

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**Mgr. Lucie Andrés Cerezo**

Význam S100 proteinů v patogenezi revmatických onemocnění

*The role of S100 proteins in the pathogenesis of rheumatic diseases*

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Ladislav Šenolt, PhD

Pracoviště: Revmatologický ústav

Klinika revmatologie 1. LF UK

Na Slupi 4

12850 Praha 2

Tel. +420 234 075 232

Fax. +420 224 914 451

Praha, 2013

**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, 20.03.2013

**Mgr. Lucie Andrés Cerezo**

**Identifikační záznam:**

ANDRÉS CERESO, Lucie. Význam S100 proteinů v patogenezi revmatických onemocnění. (The role of S100 proteins in the pathogenesis of rheumatic diseases). Praha, 2013. 76 s., 4 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav, Klinika revmatologie 1. LF UK. Školitel Šenolt, Ladislav.

## **Abstrakt**

**Úvod:** Nové poznatky a bližší pochopení patogeneze revmatických onemocnění přispěly k vývoji biologických léků zaměřených proti cytokinům a imunitním buňkám. Některé S100 proteiny vykazují chování podobné cytokinům a kromě regulace mnoha buněčných funkcí jsou součástí zánětlivého procesu. Cílem naší práce bylo studovat význam vybraných S100 proteinů ve vztahu k aktivitě a patogenezi zánětlivých revmatických onemocnění.

**Výsledky:** Naše výsledky poprvé poukázaly na vztah S100A4 proteinu k aktivitě revmatoidní artritidy (RA) a na pokles jeho biologicky aktivní multimerní formy vlivem aplikace biologické léčby blokující tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Prokázali jsme, že S100A4 funguje v podmínkách in vitro jako prozánětlivý mediátor, který indukuje produkci cytokinů TNF $\alpha$ , interleukinu (IL)-1 $\beta$  a IL-6 mononukleárními buňkami prostřednictvím Toll-like receptoru 4 (TLR-4), transkripčního faktoru NF $\kappa$ B a tyrosinových kináz erk1/2 a p38. S100A4 protein může navíc hrát roli v patogenezi zánětlivých myopatií, kde je přítomen ve zvýšeném množství v zánětlivém infiltrátu postiženého svalu, v regenerujících svalových vláknech a nepřímo se tak může podílet na poškození svalových vláken stimulací tvorby cytokinů mononukleárními buňkami. Dalším zjištěním byla normalizace zvýšených sérových hladin S100A12 a S100A8/9 proteinů u pacientů s časnou RA po zahájení konvenční antirevmatické léčby. Oba tyto proteiny pozitivně korelovaly s aktivitou RA, přičemž pokles S100A8/9 může představovat potenciálně nadějný ukazatel redukce počtu oteklých kloubů vlivem úspěšné terapie RA.

**Závěr:** Naše výsledky umožnily podrobněji charakterizovat vybrané S100 proteiny ve vztahu k aktivitě a patogenezi revmatických chorob a zhodnotit možné terapeutické využití jejich inhibice u autoimunitních onemocnění.

**Klíčová slova:** revmatoidní artritida, zánětlivé myopatie, S100 proteiny

## **Abstract**

**Introduction:** Recent findings and better understanding to the pathogenesis of rheumatic diseases contributed to the development of biological therapies targeting cytokines and immune cells. Several S100 proteins exert cytokine-like effects and participate in the regulation of the inflammatory process. The aim of this work was to study the role of selected S100 proteins in the activity and in the pathogenesis of the rheumatic diseases.

**Results:** Our data show for the first time an association of S100A4 protein with RA disease activity and decrease of the bioactive form, but not the total amount of S100A4, after application of tumour necrosis factor (TNF) blocking biologic therapy in patients with RA. We demonstrated that in vitro S100A4 acts as a potent pro-inflammatory mediator inducing production of TNF $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 in PBMCs via Toll-like receptor 4 (TLR-4), transcription factor NF $\kappa$ B and tyrosine kinases erk1/2 and p38. Moreover, S100A4 can play an important role in the pathogenesis of inflammatory myopathies. S100A4 is present in the inflammatory infiltrate of the affected muscles and in the regenerating muscles and may act as a cytokine-like factor indirectly promoting muscle fiber damage by stimulating mononuclear cells to increase the synthesis of pro-inflammatory cytokines. We also show normalization of elevated S100A8/9 and S100A12 in patients with recent-onset RA after the initiation of conventional treatment. Both proteins were positively associated with the RA disease activity and the decrease of S100A8/9 may be an indicator of the improvement in the total number of swollen joints after successful therapy of RA.

**Conclusion:** We provide further characterization of the role of S100 proteins in the activity and pathogenesis of rheumatic diseases and evaluation of the potential therapeutic implication in autoimmune diseases.

**Key words:** rheumatoid arthritis, inflammatory myopathies, S100 proteins

## OBSAH

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | ÚVOD   | 7  |
| 1.1     | Revmatoidní artritida  | 7  |
| 1.2     | Idiopatické zánětlivé myopatie   | 13 |
| 1.2.1   | Polymyositida a dermatomyositida   | 13 |
| 1.3     | S100 proteiny  | 17 |
| 1.3.1   | S100A12 a S100A8/9   | 18 |
| 1.3.2   | Protein S100A4   | 19 |
| 1.3.2.1 | Význam S100A4 u nádorových onemocnění  | 20 |
| 1.3.2.2 | Význam S100A4 v patogenezi autoimunitních onemocnění   | 22 |
| 2       | HYPOTÉZA A CÍLE  | 25 |
| 3       | METODIKA A VÝSLEDKY  | 26 |
| 3.1     | Význam S100 proteinů u revmatických onemocnění (komentáře k publikacím zařazeným do disertační práce)  | 26 |
| 3.1.1   | Hladiny S100A4 proteinu korelují s aktivitou onemocnění a aplikace anti-TNF $\alpha$ terapie vede k poklesu hladin biologicky aktivní multimerní formy S100A4 v plazmě u pacientů s revmatoidní artritidou | 26 |
| 3.1.2   | Protein S100A4 je zvýšeně exprimován u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi   | 28 |
| 3.1.3   | Snížení hladin sérového calprotectinu (S100A8/9) koreluje s poklesem počtu oteklých kloubů u pacientů s časnou revmatoidní artritidou  | 33 |
| 3.2     | Molekulární mechanismy S100A4 indukované zánětlivé odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou  | 38 |
| 3.2.1   | Metodika   | 38 |
| 3.2.2   | Výsledky   | 41 |
| 4       | DISKUSE  | 44 |
| 4.1     | Význam S100 proteinů u revmatických onemocnění   | 44 |
| 4.2     | Molekulární mechanismy S100A4 indukované imunitní odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou   | 47 |
| 5       | ZÁVĚR  | 48 |
| 6       | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK   | 49 |

|    |                           |    |
|----|---------------------------|----|
| 7  | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 51 |
| 8  | SEZNAM PUBLIKACÍ          | 69 |
| 9  | PODĚKOVÁNÍ                | 74 |
| 10 | PŘÍLOHY                   | 75 |

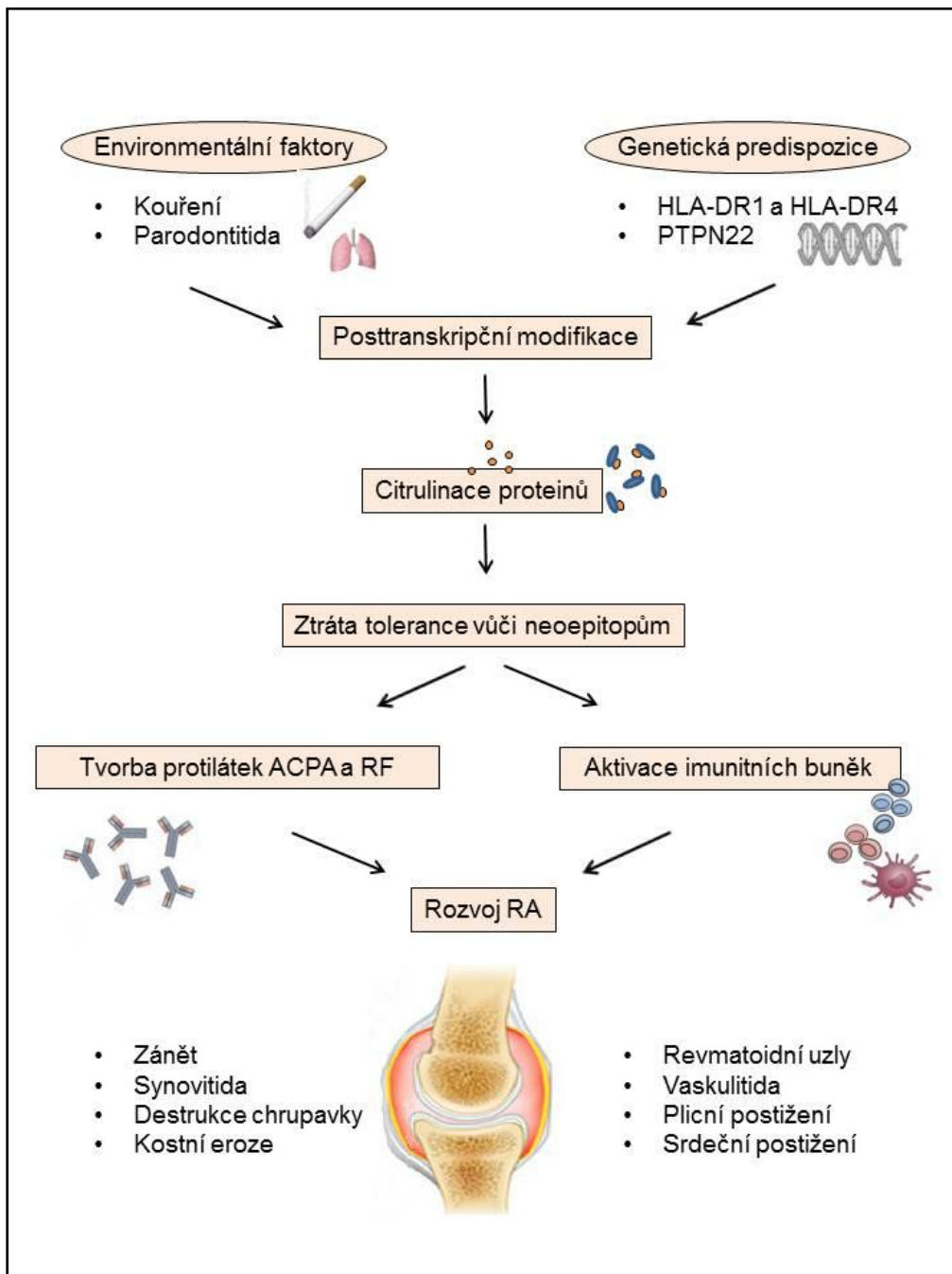
# 1 ÚVOD

## 1.1 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je systémové autoimunitní onemocnění charakterizované chronickým zánětem synoviální tkáně, tvorbou autoprotilátek a následnou kloubní destrukcí. V průmyslových zemích je revmatoidní artritidou postiženo přibližně 1% populace (Lawrence R.C. et al., 1998). K manifestaci onemocnění dochází většinou mezi 20. a 50. rokem života a ženy jsou postiženy přibližně třikrát častěji než muži. Kromě typického postižení kloubů mohou být zánětem zasaženy i další orgány, zejména srdce nebo plíce, což může vést ke kardiovaskulárním komplikacím a zvýšené mortalitě takto postižených pacientů (Alamanos Y. et al., 2008; Aviña-Zubieta J.A. et al., 2008). Neléčená RA významně snižuje kvalitu života a ve výsledku vede k výraznému funkčnímu postižení. Přestože je RA zatím onemocněním nevyléčitelným, moderní léčebné strategie umožňují u významné části nemocných dosáhnout nízké aktivity a klinické remise a zpomalit nebo i zastavit rozvoj kloubních destrukcí. Základním předpokladem úspěchu je včasná diagnóza a léčba. Časná intenzivní léčba RA spolu s pečlivým sledováním aktivity onemocnění v průběhu léčby jsou v současnosti považovány za akceptovaný terapeutický postup.

Etiologie RA není dosud zcela objasněna. Současné poznatky ukazují, že na vzniku onemocnění se podílí kombinace genetických a environmentálních faktorů, které dohromady předurčují náchylnost k rozvoji onemocnění (Obr. 1.1.). U geneticky predisponovaných jedinců vystavených působení vyvolávacího činitele dochází k abnormální imunitní reakci vedoucí k chronickému zánětu. Opakovaně bylo prokázáno, že s rozvojem RA jsou asociovány specifické alely HLA-DR1 a HLA-DR4, konkrétně alely HLA-DRB1\*0401, DRB1\*0404, DRB1\*0101 (Gregersen P.K. et al., 1987; Nepom G.T. et al., 1987). Pro tyto alely je charakteristická přítomnost sekvence několika aminokyselin ve třetí hypervariabilní oblasti HLA-DRbeta1 řetězce HLA označovaná jako tzv. sdílený epitop. Silnou asociaci se vznikem RA vykazuje také alela genu PTPN22 (kódující tyrozinovou fosfatázu), která je součástí signální kaskády T a B lymfocytů. Některé další známé rizikové alely se účastní regulace imunitní odpovědi prostřednictvím NFkB signalizace (TRAF1-C5, c-REL) nebo pomocí aktivace a diferenciací T lymfocytů (CTLA4, STAT4) (Begovich A.B. et al., 2004; Kurreeman F.A. et al., 2007; Plenge R.M. et al., 2007; Remmers E.F. et al., 2007). Nositelství sdíleného epitopu v molekulách HLA-DR či vnímavé alely genu PTPN22 predisponují nemocné k tvorbě autoprotilátek proti citrulinovaným proteinům (ACPA) a revmatoidním

faktorům a následně k rozvoji tzv. seropozitivní (ACPA a/nebo RF pozitivní) RA (Padyukov L. et al., 2004; Klareskog L. et al., 2006; Lee A.T. et al., 2005). Autoprotilátkově negativní RA - prognosticky příznivější forma onemocnění - má dosud méně popsany genetický základ a to v jiných oblastech genomu než je tomu u ACPA pozitivní formy RA. S rizikem rozvoje vzniku ACPA negativní RA jsou spojovány např. HLA-DR1\*03, interferon regulační faktor 5 (IRF5) nebo lektin vázající proteiny (Klareskog L. et al., 2008).



**Obr. 1.1.** Etiopatogeneze revmatoidní artritidy

Jedním z nejvýznamnějších faktorů zevního prostředí, který u geneticky vnímavých jedinců může fungovat jako podnět pro aktivaci imunitního systému a rozvoje RA, je kouření tabáku (Padyukov L. et al., 2004; Klareskog L. et al., 2006). Kouření a další stresové faktory ovlivňující plicní tkáň (rozpouštědla, křemen) zvyšují riziko vzniku ACPA pozitivní RA u jedinců se sdíleným epitopem (Silman A.J. et al., 2001). Vlivem těchto stresových faktorů dochází k postranlační modifikaci enzymem PADI4 (peptidyl arginin deiminasa typu IV), což navozuje citrulinaci proteinů v plicích. Změna argininu v citrulin, který není tělu vlastní, tak může spustit ztrátu tolerance vůči těmto neoepitopům a vyvolat protilátkovou odpověď (Vincent C. et al., 1999; De Rycke L. et al., 2004).

Za možné spouštěče autoimunitní reakce u RA jsou považována také některá infekční agens (lidský parvovirus B19, virus Epstein-Barrové, retroviry, virus hepatitidy B, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis a Mycoplasma) a jejich produkty (např. proteiny tepelného šoku HSPs). Předpokládá se, že imunokomplexy vznikající v průběhu infekce indukují tvorbu autoprotiáték (Auger I. et al., 1997; Kamphuis S. et al., 2005). Nedávná studie také ukázala souvislost mezi rozvojem RA a parodontózou způsobenou bakterií Porphyromonas gingivalis, která produkuje enzym PAID4 regulující citrulinaci proteinů (Wegner N. et al., 2010).

Klíčovým místem patogeneze RA je synoviální membrána. Za normálních okolností je tvořena tenkou výstelkou ze synoviálních fibroblastů a makrofágů ležících na relativně málo buněčném podkladě obsahujícím cévy, pojivovou tkáň a jen malé množství imunitních buněk. Povrchová vrstva synovie, tzv. synoviální intima, se v klidovém stavu skládá ze dvou až tří vrstev buněk. S rozvojem RA v synoviální membráně významně narůstá počet synoviálních fibroblastů a synovie se stává hyperplastickou. Aktivované RA synoviální fibroblasty produkují řadu prozánětlivých signálních molekul, které mohou přímo ovlivňovat další buňky a dále se podílet na prohlubování zánětu. Kromě toho dochází k aktivaci řady imunitních buněk, které infiltrují synoviální tkáň a ta se mění v agresivní granulační tkáň, tzv. pannus. Tato tkáň může přerůst kloubní povrch, infiltrovat ostatní kloubní struktury a navozovat jejich postupnou destrukci (Zvaifler N.J. et al., 1994).

Předpokládá se, že v patogenezi RA má zásadní význam autoprotiátková odpověď vyvolaná interakcí vrozeného (antigen prezentující buňky) a adaptivního (CD4 + T lymfocyty a B lymfocyty) imunitního systému. Aktivovaná synovie je hojně infiltrována celou řadou imunokompetentních buněk, především makrofágy a lymfocyty. T lymfocyty, a to zejména

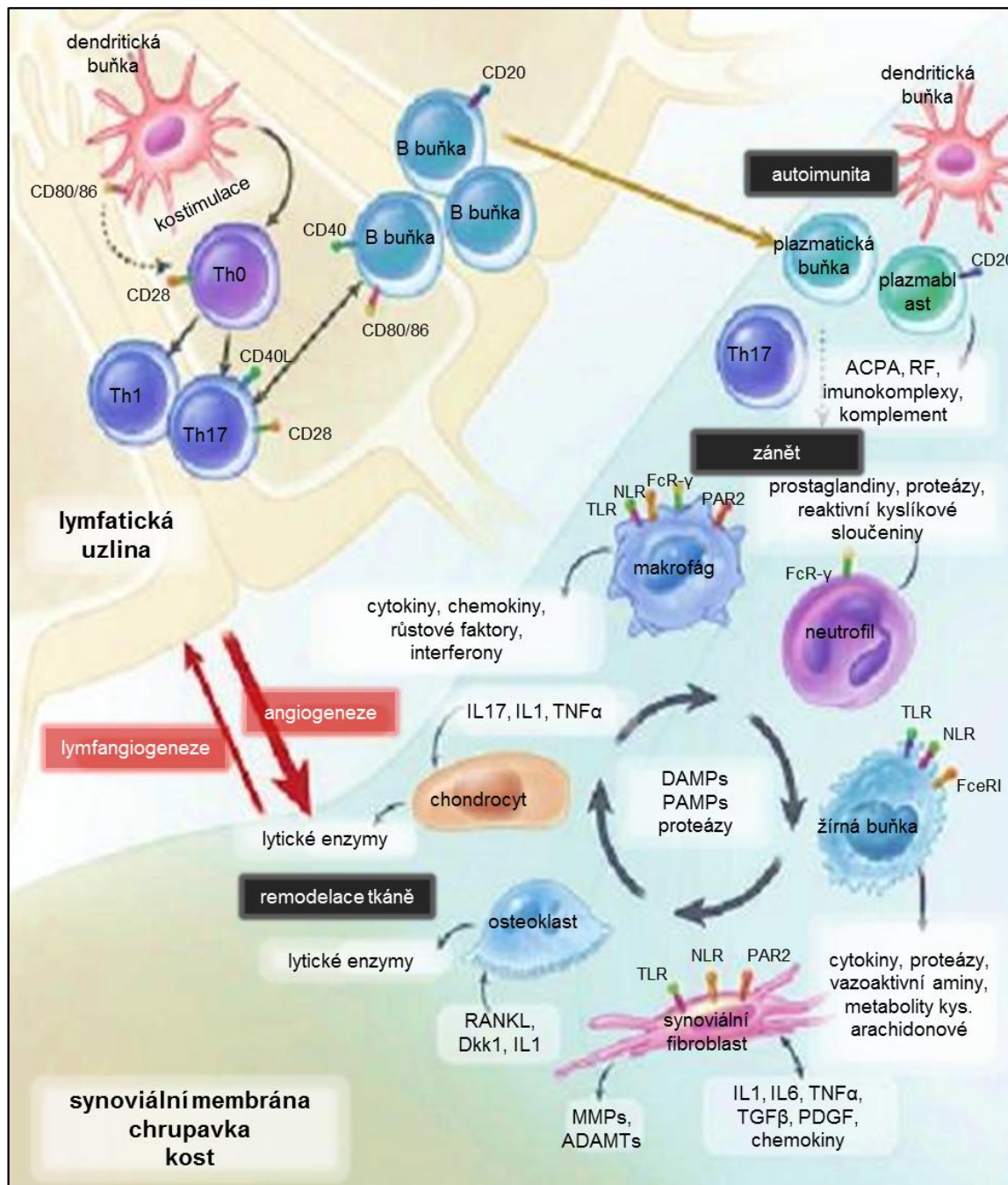
stimulované Th1 lymfocyty, jsou považovány za klíčové buňky odpovědné za rozvoj a udržování zánětlivé reakce v RA synoviální tkáni. Recentní práce poukazují také na významnou roli tzv. Th17 lymfocytů, které jsou zdrojem celé řady prozánětlivých cytokinů (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 a TNF $\alpha$ ), (Chabaud M. et al., 1998; Miossec P. et al., 2009). Th17 se polarizují z Th0 buněk pod vlivem makrofágy a dendritickými buňkami produkovaného IL-23. Tento interleukin spolu s dalšími faktory (TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21) vytváří prostředí potlačující diferenciaci T regulačních buněk ve prospěch Th17. Tím dochází k narušení rovnováhy mezi Th17 a Treg buňkami, které jsou nezbytné pro kontrolu zánětu. Th17 lymfocyty jsou zdrojem zejména IL-17, který řídí diferenciaci neutrofilních leukocytů a podílí se na aktivaci monocytů, fibroblastů a chondrocytů (Genovese M.C. et al., 2010; Nadkarni S. et al., 2007). Mezi významné buňky podílející se na destrukci kloubu během RA se řadí také B lymfocyty. B lymfocyty diferencují v plasmatické buňky, které tvoří autoprotilátky, regulují aktivaci dendritických buněk, ovlivňují interakce T lymfocytů s makrofágy a s vlastními B lymfocyty a tvoří prozánětlivé cytokiny a chemokiny (např. TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 a LT $\beta$ ). Nezanedbatelná je jejich role také jako antigen prezentujících buněk a buněk poskytujících důležitý kostimulační signál nutný pro klonální expanzi a funkci CD4 $^{+}$  T lymfocytů (Takemura S. et al., 2001; McInnes I.B. et al., 2007).

Makrofágy přítomné v synovii jsou jednak fagocytujícími a antigen prezentujícími buňkami, ale také významným zdrojem prozánětlivých cytokinů a chemokinů (např. IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 a GM-CSF) a metalloproteináz, které udržují zánětlivé prostředí RA synoviální tkáně a přispívají k destrukci kloubu (McInnes I.B. et al., 2007). K regulaci zánětu, proliferace a apoptózy přispívají v menší míře také žírné buňky přítomné v synovii (Nigrovic P.A. et al., 2007; Hueber A.J. et al., 2010). Svůj podíl mají také neutrofilní leukocyty, které se z větší části vyskytují v synoviální tekutině a jsou odpovědné za produkci prostaglandinů a proteolytických enzymů (Cascão R. et al., 2010).

Nejen imunitní buňky, ale také aktivované synoviální fibroblasty přispívají k patogenetickému procesu u RA. Aktivované fibroblasty vykazují oproti zdravým buňkám změněný fenotyp, ztrácejí schopnost tzv. kontaktní inhibice, rostou bez nutnosti ukotvení a produkují cytokiny, chemokiny, adhezní molekuly a metalloproteinázy (Bradfield P.F. et al., 2003). Předpokládá se, že agresivní fenotyp fibroblastů je způsoben především změnami v regulaci apoptózy (Aupperle K.R. et al., 1998; Schett G. et al., 1998), např. mutacemi tumor supresorového genu p53, expresí proteinů tepelného šoku (Hsp70) a dále změnou funkce

endoplasmatického retikula, která vede k narušení přirozené rovnováhy mezi proliferací a apoptózou (Amano T. et al., 2003). Nezanedbatelný vliv na regulaci buněčného cyklu synoviálních fibroblastů má také epigenetická modifikace, a to zejména metylace a acetylace regulačních genů a pozměněná exprese mikroRNA (Stanczyk J. et al., 2008).

Na molekulové úrovni jsou imunitní mechanismy v synovii zprostředkovány širokým spektrem cytokinů, jehož složení v průběhu onemocnění se mění. Současná data ukazují, že spektrum cytokinů přítomných v synoviální tekutině pacientů s časnou RA se významně odlišuje od pacientů s etablovanou RA a zásadním způsobem ovlivňuje prostředí kloubu, čímž přispívá k rozvoji etablované RA (Raza K. et al., 2005). Zatímco pro časná stádium nemoci je charakteristická přítomnost interleukinů a růstových faktorů (IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-15 a FGFs, EGFs), u pacientů s etablovanou RA hlavní roli přebírají cytokiny jako je TNF $\alpha$ , který indukce produkci dalších cytokinů, chemokinů, adhezních molekul, podporuje angiogenezi a potlačuje aktivitu T regulačních lymfocytů. Z interleukinů je nejvýznamnější IL-6, který se spolu s IL-1 podílí na aktivaci leukocytů, IL-6 dále ovlivňuje produkci protilátek, ale také změny v lipidovém metabolismu. Rodina interleukinů 1 hraje roli při aktivaci buněk kloubního prostředí chondrocytů a osteoblastů, ale i endotelových buněk (McInnes I.B. et al., 2007). Prozánětlivé cytokiny uvolňované v hyperplastické synovii indukují tvorbu metalloproteináz v synoviálních fibroblastech. Synovie ztrácí svoji protektivní funkci a proteolytické enzymy rozrušují kolagenovou síť chrupavky, agregan a nekolagenovou proteinovou matrix, což vede k destrukci kloubní chrupavky a subchondrální kosti. Protektivní funkce enzymových inhibitorů (např. TIMPs) se stává nedostatečnou a navíc pod vlivem cytokinů dochází k apoptóze chondrocytů (Sabeih F. et al., 2010). Důsledkem je postupná destrukce chrupavky a při přetrvávajícím zánětu i destrukce kosti způsobená vlivem M-CSF (faktor stimulující kolonie monocytů) a RANKL (ligand pro receptor aktivující NF $\kappa$ B) na diferenciaci osteoklastů (Gravallese E.M. et al., 1998), (Obr. 1.2.).



**Obr. 1.2.** Základní mechanismy zánětu a destrukce kloubu u revmatoidní artritidy (upraveno podle McInnes I.B. & Schett G., 2011)

## 1.2 Idiopatické zánětlivé myopatie

Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM) tvoří heterogenní skupinu poměrně vzácných onemocnění neznámé etiologie projevující se svalovou slabostí, která je následkem zánětu v příčně pruhované svalové tkáni. Polymyositida (PM) a dermatomyozitida (DM) představují dvě nejrozšířenější kategorie zánětlivých myopatií. Významně nižší frekvence výskytu byla dokumentována u myositidy s inkluzními tělísky (IBM), která je častější u pacientů starších 50 let a bývá často zaměňována s PM (Dalakas M.C. et al., 2003; Dalakas M.C., 2004). Výskyt IZM v populaci je vzácný, odhaduje se na 20/100 000. Ženy jsou postiženy asi třikrát častěji než muži. Pro IZM je typická symetrická proximální svalová slabost, která je obvykle nebolestivá. U pacientů s dermatomyozitidou jsou navíc kromě svalového syndromu pozorovány charakteristické kožní změny ve tváři, na končetinách a trupu. Ve většině případů jsou s IZM asociována různá orgánová postižení, častější je také přítomnost nádorových onemocnění (Zantos D. et al., 1994; Levine S.M., 2006).

### 1.2.1 Polymyositida a dermatomyositida

Etiopatogeneze PM a DM není dosud přesně známa. Podobně jako u jiných autoimunitních chorob se předpokládá, že u geneticky predisponovaných jedinců mohou některé vnější faktory fungovat jako spouštěcí mechanismy autoimunitní reakce (Cooper G.S. et al., 1999). Imunogenetická predispozice v populaci pacientů s PM a DM je charakterizována vyšší frekvencí výskytu určitých HLA. Jedná se především o HLA antigeny HLA-DRB1\*0301 HLA-DQAI\*0501 a PTPN22 (Mastaglia F.L. and Phillips B.A., 2002; Koffman B.M. et al., 1998; Price P. et al., 2004). Spouštěcím faktorem mohou být některá infekčních agens, léky a toxiny. Je diskutována nepřímá asociace myositidy a některých virů (viry Coxackie B, influenzy, paramyxovirus, cytomegalovirus a Epstein-Barr virus) a retrovirů (HIV, HTLV-1) (Leff L.R. et al., 1992; Illa I. et al., 1991; Cupler E.J., 1996; Crum-Cianflone N.F., 2008). Nově byla také popsána souvislost mezi kouřením a zvýšeným rizikem produkce protilátky anti-Jo-1 u pacientů s HLADRB1\*03 (Chinoy et al., 2012). Dále existuje řada bakteriálních a parazitárních onemocnění, která mohou vyústit v tzv. infekční myositidu (Crum-Cianflone N.F., 2008). V neposlední řadě užívání některých léků (např. antimalarika, kolchicin, omeprazol, glukokortikoidy, interferon alfa nebo D-penicilamin) a expozice toxickým látkám mohou vyvolat onemocnění prakticky nerozeznatelné od idiopatické DM nebo PM (Walsh R.J. et al., 2005).

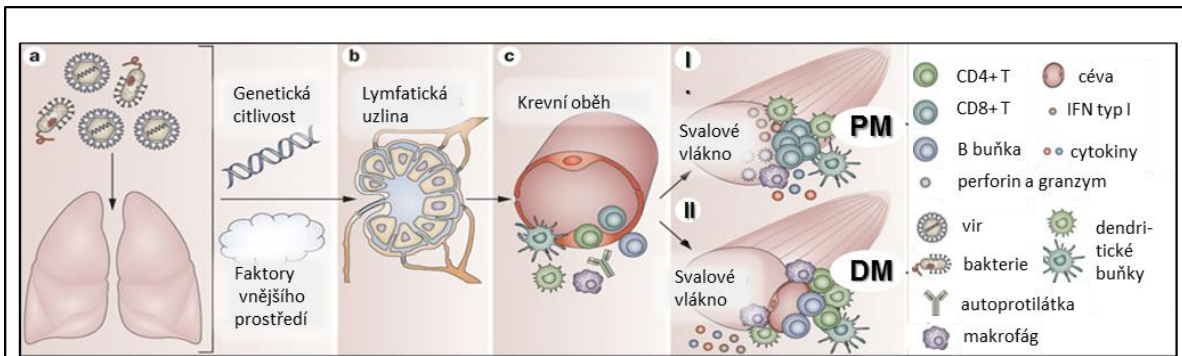
Významná část pacientů s IZM má v séru přítomny různé autoprotilátky zaměřené proti molekulám podílejících se na regulaci transkripce, translace anebo opravy DNA. Jejich přítomnost lze prokázat u přibližně 56-80 % pacientů s IZM (Brouwer R. et al., 2004; Koenig M. et al., 2007). Autoprotilátky nespecifické pro IZM, tzv. s myositidou asociované, se vyskytují i u dalších revmatických chorob bez systémových známek myositidy a řadí se sem anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Ku, anti-U1 RNP, anti-PM-Scl a další (Brouwer R. et al., 2004; Koenig M. et al., 2007). Asi u 40% pacientů byly zjištěny autoprotilátky specifické pro IZM, k nimž se váže výskyt určitého klinického obrazu, nejčastěji charakteristický začátek onemocnění nebo typická odpověď na podávanou léčbu. Mezi nejčastější patří protilátky proti aminoacyl-tRNA-syntetázám, např. anti-Jo-1 (Brouwer R. et al., 2004; Koenig M. et al., 2007; Seiberlich S. et al., 2005).

PM a DM představují dvě patogeneticky odlišná autoimunitní onemocnění. Zatímco PM je T lymfocyty zprostředkované onemocnění zaměřené proti svalovým vláknům, charakteristickým znakem DM je postižení cév zapříčiněné humorálními mechanismy namířenými proti komponentám endotelií, endomyziálních kapilár a malých cév.

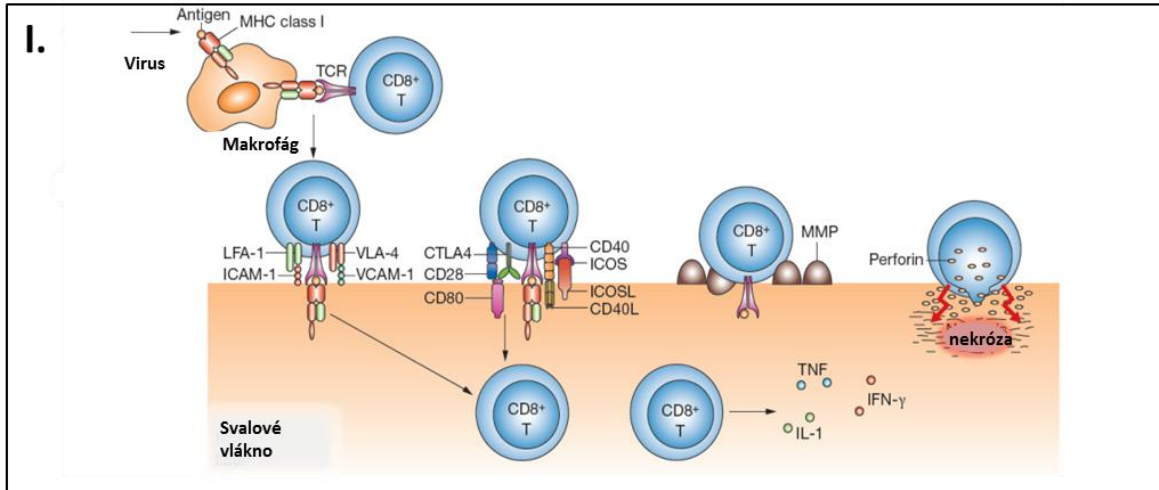
Polymyositida je onemocnění zprostředkované buněčnou imunitou. Primárně jsou postižena svalová vlákna, která u pacientů s PM na svém povrchu exprimují MHC I receptory a kostimulační molekuly, a tudíž fungují jako antigen prezentující buňky. Hlavní roli v patogenezi tohoto onemocnění hrají cytotoxické, pravděpodobně klonálně expandované, CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a makrofágy, které obklopují „non-nekrotická“ svalová vlákna. Sensibilizované CD8<sup>+</sup> T lymfocyty se následně prostřednictvím TCR receptoru vážou na MHCI svalový antigen a infiltrují „non-nekrotická“ svalová vlákna. Nezanedbatelnou roli v procesu invaze svalových vláken hrají také kostimulační molekuly (BB1 a ICOSL) a jejich ligandy (CD28, CTLA-4, a ICOS) ICAM-1/LFA-1, které stabilizují vazbu mezi CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a svalovým vláknem. Infiltraci svalového vlákna CD8<sup>+</sup> T lymfocyty významně usnadňují také matrixové degradující metalloproteinázy a v neposlední řadě i cytokiny jako interferon (IFN) $\gamma$ , interleukin IL-1, nebo TNF $\alpha$ . Vlastní nekróza svalového vlákna je indukována perforinovými granuly uvolňovanými CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (Dalakas M.C. et al., 2006)(Obr. 1.3. I.).

Dermatomyositida (DM) je především protilátkově zprostředkované onemocnění začínající v intramuskulárních cévách, ve kterých se ukládají útočné složky komplementu (membrane attack complement – MAC). Sekundárně jsou aktivovány B lymfocyty, CD4<sup>+</sup> lymfocyty,

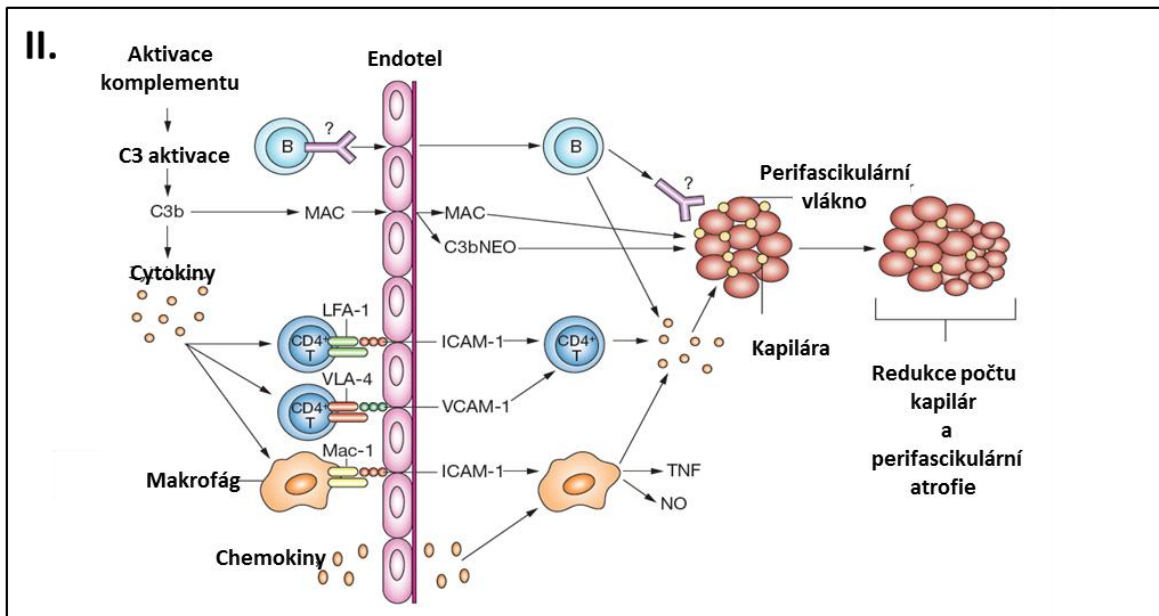
makrofágy a dendritické buňky, které infiltrují do svalu, především do intermyzia, kde produkují prozánětlivé cytokiny. Ty indukují expresi adhezních molekul (VCAM, ICAM) a integrinů (VLA-4, LFA-1) a tím podporují další infiltraci svalu mononukleárními buňkami. Tento proces vede k intramuskulární angiopatii a následné ischemii a nekróze svalových vláken (Dalakas M.C. et al., 2006) (Obr. 1.3. II.).



Upraveno podle Zong. & Lundberg, 2011



Upraveno podle Dalakas, 2006



Upraveno podle Dalakas, 2006

**Obr. 1.3.** Imunopatogeneze polymyositidy (I.) a dermatomyositidy (II.)

### 1.3 S100 proteiny

S100 rodina je tvořena více než 25 nízkomolekulárními kyselými proteiny o molekulové hmotnosti 10-12 kDa. Poprvé byly identifikovány a popsány v hovězím mozku a na základě rozpustnosti ve 100% roztoku amonium sulfátu označeny jako S100 (Moore B.W., 1965). Charakteristickým znakem S100 proteinů jsou dva strukturální motivy, tzv. „EF- vazebné domény“, které s různou afinitou váží kalcium (Isobe T. et al., 1978). Vazba kalcia vede ke strukturálním změnám, díky nimž mohou S100 proteiny navázat cílovou molekulu (Santamaria-Kisiel L. et al., 2006). Vedle kalcia jsou to také ionty zinku a mědi, které svou vazbou ovlivňují strukturu a působení některých S100 proteinů (Heizmann C.W. et al., 1998).

S100 proteiny vykazují své biologické funkce jak v intracelulárním prostředí, tak extracelulárně. Zatímco uvnitř buněk jsou v převážné většině přítomny ve formě homodimerů a heterodimerů, v podmínkách extracelulárního prostředí se vyskytují jako oligomery nebo multimery. Popsány byly např. heterotetramery proteinů S100A8/S100A9 (Strupat K. et al., 2000; Vogl T. et al., 2006), hexamery S100A12 proteinu (Strupat K. et al., 2000; Moroz O.V. et al., 2002) nebo tetra- a multi-mery S100A4 proteinu (Klingelhöfer J. et al., 2007). Většina S100 proteinů se vyskytuje intracelulárně a podílí se na regulaci řady buněčných procesů, mezi něž patří např. proliferace, apoptóza, buněčná motilita a remodelace extracelulární matrix (Donato R., 2003). S100 proteiny uvolněné do extracelulárního prostředí se svým chováním podobají cytokinům. Některé z nich se účastní regulace buněčných dějů prostřednictvím receptoru RAGE (Huttunen A.J. et al., 2000; Hofmann M.A. et al., 1999), avšak v současnosti se stávají předmětem výzkumu i další receptory, u kterých se předpokládá možná asociace s některými S100 proteiny (Robinson M.J. et al., 2002; Kiryushko D. et al., 2006; Semov A. et al., 2005; Klingelhöfer J. et al., 2009; Vogl T. et al., 2007).

Modifikovaná exprese S100 proteinů byla dokumentována u mnoha onemocnění, jako jsou neurodegenerativní a kardiovaskulární onemocnění, zánětlivá onemocnění, diabetes mellitus, alergie či tumory (Donato R., 2003). Ze všech dosud známých S100 proteinů tvoří poměrně velkou skupinu proteiny, jejichž zvýšená exprese je spojována s řadou nádorových onemocnění (S100A1, S100A4, S100A6, S100A7 a S100B). Obecně se předpokládá, že v průběhu nádorového bujení hraje podstatnou úlohu aktivace zánětlivých buněk a imunitního systému (Marx J., 2004). Z prací zabývajících se výzkumem S100 proteinů lze usuzovat, že tyto proteiny by mohly tvořit určitý spojovací článek mezi chronickým zánětem a tumory. Důkazem je např. S100A4 protein, který byl donedávna spojován pouze s rozvojem

nádorových chorob (Lee W.Y. et al., 2004; Gupta S. et al., 2003; Ambartsumian N. et al., 1996). Nejnovější poznatky však prokázaly jeho zvýšenou expresi u revmatoidní artritidy a vztah k patogenezi této chronické autoimunitní nemoci (Klingelhöfer J. et al., 2007; Šenolt L. et al., 2006; Šenolt L. et al., 2006). Uvnitř S100 rodiny byla také identifikována trojice proteinů charakteristická účastí při aktivaci zánětu a imunitního procesu, tzv. alarminy (S100A8, S100A9 a S100A12).

### **1.3.1 S100A12 a S100A8/9**

S100A12 (calgranulin C) a S100A8/9 (calprotectin) proteiny představují podskupinu prozánětlivých proteinů v rámci S100 rodiny, které jsou tvořeny převážně fagocytujícími buňkami myeloidního původu a významně se podílí na aktivaci zánětu a imunitním procesem. Vzhledem k jejich významu jako endogenních molekul signalizujících již v časně fázi poškození buněk a tkání, jsou v současnosti některými autory označovány jako “alarminy” (Bianchi M.E., 2007).

S100A12 (calgranulin C, EN-RAGE) je tvořen převážně granulocyty (Vogl T. et al., 1999) a monocyty (Santamaria-Kisiel L. et al., 2006) a jeho zvýšená přítomnost v tkáních byla dokumentována u mnoha zánětlivých onemocnění jako např. u psoriázy (Mirmohammadsadegh A. et al., 2000), zánětlivých onemocnění střev (Lugering N. et al., 1995), Kawasakiho choroby (Ye F. et al., 2004), dále u nemocí jakými jsou diabetes mellitus 2. typu (Kosaki A. et al., 2004) nebo u Alzheimerovy nemoci (Shepherd C.E. et al., 2006). Současné studie na zvířecích modelech a in vitro studie odhalily význam S100A12 v patogenezi chronické artritidy. S100A12 protein byl prokázán v hojném množství v neutrofilních leukocytech a makrofázích RA synoviální tkáň (Yang Z. et al., 2001) a byla zjištěna jeho schopnost stimulovat migraci neutrofilních leukocytů do míst zánětu (Rouleau P. et al., 2003). V časně fázi zánětu S100A12 vazbou na receptor RAGE stimuluje expresi adhezních molekul na buňkách endotelu a následnou migraci fagocytů (Foell D. et al., 2005). Prostřednictvím aktivace NFκB indukuje S100A12 tvorbu prozánětlivých cytokinů (Hofmann M.A. et al., 1999). V současnosti byly dokumentovány zvýšené hladiny S100A12 v synoviální tekutině a plazmě pacientů s RA, psoriatickou artritidou a dnou (Rouleau P. et al., 2003). Kromě toho, zvýšené sérové hladiny S100A12 u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou (JIA) korelují s aktivitou onemocnění, klesají po aplikaci protizánětlivé léčby a

dochází k jejich opětovnému zvýšení i několik týdnů před klinickým projevem relapsu choroby (Foell D. et al., 2004; Wittkowski H. et al., 2007).

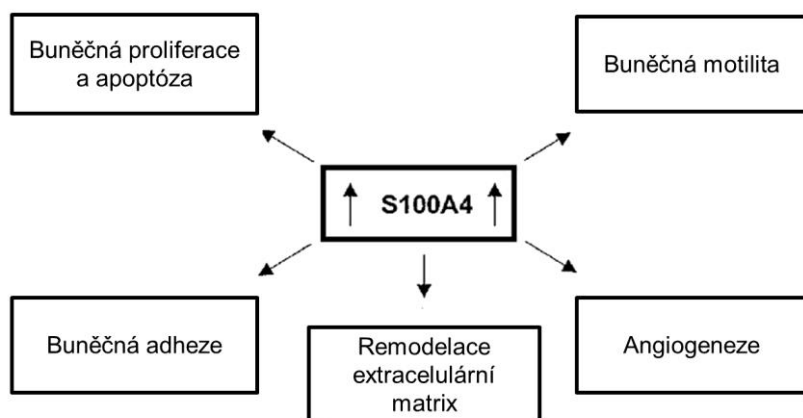
Protein S100A8/9 je heterodimerem složeným z monomerů S100A8 (MRP8 nebo calgranulin A) a S100A9 (MRP14 nebo calgranulin B) proteinů a je aktivně uvolňován monocyty a granulocyty (Rammes A. et al., 1997). Jeho zvýšená exprese byla dokumentována u řady zánětlivých onemocnění, jako jsou například cystická fibróza (Golden B.E. et al., 1996), psoriáza (Broome A.M. et al., 2003), tuberkulóza (Pechkovsky D.V. et al., 2000) či zánětlivá onemocnění střev (Lugering N. et al., 1995). U pacientů s RA byl S100A8/9 heterodimer detekován v makrofázích přítomných v synoviálním infiltrátu (Odink K. et al., 1987) a v místech destrukce chrupavky (Youssef P. et al., 1999). Jak ukazují *in vitro* studie, S100A8/9 indukuje produkci prozánětlivých cytokinů, především TNF $\alpha$  (Sunahori K. et al., 2006). Stejně jako u S100A12 byly zjištěny zvýšené hladiny S100A8/9 u pacientů s RA v plazmě, séru a synoviální tekutině (Rouleau P. et al., 2003; Berntzen H.B. et al., 1991). Hladiny tohoto proteinu u pacientů s JIA jsou vyšší v synoviální tekutině než v séru, vzájemně korelují a jsou asociovány s aktivitou onemocnění (Frosch M. et al., 2000; Schulze zur Wiesch A. et al., 2004). Nejnovější práce poukázaly na asociaci S100A8/9 s mírou poškození kloubu (Hammer H.B. et al., 2007) a na možnost využití S100A8/9 jako prognostického markeru rentgenového poškození kloubu u pacientů s etablovanou RA (Hammer H.B. et al., 2010). Obdobně jako u S100A12, hladiny S100A8/9 klesají po aplikaci protizánětlivé léčby a dochází k jejich opětovnému zvýšení i několik týdnů před klinickým projevem relapsu choroby (De Rycke L. et al., 2005; Foell D. et al., 2010).

### **1.3.2 Protein S100A4**

S100A4 (metastasin, pEL, p9Ka, FspI, CAPL, calvasculin) je termolabilní kyselý protein o molekulové hmotnosti 11-kD původně izolovaný u myši jako gen tvořený metastatickými buňkami adenokarcinomu mléčné žlázy (Ebralidze A. et al., 1989). Přítomnost S100A4 byla potvrzena v zanedbatelném množství také ve zdravé tkáni, avšak jeho fyziologická funkce nebyla dosud plně objasněna (Takenaga K. et al., 1994; Gibbs F.E. et al., 1995).

U myši je známo, že intracelulární S100A4 může být tvořen buňkami hladkých svalů, epitelálními buňkami, endoteliálními buňkami krevních cév, hnědou tukovou tkání, buňkami jater, parietálními buňkami žaludku, neurony a některými imunitními buňkami ve slezině,

brzlíku a kostní dřeni (Gibbs F.E. et al., 1995; Grigorian M. et al., 1994). Bylo zjištěno, že S100A4 je tvořen makrofágy, dendritickými buňkami, žírnými buňkami (mastocyty), neutrofilními leukocyty, některými typy T lymfocytů, pericyty a také synoviálními fibroblasty ve stádiu chronického zánětu (Klingelhöfer J. et al., 2007). Funkční protein může vytvářet homodimery (S100A4/S100A4), heterodimery (S100A4/S100A1) nebo oligomery či multimery (Wang G. et al., 2000; Tarabykina S. et al., 2000). Regulace buněčných procesů se účastní prostřednictvím vazby na cílové molekuly, jako jsou nesvalový myosin II (Kriajevska M. et al., 1994) a liprin  $\beta$ 1 (Kriajevska M. et al., 2002), které hrají důležitou roli v buněčné adhezi a motilitě. Neméně významná je vazba S100A4 na tumor supresorový protein p53 a následná regulace programované buněčné smrti – apoptózy (Grigorian M. et al., 2001; Davies B.R. et al., 1993). Dále byl prokázán vliv extracelulárního S100A4 na angiogenezi (Ambartsumian N. et al., 2001) a na produkci proteolytických enzymů, které se podílejí na remodelaci extracelulární matrix (Šenolt L. et al., 2006; Schmidt-Hansen B. et al., 2004), (Obr. 1.4.). Extracelulární S100A4 může stimulovat růst neuritu primárních hipokampálních neuronů (Novitskaya V. et al., 2000) a migraci astrocytických tumorových buněk (Belot N. et al., 2002). Byla pozorována také negativní regulace mineralizace extracelulární matrix (Duarte W.R. et al., 2003).



**Obr. 1.4.** Význam S100A4 proteinu v regulaci buněčných procesů.

### 1.3.2.1 Význam S100A4 u nádorových onemocnění

Tvorba tumorů a šíření metastáz je rozsáhlý a komplexní proces, kterého se účastní množství regulačních molekul. Jednou z nich je S100A4 protein, jehož vztah k metastázám a tumorům byl podrobně studován jak u transgenních myši (Ambartsumian N. et al., 1996), tak u člověka

(Lee W.Y. et al., 2004; Gupta S. et al., 2003).

Intracelulární S100A4 se váže na cytoskeletální struktury a reguluje tak motilitu nádorových buněk. U metastatických buněk bylo zjištěno, že interakce S100A4 s těžkým řetězcem nesvalového myosinu vede ke změnám dynamiky myosinu (Kriajevska M. et al., 1998, 2000). Podobně, interakce mezi S100A4 a nesvalovým tropomyosinem má za následek rozklad aktinových filament (Takenaga K. et al., 1994).

Dalším předpokladem pro tvorbu metastáz je oddělení buněk z nádoru, vstup do krevního řečiště a adheze k okolním buňkám a matrix. To se děje za účasti adhezivních molekul jako jsou například laminin a E-cadherin. U myších i lidských tumorů byla prokázána inverzní korelace mezi expresí S100A4 a transmembránovým glykoproteinem E-cadherinem. Bylo zjištěno, že invazivní chování nádorových buněk exprimujících S100A4 by mohlo být navozeno utlumením exprese E-cadherinu (Kimura K. et al., 2000; Keirsebilck A. et al., 1998). *In vivo* pokusy odhalily specifickou vazbu S100A4 na transmembránový protein liprin  $\beta 1$ , který je jedním z článků signální kaskády regulující buněčnou adhezi (Kriajevska M. et al., 2002).

Podrobně byl studován také vztah mezi S100A4 a tumor supresorovým proteinem p53, jenž je považován za jeden z nejvýznamnějších faktorů regulujících buněčný cyklus. Narozdíl od normálního (wild) typu p53, jehož množství je v nemutovaných buňkách nízké, dochází v transformovaných a nádorových buňkách k jeho signifikantnímu nárůstu. V buňkách exprimujících S100A4 bylo zjištěno zvýšené množství proteinu p53 (Parker C. et al., 1994). Experimenty na buněčných liniích produkujících normální protein p53 ukázaly, že indukce S100A4 v těchto buněčných liniích má vliv na expresi genů regulovaných p53 proteinem, jako jsou například p21/WAF a bax (Grigorian M. et al., 2001). Zvýšení apoptózy vlivem vazby proteinu S100A4 na p53 může vést ke ztrátě funkce normálního typu p53, což se může projevit nadbytkem mutovaného p53 a vývojem agresivního buněčného fenotypu v počátcích nádorové progresy (Grigorian M. et al., 2001). U myši s inaktivovaným genem pro S100A4, které byly vystaveny gama záření, byla pozorována redukce apoptózy (El Naaman C. et al., 2004). Experimenty na myších tumorech prokázaly pozitivní vliv extracelulárního S100A4 na přežívání nádorových buněk způsobené snížením exprese bax. Nebyl potvrzen rozdílný efekt dimerů a oligomerů S100A4 na expresi bax a překvapivě nebyl pozorován žádný vliv S100A4 na expresi p21/waf (Schmidt-Hansen B. et al., 2004).

Další podmínkou pro růst nádoru a metastazování je angiogeneze. Ta je ovlivňována S100A4 proteinem prostřednictvím regulace exprese trombospondinu 1 (Roberts D.D., 1996) a enzymů degradujících matrix – např. MMPs (Grigorian M. et al., 2001; Schmidt-Hansen B. et al., 2004). Experimenty založené na stimulaci endotelových buněk oligomerní formou S100A4 proteinu odhalily sníženou expresi genu pro trombospondin 1 (Grigorian M. et al., 2001; Schmidt-Hansen B. et al., 2004). Pokusy *in vitro* dále ukázaly, že S100A4 oligomer indukuje chemotaktickou motilitu endotelových buněk a může tak přispívat k angiogenezi. *In vivo* indukuje S100A4 neovaskularizaci rohovky (Schmidt-Hansen B. et al., 2004). Vztah S100A4 k MMPs byl potvrzen u endoteliálních buněk, u nichž byla po stimulaci extracelulárním S100A4 detekována zvýšená exprese MMP-13. Naopak snížení hladiny mRNA MMP-2, MMP-14 a TIMP-1 následovalo po snížení exprese S100A4 u buněčné linie metastazujících buněk (Bjornland K. et al., 1999). Podobné výsledky byly dokumentovány i pro MMP-9 (Saleem M. et al., 2006). Poznatky o roli S100A4 v progresi nádorových onemocnění nashromážděné za poslední desetiletí dokazují, že S100A4 má nezanedbatelný podíl na agresivním a invazivním chování nádorových buněk a tvorbě metastáz (Helfman D.M. et al., 2005).

### **1.3.2.2 Význam S100A4 v patogenezi autoimunitních onemocnění**

U proliferujících synoviálních fibroblastů od pacientů s RA byla prokázána zvýšená exprese některých genů, mimo jiné i S100A4 (Masuda K. et al., 2002). Narozdíl od zdravé kontrolní tkáně byla S100A4 mRNA zjištěna v RA synoviální tkáni. S100A4 mRNA byla exprimována v intersticiu i povrchové synoviální intimně. Nám se podařilo prokázat zvýšené množství S100A4 proteinu v synoviální tkáni, ale také v synoviální tekutině i plazmě pacientů s RA oproti jedincům s osteoartrózou (Klingelhöfer J. et al., 2007; Šenolt L. et al., 2006). Odlišnosti byly zjištěny také ve formě S100A4 vyskytujícího se v plazmě a synoviální tekutině. Zatímco u pacientů s RA byl S100A4 přítomen ve formě bioaktivních oligomerů, u pacientů s OA se většina S100A4 vyskytovala ve formě dimerů. Narozdíl od některých dalších S100 proteinů aktivně se účastnících zánětlivých procesů (S100A7, S100A8, S100A9 a S100A12) je S100A4 exprimován většinou buněk synoviální tkáně - synoviálními fibroblasty, imunitními buňkami i buňkami cévního endotelu.

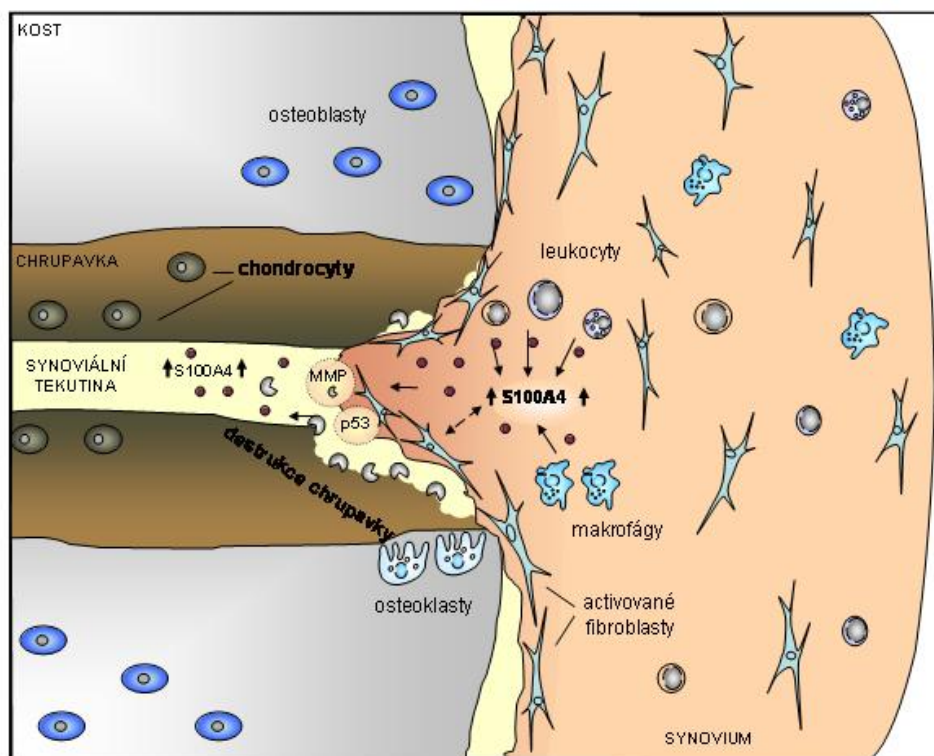
U synoviálních fibroblastů, podobně jako u buněk nádorového typu, stimuluje extracelulární S100A4 tvorbu některých MMPs. Zvýšená exprese byla potvrzena pro MMP-1, MMP-3,

MMP-9 a MMP-13 (Šenolt L. et al., 2006). V místech RA synoviální tkáň byla pozorována zvýšená exprese proteinu p53 oproti OA synoviální tkáni (Klingelhöfer J. et al., 2007). Extracelulární S100A4 oligomer navodil stabilizaci tumor supresorového proteinu p53, jeho fosforylaci v místě aminokyseliny Ser37 a tím transkripci cílových genů proteinu p53 (bcl-2, p21/WAF a HDM2), které se podílejí na regulaci buněčné proliferace a apoptózy (Klingelhöfer J. et al., 2007). Přesná úloha proteinu S100A4 a jeho vliv na apoptózu či proliferaci buněk synoviální tkáň musí být ještě blíže prozkoumány.

Na základě současných znalostí o S100A4 a jeho vztahu k RA lze konstatovat, že se S100A4 vyskytuje ve zvýšeném množství nejen lokálně v místě zánětu, ale také systémově v krevním oběhu. S100A4 je exprimován synoviálními fibroblasty a zánětlivými buňkami v místech destrukce kloubní chrupavky, kde může fungovat jako důležitý prvek regulující buněčnou apoptózu, proliferaci a produkci MMPs (Obr. 1.5.). Jedna z nejnovějších prací zaměřených na S100A4 prokázala pomocí imunohistochemických barvení a imunoblottingu přítomnost S100A4 v artritické chrupavce a lidských chondrocytech, zatímco u normální tkáň a buněk nebyl S100A4 přítomen. U chondrocytů bylo navíc potvrzeno, že extracelulární S100A4 stimuluje produkci MMP-13 a na přenosu signálu se účastnil receptor pro pokročilé glykační produkty (RAGE). S100A4 indukovaná aktivace RAGE měla za následek aktivaci NF- $\kappa$ B a produkci reaktivních kyslíkových radikálů (Yammani R.R. et al., 2006).

Nově byl S100A4 protein detekován u psoriázy, zánětlivého autoimunitního onemocnění kůže. Byla prokázána zvýšená přítomnost S100A4 proteinu v postižené kůži pacientů s psoriázou a byla zjištěna sekrece jeho aktivních multimerních forem (Zibert J.R. et al., 2010). Podobně jako u RA a tumorů, S100A4 se i zde podílí na regulaci apoptózy prostřednictvím p53 tumor supresorového proteinu. Navíc, vyblokování S100A4 u imunodeficientních myší vede k redukcí tloušťky epidermis a utlumení proliferační aktivity buněk (Zibert J. R. et al., 2010).

Současné výsledky ukazují, že S100A4 hraje významnou roli v patogenezi zánětlivých revmatických onemocnění. Je známo, že S100A4 je lokálně akumulován v postižené tkáni a podílí se na regulaci metabolických dějů na molekulární i buněčné úrovni, avšak přesný mechanismus jeho působení u autoimunitních onemocnění nebyl zatím podrobně prostudován.



**Obr. 1.5.** Předpokládaný význam S100A4 proteinu v zánětlivém procesu a poškození kloubní chrupavky u revmatoidní artritidy.

## **2 HYPOTÉZA A CÍLE**

Hypotéza této disertační práce je založena na poznatcích o roli některých S100 proteinů v regulaci zánětu.

První část disertační práce se opírá o význam S100A4/metastasinu v průběhu nádorových onemocnění a o paralelu agresivního chování RA-synoviálních fibroblastů s metastatickým chováním zhoubných nádorů. Vychází z objevu zvýšené akumulace S100A4 u pacientů s RA v místech probíhajícího zánětu s potenciálním vlivem na apoptózu a tvorbu katalytických enzymů, a je proto věnována podrobnějšímu studiu role S100A4 proteinu v patogenezi zánětu u pacientů s revmatoidní artritidou a molekulární podstatě tohoto procesu. Dále vycházíme ze současných poznatků prokazujících význam S100A4 proteinu u zánětlivých a fibrotických onemocnění a jeho podíl na procesu tkáňového poškození. Proto bylo snahou zhodnotit roli S100A4 v patogenezi idiopatických zánětlivých myopatií (polymyositidy a dermatomyositidy). Předpokládáme, že S100A4 by se mohl významně podílet na regulaci zánětu a poškození svalových vláken u pacientů s touto diagnózou.

Druhá část hypotézy je podložena znalostmi o prozánětlivých vlastnostech S100A8/9 a S100A12, tzv. S100 alarminů, jejich vztahu k aktivitě onemocnění a kloubnímu poškození u revmatoidní artritidy. Zde je naším cílem objasnit význam S100 alarminů u pacientů s časnou revmatoidní artritidou, kde by mohly sloužit jako vhodné ukazatele vývoje nemoci.

Cílem této disertační práce je alespoň částečně objasnit význam vybraných S100 proteinů u pacientů s revmatickými chorobami.

1. Určit vztah systémových hladin S100A4/metastasinu k aktivitě revmatoidní artritidy
2. Zhodnotit roli S100A4 ve vztahu k zánětu u pacientů s revmatoidní artritidou a určit molekulární mechanismy vedoucí k S100A4 indukované imunitní odpovědi
3. Stanovit potenciální význam S100A4/metastasinu v patogenezi idiopatických zánětlivých myopatií
4. Zhodnotit význam S100 alarminů u pacientů s časnou revmatoidní artritidou

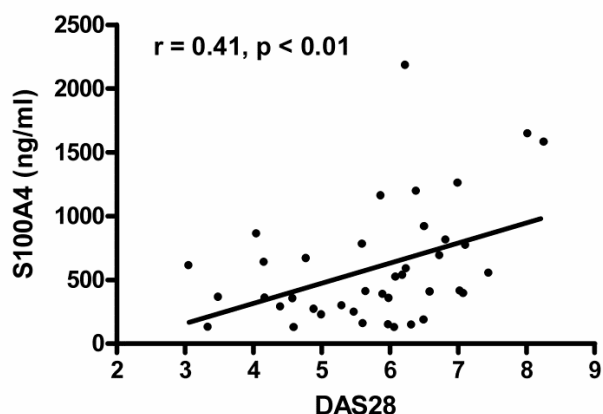
### **3 METODIKA A VÝSLEDKY**

#### **3.1 Význam S100 proteinů u revmatických onemocnění (komentáře k publikacím zařazeným do disertační práce)**

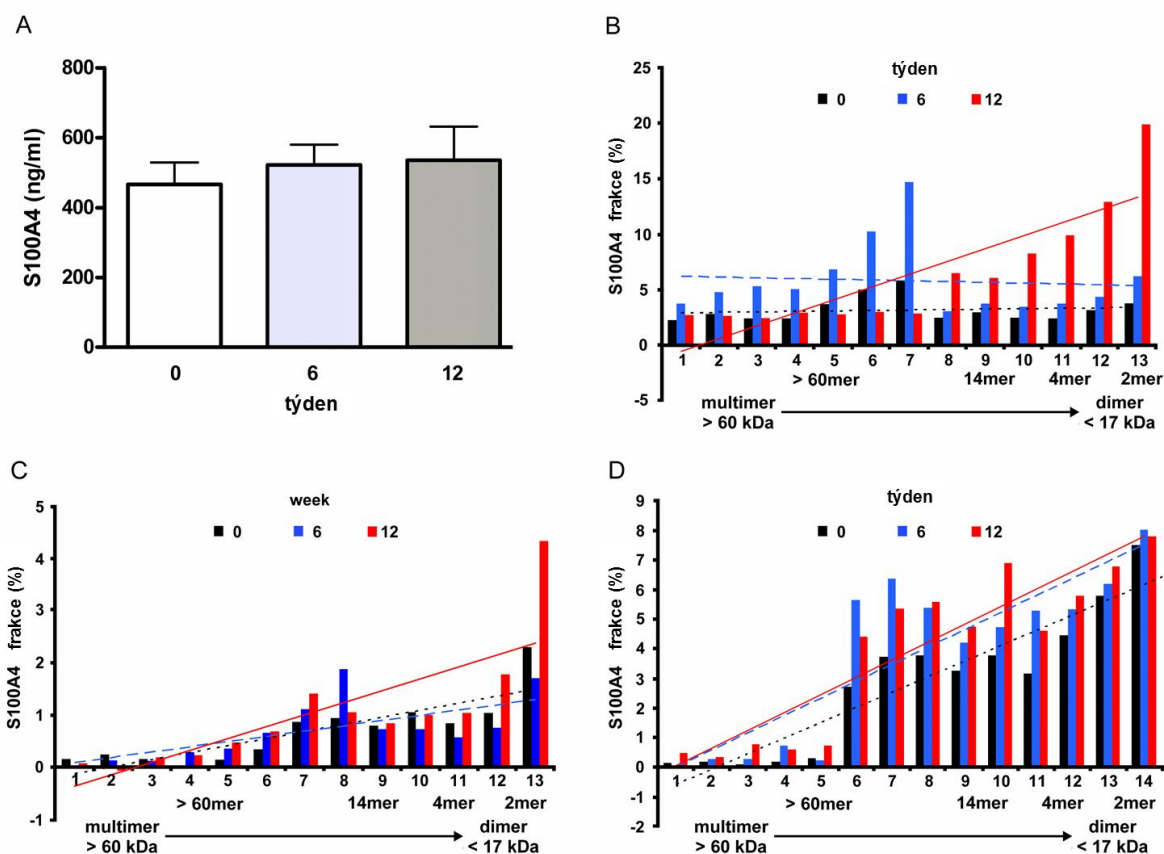
##### **3.1.1 Hladiny S100A4 proteinu korelují s aktivitou onemocnění a aplikace anti-TNF $\alpha$ terapie vede k poklesu hladin biologicky aktivní multimerní formy S100A4 v plazmě u pacientů s revmatoidní artritidou**

Protein S100A4 se ve zvýšené míře vyskytuje u pacientů s RA a předpokládá se, že především jeho biologicky aktivní multimerní forma může potencovat hyperplastické a zánětlivé změny kloubní výstelky (Šenolt L. et al., 2006; Klingelhöfer J. et al., 2007). V naší studii jsme se zaměřili na vztah plazmatických hladin S100A4 k aktivitě onemocnění a na vliv anti-TNF $\alpha$  léčby na hladiny S100A4 proteinu u pacientů s RA.

Naše výsledky ukázaly, že hladiny S100A4 významně korelují s aktivitou onemocnění u pacientů před léčbou (Obr. 3.1.). U pacientů léčených adalimumabem jsme nepozorovali významné změny v hladinách S100A4 v plazmě v průběhu 6 a 12 týdnů léčby (Obr. 3.2. A). Pomocí chromatografické metody, která umožňuje oddělit dimerní a multimerní formu proteinu jsme však zjistili, že aplikace adalimumabu po dobu 12 týdnů vede k poklesu hladin multimerní formy S100A4 ve prospěch dimerní formy (Obr. 3.2.B-D). Pro průkaz rozdílnosti v biologické aktivitě těchto dvou forem S100A4 proteinu jsme provedli in vitro experiment a ukázali jsme, že lidské monocyty vystavené působení S100A4 multimeru produkují signifikantně vyšší hladiny cytokinu TNF $\alpha$  oproti dimerem stimulovaným monocytům (Obr. 3.3.).

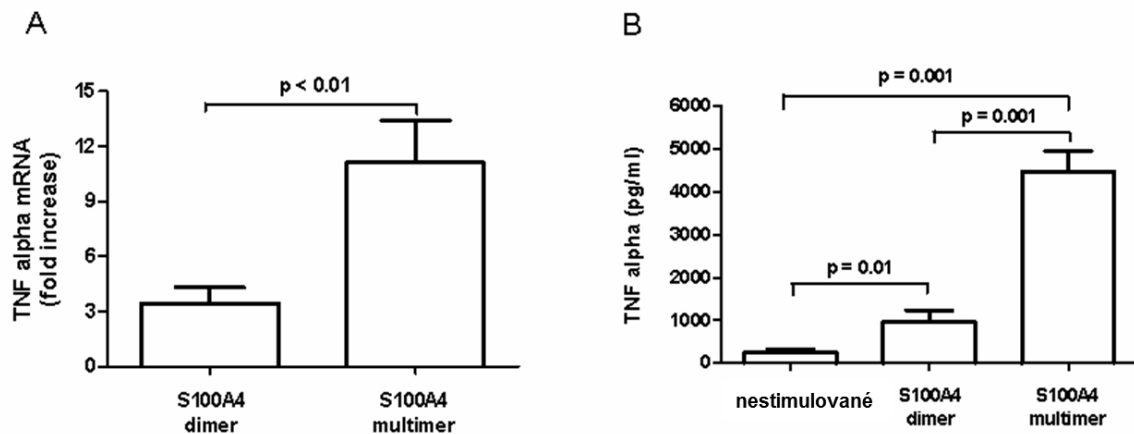


**Obr. 3.1.** Korelace plazmatických hladin S100A4 proteinu s aktivitou onemocnění (DAS28) u pacientů s RA před podáním anti-TNF $\alpha$  terapie.



**Obr. 3.2.** Anti-TNF $\alpha$  léčba nemá vliv na hladiny celkového S100A4 proteinu v plazmě pacientů s RA (A). Po 12 týdnech léčby dochází k poklesu hladin biologicky aktivních multimerních forem S100A4 ve prospěch neaktivních S100A4 dimerů v plazmě pacientů (B, C). U pacienta, který dostatečně neodpovídal na anti-TNF $\alpha$  léčbu (D) nebyl jasně pozorovatelný přechod S100A4 multimerních forem na dimerní formy, naopak došlo ke zvýšení hladin oligomerních forem S100A4.

Hodnoty na ose x zobrazují 13 frakcí S100A4 o různé molekulové hmotnosti (kDa). Každá frakce odpovídá dané konformaci S100A4 (například: fr.#13=2mer, fr.#11=4mer, fr.#9=14mer, fr.#5 = >60 mer).



**Obr. 3.3.** Lidské monocyty stimulované S100A4 multimerem významně exprimují (A) a uvolňují (B) TNF $\alpha$  do kultivačního média oproti monocytům vystaveným S100A4 dimeru a oproti nestimulovaným monocytům.

Publikace k tématu:

Ošlejšková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhöfer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchy D, Senolt L. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48:1590-4.

### 3.1.2 Protein S100A4 je zvýšeně exprimován u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi

S100A4 protein hraje významnou roli v průběhu zánětu u revmatoidní artritidy. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na studium role S100A4 u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi (Tab. 3.1) a to ve vztahu k patogenezi zánětu a poškození svalové tkáně. Zjistili jsme, že S100A4 protein je významně exprimován ve svalové tkáni pacientů se zánětlivými myopatiemi oproti zdravým jedincům (Obr. 3.4, Tab. 3.2) a to především v buňkách zánětlivého infiltrátu (Obr. 3.6), v okolí nekrotických vláken a výjimečně také v regenerujících svalových vláknech pacientů s PM/DM (Obr. 3.5). Pomocí in vitro stimulačních experimentů jsme prokázali prozánětlivý účinek S100A4 multimeru na mononukleární buňky (PBMCs) izolované z periferní krve zdravých jedinců, které po expozici S100A4 zvýšeně exprimují a uvolňují prozánětlivé cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 oproti kontrolním buňkám (Obr. 3.7). Buňky myocytů ovlivněné S100A4 multimerem naopak

nevykazovaly prakticky žádné prozánětlivé změny na genové ani proteinové úrovni. To může být zapříčiněno nepřítomností TLR-4 receptoru na myocytech (Obr. 3.8), o kterém se uvažuje jako o možném zprostředkovateli prozánětlivého efektu S100A4. Dále se ukázalo, že S100A4 nemá vliv na expresi pro/anti- apoptotických molekul Bax a Bcl2 mononukleárními buňkami a myocyty, a nepodílí se na regulaci apoptózy indukované perforin/granzyme B systémem.

| Pacient | Věk | Pohlaví | Diagnóza | Léčba v době biopsie |
|---------|-----|---------|----------|----------------------|
| 1       | 71  | F       | PM       | Pred 40              |
| 2       | 63  | M       | PM       | Pred 60              |
| 3       | 56  | F       | PM       | žádná                |
| 4       | 49  | M       | PM       | žádná                |
| 5       | 54  | M       | PM       | žádná                |
| 6       | 50  | F       | PM       | žádná                |
| 7       | 57  | F       | PM       | žádná                |
| 8       | 78  | F       | PM       | žádná                |
| 9       | 56  | F       | DM/Scl   | Pred 60              |
| 10      | 64  | F       | DM       | žádná                |
| 11      | 30  | M       | DM       | žádná                |
| 12      | 74  | F       | DM       | žádná                |
| 13      | 74  | F       | DM       | Pred 60              |
| 14      | 61  | F       | DM       | Pred 20, MTX         |

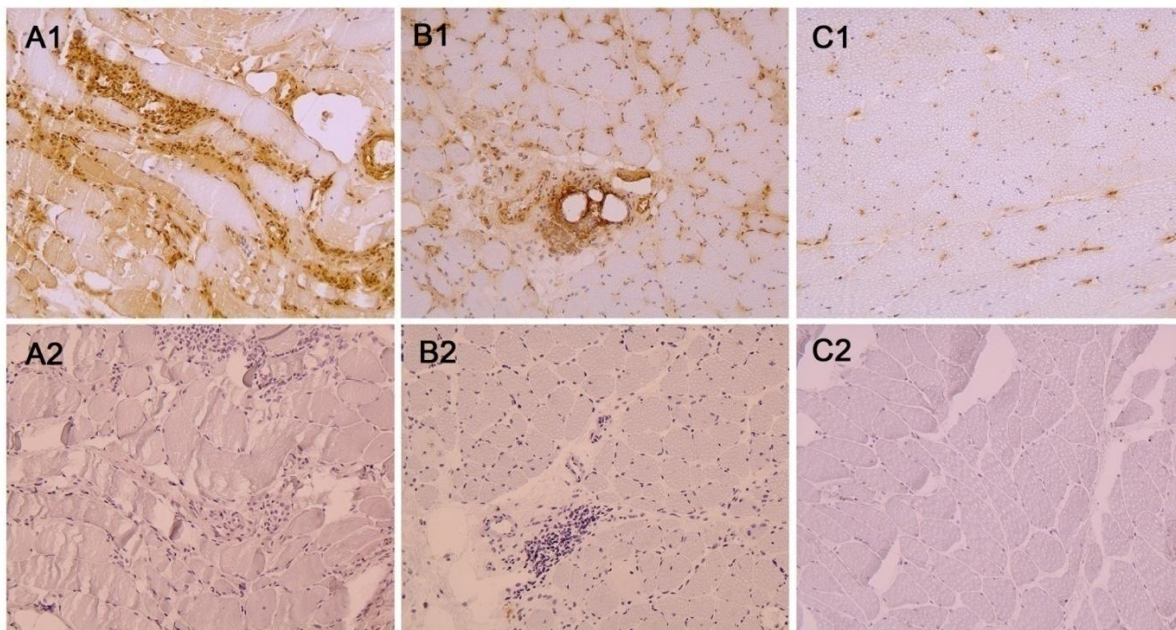
**Tab. 3.1.** Stručná charakteristika pacientů v době biopsie

F, žena; M, muž; PM, polymyositida; DM, dermatomyositida; Scl, sklerodermie; Pred, prednison; MTX, methotrexát

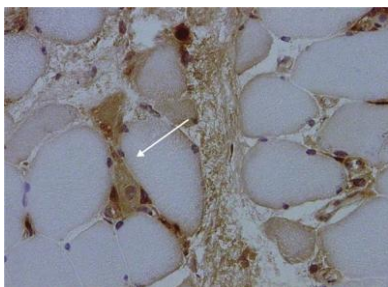
|                                     | PM/DM     | Kontroly | Mediánový test | Pearsonův chi-square test |
|-------------------------------------|-----------|----------|----------------|---------------------------|
| <b>Mononukleární infiltrát</b>      | 2 (1-3)   | 0 (0-0)  | p=0.001        | p<0.0001                  |
| <b>Cévy a kapiláry</b>              | 1.5 (1-3) | 1.5(1-2) | p=1.0          | p=0.840                   |
| <b>Intersticiální pojivová tkáň</b> | 1 (0-2)   | 1(1-2)   | p=0.661        | p=0.301                   |
| <b>Svalová vlákna</b>               | 0.5 (0-1) | 0 (0-0)  | p=0.003        | p=0.010                   |

**Tab. 3.2.** Expze S100A4 proteinu ve sledovaných oblastech svalové tkáně pacientů s polymyositidou/dermatomyositidou a kontrolních jedinců.

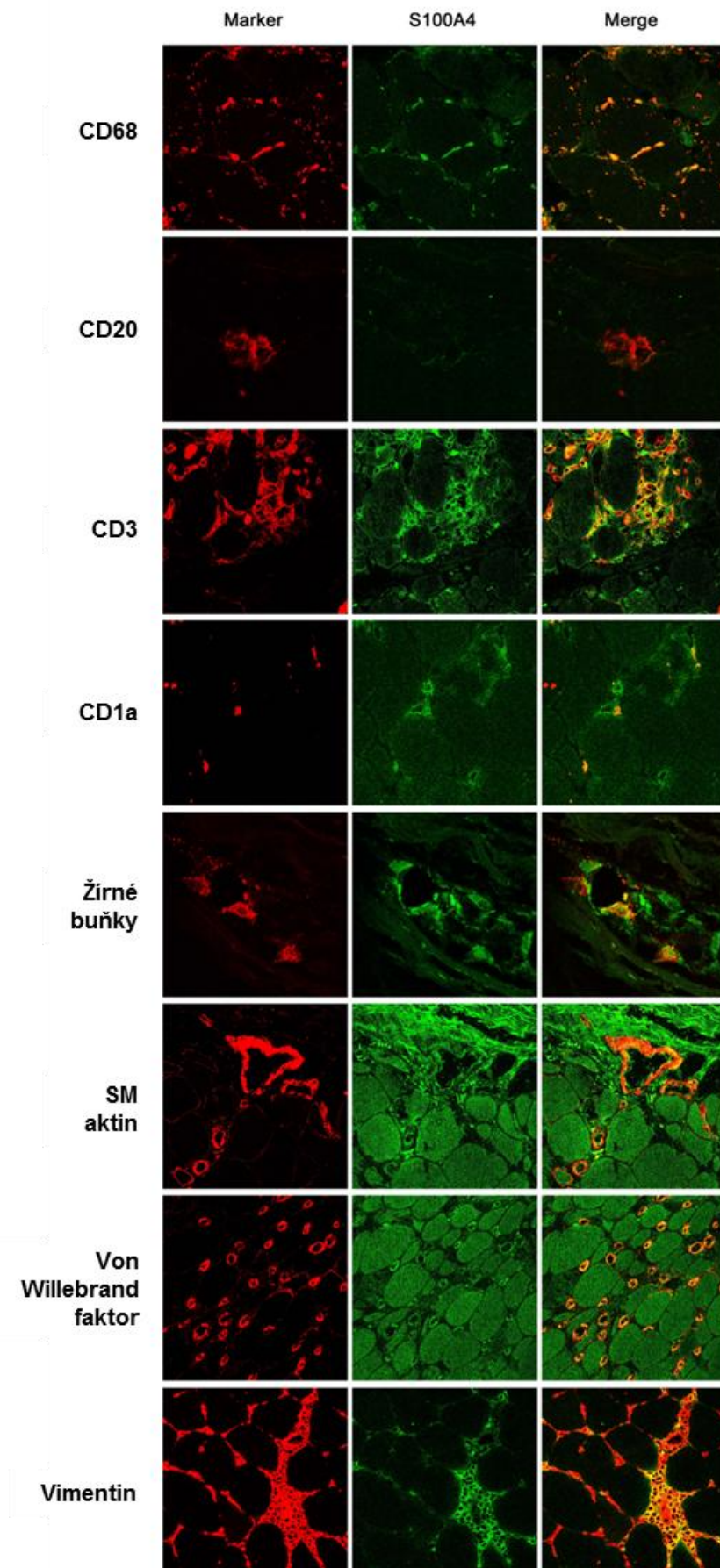
Intenzita expze S100A4 proteinu byla hodnocena s využitím semi-kvantitativního čtyřbodového skórování. Hodnota 0, vyjadřuje žádné; 1, slabé; 2, střední; a 3, silné barvení. Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (min-max). PM/DM, polymyositida/dermatomyositida.



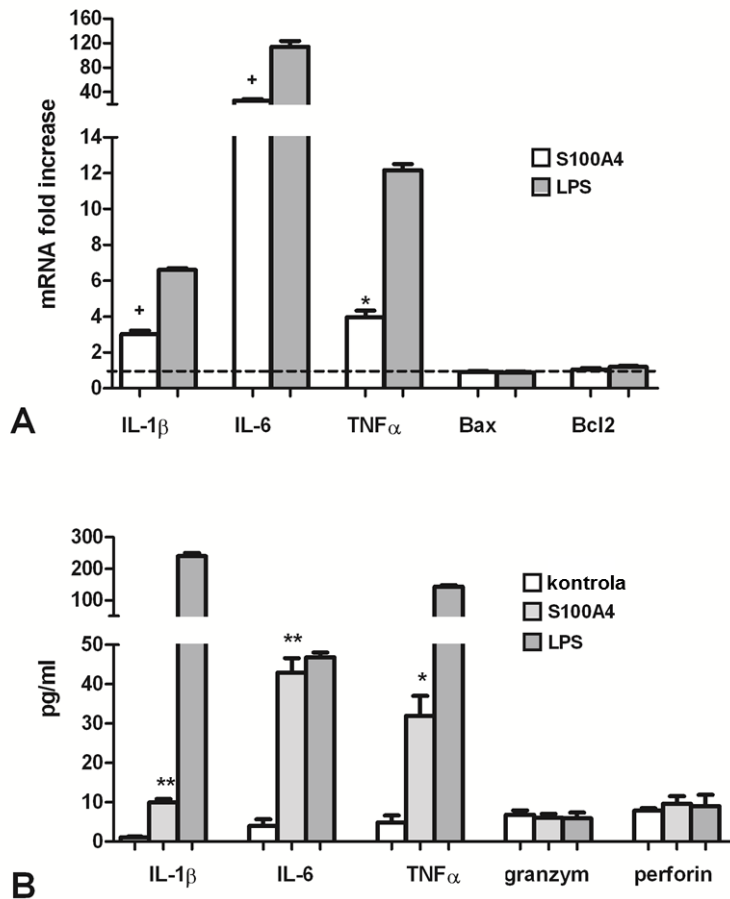
**Obr. 3.4.** Imunohistochemické barvení S100A4 proteinu ve svalové tkáni: (A1) polymyositida, (B1) dermatomyositida a (C1) kontrolní svalová tkáň. Exprese S100A4 byla významně zvýšená v mononukleárních buňkách zánětlivého infiltrátu v okolí nekrotických svalových vláken. Několik regenerujících svalových vláken bylo pozitivních na S100A4 u pacientů s myositidou oproti kontrolní tkáni. Endotelové buňky velkých cév perimysia a kapilár endomysia exprimovaly S100A4 u pacientů i u kontrolní skupiny v podobné míře. Intenzita barvení S100A4 byla srovnatelná u polymyositické a dermatomyositické tkáně. Myší IgG byl použit jako izotypová kontrola (A2, B2, C2). Zvětšeno x 200.



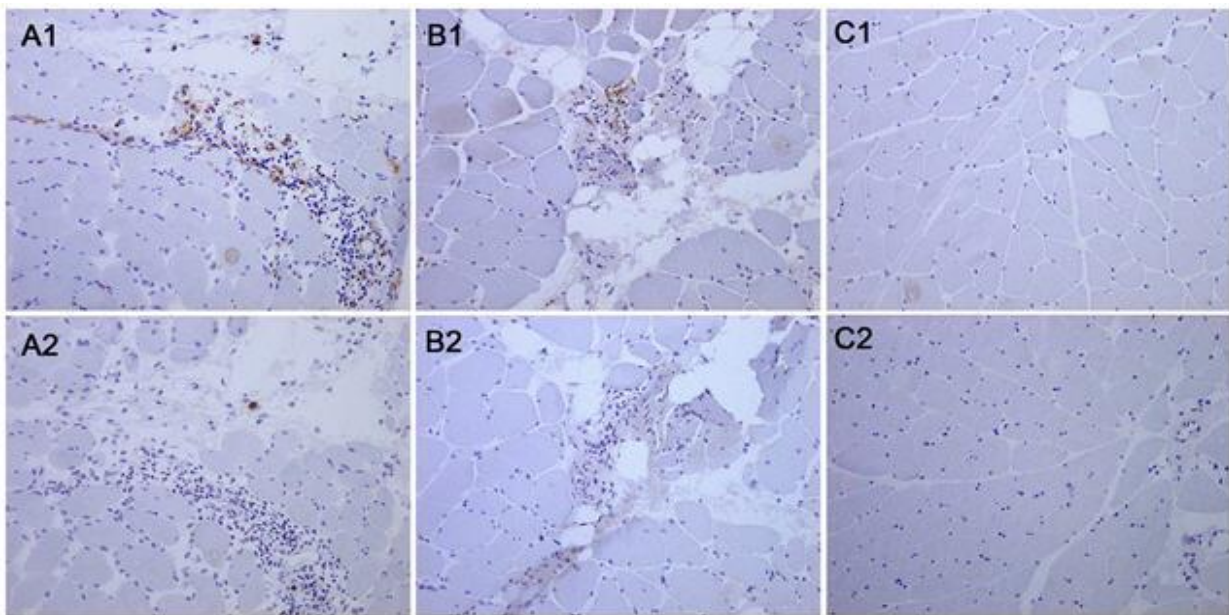
**Obr. 3.5.** Exprese S100A4 v regenerujícím svalovém vlákně u pacienta s PM. Zvětšeno x 400.



**Obr. 3.6.** Kolokalizace S100A4 proteinu s vybranými buňkami za použití dvojitého imunofluorescenčního barvení. Buňky byly označeny specifickými markery: antiCD68 (makrofágy); antiCD20 (B-lymfocyty); antiCD3 (T-lymfocyty); antiCD1a (dendritické buňky); anti smooth-muscle actin (myofibroblasty a pericyty); vimentin (buňky mesenchymálního původu); von Willebrand factor (endotelové buňky), mast cell tryptase (žírné buňky). Rozměry všech obrázků - 0.22 $\mu$ m x.0.22 $\mu$ m, kromě CD20 - 0.06 $\mu$ m x 0.06 $\mu$ m , CD1a - 0.11 $\mu$ m x.0.11 $\mu$ m.



**Obr. 3.7.** S100A4 protein indukuje zvýšenou expresi (A) a uvolňování (B) TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 u periferních krevních mononukleárních buněk (PBMCs). Expres Bax, Bcl2 mRNA (A), a produkce granzymu B a perforinu (B) zůstaly nezměněny u PBMCs stimulovaných S100A4 proteinem. Expres mRNA byla detekována po 6ti hodinách a hladiny proteinů uvolněných do buněčných supernatantů po 24 hodinách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a SEM, \* p<0.01; \*\* p<0.005; <sup>+</sup>p<0.001.



**Obr. 3.8.** Imunohistochemické barvení TLR-4 ve svalové tkáni: (A1) polymyositida, (B1) dermatomyositida a (C1) kontrolní svalová tkáň. TLR-4 byl exprimován mononukleárními buňkami infiltrujícími svalovou tkáň pacientů s idiopatickými myopatiemi, avšak nebyl detekován u tkáně zdravých kontrol. Přítomnost TLR-4 nebyla prokázána ve svalových buňkách. Myší IgG byl použit jako izotypová kontrola (A2, B2, C2). Zvětšeno x 200.

Publikace k tématu:

Cerezo LA, Kuncová K, Mann H, Tomcík M, Zámecník J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:1766-72.

### **3.1.3 Snížení hladin sérového calprotectinu (S100A8/9) koreluje s poklesem počtu oteklých kloubů u pacientů s časnou revmatoidní artritidou**

Proteiny S100A8/9 a S100A12 představují skupinu prozánětlivých S100 proteinů hojně detekovaných lokálně i systémově u pacientů s RA (Youssef P. et al., 1999; Foell D. et al., 2003; Sunahori K. et al., 2006). Zejména S100A8/9 protein byl recentně popsán jako vhodný marker pro hodnocení aktivity onemocnění a progresu poškození kloubů u RA (Hammer H.B. et al., 2010). Časná revmatoidní artritida představuje ranou fázi onemocnění s charakteristickými imunopatogenetickými znaky, během níž včasná aplikace vhodné léčby může zamezit nevratnému poškození kloubů v budoucnosti. Naše současné znalosti patologických mechanismů a biomarkerů působících v rané fázi onemocnění jsou nedostačující, a proto bylo naším cílem zhodnotit význam S100 proteinů u pacientů s časnou RA (Tab. 3.3). Zjistili jsme, že hladiny S100A8/9 a S100A12 jsou signifikantně vyšší u

pacientů s časnou RA oproti zdravým kontrolám a po 3 měsících konvenční léčby došlo k jejich poklesu na hladiny běžné u zdravých jedinců (Obr. 3.9). Kromě toho, hladiny S100A8/9 u pacientů před léčbou signifikantně korelují s laboratorními a klinickými markery onemocnění jako jsou CRP, DAS28 nebo počet oteklých kloubů (Obr. 3.10 A-C), korelace hladin S100A12 s těmito parametry je méně významná (Obr. 3.10 D-F). Podobně je tomu v případě asociace poklesu hladin S100 alarminů se změnami hodnot daných parametrů v průběhu léčby (Obr. 3.11 A-F). S využitím mnohonásobné lineární regresní analýzy jsme odhalili, že poklesy hladin S100A8/9 v séru by mohly sloužit jako významný prediktor poklesu počtu oteklých kloubů u pacientů s časnou RA léčených konvenční léčbou (Tab. 3.4 a 3.5).

#### Základní charakteristika pacientů s ERA a zdravých kontrol

| Charakteristika            | ERA<br>(n=43) | Zdravé kontroly<br>(n=32) |
|----------------------------|---------------|---------------------------|
| Pohlaví (F/M)              | 30/13         | 11/21                     |
| věk (roky)                 | 50.90 ± 16.40 | 43.97± 15.4               |
| CRP (mg/l)                 | 16.20 ± 20    |                           |
| ESR (mm/1 <sup>st</sup> )  | 34.20 ± 23.72 |                           |
| SJC z celkového počtu 66   | 10.00 ± 9.28  |                           |
| DAS28 skóre                | 5.31 ± 1.51   |                           |
| RF pozitivita, n (%)       | 32 (74.4%)    |                           |
| Anti-CCP pozitivita, n (%) | 22 (51.2%)    |                           |
| Léky (DMARD/GC)            | 42/35         |                           |

Anti-CCP, autoprotilátky proti citrulinovaným proteinům; CRP, C-reaktivní protein; DAS28 skóre, skóre activity onemocnění; DMARDs, chorobu modifikující léky; ERA, časná revmatoidní artritida; ESR, sedimentace erytrocytů; F, žena; GC, glukokortikoidy; M, muž; MTX, metotrexát; RF, revmatoidní faktor; SJC, počet oteklých kloubů. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD).

**Tab. 3.3** Základní charakteristika pacientů s časnou RA a zdravých kontrol

| Počáteční DAS28 ( $n=43$ ; $r^2=0.422$ ; $F=16.355$ ; $p<0.000$ ) <sup>a</sup> |                 |       |           |       | $\Delta$ DAS28 ( $n=41$ ; $r^2=0.349$ ; $F=11.727$ ; $p<0.000$ ) <sup>b</sup> |                 |       |           |       |
|--|-----------------|-------|-----------|-------|---|-----------------|-------|-----------|-------|
| Proměnná   | Odhad parametru | S.E.  | t-hodnota | p     | Proměnná  | Odhad parametru | S.E.  | t-hodnota | p     |
| Intercept  | 4.351           | .246  | 17.662    | 0.000 | Intercept   | -2.117          | 0.277 | -7.649    | 0.000 |
| Počáteční CRP  | 0.037           | 0.010 | 3.619     | 0.001 | Počáteční CRP   | 0.080           | 0.038 | 2.124     | 0.040 |
| Počáteční S100A8/9   | 0.000           | 0.000 | 2.007     | 0.052 | $\Delta$ CRP  | 0.136           | 0.042 | 3.248     | 0.002 |

Pozn. Adjustované hodnoty  $r^2$  jsou zobrazeny výše.

<sup>a</sup> Vyloučenými prediktory jsou věk a počáteční hladiny S100A12

<sup>b</sup> Vyloučenými prediktory jsou věk a počáteční hladiny S100A12, počáteční hladiny S100A8/9,  $\Delta$ S100A12 a  $\Delta$ S100A8/9

**Tab. 3.4** Model mnohonásobné lineární regresní analýzy pro DAS28 před léčbou a jeho změny ( $\Delta$  DAS28) během léčby.

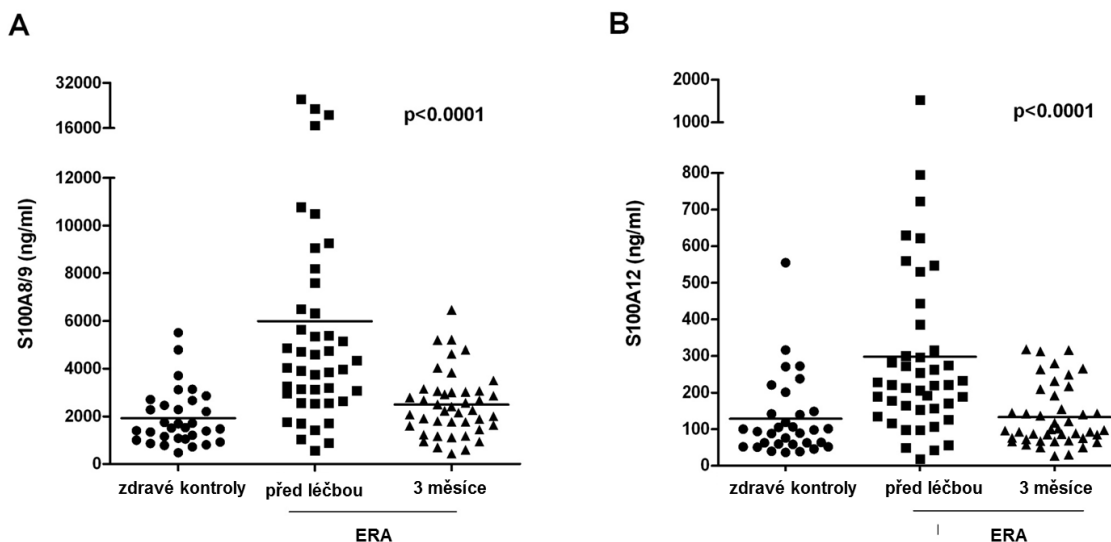
| Počáteční SJC ( $n=43$ ; $r^2=0.260$ ; $F=8.360$ ; $p=0.001$ ) <sup>a</sup> |                 |       |           |       | $\Delta$ SJC ( $n=41$ ; $r^2=0.245$ ; $F=13.974$ ; $p=0.001$ ) <sup>b</sup> |                 |       |           |       |
|---|-----------------|-------|-----------|-------|---|-----------------|-------|-----------|-------|
| Proměnná  | Odhad parametru | S.E.  | t-hodnota | p     | Proměnná  | Odhad parametru | S.E.  | t-hodnota | p     |
| Intercept   | 5.093           | 1.712 | 2.975     | 0.005 | Intercept   | -5.192          | 1.148 | -3.500    | 0.001 |
| Počáteční CRP   | 0.147           | 0.071 | 2.067     | 0.045 | $\Delta$ S100A8/9   | 0.001           | 0.000 | 3.738     | 0.001 |
| Počáteční S100A8/9  | 0.001           | 0.000 | 2.010     | 0.051 | ---   | ---             | ---   | ---       | ---   |

Pozn. Adjustované hodnoty  $r^2$  jsou zobrazeny výše.

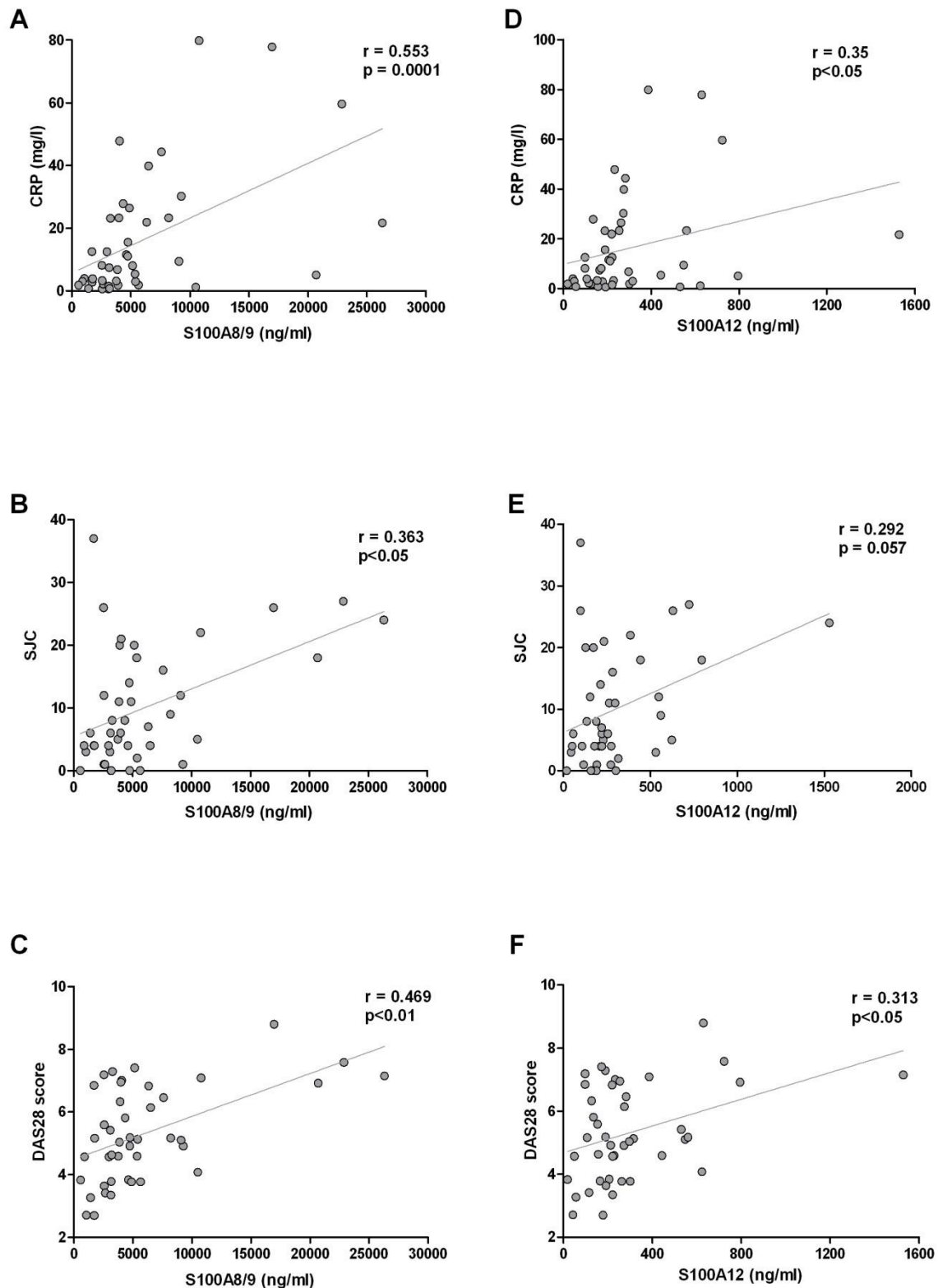
<sup>a</sup> Vyloučenými prediktory jsou věk a počáteční hladiny S100A12

<sup>b</sup> Vyloučenými prediktory jsou věk a počáteční hladiny S100A12, S100A8/9 a CRP,  $\Delta$ S100A12 a  $\Delta$ CRP

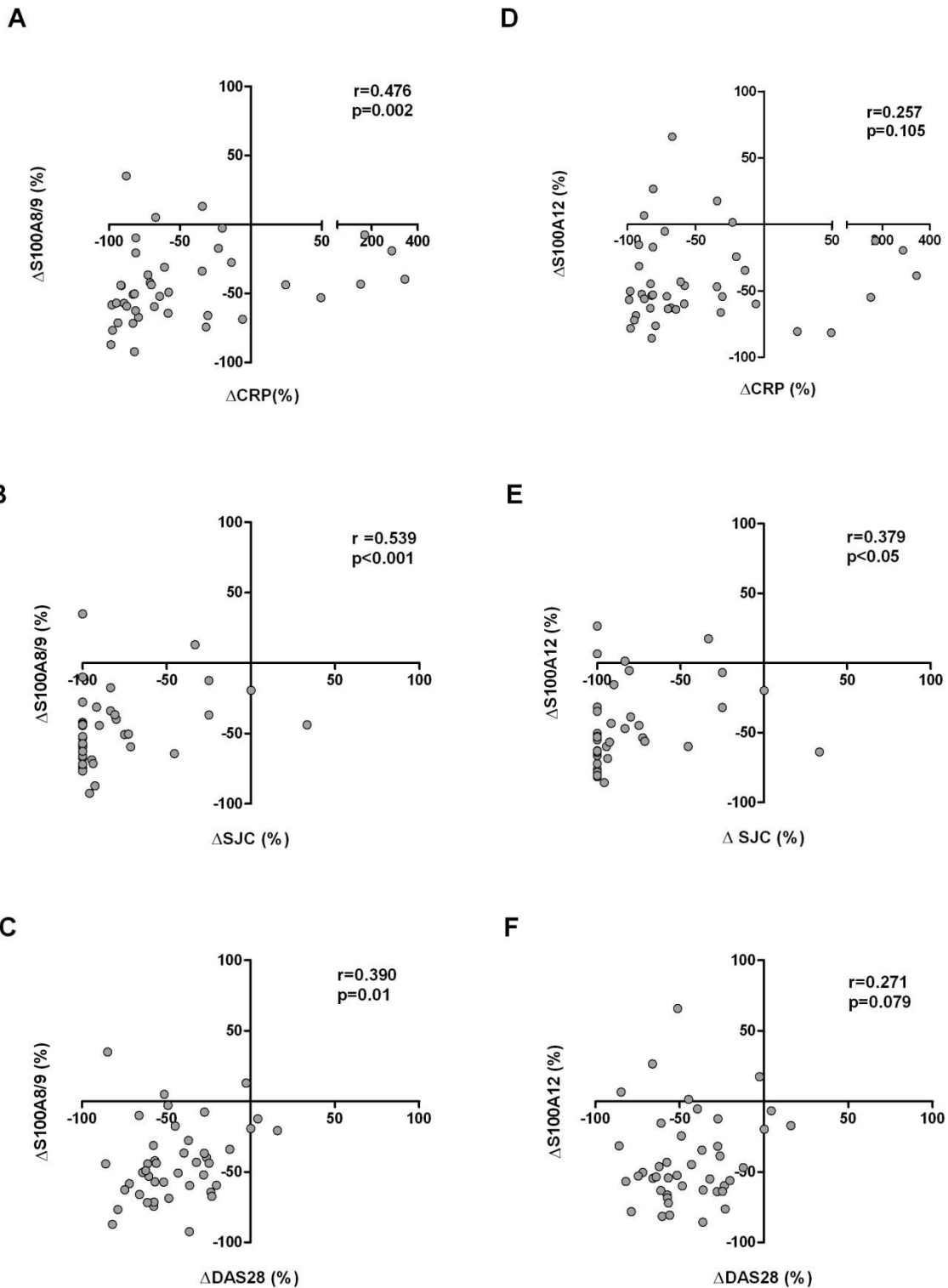
**Tab. 3.5** Model mnohonásobné lineární regresní analýzy pro počet oteklých kloubů (SJC) před léčbou a jeho změny ( $\Delta$  SJC) během léčby.



**Obr. 3.9** Sérové hladiny S100A8/9 (A) a S100A12 (B) jsou signifikantně vyšší u pacientů s časnou RA oproti zdravým kontrolám a po 3 měsících konvenční léčby dochází k jejich poklesu na úroveň zdravých jedinců.



**Obr. 3.10.** Korelace sérových hladin S100A8/9 (A-C) a S100A12 (D-F) s klinickými a laboratorními markery onemocnění před léčbou. CRP, C-reaktivní protein; DAS28, skóre aktivity onemocnění; SJC, počet oteklých kloubů z celkového počtu 66.



**Obr. 3.11.** Asociace poklesu sérových hladin S100A8/9 (A-C) a S100A12 (D-F) se změnami klinických a laboratorních ukazatelů aktivity onemocnění po 3 měsících léčby. CRP, C-reaktivní protein; DAS28, skóre aktivity onemocnění; SJC, počet oteklých kloubů z celkového počtu 66.

Publikace k tématu:

Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, Pleštilová L, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011 Jul 26;13(4):R122.

### **3.2 Molekulární mechanismy S100A4 indukované zánětlivé odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou**

S100A4 protein je stále častěji spojován s řadou chronických zánětlivých onemocnění a je diskutována jeho aktivní role v regulaci zánětu (Šenolt L. et al., 2006; Klingelhöfer J. et al., 2007; Zibert J.R. et al., 2010). Doposud však nebyly popsány přesné mechanismy vedoucí k S100A4 indukované zánětlivé reakci. Je známo, že S100A4 může vazbou na receptor pro pokročilé glykační produkty (RAGE) přes aktivaci NFκB stimulovat tvorbu MMP-13 v chondrocytech (Yammani R.R. et al., 2007). Nezávisle na RAGE indukuje S100A4 růst neuritu prostřednictvím interakce s heparan sulfátem na povrchu buněk (Kiryushko D. et al., 2006), stimuluje angiogenezi vazbou na annexin II. (Semov A. et al., 2005) nebo reguluje proliferaci a progresi nádorového bujení prostřednictvím receptoru pro epidermální růstový faktor (Klingelhöfer J. et al., 2009). V souvislosti s indukcí zánětu byla popsána interakce S100A12 proteinu s receptorem RAGE (Hofmann M.A. et al., 1999) a nověji také vazba S100A8/9 na TLR-4 u monocytů (Vogl T. et al., 2007). Vzhledem k nedostatku poznatků o přesném mechanismu prozánětlivého působení S100A4 se cílem naší práce stalo studium role S100A4 v indukcii zánětlivé odpovědi a molekulární podstaty tohoto procesu.

#### **3.2.1 Metodika**

##### **Materiál**

Pro studii byly použity vzorky periferní krve pacientů s revmatoidní artritidou. Pacienti splnili ACR kritéria pro diagnózu RA (Arnett et al., 1988) a podepsali informovaný souhlas schválený etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze.

##### **Stimulace PBMCs**

Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány metodou Ficoll-Plaque gradientové centrifugace. Čerstvě vyizolované PBMCs byly nasazeny o hustotě  $5.0 \times 10^5$  na 1 ml Advanced RPMI 1640 kultivačního media (Invitrogen, Carlsbad, CA) v 6-jamkových destičkách a inkubovány 30min ve 37°C s 5% CO<sub>2</sub> v atmosféře inkubátoru. Buňky byly

stimulovány S100A4 multimerem (1µg/ml), S100A8 (1µg/ml), S100A12 (1µg/ml) a myším IgG (10µg/ml) po dobu 24 hodin (proteiny pro stimulaci poskytla laboratoř Dr. Grigorian). Pro inhibiční experimenty byly buňky vystaveny působení inhibitorů či protilátek 30 min před přidáním S100A4 proteinu. Byly použity následující inhibitory a protilátky: 10 µg/ml abRAGE (R&D Systems, Minneapolis, MN); 100 µg/ml AGE-BSA (Biovision, Mountain View, CA), což je RAGE ligand; 10µg/ml abTLR-4 (Biolegend, San Diego, CA); 50µM MyD88 inhibitor (Imgenex, San Diego, CA), inhibitory MAP kináz: ERK (PD98059; 2µM), p38 (SB203580; 50µM), jnk (SP600125; 40nM) (Calbiochem, San Diego, CA) a inhibitor NFκB -500 µM caffeic acid phenethyl ester (Tocris Bioscience, Ellisville, MI). Po 24h inkubaci bylo odebráno kultivační medium a skladováno v -80°C.

### **Stimulace CD3+ T lymfocytů**

Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány metodou Ficoll-Plaque gradientové centrifugace. Z nich byly pozitivně vyselektovány CD3+ T lymfocyty pomocí magnetických kuliček anti-CD3 microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) a nasazeny na 6-jamkové destičky v počtu  $5.0 \times 10^5$  buněk na 1ml Advanced RPMI 1640 kultivačního média (Invitrogen, Carlsbad, CA) s L-glutaminem a inkubovány 30min ve 37°C s 5% CO<sub>2</sub> v atmosféře inkubátoru. CD3+ lymfocyty byly stimulovány S100A4 multimerem (1µg/ml) a lipopolysacharidem z E.coli (10ng/ml) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Po 24h inkubaci bylo odebráno kultivační medium a skladováno v -80°C.

### **Utlumení genu S100A4 v CD3+ T lymfocytech**

Transfekce CD3+ lymfocytů byla provedena s využitím Amaxa Human T Cell Nucleofector Kit pomocí přístroje Amaxa Nucleofector II (Amaxa Co., Köln, Germany). Podle pokynů výrobce byly buňky resuspendovány ve 100 µl nukleofekčního roztoku. Následně byla přidána S100A4 siRNA (15ug/ml) (Eurogentec, Seraing, Belgium), směs byla přenesena do kyvet a transfekována v přístroji nastaveném na program T023 pro CD3+ lymfocyty. Po transfekci bylo do každé kyvety přidáno 500 µl RPMI 1640 média s 10% FCS, L-glutaminem, penicillinem a streptomycinem vytemperovaného na 37°C. Transfekované buňky v 500ul média byly přeneseny na 6-jamkové destičky s Advanced RPMI 1640 médiem. Po 24 hodinové inkubaci byly buňky lyzovány RLT bufferem (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) a skladovány v -80°C.

### **Real Time PCR**

Celková RNA byla z buněk izolována pomocí MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit přístrojem MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics). Z RNA byla získána cDNA reverzní transkripční kitem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Pro Real Time PCR (RT-PCR) byly použity komerčně dostupné TaqMan genové expresní eseje (Applied Biosystems) pro stanovení TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 mRNA a 18S Ribosomal RNA pro normalizaci dat, a byl použit přístroj 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Výsledky byly analyzovány metodou ddCt pro relativní kvantifikaci a exprese genu 18S byla použita jako endogenní kontrola.

### **ELISA**

Hladiny cytokinů TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 byly měřeny v kultivačním médiu ELISA kity podle pokynů výrobce (Ray Biotech, Inc., Norcross GA). Absorbance byla měřena pomocí ELISA čtecího zařízení (Tecan Sunrise) na vlnové délce 450nm.

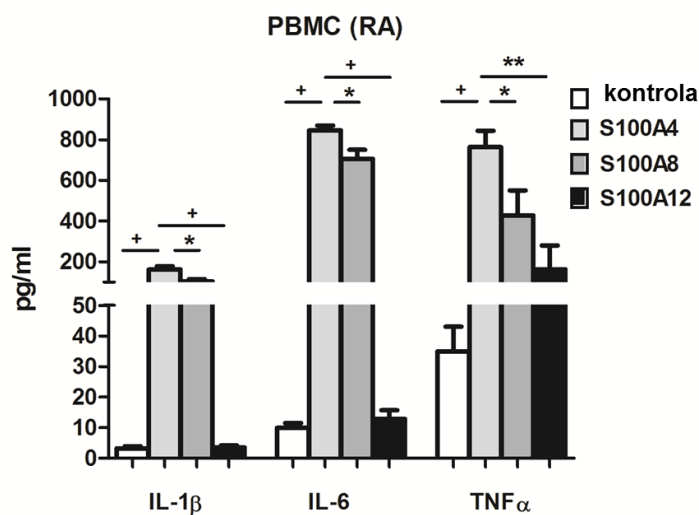
### **Statistická analýza**

Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM. Mann-Whitney U test byl použit pro porovnání rozdílů mezi 2 proměnnými, párový T-test byl uplatněn při výpočtu statistické významnosti u genových expresí. Pro statistické zhodnocení byly hodnoty P menší než 0.05 považovány za statisticky významné. Statistické analýzy byly provedeny pomocí software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

### 3.2.2 Výsledky

#### S100A4 indukce produkci prozánětlivých cytokinů mononukleárními buňkami

Pro zhodnocení prozánětlivého efektu S100A4 byly PBMCs (n=8) stimulovány S100A4 multimerem po dobu 24h a byly analyzovány hladiny uvolněných cytokinů TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 v kulturačním médiu. Ukázalo se, že S100A4 stimulované buňky signifikantně zvýšily produkci cytokinů oproti kontrolám: TNF $\alpha$  (34.95 $\pm$ 8.029 vs. 763.5 $\pm$ 80.61 pg/ml; p=0.0009), IL-1 $\beta$  (3.256 $\pm$ 0.699 vs. 161.4 $\pm$ 16.72 pg/ml; p=0.0002) a IL-6 (9.957 $\pm$ 1.546 vs. 845.2 $\pm$ 24.42 pg/ml; p=0.0002), (Obr. 3.12.). S100A4 má navíc významně silnější prozánětlivý efekt ve srovnání s dalšími studovanými prozánětlivými S100 proteiny, jako jsou S100A8 (p<0.05 pro všechny sledované cytokiny) nebo S100A12 (p<0.001 pro IL-1 $\beta$  a IL-6; p<0.01 pro TNF $\alpha$ ), (Obr. 3.12.).

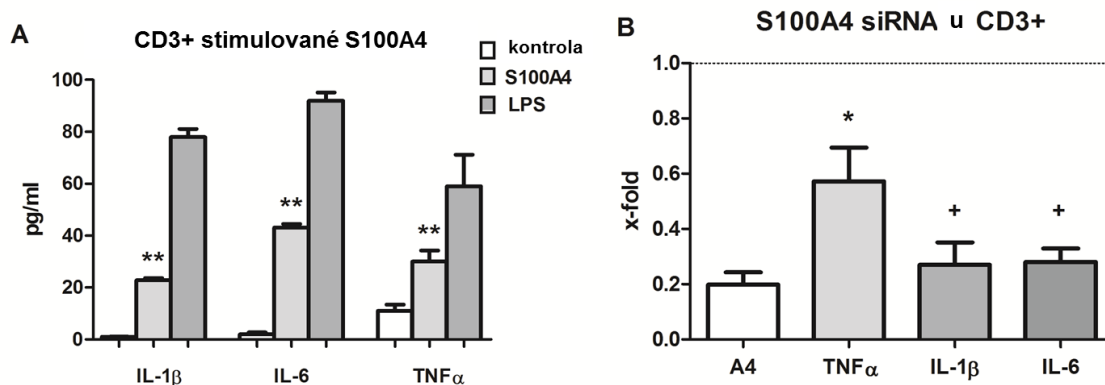


**Obr. 3.12.** Zvýšená produkce TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 u S100A4 stimulovaných PBMCs od pacientů s RA oproti zdravým kontrolám. Produkce cytokinů mononukleárními buňkami je signifikantně vyšší po indukci S100A4 proteinem ve srovnání se stimulací prozánětlivými S100A8 a S100A12 proteiny. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a SEM, \* p<0.05; \*\* p<0.01; + p<0.001.

#### Vliv extracelulárního a intracelulárního S100A4 na prozánětlivou reakci CD3+ lymfocytů

CD3+ lymfocyty izolované od pacientů s RA (n=5) a vystavené vlivu S100A4 multimeru signifikantně zvyšují produkci prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  (11.06 $\pm$ 2.37 vs. 30.05 $\pm$ 4.24 pg/ml; p=0.0043), IL-1 $\beta$  (1.02 $\pm$ 0.16 vs. 22.92 $\pm$ 0.75 pg/ml; p=0.0022) a IL-6 (2.06 $\pm$ 0.72 vs. 43.09 $\pm$ 1.40 pg/ml; p=0.0022) ve srovnání s nestimulovanými buňkami (Obr. 3.13. A). Význam intracelulárního S100A4 pro regulaci zánětu byl hodnocen pomocí utlumení exprese genu pro S100A4. V CD3+ lymfocytech s utlumeným genem pro S100A4 došlo ke snížení

exprese prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  (o 43%; p=0.025), IL-1 $\beta$  (o 73%; p=0.0009) a IL-6 (o 72%; p=0.0001) (Obr. 3.13.B). Nicméně na proteinové úrovni nedošlo k významným změnám v produkci cytokinů u buněk s utlumenou expresí S100A4 genu.

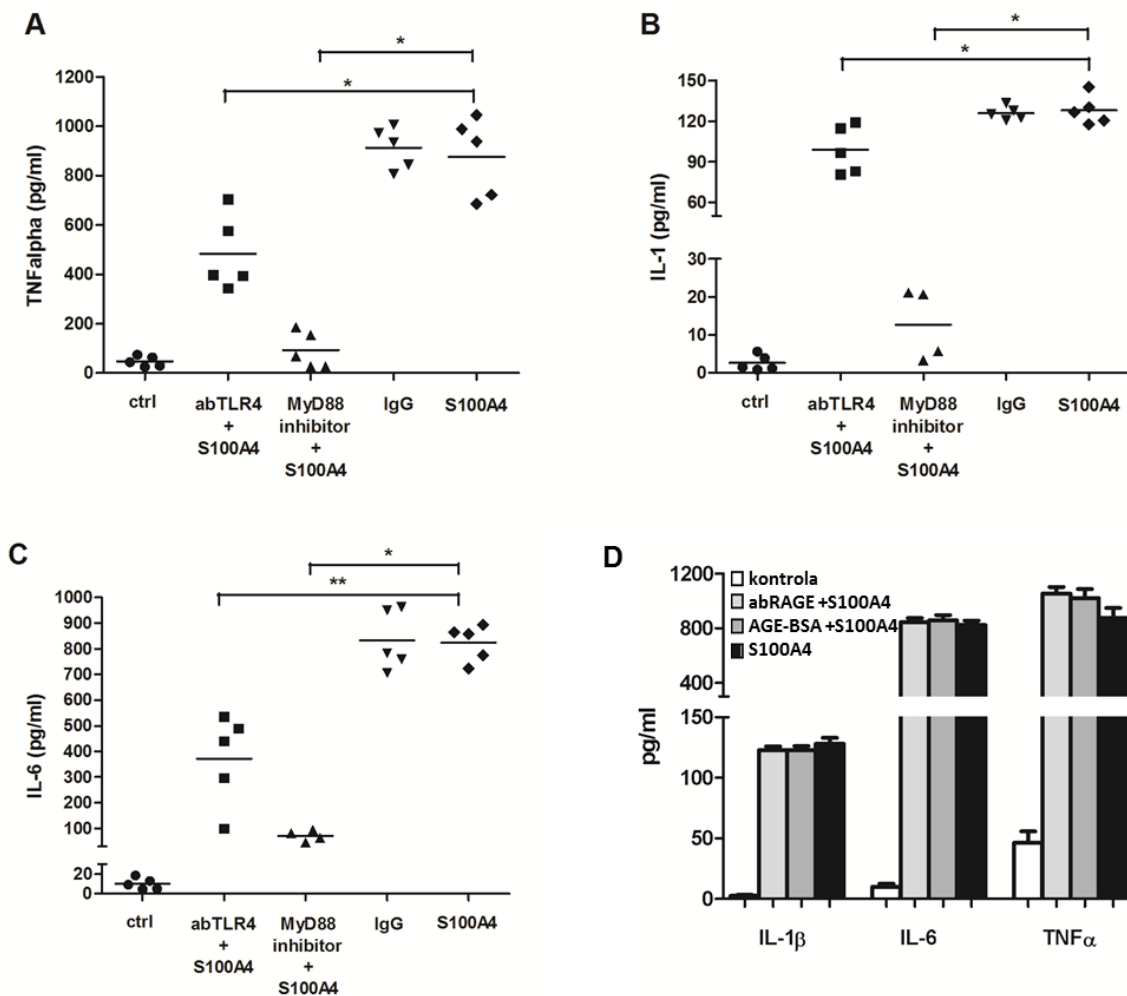


**Obr. 3.13.** CD3+ lymfocyty produkují signifikantně vyšší hladiny TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 po ovlivnění S100A4 proteinem oproti nestimulovaným kontrolním buňkám (A). Utlumení S100A4 genu snížilo expresi prozánětlivých cytokinů CD3+ lymfocyty (B). Data jsou vyjádřena jako průměr a SEM, \* p<0.05; \*\* p<0.01; + p<0.001.

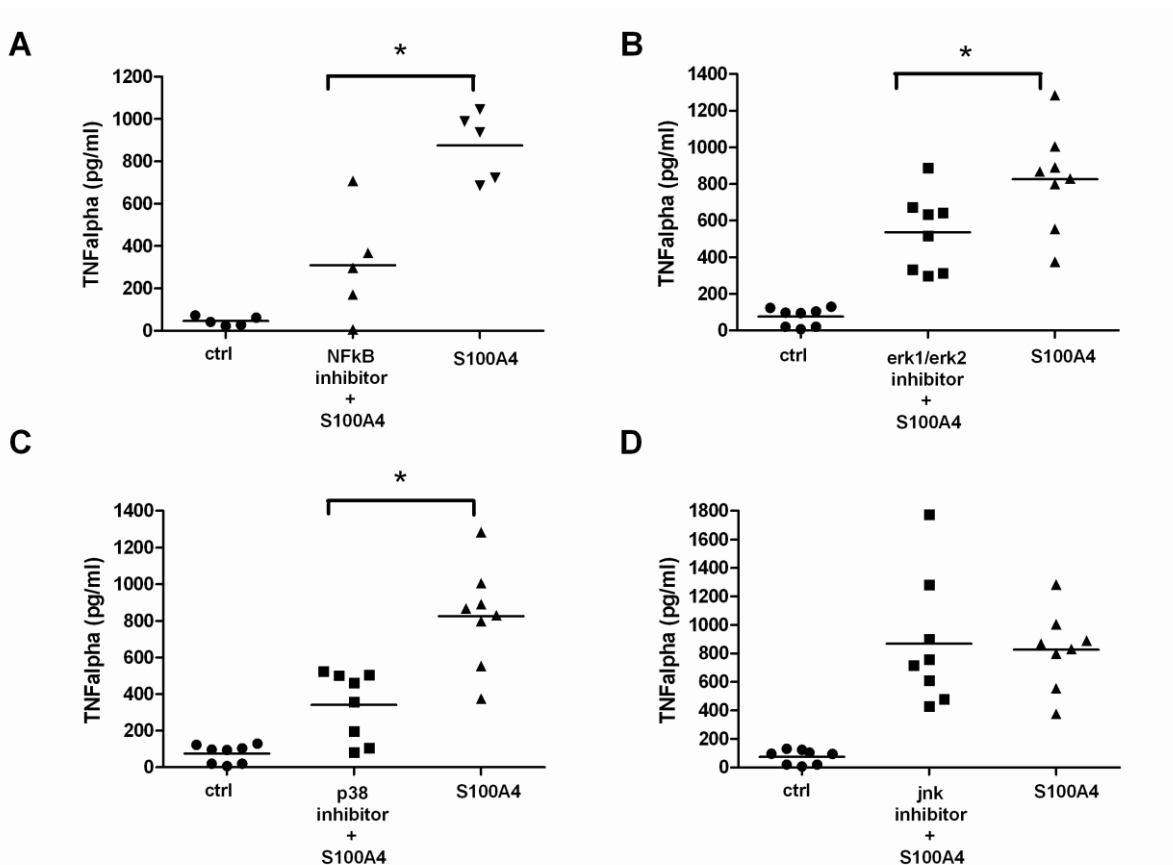
### S100A4 indukovaná zánětlivá odpověď je zprostředkována prostřednictvím receptoru TLR-4 a aktivace NF $\kappa$ B, p38 a erk1/2 kináz

Současné práce ukazují, že některé S100 proteiny indukují zánětlivou reakci v buňkách prostřednictvím receptorů RAGE nebo TLR-4. V naší studii aplikace protilátky proti receptoru RAGE nebo použití jeho alternativního ligandu AGE-BSA u PBMCs stimulovaných S100A4 proteinem nevedla k poklesu produkce prozánětlivých cytokinů a tudíž lze usuzovat, že RAGE není klíčovým receptorem pro S100A4 a jím indukovanou imunitní reakci v mononukleárních buňkách (Obr. 3.14. D). Naopak, použití protilátky proti receptoru TLR-4 před vlastní stimulací S100A4 proteinem vedla k signifikantnímu poklesu produkce prozánětlivých cytokinů mononukleárními buňkami: pokles hladiny TNF $\alpha$  o 44.9% (z 876.0 $\pm$ 72.47 na 482.8 $\pm$ 68.04 pg/ml, p=0.02), IL-1 $\beta$  o 22.8% (z 128.1 $\pm$ 4.86 na 98.95 $\pm$ 7.94 pg/ml p=0.02) a IL-6 o 54.7% (z 823.3 $\pm$ 31.67 na 372.7 $\pm$ 79.16 pg/ml, p=0.008), (Obr. 3.14. A-C). Podobně, inhibice adaptorového proteinu MyD88 u S100A4 stimulovaných buněk, jehož homodimerizace je nezbytná pro zánětlivou signalizaci TLR-4 receptoru, způsobila významný pokles produkce cytokinů: pokles hladiny TNF $\alpha$  o 89.5% (z 876.0 $\pm$ 72.47 na 91.76 $\pm$ 33.08 pg/ml, p=0.01), IL-1 $\beta$  o 90.1% (z 128.1 $\pm$ 4.86 na 12.7 $\pm$ 4.76 pg/ml p=0.02) a IL-6 o 91.4% (z 823.3 $\pm$ 31.67 na 71.0 $\pm$ 10.60 pg/ml, p=0.02), (Obr. 3.14. A-C). Při studiu S100A4 signalizace jsme se zaměřili na stanovení hladin TNF $\alpha$  u S100A4 stimulovaných buněk s inhibovaným

transkripčním faktorem NFkB a kinázami erk1/2, p38 a jnk. Signifikantní snížení hladin TNF $\alpha$  jsme pozorovali u vzorků s inhibovaným NFkB (n=5) o 71.6% (z 763.5 $\pm$ 80.61 na 216.6 $\pm$ 83.53 pg/ml, p=0.0011), p38 kinázou (n=8) o 58.7% (z 825.6 $\pm$ 96.83 na 341.2 $\pm$ 65.90 pg/ml, p=0.019) a erk1/2 kinázou (n=8) o 35.1% (z 825.6 $\pm$ 96.83 na 536.0 $\pm$ 74.46 pg/ml, p=0.0379), (Obr. 3.15. A-C). Vyblokování jnk kinázy (n=8) neovlivnilo hladiny TNF $\alpha$  cytokinu uvolňovaného S100A4 stimulovanými mononukleárními buňkami (z 825.6 $\pm$ 96.83 na 868.5 $\pm$ 160.5 pg/ml, p=NS), (Obr. 3.15.D).



**Obr. 3.14.** Vyblokování TLR-4 receptoru a MyD88 proteinu vedlo k kulturní sekrece cytokinů TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) u S100A4 stimulovaných PBMCs. Aplikace protilátky proti receptoru RAGE nebo použití jeho alternativního ligandu AGE-BSA u PBMCs stimulovaných S100A4 proteinem nevedla k poklesu produkce prozánětlivých cytokinů (D). Data jsou vyjádřena jako průměr a SEM, \*p<0.05;\*\*p<0.01.



**Obr. 3.15.** Inhibice NFkB, p38, erk1/erk2 vedla k signifikantnímu ultumení sekrece cytokinů TNF $\alpha$  (A-C), zatímco inhibice jnk MAP kinázy (D) neměla na produkci TNF $\alpha$  u S100A4 stimulovaných PBMCs vliv žádný. Data jsou vyjádřena jako průměr, \* $p < 0.05$ .

## 4 DISKUSE

### 4.1 Význam S100 proteinů u revmatických onemocnění

Protein S100A4 byl původně popsán jako regulační molekula progresu některých nádorových onemocnění, nicméně současné studie dokumentují jeho význam v patogenezi zánětlivých onemocnění (Šenolt L. 2006; Klingelhöfer J. 2007; Zibert J.R. 2010). V naší práci zaměřené na hodnocení systémových hladin S100A4 a jejich změn v průběhu biologické léčby jsme odhalili významnou asociaci plazmatických hladin S100A4 proteinu s aktivitou RA u pacientů před léčbou. Podobná korelace s aktivitou RA, ale také s autoprotilátkami a C reaktivním proteinem (CRP) byla dokumentována i pro další prozánětlivé S100 proteiny S100A8/9 a S100A12 (Foell D. et al., 2003; Wulffraat N.M. et al., 2003; Hammer H.B. et al., 2010). S100A4 nemá prokazatelný vztah k autoprotilátkám ani k CRP, a proto se domníváme, že zvýšené hladiny S100A4 v plazmě odrážejí aktivitu RA spíše než aktivaci imunitní odpovědi a zánět. Na rozdíl od výše zmíněných S100 proteinů (Foell D. et al., 2004; Wittkowski H. et al., 2007; De Rycke L. et al., 2005), hladina celkového S100A4 v plazmě

nebyla ovlivněna aplikací biologické léčby. Několik studií přineslo důkaz o existenci intracelulárního S100A4 v podobě inaktivní formy dimeru a extracelulární biologicky aktivní multimerní formy S100A4 (Novitskaya V. et al., 2000; Ornas M. et al., 2004). Separací dimerní a multimerní formy proteinu v plazmě pacientů jsme odhalili, že aplikace adalimumabu po dobu 12 týdnů vede k poklesu hladin S100A4 multimerů ve prospěch dimerní formy. Vzhledem k prokázaným vlastnostem S100A4 multimerů (Novitskaya V. et al., 2000; Ornas M. et al., 2004; Šenolt L. et al., 2006; Klingelhöfer J. et al., 2007) předpokládáme, že snížení hladiny multimerů je spojeno s poklesem aktivity choroby u pacientů na TNF $\alpha$  blokující terapii. Dále jsme zjistili, že monocyty ovlivněné S100A4 multimerem zvýšeně uvolňují TNF $\alpha$ . Naopak, v souladu s prací na nádorových buňkách (Devoogdt N. et al., 2006), TNF $\alpha$  neovlivňuje expresi S100A4 mRNA v RA synoviálních fibroblastech (nepublikovaná data). Na základě našich výsledků se tak domníváme, že S100A4 je u pacientů s RA regulován nezávisle na TNF $\alpha$ , a formace či rozpad biologicky aktivních multimerních forem S100A4 jsou asociovány s aktivitou onemocnění.

V současnosti existuje několik studií dokumentujících vliv S100A4 proteinu na regulaci zánětu a tkáňových fibrotických změn (Schneider M. et al., 2008). Naše výsledky ukazují, že u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi (polymyositida a dermatomyositida) je S100A4 protein významně exprimován ve svalové tkáni, a to především v buňkách zánětlivého infiltrátu a v některých regenerujících svalových vláknech. Obdobná distribuce S100A4 proteinu je charakteristická pro zánětlivou tkáň pacientů s RA a psoriázou (Šenolt L. et al., 2006; Klingelhöfer J. et al., 2007; Zibert J.R. et al., 2010). Podobně jako v případě S100A8 a S100A9 (Seeliger S. et al., 2003), se protein S100A4 hojně vyskytuje v mononukleárních buňkách infiltrátů obklopujících nekrotická svalová vlákna u pacientů s myositiou. Expresi S100A4 jsme pozorovali i v regenerujících svalových vláknech a lze tak usuzovat na jeho schopnost podporovat regeneraci a přežití buněk. Tuto úvahu podporuje nedávná práce (Schneider M. et al., 2007), ve které autoři pozorovali zvýšenou produkci S100A4 u myocytů infarktové zóny oproti normálním myocytům. Uvolňování S100A4 v místě zánětu u různých onemocnění (Šenolt L. et al., 2006; Klingelhöfer J. et al., 2007; Zibert J.R. et al., 2010) může být stimulováno přítomností některých prozánětlivých cytokinů (Yammani R.R. et al., 2009). S100A4 uvolněný z buněk v místě zánětu se nejčastěji vyskytuje ve své biologicky aktivní multimerní formě a má vlastnosti podobné cytokinům (Novitskaya V. et al., 2000; Schmidt-Hansen B. et al., 2004). Přestože se S100A4 hojně vyskytuje v okolí nekrotických svalových vláken, in vitro experimenty neprokázaly jeho vliv na expresi

pro/anti- apoptotických molekul Bax a Bcl2 mononukleárními buňkami nebo myocyty, ani na regulaci apoptózy indukované perforin/granzyme B systémem. Zjistili jsme ale, že S100A4 indukuje produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF $\alpha$  v mononukleárních buňkách, ale ne v myocytech. Příčinou aktivace mononukleárních buněk a ne myocytů může být přítomnost receptoru TLR-4, který u myocytů chybí (Kim G.T. et al., 2010). Naše současné výsledky naznačují, že receptor TLR-4 by mohl být jedním ze zprostředkovatelů prozánětlivého efektu S100A4 (viz kapitola 3.2.). Z těchto poznatků lze usuzovat, že se S100A4 protein v myositickém svalu podílí na poškození svalových vláken nepřímo, a to prostřednictvím aktivace mononukleárních buněk a zanětlivé odpovědi.

V rámci rodiny S100 rozlišujeme skupinu S100A8/9 a S100A12 proteinů, tzv. S100 alarminů, prozánětlivých proteinů, které se hojně vyskytují u etablované RA (Youssef P. et al., 1999; Foell D. et al., 2003; Sunahori K. et al., 2006). Naše výsledky ukazují zvýšené sérové hladiny S100A8/9 a S100A12 u pacientů s časnou fází RA. V minulosti byly dokumentovány zvýšené koncentrace těchto proteinů v cirkulaci u pacientů s etablovanou RA (Youssef P. et al., 1999; Foell D. et al., 2003; Sunahori et al., 2006) a jejich pokles po aplikaci různých protizánětlivých přípravků (Foell D. et al., 2004; Wittkowski H. et al., 2007). V souladu s těmito daty jsme u pacientů s časnou RA léčených konvenční antirevmatickou terapií pozorovali pokles sérových hladin S100A8/9 a S100A12 na úroveň hladin zdravých jedinců. Námi prokázané zvýšené hladiny sérových S100A8/9 a S100A12 proteinů u pacientů s časnou RA jsou v souladu s daty u pacientů s etablovanou chorobou (Bovin L.F. et al., 2004; de Seny D. et al., 2008), a lze tak usuzovat, že oba S100 proteiny by mohly být v časně fázi onemocnění regulovány společně. Podobně jako u etablované RA (Foell D. et al., 2003; Hammer H.B. et al., 2007, 2008, 2010), tak i u pacientů s časnou RA mají S100A8/9 a S100A12 proteiny pozitivní vztah ke klinickým a laboratorním markerům aktivity, přičemž asociace je statisticky významnější pro S100A8/9. Vyšší hladiny S100A8/9 před léčbou predikují pokles CRP a redukci počtu oteklých kloubů v čase. Pokles hladin S100A8/9 navíc koreluje s klinickým a laboratorním zlepšením v čase. Podrobnější statistická analýza ale ukázala, že S100A8/9 nelze považovat za významnější biomarker onemocnění než je v současnosti CRP. Navíc hladiny CRP i S100A8/9 jsou pouze slabými faktory předpovídajícími počet oteklých kloubů před léčbou. Nicméně změny hladin S100A8/9, ale ne CRP, korelovaly se změnami v počtu oteklých kloubů. Vzhledem k tomu, že S100A8/9 a S100A12 jsou tvořeny aktivovanými buňkami synoviální membrány a odtud přecházejí do krevního řečiště (Foell D. et al., 2003; Sunahori K. et al., 2006), mohou být považovány za

vhodné markery pro hodnocení lokálního zánětu v kloubu. Naše výsledky překvapivě neprokázaly vztah S100 proteinů a autoprotiilátek a jsou tak v rozporu s některými předchozími studii (Hammer H.B. et al., 2007; 2008; Chen Y.S. et al., 2009). To může být dáno tím, že v časně fázi onemocnění mají tyto proteiny spíše vztah k aktivitě onemocnění než k autoimunitní odpovědi. Nově byl S100A8/9 protein označen jako prediktor rentgenové progresse onemocnění u pacientů s etablovanou RA (Hammer H.B. et al., 2010). V souladu s tím tak výsledky naší studie ukazují, že pokles hladin S100A8/9 v čase je asociován s poklesem počtu oteklých kloubů a mohl by souviset s potlačením rozvoje kloubních destrukcí. Pro objasnění možnosti využití S100A8/9 jako markeru budoucího poškození kloubu je třeba dalších studií.

#### **4.2 Molekulární mechanismy S100A4 indukované imunitní odpovědi u pacientů s revmatoidní artritidou**

V současnosti je S100A4 protein podrobně studován s ohledem na jeho potenciální význam v zánětlivé odpovědi (Šenolt L. et al., 2006; Klingelhöfer J. et al., 2007; Zibert J.R. et al., 2010). S100A4 je exprimován zejména mononukleárními buňkami zánětlivého infiltrátu a rezidenčními buňkami v místě zánětu (Klingelhöfer J. et al., 2007; Zibert J.R. et al., 2010). Za indukci uvolnění S100A4 do extracelulárního prostoru jsou zodpovědné některé prozánětlivé cytokiny (Yammani R.R. et al., 2009). Studie na in vivo modelech ukazují, že extracelulární S100A4 protein je zodpovědný za stimulaci migrace myeloidních buněk do místa zánětu (Li et al., 2010) a tím progresi zánětlivého procesu. Naše výsledky dokumentují, že S100A4 indukuje uvolňování prozánětlivých cytokinů RA mononukleárními buňkami a T lymfocyty, a tak se řadí mezi molekuly s imunoregulačními vlastnostmi. Prozánětlivý efekt S100A4 je překvapivě významně silnější ve srovnání s S100 alarminy, především v porovnání s S100A12. Naše dřívější studie dokumentují výraznější expresi S100A4 v RA synoviální tkáni oproti proteinům S100A9 a S100A12 (Klingelhöfer J. et al., 2007). Domníváme se tedy, že v rámci S100 proteinů by S100A4 mohl být nejvýznamnějším prozánětlivým faktorem u RA. Nicméně role intracelulárního S100A4 v zánětu je zatím nejasná. Naše předběžné výsledky ukazují, že přestože utlumení genu pro S100A4 vede k poklesu exprese prozánětlivých cytokinů, nemá významný vliv na hladiny uvolněných cytokinů. Zde je třeba dalších experimentů zaměřených na stanovení hladin cytokinů v různých časových intervalech. Studiem molekulárních mechanismů jsme odhalili, že prozánětlivý efekt S100A4 proteinu u mononukleárních buněk je zčásti zprostředkován pomocí TLR-4 receptoru a ne vazbou na RAGE, jak bylo popsáno pro S100A12 protein (Hofmann M.A. et al., 1999). V souladu

s naším pozorováním je studie autorů Vogl T. et al., kteří zjistili, že S100A8/9 u monocytů indukuje tvorbu TNF $\alpha$  přes receptor TLR-4 (Vogl T. et al., 2007). Naše data ukazují, že vyblokování TLR-4 receptoru u S100A4 stimulovaných PBMCs vede k poklesu produkce cytokinů o 22-55%, zatímco blokování adaptorového proteinu MyD88 sníží tvorbu cytokinů až o 90%. Signální dráhy většiny receptorů TLR rodiny, ale také receptoru pro IL1 (IL-1R), jsou závislé na adaptorovém proteinu MyD88 (Adachi O. et al., 1998), a proto předpokládáme možnou asociaci i některého z těchto receptorů s S100A4 indukovaným zánětem. Podobně jako S100A8/9 protein u monocytů (Vogl T. et al., 2007), S100A4 indukuje TNF $\alpha$  u PBMCs prostřednictvím aktivace NF $\kappa$ B transkripčního faktoru a MAP kináz erk1/2 a p38. Z našich výsledků tedy vyplývá, že S100A4 protein má významné imunomodulační vlastnosti zprostředkované cestou TLR-4 receptoru a dalších zatím neznámých mechanismů, které budou předmětem našich dalších studií.

## **5 ZÁVĚR**

Výsledky této práce umožnily podrobněji charakterizovat S100A4 protein jako prozánětlivý cytokin ovlivňující imunitní odpověď a destrukci tkáně u RA, a poprvé dokumentovat jeho význam v patogenezi idiopatických zánětlivých myopatií. Z klinického hlediska byl zhodnocen význam S100 alarminů v časně fázi revmatoidní artritidy. Naše výsledky tak přispívají k lepšímu pochopení patogeneze revmatických onemocnění a mohou se částečně podílet na posunu v oblasti prognostických markerů a možném objevení nového cíle pro budoucí léčebné ovlivnění autoimunitních onemocnění.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|              |  |
|--------------|--|
| ACPA         | anti-citrullinated protein antibodies                                |
| ADAMTs       | adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs        |
| AGE-BSA      | advanced glycation end product-modified bovine serum albumin         |
| AZT          | azidothymidine   |
| bax          | Bcl-2-associated X protein   |
| bcl2         | B-cell lymphoma 2  |
| COX2         | cyklooxygenáza 2   |
| CRP          | C reaktivní protein  |
| CTLA4        | cytotoxic T-lymphocyte antigen 4                                     |
| DAS28        | disease activity score 28  |
| DM           | dermatomyositida   |
| DMARD        | disease-modifying antirheumatic drug                                 |
| EGF          | epidermal growth factor  |
| ERK          | extracellular-signal-regulated kinases                               |
| EULAR        | European Ligue Against Rheumatism                                    |
| FGF          | fibroblast growth factor   |
| FW           | sedimentace erytrocytů stanovena metodou podle Fåhraeuse-Westergrena |
| GM-CSF       | granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor                     |
| HDM2         | human double minute-2  |
| HIV          | human immunodeficiency virus   |
| HLA          | histocompatibility antigen   |
| HSP          | heat shock protein   |
| HTLV         | human T-lymphotropic virus   |
| IBM          | inclusion body myositis  |
| ICAM         | intercellular adhesion molecule 1                                    |
| ICOS         | inducible T-cell COStimulator  |
| IFN $\gamma$ | interferon gama  |
| IL           | interleukin  |
| IRF5         | interferon regulační faktor 5  |
| IZM          | idiopatické zánětlivé myopatie                                       |
| JIA          | juvenile idiopathic arthritis  |
| jnk          | c-Jun N-terminal kinase  |
| LFA-1        | lymphocyte function-associated antigen 1                             |

|                |   |
|----------------|---|
| LPS            | lipopolysacharid  |
| LT $\beta$     | lymphotoxin $\beta$   |
| MAC            | membrane attack complement  |
| MAPK           | mitogen-activated protein kinase                                  |
| MHC            | major histocompatibility complex                                  |
| MMP            | matrixová metaloproteináza  |
| MRP            | myeloid related protein   |
| MTX            | methotrexate  |
| NF $\kappa$ B  | nuclear factor-kappaB   |
| NF- $\kappa$ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells    |
| OA             | osteoartróza  |
| PADI4          | peptidyl arginin deiminasa typu IV                                |
| PBMCs          | peripheral blood mononuclear cells, periferní mononukleární buňky |
| PM             | polymyositida   |
| pred           | prednisone  |
| PTPN22         | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22                |
| RA             | revmatoidní artritida   |
| RAGE           | receptor for advanced glycation endproducts                       |
| RANKL          | receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand               |
| RASF           | synoviální fibroblasty pacientů s revmatoidní artritidou          |
| RT-PCR         | real time PCR, PCR v reálném čase                                 |
| SCL            | sklerodermie  |
| SJC            | swollen joints count  |
| STAT           | signal transducer and activator of transcription                  |
| TCR            | T cell receptor   |
| TGF- $\beta$   | transforming growth factor beta                                   |
| TIMP           | tissue inhibitor of metalloproteinase                             |
| TLR            | toll-like receptor  |
| TNF            | tumor necrosis factor, tumor nekrotizující faktor                 |
| TRAF TNF       | receptor-associated factor  |
| Treg           | T regulační buňka   |
| VCAM           | vascular cell adhesion molecule 1                                 |
| VLA-4          | integrin alpha4beta1 (very late antigen 4)                        |
| ZK             | zdravá kontrola   |

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998;9:143-50.

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36:182-8.

Amano T, Yamasaki S, Yagishita N, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Aratani S, Fujita H, Zhang L, Ikeda R, Fujii R, Miura N, Komiya S, Nishioka K, Maruyama I, Fukamizu A, Nakajima T. Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes Dev* 2003;17:2436-49.

Ambartsumian N, Klingelhöfer J. J, Grigorian M, Christensen C, Kriaievska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, and Lukanidin E. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 2001;20:4685-95.

Ambartsumian NS, Grigorian MS, Larsen IF, Karlstrøm O, Sidenius N, Rygaard J, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene* 1996;13:1621–30.

Auger I, Roudier J. A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaJ to DnaK: implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *J Clin Invest* 1997;99:1818-22.

Aupperle KR, Boyle DL, Hendrix M, Seftor EA, Zvaifler NJ, Barbosa M, Firestein GS. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 1998; 152:1091-8.

Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum* 2008;59: 1690-7.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330-7.

Belot N, Pochet R, Heizmann CW, Kiss R, Decaestecker C. Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1600:74-83.

Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, Munthe E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. 1991;20:74-82.

Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007, 81:1-5.

Bjørnland K, Winberg JO, Odegaard OT, Hovig E, Loennechen T, Aasen AO, Fodstad O, Maelandsmo GM. S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res*. 1999;59:4702-8.

Bovin LF, Rieneck K, Workman C, Nielsen H, Sørensen SF, Skjødt H, Florescu A, Brunak S, Bendtzen K: Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis: discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol Lett* 2004, 93:217-226.

Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E, Exley AE, Parsonage G, Rainger GE, Nash GB, Thomas AM, Simmons DL, Salmon M, Buckley CD. Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which

supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2472-82.

Broome AM, Ryan D, Eckert RL. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:675-85.

Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A, Grøndal G, Hietarinta M, Isenberg D, Kalden JR, Lundberg I, Moutsopoulos H, Roux-Lombard P, Vencovsky J, Wikman A, Seelig HP, van Engelen BG, van Venrooij WJ. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:116-23.

Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 2010;9:531-5.

Cooper GS, Miller FW, Pandey JP. The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research. *Environ Health Perspect* 1999;107 (Suppl 5):693–700.

Crum-Cianflone NF. Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:473-94.

Cupler EJ, Leon-Monzon M, Miller J, Semino-Mora C, Anderson TL, Dalakas MC. Inclusion body myositis in HIV-I and HTLV-I infected patients. *Brain* 119: 1887–1893.

Dalakas MC. Inflammatory disorders of muscle: progress in polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *Curr Opin Neurol*. 2004;17:561-7.

Dalakas MC and Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*. 2003;20;362:971-82.

Dalakas MC. Mechanisms of disease: signaling pathways and immunobiology of inflammatory myopathies. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:219-27.

Davies BR, Davies MP, Gibbs FE, Barraclough R, Rudland PS. Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene*. 1993;8:999-1008.

De Rycke L, Baeten D, Foell D, Kruithof E, Veys EM, Roth J, De Keyser F: Differential expression and response to anti-TNF $\alpha$  treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis. *J Pathol* 2005; 2007, 66:1020-5.

De Rycke L, Peene I, Hoffman IE, Kruithof E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C, Mielants H, Boullart L, Serre G, Veys EM, De Keyser F. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extraarticular manifestations. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1587-93.

de Seny D, Fillet M, Ribbens C, Marée R, Meuwis MA, Lutteri L, Chapelle JP, Wehenkel L, Louis E, Merville MP, Malaise M: Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem* 2008, 54:1066-1075.

Devoogdt N, Revets H, Kindt A, Liu YQ, De Baetselier P, Ghassabeh GH. The tumor promoting effect of TNF- $\alpha$  involves the induction of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol* 2006;177:8046–52.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003;60:540-51.

Duarte WR, Shibata T, Takenaga K, Takahashi E, Kubota K, Ohya K, Ishikawa I, Yamauchi M, Kasugai S. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2003;18:493-501.

Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and

whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca<sup>2+</sup>-binding protein family. *Genes Dev.* 1989;3:1086-93.

EL Naaman C, Grum-Schwensen B, Mansouri A, Grigorian M, Santoni-Rugiu E, Hansen T, Kriajevska M, Schafer BW, Heizmann CW, Lukanidin E, Ambartsumian N. Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene* 2004;23:3670-80.

Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, Fitzgerald O, Roth J. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology* 2003;42:1383–9.

Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, Wulffraat N, Schmeling H, Frosch M, Horneff G, Kuis W, Sorg C, Roth J. Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1286–95.

Foell D, Wittkowski H, Viemann D, Ehrchen J, Vogl T, Roth J. The Mediator S100A12 is Critically Involved in Early Inflammatory Events of Rheumatoid Diseases. *Arthritis Rheum* 2005;52(supp.):253.

Foell D, Wulffraat N, Wedderburn LR, Wittkowski H, Frosch M, Gerss J, Stanevicha V, Mihaylova D, Ferriani V, Tsakalidou FK, Foeldvari I, Cuttica R, Gonzalez B, Ravelli A, Khubchandani R, Oliveira S, Armbrust W, Garay S, Vojinovic J, Norambuena X, Gamir ML, García-Consuegra J, Lepore L, Susic G, Corona F, Dolezalova P, Pistorio A, Martini A, Ruperto N, Roth J. Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial. *JAMA* 2010, 303:1266-73.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkötter C, Harms E, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:628-37.

Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan-Lancaster J. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the

treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2010;62: 929-39.

Gibbs FE, Barraclough R, Platt-Higgins A, Rudland PS, Wilkinson MC, Parry EW. Immunocytochemical distribution of the calcium-binding protein p9Ka in normal rat tissues: variation in the cellular location in different tissues. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:169-80.

Golden BE, Clohessy PA, Russell G, Fagerhol MK. Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1996;74:136-9.

Gravallese EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 1998;152:943-51.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205–13.

Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G and Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 2001;276: 22699-708.

Grigorian M, Tulchinsky E, Burrone O, Tarabykina S, Georgiev G, Lukanidin E. Modulation of mts1 expression in mouse and human normal and tumor cells. *Electrophoresis* 1994;15:463–8.

Gupta S, Hussain T, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Mukhtar H. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2003;21:106–12.

Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1093-7.

Hammer HB, Ødegård S, Syversen SW, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:150-4.

Heizmann CW, Cox JA. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals*. 1998;11:383-97.

Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1955-8.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889-901.

Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes IB. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010; 184:3336-40.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem* 275:40096–40105.

Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998;161:409-14.

Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R: Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009, 11:R39.

Illa I, Nath A, Dalakas M. Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis. *Ann Neurol*. 1991;29:474-81.

Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem* 1978;89:379-88.

Kamphuis S, Kuis W, de Jager W, Teklenburg G, Massa M, Gordon G, Boerhof M, Rijkers GT, Uiterwaal CS, Otten HG, Sette A, Albani S, Prakken BJ. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2005;366:50-6.

Keirsebilck A, Bonn e S, Bruyneel E, Vermassen P, Lukanidin E, Mareel M, van Roy F. E-cadherin and metastasin (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families. *Cancer Res*. 1998;58:4587-91.

Kim GT, Cho ML, Park YE, Yoo WH, Kim JH, Oh HJ, Kim DS, Baek SH, Lee SH, Lee JH, Kim HY, Kim SI. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol*. 2010;29:273-9.

Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y, Sasaki T. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2000;16:1125-31.

Kiryushko D, Novitskaya V, Soroka V, Klingelh ofer J, Lukanidin E, Berezin V, Bock E: Molecular mechanisms of Ca(2+) signaling in neurons induced by the S100A4 protein. *Mol Cell Biol* 2006, 26:3625-3638.

Klareskog L, R nnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 2008;26:651-75.

Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, K llberg H, Bengtsson C, Grunewald J, R nnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantap  -Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-

restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54:38–46.

Klingelhöfer J, Møller HD, Sumer EU, Berg CH, Poulsen M, Kiryushko D, Soroka V, Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin EM. Epidermal growth factor receptor ligands as new extracellular targets for the metastasis-promoting S100A4 protein. *FEBS J*. 2009;276:5936-48.

Klingelhöfer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshøj I, Pavelka K, Neidhart M, Gay S, Ambartsumian N, Hansen BS, Petersen J, Lukanidin E, Grigorian M. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts 1) in Rheumatoid Arthritis: putative involvement in the pathogenesis of RA. *Arthritis Rheum*. 2007 Mar;56:779-89.

Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Senécal JL. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R78.

Koffman BM, Sivakumar K, Simonis T, Stroncek D, Dalakas MC. HLA allele distribution distinguishes sporadic inclusion body myositis from hereditary inclusion body myopathies. *J Neuroimmunol*. 1998.15;84:139-42.

Kosaki A, Hasegawa T, Kimura T, Iida K, Hitomi J, Matsubara H, Mori Y, Okigaki M, Toyoda N, Masaki H, Inoue-Shibata M, Nishikawa M, Iwasaka T. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5423-8.

Kriajevska M, Bronstein IB, Scott DJ, Tarabykina S, Fischer-Larsen M, Issinger O, Lukanidin E. Metastasis-associated protein Mts1 (S100A4) inhibits CK2-mediated phosphorylation and self-assembly of the heavy chain of nonmuscle myosin. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1498:252-63.

Kriajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E. Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem*. 2002;277:5229-35.

Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Maitland N, Lomonosov M, Hansen K, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *J Biol Chem*. 1998;273:9852-6.

Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP and Lukanidin EM. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem* 1994;269:19679-82.

Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, van der Helm-van Mil AH, Allaart CF, Verduyn W, Houwing-Duistermaat J, Alfredsson L, Begovich AB, Klareskog L, Huizinga TW, Toes RE. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 2007;4(9): e278. [Erratum, *PLoS Med* 2007;4(12):e358.]

Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD, Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;41:778-788.

Lee AT, Li W, Liew A, Bombardier C, Weisman M, Massarotti EM, Kent J, Wolfe F, Begovich AB, Gregersen PK. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dosedependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun* 2005;6:129–33.

Lee WY, Su WC, Lin PW, Guo HR, Chang TW, Chen HH. Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early stage breast cancer. *Oncology* 2004;66:429–38.

Leff RL, Love LA, Miller FW, Greenberg SJ, Klein EA, Dalakas MC, Plotz PH. Viruses in the idiopathic inflammatory myopathies: absence of candidate viral genomes in muscle. *Lancet*. 1992; 339: 1192–1195.

Levine SM. Cancer and myositis: New insights into an old association. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18:620-624.

Lugering N, Stoll R, Schmid KW, Kucharzik T, Stein H, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. The myeloic related protein MRP8/14 (27E10 antigen)-usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:659-64.

Marx J. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 2004;306:966-8.

Mastaglia FL and Phillips BA. Idiopathic inflammatory myopathies: epidemiology, classification and diagnostic criteria. *Rheum Dis Clin N Am.* 2002; 28: 723–741.

Masuda K, Masuda R, Neidhart M, Simmen BR, Michel BA, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Molecular profile of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis depends on the stage of proliferation. *Arthritis Res.* 2002; 4:R8.

McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:429-42.

Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin- 17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-98.

Mirmohammadsadegh A, Tschakarjan E, Ljoljic A, Bohner K, Michel G, Ruzicka T, Goos M, Hengge UR. Calgranulin C is overexpressed in lesional psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2000;114:1207-8.

Moore, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;19:739-44.

Moroz OV, Antson AA, Dodson EJ, Burrell HJ, Grist SJ, Lloyd RM, Maitland NJ, Dodson GG, Wilson KS, Lukanidin E, Bronstein IB. The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002;58:407-13.

Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* 2007;204:33-9.

Nepom GT, Hansen JA, Nepom BS. The molecular basis for HLA class II associations with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol.* 1987;7:1-7.

Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007;217:19-37.

Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E and Lukanidin E. Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons *J Biol Chem* 2000;275: 41278-86.

Odink K, Cerletti N, Bruggen J. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.* 1987;330:80-2.

Orna's M, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4 (mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004;23:5487-95.

Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3085-92.

Parker C, Lakshmi MS, Piura B, Sherbet GV. Metastasis-associated mts1 gene expression correlates with increased p53 detection in the B16 murine melanoma. *DNA Cell Biol.* 1994;13:343-51.

Pechkovsky DV, Zalutskaya OM, Ivanov GI, Misuno NI. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000;29:27-33.

Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, Pe'er I, Burtt NP, Blumenstiel B, DeFelice M, Parkin M, Barry R, Winslow W, Healy C, Graham RR, Neale BM, Izmailova E, Roubenoff R, Parker AN, Glass R, Karlson EW, Maher N, Hafler DA, Lee DM, Seldin MF, Remmers EF, Lee AT, Padyukov L, Alfredsson L, Coblyn J, Weinblatt ME, Gabriel SB, Purcell S, Klareskog L, Gregersen PK, Shadick NA, Daly MJ, Altshuler D. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2007;39:1477-82.

Price P, Santoso L, Mastaglia F, Garlepp M, Kok CC, Allcock R, Laing N. Two major histocompatibility complex haplotypes influence susceptibility to sporadic inclusion body myositis: critical evaluation of an association with HLA-DR3. *Tissue Antigens*. 2004; 64: 575–580.

Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1997;272:9496-502.

Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 2005;7: R784-R795.

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007;357:977-86.

Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J*. 1996;10:1183-91.

Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:3658-65.

Rouleau P, Vandal K, Ryckman C, Poubelle PE, Boivin A, Talbot M, Tessier PA. The calcium-binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentrations similar to those found in human inflammatory arthritis. *Clin Immunol.* 2003;107:46-54.

Sabeh F, Fox D, Weiss SJ. Membranetype I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J Immunol* 2010; 184:6396-406.

Saleem M, Kweon MH, Johnson JJ, Adhami VM, Elcheva I, Khan N, Bin Hafeez B, Bhat KM, Sarfaraz S, Reagan-Shaw S, Spiegelman VS, Setaluri V, Mukhtar H. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:14825-30.

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and-independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J.* 2006;396:201-14.

Seeliger S, Vogl T, Engels IH, Schröder JM, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in inflammatory muscle diseases. *Am J Pathol* 2003;163:947-56.

Seiberlich B, Hunzelmann N, Roers A, Weber M, Schulze-Lohoff E. Das Jo-1-Syndrom und seine klinischen Manifestationen. *Medizinische Klinik* 2005;100:137-142.

Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V: Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005, 280:20833-20841.

Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Michel BA, Gay RE, Gay S, Pavelka K, Neidhart M. S100A4 (Mts1): is there any relation to the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Autoimmun Rev.* 2006;5:129-31.

Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Simmen B, Michel BA, Pavelka K, Gay RE, Gay S, Neidhart M. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1645-8.

Shepherd CE, Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL, Halliday GM. Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27:1554-63.

Schett G, Redlich K, Xu Q, Bizan P, Gröger M, Tohidast-Akrad M, Kiener H, Smolen J, Steiner G. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue: differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1998;102:302-11.

Schmidt-Hansen B, Klingelhöfer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen A, Kruse C, Ambartsumian N, Lukanidin E, Grigorian M. Functional significance of S100A4 (Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* 2004;279:24498-504.

Schmidt-Hansen B., Örnås D., Grigorian M., Tulchinsky E., Lukanidin E., Ambartsumian N. Extracellular S100A4 (mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004;23:5487-95.

Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP. S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med* 2008;86:507-22.

Schneider M, Kostin S, Strøm CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, Grigorian M, Andersen CB, Lukanidin E, Lerche Hansen J, Sheikh SP. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2007;75:40-50.

Schulze zur Wiesch A, Foell D, Frosch M, Vogl T, Sorg C, Roth J. Myeloid related proteins MRP8/MRP14 may predict disease flares in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:368-73.

Silman AJ, Hochberg MC. *Epidemiology of the rheumatic disease*. 2nd edn Oxford: Oxford University Press 2001.

Stanczyk J, Ospelt C, Gay RE, Gay S. Synovial cell activation. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18:262-7.

Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1001-9.

Strupat K, Rogniaux H, Van Dorsselaer A, Roth J, Vogl T. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionisation-mass analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11:780-788.

Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, Chazin WJ, Nakatani Y, Yui S, Makino H. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R69.

Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol*. 2001;167:4710-8.

Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S, Hasegawa Y, Sato K, Endo H. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J Cell Biol*. 1994;124:757-68.

Tarabykina S, Kriajevska M, Scott DJ, Hill TJ, Lafitte D, Derrick PJ, Dodson GG, Lukanidin E, Bronstein I. Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett*. 2000;475:187-91.

Vincent C, de Keyser F, Masson-Bessière C, Sebbag M, Veys E, Serre G. Antiperinuclear factor compared with the so called “antikeratin” antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann Rheum Dis* 1999;58:42-8.

Vogl T, Leukert N, Barczyk K, Strupat K, Roth J. Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763:1298-306.

Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007;13:1042–9.

Walsh RJ, Amato AA. Toxic myopathies. *Neurol Clin.* 2005;23:397-428.

Wang G, Rudland PS, White MR, Barraclough R. Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1. *J Biol Chem.* 2000;275:11141-6.

Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2662-72.

Wittkowski H, Foell D, af Klint E, De Rycke L, De Keyser F, Frosch M, Ulfgren AK, Roth J: Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007, 66:1020-5.

Wulffraat NM, Haas PJ, Frosch M, De Kleer IM, Vogl T, Brinkman DM, Quartier P, Roth J, Kuis W. Myeloid related protein 8 and 14 secretion reflects phagocyte activation and correlates with disease activity in juvenile idiopathic arthritis treated with autologous stem cell transplantation. *Ann Rheum Dis* 2003;62:236–41.

Yammani RR, Carlson CS, Bresnick AR, Loeser RF. Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2901-11.

Yammani RR, Long D, Loeser RF. Interleukin-7 stimulates secretion of S100A4 by activating the JAK/STAT signaling pathway in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009;60:792-800.

Yang Z, Tao T, Raftery MJ, Youssef P, Di Girolamo N, Geczy CL. Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol.* 2001;69:986-94.

Ye F, Foell D, Hirono KI, Vogl T, Rui C, Yu X, Watanabe S, Watanabe K, Uese K, Hashimoto I, Roth J, Ichida F, Miyawaki T. Neutrophil-derived S100A12 is profoundly upregulated in the early stage of acute Kawasaki disease. *Am J Cardiol.* 2004;94:840-4.

Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, Bresnihan B. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 1999;26:2523-8.

Zantos D, Zhang Y, Felson D. The overall and temporal association of cancer with polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol.* 1994;21:1855-1859.

Zibert JR, Skov L, Thyssen JP, Jacobsen GK, Grigorian M. Significance of the S100A4 protein in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130:150-60.

Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:783-9.

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ

### Publikace k tématu dizertační práce

#### S IF:

Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, Pleštilová L, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jul 26;13(4):R122.

Cerezo LA, Kuncová K, Mann H, Tomčík M, Zámečník J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Oct;50(10):1766-72

Ošlejšková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovský J, Pavelka K, Klingelhöfer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchý D, Šenolt L. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48:1590-4.

Oslejskova L, Grigorian M, Gay S, Neidhart M, Senolt L. The metastasis associated protein S100A4: a potential novel link to inflammation and consequent aggressive behavior of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2008, 67:1499-504.

#### Recenzované:

Ošlejšková L, Šenolt L. Význam S100A4 proteinu v patogenezi revmatoidní artritidy. *Čes. Revmatol* 2007;3:146-51.

#### Další publikace:

#### S IF:

Hulejová H, Andrés Cerezo L, Kuklová M, Pecha O, Vondráček T, Pavelka K, Vencovský J, Haluzík M, Senolt L. Novel adipokine fibroblast growth factor 21 is increased in rheumatoid arthritis. *Physiol Res*. 2012;6:489-94

Senolt L, Hulejova H, Krystufkova O, Forejtova S, Andres Cerezo L, Gatterova J, Pavelka K, Vencovsky J. Low circulating Dickkopf-1 and its link with severity of spinal involvement in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:71-4.

Filková M, Hulejová H, Kuncová K, Pleštilová L, Cerezo LA, Mann H, Klein M, Zámečník J, Gay S, Vencovský J, Senolt L. Resistin in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3):R111.

Senolt L, Kryštůfková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, 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;55:116-21.

Šenolt L, Kuklová M, Andrés Cerezo L, Hulejová H, Filková M, Bošanská L, Pecha O, Pavelka K, Haluzík M, Vencovský J. Adipokine profile is modulated in subcutaneous adipose tissue by TNF- alpha inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 May 27.

Senolt L, Kryštůfková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, 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;55:116-21.

Senolt L, Polanská M, Filková M, Cerezo LA, Pavelka K, Gay S, Haluzík M, Vencovsky J. Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1410-1.

### **Abstrakta**

B. Šumová, L.A. Cerezo, L. Pleštilová, O. Pecha, K. Jarošová, Š. Forejtová, O. Ruzicková, J. Závada, J. Gatterová, K. Pavelka, H. Mann, J. Vencovský, L. Šenolt. Higher levels of metastasis - inducing S100A4 protein levels are associated with less favourable treatment response to disease modifying antirheumatic drugs in female patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71(Suppl3):642.

L. Andrés Cerezo, H. Hulejová, Z. Vernerová, M. Kuklová, O. Pecha, V. Pešáková, K. Pavelka, J. Vencovský, L. Šenolt. Fatty acid-binding protein (FABP)-4 is increased in patients with rheumatoid arthritis and correlates with metabolic rather than with disease activity status (American College of Rheumatology 2011).

L. Šenolt, M. Filková, H. Hulejová, L. Andrés Cerezo, O. Pecha, L. Pleštilová, K. Jarošová, K. Pavelka, J. Vencovský, H. Mann. Decrease of serum IL-35 predicts clinical improvement in patients with very early RA (American College of Rheumatology 2011).

L. Andres Cerezo, L. Pleštilová, H. Mann, O. Pecha, K. Pavelka, J. Vencovský, L. Šenolt. Predictive role of S100 alarmins in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl3):688.

M. Filkova, C. Ospelt, S. Vettori, L. Šenolt, H. Mann, A. Filer, K. Raza, C. Buckley, L. Andrés Cerezo, C. Kolling, B.A. Michel, R.E. Gay, J. Vencovský, K. Pavelka, S. Gay, A. Jüngel. Early rheumatoid arthritis is characterized by the downregulation of the MIR-146A and MIR-155 compared to established disease. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl3):216.

M. Tomcik, K. Palumbo, P. Zerr, B.G. Fuernrohr, J. Avouac, A. Horn, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, L. Andres Cerezo, R. Becvar, O. Distler, M. Grigorian, L. Senolt, G. Schett, J.H. Distler. S100A4 mediates the profibrotic effects of TGF-beta in dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl3):492.

L. Šenolt, M. Kuklová, L. Bošanská, L. Andrés Cerezo, H. Hulejová, M. Filková, K. Pavelka, M. Haluzík, J. Vencovský. TNF blockade therapy modulates adipokine profile in subcutaneous adipose tissue of patients with inflammatory arthritides. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl3):531.

L. Šenolt, H. Hulejová, O. Kryštufková, M. Polanská, M. Filková, L.A. Cerezo, Š. Forejtová, K. Pavelka, S. Gay, J. Vencovský. Change of serum visfatin levels after rituximab treatment with patients with active rheumatoid arthritis may predict exacerbation of the disease. *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl3):501.

Filkova M, Hulejova H, Polanska M, Andres Cerezo L, Vencovsky J, Pavelka K, Gay S, Senolt L. Pro-inflammatory properties of IL-35 and its association with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*2010;62(10)Suppl.:266.

L. Andrés Cerezo, J. Vencovský, M. Grigorian, M. Neidhart, S. Gay, L. Šenolt. S100A4 stimulates human monocytes to express TNF-alpha via TLR-4 and activation of NFkB. *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl3):663.

L. Šenolt, H. Hulejová, O. Kryštufková, M. Polanská, M. Filková, L.A. Cerezo, Š. Forejtová, K. Pavelka, S. Gay, J. Vencovský. Change of serum visfatin levels after rituximab treatment in patients with active rheumatoid arthritis may predict exacerbation of the disease. *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl3):501.

L. Ošlejšková, K. Kuncová, H. Hulejová, H. Mann, J. Zámečník, M. Neidhart, S. Gay, E. Lukanidin, M. Grigorian, J. Vencovský, L. Šenolt. S100A4 – A novel regulator of inflammation in poly/dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl3):467.

Polanska M, Tomcik M, Oslejskova L, Filkova M, Gay S, Haluzik M, Senolt L. The role of adipocyte fatty-acid binding protein AP2 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl3):364.

Ošlejšková L, Polanská M, Šenolt L. Význam proteinu S100A4 v patogenezi autoimunitních onemocnění (52. Sjezd českých a slovenských revmatologů, 2009).

L. Ošlejšková, K. Kuncová, H. Hulejová, H. Mann, J. Zámečník, M. Neidhart, S. Gay, E. Lukanidin, M. Grigorian, J. Vencovský, L. Šenolt. Metastasis inducing protein S100A4 is up-regulated in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl II):111.

L. Šenolt, L. Ošlejšková, H. Hulejová, M. Neidhart, S. Gay, H. Brabcová, D. Suchý, E. Lukanidin, M. Grigorian. Divergent modulation of S100 proteins in rheumatoid arthritis patients treated with the antiTNF-alpha inhibitor adalimumab. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl II):456.

Šenolt L, Klingelhöfer J, Ošlejšková L, Baslund B, Nielsen G, Pavelka K, Neidhart M, Ambartsumian N, Hansen B, Lukanidin E, Gay S, Grigorian M. Increased metastasis-promoting S100A4 (MTS1) in rheumatoid arthritis can modulate apoptosis. *Ann Rheum Dis* 2007;66 (Suppl. II):298.

Šenolt L, Filková M, Hulejová H, Ošlejšková L, Braun M, Haluzík M, Pavelka K. Adiponectin and resistin serum levels in patients with erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *OARSI (World Congress on Osteoarthritis)*, 2007.

Šenolt L, Hulejová H, Ošlejšková L, Braun M, Haluzík M, Pavelka K. Adiponectin and resistin serum levels in patients with erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15 (Suppl.C):C77.

Ošlejšková L, Šenolt L. The role of S100 proteins in pathogenesis of rheumatoid arthritis and in monitoring of disease activity. *Rheumatologia* 2007;3:156.

## 9 PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych velmi ráda poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, PhD., za skvělé vedení, pomoc při postgraduálním studiu a profesním růstu. Dále mé díky patří Prof. Jiřímu Vencovskému, DrSc., a Prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., řediteli Revmatologického ústavu v Praze, za podporu a umožnění zahraničního studijního pobytu v Institute of Cancer Biology v Kodani. V souvislosti s tím bych ráda poděkovala i Prof. Eugene Lukanidinovi, Mariam Grigorian, MD, PhD. a Jörgovi Klingelhöferovi, MD, PhD. z Institute of Cancer Biology v Kodani za rozšíření mého obzoru v oblasti studia S100A4 proteinu a zasvěcení do nových laboratorních metod. Děkuji všem kolegům a spoluautorům v Revmatologickém ústavu v Praze, především Mgr. Markétě Kuklové, Ing. Haně Hulejové, MUDr. Michalu Tomčíkovi, MUDr. Márii Filkové, PhD. a MUDr. Lence Pleštilové a na všech partnerských pracovištích za pomoc a spolupráci při řešení projektů. Řešení projektů ze kterých vychází disertační práce by se neobešlo bez finanční podpory následujících institucí: Výzkumné záměry MZČR (00023728), grant IGA MZČR (NT 13698-4), grant GAUK (323011), PRVOUK a SVV (264 511).

## 10 PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu disertační práce.

### Seznam příloh

1. Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, Pleštilová L, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jul 26;13(4):R122.
2. Cerezo LA, Kuncová K, Mann H, Tomčík M, Zámecník J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:1766-72.
3. Ošlejšková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovský J, Pavelka K, Klingelhöfer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchý D, Šenolt L. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48:1590-4.
4. Oslejskova L, Grigorian M, Gay S, Neidhart M, Senolt L. The metastasis associated protein S100A4: a potential novel link to inflammation and consequent aggressive behavior of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2008, 67:1499-504.