

## The expression of genes involved in the response of airway epithelial cells to simulated viral infection in patients with idiopathic inflammatory myopathies

### *Ekspresja genów zaangażowanych w odpowiedź komórek nabłonka dróg oddechowych na symulowaną infekcję wirusową u pacjentów z idiopatycznymi miopatiąmi zapalnymi*

Aleksandra Opinc-Rosiak, Joanna Sarnik, Olga Brzezińska, Anna Lewandowska-Polak, Joanna Makowska

Department of Rheumatology, Medical University of Lodz, Poland

Klinika Reumatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

**Key words:** idiopathic inflammatory myopathies, dermatomyositis, airway epithelium, transcription factors

**Słowa kluczowe:** idiopatyczne miopatie zapalne, zapalenie skórno-mięśniowe, nabłonek dróg oddechowych, czynniki transkrypcyjne

**Introduction:** Pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies (IIM) is not fully elucidated. Seasonality of the disease, frequent preceding respiratory infections or exposure to inhaled agents suggest airway epithelium as the crucial milieu for autoimmunity outburst. Poly-IC, a synthetic dsRNA analogue, imitates viral infection as an agonist of RIG-I/MDA5.

**Material and methods:** The study aimed to assess the airway epithelial response in IIM following simulated viral infection. Ten patients with IIM and 9 healthy controls (HC) were recruited. From each of the participants primary nasal epithelial cells were harvested by gentle passage of the middle meatus with cytology brushes, isolated and cultured on collagen-coated plates. Expression of transcription factors (IRF3, IRF7, NFkB, TRAF3, TRAF6) was assessed after 1, 12, 24, 48 hours post incubation of the cells monolayers with Poly-IC. The reference gene *GAPDH* and other genes were performed using TaqMan probes (Life Technologies). Relative gene expression was determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Data was analysed statistically with STATISTICA 13 and GraphPad softwares.

**Results:** The highest increase upon stimulation with RIG-I/MDA5 agonist was observed for IRF7, with statistically higher expression at 1 hour in IIM group as compared to HC ( $p = 0.049$ , Fig. 1). Patients with IIM presented also higher TRAF6 expression at 1 hour and 24 hours after stimulation (respectively  $p = 0.020$  and  $p = 0.027$ , Fig. 1).

Several associations with serological profiles are noticeable, yet not reached statistical significance (Table I).

**Conclusions:** This is the first study to assess the airway epithelial response in IIM upon stimulation of RIG-I/MDA5. Further studies are required to evaluate the possible discrepancies between IIM subtypes.

*The study was approved by the Bioethics Committee of Medical University of Lodz (No. of approval: RNN/329/20/KE).*

*Funding: National Science Centre Poland, grant number 2020/37/N/NZ6/01442.*

**Wprowadzenie:** Patogeneza idiopatycznych zapalnych miopatii (IIM) nie jest w pełni wyjaśniona. Sezonowość choroby, częste poprzedzające infekcje dróg oddechowych i narażenia na substancje wziewne wskazują, że nabłonek dróg oddechowych może być kluczowym środowiskiem dla inicjacji autoimmunizacji. Poly-IC, syntetyczny analog dwuniciowego RNA, imituje infekcję wirusową jako agonista RIG-I/MDA5.

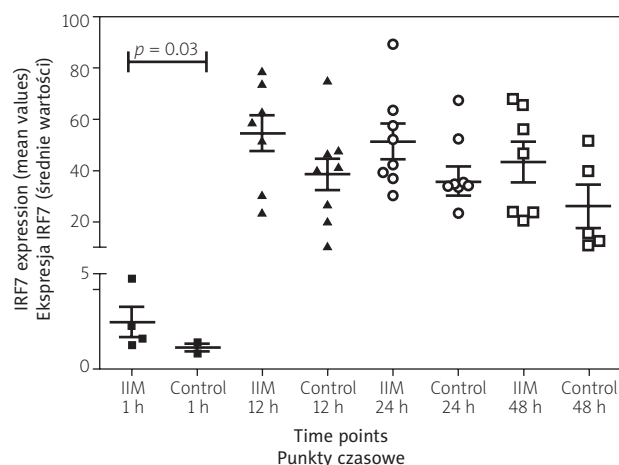
**Materiał i metody:** Celem badania była ocena odpowiedzi nabłonka dróg oddechowych w IIM po symulowanej infekcji wirusowej. Zrekrutowano 10 pacjentów z IIM oraz 9 zdrowych osób (HC). Od każdego z uczestników pobrano pierwotne komórki nabłonkowe nosa z okolicy małżowiny środkowej za pomocą szczotek cytologicznych, a następnie komórki izolowano i hodowano na płytkach pokrytych kolagenem. Ekspresję czynników transkrypcyjnych (IRF3, IRF7, NFkB, TRAF3, TRAF6) oceniano po 1, 12, 24, 48 godzinach inkubacji monowarstw komórkowych z Poly-IC. Gen referencyjny *GAPDH* oraz inne geny analizowano za pomocą sond TaqMan (Life Technologies). Względną ekspresję genów określono metodą  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Dane zostały poddane analizie statystycznej w programie STATISTICA 13 i GraphPad.

**Wyniki:** Największy wzrost po stymulacji agonistą RIG-I/MDA5 zaobserwowano dla IRF7, z istotnie wyższą ekspresją po 1 godzinie obserwowaną w grupie IIM w porównaniu z HC ( $p = 0,049$ ; ryc. 1). Pacjenci z IIM wykazywali ponadto wyższą ekspresję TRAF6 w 1. godzinie i 24 godziny po stymulacji (odpowiednio  $p = 0,020$  i  $p = 0,027$ ; ryc. 1). Zwraca uwagę wyższa ekspresja poszczególnych czynników transkrypcyjnych u pacjentów ze specyficznymi podtypami serologicznymi, jednak zależności te nie osiągnęły istotności statystycznej (tab. I).

**Wnioski:** Jest to pierwsze badanie oceniające odpowiedź nabłonka dróg oddechowych w IIM po stymulacji RIG-I/MDA5. Konieczne są dalsze badania oceniające możliwe różnice w odpowiedzi u pacjentów różniących się profilem serologicznym.

*Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi na badanie (nr zgody: RNN/329/20/KE).*

*Finansowanie: Narodowe Centrum Nauki, numer grantu 2020/37/N/NZ6/01442.*



**Fig. 1.** Comparison of relative IRF7 expression in IIM patients and healthy controls.

**Ryc. 1.** Porównanie względnej ekspresji IRF7 u pacjentów z IIM i zdrowych osób z grupy kontrolnej.

**Table I.** Relative gene expression of selected transcription factors after stimulation with Poly-IC

Transcription factor	Time points	IIM (mean values $\pm$ SD)	HC (mean values $\pm$ SD)	
IRF3	1 h	1.33 $\pm$ 0.99	0.85 $\pm$ 0.23	0.491
	12 h	1.72 $\pm$ 0.74	1.49 $\pm$ 0.40	0.540
	24 h	1.93 $\pm$ 0.68	1.56 $\pm$ 0.48	0.307
	48 h	1.17 $\pm$ 21.66	1.05 $\pm$ 16.50	0.789
IRF7	1 h	1.89 $\pm$ 1.53	0.80 $\pm$ 0.41	0.034
	12 h	49.36 $\pm$ 21.59	38.38 $\pm$ 17.44	0.178
	24 h	47.76 $\pm$ 20.80	35.72 $\pm$ 15.64	0.153
	48 h	36.08 $\pm$ 21.66	26.09 $\pm$ 16.50	0.286
NFKB	1 h	1.79 $\pm$ 1.74	0.94 $\pm$ 0.27	0.910
	12 h	3.14 $\pm$ 2.16	2.65 $\pm$ 0.81	0.903
	24 h	2.97 $\pm$ 1.66	2.80 $\pm$ 0.92	0.967
	48 h	1.89 $\pm$ 1.10	3.00 $\pm$ 2.47	0.790
TRAF3	1 h	1.85 $\pm$ 1.78	0.88 $\pm$ 0.20	0.734
	12 h	1.39 $\pm$ 0.88	1.46 $\pm$ 0.68	0.775
	24 h	2.28 $\pm$ 1.31	2.01 $\pm$ 0.7	0.967
	48 h	1.17 $\pm$ 0.60	1.05 $\pm$ 0.36	1.00
TRAF6	1 h	1.59 $\pm$ 0.94	3.97 $\pm$ 3.36	0.571
	12 h	3.24 $\pm$ 2.22	1.92 $\pm$ 0.62	0.391
	24 h	5.37 $\pm$ 3.13	2.60 $\pm$ 0.68	0.055
	48 h	5.44 $\pm$ 3.80	1.98 $\pm$ 0.82	0.230

HC – healthy controls, IIM – idiopathic inflammatory myopathies.

**Tabela I.** Względna ekspresja genów wybranych czynników transkrypcyjnych po stymulacji Poly-IC

Czynnik transkrypcyjny	Punkty czasowe	IIM (średnia $\pm$ SD)	HC (średnia $\pm$ SD)	p
IRF3	1 h	1,33 $\pm$ 0,99	0,85 $\pm$ 0,23	0,491
	12 h	1,72 $\pm$ 0,74	1,49 $\pm$ 0,40	0,540
	24 h	1,93 $\pm$ 0,68	1,56 $\pm$ 0,48	0,307
	48 h	1,17 $\pm$ 21,66	1,05 $\pm$ 16,50	0,789
IRF7	1 h	1,89 $\pm$ 1,53	0,80 $\pm$ 0,41	0,034
	12 h	49,36 $\pm$ 21,59	38,38 $\pm$ 17,44	0,178
	24 h	47,76 $\pm$ 20,80	35,72 $\pm$ 15,64	0,153
	48 h	36,08 $\pm$ 21,66	26,09 $\pm$ 16,50	0,286
NFKB	1 h	1,79 $\pm$ 1,74	0,94 $\pm$ 0,27	0,910
	12 h	3,14 $\pm$ 2,16	2,65 $\pm$ 0,81	0,903
	24 h	2,97 $\pm$ 1,66	2,80 $\pm$ 0,92	0,967
	48 h	1,89 $\pm$ 1,10	3,00 $\pm$ 2,47	0,790
TRAF3	1 h	1,85 $\pm$ 1,78	0,88 $\pm$ 0,20	0,734
	12 h	1,39 $\pm$ 0,88	1,46 $\pm$ 0,68	0,775
	24 h	2,28 $\pm$ 1,31	2,01 $\pm$ 0,7	0,967
	48 h	1,17 $\pm$ 0,60	1,05 $\pm$ 0,36	1,00
TRAF6	1 h	1,59 $\pm$ 0,94	3,97 $\pm$ 3,36	0,571
	12 h	3,24 $\pm$ 2,22	1,92 $\pm$ 0,62	0,391
	24 h	5,37 $\pm$ 3,13	2,60 $\pm$ 0,68	0,055
	48 h	5,44 $\pm$ 3,80	1,98 $\pm$ 0,82	0,230

IIM – idiopatyczne zapalne miopatie, HC – grupa kontrolna.

**Table II.** Noticeable associations with serological profiles

Transcription factor
The highest expression in:
IRF3
DM with anti-MDA-5, DM with anti-TIF1 $\gamma$
IRF7
DM with anti-MDA-5, DM with anti-TIF1 $\gamma$
NFKB
DM with anti-MDA-5, IMNM with anti-HMGCR
TRAF3
DM with anti-MDA-5,
TRAF6
ASS with anti-Jo1

DM – dermatomyositis, IMNM – immune-mediated necrotizing myopathy, ASS – antisynthetase syndrome.

**Tabela II.** Zauważalne powiązania z profilami serologicznymi

Czynnik transkrypcyjny
Najwyższa ekspresja w:
IRF3
DM z anty-MDA-5, DM z anty-TIF1 $\gamma$
IRF7
DM z anty-MDA-5, DM z anty-TIF1 $\gamma$
NFKB
DM z anty-MDA-5, IMNM z anty-HMGCR
TRAF3
DM z anty-MDA-5
TRAF6
ASS z anty-Jo1

DM – zapalenie skórno-mięśniowe, IMNM – martwicza miopatia o podłożu immunologicznym, ASS – zespół antysyntetazy.