determinismul SSc, precum și descoperirea unei semnături inflamatorii specifice în SSc și a unei noi proteine diferențiat exprimată, CCL28, rezultatele obținute au permis lansarea a două concepte inovative în patogeneza SSc, cel al imunității antrenate și cel al îmbătrânirii imune accelerate.

DOCTORAL THESIS

Study of pathogenic mechanisms in systemic sclerosis

Doctoral candidate **Iulia-Elisabeta Rotaru (căs. Szabo)**

Coordinator Prof.dr. **Simona Rednic**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE IULIU HAŢIEGANU CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION 15

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE
1. Introduction 19
2. Etiology of systemic sclerosis 21
2.1. Genetic susceptibility 21
2.2. Infectious and non-infectious risk factors 21
2.3. Epigenetic control of gene expression 22
2.3.1. The role of miRNAs 24
2.3.1.1. Profibrotic and antifibrotic miRNAs 24
2.3.1.2. MiRNAs involved in immune dysfunction 26
3. Systemic sclerosis pathogenesis 27
3.1. Vasculopathy 29
3.2. Immune dysfunction 30
3.3. Fibrogenesis 32

PERSONAL CONTRIBUTION
1. Working hypothesis/objectives 35
2. First study - Enhanced innate and acquired immune responses in systemic sclerosis primary peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 37
2.1. Introduction 37
2.2. Working hypothesis/objectives 38
2.3. Material and method 38
2.3.1. Study design, participants and variables 38
2.3.2. Cell isolation and culture conditions 39
2.3.3. Measurement of cytokine concentrations 39
2.3.4. Statistical analysis 40
2.4. Results 41
2.4.1. Demographic, clinical and laboratory data of patients included in the study 41
2.4.2. *Ex vivo* cytokine production is enhanced in patients with SSc 44
2.4.3. Assessment of cytokine production in correlation to disease duration 46
2.4.4. Cytokine production in relationship to SSc subphenotypes 48
2.5. Discussions 49
2.6. Conclusions 52
3. Second study - Immune profiling of patients with systemic sclerosis through targeted proteomic analysis 55
3.1. Introduction 55
3.2. Working hypothesis/objectives 56
3.3. Material and method 56
3.3.1. Study design and participants 56
3.3.2. Variables and data collection 57
3.3.3. Sample collection and assessment of inflammation biomarkers 57
3.3.4. Statistical analysis 58
3.4. Results 58

3.4.1. Demographic and clinical characteristics of the study participants 58
3.4.2. Patients with SSc demonstrate a distinct proteomic profile 60
3.4.3. Portrayal of inflammatory endotypes based on the identified protein signature 63
3.4.4. Inflammatory proteins are significantly upregulated in patients with a longer disease duration 65
3.4.5. Performance of differentially expressed proteins for the diagnosis of SSc 67
3.5. Discussions 67
3.6. Conclusions 72
4. Third study - Role of miRNAs in modulating inflammatory responses in peripheral mononuclear cells of patients with systemic sclerosis 73
4.1. Introduction 73
4.2. Working hypothesis/objectives 75
4.3. Material and method 75
4.3.1. Study participants and variables 75
4.3.2. Cell isolation and detection of cytokine concentrations 75
4.3.3. Total RNA isolation and miRNA quantification 76
4.3.4. Statistical analysis 77
4.4. Results 77
4.4.1. Expression of miRNAs in primary peripheral mononuclear cells 79
4.4.2. Role of miR-26a-5p in modulating inflammation in SSc 80
4.4.3. Differential expression of miR-26a-5p in relation to different clinical phenotypes 82
4.5. Discussions 83
4.6. Conclusions 85
5. Forth study - The contribution of the IL-1 signaling pathway in mediating immune dysfunction in systemic sclerosis 87
5.1. Introduction 87
5.2. Working hypothesis/objectives 88
5.3. Material and method 88
5.3.1. Study design and participants 88
5.3.2. PBMCs stimulation and measurement of cytokine concentrations 89
5.3.3. Statistical analysis 90
5.4. Results 90
5.4.1. IL-1Ra production is increased in SSc following stimulation with PRRs agonists 90
5.5. Discussions 93
5.6. Conclusions 94
6. General discussions 97
7. General conclusions 101
8. Originality and innovative contributions of the thesis 103

REFERENCES 105

Keywords: systemic sclerosis, epigenetics, miRNA, immune dysfunction, innate immunity, trained immunity, proteomics, interleukin-1

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease burdened by severe organ complications leading to high morbidity and mortality. The pathophysiology of the disease is characterized by the complex interplay of distinct pathogenetic pathways leading to inflammation, functional and structural microvascular alterations, and collagen deposition in the skin and internal organs. The chronic course, together with its progressive and disabling nature, significantly decreases the quality of life of these patients, mainly due to dyspnea, gastrointestinal symptoms and peripheral vascular manifestations. The myriad of soluble mediators, mainly synthesized by the immune cells, ensure communication within the pathogenic triad. Furthermore, studies on animal models have shown that the development of fibrotic organ manifestations requires close and synchronized cooperation of innate and acquired immune responses. The fact that the only effective therapeutic option in SSc is autologous stem cell transplantation illustrates the severity of SSc and the vital role of immune dysfunction as a driver of the disease.

This doctoral thesis aimed to investigate how immune responses contribute to the development of SSc and its specific clinical phenotypes through exploratory functional studies of these responses, complemented by quantification of miRNAs by real-time polymerase chain reaction (qPCR) and "omics" technologies in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from patients with SSc. These experiments may unravel new perspectives in the understanding of molecular mechanisms, as well as increasing diagnostic performance and generating feasible therapeutic targets.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The molecular mechanisms that govern the pathogenesis of SSc, in particular the activation of innate and adaptive immune responses, vasculopathy and fibrosis, contribute variably to the distinctive clinical phenotypes of this disease. Inflammation and endothelial dysfunction are considered early events, responsible of aberrant synthesis of cytokines, adhesion molecules and growth factors that disrupt tissue homeostasis and establish complex intercellular interactions, leading to persistent activation of myofibroblasts and excess production of matrix proteins. The association of SSc with HLA risk alleles common to other autoimmune diseases, as well as with non-HLA genes involved in the regulation of immune responses or in defining specific autoantibody sets, emphasizes the central role of the immune system in the development of the disease. At the same time, against this predisposing genetic background, various triggering factors exert their effects through mechanisms such as molecular mimicry or cross-reactivity, instigating loss of immune tolerance. Surprisingly, however, immunomodulatory therapies have shown modest efficacy in the treatment of SSc, suggesting that immune dysfunction is not a reversible cause of vasculopathy and fibrosis, but a phenomenon that contributes together with other pathophysiologic processes to the onset and progression of the disease.

The study of epigenetics in SSc has resulted in solid arguments for the contribution of non-coding RNA fragments in shaping the phenotypic features characteristic of SSc. MiRNAs, in particular, in addition to their role in modulating various pathogenetic pathways, have also proven useful as diagnostic or prognostic biomarkers in addition to potential therapeutic targets. Distinct miRNA signatures were identified in *ex vivo* cultured serum, in the skin and fibroblasts of SSc patients, demonstrating that the differential expression of miRNAs not only distinguishes diseased from healthy subjects, but can also distinguish diffuse from limited forms of disease or identify organ-specific manifestations such as pulmonary fibrosis or pulmonary arterial hypertension. With regard to the contribution of miRNAs in promoting immune dysfunction in SSc, it was shown that they orchestrate immune system responses by regulating key signaling pathways and transcription factors, thereby influencing immune cell differentiation and cytokine synthesis.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contribution consisted of conducting 4 prospective, cross-sectional case-control studies focused on investigating the cytokine profile of PBMCs isolated from scleroderma patients, the impact of miRNAs on the synthesis of proinflammatory mediators, the protein signature in SSc and the role of the interleukin-1 signaling pathway in the pathogenesis of the disease.

First study - Enhanced Innate and Acquired Immune Responses in Systemic Sclerosis Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

The main objective of this pilot study was to assess various cytokine profiles in primary PBMCs upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and heat-killed *Candida albicans*, as well as their expression levels in correlation to disease duration. Moreover, we explored the potential associations between serum cytokine concentrations and different clinical features.

Our data highlight the ability of PBMCs to mount an enhanced immune response in SSc patients compared with their matched controls in response to LPS or heat-killed *Candida albicans*. The increased cytokine production is particularly evident for IL-1 β and IL-6, while other cytokines (IL-1Ra, TNF, IL-17, IL-10) exhibit higher concentrations in patients versus controls but without reaching statistical significance. IFN-gamma production showed no difference between groups. Notably, most cytokine levels remain persistently elevated in our group despite disease progression. The only significant correlation identified was between decreasing levels of IL-10 and increasing disease duration. Remarkably, in our study, no distinct cytokine signatures could distinguish between different disease phenotypes. However, IL-6 levels proved to be higher in patients with a previous or current history of digital ulcers, with a borderline p value of 0.055. Likewise, patients with early disease (≤3 years from diagnosis) produced higher concentrations of IL-10 but without crossing the threshold for statistical significance ($p = 0.056$).

In summary, this study emphasized the role of cell-mediated immunity in the pathogenesis of SSc by demonstrating a generally elevated cytokine response in patients versus controls which is maintained throughout the course of the disease. The sustained PBMC reactivity seen in our patients up to 16 years after diagnosis supports the hypothesis that an innate immune memory could be present in SSc which enables patients to mount an increased inflammatory response to subsequent insults. As previously mentioned, several limitations hindered our ability to establish clinically relevant correlations or define disease subtypes according to their cytokine signature. Validation of these preliminary findings and further mechanistic assessment in larger cohorts is warranted.

Second study - Immune Profiling of Patients with Systemic Sclerosis through Targeted Proteomic Analysis

The aims of the second study were: (a) to assess the plasma protein profile of SSc patients compared to healthy subjects, (b) to identify disease endotypes based on unique protein signatures, and (c) to analyze the performance of circulating proteins as diagnostic biomarkers.

Thus, targeted proteomic analysis of the 92 inflammatory analytes included in the Olink® panel, an antibody-based technology, showed that SSc patients have a distinct protein signature compared to healthy subjects. Importantly, a subset of 5 individuals with SSc exhibited protein profiles similar to those of the control group, thus emphasizing the heterogeneity within the disease and suggesting the potential presence of different molecular subtypes or disease endotypes. The 17 differentially expressed proteins belong to the CXC and CC chemokine families, potent molecular mediators of angiogenesis with a role in promoting vascular dysfunction and remodeling in SSc, together with members of the TNFSF and TNFRSF superfamilies. The increased expression of cytokines and costimulatory receptors of TNFSF and TNFRSF observed in our cohort, as well as evidence in the literature for their involvement in the activation and metabolic reconfiguration of innate immune cells, suggest a potential role for trained immunity in the development of SSc. The expression levels of the identified biomarkers were later used to classify patients based on their inflammatory endotypes, either low or high. Interestingly, patients belonging to the high inflammatory endotype were older and had a longer disease duration, while esophagitis was less prevalent. The correlations performed further supported these results, as several proteins (TNF, CXCL9, TNFRSF9 and CXCL10) were associated with disease progression, suggesting a persistent Th1 lymphocyte response as the disease progresses. Surprisingly, no significant difference in protein expression levels was identified among patients with early disease (≤ 3 years) compared to those with late disease (> 3 years). Furthermore, TNF, CXCL9, CXCL9, CXCL10 and CX3CL1 demonstrated good discriminatory ability, with the highest diagnostic accuracy being obtained using the multi-protein panel.

In summary, even though these data require further validation in larger cohorts, the detected proteins exert important functions in innate immune responses and vasculopathy, which may be revealing for the pathogenesis of SSc.

Third study - The role of miRNAs in modulating inflammatory responses in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis

The aim of the third study was to investigate the role of miR-92a, miR-21-5p, miR-let-7a-3p and miR-26a-5p in regulating innate and adaptive immune processes by analyzing the cytokine secretion of PBMCs and, consequently, their contribution to the pathogenesis of SSc. Furthermore, due to the ability of the studied miRNAs to control collagen synthesis, we hypothesized that the expression levels of miR-92a, miR-21-5p, miR-let-7a-3p and miR-26a-5p in PBMCs harvested from SSc patients correlate with a more severe clinical phenotype, defined by the presence of pulmonary fibrosis and extensive skin thickening.

Following the pooled analysis of samples using qPCR, only miR-26a-5p was subsequently quantified in individual samples based on the difference in ΔCt compared to the control group. Although there was a trend towards lower miR-26a-5p values in PBMCs isolated from SSc patients, this difference did not reach statistical significance. Also, miR-26a-5p did not influence the synthesis of IL-1β, IL-6 and IL-17 following stimulation of PBMCs with LPS and heat-killed *Candida albicans*. Considering the demonstrated role of miR-26a-5p in modulating fibrosis, we evaluated the relationship between this miRNA and fibrotic manifestations of SSc, such as interstitial lung disease (ILD) and cutaneous sclerosis. Although we could not demonstrate a correlation between the studied parameters, we nevertheless noted a trend towards lower expression levels among patients with pulmonary involvement and those with more extensive skin thickening.

In summary, the lack of a differential expression of the studied miRNAs could be explained both by the small number of patients included in the analysis and by the different abundance of miRNAs across various cellular compartments and tissues. Although miR-26a-5p has been shown to have an important anti-inflammatory role in other pathologies, in SSc this miRNA is inert in terms of influence on cytokine synthesis. It is worth noting, however, that miR-26a-5p expression in PBMCs was quantified under basal conditions, and that miR-26a-5p abundance is more likely to be different in activated PBMCs. Nonetheless, the tendency towards lower values among patients with ILD and those with diffuse forms of the disease suggests that miR-26a-5p could potentially serve as a marker of severity in SSc. This hypothesis needs to be validated in larger and more homogeneous patient cohorts.

Fourth study - The contribution of the IL-1 signaling pathway in mediating immune dysfunction in systemic sclerosis

The enhanced production of IL-1β and IL-6 observed in the pilot study among SSc patients provided the basis for the experiments in this study, which aimed to assess the ability of various infectious and endogenous agonists of innate immune receptors to stimulate the release of IL-1β and its natural antagonist, IL-1Ra, from PBMCs collected from these patients, compared to a control group.

Thus, there was a trend towards higher IL-1β values among scleroderma patients, while basal IL-1Ra (RPMI) values, as well as those following incubation with LPS, heat-killed *Candida albicans*, Poly(I:C), Influenza B and RSV-A were significantly increased in the SSc group. On the one hand, these results emphasize the contribution of the myeloid compartment and, by extension, of innate immunity in the pathogenesis of SSc, and on the other hand, they represent indirect arguments for the role of trained immunity in the development of the disease. Additionally, the current study reveals an imbalance in the IL-1Ra/IL-1β ratio in SSc, as shown by the ratios obtained following the exposure of PBMCs to LPS (IL-1Ra/IL-1β = 19) and heat-inactivated *Candida albicans* (IL-1Ra/IL-1β = 7). This suggests that inadequate production of IL-1Ra could sustain the inflammatory cascade and the persistently active status of stromal cells.

In summary, the experiments conducted support the contribution of the IL-1 signaling pathway in the pathogenesis of SSc by demonstrating an increased innate cytokine response of PBMCs to TLR ligands. This innate immune reactivity, observed even under basal conditions, suggests a priming effect of immune responses due to previous antigenic stimulations, a concept known as trained immunity. Exploring the role of trained immune memory in the pathogenesis of SSc requires extending the experiments to include an integrated study of genomic, and transcriptomic data, as well as metabolic and epigenetic reprogramming. The low IL-1Ra/IL-1β ratio observed in our study indicates an insufficient endogenous synthesis of IL-1Ra to counteract the systemic inflammation precipitated by IL-1 agonists, thus highlighting the therapeutic potential of cytokine inhibition.

GENERAL DISCUSSIONS

The studies conducted in this thesis reveal a number of constraints that compromise the validity and generalizability of the results. First, small sample sizes affect the statistical power and representativeness of the SSc population. Furthermore, with the exception of the fourth study, the exclusive recruitment of female patients from a tertiary care center could lead to sampling bias and underrepresentation of disease diversity. Second, the use of a limited number of stimuli and cytokines measured, as well as the restriction of plasma proteome assessment to analytes included in the inflammatory panel Olink®, prevents the identification of novel biomarkers or relevant molecular pathways. This limitation is emphasized in the second study by a strict statistical methodology that, while reducing the risk of false findings, may exclude significant circulating proteins that do not meet the statistical significance threshold. Thirdly, all studies are based on a cross-sectional design, which does not allow for dynamic tracking of changes in cytokine profiles or protein expression levels over the course of disease progression, limiting our understanding of the evolution of immune responses and potential therapeutic targets. Furthermore, the third study highlights the limitations of selective investigation of some miRNAs, which may restrict the identification of miRNAs of major interest in discriminating SSc patients. The absence of adequate functional experiments makes it difficult to interpret the contribution of miR-26a-5p in SSc immunopathogenesis. A final limitation that deserves attention is the existence in the fourth study of a significant age gap between the SSc and control groups, which could influence the observed cytokine responses. These limitations emphasize the need for future larger studies with more complex methodological approaches to fully clarify the role of biomarkers and immunologic profiles in SSc.

GENERAL CONCLUSIONS

The experiments performed in this thesis provide a comprehensive analysis of the pathogenetic mechanisms involved in SSc and emphasize the importance of innate immunity and soluble inflammatory mediators. Therefore, in the conducted studies, we observed an amplified and persistent cytokine response in SSc patients following exposure to various TLR agonists, noticeable in both the early and late stages of the disease. The role of inflammation in SSc was further supported by targeted proteomic analysis that identified an individual protein signature in SSc, including chemokines and members of the TNFSF and TNFRSF superfamilies, factors involved in angiogenesis processes and in triggering innate immune responses. An unexpected observation was the detection of a high inflammatory endotype among older patients and those with a longer disease duration. This led to two hypotheses: the existence of an accelerated immune senescence process in SSc and the persistence of a Th1 phenotype even in the late stages of the disease, contrary to the traditional concept of a shift towards a Th2 profile over time. Additionally, circulating proteins showed high diagnostic accuracy but require further validation in larger cohorts.

The sustained reactivity of PBMCs up to 16 years after diagnosis, as evidenced by their ability to generate an increased basal and stimulated cytokine production, along with elevated expression of inflammatory proteins involved in the activation and metabolic reprogramming of innate immune cells, suggests a possible contribution of trained immunity. This may grant patients the ability to mount an enhanced inflammatory response to subsequent insults.

Expression of miR-26a-5p did not exert a regulatory effect on the synthesis of IL-1β, IL-6 and IL-17, and thus did not influence innate and acquired immune responses. However, miR-26a-5p could be a marker of severity in SSc, an aspect suggested by the trend towards lower values among patients with ILD and those with diffuse forms of the disease.

Finally, culture of PBMCs in media enriched with infectious and endogenous PRRs ligands resulted in a significant increase in IL-1Ra in SSc compared to the control group, thus revealing a vigorous innate inflammatory response in SSc that is mediated, at least in part, by the IL-1 signaling pathway.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

This thesis stands out primarily for its complex approach to the study of immune mechanisms, through functional *ex vivo* experiments on immune cells coupled with advanced proteomic analysis and qPCR techniques, making significant contributions to our understanding of the pathogenesis and diagnosis of SSc, thus opening new avenues for future research.

Along with the significant contribution made in characterizing the molecular mechanisms of the disease by identifying and detailing an amplified and persistent innate inflammatory response in SSc patients, potentially uncovering miR-26a-5p as a marker of severity, highlighting the importance of the IL-1β signaling pathway in the development of SSc, as well as the discovery of a specific inflammatory signature in SSc and of a novel differentially expressed protein, CCL28, the results have led to the introduction of two innovative concepts in SSc pathogenesis: trained immunity and accelerated immune aging.