

## Streszczenie

Choroby zapalne jelit (IBD, ang. *inflammatory bowel disease*) zaliczane są do najczęściej diagnozowanych chorób układu pokarmowego o przebiegu nawracającym. Pomimo ciągłego postępu w diagnostyce i leczeniu dwóch głównych podtypów chorób zapalnych jelit, tj. choroby Leśniowskiego-Crohna (CD, ang. *Crohn's disease*) i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (UC, ang. *ulcerative colitis*), obserwuje się nie tylko nieustanny wzrost zachorowań na te jednostki chorobowe, ale i brak postępu w kontekście utrzymania długotrwałej remisji choroby. Przewlekły stan zapalny rozwijający się w jelicie prowadzi do zaburzeń perystaltyki i uszkodzeń błony śluzowej jelit, jak również może przyczyniać się do wzrostu ryzyka transformacji nowotworowej jelita grubego. Wyniki wielu badań wskazują na immunomodulacyjną rolę estrogenów w patofizjologii licznych chorób, w tym IBD. Niemniej brak jest jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy za zaburzenia sygnalizacji estrogenowej w chorobach zapalnych jelit odpowiedzialne są estrogeny, których poziom może być zróżnicowany w zależności od płci i wieku pacjentów, czy też ekspresja receptorów estrogenów odpowiedzialnych za efekt genomowy i niegenomowy działania estrogenów.

Celem przeprowadzonych badań była: **A.** ocena udziału sygnalizacji estrogenowej w chorobach zapalnych jelit w zależności od płci i wieku kobiet, **B.** identyfikacja mechanizmów molekularnych indukowanych za pośrednictwem receptorów estrogenów w chorobie Leśniowskiego-Crohna, **C.** ocena potencjalnych oddziaływań pomiędzy receptorami estrogenów w chorobie Leśniowskiego-Crohna.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem materiału klinicznego (surowica i biopaty jelit) pochodzącego od mężczyzn oraz kobiet przed i po 50 roku życia z chorobami zapalnymi jelit oraz mysiego modelu choroby Leśniowskiego-Crohna indukowanej jednorazowym podaniem kwasu 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfonowego.

Ogólnoustrojowa charakterystyka pacjentów z IBD ujawniła brak zmian w poziomie 17 $\beta$ -estradiolu i wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm estrogenów. W poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie o udział sygnalizacji estrogenowej w patofizjologii chorób zapalnych jelit przeprowadzono analizę ekspresji receptorów estrogenów: receptora estrogenów oddziałującego z białkami G (GPER, ang. *G protein-coupled estrogen receptor*), jądrowych receptorów estrogenów (ER, ang. *estrogen receptor*), tj. ER $\alpha$  i ER $\beta$ , a także produktów alternatywnego składania genu kodującego ER $\alpha$ , tj. ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 46. W jelicie grubym pacjentów zarówno z CD, jak i z UC ujawniono deregulację

ekspresji receptorów estrogenów, tj. GPER, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 46 w porównaniu do osób bez zdiagnozowanych chorób jelit. Uzyskane wyniki sugerują, że profil ekspresji receptorów estrogenów jest determinowany płcią oraz wiekiem pacjentów z chorobami zapalnymi jelit.

Badania na zwierzęcym modelu choroby Leśniowskiego-Crohna wykazały, że w obecności ligandów receptorów estrogenów, tj. związku G-1 będącego selektywnym agonistą GPER oraz związku ICI 182,780 (Fulvestrant<sup>®</sup>) będącego agonistą GPER, a antagonistą jądrowych receptorów estrogenów, ma miejsce poprawa wskaźnika przeżycia myszy z indukowaną CD. Aktywacja GPER manifestowała się znacznym spadkiem obszaru zapalenia, jak również poprawą parametrów makroskopowych i mikroskopowych jelita grubego myszy z indukowaną CD. Immunomodulującą rolę GPER potwierdziły analizy aktywności mieloperoksydazy i poziomu białka C-reaktywnego, których spadek obserwowano u myszy z indukowaną CD po podaniu agonistów receptora. U samców myszy z indukowaną CD, podobnie jak w biopsjach jelit mężczyzn z CD, ujawniono nadekspresję GPER na poziomie mRNA i białka. Podanie agonistów GPER myszom z CD prowadziło do spadku ekspresji GPER, ujawniając znaczenie tego receptora w CD. Co ciekawe aktywacja/inhibicja GPER okazała się nie pozostawać bez znaczenia dla sygnalizacji estrogenowej indukowanej za pośrednictwem pozostałych receptorów estrogenów, wpływając na poziom ekspresji i lokalizację jądrowych receptorów estrogenów, jak również receptorów pokrewnych do receptorów estrogenów. Wykazano, że na poziomie molekularnym modulacja aktywności GPER wpływa na szlak sygnałowy kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym oraz na transkrypcję wielu genów, takich jak *Ccnd1*, *Kras*, *Stat3*, *Rela*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Vegfa* i *Trpv4*, które zaangażowane są między innymi w odpowiedź immunologiczną.

Przeprowadzone analizy ujawniły, że w chorobach zapalnych jelit dochodzi do deregulacji sygnalizacji estrogenowej w wyniku zaburzeń ekspresji receptorów estrogenów w jelicie grubym w sposób zależny od płci i wieku kobiet, co może mieć udział w modulacji stanu zapalnego i homeostazy nabłonka jelit. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że sygnalizacja estrogenowa za pośrednictwem GPER wpływa na obraz kliniczny CD indukując liczne zdarzenia w komórkach nabłonka jelita grubego na poziomie molekularnym. Przedstawione wyniki badań sugerują, że GPER może być atrakcyjnym celem terapeutycznym w chorobie Leśniowskiego-Crohna.

*Macenzie Demien*

## Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are among the most frequently diagnosed diseases of the digestive system with relapsing course. Despite continuous progression in the diagnosis and treatment of two major subtypes of inflammatory bowel diseases, i.e. Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), sustained increase in the incidence of these diseases but also the lack of progress in the context of maintaining long-term remission of the disease is observed. Chronic inflammation that develops in the intestine leads to peristalsis disorder and intestinal mucosa damage as well as may increase the risk of colon neoplastic transformation. The results of many studies indicate the immunomodulatory role of estrogens in pathophysiology of numerous diseases, including IBD. However, there is no unambiguous answer to the question whether estrogens, which level may vary depending on sex and age of patients or the expression of estrogen receptors, which are responsible for genomic and non-genomic effects of estrogens are responsible for estrogen signaling disturbances in inflammatory bowel disease.

The aim of the study was: **A.** assessment of estrogen signaling in inflammatory bowel diseases depending on the sex and age of women, **B.** identification of molecular mechanisms induced by estrogen receptors in Crohn's disease, **C.** evaluation of potential interactions between estrogen receptors in Crohn's disease.

The research was carried out with the use of clinical material (serum and intestinal biopsy) from men and women before and after the age of 50 with inflammatory bowel diseases and murine model of Crohn's disease induced by a single administration of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid.

The systemic characterization of patients with IBD revealed no changes in the  $17\beta$ -estradiol level and selected enzymes involved in estrogen metabolism. Seeking answers to the question of the involvement of estrogen signaling in the pathophysiology of inflammatory bowel diseases, analysis of estrogen receptor expression: G protein-coupled estrogen receptor (GPER), nuclear estrogen receptors (ER), i.e.  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  as well as products of alternative splicing of the gene encoding  $ER\alpha$ , i.e.  $ER\alpha36$  and  $ER\alpha46$  was performed. In the colon, both CD and UC patients deregulation of estrogen receptors, i.e. GPER,  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ,  $ER\alpha36$  and  $ER\alpha46$  in relation to people without diagnosed bowel diseases was disclosed. The obtained results suggest that the expression profile of estrogen receptors is determined by the sex and age of patients with inflammatory bowel diseases.

Studies on animal model of Crohn's disease have shown that in the presence of estrogen receptor ligands, i.e. G-1, which is a selective GPER agonist and ICI 182,780 (Fulvestrant<sup>®</sup>),

which is GPER agonist and nuclear estrogen receptor antagonist, there is an increase of the survival rate of mice with induced CD. GPER activation was manifested by a significant decrease of the inflammation area and an improvement of macroscopic and microscopic parameters of mouse colon with induced CD. The immunomodulatory role of GPER was confirmed by myeloperoxidase activity and C-reactive protein level analyses, which were observed to decrease in mice with induced CD after receptor agonists administration. In male mice with induced CD, similar to that of men patients with CD, GPER was overexpressed at the mRNA and protein levels. Administration of GPER agonists to mice with CD led to a decrease of GPER expression, revealing significance of this receptor in CD. Interestingly, GPER activation/inhibition proved to be not without significance for estrogen signaling induced by other estrogen receptors, affecting expression level and localization of nuclear estrogen receptors as well as estrogen receptor-related receptors. It has been shown that, at the molecular level, modulation of GPER activity affects the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway and transcription of numerous genes, i.e. *Ccnd1*, *Kras*, *Stat3*, *Rela*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Vegfa* and *Trpv4*, which are involved among others in the immune response.

The analyses carried out revealed that in inflammatory bowel diseases there is deregulation of estrogen signaling due to disturbed expression of estrogen receptors in colon in a manner depending on the sex and age of women, which may contribute to the modulation of inflammation and intestinal homeostasis. In this study, it was demonstrated for the first time that GPER-mediated estrogen signaling affects clinical picture of CD by inducing numerous events in colon epithelial cells at the molecular level. The presented research results suggest that GPER may be an attractive therapeutic target in Crohn's disease.

Jeremik Dornien