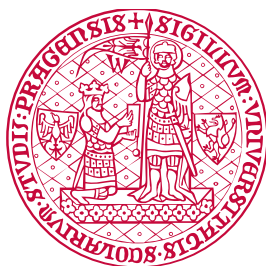


**Universita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Klinika revmatologie**

Revmatologický ústav, Praha

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny
Studijní obor: Imunologie



MUDr. Olga Kryštůfková

**BAFF (B-cell Activating Factor of the TNF Family)
u nemocných s idiopatickými zánětlivými myopatiemi
se zřetelem na autoprotilátkový profil**

BAFF (B-cell Activating Factor of the TNF Family)
in patients with idiopathic inflammatory myopathies
with respect to autoantibody profile

Doktorská disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jiří Vencovský, DrSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23. 4. 2018

Olga Kryštůfková

.....

Identifikační záznam:

KRYŠTŮFKOVÁ, Olga. BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) u nemocných s idiopatickými zánětlivými myopatiemi se zřetelem na autoprotilátkový profil. [*BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) in patients with idiopathic inflammatory myopathies with respect to autoantibody profile*]. Praha, 2018. 59 s., 8 příloh Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika revmatologie / Revmatologický ústav. Školitel Vencovský, Jiří

Souhrn

Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM) jsou heterogenní skupinou chronických zánětlivých onemocnění svalů s vážnou prognózou. Přítomnost autoprotilátek a složení svalových infiltrátů svědčí o jejich autoimunitní povaze a o roli B lymfocytů v patogeneze IZM. Kromě tradičních diagnostických podjednotek byly identifikovány autoprotilátkově-fenotypové podskupiny s podobným patogenetickým mechanismem. Nejznámější z nich je antisyntetázový syndrom, charakterizovaný myozitidou, protilátkami proti tRNA syntetázám (z nichž nejčastější jsou anti-Jo-1), intersticiálním plicním onemocněním a dalšími extramuskulárními projevy.

BAFF (B cell-Activating Factor of the TNF Family), je klíčovým faktorem v modulaci B buněčné homeostázy. Ve vysokých hladinách umožňuje přežití autoreaktivních klonů a účastní se tak v patogeneze autoimunitních onemocnění. Jeho exprese je indukována interferony I. typu (IFN-1).

Cílem doktorské práce bylo studium cytokinu BAFF v patogeneze IZM analýzou sérových hladin BAFF, jeho receptorů ve svalech ve vztahu k IFN-1 a exprese mRNA transkripčních variant *BAFF genu* v periferní krvi. Dalším aspektem byla možná synergie BAFF a visfatinu (PBEF; pre-B cell colony-enhancing factor), který stimuluje časná stadia diferenciaci B lymfocytů. Studovali jsme asociace těchto aspektů s autoprotilátkami, klinickým fenotypem a aktivitou IZM, časovou variabilitu a vliv terapie.

Teoretická část obsahuje přehled aktuálních poznatků o těchto aspektech a výsledky jsou předloženy ve formě sedmi originálních publikací a jedné přehledné práce.

Hlavními poznatky jsou: 1. Zvýšené sérové hladiny BAFF jsou vázány na fenotypy s anti-Jo-1 protilátkami a s plicním postižením u nemocných s polymyozitidou a bez ohledu na přítomnost autoprotilátek u pacientů s dermatomyozitidou. 2. Časová variabilita byla spojena především s tíží svalového postižení, klinickou aktivitou a hladinami autoprotilátek a byla ovlivněna terapií glukokortikoidy. 3. Exprese receptorů na buňkách B linie byla asociována se známkami přítomnosti IFN-1 a jeho buněčným zdrojem ve svalu a byla vázána na pozitivitu anti-Jo-1 a/nebo anti-Ro52/60 autoprotilátek v séru. Tyto nálezy činí BAFF novým terapeutickým cílem u nemocných s výše uvedeným fenotypem IZM, ukazují na možnost místní produkce autoprotilátek ve svalové tkáni pod lokálním vlivem IFN-1 a BAFF a navíc podporují roli autoprotilátek v indukcii IFN-1.

4. Dvě alternativní varianty *BAFF genu* byly u nemocných exprimovány v podobném poměru jako u zdravých kontrol, takže zvýšení hladin BAFF proteinu zřejmě nelze přičítat snížení exprese inhibiční varianty Δ BAFF.

5. Podobně jako BAFF, visfatin byl v sérech nemocných zvýšen ve vazbě na klinickou aktivitu a byl exprimován ve svalech pacientů s IZM. Avšak jeho asociace se svalovým postižením a hladinami autoprotilátek byla slabší. BAFF i visfatin jsou senzitivní k terapii B deplecí avšak jejich regulace byla odlišná i když v obou případech vázaná na počty B lymfocytů avšak v opačné korelaci. Visfatin může mít i praktický význam jako biomarker účinnosti B depleční terapie.

Klíčová slova: anti-Jo-1, BAFF, BAFF-receptor, BCMA, BlyS, Dermatomyozitida, Idiopatické zánětlivé myopatie, Interferon α , Intersticiální plicní nemoc, Polymyozitida, TACI, Visfatin

Abstract

The idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) are a heterogeneous group of chronic muscle diseases with frequent extramuscular organ involvement that contributes to serious prognosis. The presence of autoantibodies and composition of muscle infiltrates both support autoimmune nature of the disease and pathogenic role of B lymphocytes. Besides the traditional diagnostic subgroups, autoantibody characterised phenotype subsets have been identified with presumed similar pathogenic mechanisms. The best known is the antisynthetase syndrome which is characterised by presence of myositis, antisynthetase autoantibodies (with anti-Jo-1 being the most frequent), interstitial lung disease and other extramuscular manifestations.

BAFF (B cell-Activating Factor of the TNF Family) is a key factor in B cell homeostasis modulation. In high levels, it allows survival of autoreactive B cell clones and thus participates in the pathogenesis of autoimmune diseases. Its expression is induced by type I interferons (IFN-1).

The aim of the PhD thesis was to explore the role of BAFF in pathogenesis of IIMs by analysis of its serum levels, the receptors for BAFF in muscle tissue, their associations to IFN-1 and expression of *BAFF gene* mRNA transcription variants in peripheral blood cells. Further aspect was to study a possible synergy of BAFF and visfatin (PBEF; pre-B cell colony-enhancing factor), a cytokine that stimulates the early stages of B cell differentiation. Here we analysed the associations with autoantibodies, clinical phenotypes and disease activity, time related variability and the impact of treatment.

The theoretical part of thesis summarises the current knowledge on these aspects and the results are presented in seven original publications and one review article.

Main findings are: 1. Elevated serum BAFF levels were associated with anti Jo-1 autoantibodies and lung involvement in patients with polymyositis and in dermatomyositis patients irrespective of autoantibodies. 2. Time variability of BAFF levels was associated particularly with the severity of muscle impairment, clinical disease activity and levels of autoantibodies and was affected by treatment with glucocorticoids. 3. The expression of BAFF receptors on B and plasma cells in muscle tissue was associated with markers of IFN-1 and its cell producers and was related to presence of anti-Jo-1 and/or anti-Ro52/60 antibodies in serum. These findings indicate a possible autoantibody production in muscle tissue under a local influence of IFN-1 and BAFF and imply that BAFF blocking therapy can be an attractive novel treatment in these subsets of IIMs. They also further support a role of autoantibodies in the IFN-1 induction.

4. The two alternative variants of *BAFF gene* were expressed in patients and healthy controls in the similar ratio. BAFF protein elevation could not thus be attributed to downregulation of the inhibitory Δ BAFF variant.

5. Similarly to BAFF, visfatin was elevated in myositis sera in relation to clinical activity and was expressed in muscle tissue of patients with IIMs, but its association with muscle impairment and autoantibody levels was weaker. 6. BAFF and visfatin are differentially regulated after therapy with rituximab and change in visfatin serum levels after B cell depletion may have a practical value as an efficiency biomarker of this treatment.

Key words: anti-Jo-1, BAFF, BAFF-receptor, BCMA, BLYS, Dermatomyositis, Idiopathic Inflammatory Myopathy, Interferon α , Interstitial Lung Disease, Polymyositis, TACI, Visfatin

Obsah

1. Předmluva	2
2. Úvod	3
2.1. Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM)	3
2.1.1. Definice, klinický obraz, diagnóza a fenotypy IZM	3
2.1.2. Histologie IZM	6
2.1.3. Autoprotilátky u IZM	8
2.1.4. Antisyntetázové protilátky	8
2.1.5. Anti-Jo-1 protilátky v patogeneze IZM	9
2.1.6. Terapie IZM	11
2.2. BAFF	12
2.2.1. Charakteristika BAFF	12
2.2.2. Produkce BAFF	12
2.2.3. Receptory pro BAFF a APRIL	13
2.2.4. Funkce BAFF, APRIL a jejich receptorů	14
2.2.5. BAFF u nemocných s revmatickými chorobami	15
2.2.6. Polymorfismy <i>BAFF</i> genu	15
2.2.7. Alternativní varianty BAFF	15
2.2.8. BAFF a interferony I. typu	16
2.2.9. BAFF jako cílová molekula v terapii	17
2.3. Visfatin / PBEF	17
3. Cíle doktorské práce	19
4. Materiál a metody	22
4.1. Nemocní	22
4.2. Diagnóza a fenotyp IZM	24
4.3. Hodnocení aktivity IZM	26
4.3.1. Laboratorní aktivita	26
4.3.2. Klinická aktivita	26
4.3.3. Aktivita podle MRI	26
4.4. Hodnocení aktivity RA	26
4.5. Serologické testy	26
4.5.1. Detekce autoprotilátek	26
4.5.2. ELISA testy	26
4.5.3. IFN alfa	27
4.6. Vyšetření svalových biopsií	27
4.6.1. Svalová biopsie	27
4.6.2. Imunohistochemie	27
4.6.3. Imunofluorescence a konfokální mikroskopie	28
4.7. Transkripční varianty BAFF	28
4.8. Imunofenotypizace	29
4.9. Statistika	29
5. Výsledky a diskuse	30
5.1. Studie 1 - BAFF, autoprotilátkový a fenotypový profil a léčba IZM	30
5.2. Studie 2 - BAFF, anti-Jo-1 a aktivita myozitidy v čase	32
5.3. Studie 3 - Receptory pro BAFF ve svalu	34
5.4. Studie 4 - IFNα, anti-Jo1, terapie a svalové postižení	36
5.5. Studie 5 - Transkripční varianty BAFF	37
5.6. Studie 6 - BAFF, PBEF/visfatinu a aktivita anti-Jo-1⁺ myozitidy	38
5.7. Studie 7 - Vliv deplece B buněk na vztah BAFF a PBEF/visfatinu	40
6. Závěry	42
7. Použitá literatura	44
8. Seznam zkratk	55
9. Seznam publikací	57
10. Přílohy	60

1. Předmluva

Osobním důvodem mého PhD studia byl zájem projít stejnou vědeckou přípravou jako naši PhD studenti, s cílem vylepšit kvalitu mého podílu na vědeckých projektech pracoviště. Další motivací byla touha lépe poznat imunologické mechanismy chorob, se kterými jsem se setkala v klinické praxi a lépe pochopit aktuální výzkum prezentovaný na vědeckých fórech v oborech imunologie a revmatologie. Oba cíle jsem mohla uskutečnit díky pochopení ředitele Revmatologického ústavu v Praze, Prof. MUDr. Karla Pavelky, DrSc. a umožnění studia a zahraničního studijního pobytu.

Především však vděčím mému školiteli Prof. MUDr. Jiřímu Vencovskému, DrSc. za zapojení do vědecké činnosti Revmatologického ústavu v Praze, za neocenitelné konzultace, podporu a vedení studia a za uvedení do prostředí mezinárodního revmatologického výzkumu a vědecké myozitické komunity.

Díky podpoře Prof. Vencovského jsem dostala možnost opakovaného pobytu v laboratoři Centre of Molecular Medicine, CMM, Rheumatology Unit, Karolinska University Hospital, Solna, Stockholm a ve skupině myozitid Revmatologické kliniky pod vedením Prof. Ingrid Lundberg MD, PhD. Tam také bylo navrženo společné téma této doktorské práce a zahájila jsem první experimenty projektu. Prof. Lundberg byla po celou dobu projektu nejen odborným garantem části zpracované ve spolupráci, ale vnímám ji také jako mentora a osobní vzor. Poděkování patří i kolegům z CMM za podporu nejenom při práci v laboratoři ale i lidskou. Listed by alfabet, not by importance: Andreas, Dagmar, Eva J. and Eva L., Vivi, Heidi, Ingela, Ingrid, Johan, Leonid, Marina, Maryam, Mei, Mona, Omri, Paulius, Sevim, Sukanya, Tina, Therese and many other uncountable – thank you a lot for all support, you will be always in my mind and heart.

V projektu jsem pokračovala dále s kolegy z myozitické skupiny na Revmatologickém ústavu v Praze a také spolupráci s oddělením experimentální revmatologie vedené Prof. MUDr. Ladislavem Šenolttem, PhD. Děkuji za spolupráci především Ing. Hance Hulejové, MUDr. Lence Pleštilové, PhD, MUDr. Heřmanovi Mannovi, Ondřejovi Pechovi, PhD a všem další spoluautorům a kolegům klinikům.

Můj velký dík patří též Prof. MUDr. Tereze Fučíkové, DrSc, mé první školitelce v oboru klinické imunologie a všem kolegyním a kolegům z oboru imunologie včetně Imunologických ústavů I.LFUK a MBÚ AVČR, které ani nelze vyjmenovat a díky kterým jsem získala odvalu pokračovat v sebevzdělávání po celý život.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým dětem, sestrám a přátelům za neocenitelnou podporu v průběhu studia.

Své první PGS jsem zahájila v roce 2003 na jiné téma a z osobních důvodů přerušila a opět zahájila nové studium v roce 2011. Protože část povinností byla splněna a uznána v rámci prvního studia a také z důvodu kontinuity prezentovaných výsledků jsem do dizertace zahrнула i první práci publikovanou před zahájením druhého studia.

Tato práce vznikla za hlavní podpory grantů EU FP6, AutoCure LSHB CT-2006-018661, Institucionální podpory MZČR 0021620812 a grantu NT/12438-4 IGA MZČR.

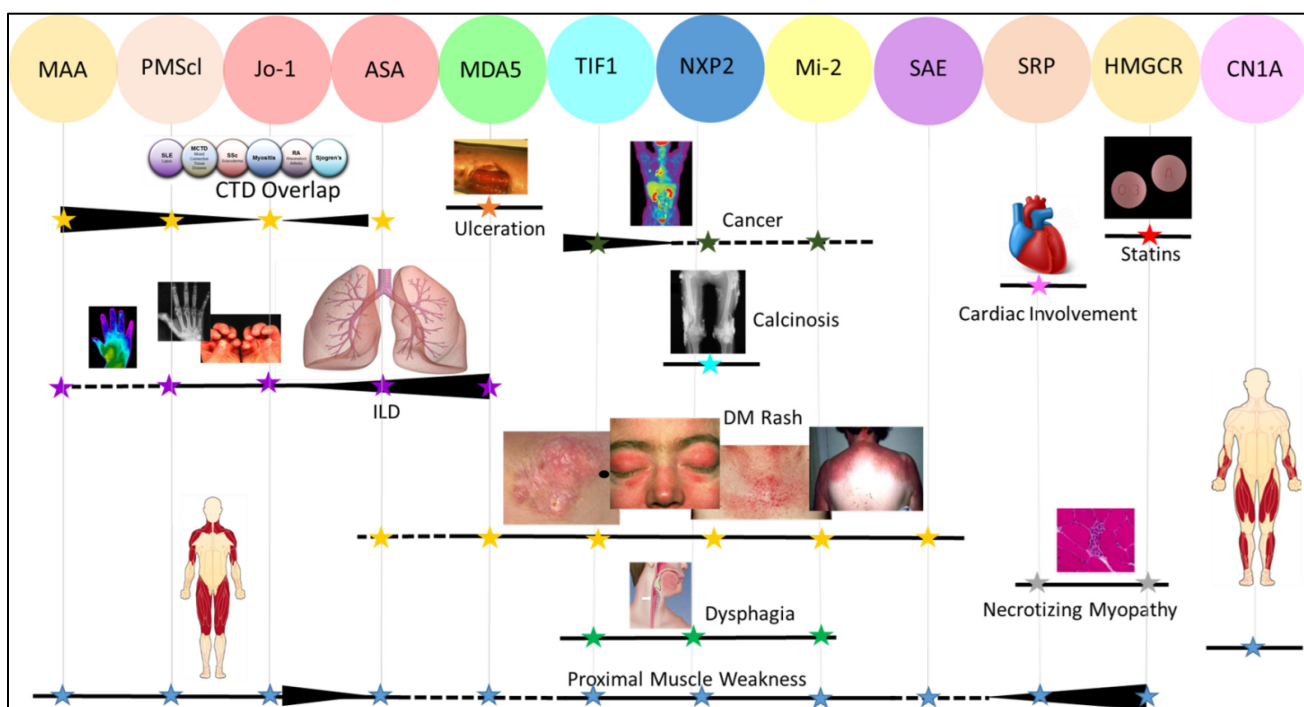
2. Úvod

2.1. Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM)

2.1.1. Definice, klinický obraz, diagnóza a fenotypy IZM

Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM), souhrnně nazývané myozitidy, jsou heterogenní skupinou zánětlivých onemocnění svalstva charakterizovaných svalovou slabostí a přítomností zánětlivých infiltrátů v postižené svalové tkáni [1]. Jedná se o vzácné onemocnění s odhady prevalence 0,55 až 17,50 na 100 000 [2]. Roční incidence PM a DM je kolem 7 na 10⁶ obyvatel. Odhad pětiletého přežití je podle různých zdrojů 65 – 95% [3]. Přítomnost autoantilátok u 60-80% nemocných s myozitidou [4, 5] a složení svalových infiltrátů (viz 2.1.2.) svědčí o tom, že myozitida je autoimunitní onemocnění.

Na podkladě klinických a histopatologických nálezů byly IZM tradičně klasifikovány na polymyozitidu (PM), dermatomyozitidu (DM) a myozitidu s inklusními tělísky (IBM) [6], avšak nově jsou definovány další fenotypové skupiny IZM. Přibývají důkazy pro to, že mnoho těchto fenotypů se pojí s určitými autoantilátkami [7], mají různě vyjádřenou svalovou slabost a mimosvalové projevy (obr. 2.1.), společné rysy histologického nálezu a liší se též v prognóze a odpovědi na léčbu [8, 9].



Obrázek 2.1.: Schematický přehled asociací autoantilátok (v záhlaví) a klinických projevů IZM. Použito se souhlasem autorky Zoe E Betteridge, PhD; MyoNet Meeting - Praha 2018. Zkratky cílových antigenů autoantilátok viz tabulka 1.

Hlavním klinickým projevem IZM je symetrická svalová slabost především pletencového svalstva končetin u PM a DM, nebo spíše asymetrické postižení distálních svalů u IBM [10]. Postižení svalstva horní části jícnu, vede k poruše polykání, která může způsobit i aspirační pneumonii. Slabost dýchacích svalů může vyústit ve ventilační nedostatečnost.

Pro dermatomyozitidu jsou charakteristické erytematosní kožní projevy na extenzorových plochách drobných kloubů rukou (tzv. Gottronovy papuly), na očních víčcích (heliotropní raš), na hrudníku v oblasti výstřihu (erytém ve tvaru V), na zádech a ramenou (šálový příznak). Změny charakteru hyperkeratotických lézí a prasklinek kůže na palmárních a mediálních ploškách prstů, označované jako ruce mechanika, se objevují v rámci antisyntetázového syndromu (viz kapitola 2.1.4.) také u nemocných s polymyozitidou [11]. Ruce mechanika mohou být, spolu s ulceracemi, panikulitidou, alopecií a nekrózami, přítomny u pacientů s DM kteří mají anti-MDA5 autoprotilátky (přehled autoprotilátek viz kapitola 2.1.3 a tabulka 2.1.) [12].

U části případů DM není slabost vyjádřena vůbec nebo jen subklinicky či se objeví až v průběhu sledování a dominují mimosvalové projevy. To definuje tzv. amyopatickou dermatomyozitidu [13]. Diagnóza je pak podpořena přítomností kožního projevu, průkazem orgánového postižení (nejčastěji plicního) a pozitivitou určitých autoprotilátek (anti-MDA5, anti-TIF-1 γ u mladých dospělých pacientů, anti-SAE či některé antisyntetázové protilátky – viz níže) [14, 15].

Především u nemocných s dermatomyozitidou je zvýšené riziko výskytu malignit. Za paraneoplastickou IZM, se obvykle považuje onemocnění vzniklé v období 3 roky před nebo po diagnóze malignity, s nejvyšším rizikem nádoru v období jednoho roku od začátku příznaků myozitidy. Přítomnost nádoru definuje další skupinu, pro kterou jsou charakteristické protilátky proti TIF-1 γ [16] a často se pojí s anti-NXP-2 u starších dospělých pacientů [17]. Protilátka anti-NXP-2 je často provázena výskytem podkožních kalcifikací (kalcinóza), především u dětských pacientů [18].

Tabulka 2.1. Autoprotilátky specifické pro myozitidu a asociované s myozitidou, upraveno dle [8, 19-21]. Podskupiny autoprotilátek jsou podkresleny podle vazby na fenotypy: modře-antisyntetázový syndrom, zeleně - dermatomyozitida, růžově - imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie, žlutě - myozitida s inklusními tělísky.

Specifické	Cílový antigen	Asociované	Cílový antigen
	<i>Aminoacyl-tRNA-syntetázy (RS)</i>		
Anti-Jo-1	<i>Histidyl-RS</i>	Anti-SSA/Ro	<i>Sjögren's syndrome antigen A</i>
Anti-PL-7	<i>Threonyl-RS</i>	Anti-Ro52	<i>Ro-52 kDa (TRIM21)</i>
Anti-PL-12	<i>Alanyl-RS</i>	Anti-Ro60	<i>Ro-60 kDa</i>
Anti-EJ	<i>Glycyl-RS</i>	Anti-SSB/La	<i>Sjögren's syndrome antigen B</i>
Anti-OJ	<i>Isoleucyl-RS</i>	Anti-PM-Scl	<i>75/100 kDa Exosome protein complex</i>
Anti-KS	<i>Asparaginyl-RS</i>		<i>Polymyositis-Scleroderma</i>
Anti-Zo	<i>Phenylalanyl-RS</i>	Anti-U1RNP	<i>U1 small nuclear RNP</i>
Anti-YRS	<i>Tyrosyl-RS</i>	Anti-Ku72/86	<i>72/86 kDa DNA- dependent protein kinase catalytic subunit complex</i>
		Anti-cN-1A	<i>Cytosolic 5'-nucleotidase-1A</i>
Anti-Mi-2	<i>Chromodomain-helicase-DNA binding protein 4</i>		
Anti-MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>		
Anti-TIF1- γ	<i>Transcriptional Intermediary Factor-1γ</i>		
Anti-NXP-2	<i>Nuclear matrix protein-2</i>		
Anti-SAE	<i>Small ubiquitin-like modifier-1 activating enzyme</i>		
Anti-SRP	<i>Signal recognition particle</i>		
Anti-HMGCR	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase</i>		
Anti-FHL1	<i>Four and half limb domain-1 protein</i>		

V poslední době byl (mezi pacienty původně klasifikovanými jako polymyositis) identifikován další podtyp IZM - imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie (IZNM), charakterizovaný převahou nekrotických změn svalových vláken v biopsii a přítomností specifických autoprotilátek (anti-SRP nebo anti-HMGCR) [22].

Mezi mimosvalové projevy patří postižení plic, srdce, kloubů a gastrointestinálního traktu. Prognosticky nejzávažnější z nich je intersticiální plicní nemoc (interstitial lung disease, ILD), s prevalencí přibližně 20-65% IZM [23-25]. Plicní postižení a jeho komplikace se podílí podle různých zdrojů na 40-80% mortality IZM [26-28]. Odhady prevalence u nově diagnostikovaných myozitid se pohybují mezi 40 až 65% v závislosti na kritériích použitých pro průkaz ILD a na době vyšetření, neboť se může manifestovat kdykoliv v průběhu onemocnění [23, 26]. Hlavním rizikovým faktorem ILD je přítomnost autoprotilátek proti amino-acyl-tRNA syntetázám (ARS; resp. antisynthase antibodies - ASA) a anti-MDA-5 [23]. Pozitivita anti-ARS protilátek a postižení plic je spolu s dalšími klinickými projevy součástí antisynthetázového syndromu [11] (kapitola 2.1.4.).

Tabulka 2.2. Diagnostické nástroje IZM, podle [20].

Anamnéza: svalová slabost, nebo únava

Klinický nález: svalová atrofie, slabost, vyrážka, postižení kloubů, plic, srdce

Předchozí léčba: mytoxické léky*, statiny a další.

Rodinná anamnéza: revmatického nebo svalového onemocnění

Vyšetření:

Svalové enzymy v séru (CK, LDH, AST, ALT a aldoláza)

Svalová biopsie z postiženého svalu

Magnetická rezonance postiženého svalu s T1 a T2 (STIR) zobrazením

Autoprotilátky myozitidy specifické nebo asociované (tab. 2.1.)

Elektromyografie (EMG)

Průkaz orgánového postižení

HRCT plic (high resolution computer tomography)

Spirometrie, Difusní kapacita plic

Elektrokardiografie

Echokardiografie

* přehled mytoxických léků viz [29, 30]

Další fenotypovou skupinu tvoří nemocní, u kterých se příznaky myozitidy překrývají s jinými systémovými onemocněními (Overlap myositis, OM / CTD overlap), nejčastěji se systémovou sklerodermií (SSc), systémovým lupusem erythematosem (SLE), Sjögrenovým syndromem (pSS), revmatoidní artritidou (RA) nebo smíšenou chorobou pojiva (Mixed connective tissue disease, MCTD). Tento fenotyp se pojí s různými autoprotilátkami, mezi které patří anti-PM-Scl, anti-Ku, anti-U1/2 RNP a další autoprotilátky asociované s myozitidou [10, 31]. Podrobný přehled autoprotilátkově-fenotypových podskupin IZM s ohledem na histopatologický obraz je podán v recentním návrhu integrované klasifikace prezentovaném skupinou neuropatologů [9].

Diagnóza myozitidy (tab. 2.2.) je založena na přítomnosti svalové slabosti, charakteristickém klinickém a laboratorním nálezu se zvýšením svalových enzymů (kreatin kináza - CK, laktát dehydrogenáza - LDH, aminotransferázy - AST a ALT) a myoglobinu v séru. Svalové postižení je verifikováno charakteristickými změnami elektromyografické křivky (EMG), známkami otoku, atrofie a náhrady svalů tukovou tkání v magnetické rezonanci (MRI) a myozitickým obrazem ve svalové biopsii. K diagnóze přispívá průkaz autoprotilátek specifických pro myozitidu (tab. 2.1.) [8]. Dosud jsou nejčastěji používána klasifikační kritéria pro DM a PM podle Bohana a Petera (tab. 2.6.) [32, 33] nebo Griggsova pro IBM (tab. 2.7.) [34]. Ta však neumožňují identifikaci dalších nově popsáných fenotypů IZM a nezahrnují průkaz autoprotilátek [20]. Mnoho pacientů hodnocených jako polymyozitida bylo v průběhu sledování na podkladě histopatologických a serologických nálezů přehodnoceno na myozitidu s inklusními tělísky, imunitně zprostředkovanou nekrotizující myopatii nebo antisynthetázový syndrom. To může do budoucna zpochybnit existenci polymyozitidu jako diagnostické jednotky [9].

Letos byla publikována nová EULAR/ACR kritéria pro IZM dospělých a dětského věku, která mají i klasifikační strom k identifikaci fenotypových podskupin IZM včetně imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie a amyopatickou dermatomyozitidu [35]. Tato kritéria byla vyvinuta na podkladě patientských dat a vzhledem k frekvenci ostatních autoprotilátek zůstaly mezi kritérii zatím jen protilátky proti Jo-1. Předpokládá se, že zohlednění dalších autoprotilátek umožní v budoucnu klasifikovat více homogenní skupiny nemocných s podobným patogenetickým mechanismem [9].

2.1.2. Histologie IZM

Diagnózu myozitidy podporuje histologický nález nekrózy svalových vláken I a II typu, fagocytóza, degenerace a regenerace svalových vláken s kolísáním jejich velikosti, infiltráty mononukleárních buněk v endomysiu, perimysiu, perivaskulárně nebo v intersticiu postiženého svalu. Jednotlivé diagnostické či fenotypové podskupiny IZM mají charakteristické rysy v biopsickém nálezu.

Pro dermatomyozitidu je charakteristická atrofie svalových vláken s perivaskulárními zánětlivými infiltráty v interfascikulárních septech a na periférii svalových snopců. Patologické změny svalových vláken (degenerace, nekróza a regenerace) jsou u DM lokalizované především perifascikulárně [36].

Tyto změny jsou vysvětlovány hypoperfuzí na podkladě destrukce endomysialních kapilár na okrajích snopců a mikroinfarkty. Poškození kapilár je vysvětlováno humorálními mechanismy, vzhledem k nálezu známek aktivace komplementu s depozity terminálního produktu komplementové kaskády C5b-9, označovaného jako MAC (membrane attack complex) na kapilárách endomysia v časných stádiích [10, 37].

Aktivace komplementu je pravděpodobně spuštěna autoimunitními mechanismy v místě postižených cév [38] nebo aktivací klasické dráhy komplementu přímou vazbou C1q složky komplementu na poškozené endotelie [39]. Následná redukce kapilár je spojená s kompenzační dilatací cév. Pod vlivem prozánětlivých cytokinů se zvyšuje exprese adhezních molekul na endoteliích usnadňuje transmigraci

a homing infiltrujících buněk do endomysia [40]. V infiltrátech převažují $CD4^+$ T a B lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky [38].

U pacientů s polymyozitidou a myozitidou s inklusními tělísky převažují v endomysialních zánětlivých infiltrátech T lymfocyty, především $CD8^+$, které obklopují a invadující nepoškozená (non-nekrotická) svalová vlákna a prostřednictvím enzymů perforinu a granzymu uplatňují mytoxický efekt [41]. Dalšími složkami infiltrátů u PM a IBM jsou $CD4^+$ T lymfocyty, dendritické buňky (DC) a makrofágy což, spolu s expresí HLA I. třídy svalovými vlákny ukazuje na možnou lokální prezentaci autoantigenů ve svalu a buněčný imunopatogenetický mechanismus poškození svalových vláken [38].

Pro diagnózu IBM je charakteristický nález lemovaných vakuol ve svalových vláknech a depozit amyloidu. Elektronopticky lze zobrazit cytoplazmatická i nukleární vláknitá inkluzní tělíska. Histopatologický obraz ukazuje na současný podíl mitochondriální dysfunkce, abnormální agregace proteinů a zánětlivých mechanismů. Na počátku onemocnění může mít infiltrát podobný charakter jako u polymyozitidy [10].

V infiltrátech u IBM a PM bylo nalezeno více myeloidních DC, zatímco v dermatomyozitických infiltrátech převažovaly plazmacytooidní DC (pDC) [42, 43], které jsou hlavním zdrojem interferonů I. typu (IFN-1) [44] (IFN-1 viz kapitola 2.2.8). Možná lokální syntéza IFN-1 v zánětlivých infiltrátech je histologicky doložena přítomností proteinu indukovaného $IFN\alpha/\beta$ - MX-1 (myxovirus resistance-1) nejen ve svalech pacientů s DM a také u PM a IBM a v kožních biopsiích pacientů s DM a JDM [42, 43, 45-48].

Histologický obraz DM, PM a IBM není vždy takto uniformní a původní diagnostické závěry a imunopatogenetické hypotézy jsou revidovány [49].

Histopatologický obraz, v poslední době častěji diagnostikovaných, imunitně zprostředkovaných nekrotizujících myopatií je charakterizovaný difusní nekrózou a variabilitou velikosti svalových vláken, expresí HLA I. třídy a depozicí komplementu na sarkolemě, myofagocytozou a minimálním lymfocytárním infiltrátem [9].

Také další klinické fenotypy asociované s určitými autoprotilátkami mají charakteristické morfologické obrazy, na podkladě kterých vznikají nové klasifikační systémy [9, 50]. Pacienti s antisyntetázovými autoprotilátkami mají odlišný bioptický nález se zmnožením pojiva bohatého na makrofágy v perimysiu poblíž perifascikulárních oblastí, s atrofickými a regenerujícími vlákny a se známkami perifascikulární nekrózy [51].

Nálezy B lymfocytů v infiltrátech svalových biopsií nemocných s DM, PM a IBM a plazmatických buněk (PC) u nemocných s PM [52-56] se známkami klonální proliferace B buněk a PC [57] a lokální afinitní maturace [58] spolu s přítomností autoprotilátek v séru a jejich klinickými asociacemi [8] svědčí o podílu B lymfocytů v patogenetických mechanismech IZM.

2.1.3. Autoprotilátky u IZM

Orgánově nespecifické autoprotilátky se nacházejí častěji v séru nemocných s PM, DM a méně často u IBM [4, 59]. Autoprotilátky, které se vyskytují především u myozitidy jsou považovány za specifické pro toto onemocnění (myositis-specific autoantibodies, MSA, tab. 2.1). U pacientů s DM a PM jsou nacházeny ve více než 50%. U IBM byly autoprotilátky zjišťovány méně často (v 18%) [4] do průkazu anti-cN-1A u 37-61% nemocných s IBM [60, 61] (tab. 2.1.).

Autoprotilátky vůči funkčně podobným antigenům se druzí s určitými klinickými projevy zmíněnými výše (viz odstavec 2.1.1.) a jsou využívány v diagnostice [8]. Mnohé MSA a jejich klinické asociace byly popsány teprve v posledních letech (anti-TIF1, anti-NXP2, anti-MDA5, anti-SAE, anti-HMGCR a anti-cN-1A). Množí se důkazy o vazbě hladin autoprotilátek na klinickou aktivitu a o jejich prognostické hodnotě [8, 62-65].

Některé autoprotilátky (např. anti-SSA/Ro -Ro52, Ro60, anti-SSB/La, anti-PM-Scl, anti-Ku a anti-RNP) jsou běžně přítomné i u různých autoimunitních systémových onemocnění včetně myozitidy a jsou označovány jako asociované s myozitidou (myositis-associated autoantibodies; MAA, tab. 2.1.) [11]. Z nich nejčastější jsou anti-SSA/Ro52, které se nachází u více systémových onemocnění (především u pSS a SLE), mají u myozitidy prevalenci 12-30%. Dále jsou časté anti-PM-Scl protilátky (5-10% IZM), především u překryvu se systémovou sklerodermií [4, 66].

2.1.4. Antisyntetázové protilátky

Hlavní skupinu MSA tvoří protilátky proti aminoacyl-tRNA syntetázám (ARS), přičemž jsou přítomny častěji u pacientů s PM (20-40%) než u nemocných s DM (5%). Cílovým antigenem jsou enzymy, které katalyzují vazbu určitých aminokyselin na příslušnou molekulu transferové RNA (tab. 2.1.). Nejčastější z nich jsou proti histidyl-tRNA syntetáze (Jo-1) a nachází se podle různých zdrojů u 9-25% dospělých nemocných s myozitidou. Další z celkem osmi známých ARS (non-Jo-1) mají menší prevalenci. Nemocní s non-Jo-1 ARS tvoří celkově 6-12% nemocných s myozitidou a jednotlivé autoprotilátky byly nalezeny v 1-5% a méně [5, 8, 19, 59, 66]. Rutinní testy pro průkaz non-Jo-1 ARS autoprotilátek jsou k dispozici teprve v posledních letech a to může být příčinou podhodnocení jejich prevalence.

Spolu s myozitidou, postižením plic (ILD) a dalšími extramuskulárními projevy (Raynaudův fenomén, polyartritida a kožní projev - ruce mechanika) jsou antisyntetázové protilátky součástí tzv. antisyntetázového syndromu (ASS) [11, 67], druzí se s horší odpovědí na léčbu kortikoidy a těžší prognózou a mají zřejmě i patogenetický význam.

Horší prognóza pacientů s ARS je příkládána asociaci s postižením plic, jehož komplikace jsou hlavní příčinou mortality u antisyntetázového syndromu [11, 25, 27, 28]. ILD se může objevit kdykoliv v průběhu onemocnění myozitidou a také manifestace je variabilní. V některých případech je

asymptomatická ILD zjištěna při systematickém sledování funkčními testy či zobrazovacími postupy, jindy se projeví akutně těžkou respirační nedostatečností [68, 69].

Frekvence ILD u nemocných s anti-Jo-1 autoprotilátkami se v různých studiích pohybuje mezi 56 - 93% v závislosti na zkoumané populaci a na použitých kritériích pro definici plicního postižení (tab. 2.3.) [70-80]. I když téměř všechny non-anti-Jo-1 antisyntetázové protilátky se pojí s ILD je známá heterogenita v převaze plicního nebo svalového postižení, která je vázaná na přítomnost určitých non-anti-Jo-1 autoprotilátek [8, 68, 81-83].

Tabulka 2.3. Prevalence intersticiální plicní nemoci (ILD) u pacientů s anti-Jo-1 protilátkami.

Počet pacientů v souboru	% ILD	Citace	
231	75%	<i>Schmidt, Wetzel et al. 2000</i>	[70]
15	73%	<i>Marie et al. 2002</i>	[71]
14	64%	<i>Mielnik et al. 2006</i>	[72]
14	64%	<i>Selva-O'Callaghan et al. 2006</i>	[73]
90	86%	<i>Richards et al. 2009</i>	[74]
27	70%	<i>Vancsa et al. 2009</i>	[75]
15	93%	<i>Mileti et al. 2009</i>	[76]
37	70%	<i>Dugar et al. 2011</i>	[77]
107	56%	<i>Marie et al. 2011</i>	[78]
225	84%	<i>Cavagna et al. 2015</i>	[79]

2.1.5. Anti-Jo-1 protilátky v patogeneze IZM

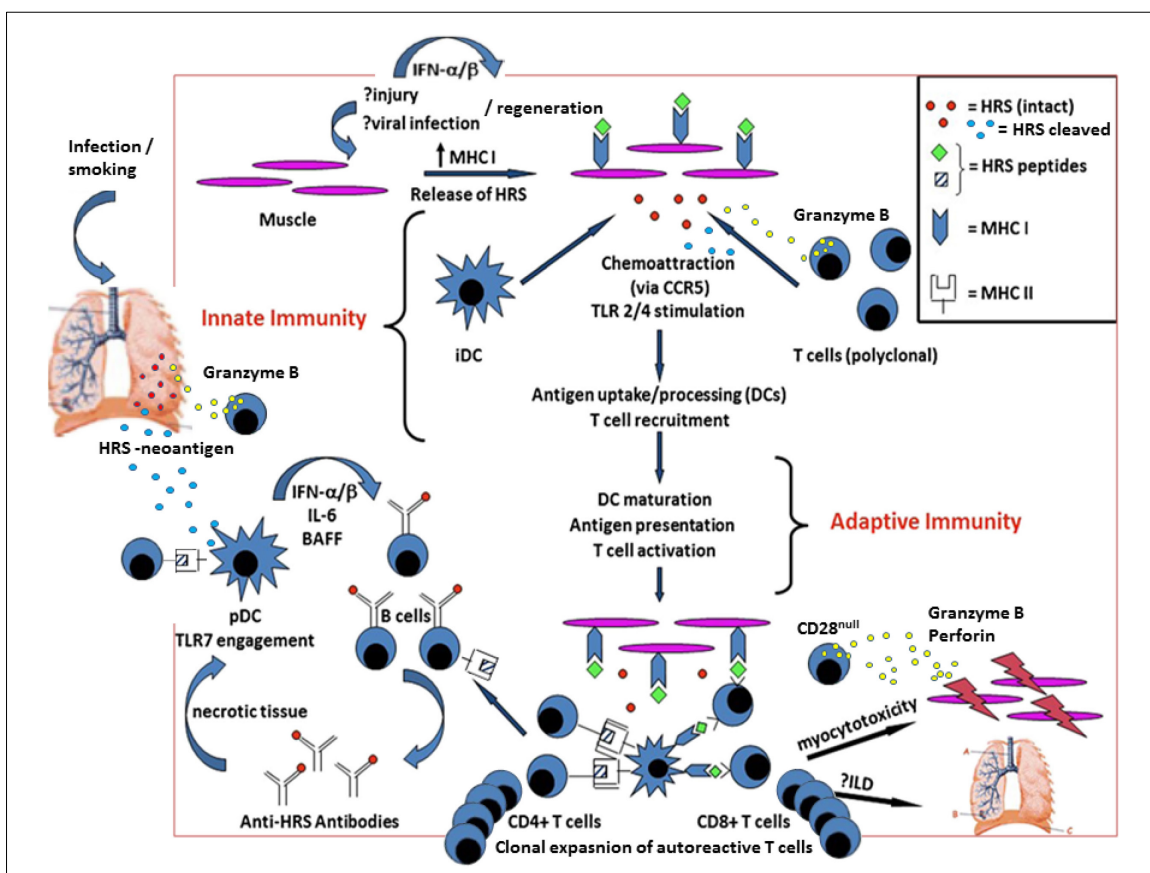
Anti-Jo-1 autoprotilátky byly pozorovány ještě před prvními klinickými projevy myozitidy, což svědčí pro jejich možnou roli v patogenezi této podskupiny IZM [84, 85]. Dále byla popsána korelace sérových hladin protilátek proti Jo-1 se svalovým postižením hodnoceným hladinou CK v séru a se svalovou, plicní a celkovou klinickou aktivitou IZM a jejich asociace v čase [65]. Navíc bylo pozorováno i vymizení anti-Jo-1 protilátek v době nízké aktivity myozitidy v 16-27% různých kohort anti-Jo-1-pozitivních nemocných [65, 86, 87].

Dalším důkazem možné patogenetické role anti-Jo-1 autoprotilátek je nález modifikovaného antigenu (histidyl-tRNA syntetázy), v plicích, kde zřejmě probíhá iniciace autoimunitní odpovědi u ASS [88]. Předpokládá se, že rozvoji svalového postižení předchází respirační infekce, při kterém je histidyl-tRNA syntetáza štěpena granzymem B a nově vzniklé antigenní fragmenty jsou prezentovány dendritickými buňkami CD4⁺ T lymfocytům s následnou aktivací autoantigen specifických adaptivních mechanismů (obr. 2.2.). T lymfocyty periferní krve anti-Jo-1 pozitivních pacientů reagovaly proliferací v kultuře s autologními dendritickými buňkami s navázanými fragmenty histidyl-tRNA syntetázy [89].

Fragmenty Jo-1 působí chemotakticky na lymfocyty, aktivované monoocyty a nezralé dendritické buňky [90] a také séra anti-Jo1 pozitivních pacientů s PM a postižením plic v experimentu indukovala expresi adhesivní molekuly ICAM-1 endoteliálními buňkami derivovanými z plic což také může

příspěk k lokální migraci zánětlivých buněk [91]. Tyto infiltruující buňky lokálně vyžívají, prezentují peptidy a produkují cytokiny.

Předpokládá se, že molekuly MHC I exprimované na myocytech mohou prezentovat peptidy Jo-1 CD8⁺T lymfocytům. Ve svalové tkáni nemocných s PM byly analýzou spektra T buněčných receptorů prokázány známky oligoklonální expanze CD8⁺ T lymfocytů [92, 93], která může být lokálně řízena jedním či více specifickými antigeny a spíše polyklonální expanze CD4⁺ T lymfocytů. Dále byla zjištěna zvýšená exprese antigenu Jo-1 v regenerujících svalových vláknech [94]. Ty pak mohou být specifickým cílem infiltrujiících cytotoxických CD8⁺ a CD4⁺CD28^{null} T lymfocytů [95, 96], které mohou působit nejen ve svalech ale i v plicích destrukci cílových tkání a také spouštět autoimunitní reaktivitu štěpením Jo-1 [41].



Obrázek 2.2.: Příspěvek antigenu Jo-1 a autoantiláték proti Jo-1 k patogeneze antisynthetázového syndromu podle [97] s úpravami podle [38, 41, 49]. (HRS = Jo-1)

V sérech anti-Jo-1-positivních nemocných s myozitidou odebíraných během dlouhodobého sledování bylo prokázáno rozšiřování spektra a afinitní maturace anti-Jo-1 autoantiláték [98]. Ve svalové tkáni pacientů s DM byla zjištěna exprese mRNA sekretovatelných sestřihových variant Jo-1, které byly rozpoznány anti-Jo-1 autoantilátkami [99]. To, spolu s průkazem lokální afinitní maturace buněk B lymfocytární linie ve svalových infiltrátech [58], může svědčit pro případnou místní produkci autoantiláték v zanícené svalové tkáni.

Některé MAA a MSA se vyskytují současně. Tak je tomu u autoprotilátek proti Ro52, které byly pozorovány v 56–72% anti-Jo-1 pozitivních sér [8, 100, 101]. Jejich současný nález byl spojen s vážnějším průběhem plicního postižení a horší odpovědí na imunosupresivní terapii [25, 27, 100, 101], nebo s těžším svalovým postižením a s kloubními projevy [78]. Imunokomplexy s protilátkami proti Jo-1 a/nebo Ro52 ze sér nemocných s myozitidou indukovaly in vitro tvorbu IFN- α/β [46, 102], který je významným činitelem v patogeneze IZM (viz 2.2.8.).

2.1.6. Terapie IZM

Léčbou první volby jsou glukokortikoidy. Více než dvě třetiny pacientů s plicním postižením v rámci antisyntetázového syndromu potřebuje jedno a více imunosupresiv v průběhu léčby. Glukokortikoidní a imunosupresivní léčba jsou navíc účinné jen u části nemocných. Pouze 20% až 40% léčených nemocných s IZM dosáhne remise, zatímco 60% až 80% pokračuje v chronickém či polycyklickém vývoji onemocnění [27]. Proto se u vybraných fenotypů IZM rezistentních na steroidy ověřuje účinnost včasného nasazení imunosupresiv, použití intravenózních imunoglobulinů a dále kombinace s biologickými léky. Zatím nejúčinnější byla deplece B lymfocytů rituximabem (RTX, anti-CD20), která je zdůvodnitelná přítomností buněk B lymfocytární linie v zánětlivých infiltrátech a také asociací autoprotilátek s klinickými projevy. Účinek RTX byl popsán v případových studiích pacientů DM a PM rezistentních na konvenční léčbu, nemocných s antisyntetázovým syndromem a s protilátkami proti Jo-1 a v jedné otevřené pilotní studii [103-113].

V recentní přehledové studii bylo analyzováno 458 pacientů s myozitidou prezentovaných ve 48 sděleních, kde byl prokázán účinek rituximabu celkem ve 78,3% léčených [114]. Dále byla zaznamenána dobrá odpověď na RTX u nemocných s ASS a autoprotilátkami proti Jo-1, především ve zlepšení plicních funkcí [115]. Výsledky randomizované klinické studie u pacientů s PM/DM/JDM (NCT00106184) byly méně přesvědčivé [116]. I když téměř 80% nemocných odpovědělo na terapii RTX, nebylo dosaženo primárního ani sekundárních cílů studie, což bylo částečně vysvětlováno návrhem studie. Nedávná dodatečná analýza navíc ukázala, že u podskupiny nemocných s DM a JDM měla terapie rituximabem významný účinek na refrakterní kožní projevy [117]. Ukázalo se, že účinnost RTX může být predikována přítomností a také hladinami antisyntetázových protilátek (především anti-Jo-1), protilátek proti Mi-2 a TIF1- γ [118-121].

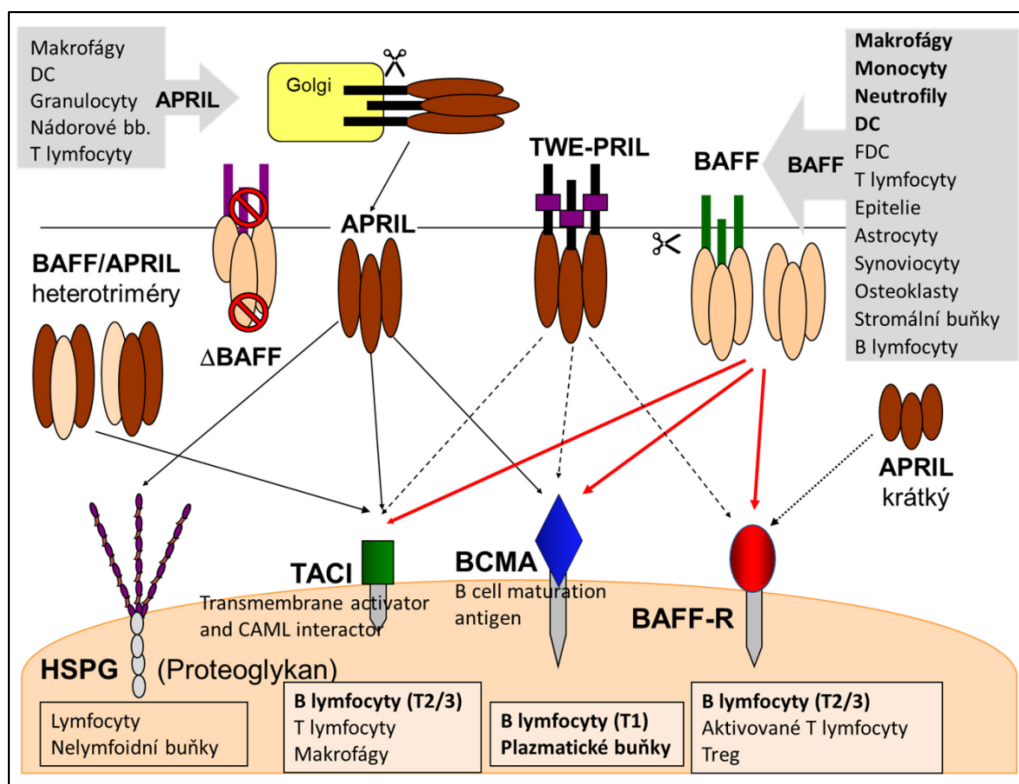
Alternativou k depleci B lymfocytů je blok mechanismů regulace vyzrání a přežití B lymfocytů, jakým je například cytokin BAFF (B cell-Activating Factor of the TNF Family; viz kapitola 2.2.9.) [122, 123]. B-depleční léčba rituximabem má svá omezení. Jednak bylo prokázáno, že deplece B lymfocytů vedla k elevaci hladin BAFF v séru [124, 125], což by mohlo umožnit proliferaci autoreaktivních klonů během repopulace B buněk. Navíc se cílová molekula pro RTX (CD20) nachází pouze na určitých diferenciačních stádiích B lymfocytů. CD20 negativní diferenciační stadia B buněk (plazmatické buňky), nepodléhají depleci. Ty však exprimují receptory pro BAFF (viz kapitola 2.2.3.), od kterého dostávají antiapoptotické signály.

2.2. BAFF

2.2.1. Charakteristika BAFF

Cytokin BAFF (B cell-Activating Factor of the TNF Family), také známý jako B-lymphocyte stimulator (BLys), nebo TNFSF13B (Tumor Necrosis Factor ligand SuperFamily member 13B) či TALL-1 (TNF- and APOL-related Leukocyte expressed ligand), je klíčovým faktorem v modulaci B buněčné tolerance a homeostázy [126]. Působí přežití přechodných stadií maturace B lymfocytů. Vysoké hladiny BAFF umožní přežití i autoreaktivních B lymfocytů, které by měly hynout apoptózou a umožní jejich klonální proliferaci (review [127]). Na zvířecím modelu bylo prokázáno, že při chybění BAFF dochází k těžké deficienci B lymfocytů. Naopak, transgenní myši s nadměrnou tvorbou BAFF mají zvýšené počty B buněk a lupu s-like syndrom [128].

Funkce BAFF jsou však komplexní, také vzhledem k tomu že má tři receptory (obr. 2.3.), z nichž dva sdílí s dalším ligandem zvaným APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) [129]. BAFF i APRIL jsou členy rodiny TNF (tumor nekrotizující faktor) [130].



Obrázek 2.3.: BAFF, APRIL, jejich zdroje a jejich receptory. Upraveno podle [129, 131, 132].

2.2.2. Produkce BAFF

BAFF je tvořen především neutrofily, monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami (DC) a v menší míře i T-buňkami [129, 133-135]. Dalším místním zdrojem BAFF jsou folikulární DC [136] a buňky nehematopoetického původu (obr. 2.3.). V periferních tkáních se podílí na lokálních antiapoptotických signálech specifických nik, které modulují přežití a funkci B lymfocytů a plazmatických buněk v

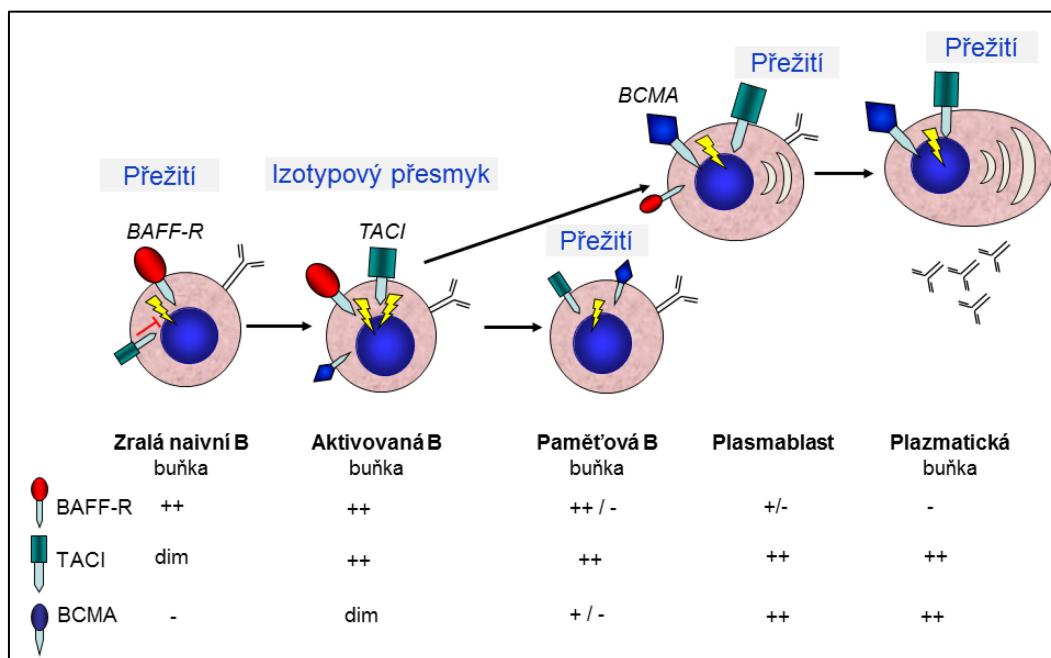
zánětlivých infiltrátech [127]. V různých tkáních byly lokálním zdrojem BAFF epitelie dýchacích cest a slinných žláz [137, 138], synoviální fibroblasty [139], astrocyty [140], VCAM-1 pozitivní buňky stromatu kostní dřeně [141] a osteoklasty [142]. Některé studie ukazují na autokrinní tvorbu BAFF B lymfocyty (např. [143]).

Tvorba BAFF i APRIL v makrofázích, neutrofilech a DC je stimulovatelná interferony (IFN) α , IFN γ , interleukiny (IL)-10 a IL-4 [129], faktorem stimulujícím kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), CD40 ligandem (CD40L), lipopolysacharidem a peptidoglykany [144, 145].

2.2.3. Receptory pro BAFF a APRIL

BAFF působí prostřednictvím tří receptorů [129], BAFF-R (BAFF Receptor neboli BR3; TNFRSF13c), BCMA (B-Cell Maturation Antigen; TNFRSF17) a TACI (Transmembrane Activator and calcium-modulating Cyclophilin ligand Interactor; TNFRSF13b), které se exprimují diferencovaně v různých stádiích maturace B lymfocytů (obr. 2.4.) [146, 147].

BAFF se váže specificky na BAFF-R a sdílí BCMA a TACI s cytokinem APRIL [129, 148]. Ten se navíc váže na povrchové proteoglykany buněk lymfoidního i nelymfoidního původu [149] (obr. 2.3.). Nezralé B buňky, které právě vznikly v primárních lymfatických centrech, jsou nejvíce náchylné k negativní selekci a jejich kontakt s vysoce aviditním antigenem spouští procesy eliminace buněčnou smrtí nebo revize BCR. Pokud přežijí, vyzárají nezralé B buňky do pozdních nezralých B buněk, které opouštějí primární lymfatická centra a kolonizují vnější lymfatické orgány v první fázi přechodného stadia jako T1 B buňky (z angl. Transitional).



Obrázek 2.4.: Expresce receptorů pro BAFF a APRIL v různých stádiích maturace zralých B buněk. Upraveno podle [129, 150-154]. BAFF-R = BAFF receptor, BCMA = B-cell maturation antigen a TACI = transmembrane activator and CAML (calcium-modulating cyclophilin ligand) interactor.

BCMA je přítomen již na časných přechodných stádiích (T1) nezralých B lymfocytů, dále se jeho exprese snižuje a opět se zvyšuje až během další diferenciaci do plazmablastů a plazmatických buněk [155, 156] (obr. 2.4.). Byl nalezen také na B buňkách germinálních center tonzil [155, 157, 158]. TACI a BAFF-R jsou exprimovány nezralými B buňkami pozdních stádií (T2/3) a dále zralými B buňkami. BAFF-R je přítomen na všech diferenciacích stádiích až do stadia paměťových B buněk. Jeho exprese je stimulována vazbou specifického antigenu na BCR zralých B buněk a později klesá během vývoje do plazmatických buněk. Naopak exprese TACI se během diferenciaci plazmatických buněk zvyšuje. BAFF-R je navíc exprimován také aktivovanými T-lymfocyty a T-regulačními buňkami (Treg) [149].

2.2.4. Funkce BAFF, APRIL a jejich receptorů

Nejprve bylo zjištěno v *in vitro* experimentu, že BAFF působí specificky přežití T2 přechodného stadia vyžívání B buněk při maturaci ve slezině [129]. To bylo potvrzeno na zvířecím modelu tak, že BAFF-deficitní zvířata měla poruchu diferenciaci B lymfocytů z přechodného stadia T1 do stadia T2 [129]. B lymfocyty v tomto stadiu procházejí tzv. negativní selekcí na podkladě specifity B buněčného receptoru (BCR), která vede k jejich snášenlivosti k antigenu buď eliminací, nebo anergií. Tento mechanismus negativní selekce B buněk zabraňuje nadměrné produkci autoreaktivních B buněk.

Ty B lymfocyty, jejichž BCR rozpoznávají vlastní antigeny, hynou apoptózou. Vysoké hladiny BAFF působí antiapoptoticky proti tomuto mechanismu a je tak umožněna proliferace autoreaktivních klonů B lymfocytů [126]. U BAFF transgenických myší byla nadprodukce BAFF sdružena s autoimunitními projevy. Toto je také důležitý patogenetický mechanismus autoimunitních onemocnění u lidí.

APRIL není nezbytný pro normální vývoj B lymfocytů. Zdá se, že se uplatní především v mechanismu izotypového přesmyku do IgA [134]. Biologická funkce smíšených molekul BAFF/APRIL a TWE-PRIL není zcela jasná.

BAFF-R je klíčovým receptorem, který zprostředkovává výše popsany anti-apoptotický signál cytokinu BAFF v populaci naivních B lymfocytů [129, 144, 159].

Vazba BCMA je důležitá pro vývoj zralých, dlouho žijících B lymfocytů a podporuje přežití plazmatických buněk (PC), včetně dlouho žijících PC v kostní dřeni [156].

TACI je důležitý pro odpověď na antigeny nezávislé na T lymfocytech, negativně reguluje aktivaci a klonální expanzi B buněk [160] a předává signál cytokinu APRIL k izotypovému přesmyku [161]. Mutace TACI byla spojena s protilátkovým imunodeficitem (CVID) [162]. TACI může také působit regulačně vazbou BAFF, která snižuje jeho dostupnost pro BAFF-R [146, 147, 163]. TACI-deficitní zvířata mají vysoké počty B lymfocytů a autoimunitní fenotyp, podobný SLE a také lymfatické nádory [159].

2.2.5. BAFF u nemocných s revmatickými chorobami

Biologický význam BAFF v patogeneze systémových onemocnění dokládají nálezy vysokých hladin v séru nemocných a autoimunitními onemocněními [124, 164-175] v asociaci s aktivitou onemocnění nebo pozitivitou autoprotilátek [165, 168, 170-173] a exprese BAFF nebo jeho receptorů v postižených orgánech [144].

Byly dokumentovány asociace hladin BAFF s vysokými titry autoprotilátek proti dsDNA nebo Sm u SLE [165, 168, 170, 172, 176-178], s revmatoidním faktorem (RF) a protilátkami proti citrulinovaným peptidům (anti-CCP) u revmatoidní artritidy [168, 179], s RF nebo s anti-SSA/B autoprotilátkami u Sjögrenova syndromu [173], a nebo protilátkami proti histonům u lokalizované formy SSc [164].

Do zahájení našeho projektu byla publikována jedna studie proteinu BAFF v séru, kde byla zařazena i malá kontrolní skupina nemocných s DM k pacientům se systémovou sklerodermií. Zde byly hladiny BAFF zvýšené u DM oproti zdravým kontrolám [171]. Později byla nalezena zvýšená exprese transkriptů BAFF mRNA v bioptických vzorcích svalů od nemocných DM, PM a IBM, přítomnost BAFF proteinu v perifascikulárních svalových vláknech nemocných s DM [57, 180] a také exprese BAFF-R [180].

I když v dřívějších studiích u jiných systémových onemocnění (SLE a RA) byla popisována omezená variabilita sérových hladin BAFF v čase bez vývoje v době vzplanutí [165, 172], pozdější práce uvádí kolísání hladin BAFF ve vztahu k vývoji aktivity onemocnění během dlouhodobého sledování nemocných se SSc, časnou RA a SLE [164, 178, 179]. Změny hladin BAFF mezi dvěma časovými body byly asociované se změnami aktivity podle laboratorních a klinických hodnocení u SLE a SSc a byly vázané na dávky terapie glukokortikoidy [165, 171].

2.2.6. Polymorfismy *BAFF* genu

Existuje několik jednonukleotidových polymorfismů (single-nucleotide polymorphisms; SNP) promotorové oblasti genu pro BAFF [181, 182]. Čtyři z nich (rs9514827 (-2841T>C), rs3759467 (-2704T>C), rs1041569 (-2701T>A) a rs9514828 (-871C>T)) jsou v silné vazebné nerovnováze a tvoří 4 nejčastější haplotypy CTAT, TTAC, TCAC a TTTT. Tyto polymorfismy i jejich haplotypy byly studovány u nemocných s pSS, SLE a RA [176, 182-184] s různě silnými asociacemi některých z nich s diagnózou či se zvýšenými hladinami BAFF u nemocných s autoimunitními chorobami.

Z nekonzistentních nálezů těchto studií je spíše pravděpodobné, že dysregulace exprese BAFF proteinu je způsobena dalšími faktory (jiné genetické, prostředí, další cytokiny), které ovlivňují senzitivitu buněk produkujících BAFF. Tvorba proteinu BAFF není závislá jen na genetickém pozadí, ale také jsou známy transkripční varianty, kódující proteiny s různou funkcí.

2.2.7. Alternativní varianty BAFF

BAFF je tvořen, podobně jako další TNF ligandy, jako transmembránový protein II. typu a je též sekretován po proteolytickém odštěpení z buněčné membrány ve formě rozpustného homotriméru nebo multiméru (obr. 2.3.) [185]. Membránová i rozpustná forma je biologicky aktivní, avšak funkční

rozdíly mezi membránovou a rozpustnou formou BAFF zatím nejsou známe [185]. Kromě nezkrácené formy byly popsány další sestřihové varianty [186, 187]. Plná varianta (full-length; FL-BAFF) působí na diferenciaci a přežití B lymfocytů a plazmatických buněk, zatímco zkrácený produkt alternativního sestřihu, s chybějícím 3. exonem (Δ BAFF), který se zřejmě neodštěpuje z buněčné membrány do solubilní formy, nemá tuto funkci, a navíc může působit jako negativní regulátor FL-BAFF tak, že tvoří s FL heterotrimér a omezuje odštěpení sekretované formy z buněčné membrány [186]. Rozpustné heterotriméry BAFF/ Δ BAFF se vážou na receptory pro BAFF s menší afinitou nežli multiméry FL-BAFF čímž jej kompetitivně inhibují. U lidí zatím nebyl detekován protein odpovídající této variantě a jsou dostupné jen analýzy exprese Δ BAFF na mRNA úrovni. Zvýšení poměru mezi BAFF/ Δ BAFF pravděpodobně hraje roli v patogenezi pSS [138]. U pacientů s IZM byla exprese obou variant zvýšena, korelovala s aktivitou myozitidy a byla asociována s autoprotilátkami proti SSA/Ro, SSB/La. Poměr BAFF/ Δ BAFF byl u IZM s autoprotilátkami nižší než u pacientů bez autoprotilátek, koreloval negativně s aktivitou myozitidy a byl zřejmě ovlivněn léčbou [188].

Další varianta, Δ 4BAFF, byla popsána u B lymfoproliferativních onemocnění a zřejmě působí jako transkripční faktor BAFF genu a zvyšuje produkci BAFF u nádorů i autoimunitních onemocnění [187].

2.2.8. BAFF a interferony I. typu

Expese BAFF je indukována interferony (IFN) I. typu [138, 189]. Navíc expozice IFN I. typu (IFN-1) přispívá k diferenciaci B lymfocytů do plazmablastů a zvyšuje jejich přežívání a rezistenci k Fas-zprostředkované apoptóze [190, 191]. IFN-1 jsou skupinou 13 subtypů IFN α , IFN β , - ϵ , - κ a - ω [192] a jejich průkaz konvenční metodou testy ELISA není zcela jednoduchý. Navíc jsou systémové i lokální koncentrace cytokinů nízké a potenciální expese může být pouze přechodná. Ukazatelem nadprodukce IFN-1 je analýza genů nebo proteinů které indukují - tzv. otisk interferonu (IFN signature) [193]. Úloha IFN-1 v patogeneze IZM je dobře dokumentována [43, 48, 194, 195]. Expese transkriptů indukovaných IFN-1 v krvi nemocných s DM a PM korelovala s aktivitou myozitidy [193, 196-200] a byla asociována s pozitivitou protilátek proti RNA-vázajícím proteinům (Jo-1, Ro60 a U1RNP) [201]. Avšak u nemocných DM bylo zaznamenáno zvýšení INF-indukovatelných genů bez vazby na přítomnost autoprotilátek [201]. Také v myozitické svalové tkáni bylo popsáno zvýšení exprese IFN imunohistochemicky i průkazem genomického otisku IFN [43, 197, 202].

Buněčným zdrojem IFN-1 jsou plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) stimulované virem nebo imunokomplexy obsahujícími protilátky proti nukleovým kyselinám, nebo proteinům vázajícím nukleové kyseliny [203]. Plasmacytoidní DC byly společně s proteinem MX-1 (myxovirus resistance-1) indukovaným IFN-1 nalezeny v biopsiích svalů nemocných především s DM a také u PM a IBM a v kožních biopsiích pacientů s DM a JDM [42, 43, 45-48].

Séra nemocných s protilátkami proti Jo-1 a/nebo Ro52 působila v in vitro experimentu jako endogenní faktor indukující tvorbu IFN- α v kulturách mononukleárních buněk periferní krve [46, 102].

Předpokládá se, že komplexy autoprotilátek s fragmenty Jo-1 a nebo nukleovými kyselinami obsaženými v materiálu z nekrotických buněk, aktivují právě pDC k expresi IFN- α .

Vzájemnou interakci mezi BAFF a IFN-1 v patofyziologii IZM potvrzuje účinek léčby monoklonální protilátkou proti IFN- α (sifalimumab; NCT00533091), která vedla u nemocných s DM a PM ke snížení transkriptů BAFF v periferní krvi a poklesu exprese transkriptů vývojové řady B buněk ve svalových biopsiích [204]. Význam interference s patogenetickými mechanismy zprostředkovanými IFN-1 u IZM je zřejmý i z aktuálně probíhajících terapeutických studií na úrovni bloku pDC vazbou receptoru ILT7 monoklonální protilátkou (NCT02780674) a vakcinace IFN α -Kinoidem (NCT02980198) [205].

2.2.9. BAFF jako cílová molekula v terapii

Po prvotních experimentech s neutralizací BAFF pomocí TACI-Ig a BAFF-R-Ig u myších modelů SLE [206] byla neutralizace BAFF protilátkami (anti-BAFF, anti-BAFF-R) či rozpustným receptorem (TACI-Ig) terapeuticky zkoušena v klinických studiích především u SLE (review [122]) a pSS [183]. V současné době je registrovaná monoklonální protilátka proti BAFF - belimumab - pro terapii, pacientů s SLE s pozitivními autoprotilátkami a neúčinností standardní léčby. Probíhá studie u nemocných s postižením ledvin při SLE (NCT01639339) a randomizovaná studie s kombinovanou sekvenční aplikací belimumabu a B deplece rituximabem u pSS (NCT02631538). Hodnocení účinnosti ataciceptu (TACI-Ig; fúzní protein Fc frakce IgG a receptoru TACI), který váže BAFF i APRIL, bylo ukončeno pro rozvoj těžké hypogamaglobulinemie se závažnou pneumonií. Další dva léky, které jsou zkoušeny u SLE: Blisibimod (fúzní polypeptidový protein čtyř vazebných domén pro BAFF a Fc fragmentu IgG) a tabalumab (monoklonální protilátka proti BAFF izotypu IgG₄), vážou jak na rozpustný tak na membránový BAFF. Aktuálně probíhá klinické hodnocení účinku belimumabu u PM a DM refrakterních na léčbu glukokortikoidy a imunosupresivy (NCT02347891) [205].

2.3. Visfatin / PBEF

Visfatin, také známý jako pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF) nebo nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), byl identifikován v kostní dřeni jako cytokin, který je sekretován aktivovanými lymfocyty a stimuluje časná stadia diferenciací B lymfocytů [207]. Je povšechně přítomen v různých tkáních a vzhledem ke zvýšené expresi v buňkách viscerálního tuku byl označen za adipocytokin [208]. Visfatin je protein s významnými imunomodulačními vlastnostmi. Kromě účasti v energetickém metabolismu [209] se podílí na mechanismech přirozené imunity a zánětu [210]. Zvyšuje aktivaci a stimuluje proliferaci leukocytů, expresi adhezivních molekul a produkci prozánětlivých cytokinů jako např. TNF- α a interleukiny IL-1 a IL-6 v monocytech [210-212].

Bylo prokázáno, že BAFF zvyšuje expresi genu pro visfatin [213] ale interakce BAFF a visfatinu na proteinové úrovni a *ex vivo* v klinickém kontextu nebyly studovány. Nedávno bylo prokázáno zvýšení

jiného adipocytokinů - rezistinu v sérech nemocných s myozitidou ve srovnání se zdravými jedinci a jejich asociace s aktivitou zánětu a vyšší celkovou zánětlivou a klinickou aktivitou [214]. O roli visfatinu v IZM do naší studie nebyly zprávy.

Visfatin a další adipocytokiny jsou tvořeny buňkami revmatoidního kloubu v místech aktivity a periartikulární tukové tkáni. Prozánětlivé faktory stimulují jeho tvorbu v synoviálních fibroblastech a on sám působí jako zánětlivý mediátor [215, 216]. Nemocní se SLE a RA měli zvýšené hladiny visfatinu v séru v korelaci s klinickou aktivitou onemocnění a destruktivními změnami u RA [215, 217, 218].

Během B-depleční terapie rituximabem dochází ke zvýšení BAFF v séru nemocných se systémovými revmatickými onemocněními [124, 125]. Vliv této léčby na hladiny visfatinu, na vztah mezi těmito dvěma cytokiny indukujícími diferenciaci B lymfocytů není znám. Předpokládanými mechanismy elevace BAFF jsou snížení spotřeby BAFF při absenci B lymfocytů jako jeho hlavních konzumentů a nedostatečná zpětnovazebná regulace jeho produkce s průkazem trvalé transkripce BAFF mRNA [125]. Vzestup hladin BAFF v séru s odstupem po B-depleční léčbě byl asociován s relapsem onemocnění, elevací autoprotilátek a plazmablastů v periferní krvi jak u SLE [219, 220] tak u RA [221]. Asociace případných změn visfatinu s klinickým stavem nemocných po depleci B lymfocytů nebyl studován.

3. Cíle doktorské práce

Cílem doktorské práce bylo přispět k poznání role cytokinu BAFF v patogeneze idiopatických zánětlivých myopatií (IZM). Studium níže uvedených aspektů jsme chtěli zjistit:

A) Kvantitativní analýza sérových hladin BAFF:

- Zda jsou sérové hladiny BAFF odlišné u nemocných s IZM a jsou-li případné odchylky ovlivněny přítomností autoprotilátek, či klinickým fenotypem a popřípadě zda reagují na terapii.
- Zda zvýšené hladiny BAFF mají vliv na hladiny autoprotilátek, či případně obráceně; mění-li se v čase a jsou-li jejich změny vázány na aktivitu onemocnění a na její vývoj.

B) Hodnocení exprese receptorů pro BAFF ve svalu a vztah k IFN I. typu:

- Zda jsou v infiltrátech postiženého svalu nemocných přítomny buňky B lymfocytární linie a zda tyto buňky exprimují receptory pro BAFF.
- Zda jsou v oblastech exprese receptorů pro BAFF známky přítomnosti IFN I. typu a buněk, které jej tvoří, a zda tyto známky kvantitativně korelují s expresí receptorů pro BAFF.
- Zda je tato exprese asociována s přítomností autoprotilátek proti Jo-1 a/nebo Ro52 v sérech nemocných (vzhledem k prokázané inducibilitě IFN I. typu séry obsahujícími tyto autoprotilátky).
- Zda jsou v sérech nemocných s IZM změněny hladiny IFN α a jaký mají případný vztah k postižení svalu.

C) Analýza exprese transkripčních variant BAFF na úrovni mRNA:

- Zda se poměr dvou různých transkripčních variant u nemocných s IZM liší oproti zdravým jedincům.

D) Studium možné synergie BAFF a PBEF (visfatinu):

- Zda má PBEF podobný vztah k aktivitě myozitidy a autoprotilátkám jako BAFF.
- Pokud ano, jsou-li hladiny PBEF a BAFF v sérech nemocných s IZM vzájemně asociované a jsou-li podobně ovlivněné léčbou.
- Zda je PBEF přítomen v postiženém svalu nemocných s IZM.
- Zda je PBEF asociován s počty B lymfocytů a zda po jejich depleci dochází k podobnému vývoji hladin PBEF jako bylo popsáno u BAFF.

Ke zodpovězení těchto otázek jsme provedli sedm studií, jejichž výsledky jsou předloženy v této dizertační práci ve formě publikací v impaktovaných časopisech. Dále je přiložena oponovaná přehledná práce.

A) Kvantitativní analýza sérových hladin BAFF u nemocných s IZM.

1. Kryštůfková O, Vallerskog T., Barbasso Helmers S., Mann H., Půtová I., Běláček J., Malmström V., Trollmo C., Vencovský J., Lundberg IE. *Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies.*

Ann Rheum Dis.2009; 68 (6): 836-843. IF: 12,811

2. Kryštůfková O, Hulejová H, Mann H, Pecha O, Půtová I, Ekholm L, Lundberg IE, Vencovský J *Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1 positive polymyositis and dermatomyositis*

Arthritis Res Ther - Submitted manuscript ARRT-D-18-00153, IF: 4,121

B) Expres receptorů pro BAFF v postiženém svalu a vztah k IFN.I. typu

3. Kryštůfková O, Barbasso Helmers S, Venalis P, Malmström V, Lindroos E, Vencovský J, Lundberg IE. *Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies.*

Arthritis Res Ther. 2014;16 (5): Article Nr. 454: pp 1-13. IF: 4,121

4. Król P, Kryštůfková O, Polanská M, Mann H, Klein M, Beran O, Vencovský J. *Serum levels of IFN α do not correlate with disease activity in patients with dermatomyositis / polymyositis.*

Ann Rheum Dis, 2011;70 (5): 879-880. IF: 12,811

C) Expres mRNA transkripčních variant BAFF na úrovni mRNA

5. Remáková M, Svitálková T, Faustová M, Vencovský J, Novota P, Kryštůfková O. *The two mRNA transcription variants of the B-cell activating factor are differentially expressed, but in a stable ratio.*

Clin Exp Rheumatol 2014 Sep-Oct;32(5):763-764. IF: 2,634

D) Studium možné synergie BAFF a PBEF (visfatinu):

6. Hulejová H, Kryštůfková O, Mann H, Klein M, Pavlíčková K, Zámečník J, Vencovský J, Šenolt L. *Increased visfatin levels are associated with higher disease activity in anti-Jo-1-positive myositis patients.*

Clin Exp Rheumatol 2016; 34(2):222-229 IF: 2,634

7. Šenolt L*, Kryštůfková O*, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Andrés Cerezo L, Běláček J, Haluzík M, Forejtová Š, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. *The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy.*

Cytokine. 2011; 55 (1): 116-121. IF: 3,488

* Sdílené první autorství.

Přehledný článek

Kryštůfková O. *Cytokiny BAFF (B-cell activating factor) a APRIL (a proliferation-inducing ligand) a jejich role u autoimunitních onemocnění.* Čes Revmatol 2008; 16 (1): 9-15.bez IF (recenzovaný)

Podíl na předložených publikacích

Na předložených publikacích jsem se podílela účastí na přípravě návrhů studií č 1, 2, 3, 4 a 6 a 7 a dále jsem provedla tyto práce:

Studie 1: provedla jsem ELISA testy a jejich vyhodnocení, vytvořila databázi klinických a laboratorních dat, koordinovala interpretaci stanovení autoprotilátek, provedla základní statistické analýzy a grafickou dokumentaci, koordinovala provedení mnohorozměrných statistických testů, sepsala draft rukopisu a dokončila jej spolu se spoluautory.

Studie 2: koordinovala jsem ELISA testy a jejich vyhodnocení, vytvořila jejich databázi klinických a laboratorních dat, koordinovala vyšetření a interpretaci průkazu anti Jo-1 autoprotilátek, provedla základní statistické analýzy a grafickou dokumentaci, koordinovala provedení mnohorozměrných statistických testů, sepsala draft rukopisu a dokončila jej spolu se spoluautory.

Studie 3: provedla jsem imunohistochemická barvení, jejich vyhodnocení a koordinovala vyhodnocení dalšími nezávislými hodnotiteli, koordinovala imunofluorescenční barvení a jeho vyhodnocení konfokální mikroskopií, titrace protilátek a optimalizace blokačních postupů obou metod. Provedla statistické analýzy, vytvořila obrazovou a fotografickou dokumentaci, sepsala draft rukopisu a dokončila jej spolu se spoluautory.

Studie 4: koordinovala jsem optimalizaci multiplexové analýzy IFN α s vyhodnocením na průtokovém cytometru, podílela se na měření a interpretaci výsledků, statistické analýze a psaní rukopisu.

Studie 5: podílela jsem se na interpretaci výsledků a psaní rukopisu.

Studie 6: vytvořila jsem databázi klinických a laboratorních dat, podílela se na výběru biologického materiálu pro studii a interpretaci ELISA testů a vyhodnocení imunohistochemických barvení, provedla statistické analýzy a vytvořila grafickou dokumentaci, podílela se na sepsání rukopisu ve sdíleném prvním autorství (které však nebylo uvedeno v tisku).

Studie 7: podílela jsem se na interpretaci ELISA testů a tvorbě databáze klinických a laboratorních dat, koordinovala a částečně provedla cytometrická měření a analýzy, provedla statistické analýzy a vytvořila grafickou dokumentaci, podílela se na sepsání rukopisu ve sdíleném prvním autorství.

4. Materiál a metody

4.1. Nemocní

Níže je uveden způsob výběru pacientů při zařazování do jednotlivých studií, které jsou součástí práce. Složení skupin je vypsáno v tabelárním přehledu (tab. 4.1.) a demografické charakteristiky jsou uvedeny v metodice plných znění článků (viz přílohy 1-7). Všichni nemocní podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii schválený etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze.

Studie 1-3 vznikly ve spolupráci s myozitickou skupinou prof. Ingrid E. Lundberg z Kliniky Revmatologie, Karolinska University Hospital Solna, Karolinska Institute (KI) Stockholm, Sweden a účast švédských pacientů byla schválena etickou komisí Karolinska Hospital Nord, Stockholm.

Tabulka 4.1. Základní charakteristiky skupin nemocných s IZM zahrnutých do studií 1-6. Uvedeny počty (%) pacientů zařazených do studií.

	Průřezová studie hladin BAFF v séru	Hladiny BAFF a anti-Jo-1 v séru v čase	Expresce receptorů pro BAFF ve svalu	Hladiny IFN α v séru a MRI svalů	Expresce mRNA pro BAFF v PBMC	Korelace hladin BAFF a visfatinu v séru
Studie	1. [222]	2. [*]	3. [223]	4. [224]	5. [225]	6. [226]
Všichni nemocní	99	63	23	43	26	38
DM	49	22	11	24	NA	27
PM	44	41	6	19	NA	11
IBM	6	-	6	-	NA	-
Časné případy (\leq 6 měsíců)	27 (27%)	30 (48%)	9 (23%)	NA	NA	NA
Opakované odběry	-	58	-	-	-	16
ILD	43 (43%)	48 (76%)	7 (30%)	26 (60%)	NA	32 (84%)
Autoprotilátky						
anti-Jo-1	34 (34%)	63 (100%)	6 (26%)	26 (60%)	NA	38 (100%)
anti-Ro52/60	26 (26%)	33 (52%)	5 (22%)	NA	NA	15 (40%)
anti-Mi-2	11 (11%)	-	-	NA	NA	-
anti-PM-Scl	11 (11%)	-	-	NA	NA	-
anti-Ku72/86	13 (13%)	-	-	NA	NA	-
Bez autoprotilátek	39 (39%)	-	10 (43%)	17 (40%)	NA	-
Kontroly - zdravé	30	25	7	25	18	25
- akutní virová infekce	-	-	-	6	-	-

Legenda: DM, dermatomyozitida; IBM, myozitida s inklusními tělísky; ILD, intersticiální plicní nemoc; NA, nehodnoceno; PBMC, mononukleární buňky periferní krve; PM, polymyozitida; RÚ, pacienti z Revmatologického ústavu Praha; *odesláno do tisku ART

4.1.1. Studie 1: Průřezová studie hladin BAFF v séru

V prvním hodnocení hladin BAFF v séru nemocných myozitidami bylo vyšetřeno 99 prospektivně sledovaných pacientů s DM (n=49), PM (n=44) nebo IBM (n=6), cíleně vybraných tak, aby byly zahrnuty nemocní s nejčastějšími myositis specifickými a asociovanými autoprotilátkami. Proto zastoupení autoprotilátek u zařazených pacientů neodpovídala publikovaným frekvencím v populacích IZM [4, 11, 73, 227].

Iniciálními aspekty výběru nemocných byla přítomnost či chybění autoprotilátek proti Jo-1 a Ro52/60, zvolené na podkladě předchozí studie role těchto autoprotilátek v indukci IFN I. typu [46], o kterém je známo, že stimuluje tvorbu cytokinu BAFF. V první pilotní fázi bylo vyšetřeno 28 pacientů sledovaných na klinice Revmatologie ve Stockholmu s a bez těchto autoprotilátek. Vedení předběžnými výsledky jsme rozšířili projekt o výběr 71 pacientů z národního registru revmatických chorob Revmatologického ústavu v Praze (RÚ), kteří měli anti-Jo-1, anti-Mi-2 nebo anti-PM-Scl protilátky anebo neměli známé autoprotilátky (viz tabulka 4.1.).

Obě kohorty měly srovnatelné demografické a klinické charakteristiky [222], kromě vyššího věku a doby trvání Švédských pacientů, což však nemělo vztah k hladinám BAFF v séru, takže jsme mohli provést souhrnnou analýzu obou skupin najednou. Kontrolní skupinu tvořilo 30 věkem a pohlavím srovnatelných zdravých osob.

4.1.2. Studie 2: Dlouhodobé sledování hladin BAFF a anti Jo-1

Vzhledem k průkazu asociace zvýšených hladin BAFF s pozitivitou anti-Jo-1, jsme do další studie zařadili všechny nemocné, u kterých jsme zjistili přítomnost těchto autoprotilátek během devítiletého období a kteří byli dlouhodobě sledováni v rámci registru RÚ v Praze (n=53). Současně jsme vyšetřili 10 prospektivně sledovaných pacientů v KI Stockholm. Z celkem 63 pacientů, 41 mělo diagnózu pravděpodobné nebo definitivní PM a 22 mělo DM. Dále bylo zařazeno 25 sér od věkem a pohlavím srovnatelných, zdravých kontrol (viz tabulka 4.1.).

K posouzení variability hladin BAFF a anti-Jo-1 v séru v čase a vývoje asociací s aktivitou myozitidy byly vyšetřeny opakované odběry provedené při běžných klinických kontrolách spolu s klinickým hodnocením aktivity. Celkem bylo vyšetřeno 143 vzorků sér. Nejstarší vzorky od každého pacienta byly použity pro průřezové hodnocení. Párové vzorky ze dvou odběrů od 46 nemocných a odběry ze 3 až 5 časových bodů od 23 pacientů byly použity pro hodnocení v čase.

4.1.3. Studie 3: Expresí receptorů pro BAFF ve svalu

Expresi receptorů pro BAFF v postižené svalové tkáni jsme studovali u 23 pacientů s diagnózou definitivní nebo pravděpodobné PM (n=11), DM (n=6) nebo IBM (n=6) zařazených podle positivity nebo negativity autoprotilátek proti Jo-1 a Ro52. Tato skupina nemocných byla dlouhodobě sledována na Revmatologické jednotce, KI ve Stockholmu a již dříve referována v práci zaměřené na roli autoprotilátek v indukci IFN I. typu u myozitidy [46]. Kontroly tvořily bioptické vzorky sedmi zdravých osob.

4.1.4. Studie 4: Hladiny IFN α v séru nemocných s IZM.

Vzhledem k tomu, že nejvyšší hladiny BAFF v séru měli pacienti s anti Jo-1 autoprotilátkami, které zřejmě mají patogenetickou roli mechanismem indukce IFN I. typu [46] a je prokázáno, že IFN I. typu stimuluje produkci BAFF, měřili jsme také hladiny IFN α u skupiny nemocných s myozitidami obohacené o pacienty s anti-Jo-1 autoprotilátkami. Z originální kohorty 81 pacientů s PM a DM

registru RÚ v Praze jsme vybrali nemocné, kteří měli vyšetření svalů magnetickou rezonancí a s ohledem na přítomnost protilátek proti Jo-1.

Vyšetřili jsme celkem 43 sér nemocných s DM/PM (n=24/19) rozříděných podle terapie do odběru do 3 skupin na neléčené (Skupina 1= G1; n=19; 44%), léčené kortikoidy v dávce prednisonu \leq 20mg/den (Skupina 2 = G2; n= 15; 35%) a nemocné, kteří užívali > 20mg prednisonu denně (Skupina 3 =G3; n=9; 21%). Kontrolní skupiny tvořilo 25 zdravých jedinců (C1) a k ověření citlivosti metody stanovení IFN α jsme zařadili 6 nemocných s virovou infekcí (C2).

4.1.5. Studie 5: Expres transkripčních variant BAFF genu

Do studie hodnocení exprese dvou transkripčních variant BAFF genu jsme zařadili 26 nemocných s myozitidou a 18 zdravých kontrol kavkazské etnicity z registru RÚ Praha. Pacientské vzorky byly zařazeny a analyzovány bez ohledu na autoprotilátkový profil (viz tabulka 4.1.).

4.1.6. Studie 6: Asociace hladin BAFF a PBEF v séru u DM/PM

K zhodnocení vztahu cytokinu BAFF k adipocytokinu PBEF (pre-B cell colony-enhancing factor) u nemocných s myozitidami jsme vyšetřili 38 anti-Jo-1 pozitivních pacientů s (27 PM a 11 DM) opět z registru RÚ. K posouzení vývoje PBEF v čase jsme vyšetřili párové vzorky ze dvou opakovaných odběrů u 16 nemocných. Kontrolní skupinu tvořilo 25 věkem a pohlavím srovnatelných zdravých jedinců.

Vzorky svalové biopsie pro imunohistochemii od pacientů s PM (n = 5) a DM (n = 5) byly odebrány z postižených svalů po stanovení diagnózy a po vyšetření magnetickou rezonancí (MRI) [228] a před zahájením léčby. Jako nezářlivé kontroly byly použity vzorky svalové tkáně od pacientů s myasthenia gravis bez lymfocytární infiltrace (MG, n = 5), které byly získány v průběhu tymektomie.

4.1.7. Studie 7: Vliv B depleční terapie na hladiny BAFF a PBEF u nemocných s RA.

Protože je známý trend ke zvýšení BAFF po léčbě rituximabem (RTX), adipocytokin PBEF (visfatin) je prozánětlivým mediátorem u RA a oba cytokiny mají úlohu v diferenciaci B lymfocytů, hodnotili jsme jejich vzájemný vztah a vývoj po B-depleční léčbě RTX. Vyšetřili jsme tak 31 pacientů s aktivní RA před a 16 týdnů po podání RTX z českého registru biologické léčby ATTRA v RÚ. U 24 z nich předcházela neadekvátní odpověď na TNF α blokující léčbu. Kontrolní skupinu tvořilo 33 věkem a pohlavím srovnatelných zdravých jedinců.

4.2. Diagnóza a fenotyp IZM

Ve všech studiích byla diagnóza pravděpodobně nebo definitivní DM či PM stanovena podle kritérií Bohana a Petera (viz tabulka 4.2. [32, 33]) a diagnóza IBM byla založena na Griggsových kritériích (viz tabulka 4.3. [34]). Klinická a laboratorní data vztahující se k fenotypu a aktivitě myozitidy byla sbírána prospektivně v rámci registrů obou pracovišť (RÚ a KI), které se později staly součástí Evropské databáze - EuroMyositis (<https://www.euromyositis.eu/>). Chybějící data byla v jednotlivých případech doplněna z patientských záznamů. Plicní postižení (ILD) bylo ve všech studiích definováno na podkladě patologického nálezu na rentgenu nebo HRCT (výpočetní tomografie s vysokým

rozlišením) plic (density mléčného skla, voštinovitá přestavba, trakční bronchiektasie a další přestavbové změny) nebo snížení funkčních testů ve spirometrii (vitální kapacita pod 80% náležité hodnoty) nebo difusní kapacity plic (DLCO < 80% náležité hodnoty) [24].

ILD a ostatní extarmuskulární projevy (kožní raš, Raynaudův fenomén, ruce mechanika, Sjögrenův syndrom a artritida) byly registrovány kdykoliv v anamnéze a během sledování.

Tabulka 4.2.: Kritéria PM/DM dle Bohana a Petera, dle [32, 33].

Vyloučení jiných forem myopatií			
1. Symetrická svalová slabost pletencových svalů, obvykle progresivní			
2. Bioptický průkaz myozitidy ve svalu Nekróza svalových vláken I a II typu, fagocytóza, degenerace a regenerace svalových vláken s kolísáním jejich velikosti, infiltráty mononukleárních buněk v endomysiu, perimysiu, perivaskulárně nebo v intersticiu			
3. Zvýšení svalových enzymů v séru CK, Adoláza, LDH, Aminotransferázy (ALT/SGPT a AST/SGOT)*			
4. EMG myopatická triáda – Krátké, malé potenciály motorických jednotek, polyfázické a nízké amplitudy – Fibrilace i klidové – Bizarní repetitivní výboje o vysoké frekvenci			
5. Raš - kožní projev charakteristický pro dermatomyozitidu			
Polymyozitida		Dermatomyozitida	
Definitivní	4 z 1 - 4	Definitivní	raš a 3 z 1 - 4
Pravděpodobná	3 z 1 - 4	Pravděpodobná	raš a 2 z 1 - 4
Možná	2 z 1 - 4	Možná	raš a 1 z 1 - 4

*CK, kreatin kináza; LDH, Laktát dehydrogenáza

Tabulka 4.3.: Diagnostická kritéria pro IBM dle Griggse a spol. dle [34].

1.	Trvání potíží nejméně 6 měsíců
2.	Věk začátku onemocnění nejméně 30 let
3.	Svalová slabost proximálních a distálních svalů paží a nohou a přítomnost nejméně jednoho z následujících projevů: <ul style="list-style-type: none"> 1. Slabost flexorů prstů 2. Na zápěstí je slabost flexorů > slabost extenzorů 3. Slabost kvadricepsů
4.	Zvýšení CK* v séru > 12-ti násobek nad normou
5.	Bioptický nález ve svalu: <ul style="list-style-type: none"> 1. Mononukleární infiltrát invadující non-nekrotická svalová vlákna 2. Vakuoly ve svalových vláknech 3. Intracelulární depozita amyloidu nebo tubulofilamenta v elektronové mikroskopii.
6.	EMG obraz zánětlivé myopatie

*CK, kreatin kináza

4.3. Hodnocení aktivity IZM

4.3.1. Laboratorní aktivita

Svalové postižení bylo laboratorně hodnoceno podle sérových hladin tzv. svalových enzymů CK, ALT, AST, LDH a myoglobinu. K posouzení systémové zánětlivé aktivity byla ve všech studiích hodnocena hladina C-reaktivního proteinu (CRP). Tato vyšetření proběhla v rutinních laboratořích RÚ nebo KI se srovnatelnými referenčními mezemi [222], případně dodatečně vyšetřena ze sér zahrnutých do studie.

4.3.2. Klinická aktivita

Klinická aktivita byla standardizovaně hodnocena pomocí Myositis Disease Activity Assessment Tool (MDAAT) podle doporučení IMACS (International Myositis Assessment and Clinical Studies Group) [229].

4.3.3. Aktivita podle MRI

Míra svalového postižení byla ve studii 4. hodnocena také vyšetřením MRI svalů ve zobrazení s potlačením signálu tuku sekvencí STIR (short tau inversion recovery). Intenzita a rozsah otoku a celkové postižení byly kvantifikovány pomocí 10 cm vizuálně analogové škály [228].

4.4. Hodnocení aktivity RA

Aktivita RA byla hodnocena použitím indexu aktivity DAS28 (disease activity score), založeného na počtu bolestivých a oteklých kloubů ze 28 hodnocených, sedimentaci erytrocytů a celkového hodnocení aktivity pacientem na VAS škále.

4.5. Serologické testy

4.5.1. Detekce autoprotilátek

Myositis specifické (MSA) a myositis asociované (MAA) autoprotilátky byly stanoveny pro všechny studie s využitím souprav pro line blot (Inno-Lia ANA Update line blot assay, Innogenetics, Ghent, Belgium and Myositis-LIA, IMTEC, Berlin, Germany) a western blot (Anti-Myositis–Antigen EUROLINE-WB kit, Euroimmun, Lubeck, Germany) [222], které zahrnovaly následující specifity Jo-1/HRS, SmB, SmD, ribonukleoprotein (RNP)-70K, RNP-A, RNP-C, Ro52/SSA, Ro60/SSA, La/SSB, Centromera B, Topoisoméráza-1/Sc170, Ribozomální P antigen, histony, Mi-2, PM-Sc1/100, U1-SnRNP, Ku72/86, PL-7 a PL-12. Kritériem negativity anti-Jo-1 a anti-Ro52 protilátek byl negativní výsledek všech třech testů.

4.5.2. ELISA testy

Hladiny BAFF, APRIL a Visfatinu v sérech nemocných byly měřeny pomocí souprav ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) podle instrukcí výrobce (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA / Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria / BioVision Research Products, Mountain View, USA).

Kvantitativní stanovení autoprotilátek proti Jo-1 bylo provedeno soupravou ELISA (Orgentec, Mainz, Germany) s hraniční hodnotou pozitivita <15kU/l a šedou zónou 15-25kU/l. Pozitivita anti-Jo-1 ve vzorcích s hodnotami v oblasti šedé zóny byla ověřena výše uvedenými metodami (viz bod 4.5.1).

Stanovení autoprotilátek proti citrulinovaným proteinům/peptidům (ACPA) a revmatoidního faktoru IgM (IgM-RF) byla provedena soupravami ELISA (Test Line s.r.o., Czech Republic).

4.5.3. IFN alfa

Kvantitativní stanovení hladin IFN α v séru bylo provedeno pomocí Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (Human IFN-alpha FlowCytomix Simplex, Bender MedSystems) s vyhodnocením na průtokovém cytometru CyAn^{ADP}.

4.6. Vyšetření svalových biopsií

4.6.1. Svalová biopsie

Vzorky postižených svalů pro histochemické stanovení byly odebrány polootevřenou technikou [230]. Sériové kryostatové řezy, šíře 5 nebo 7 μ m, byly fixované ve 2% formaldehydu [46] a zamraženy při -80°C do stanovení. K zajištění konzistence přítomnosti zánětlivých infiltrátů v sériových řezech byl vždy první a poslední vzorek série obarven hematoxylinem a eozinem a vyhodnocen před zařazením série do studie.

4.6.2. Imunohistochemie

4.6.2.1. Expresce receptorů pro BAFF ve svalů.

Pro imunohistochemické barvení receptorů pro BAFF a identifikaci buněk zánětlivého infiltrátu ve studii 3 jsme barvili sériové řezy svalových biopsií primárními myšími monoklonálními protilátkami proti receptorům BAFF-R, BCMA a TACI (ZymoGenetics, Seattle, WA), se zařazením protilátek proti CD19 a CD138 (Dako, Glostrup, Dánsko) do série, podle předpokládané exprese receptorů BAFF-R, BCMA a TACI na B lymfocytech nebo plazmatických buňkách. K potvrzení specificity značení bylo použito izotypových kontrol.

Barvili jsme peroxidázovou metodou (Vectastain ABC Elite Kit; Vector, Burlingame, CA), kdy jsme po inkubaci se sekundární biotinylovanou polyklonální koňskou-anti-myší protilátkou provedli vizualizaci avidinovým konjugátem s peroxidázou a 3,3'-diaminobenzidinem (DAB substrate kit, Vector, Burlingame, CA) s dobarvením jader Mayerovým hematoxylinem. Postup zavedený ve studii s IFN α , na kterou jsme navazovali [46], jsme modifikovali několikasupňovou blokadí nespecifického barvení a kromě bloku endogenní peroxidázy a biotinu (Vector, Burlingame, CA) jsme zařadili také blok koňským sérem [223]. Vzhledem k heterogenitě v přítomnosti B lymfocytů a plazmatických buněk a v expresi receptorů pro BAFF ve svalových infiltrátech jednotlivých pacientů jsme k titraci primárních protilátek použili, jako pozitivní kontroly, vzorky lidských tonsil.

Kvantitativní odečtení kódovaných vzorků jsme provedli na světelném mikroskopu (Reichert-Jung Polyvar 2; Leica, Vienna, Austria). Hodnotili jsme počty buněk v mm² svalové tkáně, nesoucí

receptory pro BAFF a znaky CD19 a CD138. Do vyhodnocení jsme pak použili průměrné hodnoty odečtů tří nezávislých hodnotitelů.

Expresi receptorů jsme mohli porovnat s přítomností proteinu MX-1, jako známky přítomnosti interferonu I. typu a znaku plazmacytoidních dendritických buněk BDCA-2 (blood dendritic cell antigen-2; CD303) na dříve značených řezech stejné série díky shodě mezi konvenční mikroskopií a počítačovou analýzou obrazu (Leica QWin software na mikroskopu DMRXA2; Leica, Wetzlar, Germany) použitou pro vyhodnocení celkové exprese MX-1 a BDCA-2 pozitivních buněk [46].

4.6.2.2. Exprese PBEF/visfatinu ve svalu

Pro imunohistochemický průkaz exprese visfatinu (studie 6) ve svalové tkáni nemocných s myozitidou a v kontrolní nezánetlivé tkáni byla použita imunoperoxidázová metoda barvením mražených biotických řezů primární králičí polyklonální protilátkou anti-PBEF (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA) s vizualizací pomocí Histofine detection system (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) a 3,3'-diaminobenzidinu a dobarvením Harrisovým hematoxylinem.

Všechny řezy byly analyzovány semikvantitativně dvěma zkušenými patology na spolupracujícím pracovišti v Ústavu patologie 3. LF UK. Intenzita exprese visfatinu byla hodnocena na čtyřbodové škále (0-3) v sedmi oblastech řezu (zánětlivý infiltrát, perimysialní cévy, kapiláry endomysia, svalová vlákna, regenerující a atrofická svalová vlákna a rhabdomyoblasty).

4.6.3. Imunofluorescence a konfokální mikroskopie.

Expresi receptorů pro BAFF na B lymfocytech a plazmatických buňkách v zánětlivých infiltrátech svalů byla ověřena dvojitým značením metodou nepřímé imunofluorescence. Byly použity svalové řezy ze stejné série jako pro imunohistochemii s blokovacími kroky lidským a zvířecími séry. Po značení primárními protilátkami proti receptorům BAFF-R a BCMA a znakům CD19 a CD138 a následné inkubaci se sekundárními protilátkami (s biotinylovanou koňskou-anti-myší respektive oslí-anti-kozí značenou fluorochromem Alexa Fluor 594) byly řezy inkubovány s konjugátem streptavidin-Alexa Fluor 488. Jádra byla doznačena 4',6-diamidino-2-phenylindolem (DAPI). Pro detekci imunofluorescence byl použit konfokální mikroskop a software Leica QWin (Leica, Wetzlar, Germany).

4.7. Transkripční varianty BAFF

Stanovení exprese mRNA transkripčních variant *BAFF genu* (plné Full-length = FL-BAFF a zkrácené varianty = Δ BAFF) bylo provedeno metodou kvantitativního real time PCR. Po extrakci RNA z plné krve s použitím soupravy RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) byla provedena amplifikace pro oba transkripty BAFF genu s primery 5'-AGAAATAAGCGTGCCGTTTCAG-3' a 5'-AGAAGCCATGGAACAAATGTG-3'. Pro identifikaci transkripčních variant bylo použito specifických MGB sond (Life Technologies, USA); pro FL variantu BAFF: 5'-CAGAAGAAACAGGATCTT-3'-VIC a pro Δ BAFF: 5'-AGTCACTCAAGACTGCTT-3'-6-FAM (Applied Biosystems, Warrington, UK). Detekce exprese mRNA byla provedena pomocí ABI 7900 RT

cyklu s použitím SYBR® Green (Life Technologies, USA) s normalizací na 2 referenční house-keeping geny (*B2M*, *GAPDH*). Expresní hladiny obou mRNA transkripčních variant BAFF byly vyjádřeny jako normalizované delta Ct hodnoty.

4.8. Imunofenotypizace

Imunofenotypizace mononukleárních buněk periferní krve, izolovaných na hustotním gradientu, byla provedena metodou průtokové cytometrie s využitím přímo značených monoklonálních protilátek CD19-PB, CD3-FITC, CD45-CY a CD14-APC-Cy7 (Dako, Glostrup, Denmark a BD Biosciences, San Jose, CA USA) na analyzátoru CyAn^{ADP} (Dako, Colorado, USA). Analýza byla provedena pomocí software Summit a B buňky byly definovány jako CD19⁺/CD45⁺/CD14⁻/CD3⁻ lymfocyty.

4.9. Statistika

Vzhledem k nenormální distribuci dat jsme ke statistickým analýzám využili neparametrických testů. K porovnání skupin byl použit Kruskal-Wallisův test s Dunnovým post hoc testem a Mann-Whitneův U test. K párovému srovnání byl použit Wilcoxonův test a ke korelačním analýzám Spearmanův pořadový test a jeho varianta pro parciální korelace. Využili jsme statistické balíky GraphPad Prism (verze 3.03 a 5.02; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) a SPSS (verze 14.0 a 17.0, SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA).

Pro analýzu vztahu vzájemně korelovaných proměnných jsme použili vícerozměrné analýzy rozptylu ANOVA na logaritmicky transformovaných hodnotách sérových hladin BAFF - jako závislé proměnné ve studii 1 a na hladinách CK v séru - jako závislé proměnné ve studii 2. Ve studii 1 byly dále vytvořeny hierarchické lineární modely vysvětlující rozptyl hodnot BAFF dalšími nezávislými proměnnými (aktivita podle hladiny CK, diagnóza PM/DM, přítomnost autoprotilátek a terapie). Ve studii 2 bylo použito strukturálního modelování k vysvětlení kauzálních vztahů mezi hladinami BAFF, anti Jo-1, CK a CRP v séru pomocí path analýzy (software package LISREL 8.8, Scientific Software International, Inc., Lincolnwood, IL.) [231, 232].

Pro analýzu vztahu opakovaných měření sérových hladin BAFF, anti Jo-1, CK a dalších hodnocení klinické aktivity myozitidy v čase byly vytvořeny dvojúrovňové hierarchické lineární modely samostatně pro hladiny BAFF, anti-Jo-1 a CK s použitím balíku HLM 6 [233].

5. Výsledky a diskuse

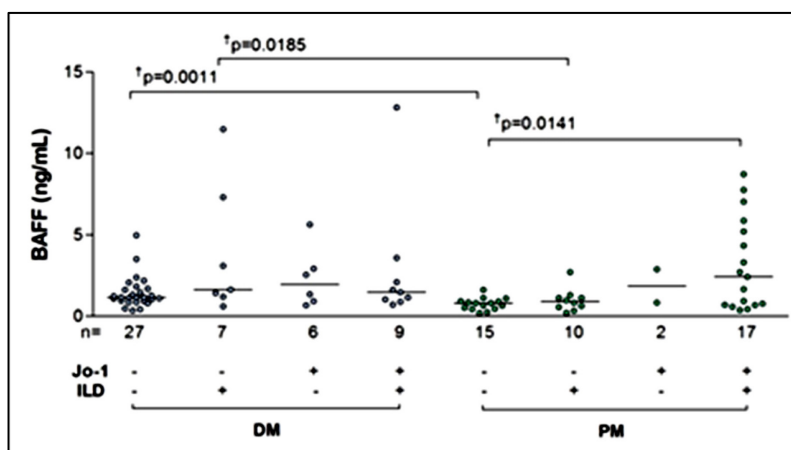
5.1. Studie 1 - BAFF, autoprotilátkový a fenotypový profil a léčba IZM

Průřezová studie hladin BAFF v séru měla zodpovědět dotaz, zda 1) jsou sérové hladiny BAFF odlišné u nemocných s IZM, 2) jsou-li případné odchylky ovlivněny přítomností autoprotilátek, či klinickým fenotypem a popřípadě 3) zda mají vztah ke svalovému postižení a 4) zda reagují na terapii. 5) Současně jsme chtěli zjistit, zda najdeme podobné změny hladin funkčně blízkého cytokinu APRIL (a proliferation-inducing ligand [129]).

1) Sérové hladiny BAFF byly u výběrové skupiny nemocných s IZM (metody 4.1.1) signifikantně vyšší než u zdravých osob, srovnatelně s nálezy u jiných systémových onemocnění [164-166, 168, 170, 171, 173, 175].

2) Nalezli jsme vyšší hladiny BAFF u nemocných s dermatomyozitidou oproti pacientům s polymyozitidou a jejich asociaci s postižením plic (ILD) a s protilátkami proti Jo-1. Pro úplnost je nutno zmínit, že tento nález nebyl specifický pouze pro anti-Jo-1 neboť vyšší hladiny BAFF měli také jednotliví pacienti s jinými autoprotilátkami. Naopak současná přítomnost protilátek proti Ro52 u ½ anti-Jo-1 pozitivních pacientů s mozitidou se v asociacích hladin BAFF neodrazila.

Vazba BAFF na autoprotilátky specifické pro diagnózu byla prokázána u dalších revmatických onemocnění - jako primární Sjögrenův syndrom (anti-SSA/Ro [173]), systémový lupus erythematoses (anti-dsDNA, anti-Sm [165, 168, 170, 172, 176-178]) a sklerodermie (anti-histony [164]). Potvrdili jsme tak v klinickém kontextu, že také u myozitidy má BAFF vliv na přežití a diferenciaci autoreaktivních B lymfocytů a produkci myositis-specifických autoprotilátek.



Obrázek 5.1.1.: Hladiny BAFF v séru u pacientů tříděných podle diagnózy (DM/PM) a klinického fenotypu charakterizovaného postižením plic (ILD) a protilátkami proti Jo-1.

Zvýšení hladin BAFF v sérech pacientů s polymyozitidou bylo vázáno na fenotypy charakterizované ILD a protilátkami proti Jo-1, zatímco u pacientů s dermatomyozitidou nemělo vazbu na autoprotilátky (Obr 5.1.1.).

Také v mnohorozměrném ANOVA modelu měla přítomnost anti-Jo-1 protilátek a ILD větší výpovědní hodnotu pro

vysvětlení variability sérových hladin BAFF, než tradiční dělení podle diagnózy DM a PM.

Klinický fenotyp pacientů se zvýšenými hladinami BAFF, charakterizovaný myozitidou, ILD a protilátkami proti Jo-1 odpovídá minimální definici antisynthetázového syndromu [28, 68]. To

podporuje současnou teorii, že jednotlivé autoprotilátkově-fenotypové podskupiny mají společné patogenetické mechanismy. Z tohoto hlediska by byla v dalších výzkumech vhodná subklasifikace IZM spíše podle autoprotilátkového profilu, než podle tradičních diagnostických jednotek DM/PM.

Skutečnost, že podskupina nemocných s dermatomyozitidou měla vyšší hladiny BAFF i bez přítomnosti anti-Jo-1 protilátek a postižení plic, ukazuje na možný podíl dalších B buněčných mechanismů, které nejsou vázané na přítomnost těchto autoprotilátek. Zvýšené hladiny BAFF zřejmě mohou být zprostředkované jednak fenotypově specifickými ale také společnými mechanismy, vázanými na interferony I. typu (IFN-1). IFN α může indukovat expresi BAFF [138]. Podobný fenotyp měli nemocní, jejichž séra vykazovala schopnost indukovat tvorbu IFN α *in vitro* [46]. Plazmacytoidní dendritické buňky, které jsou zdrojem IFN α byly nalezeny v kožních biopsiích pacientů s DM [45] a ve svalových biopsiích pacientů s PM a DM [42, 43, 234]. U nemocných DM byla již popsána nepřítomnost vazby exprese genů indukovatelných INF-1 na autoprotilátky [201]. Zvýšení hladin BAFF v séru bychom mohli klást do souvislosti s místní produkcí endogenního IFN-1 ve svalu u anti-Jo-1 pozitivních nemocných s PM a v kůži u nemocných s DM.

3) Pro vazbu těchto mechanismů na svalové postižení svědčí také asociace sérových hladin BAFF a kreatin kinázy v korelační a v mnohorozměrné analýze. To ukazuje na možnou variabilitu sérových hladin BAFF v čase vázanou na aktivitu myozitidy.

4) Další analýzy ukazují na senzitivitu hladin BAFF k terapii glukokortikoidy (GC). Negativně korelovaly s denní dávkou GC podávanou v období před odběrem a úžeji s kumulativní dávkou v prvním ½ roce léčby. Podobné asociace byly prokázány u systémového lupusu, nebo u systémové sklerodermie [165, 171]. Terapie také dominovala v ANOVA modelu vysvětlením variability hladin BAFF. Klinický účinek GC však není u některých pacientů dostatečný a naše nálezy ukazují na terapeutický potenciál blokády BAFF u pacientů s výše uvedeným fenotypem IZM.

5) V pilotní analýze sérových hladin cytokinu APRIL jsme neprokázali žádné asociace s diagnózou, autoprotilátkami, fenotypem či terapií a dále jsme se studiu tohoto cytokinu nevěnovali. Rozdíl mezi asociacemi BAFF a APRIL si vysvětlujeme jejich odlišnou regulací u revmatických onemocnění [235].

Příloha 1. Kryštůfková O, Vallerskog T., Barbasso Helmers S., Mann H., Půtová I., Běláček J., Malmström V., Trollmo C., Vencovský J., Lundberg IE. Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis.*2009; 68 (6): 836-843. IF: 12,811

5.2. Studie 2 - BAFF, anti-Jo-1 a aktivita myozitidy v čase

Na podkladě prokázané variability hladin BAFF u IZM [222] a vzhledem k recentně referovaným korelacím mezi hladinami anti-Jo-1 autoprotilátek a aktivitou myozitidy [65] jsme se rozhodli studovat vzájemné asociace sérových hladin BAFF a anti-Jo-1 protilátek, jejich vývoj v čase a jejich vztah k aktivitě myozitidy. K posouzení významnosti účasti BAFF na tvorbě anti-Jo-1 autoprotilátek a jejich kolísání v čase jsme provedli průřezové a longitudinální sledování hladin BAFF a kvantitativního stanovení protilátek anti-Jo-1 v séru metodou ELISA (4.3.2.) a jejich porovnání s aktivitou onemocnění hodnocenou standardizovanými indexy klinické aktivity (MDAAT) a hladinami kreatin kinázy (CK), myoglobinu a aminotransferáz (ALT, AST) v sérech nemocných všech dostupných anti-Jo-1 pozitivních nemocných s DM a PM (viz tab. 4.1. a odstavec 4.1.2.).

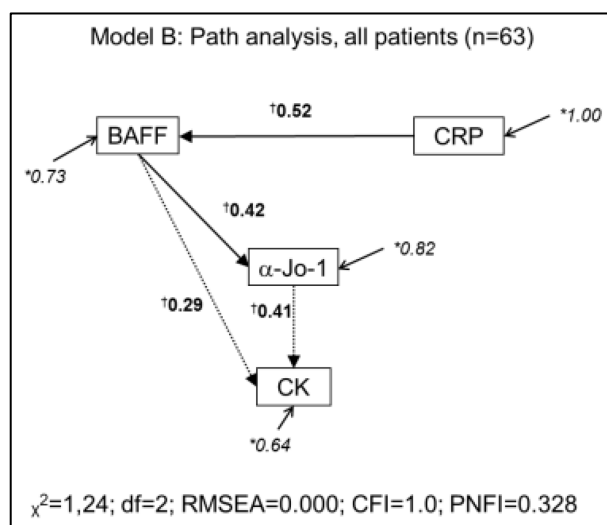
Chtěli jsme zjistit: 1) Zda zvýšené hladiny BAFF mají vliv na hladiny autoprotilátek, nebo obráceně a zda mají podobný vztah k aktivitě onemocnění, 2) mění-li se sérové hladiny BAFF a anti-Jo-1 v čase a 3) jsou-li jejich změny vázány na aktivitu onemocnění a na její vývoj.

1) V průřezovém hodnocení jsme prokázali významnou vazbu mezi sérovými hladinami BAFF a anti-Jo-1 protilátek a to především u pacientů s polymyozitidou a s ILD. Hladiny BAFF a anti-Jo-1 v séru korelovaly s laboratorními známkami svalového postižení (myoglobin, CK, AST) což potvrzuje předchozí nálezy [65, 222, 236]. S ohledem na variabilitu všech parametrů v čase byly asociace významnější na počátku onemocnění.

Pomocí path analýzy (odstavec 4.2.; obr. 5.2.1.) jsme zjistili, že BAFF má vliv na hladiny anti-Jo-1 a dále na svalové postižení (hladinu CK) a to jak přímý tak nepřímý prostřednictvím anti-Jo-1.

Korelace mezi hladinami BAFF a hodnocením kožní aktivity u nemocných s DM, spolu a již známými asociacemi BAFF a závažnosti kožního postižení u SSc a SLE [164, 171, 177] svědčí pro to, že aktivní kožní léze mohou být zdrojem zvýšených BAFF v cirkulaci.

Nepřítomnost rozdílů hladin BAFF mezi pacienty s diagnózou DM a PM, nebo s a bez postižení plic (ILD) potvrzuje předchozí nález vyšší diskriminační hodnoty anti-Jo-1 protilátek pro variabilitu hladin BAFF než třídění podle diagnózy, nebo postižení plic [222].



Obrázek 5.2.1.: Schematické zobrazení asociací mezi hladinami BAFF, anti-Jo-1 protilátek (α -Jo-1), CRP a CK v séru hodnocených pomocí path analýzy. Zobrazeny jsou signifikantní \dagger path koeficienty, *residuální rozptyly a parametry fitu (pod schématem). Šipky ukazují směr vlivů proměnných, které byly navrženy modelem a ze kterých můžeme usuzovat na možné kauzální vztahy.

2) Hladiny BAFF se měnily v čase více než anti-Jo-1 avšak s podobným trendem, především na počátku onemocnění. Zatímco variabilita hladin BAFF v čase spočívala ve změnách u jednotlivých pacientů, podstatná část variability anti-Jo-1 byla situována mezi pacienty. Kauzální vztah závislosti anti-Jo-1 na BAFF byl podpořen modelem HLM, který vysvětlil vysoké procento rozptylu anti Jo-1 sérovými hladinami BAFF, ale opačný vztah nebyl přítomen.

3) Prokázali jsme i vztah časového vývoje hladin BAFF i anti-Jo-1 se známkami svalového postižení v porovnání změn mezi dvěma odběry i v analýze dlouhodobého sledování HLM a navíc s klinickou aktivitou svalovou, plicní a celkovou.

Protilátky proti Jo-1 přestaly být u části pacientů měřitelné, spolu s významným poklesem hladin BAFF a známek aktivity svalové léze. Navíc změny BAFF a aktivity onemocnění v čase byly asociovány se vstupní dávkou kortikoidů.

4) Původně jsme chtěli potvrdit že BAFF není ukazatelem nespecifického zánětu vyloučením vztahu mezi sérovými hladinami BAFF a C-reaktivního proteinu (CRP) [222]. Proto byly asociace BAFF, anti-Jo-1 i aktivity myozitidy a svalového postižení s hladinami CRP neočekávaným nálezem. I když CRP není považován za ukazatele aktivity většiny systémových onemocnění (kromě RA), jsou důkazy o jeho roli v patogeneze plicního postižení [237-239]. U IZM měl CRP prediktivní hodnotu pro plicní postižení [71, 74, 240, 241] a také pro zhoršení plicních funkcí u pacientů s anti-Jo-1 pozitivní myozitidou a ILD [74]. Naši nemocní s ILD měli více vyjádřené asociace sérových hladin CRP s hladinami BAFF, anti-Jo-1 či svalových enzymů jak v průřezovém tak v longitudinálním sledování, avšak k plicní aktivitě vztah neměly.

V PA modelu měl CRP na svalové postižení (hladiny CK) jen nepřímý avšak signifikantní vliv, zprostředkovaný hladinami BAFF a anti-Jo-1 (obr. 5.2.1.). Vazby hladin BAFF a CRP byly prokázány také v několika studiích u nemocných se SLE [172, 176, 242]. Tento nález lze například vysvětlit schopností CRP indukovat sekreci solubilního biologicky aktivního BAFF myeloidními buňkami po vazbě na FcγRIIIa receptor [243]. To však vyžaduje další ověření.

Asociace sérových hladin BAFF a anti-Jo-1 protilátek a aktivity onemocnění v průřezovém hodnocení vstupních hodnot i v dlouhodobém sledování dále podporuje možnou roli BAFF v patogenezi anti-Jo-1 pozitivní myozitidy a činí BAFF novým atraktivním terapeutickým cílem, především u pacientů s PM a ILD.

Navíc, naše nálezy ukazují na to, že CRP by mohl hrát roli u IZM nejen jako ukazatel systémové aktivity ale i podílet se na mechanismech onemocnění ve vztahu k cytokinu BAFF u podskupiny nemocných s PM, ILD a autoprotilátkami. Molekulární mechanismy však vyžadují další výzkum.

Příloha 2. Kryštůfková O, Hulejová H, Mann H, Pecha O, Půtová I, Ekholm L, Lundberg IE, Vencovský J. Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) / BLyS correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and with disease activity in longitudinally followed patients with polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Res Ther* – Odesláno do tisku ARRT-D-18-00153

5.3. Studie 3 - Receptory pro BAFF ve svalu

Prokázali jsme asociaci zvýšených sérových hladin BAFF s autoprotilátkami proti Jo-1 a s markery svalového postižení u pacientů s IZM [222, 244]. Místo produkce autoprotilátek u IZM není známé, avšak nálezy B lymfocytů a plazmatických buněk (PC) infiltrátech svalových biopsií [52-56] se známkami klonální příbuznosti a lokální afinitní maturace B buněk a PC [57, 58] ukazují na možnou produkci autoprotilátek ve svalové tkáni. Dalším důkazem podmínek podporujících místní diferenciaci autoprotilátky produkujících buněk je průkaz exprese mRNA pro BAFF v myozitickém svalu [57, 180]. Exprese BAFF je indukována interferony I. typu (IFN-1; IFN- α/β) [138, 189]. Vzhledem ke známé inducibilitě IFN- α séry nemocných s myozitidou a autoprotilátkami proti Jo-1 a/nebo Ro52/60 [46] lze očekávat, že uvedené mechanismy jsou relevantní především u nemocných s těmito autoprotilátkami.

Studii exprese receptorů pro BAFF ve svalu jsme chtěli zjistit: 1) Zda jsou v infiltrátech postiženého svalu nemocných s myozitidou přítomné buňky B lymfocytární linie, které exprimují receptory pro BAFF.

2) Zda jsou v oblastech exprese receptorů pro BAFF známky přítomnosti IFN-1 (MX-1) a plazmacytoidních dendritických buněk (blood dendritic cell antigen 2; BDCA-2) a zda vzájemně kvantitativně korelují.

3) Zda má exprese receptorů pro BAFF vazbu na autoprotilátkový profil nemocných.

1) Do studie byli zařazeni proporcionálně nemocní s DM, PM a IBM či s protilátkami proti Jo-1, Ro52/60 a bez autoprotilátek (viz tab. 4 a odstavec 4.1.3.). Ve svalové tkáni jsme našli receptory BAFF-R, BCMA a TACI v různých oblastech mononukleárních infiltrátů. Podle lokalizace na sériových řezech byla exprese receptoru BAFF-R přítomna ve shlucích B lymfocytů s poměrně slabou expresí CD19. Zatímco značení BCMA a TACI bylo pozitivní v jiných místech infiltrátů a také na jednotlivých buňkách s morfologií plazmatických buněk a pozitivitou znaku CD138, které byly roztroušené ve svalové tkáni.

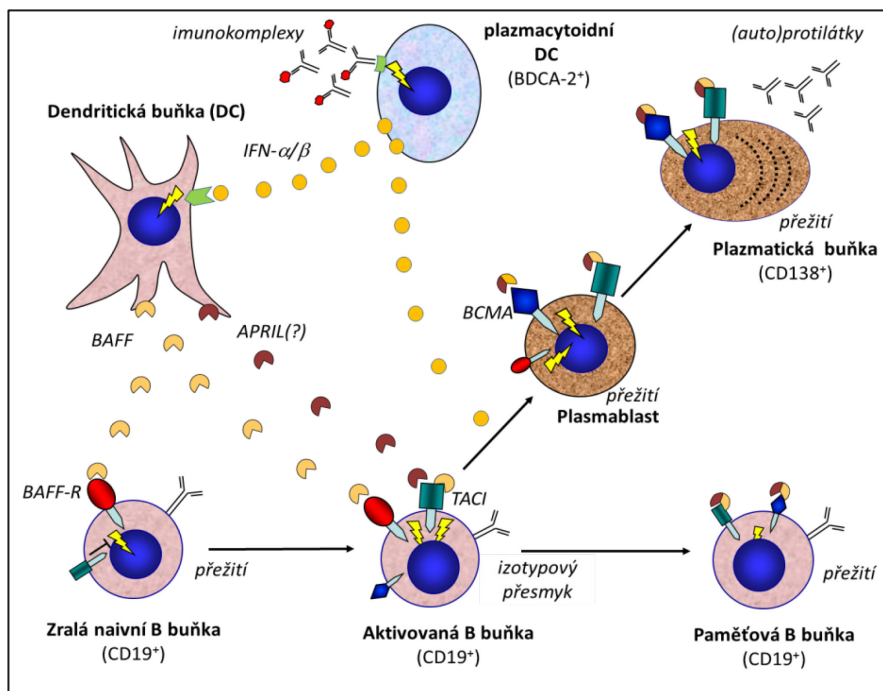
Koexpresi znaků B linie a receptorů pro BAFF odpovídající diferencované expresi receptorů pro BAFF (viz obr. 2.4, kapitola 2.2.3, [146, 147]) jsme v naší studii potvrdili imunofluorescenčním značením a konfokální mikroskopií. Tuto expresi, která odpovídá přítomnosti buněk různých diferenciačních stadií ve tkáních individuálních pacientů, odrážela i kvantitativní korelace receptorů a buněk B linie.

Převaha plazmatických buněk ve svalových biopsiích IZM již byla demonstrována i jinými autory [56-58]. Slabší barvení CD19 odpovídá snížení exprese CD19 na dlouho žijících prekurzorech plazmatických buněk u dalších systémových onemocnění [245-247], které provází diferenciaci B lymfocytů do protilátky produkujících buněk [248, 249].

2) Ve svalových biopsiích nemocných IZM byly nalezeny plazmacytoidní dendritické buňky (pDC), které jej tvoří a také protein indukovaný interferonem (myxovirus resistance-1 protein; Mx-1) [43, 46].

My jsme našli v sériových biopsických řezech postižené svalové tkáň našich pacientů místní i kvantitativní asociaci exprese receptorů pro BAFF na plazmatických buňkách s pozitivitou Mx-1, odpovídající přítomnosti IFN(α/β) i pDC podle exprese znaku BDCA-2. Expozice IFN- α/β také podporuje diferenciaci B buněk do plazmablastů a jejich přežití [190, 191]. BAFF a IFN-1 nejspíše navzájem interagují a lokálně se podílí na permisivním mikroprostředí pro diferenciaci autoreaktivních buněk B lymfocytární linie. To odpovídá lokální roli pDC a IFN-1 v diferenciaci B buněk. Naše nálezy, spolu s literárními údaji, podporují lokální diferenciaci B buněk, exprimujících receptory pro BAFF, (obr. 5.3.1.) a možnou produkci autoprotilátek přímo ve svalové tkáni pod vlivem přítomnosti IFN α/β a BAFF.

3) Receptory pro BAFF byly exprimovány častěji ve svalové tkáni pacientů s protilátkami proti Jo-1 nebo Ro52/60 v séru nežli u nemocných bez těchto autoprotilátek či u kontrol. Jejich exprese nebyla vázána na diagnózu PM, DM nebo IBM ani na terapii nebo trvání onemocnění. Přinášíme tak další důkazy pro potenciální účinek blokady BAFF přímo v postiženém svalu u fenotypu anti-Jo-1 pozitivní myozitidy.



Obrázek 5.3.1.: Schematické zobrazení předpokládaných mechanismů interakce dendritických buněk (DC), IFN I. typu (α/β) a lokální diferenciace B lymfocytů v myozitickém svalu. Plazmacytoidní dendritické buňky tvoří IFN- α/β po stimulaci imunokomplexy a indukují sekreci cytokinů BAFF a APRIL v konvenčních DC. Ty pak působí přežití B buněk. Receptory BAFF-R, BCMA a TACI jsou různě exprimovány na diferenciálních stadiích B lymfocytů (od naivních až po paměťové B lymfocyty a plazmatické buňky). Izotypový přesmyk, diferenciace plazmablastů a jejich přežití jsou také ovlivněny IFN- α/β . Přítomnost APRIL ve svalu je nejistá ale je známá jeho potřeba pro přesmyk izotypů imunoglobulinů. Je pravděpodobné, že infiltrující B buňky a plazmocyty jsou autoreaktivní a tvorba autoprotilátek může probíhat přímo ve svalu.

Příloha 3. Kryšťůvková O, Barbasso Helmers S, Venalis P, Malmström V, Lindroos E, Vencovský J, Lundberg IE.

Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2014;16 (5): Article Nr. 454: pp 1-13

5.4. Studie 4 - IFN α , anti-Jo-1, terapie a svalové postižení

Jak bylo řečeno, exprese BAFF je indukována interferony I. typu a expozice IFN-1 přispívá k diferenciaci B lymfocytů do plazmablastů a zvyšuje jejich rezistenci k Fas-zprostředkované apoptóze [190, 191]. V předchozí práci jsme zjistili místní i kvantitativní asociaci exprese receptorů pro BAFF na plazmatických buňkách se známkami přítomnosti IFN I. typu a plazmacytoidních dendritických buněk v bioptických řezech postižené svalové tkáně. Akutní zánět svalu u IZM způsobuje otok, který může být zobrazen nukleární magnetickou rezonancí (MRI).

Studiem hladin IFN α jsme chtěli zjistit:

1) Zda jsou hladiny IFN α v sérech nemocných s IZM změněny, zda jsou tyto případné změny vázány na diagnózu DM či PM nebo spíše na fenotyp charakterizovaný protilátkami proti Jo-1 či postižením plic.

2) Jaký mají případný vztah k tíži svalového postižení.

1) Sérové hladiny IFN α u našich pacientů s PM a DM neodrážely předpokládaný zvýšený obsah IFN α ve tkáni [250]. Naopak, byly nižší u nemocných než u zdravých kontrol i při ověření citlivosti metody vyšetřením sér pacientů s aktivní virovou infekcí. Tento nálezn nehodnotíme jako důsledek terapie, protože hladiny IFN α se nelišily v sérech pacientů odebraných před a po terapii. Hladiny IFN α v séru se u nemocných s DM a PM nelišily, což odpovídá popsanému expresnímu profilu IFN-1 indukovatelných genů [193]. Avšak že hladiny IFN α byly zvýšené v sérech pacientů s anti-Jo-1 protilátkami na rozdíl od pacientů bez autoprotiáték. Také nemocní s ILD měli trend k vyšším hladinám IFN α . To je v soulasu s popsanou kapacitou sér, které obsahují tyto autoprotiátky, indukovat IFN α [46], s nálezem zvýšené exprese transkriptů indukovaných IFN-1 v krvi nemocných s pozitivitou protilátek proti RNA-vázajícím proteinům (Jo-1, Ro60 a U1RNP) [201] a s prokázanou schopností sér pacientů s postižením plic indukovat IFN α [46].

2) IFN α se podílí v patogeneze myozitidy [43, 48, 194, 195], avšak my jsme nenašli očekávané zvýšení hladin IFN α u nemocných s těžším svalovým postižením podle hodnocení MRI ani s klinickou aktivitou myozitidy. Naopak; čím nižší byly hladiny IFN α tím těžší byl svalový edém na MRI. Hypoteticky by lokálně tvořený IFN α mohl být spotřebován ve svalu, a proto by nebyl uvolňován do cirkulace, což by odpovídalo již publikovanému nálezu vyšší exprese transkriptů indukovatelných IFN-1 ve svalu v porovnání s nálezem v krvi [197] a potvrdilo lokální mechanismus indukce prostředí permisivního pro diferenciaci autoprotiátky produkujících buněk (viz obrázek 5.3.1.). Nebo by za interferonový podpis v cirkulaci, charakteristický pro nemocné s DM a PM, mohl být zodpovědný jiný typ IFN ze skupiny IFN-1 nežli IFN α . U nemocných s DM byla vysoká exprese genů indukovatelných IFN-1 asociována pouze s hladinami proteinu IFN β v periferní krvi a nikoliv IFN α nebo IFN ω [251].

Příloha 4. Król P, Kryštůfková O, Polanská M, Mann H, Klein M, Beran O, Vencovský J. Serum levels of IFN α do not correlate with disease activity in patients with dermatomyositis / polymyositis. *Ann Rheum Dis*, 2011;70 (5): 879-880.

5.5. Studie 5 - Transkripční varianty BAFF

V předchozích studiích jsme prokázali, že hladiny BAFF v sérech pacientů s IZM mají významnou variabilitu mezi pacienty i v časovém průběhu u jednotlivých nemocných. Mohou být ovlivněny nejen syntézou BAFF proteinu ale i spotřebou a dostupností buněk nesoucích receptory vázající BAFF [125, 143, 252]. Dalším faktorem je exprese BAFF vázaného na membránách produkujících buněk. Stanovení hladin messenger RNA (mRNA) pro BAFF na buňkách periferní krve může být senzitivnějším a přesnějším ukazatelem aktivity BAFF v cirkulaci [188].

Kromě BAFF proteinu o plné délce (full-length; FL-BAFF) existují další transkripční varianty *BAFF genu* [186, 187] s různou funkcí. Zkrácený produkt alternativního sestřihu, s chybějícím 3. exonem (Δ BAFF), zřejmě může působit jako negativní regulátor FL-BAFF tak, že s ním tvoří heterotrimér a omezuje jeho odštěpení z buněčné membrány a následnou sekreci [186]. Rozpustné heterotriméry BAFF/ Δ BAFF se vážou na receptory pro BAFF s nižší afinitou nežli multiméry FL-BAFF čímž jej kompetitivně inhibují. U lidí zatím nebyl detekován protein odpovídající této variantě a jsou dostupné jen analýzy exprese Δ BAFF na mRNA úrovni. Není tedy známo do jaké míry se na zvýšených sérových hladinách BAFF proteinu podílí tyto dvě varianty.

Analýzou exprese transkripčních variant BAFF na úrovni mRNA jsme chtěli zjistit, zda se poměr těchto dvou různých transkripčních variant liší u nemocných s IZM od zdravých jedinců.

Expres FL-BAFF a Δ BAFF vykazovala trend k vyšším hodnotám u nemocných oproti zdravým kontrolám. V porovnání pacientů a zdravých kontrol, byla u nemocných exprese BAFF i Δ BAFF. K posouzení možné snížené inhibice FL-BAFF působením Δ BAFF u pacientů jsme analyzovali relativní poměr FL-BAFF/ Δ BAFF. U pacientů i kontrol byla exprese FL-BAFF významně vyšší než Δ BAFF, avšak relativní poměr FL-BAFF/ Δ BAFF byl u pacientů srovnatelný s kontrolami. Expres obou variant byly u pacientů úzce korelovány zatímco u kontrol nikoliv. Zvýšení sérových hladin na proteinové úrovni u pacientů s IZM oproti kontrolám tedy zřejmě nelze přičítat pouze změně poměru dvou transkripčních variant, respektive snížení exprese inhibiční varianty Δ BAFF.

Průkaz významně vyšší exprese obou variant u pacientů s IZM než u zdravých kontrol odpovídá nálezů na větší skupině amerických pacientů. Avšak v naší pilotní studii jsme nenašli asociaci hladin exprese BAFF mRNA s aktivitou, terapií, věkem ani pohlavím [188]. Tím také můžeme vysvětlit skutečnost, že jsme nenašli rozdíl v relativním poměru exprese FL-BAFF/ Δ BAFF mezi pacienty a kontrolami.

Dosud není dostupná metoda kvantitativní analýzy, která by odlišila mezi FL-BAFF a Δ BAFF na proteinové úrovni. Z toho důvodu je třeba interpretovat asociační studie proteinů BAFF s opatrností. Do budoucna by bylo zajímavé posoudit, zda se liší transkripční profil u pacientů s různými polymorfismy v promotoru *BAFF genu*, nebo pod vlivem nových terapeutických modalit.

Příloha 5. Remáková M, Svitálková T, Faustová M, Vencovský J, Novota P, Kryštůfková O. The two mRNA transcription variants of the B-cell activating factor are differentially expressed, but in a stable ratio. Clin Exp Rheumatol. 2014;32(5):763-764

5.6. Studie 6 - BAFF, PBEF/visfatinu a aktivita anti-Jo-1⁺ myozitidy

Vzhledem k předchozím nálezům asociace cytokinu BAFF s autoprotilátkami proti Jo-1, jejich vazbě na aktivitu myozitidy [222, 244], známé roli visfatinu v časně diferenciaci B lymfocytů [207] a k předpokládané interakci BAFF a visfatinu [213], hledali jsme známky jejich synergie u anti-Jo-1 pozitivních nemocných s DM a PM.

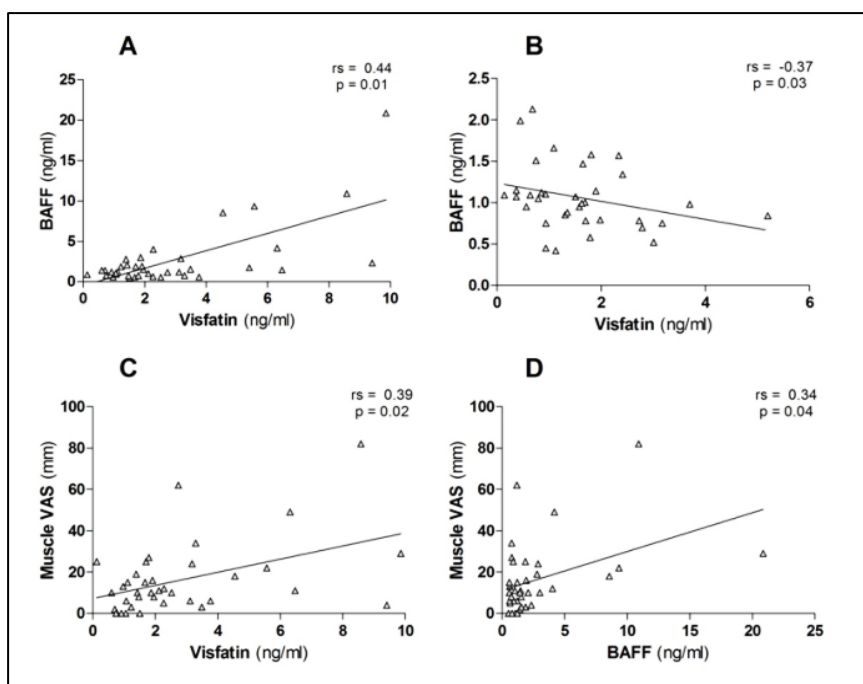
Cílem studie bylo zjistit:

1) Zda visfatin má podobný vztah k aktivitě myozitidy a autoprotilátkám jako BAFF. Pokud ano, jsou-li hladiny visfatinu a BAFF v sérech nemocných s IZM vzájemně asociované a podobně ovlivněné léčbou.

2) Zda je visfatin přítomen v postiženém svalu nemocných s IZM.

1) Hladiny visfatinu v sérech pacientů s anti-Jo-1 pozitivní myozitidou byly oproti zdravým kontrolám zvýšené, stejně jako je tomu u hladin BAFF. Jejich vzájemná pozitivní korelace svědčí pro možnou synergii u pacientů. Avšak negativní korelace v sérech zdravých kontrol ukazuje na existenci možných kompenzačních mechanismů B buněčných funkcí při absenci zánětu.

Hladiny BAFF a visfatinu byly asociovány s klinickou svalovou aktivitou myozitidy (obr. 5.6.1.) s trendem k asociaci s celkovou aktivitou hodnocenými pomocí MYOACT. To odpovídá prozánětlivým imunomodulačním vlastnostem a prokázané roli visfatinu u různých chorob včetně zánětlivých onemocnění a malignit [211, 215, 253, 254]. Protože hladiny visfatinu (na rozdíl od BAFF) byly asociovány pouze s LDH a nikoliv s dalšími laboratorními ukazateli svalové léze (CK, myoglobin a AST) usuzujeme, že visfatin má vztah spíše k zánětlivé aktivitě a nikoliv ke svalovému poškození.



Obrázek 5.6.1.: Korelace hladin visfatinu a BAFF v séru pacientů (A), kontrol (B) a jejich korelace se svalovou aktivitou myozitidy (C,D).

I když v průřezovém hodnocení neměly hladiny visfatinu vztah k léčbě, v průběhu terapie významně klesly paralelně s poklesem celkové aktivity myozitidy. Podobný vývoj byl zaznamenán u pacientů s revmatoidní artritidou [255, 256] i když nálezy různých studií nejsou zcela konzistentní [257].

Hladiny visfatinu se také lišily od hladin BAFF pouhým trendem ke korelaci s hladinami anti-Jo-1 autoprotilátek. Asociace obou cytokinů u pacientů s myozitidou a protilátkami proti Jo-1 a jejich vývoj při sledování v čase ukazuje na jejich vazbu k patogenetickým mechanismům tohoto fenotypu IZM a jejich zřejmou senzitivitu k terapii. Užší vazba sérových hladin BAFF k hladinám anti-Jo-1 autoprotilátek bude zřejmě souviset s jeho úlohou v diferenciaci a přežívání také (auto)protilátky produkujících diferenciačních stadií buněk B lymfocytární linie [127, 156], zatímco visfatin se podílí na diferenciaci pre-B buněčných, tedy časných, stadií [207].

2) Prokázali jsme přítomnost visfatinu ve všech svalových biopsiích pacientů se srovnatelnou intenzitou u PM a DM. Visfatin byl exprimován v převážné většině buněk zánětlivých infiltrátů endomysia u PM, v části infiltrujících buněk perimysia u DM a také v regenerujících svalových vláknech pacientů a nikoliv v nezápovědných kontrolních vzorcích myasthenia gravis. Vzhledem k tomu, že BAFF je spolu s jeho receptory up-regulován ve svalové tkáni pacientů s myozitidou [57, 180, 223] a zároveň BAFF zvyšuje in vitro genovou expresi visfatinu v B buňkách [213], můžeme předpokládat, že se visfatin spolu s cytokinem BAFF může podílet na udržení zánětlivé aktivity v infiltrátech svalové tkáně. Expresie ve svalových vláknech může odpovídat jeho funkci jako myokinu podporujícího růst a metabolismus kosterního svalstva [258].

I když visfatin má vazbu k aktivitě myozitidy, podíl BAFF v patogenezi podle asociací s ukazateli svalového postižení a autoprotilátkami může být významnější. Úlohu obou cytokinů v patogenezi anti-Jo-1 pozitivní myozitidy však podporuje skutečnost, že nemocní s antisyntetázovým syndromem lépe odpovídají na B-depleční terapii rituximabem než nemocní s jinými formami IZM [259] a že účinnost této léčby může být predikována přítomností a také hladinami anti-Jo-1protilátek [121]. Upřesnění konkrétní úlohy visfatinu v patogenezi myozitidy si vyžádá další výzkum.

Příloha 6. Hulejová H, Kryštůfková O, Mann H, Klein M, Pavlíčková K, Zámečník J, Vencovský J, Šenolt L

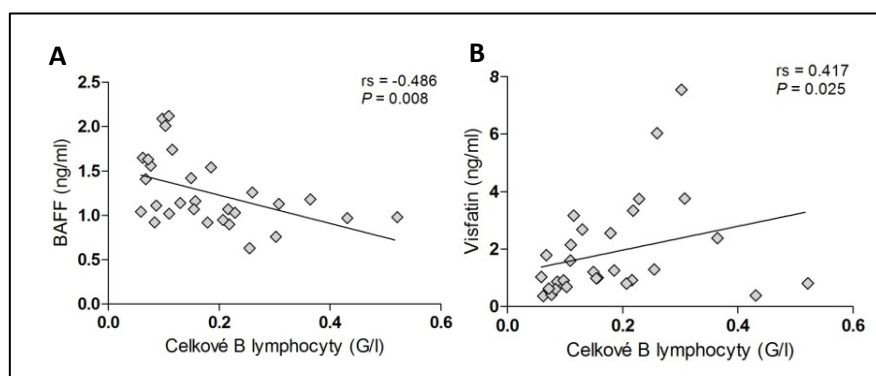
Increased visfatin levels are associated with higher disease activity in anti-Jo-1-positive myositis patients. Clin Exp Rheumatol. 2016; 34(2):222-9 ISSN 0392-856X

5.7. Studie 7 - Vliv deplece B buněk na vztah BAFF a PBEF/visfatinu

BAFF zvyšuje expresi visfatinu v B lymfocytech [213]. Trend ke zvýšení hladin BAFF v séru nemocných během B depleční terapie je známý [124, 125]; avšak vliv B depleční terapie na visfatin a vztah mezi těmito dvěma cytokiny stimulujícími diferenciaci B lymfocytů není znám. Vzestup hladin BAFF v séru byl asociován s relapsem onemocnění, elevací autoprotilátek a plazmablastů v periferní krvi jak u SLE [219, 220] tak u RA [221]. Vztah případných změn visfatinu s klinickým stavem nemocných po depleci B lymfocytů nebyl studován.

V této studii jsme chtěli zhodnotit 1) zda je visfatin asociován s počty B lymfocytů a jaký je vztah obou cytokinů k aktivitě RA 2) zda má B depleční léčba vliv na hladiny visfatinu a na vzájemný vztah obou cytokinů 3) zda případné změny hladin visfatinu souvisí s klinickou odpovědí na B depleční léčbu a s jejím trváním.

1) U pacientů s RA koreloval počet B lymfocytů před začátkem léčby pozitivně s hladinami visfatinu a negativně s hladinami BAFF (obr. 5.7.1). Avšak, 16 týdnů po podání RTX již asociace s B lymfocyty nebyly významné.



Obrázek 5.7.1: Korelace visfatinu (A) a BAFF (B) s počtem B-lymfocytů u pacientů s RA před zahájením léčby rituximabem.

Hladiny visfatinu ani BAFF nekorelovaly s aktivitou RA před ani 16 týdnů po léčbě RTX. Chybějící vazbu aktivity RA a visfatinu oproti předchozím nálezům [215, 217] by bylo možné vysvětlit předchozí TNF α blokující léčbou, která by omezila známý vliv TNF α na expresi visfatinu [215, 260]. Nicméně vliv TNF α inhibitorů na hladiny visfatinu a jejich asociace s aktivitou RA dosud nebyl prokázán [257].

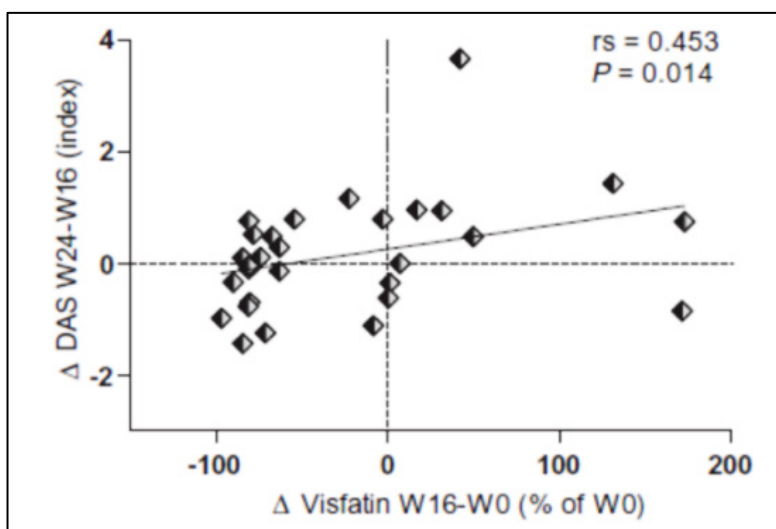
2) Hladiny visfatinu v sérech pacientů s RA byly před začátkem léčby signifikantně vyšší než u zdravých kontrol. Šestnáct týdnů od podání léčby RTX však došlo k jejich poklesu u většiny pacientů a výsledné hladiny byly srovnatelné s hodnotami u zdravých kontrol, zatímco hladiny BAFF významně stoupaly.

Rozdílný vývoj hladin visfatinu a BAFF po terapii vedl ke vzniku významné negativní korelace hladin těchto cytokinů, které před začátkem léčby nebyly vzájemně asociovány. Výsledné hladiny visfatinu a také negativní asociace obou cytokinů u pacientů po léčbě odpovídaly nálezům u zdravých kontrol.

Opačný vývoj hladin BAFF a visfatinu po terapii se také odrazil v trendu k negativní korelaci změn hladin obou cytokinů mezi párovými odběry před a po terapii.

Tento rozdílný vývoj, spolu s opačnou korelací obou cytokinů s počty B lymfocytů před terapií, bude zřejmě důsledkem jejich odlišné modulace. Elevace BAFF po RTX je kladena do souvislosti s jeho sníženou spotřebou chybějícími B lymfocyty a nedostatečnou zpětnou regulací jeho produkce [125], zatímco pokles visfatinu by mohl být vysvětlen sníženou tvorbou B lymfocyty [211].

3) Nezaznamenali jsme vazbu vývoje hladin obou cytokinů na klinický účinek podání jednoho cyklu RTX. Avšak změna sérového visfatinu do 16 týdnů od podání RTX pozitivně korelovala s budoucím nárůstem aktivity RA během následujících dvou měsíců (obr. 5.7.2). To je doba, kdy bývá obvykle nutno podat další cyklus rituximabu. V současnosti neexistují spolehlivé parametry, na základě kterých bychom mohli predikovat, jak bude individuální pacient reagovat na B-depleční léčbu. Vodítkem by mohl být vývoj hladin visfatinu, jehož zvýšení nebo minimální změna během prvních 4 měsíců by mohla predikovat relaps RA. Tento předpoklad bude vhodné dále ověřit.



Obrázek 5.7.2.: Prediktivní hodnota procentuální změny sérových hladin visfatinu (Δ visfatin) po 16 týdnech od podání rituximabu pro další vývoj aktivity RA - změnu DAS28 mezi 16. a 24. týdnem léčby (Δ DAS).

Příloha 7. Šenolt L*, Kryštůfková O*, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Andrés Cerezo L, Běláček J, Haluzík M, Forejtová Š, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. (* Sdílené první autorství). The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. *Cytokine*. 2011; 55 (1): 116-121

6. Závěry

A) Kvantitativní analýza sérových hladin BAFF

Zvýšení sérových hladin BAFF v asociaci s určitými autoprotilátkami či klinickými projevy a aktivitou onemocnění ukazují na důležitou úlohu B buněk u těchto nemocných s myozitidou. Náš náález podporuje současnou teorii, že se v patogenezi onemocnění u různých fenotypových podskupin podílejí různé mechanismy. Z tohoto hlediska by byla v dalších výzkumech vhodná subklasifikace IZM spíše podle autoprotilátkového profilu, než podle tradičních diagnostických jednotek.

Zvýšené hladiny BAFF mohou být zprostředkované jednak fenotypově specifickými mechanismy u pacientů s anti-Jo-1 protilátkami a postižením plic, ale také společnými mechanismy nezávislými na přítomnosti autoprotilátek, protože nemocní s dermatomyozitidou bez autoprotilátek měli také vyšší hladiny BAFF. Takový společný mechanismus může být zprostředkován interferony I. typu vzhledem jejich schopnosti indukovat expresi BAFF a s ohledem na nálezy zvýšení genů indukovatelných INF-1 u pacientů s DM bez autoprotilátek

Nejvyšší hladiny u nemocných s krátkým trváním onemocnění a nízké hladiny spojené s vyššími dávkami kortikosteroidů ukazují na možnou variabilitu sérových hladin BAFF v čase v souvislosti se změnami aktivity onemocnění a pod vlivem terapie.

Tuto vysokou variabilitu hladin BAFF v čase jsme potvrdili longitudinálním sledováním pacientů s anti-Jo-1 protilátkami. Možná role BAFF v patogenezi anti-Jo-1 pozitivní myozitidy je dále podpořena asociací mezi sérovými hladinami BAFF a anti-Jo-1 protilátek v průřezovém i dlouhodobém sledování a také jejich vazbou na aktivitu myozitidy především u pacientů s postižením plic, polymyozitidou a v časných stádiích onemocnění.

V souhrnu, naše data činí BAFF novým atraktivním terapeutickým cílem u anti-Jo-1 pozitivních nemocných s polymyozitidou a ILD a u nemocných s dermatomyozitidou bez ohledu na přítomnost autoprotilátek.

Vedlejší nálezy ukazují na to, že v mechanismech onemocnění IZM s autoprotilátkami může hrát roli i CRP, nejen jako ukazatel systémové aktivity ale pravděpodobně i ve vztahu k patogenetické roli cytokinu BAFF. Molekulární mechanismy tohoto nálezu však vyžadují další výzkum.

B) Hodnocení exprese receptorů pro BAFF ve svalu a vztah k IFN I. typu

Nález exprese receptorů pro BAFF ve svalových infiltrátech nemocných s IZM podporuje lokální roli BAFF ve svalové tkáni nemocných s myozitidou a to především u podskupiny s protilátkami proti Jo-1 a/nebo Ro52/60 v séru. Přítomnost receptorů pro BAFF v blízkosti B lymfocytů a plazmatických buněk až jejich kolokalizace ve svalových infiltrátech ukazuje na možnou místní diferenciaci buněk B lymfocytární linie exprimujících různé receptory pro BAFF. Současně jsme zjistili v bioptických řezech postižené svalové tkáně místní i kvantitativní asociaci exprese receptorů pro BAFF na plazmatických buňkách se známkami přítomnosti interferonu I. typu (α/β) a jeho pravděpodobného zdroje - plazmacytoidních dendritických buněk. To, spolu s literárními údaji, svědčí pro možnost

místní produkce autoprotilátek ve svalové tkáni pod vlivem lokální tvorby $IFN\alpha/\beta$ a BAFF (obr. 5.3.4.). Přinášíme tak další důkazy pro potenciální účinek blokády BAFF přímo v postiženém svalu u anti-Jo-1 pozitivní myozitidy.

Nález vyšších hladin $IFN\alpha$ v sérech anti-Jo-1 pozitivních pacientů s myozitidou dále podporuje roli autoprotilátek v indukci IFN I. typu, bez vazby na diagnostické zařazení pacientů mezi DM nebo PM. Současný trend k asociaci s plicním postižením ukazuje na potenciální význam $IFN\alpha$ jako biomarkeru této fenotypové podskupiny. Interferon alfa zřejmě působí především lokálně ve svalu, protože sérové hladiny proteinu nekorelovaly s aktivitou myozitidy a byly nižší než u zdravých kontrol.

C) Analýza exprese transkripčních variant BAFF na úrovni mRNA

Dvě alternativní, funkčně odlišné transkripční varianty genu pro cytokin BAFF (protein v plné délce - FL-BAFF a forma s chybějícím exonem 3 - Δ BAFF) byly více exprimovány u nemocných s IZM než u zdravých kontrol ale v podobném poměru. Zvýšení sérových hladin na proteinové úrovni u pacientů s IZM oproti kontrolám takto nelze přičítat pouze změně poměru dvou transkripčních variant, respektive snížení exprese inhibiční varianty Δ BAFF. Dosud není dostupná metoda kvantitativní analýzy, která by odlišila mezi FL-BAFF a Δ BAFF na proteinové úrovni. Z toho důvodu je třeba interpretovat asociační studie proteinů BAFF s opatrností. Do budoucna by bylo zajímavé posoudit, zda se liší transkripční profil u pacientů s různými polymorfismy v promotoru BAFF genu, nebo pod vlivem nových terapeutických modalit.

D) Studium možné synergie BAFF a PBEF/visfatinu

Prokázali jsme, že hladiny visfatinu jsou zvýšené u pacientů s anti-Jo-1 pozitivní myozitidou, podobně jako je tomu u hladin BAFF. Oba cytokiny byly pozitivně asociovány se svalovou aktivitou hodnocenou pomocí MYOACT. Navíc, i exprese visfatinu ve svalové tkáni pacientů s myozitidou byla zvýšena.

Užší vazba sérových hladin BAFF k hladinám anti-Jo-1 autoprotilátek by mohla souviset s jeho úlohou v diferenciaci a přežívání také pozdních a (auto)protilátky produkujících diferenciacních stadií buněk B lymfocytární linie, zatímco visfatin se podílí na diferenciaci pre-B buněčných stadií. Inverzní korelace mezi hladinami BAFF a visfatinu v sérech zdravých jedinců může ukazovat na existenci možných kompenzačních mechanismů B buněčných funkcí při absenci zánětu. Odhalení konkrétní úlohy visfatinu v patogenezi myozitidy si vyžádá další výzkum.

Jako první jsme popsali rozdílnou regulaci visfatinu a BAFF. Využili jsme B-deplečního účinku rituximabu, který indukoval pokles hladin visfatinu v séru u pacientů s aktivní revmatoidní artritidou, zatímco hladiny BAFF stoupaly. Dva faktory aktivující B lymfocyty – visfatin a BAFF po této B-depleční terapii vzájemně negativně korelovaly. Tento rozdílný vývoj, spolu s opačnou korelací obou cytokinů s počty B lymfocytů před terapií, bude zřejmě důsledkem jejich odlišné modulace. Vzhledem k tomu, že změny visfatinu v séru 16 týdnů po podání rituximabu mohou predikovat vzestup aktivity RA, může mít visfatin i praktický význam jako biomarker účinnosti B-depleční terapie.

7. Použitá literatura

1. Plotz PH, Rider LG, Targoff IN, et al. **NIH conference. Myositis: immunologic contributions to understanding cause, pathogenesis, and therapy.** Ann Intern Med. 1995 May 1; 122(9):715-724.
2. Furst DE, Amato AA, Iorga SR, et al. **Epidemiology of adult idiopathic inflammatory myopathies in a U.S. managed care plan.** Muscle & nerve. 2012 May; 45(5):676-683.
3. Danko K, Ponyi A, Constantin T, et al. **Long-term survival of patients with idiopathic inflammatory myopathies according to clinical features: a longitudinal study of 162 cases.** Medicine. 2004 Jan; 83(1):35-42.
4. Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, et al. **Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis.** Annals of the rheumatic diseases. 2001 Feb; 60(2):116-123.
5. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, et al. **Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes.** Arthritis research & therapy. 2007; 9(4):R78.
6. Dalakas MC. **Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis.** N Engl J Med. 1991 Nov 21; 325(21):1487-1498.
7. Tansley SL, Betteridge ZE, McHugh NJ. **The diagnostic utility of autoantibodies in adult and juvenile myositis.** Curr Opin Rheumatol. 2013 Nov; 25(6):772-777.
8. Betteridge Z, McHugh N. **Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis.** Journal of internal medicine. 2016 Jul; 280(1):8-23.
9. Allenbach Y, Benveniste O, Goebel HH, et al. **Integrated classification of inflammatory myopathies.** Neuropathology and applied neurobiology. 2017 Feb; 43(1):62-81.
10. Dalakas MC. **Inflammatory Muscle Diseases.** N Engl J Med. 2015 Jul 23; 373(4):393-394.
11. Love LA, Leff RL, Fraser DD, et al. **A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups.** Medicine. 1991 Nov; 70(6):360-374.
12. Fiorentino D, Chung L, Zwerner J, et al. **The mucocutaneous and systemic phenotype of dermatomyositis patients with antibodies to MDA5 (CADM-140): a retrospective study.** Journal of the American Academy of Dermatology. 2011 Jul; 65(1):25-34.
13. Bailey EE, Fiorentino DF. **Amyopathic dermatomyositis: definitions, diagnosis, and management.** Current rheumatology reports. 2014 Dec; 16(12):465.
14. Hozumi H, Fujisawa T, Nakashima R, et al. **Comprehensive assessment of myositis-specific autoantibodies in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease.** Respiratory medicine. 2016 Dec; 121:91-99.
15. Matsuura E, Ishiguro N, Katsumata Y, et al. **Two young-adult female cases of dermatomyositis with antibodies for transcriptional intermediary factor 1-gamma.** European journal of dermatology : EJD. 2012 Sep-Oct; 22(5):668-671.
16. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, et al. **Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcriptional intermediary factor 1 family proteins.** Arthritis and rheumatism. Oct 10.
17. Fiorentino DF, Chung LS, Christopher-Stine L, et al. **Most patients with cancer-associated dermatomyositis have antibodies to nuclear matrix protein NXP-2 or transcription intermediary factor 1gamma.** Arthritis and rheumatism. 2013 Nov; 65(11):2954-2962.
18. Tansley SL, Betteridge ZE, Shaddick G, et al. **Calcinosis in juvenile dermatomyositis is influenced by both anti-NXP2 autoantibody status and age at disease onset.** Rheumatology (Oxford, England). 2014 Dec; 53(12):2204-2208.
19. Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ. **Novel autoantibodies and clinical phenotypes in adult and juvenile myositis.** Arthritis research & therapy. 2011; 13(2):209.
20. Lundberg IE, Miller FW, Tjarnlund A, et al. **Diagnosis and classification of idiopathic inflammatory myopathies.** Journal of internal medicine. 2016 Jul; 280(1):39-51.
21. Albrecht I, Wick C, Hallgren A, et al. **Development of autoantibodies against muscle-specific FHL1 in severe inflammatory myopathies.** The Journal of clinical investigation. 2015 Dec; 125(12):4612-4624.
22. Basharat P, Christopher-Stine L. **Immune-Mediated Necrotizing Myopathy: Update on Diagnosis and Management.** Current rheumatology reports. 2015 Dec; 17(12):72.
23. Kiely PD, Chua F. **Interstitial lung disease in inflammatory myopathies: clinical phenotypes and prognosis.** Current rheumatology reports. 2013 Sep; 15(9):359.
24. Fathi M, Lundberg IE. **Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis.** Curr Opin Rheumatol. 2005 Nov; 17(6):701-706.

25. Labirua A, Lundberg IE. **Interstitial lung disease and idiopathic inflammatory myopathies: progress and pitfalls.** *Curr Opin Rheumatol.* 2010 Nov; 22(6):633-638.
26. Saketkoo LA, Ascherman DP, Cottin V, et al. **Interstitial Lung Disease in Idiopathic Inflammatory Myopathy.** *Current rheumatology reviews.* 2010 May; 6(2):108-119.
27. Marie I. **Morbidity and mortality in adult polymyositis and dermatomyositis.** *Current rheumatology reports.* 2012 Jun; 14(3):275-285.
28. Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, et al. **Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity.** *Autoimmun Rev.* 2012 Dec; 12(2):210-217.
29. Mann HF, Vencovsky J, Lundberg IE. **Treatment-resistant inflammatory myopathy.** *Best practice & research Clinical rheumatology.* 2010 Jun; 24(3):427-440.
30. Walsh RJ, Amato AA. **Toxic myopathies.** *Neurologic clinics.* 2005 May; 23(2):397-428.
31. Satoh M, Tanaka S, Ceribelli A, et al. **A Comprehensive Overview on Myositis-Specific Antibodies: New and Old Biomarkers in Idiopathic Inflammatory Myopathy.** *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017 Feb; 52(1):1-19.
32. Bohan A, Peter JB. **Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts).** *N Engl J Med.* 1975 Feb 13; 292(7):344-347.
33. Bohan A, Peter JB. **Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts).** *N Engl J Med.* 1975 Feb 20; 292(8):403-407.
34. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, et al. **Inclusion body myositis and myopathies.** *Annals of neurology.* 1995 Nov; 38(5):705-713.
35. Lundberg IE, Tjarnlund A, Bottai M, et al. **2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2017 Dec; 76(12):1955-1964.
36. Dalakas MC. **Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies.** *Rheum Dis Clin North Am.* 2002 Nov; 28(4):779-798, vi.
37. De Bleecker JL, De Paepe B, Aronica E, et al. **2015th ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies part II 28-30 March 2014, Naarden, The Netherlands.** *Neuromuscul Disord.* 2015 Mar; 25(3):268-272.
38. Zong M, Lundberg IE. **Pathogenesis, classification and treatment of inflammatory myopathies.** *Nature reviews Rheumatology.* 2011 May; 7(5):297-306.
39. Lahoria R, Selcen D, Engel AG. **Microvascular alterations and the role of complement in dermatomyositis.** *Brain.* 2016 Jul; 139(Pt 7):1891-1903.
40. Sallum AM, Kiss MH, Silva CA, et al. **Difference in adhesion molecule expression (ICAM-1 and VCAM-1) in juvenile and adult dermatomyositis, polymyositis and inclusion body myositis.** *Autoimmun Rev.* 2006 Feb; 5(2):93-100.
41. Malmstrom V, Venalis P, Albrecht I. **T cells in myositis.** *Arthritis research & therapy.* 2012 Dec 28; 14(6):230.
42. Greenberg SA, Pinkus GS, Amato AA, et al. **Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis.** *Muscle & nerve.* 2007 Jan; 35(1):17-23.
43. Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, et al. **Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis.** *Annals of neurology.* 2005 May; 57(5):664-678.
44. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV. **Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity.** *Autoimmunity.* 2003 Dec; 36(8):463-472.
45. Wenzel J, Schmidt R, Proelss J, et al. **Type I interferon-associated skin recruitment of CXCR3+ lymphocytes in dermatomyositis.** *Clinical and experimental dermatology.* 2006 Jul; 31(4):576-582.
46. Eloranta ML, Barbasso Helmers S, Ulfgren AK, et al. **A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies.** *Arthritis and rheumatism.* 2007 Sep; 56(9):3112-3124.
47. Shrestha S, Wershil B, Sarwark JF, et al. **Lesional and nonlesional skin from patients with untreated juvenile dermatomyositis displays increased numbers of mast cells and mature plasmacytoid dendritic cells.** *Arthritis and rheumatism.* 2010 Sep; 62(9):2813-2822.
48. Lundberg IE, Helmers SB. **The type I interferon system in idiopathic inflammatory myopathies.** *Autoimmunity.* 2010 Apr; 43(3):239-243.
49. Grundtman C, Malmstrom V, Lundberg IE. **Immune mechanisms in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies.** *Arthritis research & therapy.* 2007 Mar 26; 9(2):208.
50. Suzuki S, Uruha A, Suzuki N, et al. **Integrated Diagnosis Project for Inflammatory Myopathies: An association between autoantibodies and muscle pathology.** *Autoimmun Rev.* 2017 Jul; 16(7):693-700.

51. Mozaffar T, Pestronk A. **Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 2000 Apr; 68(4):472-478.
52. Arahata K, Engel AG. **Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells.** *Annals of neurology.* 1984 Aug; 16(2):193-208.
53. Lopez De Padilla CM, Vallejo AN, Lacomis D, et al. **Extranodal lymphoid microstructures in inflamed muscle and disease severity of new-onset juvenile dermatomyositis.** *Arthritis and rheumatism.* 2009 Apr; 60(4):1160-1172.
54. Yokoyama T, Shimizu M, Ishikawa S, et al. **Accumulation of mature B cells in the inflamed muscle tissue of a patient with anti-155/140 antibody-positive juvenile dermatomyositis.** *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association.* 2012 Mar 28.
55. Brunn A, Hans VJ, Vogelgesang S, et al. **Inflammatory myopathy with abundant macrophages and dermatomyositis: two stages of one disorder or two distinct entities?** *Acta Neuropathol.* 2009 Jul 10.
56. Greenberg SA, Bradshaw EM, Pinkus JL, et al. **Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis.** *Neurology.* 2005 Dec 13; 65(11):1782-1787.
57. Salajegheh M, Pinkus JL, Amato AA, et al. **Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles.** *Muscle & nerve.* 2010 Oct; 42(4):576-583.
58. Bradshaw EM, Orihuela A, McArde SL, et al. **A local antigen-driven humoral response is present in the inflammatory myopathies.** *J Immunol.* 2007 Jan 1; 178(1):547-556.
59. Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. **Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2009 Jun; 48(6):607-612.
60. Herbert MK, Stammen-Vogelzangs J, Verbeek MM, et al. **Disease specificity of autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in sporadic inclusion body myositis versus known autoimmune diseases.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2016 Apr; 75(4):696-701.
61. Lloyd TE, Christopher-Stine L, Pinal-Fernandez I, et al. **Cytosolic 5'-Nucleotidase 1A As a Target of Circulating Autoantibodies in Autoimmune Diseases.** *Arthritis care & research.* 2016 Jan; 68(1):66-71.
62. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, et al. **Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy.** *Arthritis and rheumatism.* 2012 Dec; 64(12):4087-4093.
63. Kobayashi N, Kobayashi I, Mori M, et al. **Increased Serum B Cell Activating Factor and a Proliferation-inducing Ligand Are Associated with Interstitial Lung Disease in Patients with Juvenile Dermatomyositis.** *The Journal of rheumatology.* 2015 Dec; 42(12):2412-2418.
64. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, et al. **Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy.** *Arthritis and rheumatism.* 2011 Jul; 63(7):1961-1971.
65. Stone KB, Oddis CV, Fertig N, et al. **Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy.** *Arthritis and rheumatism.* 2007 Sep; 56(9):3125-3131.
66. Ronnelid J, Barbasso Helmers S, Storfors H, et al. **Use of a commercial line blot assay as a screening test for autoantibodies in inflammatory myopathies.** *Autoimmun Rev.* 2009 Sep; 9(1):58-61.
67. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, et al. **Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes.** *The Quarterly journal of medicine.* 1990 Oct; 77(282):1019-1038.
68. Hervier B, Benveniste O. **Clinical heterogeneity and outcomes of antisynthetase syndrome.** *Current rheumatology reports.* 2013 Aug; 15(8):349.
69. Polosa R, Di Mauro C, Spampinato B, et al. **A patient with antihistidyl-tRNA synthetase positive polymyositis presenting as acute respiratory distress syndrome.** *J Clin Rheumatol.* 2008 Aug; 14(4):219-221.
70. Schmidt WA, Wetzel W, Friedlander R, et al. **Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies--an evolving spectrum of disease manifestations.** *Clinical rheumatology.* 2000; 19(5):371-377.
71. Marie I, Hachulla E, Cherin P, et al. **Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis.** *Arthritis and rheumatism.* 2002 Dec 15; 47(6):614-622.
72. Mielnik P, Wiesik-Szewczyk E, Olesinska M, et al. **Clinical features and prognosis of patients with idiopathic inflammatory myopathies and anti-Jo-1 antibodies.** *Autoimmunity.* 2006 May; 39(3):243-247.
73. Selva-O'Callaghan A, Labrador-Horrillo M, Solans-Laquer R, et al. **Myositis-specific and myositis-associated antibodies in a series of eighty-eight Mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy.** *Arthritis and rheumatism.* 2006 Oct 15; 55(5):791-798.
74. Richards TJ, Eggebeen A, Gibson K, et al. **Characterization and peripheral blood biomarker assessment of anti-Jo-1 antibody-positive interstitial lung disease.** *Arthritis and rheumatism.* 2009 Jul; 60(7):2183-2192.

75. Vancsa A, Csipo I, Nemeth J, et al. **Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients.** *Rheumatol Int.* 2009 Jul; 29(9):989-994.
76. Mileti LM, Streck ME, Niewold TB, et al. **Clinical characteristics of patients with anti-Jo-1 antibodies: a single center experience.** *J Clin Rheumatol.* 2009 Aug; 15(5):254-255.
77. Dugar M, Cox S, Limaye V, et al. **Clinical heterogeneity and prognostic features of South Australian patients with anti-synthetase autoantibodies.** *Internal medicine journal.* 2011 Sep; 41(9):674-679.
78. Marie I, Hatron PY, Dominique S, et al. **Short-term and long-term outcomes of interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis: a series of 107 patients.** *Arthritis and rheumatism.* 2011 Nov; 63(11):3439-3447.
79. Cavagna L, Nuno L, Scire CA, et al. **Clinical Spectrum Time Course in Anti Jo-1 Positive Antisynthetase Syndrome: Results From an International Retrospective Multicenter Study.** *Medicine.* 2015 Aug; 94(32):e1144.
80. Lilleker JB, Vencovsky J, Wang G, et al. **The EuroMyositis registry: an international collaborative tool to facilitate myositis research.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2018 Jan; 77(1):30-39.
81. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, et al. **Common and distinct clinical features in adult patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies: heterogeneity within the syndrome.** *PLoS one.* 2013; 8(4):e60442.
82. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Huapaya JA, et al. **A longitudinal cohort study of the anti-synthetase syndrome: increased severity of interstitial lung disease in black patients and patients with anti-PL7 and anti-PL12 autoantibodies.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2017 Jun 1; 56(6):999-1007.
83. Kalluri M, Sahn SA, Oddis CV, et al. **Clinical profile of anti-PL-12 autoantibody. Cohort study and review of the literature.** *Chest.* 2009 Jun; 135(6):1550-1556.
84. Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S, et al. **Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies.** *Autoimmunity.* 2006 May; 39(3):233-241.
85. Matsushita T, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. **Clinical evaluation of anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies in Japanese patients with dermatomyositis.** *J Rheumatol.* 2007 May; 34(5):1012-1018.
86. Yoshida S, Akizuki M, Mimori T, et al. **The precipitating antibody to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue diseases. A marker for a subset of polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis.** *Arthritis and rheumatism.* 1983 May; 26(5):604-611.
87. Miller FW, Twitty SA, Biswas T, et al. **Origin and regulation of a disease-specific autoantibody response. Antigenic epitopes, spectrotype stability, and isotype restriction of anti-Jo-1 autoantibodies.** *The Journal of clinical investigation.* 1990 Feb; 85(2):468-475.
88. Levine SM, Raben N, Xie D, et al. **Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis.** *Arthritis and rheumatism.* 2007 Aug; 56(8):2729-2739.
89. Ascherman DP, Oriss TB, Oddis CV, et al. **Critical requirement for professional APCs in eliciting T cell responses to novel fragments of histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) in Jo-1 antibody-positive polymyositis.** *J Immunol.* 2002 Dec 15; 169(12):7127-7134.
90. Howard OM, Dong HF, Yang D, et al. **Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells.** *The Journal of experimental medicine.* 2002 Sep 16; 196(6):781-791.
91. Barbasso Helmers S, Englund P, Engstrom M, et al. **Sera from anti-Jo-1-positive patients with polymyositis and interstitial lung disease induce expression of intercellular adhesion molecule 1 in human lung endothelial cells.** *Arthritis and rheumatism.* 2009 Aug; 60(8):2524-2530.
92. Benveniste O, Cherin P, Maisonobe T, et al. **Severe perturbations of the blood T cell repertoire in polymyositis, but not dermatomyositis patients.** *J Immunol.* 2001 Sep 15; 167(6):3521-3529.
93. Hofbauer M, Wiesener S, Babbe H, et al. **Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR, and CDR3-spectratype analysis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003 Apr 1; 100(7):4090-4095.
94. Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, et al. **Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy.** *The Journal of experimental medicine.* 2005 Feb 21; 201(4):591-601.
95. Pandya JM, Venalis P, Al-Khalili L, et al. **CD4+ and CD8+ CD28(null) T Cells Are Cytotoxic to Autologous Muscle Cells in Patients With Polymyositis.** *Arthritis & rheumatology.* 2016 Aug; 68(8):2016-2026.
96. Fasth AE, Dastmalchi M, Rahbar A, et al. **T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells.** *J Immunol.* 2009 Oct 1; 183(7):4792-4799.

97. Ascherman DP. **Role of Jo-1 in the Immunopathogenesis of the Anti-synthetase Syndrome.** Current rheumatology reports. 2015 Sep; 17(9):56.
98. Miller FW, Waite KA, Biswas T, et al. **The role of an autoantigen, histidyl-tRNA synthetase, in the induction and maintenance of autoimmunity.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990 Dec; 87(24):9933-9937.
99. Zhou JJ, Wang F, Xu Z, et al. **Secreted histidyl-tRNA synthetase splice variants elaborate major epitopes for autoantibodies in inflammatory myositis.** The Journal of biological chemistry. 2014 Jul 11; 289(28):19269-19275.
100. Rutjes SA, Vree Egberts WT, Jongen P, et al. **Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy.** Clin Exp Immunol. 1997 Jul; 109(1):32-40.
101. Frank MB, McCubbin V, Trieu E, et al. **The association of anti-Ro52 autoantibodies with myositis and scleroderma autoantibodies.** J Autoimmun. 1999 Mar; 12(2):137-142.
102. Eloranta ML, Lovgren T, Finke D, et al. **Regulation of the interferon-alpha production induced by RNA-containing immune complexes in plasmacytoid dendritic cells.** Arthritis and rheumatism. 2009 Aug; 60(8):2418-2427.
103. Brulhart L, Waldburger JM, Gabay C. **Rituximab in the treatment of antisynthetase syndrome.** Annals of the rheumatic diseases. 2006 Jul; 65(7):974-975.
104. Cooper MA, Willingham DL, Brown DE, et al. **Rituximab for the treatment of juvenile dermatomyositis: A report of four pediatric patients.** Arthritis and rheumatism. 2007 Aug 30; 56(9):3107-3111.
105. Chiappetta N, Steier J, Gruber B. **Rituximab in the treatment of refractory dermatomyositis.** J Clin Rheumatol. 2005 Oct; 11(5):264-266.
106. Chung L, Genovese MC, Fiorentino DF. **A pilot trial of rituximab in the treatment of patients with dermatomyositis.** Archives of dermatology. 2007 Jun; 143(6):763-767.
107. Lambotte O, Kotb R, Maigne G, et al. **Efficacy of rituximab in refractory polymyositis.** The Journal of rheumatology. 2005 Jul; 32(7):1369-1370.
108. Levine TD. **Rituximab in the treatment of dermatomyositis: an open-label pilot study.** Arthritis and rheumatism. 2005 Feb; 52(2):601-607.
109. Noss EH, Hausner-Sypek DL, Weinblatt ME. **Rituximab as therapy for refractory polymyositis and dermatomyositis.** The Journal of rheumatology. 2006 May; 33(5):1021-1026.
110. Ytterberg SR. **Treatment of refractory polymyositis and dermatomyositis.** Current rheumatology reports. 2006 Jun; 8(3):167-173.
111. Sultan SM, Ioannou Y, Moss K, et al. **Outcome in patients with idiopathic inflammatory myositis: morbidity and mortality.** Rheumatology (Oxford, England). 2002 Jan; 41(1):22-26.
112. Marie I, Dominique S, Janvresse A, et al. **Rituximab therapy for refractory interstitial lung disease related to antisynthetase syndrome.** Respiratory medicine. 2012 Apr; 106(4):581-587.
113. Sem M, Molberg O, Lund MB, et al. **Rituximab treatment of the anti-synthetase syndrome: a retrospective case series.** Rheumatology (Oxford, England). 2009 Aug; 48(8):968-971.
114. Fasano S, Gordon P, Hajji R, et al. **Rituximab in the treatment of inflammatory myopathies: a review.** Rheumatology (Oxford, England). 2017 Jan; 56(1):26-36.
115. Bauhammer J, Blank N, Max R, et al. **Rituximab in the Treatment of Jo1 Antibody-associated Antisynthetase Syndrome: Anti-Ro52 Positivity as a Marker for Severity and Treatment Response.** The Journal of rheumatology. 2016 Aug; 43(8):1566-1574.
116. Oddis CV, Reed AM, Aggarwal R, et al. **Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: a randomized, placebo-phase trial.** Arthritis and rheumatism. 2013 Feb; 65(2):314-324.
117. Aggarwal R, Loganathan P, Koontz D, et al. **Cutaneous improvement in refractory adult and juvenile dermatomyositis after treatment with rituximab.** Rheumatology (Oxford, England). 2017 Feb; 56(2):247-254.
118. Aggarwal R, Bandos A, Reed AM, et al. **Predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis.** Arthritis & rheumatology. 2014 Mar; 66(3):740-749.
119. Mahler EA, Blom M, Voermans NC, et al. **Rituximab treatment in patients with refractory inflammatory myopathies.** Rheumatology (Oxford, England). 2011 Dec; 50(12):2206-2213.
120. Reed AM, Crowson CS, Hein M, et al. **Biologic predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory myositis.** BMC musculoskeletal disorders. 2015 Sep 17; 16:257.

121. Aggarwal R, Oddis CV, Goudeau D, et al. **Autoantibody levels in myositis patients correlate with clinical response during B cell depletion with rituximab.** *Rheumatology (Oxford, England)*. 2016 Jun; 55(6):991-999.
122. Stohl W. **Inhibition of B cell activating factor (BAFF) in the management of systemic lupus erythematosus (SLE).** *Expert review of clinical immunology*. 2017 Jun; 13(6):623-633.
123. Stohl W. **BlySfulness does not equal blissfulness in systemic lupus erythematosus: a therapeutic role for BlyS antagonists.** *Current directions in autoimmunity*. 2005; 8:289-304.
124. Vallerskog T, Heimburger M, Gunnarsson I, et al. **Differential effects on BAFF and APRIL levels in rituximab-treated patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.** *Arthritis research & therapy*. 2006; 8(6):R167.
125. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, et al. **Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production.** *Annals of the rheumatic diseases*. 2007 May; 66(5):700-703.
126. Thien M, Phan TG, Gardam S, et al. **Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches.** *Immunity*. 2004 Jun; 20(6):785-798.
127. Mackay F, Schneider P. **Cracking the BAFF code.** *Nat Rev Immunol*. 2009 Jul; 9(7):491-502.
128. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al. **Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations.** *The Journal of experimental medicine*. 1999 Dec 6; 190(11):1697-1710.
129. Mackay F, Schneider P, Rennert P, et al. **BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival.** *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:231-264.
130. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. **The molecular architecture of the TNF superfamily.** *Trends in biochemical sciences*. 2002 Jan; 27(1):19-26.
131. Ng LG, Mackay CR, Mackay F. **The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes.** *Molecular immunology*. 2005 May; 42(7):763-772.
132. Mackay F, Silveira PA, Brink R. **B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling.** *Current opinion in immunology*. 2007 Jun; 19(3):327-336.
133. Hahne M, Kataoka T, Schroter M, et al. **APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth.** *The Journal of experimental medicine*. 1998 Sep 21; 188(6):1185-1190.
134. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. **DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL.** *Nature immunology*. 2002 Sep; 3(9):822-829.
135. Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. **Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells.** *Blood*. 2001 Jan 1; 97(1):198-204.
136. Munoz-Fernandez R, Blanco FJ, Frecha C, et al. **Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts.** *J Immunol*. 2006 Jul 1; 177(1):280-289.
137. Kato A, Truong-Tran AQ, Scott AL, et al. **Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism.** *J Immunol*. 2006 Nov 15; 177(10):7164-7172.
138. Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J, et al. **B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome.** *Arthritis research & therapy*. 2006; 8(2):R51.
139. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, et al. **Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines.** *J Immunol*. 2005 Jan 15; 174(2):864-870.
140. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, et al. **BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma.** *The Journal of experimental medicine*. 2005 Jan 17; 201(2):195-200.
141. Schaumann DH, Tuischer J, Ebell W, et al. **VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF.** *Molecular immunology*. 2007 Mar; 44(7):1606-1612.
142. Abe M, Kido S, Hiasa M, et al. **BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma.** *Leukemia*. 2006 Jul; 20(7):1313-1315.
143. Krejsek J, Kolackova M, Lindrova I, et al. **Increase of Intracellular BAFF in B Cells of Sjogren's Patients Is Not Affected by Decrease of BAFFR.** *Acta medica*. 2015; 58(1):25-31.
144. Mackay F, Sierro F, Grey ST, et al. **The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases.** *Current directions in autoimmunity*. 2005; 8:243-265.
145. Moon EY, Lee JH, Oh SY, et al. **Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression.** *Free radical biology & medicine*. 2006 Jun 15; 40(12):2103-2111.
146. Darce JR, Arendt BK, Wu X, et al. **Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation.** *J Immunol*. 2007 Dec 1; 179(11):7276-7286.

147. Zhang X, Park CS, Yoon SO, et al. **BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors.** *Int Immunol.* 2005 Jun; 17(6):779-788.
148. Schneider P. **The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation.** *Current opinion in immunology.* 2005 Jun; 17(3):282-289.
149. Mackay F, Leung H. **The role of the BAFF/APRIL system on T cell function.** *Semin Immunol.* 2006 Oct; 18(5):284-289.
150. Brink R. **Regulation of B cell self-tolerance by BAFF.** *Semin Immunol.* 2006 Oct; 18(5):276-283.
151. Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, et al. **BAFF, APRIL and human B cell disorders.** *Semin Immunol.* 2006 Oct; 18(5):305-317.
152. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, et al. **TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts.** *Blood.* 2008 Feb 1; 111(3):1004-1012.
153. Cerutti A, Qiao X, He B. **Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching.** *Immunology and cell biology.* 2005 Oct; 83(5):554-562.
154. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. **The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus.** *The Journal of clinical investigation.* 2009 May; 119(5):1066-1073.
155. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, et al. **BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells.** *The Journal of clinical investigation.* 2003 Jul; 112(2):286-297.
156. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. **BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells.** *The Journal of experimental medicine.* 2004 Jan 5; 199(1):91-98.
157. Klein B, Tarte K, Jourdan M, et al. **Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells.** *International journal of hematology.* 2003 Aug; 78(2):106-113.
158. Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al. **B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells.** *J Immunol.* 2004 Jul 15; 173(2):807-817.
159. Kalled SL, Ambrose C, Hsu YM. **The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors.** *Current directions in autoimmunity.* 2005; 8:206-242.
160. Acosta-Rodriguez EV, Craxton A, Hendricks DW, et al. **BAFF and LPS cooperate to induce B cells to become susceptible to CD95/Fas-mediated cell death.** *Eur J Immunol.* 2007 Apr; 37(4):990-1000.
161. Castigli E, Wilson SA, Scott S, et al. **TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells.** *The Journal of experimental medicine.* 2005 Jan 3; 201(1):35-39.
162. Castigli E, Geha RS. **TACI, isotype switching, CVID and IgAD.** *Immunol Res.* 2007 Jul; 38(1-3):102-111.
163. Mackay F, Schneider P. **TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Jun-Aug; 19(3-4):263-276.
164. Matsushita T, Hasegawa M, Matsushita Y, et al. **Elevated serum BAFF levels in patients with localized scleroderma in contrast to other organ-specific autoimmune diseases.** *Exp Dermatol.* 2007 Feb; 16(2):87-93.
165. Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. **B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations.** *Arthritis and rheumatism.* 2003 Dec; 48(12):3475-3486.
166. Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, et al. **Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome.** *Journal of clinical immunology.* 2005 May; 25(3):189-201.
167. Seyler TM, Park YW, Takemura S, et al. **BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis.** *The Journal of clinical investigation.* 2005 Nov; 115(11):3083-3092.
168. Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, et al. **BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases.** *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun; 1050:34-39.
169. Szodoray P, Jonsson R. **The BAFF/APRIL system in systemic autoimmune diseases with a special emphasis on Sjogren's syndrome.** *Scandinavian journal of immunology.* 2005 Nov; 62(5):421-428.
170. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. **Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases.** *Arthritis and rheumatism.* 2001 Jun; 44(6):1313-1319.
171. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, et al. **Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes.** *Arthritis and rheumatism.* 2006 Jan; 54(1):192-201.
172. Becker-Merok A, Nikolaisen C, Nossent HC. **B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time.** *Lupus.* 2006; 15(9):570-576.
173. Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. **The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2003 Feb; 62(2):168-171.

174. Koyama T, Tsukamoto H, Miyagi Y, et al. **Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2005 Jul; 64(7):1065-1067.
175. Szodoray P, Alex P, Jonsson MV, et al. **Distinct profiles of Sjogren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF.** *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 2005 Nov; 117(2):168-176.
176. Eilertsen GO, Van Ghelue M, Strand H, et al. **Increased levels of BAFF in patients with systemic lupus erythematosus are associated with acute-phase reactants, independent of BAFF genetics: a case-control study.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2011 Dec; 50(12):2197-2205.
177. McCarthy EM, Lee RZ, Ni Gabhann J, et al. **Elevated B lymphocyte stimulator levels are associated with increased damage in an Irish systemic lupus erythematosus cohort.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2013 Jul; 52(7):1279-1284.
178. Petri M, Stohl W, Chatham W, et al. **Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis and rheumatism.* 2008 Aug; 58(8):2453-2459.
179. Bosello S, Youinou P, Daridon C, et al. **Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis.** *The Journal of rheumatology.* 2008 Jul; 35(7):1256-1264.
180. Baek A, Park HJ, Na S-J, et al. **The expression of BAFF in the muscles of patients with dermatomyositis.** *Journal of neuroimmunology.* 2012; 249(1-2):96-100.
181. Jiang Y, Ohtsuji M, Abe M, et al. **Polymorphism and chromosomal mapping of the mouse gene for B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (Baff) and association with the autoimmune phenotype.** *Immunogenetics.* 2001 Dec; 53(9):810-813.
182. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, et al. **Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.** *Genes and immunity.* 2002 Nov; 3(7):424-429.
183. Nossent JC, Lester S, Zahra D, et al. **Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2008 Sep; 47(9):1311-1316.
184. Gottenberg JE, Sellam J, Ittah M, et al. **No evidence for an association between the -871 T/C promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and primary Sjogren's syndrome.** *Arthritis research & therapy.* 2006; 8(1):R30.
185. Mackay F, Ambrose C. **The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Jun-Aug; 14(3-4):311-324.
186. Gavin AL, Ait-Azzouzene D, Ware CF, et al. **DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF.** *The Journal of biological chemistry.* 2003 Oct 3; 278(40):38220-38228.
187. Le Pottier L, Bendaoud B, Dueymes M, et al. **BAFF, a new target for intravenous immunoglobulin in autoimmunity and cancer.** *Journal of clinical immunology.* 2007 May; 27(3):257-265.
188. Lopez De Padilla CM, McNallan KT, Crowson CS, et al. **BAFF expression correlates with idiopathic inflammatory myopathy disease activity measures and autoantibodies.** *The Journal of rheumatology.* 2013 Mar; 40(3):294-302.
189. Sjostrand M, Johansson A, Aqrabi L, et al. **The Expression of BAFF Is Controlled by IRF Transcription Factors.** *J Immunol.* 2016 Jan 01; 196(1):91-96.
190. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, et al. **Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6.** *Immunity.* 2003 Aug; 19(2):225-234.
191. Braun D, Caramalho I, Demengeot J. **IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses.** *Int Immunol.* 2002 Apr; 14(4):411-419.
192. Platanius LC. **Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling.** *Nat Rev Immunol.* 2005 May; 5(5):375-386.
193. Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, et al. **Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis.** *Genes and immunity.* 2012 Apr; 13(3):207-213.
194. Greenberg SA. **Inflammatory myopathies: disease mechanisms.** *Curr Opin Neurol.* 2009 Oct; 22(5):516-523.
195. de Padilla CM, Reed AM. **Dendritic cells and the immunopathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies.** *Curr Opin Rheumatol.* 2008 Nov; 20(6):669-674.
196. Higgs BW, Liu Z, White B, et al. **Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2011 Nov; 70(11):2029-2036.

197. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, et al. **Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis.** *Arthritis and rheumatism.* 2007 Nov; 56(11):3784-3792.
198. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, et al. **An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity.** *Mol Med.* 2007 Jan-Feb; 13(1-2):59-68.
199. Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, et al. **Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis.** *Arthritis and rheumatism.* 2009 Nov; 60(11):3436-3446.
200. Reed AM, Peterson E, Bilgic H, et al. **Changes in novel biomarkers of disease activity in juvenile and adult dermatomyositis are sensitive biomarkers of disease course.** *Arthritis and rheumatism.* 2012 Dec; 64(12):4078-4086.
201. Ekholm L, Vosslander S, Tjarnlund A, et al. **Autoantibody Specificities and Type I Interferon Pathway Activation in Idiopathic Inflammatory Myopathies.** *Scandinavian journal of immunology.* 2016 Aug; 84(2):100-109.
202. Isenberg DA, Rowe D, Shearer M, et al. **Localization of interferons and interleukin 2 in polymyositis and muscular dystrophy.** *Clin Exp Immunol.* 1986 Feb; 63(2):450-458.
203. Bave U, Vallin H, Alm GV, et al. **Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines.** *J Autoimmun.* 2001 Aug; 17(1):71-80.
204. Higgs BW, Zhu W, Morehouse C, et al. **A phase 1b clinical trial evaluating sifalimumab, an anti-IFN-alpha monoclonal antibody, shows target neutralisation of a type I IFN signature in blood of dermatomyositis and polymyositis patients.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2014 Jan; 73(1):256-262.
205. Barsotti S, Bruni C, Cometi L, et al. **One year in review 2017: idiopathic inflammatory myopathies.** *Clin Exp Rheumatol.* 2017 Nov-Dec; 35(6):875-884.
206. Ramanujam M, Davidson A. **The current status of targeting BAFF/BLyS for autoimmune diseases.** *Arthritis research & therapy.* 2004; 6(5):197-202.
207. Samal B, Sun Y, Stearns G, et al. **Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor.** *Mol Cell Biol.* 1994 Feb; 14(2):1431-1437.
208. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. **Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin.** *Science.* 2005 Jan 21; 307(5708):426-430.
209. Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, et al. **Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis.** *Eur J Immunol.* 2002 Nov; 32(11):3225-3234.
210. Luk T, Malam Z, Marshall JC. **Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity.** *J Leukoc Biol.* 2008 Apr; 83(4):804-816.
211. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. **Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties.** *J Immunol.* 2007 Feb 1; 178(3):1748-1758.
212. Ognjanovic S, Ku TL, Bryant-Greenwood GD. **Pre-B-cell colony-enhancing factor is a secreted cytokine-like protein from the human amniotic epithelium.** *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Jul; 193(1):273-282.
213. Xu LG, Wu M, Hu J, et al. **Identification of downstream genes up-regulated by the tumor necrosis factor family member TALL-1.** *J Leukoc Biol.* 2002 Aug; 72(2):410-416.
214. Filkova M, Hulejova H, Kuncova K, et al. **Resistin in idiopathic inflammatory myopathies.** *Arthritis research & therapy.* May 11; 14(3):R111.
215. Brentano F, Schorr O, Ospelt C, et al. **Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities.** *Arthritis Rheum.* 2007 Sep; 56(9):2829-2839.
216. Meier FM, Frommer KW, Peters MA, et al. **Visfatin/Pre-B-cell Colony-enhancing Factor (PBEF), a Proinflammatory and Cell Motility-changing Factor in Rheumatoid Arthritis.** *The Journal of biological chemistry.* 2012 Aug 17; 287(34):28378-28385.
217. Rho YH, Solus J, Sokka T, et al. **Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 2009 Jul; 60(7):1906-1914.
218. Chung CP, Long AG, Solus JF, et al. **Adipocytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to inflammation, insulin resistance and coronary atherosclerosis.** *Lupus.* 2009 Aug; 18(9):799-806.
219. Ehrenstein MR, Wing C. **The BAFFing effects of rituximab in lupus: danger ahead?** *Nature reviews Rheumatology.* 2016 Jun; 12(6):367-372.
220. Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC, et al. **B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2008 Jul; 67(7):1011-1016.

221. Cambridge G, Perry HC, Nogueira L, et al. **The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment.** *J Autoimmun.* 2014 May; 50:67-76.
222. Krystufkova O, Vallerskog T, Helmers SB, et al. **Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2009 Jun; 68(6):836-843.
223. Krystufkova O, Barbasso Helmers S, Venalis P, et al. **Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies.** *Arthritis research & therapy.* 2014; 16(5):454.
224. Krol P, Krystufkova O, Polanska M, et al. **Serum levels of interferon alpha do not correlate with disease activity in patients with dermatomyositis/polymyositis.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2011 May; 70(5):879-880.
225. Remakova M, Svitalkova T, Faustova M, et al. **The two mRNA transcription variants of the B-cell activating factor are differentially expressed, but in a stable ratio.** *Clin Exp Rheumatol.* 2014 Sep-Oct; 32(5):763-764.
226. Hulejova H, Krystufkova O, Mann H, et al. **Increased visfatin levels are associated with higher disease activity in anti-Jo-1-positive myositis patients.** *Clin Exp Rheumatol.* 2016 Mar-Apr; 34(2):222-229.
227. Furuya T, Hakoda M, Tsuchiya N, et al. **Immunogenetic features in 120 Japanese patients with idiopathic inflammatory myopathy.** *The Journal of rheumatology.* 2004 Sep; 31(9):1768-1774.
228. Tomasova Studynkova J, Charvat F, Jarosova K, et al. **The role of MRI in the assessment of polymyositis and dermatomyositis.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2007 Jul; 46(7):1174-1179.
229. Isenberg DA, Allen E, Farewell V, et al. **International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease.** *Rheumatology (Oxford, England).* 2004 Jan; 43(1):49-54.
230. Henriksson KG. **"Semi-open" muscle biopsy technique. A simple outpatient procedure.** *Acta Neurol Scand.* 1979 Jun; 59(6):317-323.
231. Montfort Kv, Mooijaart A, Meijerink F. **Estimating structural equation models with nonnormal variables by using transformations.** *Statistica Nederlandica.* 2009; 63(2):213-226.
232. Jöreskog KG, Sörbom D. **LISREL (version 8.8).** Scientific Software International, Inc, Lincolnwood, IL. 2006:22-69.
233. Raudenbush SW, Bryk AS, Cheong YF, et al. **HLM 6: Hierarchical linear and nonlinear modeling.** MA: Lincolnwood, IL: Scientific Software International, Inc. 2004:14-64.
234. Eloranta M-L, Barbasso Helmers S, Ulfgren A-K, et al. **A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/Anti-Ro60 autoantibodies.** *Arthritis Rheum.* 2007; 56.
235. Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. **Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2004 Sep; 63(9):1096-1103.
236. Peng QL, Shu XM, Wang DX, et al. **B-cell activating factor as a serological biomarker for polymyositis and dermatomyositis.** *Biomarkers in medicine.* 2014; 8(3):395-403.
237. Muangchan C, Harding S, Khimdas S, et al. **Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group.** *Arthritis care & research.* 2012 Sep; 64(9):1405-1414.
238. Liu X, Mayes MD, Pedroza C, et al. **Does C-reactive protein predict the long-term progression of interstitial lung disease and survival in patients with early systemic sclerosis?** *Arthritis care & research.* 2013 Aug; 65(8):1375-1380.
239. Agassandian M, Shurin GV, Ma Y, et al. **C-reactive protein and lung diseases.** *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2014 Aug; 53:77-88.
240. Cen X, Zuo C, Yang M, et al. **A clinical analysis of risk factors for interstitial lung disease in patients with idiopathic inflammatory myopathy.** *Clinical & developmental immunology.* 2013; 2013:648570.
241. Xu Y, Yang CS, Li YJ, et al. **Predictive factors of rapidly progressive-interstitial lung disease in patients with clinically amyopathic dermatomyositis.** *Clinical rheumatology.* 2016 Jan; 35(1):113-116.
242. Roth DA, Thompson A, Tang Y, et al. **Elevated BlyS levels in patients with systemic lupus erythematosus: Associated factors and responses to belimumab.** *Lupus.* 2016 Apr; 25(4):346-354.
243. Li X, Su K, Ji C, et al. **Immune opsonins modulate BlyS/BAFF release in a receptor-specific fashion.** *J Immunol.* 2008 Jul 15; 181(2):1012-1018.

244. Krystufkova O, Modra M, Mann H, et al. **Serum levels of BAFF correlate with disease activity in longitudinally followed patients with anti-Jo-positive myositis.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2010; 69(Suppl3):412.
245. Szyszko EA, Brun JG, Skarstein K, et al. **Phenotypic diversity of peripheral blood plasma cells in primary Sjogren's syndrome.** *Scandinavian journal of immunology.* Jan; 73(1):18-28.
246. Wehr C, Eibel H, Masilamani M, et al. **A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE.** *Clinical immunology (Orlando, Fla.* 2004 Nov; 113(2):161-171.
247. Arce E, Jackson DG, Gill MA, et al. **Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus.** *J Immunol.* 2001 Aug 15; 167(4):2361-2369.
248. Brieva JA, Roldan E, De la Sen ML, et al. **Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation.** *Immunology.* 1991 Apr; 72(4):580-583.
249. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al. **Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus.** *J Immunol.* 2000 Nov 15; 165(10):5970-5979.
250. Greenberg SA. **Type 1 interferons and myositis.** *Arthritis Res Ther.* Apr 14; 12 Suppl 1:S4.
251. Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R, et al. **Interferon beta is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2011 May; 70(5):831-836.
252. Sellam J, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, et al. **Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2007 Jun; 66(6):790-797.
253. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, et al. **Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation.** *Nature clinical practice Rheumatology.* 2007 Dec; 3(12):716-724.
254. Nowell M, Evans L, Williams A. **PBEF/NAMPT/visfatin: a promising drug target for treating rheumatoid arthritis?** *Future medicinal chemistry.* 2012 Apr; 4(6):751-769.
255. Sglunda O, Mann H, Hulejova H, et al. **Decreased circulating visfatin is associated with improved disease activity in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort.** *PloS one.* 2014; 9(7):e103495.
256. Klaasen R, Herenius MM, Wijbrandts CA, et al. **Treatment-specific changes in circulating adipocytokines: a comparison between tumour necrosis factor blockade and glucocorticoid treatment for rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2012 Sep; 71(9):1510-1516.
257. Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, et al. **Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy.** *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Jan-Feb; 28(1):56-62.
258. Krzysik-Walker SM, Ocon-Grove OM, Maddineni SR, et al. **Is visfatin an adipokine or myokine? Evidence for greater visfatin expression in skeletal muscle than visceral fat in chickens.** *Endocrinology.* 2008 Apr; 149(4):1543-1550.
259. Munoz-Beaunud F, Isenberg DA. **Rituximab as an effective alternative therapy in refractory idiopathic inflammatory myopathies.** *Clin Exp Rheumatol.* 2013 Nov-Dec; 31(6):896-903.
260. Otero M, Lago R, Gomez R, et al. **Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases.* 2006 Sep; 65(9):1198-1201.

8. Seznam zkratek

ACPA	anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies
ALT	alanine aminotransferase
ANOVA	multiway analysis of variance
Anti-CCP	anti-cyclic citrullinated peptide antibody
Anti-Jo-1	anti-histidyl-tRNA synthetase antibody
APRIL	A proliferation inducing ligand
ARS / ASA	protilátky proti amino-acyl-tRNA syntetázám / anti-synthetase antibodies
ASS	anti-synthetase syndrome
AST	aspartate aminotransferase
BAFF / BLyS	B-cell activating factor of the TNF family / B-cell stimulator
BAFF-R / BR3	BAFF receptor / BAFF receptor 3
BCMA	B-cell maturation antigen
BCR	B-cell receptor
BDCA-2	blood dendritic cell antigen-2
CD138	Syndecan-1 - Plasma Cell Marker
CD19; CD20	B-lymphocyte antigen
CK	Creatin kinase, Kreatin kináza
CRP	C-reaktivní protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAS28	disease activity score of 28 joints
DC	dendritic cell
DLCO	diffusion capacity of the lung for carbon monoxide
DM	dermatomyozitida
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EULAR	European league against rheumatism
HLA	human leukocyte antigen
HLM	hierarchical linear model
HRCT	high resolution computer tomography
IBM	inclusion body myositis
ICC	intra-class correlation coefficient
IFN-1	interferon I typu
Ig	immunoglobulin
IIM	idiopathic inflammatory myositis
ILD	interstitial lung disease
IMACS	International Myositis Assessment and Clinical Studies (Group)
IMNM	immune mediated necrotizing myopathy
IZM	idiopatické zánětlivé myopatie
IZNM	imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie
JDM	Juvenile dermatomyositis
KW	Kruskall-Wallis test
MAA	myositis associated autoantibodies
MCTD	mixed connective tissue disease
MDAAT	Myositis Disease Activity Assessment Tool
MG	myasthenia gravis

MHC	major histocompatibility complex
MMT	manual muscle test
MR	multiple regression
MRI	magnetic resonance imaging, magnetická rezonance
mRNA	messenger RNA
MSA	myositic specific autoantibodies
MTX	methotrexate
MW	Mann-Whitney test
MX-1	IFN α / β -inducible myxovirus resistance-1 protein
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase
PBEF	pre-B cell colony-enhancing factor / visfatin
PC	Plasma cell
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PM	polymyozitida
pSS	primární Sjögrenův syndrom
RA	revmatoidní artritida
RF	revmatoidní faktor
RTX	rituximab
SLE	systemový lupus erythematoses
SSc	systemová sklerodermie
TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TNF- α	tumor necrosis factor α
VAS	visual analogue scale

9. Seznam publikací

Publikace k tématu disertační práce (viz Přílohy 1 – 8)

1. Kryštůfková O., Vallerskog T., Barbasso Helmers S., Mann H., Půtová I., Běláček J., Malmström V., Trollmo C., Vencovský J., Lundberg IE.
Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies.
Ann Rheum Dis.2009; 68 (6): 836-843. ISSN 0003-4967, DOI: 10.1136/ard.2008.091405
IF: 12,811
2. Kryštůfková O., Hulejová H, Mann H, Pecha O, Půtová I, Ekholm L, Lundberg IE, Vencovský J.
Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) / BLYS correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and with disease activity in longitudinally followed patients with polymyositis and dermatomyositis.
Arthritis Res Ther - Submitted manuscript ARRT-D-18-00153
IF: 4,121
3. Kryštůfková O., Barbasso Helmers S, Venalis P, Malmström V, Lindroos E, Vencovský J, Lundberg IE.
Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies.
Arthritis Res Ther 2014;16 (5): Article Nr. 454: pp 1-13. ISSN 1478-6354, DOI: 10.1186/s13075-014-0454-8
IF: 4,121
4. Król P, Kryštůfková O., Polanská M, Mann H, Klein M, Beran O, Vencovský J.
Serum levels of IFN α do not correlate with disease activity in patients with dermatomyositis / polymyositis.
Ann Rheum Dis, 2011;70 (5): 879-880. ISSN 0003-4967 DOI: 10.1136/ard.2010.141051
IF: 12,811
5. Remáková M, Svitálková T, Faustová M, Vencovský j, Novota P, Kryštůfková O.
The two mRNA transcription variants of the B-cell activating factor are differentially expressed, but in a stable ratio.
Clin Exp Rheumatol. 2014 Sep-Oct;32(5):763-764. ISSN 0392-856X
IF: 2,634
6. Hulejová H, Kryštůfková O., Mann H, Klein M, Pavličková K, Zámečník J, Vencovský J, Šenolt L.
Increased visfatin levels are associated with higher disease activity in anti-Jo-1-positive myositis patients
Clin Exp Rheumatol. 2016; 34(2):222-9 ISSN 0392-856X,
IF: 2,6340
7. Šenolt L*, Kryštůfková O*, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Andrés Cerezo L, Běláček J, Haluzík M, Forejtová Š, Gay S, Pavelka K, Vencovský J.
The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy .
Cytokine. 2011; 55 (1): 116-121. ISSN 1043-4666 DOI:10.1016/j.cyto.2011.04.004
IF: 3,4880 * Sdílené první autorství.
- 8 Kryštůfková O.
Cytokiny BAFF (B-cell activating factor) a APRIL (a proliferation-inducing ligand) a jejich role u autoimunitních onemocnění.
Čes Revmatol 2008; 16 (1): 9-15
bez IF (recenzovaný)

Publikace, které nejsou zahrnuty do disertační práce
(vybrány pouze impaktované)

1. Musset L, Allenbach Y, Benveniste O, Boyer O, Bossuyt X, Bentow C, Phillips J, Mammen A, Van Damme P, Westhovens R, Ghirardello A, Doria A, Choi MY, Fritzler MJ, Schmelting H, Muro Y, García-De La Torre I, Ortiz-Villalvazo MA, Bizzaro N, Infantino M, Imbastaro T, Peng Q, Wang G, Vencovský J, Klein M, Krystufkova O, Franceschini F, Fredi M, Hue S, Belmondo T, Danko K, Mahler M.
Anti-HMGCR antibodies as a biomarker for immune-mediated necrotizing myopathies: A history of statins and experience from a large international multi-center study.
Autoimmun Rev. 2016 Oct;15(10):983-93. ISSN: 1568-9972 DOI: 10.1016/j.autrev.2016.07.023.
IF: 8,961
2. Albrecht I, Wick C, Hallgren Å, Tjärnlund A, Nagaraju K, Andrade F, Thompson K, Coley W, Phadke A, Diaz-Gallo LM, Bottai M, Nennesmo I, Chemin K, Herrath J, Johansson K, Wikberg A, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Danielsson O, Krystufkova O, Vencovsky J, Landegren N, Wahren-Herlenius M, Padyukov L, Kämpe O, Lundberg IE.
Development of autoantibodies against muscle-specific FHL1 in severe inflammatory myopathies
J Clin Invest. 2015 Dec 1;125(12):4612-4624. ISSN 0021-9738, DOI:10.1172/JCI81031
IF: 12,784
3. Mišunová M, Svitálková T, Pleštilová L, Kryštůfková O, Tegzová D, Svobodová R, Hušáková M, Tomčík M, Bečvář R, Závada J, Mann H, Kolesár L, Slavčev A, Vencovský J, Novota P.
Molecular markers of systemic autoimmune disorders: the expression of MHC-located HSP70 genes is significantly associated with autoimmunity development.
Clin Exp Rheumatol. 2017 Jan-Feb;35(1):33-42. Epub 2016 Dec 28. DOI: nepřiděleno
IF: 2,634
4. Šenolt L, Hulejová H, Kryštůfková O, Forejtová S, Andres Cerezo L, Gatterová J, Pavelka K, Vencovský J.
Low circulating Dickkopf-1 and its link with severity of spinal involvement in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis.
Ann Rheum Dis. 2012; 71 (1): 71-4. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200357
IF: 12,811
5. Freiburger T, Grombířiková H, Ravčuková B, Jarkovský J, Kuklínek P, Kryštůfková O, Hanzlíková J, Daňková E, Kopecký O, Zachová R, Lahodná M, Vašáková M, Grodecká L, Litzman J.
No evidence for linkage between the hereditary angioedema clinical phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene.
Scand J Immunol. 2011, 74, 1, 100-6. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02547.x
IF: 2,256
6. van Lierop MJ, den Hoed L, Houbiers J, Vencovský J, Ružičková S, Kryštůfková O, van Schaardenburg M, van den Hoogen F, Vandooren B, Baeten D, De Keyser F, Sonderstrup G, Bos E, Boots AM.
Endogenous HLADR- restricted presentation of the cartilage antigens human cartilage gp-39 and melanoma inhibitory activity in the inflamed rheumatoid joint.
Arthritis Rheum. 2007;56 (7): 2150-2159. ISSN 0004- 3591,DOI: 10.1002/art.22651
IF: 7,379
7. Veigl D, Niederlová J, Kryštůfková O.
Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression.
Physiol Res. 2007;56(4):455-62. DOI: nepřiděleno
IF: 1,461

8. Freiburger T, Vyskocilova M, Kolarova L, Kuklinek P, Kryštůfková O, Lahodna M, Hanzlikova J, Litzman J.
Exon 1 polymorphism of the B2BKR gene does not influence the clinical status of patients with hereditary angioedema.
Hum Immunol. 2002, 63, 6, 492-4. DOI: 10.1016/S0198-8859(02)00397-X
IF: 2,311
9. Krátká Z, Bártová J, Kryštůfková O, Benetková K, Mrklas L, Fučíková T.
Effect of intravenous immunoglobulins on in vitro immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency.
APMIS. 2002; 110, 3: 205-13. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2002.t01-1-100302.x
IF: 1,795
10. Kryštůfková O, Hausner P, Janatková I, Votava V, Šebeš A.
Cell-mediated response to BCG investigated by leukocyte migration test from an agarose droplet.
J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1988;32(2):181-7
IF: 0.02

10. Přílohy

Příloha 1

<http://ard.bmj.com/content/68/6/836.long>

Příloha 2

Manuscript odeslaný do tisku

Příloha 3

<https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-014-0454-8>

Příloha 4

<http://ard.bmj.com/content/70/5/879.long>

Příloha 5

<http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=7967>

Příloha 6

<http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=9618>

Příloha 7

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043466611001050>

Příloha 8

<http://www.prolekare.cz/ceska-revmatologie-clanek/cytokiny-baff-b-cell-activating-factor-a-april-a-proliferation-inducing-ligand-a-jejich-role-u-autoimunitnich-471>