

# Kleine Regulatoren mit grossem Einfluss

## Wie microRNAs die Immunpathogenese von Multipler Sklerose beeinflussen

Claudia Sievers<sup>a</sup>, Maria Meira<sup>a</sup>, Francine Hoffmann, Raija Lindberg

Universitätsspital Basel, Departement Biomedizin und Neurologie

<sup>a</sup> gleiche Beteiligung

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der zum einen die komplexen Strukturen und Funktionen des zentralen Nervensystems und zum anderen die Komplexität des angeborenen und adaptiven Immunsystems berücksichtigt werden müssen [1]. Pathophysiologische Prozesse wie Entzündung, Demyelinisierung und Beschädigung von Axonen, aber auch neuronale Reparaturmechanismen, spielen bei MS eine Rolle. MS-Patienten zeigen eine Vielzahl verschiedener Symptome und Krankheitsverläufe, zudem lässt sich die Therapieeffektivität nur schwer vorhersagen. Die Manifestierung von MS ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem die genetische Komponente genauso eine Rolle spielt wie Umweltfaktoren. Ein weiterer wichtiger Faktor der Pathogenese ist ausserdem die Regulation der DNS-Transkription.

Die kürzlich entdeckten MikroRNAs (miRNAs), die zur Gruppe der «small non-coding RNAs» gehören, gelten als wichtige Regulatoren zahlreicher biologischer Prozesse. Bisher sind über tausend verschiedene miRNAs bekannt. Indem miRNAs die Expression von bis zu 30% aller proteinkodierenden Gene beeinflussen, sind sie unter anderem bei der Zellteilung, der Differenzierung, Apoptose, Signalweiterleitung und Organentwicklung beteiligt. miRNAs haben immer einen hemmenden Effekt auf ihr Ziel-Gen. Durch komplementäre Bindung kommt es zu einer Hemmung der Gentranslation. Während bei einer vollständigen Übereinstimmung der Sequenzen die mRNA degradiert wird, blockiert bei einer teilweisen Übereinstimmung die miRNA-mRNA-Interaktion die Bindung der Ribosomen, womit die Translation effizient gehemmt wird. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass miRNAs nicht nur intrazellulär, sondern sehr stabil, geschützt vor endogener RNase-Aktivität, auch in Serum und Plasma vorkommen. Somit könnten sie ideale Kandidaten für leicht zugängliche Biomarker zur Vorhersage von Krankheitsverläufen und Therapieeffektivität sein.

MiRNAs sind auch an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Neben der Homöostase können genauso funktionelle Aspekte der Immunabwehr durch miRNAs beeinflusst werden. Auch bei der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen, inklusive MS, zeichnet sich immer häufiger eine Beteiligung von miRNAs ab. miRNAs wurden sowohl in Blut, Serum und Plasma von MS-

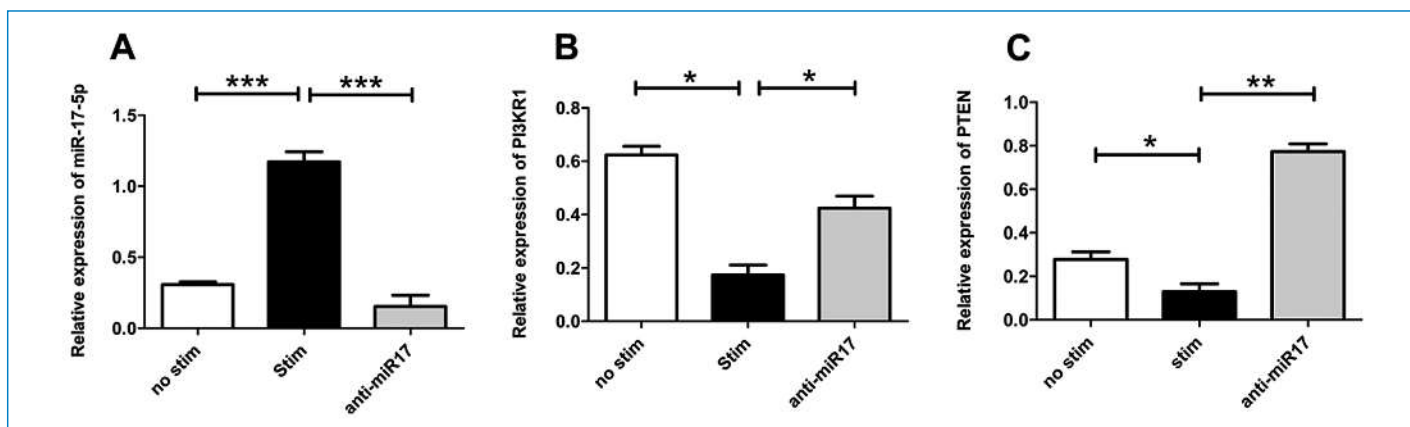
Patienten als auch in MS-Läsionen im Gehirn und in Liquor nachgewiesen. So konnte in MS-Läsionen und Astrozyten eine erhöhte Expression von miRNA-155 gezeigt werden. Ein potentielles Ziel von miRNA-155 ist CD47. Das Protein reguliert neben der phagozytotischen Aktivität von Makrophagen auch die Zytokinproduktion von dendritischen Zellen via Regulation von SIRP-alpha. Eine Hemmung von CD47 durch miRNA-155 hat demnach eine gesteigerte Phagozytose in MS-Läsionen zur Folge, was wiederum zu einer Zerstörung des Gewebes führen kann.

Zahlreiche Studien analysieren die miRNA-Expression im Blut, in peripheren mononuklearen Zellen (PBMCs) und in verschiedenen Zell-Subpopulationen von MS-Patienten [2]. Dabei konnte zum Beispiel eine Überexpression von miRNA-326 in TH17-Zellen von Patienten mit schubförmiger MS (relapsing-remitting MS) gezeigt werden. miRNA-326 hemmt Ets-1, ein negativer Regulator der TH17-Differenzierung, wodurch es zu einer gesteigerten Proliferation von TH17-Zellen kommt. Auch in regulatorischen T-Zellen (Treg) von MS-Patienten konnte eine Deregulation von miRNAs gezeigt werden. Im Vergleich zu gesunden Probanden war die Expression von miR-106b, miR-25, miR-19a und miR-19b gesteigert. Des Weiteren lässt sich in naiven und memory-CD4-T-Zellen ein spezifisches miRNA-Expressionsmuster zeigen, das zu einem spezifischen TH1/TH2-Phänotyp führt. Aktuelle Publikationen zeigen eindeutig eine zelltypspezifische Expression bestimmter miRNAs in den verschiedenen peripheren Immunzellen. Demnach überrascht es nicht, dass mit Vollblut gemachte Studien kontroverse Ergebnisse hervorgebracht haben.

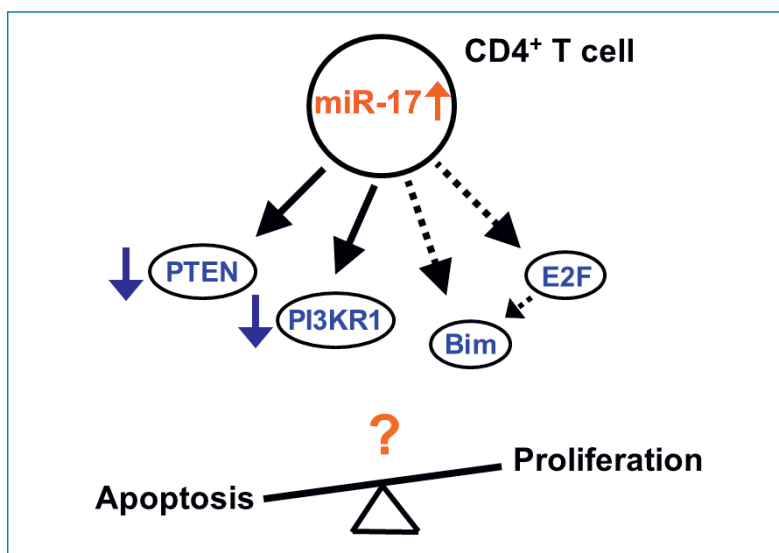
### Zielsetzung und Hypothese

Mit dieser Studie soll die Relevanz von miRNAs hinsichtlich der Immunregulation bei MS untersucht werden. MiRNA-Expressionsmuster in unterschiedlichen Immunzellen sowie bei verschiedenen MS-Typen und -Verläufen sollen mit denen von gesunden Probanden verglichen werden. Lässt sich dabei ein spezifisches Muster erkennen, wodurch bestimmte miRNAs bestimmten MS-Typen zugeordnet werden können, sollen diese in grösseren Studien validiert und ihre potentielle Funktion als prognostischer Marker für Krankheitsaktivität und Behandlungserfolg untersucht werden. Daneben können die Ergebnisse neue Aspekte der Genregulation bei MS liefern und damit zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen und der Immunpathogenese von MS beitragen.

Diese Studien wurden vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (SNSF Grant Nr.: 310030\_132644/1) sowie vom Roche Postdoc Fellowship (RPF) Program (Project RPF-ID:024) und von der Schweizerischen Multiple Sklerose Gesellschaft unterstützt. Forschungs-Grant-Nr.: SNSF Grant Nr.: 310030\_132644/1



**Abbildung 1**  
 Effekt von miR-17-Inhibitor auf die Expression von miR-17-5p, PI3KR1 und PTEN. miR-17-5p-Expression (A) und mRNA-Expression von PI3KR1 (B) und PTEN (C) in unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen (weisse Säule), nach 24-stündiger CD3/CD28-Stimulation ohne spezifischen miR-17-Inhibitor (schwarze Säule) und mit miR-17-Inhibitor (graue Säule). Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.  
 \*\*\* = p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p < 0,05.



**Abbildung 2**  
 Schematische Darstellung der Hypothese: Wie deregulierte miRNAs die Balance zwischen Apoptose und Zellüberleben autoreaktiver Immunzellen in MS beeinflussen können.

### Methodik

Mit Hilfe von «low-density miRNA expression arrays» kann die Expression von 728 unterschiedlichen miRNAs zeitgleich in einer Probe analysiert werden. Mit dieser modernen molekularbiologischen Technik wurde die miRNA-Expression bei 12 MS-Patienten mit der Expression bei 12 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Das dabei gefundene Expressionsmuster soll anschliessend mit einer grösseren, unabhängigen Kohorte validiert werden. Unser Labor der klinischen Neuroimmunologie ist im Departement der Neurologie am Universitätsspital Basel eingegliedert. Die Neurologie beinhaltet eine grosse MS-Klinik mit über 1000 MS-Patienten pro Jahr, was uns den Zugang zu Patienten mit verschiedenen MS-Typen, -Aktivitätsgraden und -Krankheitsverläufen ermöglicht. Dadurch sind wir in der Lage, Verlaufspuren von MS-Patienten mit den unterschiedlichsten Behandlungen zu sammeln und zu analysieren.

sieren. Ausserdem besteht eine enge Kollaboration mit der Radiologie und dem Medical Imaging Analysis Center (MIAC), was eine qualitative und quantitative phänotypische Charakterisierung der Patienten nach höchstem Standard garantiert.

### Wichtigste Ergebnisse

Wir haben vor kurzem MS-spezifische miRNA-Expressionsmuster in peripheren CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und B-Zellen identifiziert [3]. Unter anderem konnten wir eine Deregulation von miR-17 in CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigen. Interessanterweise wird miR-17 oft in Zusammenhang mit Autoimmunität gebracht. Ein Vergleich der 992 potentiellen Ziel-Gene (mRNA) von miR-17 deutet auf den Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signalweg als einen von miR-17 stark regulierten Signalweg hin. Dieser spielt zum Beispiel bei der T-Zell-Entwicklung eine wichtige Rolle. 15 Gene des PI3K-Signalwegs haben konservierte Bindungsstellen für miR-17. Wir haben uns zunächst auf zwei dieser Moleküle fokussiert: PI3KR1, regulatorische Untereinheit 1 (p85 alpha) von PI3K, und PTEN, Tumorsuppressor, Phosphatase und Tensin-Homolog, ein Inhibitor von PI3K.

Eine Stimulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen in vitro mittels antiCD3/CD28-Beads hat eine gesteigerte Expression von miR-17 zur Folge. 24 Stunden nach Stimulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte eine verminderte Expression von PI3KR1 und PTEN sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Level gezeigt werden (Abb. 1). Bei gleichzeitig spezifischer Hemmung von miR-17 mittels eines synthetischen Inhibitors wurde die PI3KR1- und PTEN-Expression wieder erhöht. Dieses Ergebnis deutet auf einen direkten Effekt von miR-17 auf die Expression von PI3KR1 und PTEN hin. Unsere daraus resultierende Hypothese ist, dass zytotoxische T-Zellen von MS-Patienten nach Aktivierung eine gesteigerte Proliferation aufweisen und damit resistenter gegen Apoptose sind (Abb. 2). Tatsächlich konnten wir in vitro eine gesteigerte Proliferation in T-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Zellen zeigen.

Zusätzlich haben wir weitere Moleküle des PI3K-Signalwegs untersucht. Bim, ein proapoptisches Mitglied der Bcl-2-Familie (Bcl-2 homology domain), wurde jedoch im Gegensatz zu PI3KR1 und PTEN nach Stimulation vermehrt exprimiert, was auf eine miR-17-unabhängige Regulation hinweist. Tatsächlich ist die Regulation von Bim komplex. Das Protein wird unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren E2F1 und FOXO3A beeinflusst. Interessanterweise war E2F1, ebenso wie Bim, nach Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-Zellen durch antiCD3/CD28-Beads hochreguliert. Eine Inhibition von miR-17 konnte die vermehrte Expression von Bim und E2F1 verhindern, was auf eine Korrelation von miRNA und Ziel-Gen deutet. MS galt lange als T-Zell-induzierte Autoimmunerkrankung. Inzwischen gibt es aber mehr und mehr Beweise, dass auch B-Zellen eine zentrale Rolle in der MS-Pathogenese spielen [4]. Genexpressionsstudien zeigen eine veränderte Genregulation, inklusive miRNA-Expression, in B-Zellen von MS-Patienten. Unsere Expressionsanalyse zeigt ein spezifisches Set von 49 miRNAs, die signifikant verändert sind [5]. Die Expression der 49 miRNAs war im Vergleich mit gesunden Menschen vermindert. Wir konnten Mitglieder von zwei paralogenen miRNA-Clustern identifizieren. Dazu gehört miR-19b, ein Mitglied des miR-17-92-Clusters, sowie miR-25, miR-106b und miR-93 als Mitglieder des miR-106b-25-Clusters. Die beiden Cluster resultieren evolutionsbiologisch aus der Duplizierung eines Gens. Eine funktionelle Kooperation beider Cluster konnte unlängst in einem Mausmodell gezeigt werden. Neben der verminderten Expression spezifischer miRNAs in unbehandelter MS konnten wir darüber hinaus zeigen, dass Natalizumab, eine Standardbehandlung bei Therapieeskalation, die Expression einiger dieser miRNAs normalisiert.

## Schlussfolgerungen und Ausblick

Unsere Forschung liefert neue Aspekte zu der komplexen Genregulation von Immunzellen in MS. Die spezifische Deregulation der verschiedenen miRNAs in den unterschiedlichen Zellen legt ein diffiziles Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Zelltypen nah. Ferner tragen unsere Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Heterogenität von MS bei. Ein essentieller Faktor bei der Behandlung von MS ist die Vorhersage von Krankheitsverlauf und Therapieeffektivität. Eine Zukunftsperspektive ist daher die Evaluierung und Etablierung von miRNAs als potentielle prognostische und pharmakodynamische Biomarker.

### Korrespondenz:

Prof. Raija LP Lindberg  
 Universitätsspital Basel  
 Departement Biomedizin und Neurologie  
 Klinische Neuroimmunologie  
 Hebelstrasse 20  
 CH-4031 Basel  
[Raija.lindberg\[at\]unibas.ch](mailto:Raija.lindberg[at]unibas.ch)

### Literatur

- 1 Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006;52(1):61–76.
- 2 de Faria Jr. O, Moore C, Kennedy T, Antel J, Bar-Or A, Dhaunchak A. MicroRNA Dysregulation in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Genetics*. 2013;3:1–6.
- 3 Lindberg RLP, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. Altered expression of miR-17-5p in CD4<sup>+</sup> lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *European journal of immunology*. 2010;40(3):888–98.
- 4 Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(9):852–8.
- 5 Sievers C, Meira M, Hoffmann F, Fontoura P, Kappos L, Lindberg RLP. Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: Towards a better understanding of treatment effects. *Clinical immunology*. 2012;144(1):70–9.