

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



Genetické, humorální a buněčné faktory rozvoje autoimunitních chorob

Doktorská disertační práce

Praha, září 2010

Autor: RNDr. Šárka Růžičková

Školitel: doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

3. LF UK, Praha

Doktorskou práci jsem vypracovala na Revmatologickém ústavu v Praze, kde jsem pracovala pod vedením **prof. MUDr. Jiřího Vencovského, DrSc.** a z části v Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité University Hospital v Berlíně, kde jsem pracovala pod vedením **prof. Thomase Dörnera, MD, PhD.**

Poděkování:

Děkuji školitelce Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za výjimečnou podporu, vstřícnost a pomoc, kterou mi poskytla v době závěrečných úprav disertační práce a ukončení postgraduálního studia.

Děkuji profesoru Jiřímu Vencovskému za péči, rady, diskuse a konzultace během našich vědeckých hovorů: Zvláště pak děkuji za zprostředkování pobytu v renomovaných zahraničních pracovištích a odborných kontaktů s mnoha významnými revmatology a imunology.

Dále děkuji bývalým i současným spolupracovníkům týmu, jmenovitě Zdenkovi Cimburkovi, Zuzaně Hůzlové, Ireně Veselé, Mgr. Jiřině Kinkorové, CSc. a Mgr. Jarmile Mouchové, kteří kromě excelentního zajišťování chodu laboratoře a pomoci s experimenty mi byli vždy připraveni poskytnout morální a lidskou podporu především v dobách, kdy se nedařilo jak v pracovním tak v osobním životě.

V této souvislosti nemohu opomenout pana profesora Ivana Rašku, který nikdy neodmítl žádost o rozhovor v jakékoli věci, vždy mi byl sice přísným ale příkladným „korektorem“ v oblasti přístupu k vědeckým metodám.

Nemalou měrou přispěl k mému odbornému zrání pobyt v Berlíně v laboratoři Thomase Dörnera, který mne uvedl do „světa B lymfocytů“ a rovněž přispěl k bezproblémovosti mého života v Německu.

Na závěr chci vyjádřit velký dík všem členům mé rodiny a všem mým nejbližším především za velkou trpělivost, kterou se mnou vždy měli.

Věnováno mému otci Robertu Růžičkovi, jenž svůj boj se životem i se smrtí jednou pro vždy ztratil.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto doktorskou disertační práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a uvádím všechny použité zdroje.

Prohlašuji, že jsem práci ani její podstatnou část nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Obsah:

	Strana
Přehled o současném stavu problematiky.....	6
<i>Úvod.....</i>	<i>6</i>
<i>Autoimunitní choroby a genetické faktory.....</i>	<i>6</i>
<i>Autoprotilátky, autoantigeny a jejich využití.....</i>	<i>13</i>
<i>Role B lymfocytů v rozvoji autoimunitních chorob.....</i>	<i>17</i>
<i>Literatura.....</i>	<i>21</i>
Hypotézy.....	31
Cíle práce.....	32
Teze práce.....	33
Závěr.....	46
Seznam příloh.....	49

Přehled o současném stavu problematiky:

Úvod:

Jednou z fyziologických funkcí imunitního systému v rámci udržování homeostáze je schopnost rozpoznávat antigeny vlastních tkání a buněk. Během tohoto procesu jsou staré, apoptotické, poškozené nebo jinak pozměněné buňky identifikovány a eliminovány z organismu. Pokud však imunitní odpověď vede k poškození vlastních buněk, dojde k rozvoji autoimunitní reakce a následně autoimunitní nemoci.

Podle Wittebského kritérií lze chorobu klasifikovat jako autoimunitní, je-li charakterizován autoantigen a lze-li autoimunitní reakci reprodukovat *in vitro* nebo přenosem autoprotilátek, případně autoreaktivních buněk na experimentální zvíře (Wittebsky et al. 1957).

Autoimunitní reakce se dělí do dvou hlavních skupin, humorální nebo buňkami zprostředkované. Předmětem této práce jsou autoimunitní reakce a choroby prvního typu. Jejich základním rysem je, že v organismu dochází k tvorbě patologických autoprotilátek (nejčastěji izotypu IgG). Ty se na poškození buněk a tkání podílejí zejména cytotoxickými mechanismy nebo tvorbou a ukládáním imunokomplexů. Autoimunitní nemoci jsou vždy spojeny s indukcí a propagací zánětu, což je jejich další hlavní charakteristika.

Etiopatogeneze těchto nemocí není přesně známa, ale výsledky mnoha studií včetně těch zahrnutých do této práce potvrzují, že kromě humorálních, buněčných a environmentálních faktorů se na jejich vzniku podílí faktory genetické.

Existuje celá řada autoimunitních chorob, ale budou zmíněny jen ty přímo relevantní k zaměření a cílům předkládané disertační práce, konkrétně juvenilní idiopatická artritida, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses, Sjögrenův syndrom a choroba chladových aglutininů.

Autoimunitní choroby a genetické faktory:

Juvenilní idiopatická artritida (JIA), dříve známá jako juvenilní revmatoidní artritida (JRA) nebo juvenilní chronická artritida (JCA) představuje nejčastější dětské revmatické onemocnění a je jednou z nejrozšířenějších chronických chorob u dětí (Cassidy a Nelson 1988). Jedná se o komplexní systémovou autoimunitní chorobu

neznámé etiopatogeneze začínající před 16. rokem života, s incidencí v západních zemích 10-20/100 000 v dětské populaci a prevalencí 1/1000 (Glass a Giannini 1999, Runstaler et al. 2003). Onemocnění je z hlediska klinických projevů velmi heterogenní a lze je rozdělit do následujících skupin: systémová forma, seronegativní a seropozitivní polyartritida (tj. revmatoidní faktor, RF- a +), persistující a rozšířená oligoartritida, artritida s entesitidou a psoriatická artritida (Petty et al. 1998).

Ačkoliv příčiny vzniku a vývoje žádné z forem JIA nejsou přesně známy, epidemiologické studie vedly k závěru, že kromě vlivů prostředí se zde uplatňuje vliv predisponujících genetických faktorů. Nejprve byla identifikována asociace mezi určitými typy JIA a DR, DQ a DP alelami genů pro leukocytární antigeny II. třídy (HLA II), např. DR5 (Schreuder et al. 1997), DR8 a DP3 se seronegativní polyartikulární JIA nebo DR4 se seropozitivní polyartikulární JIA (Howard et al. 1985, Thomas et al. 2000). Nicméně asociace s HLA II alelami nejsou dostatečně zodpovědné za celé genetické pozadí JIA.

Byla tedy navržena hypotéza tzv. dvousložkového procesu, kdy k rozvoji choroby je nutný příspěvek ještě jiných genů tak, že určité geny pravděpodobně predisponují k rozvoji autoimunitního stavu obecně (např. HLA II geny), zatímco na vzniku individuálních forem JIA se podílejí další non-HLA geny již specificky (Glass a Giannini 1999). K takovým genům by mohl patřit gen IL-1RN (gen pro IL-1RA, interleukin-1 receptorový antagonist) lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu č. 2 (2q12-22), který kóduje protein kompetující s IL-1 o vazebné místo na IL-1 receptoru (Nicklin et al. 1994, Schreuder et al. 1997). Zájem genetiků o tento gen byl zvýšen, když subkutánní podání rekombinantního lidského rekombinačního IL-1RA proteinu pacientům s RA vedlo k jednoznačnému zlepšení klinického stavu a vyřazení genu z funkce u myši vedlo ke spontánnímu rozvoji zánětlivé artritidy s klinickými rysy lidské revmatoidní artritidy (Bresnihan et al. 1998, Schiff 2000, Horai et al. 2000).

Ve druhém intronu IL-1RA genu se nachází polymorfní oblast obsahující 86-bp variabilní tandemovou repetici (VNTR) vyskytující se v 5 alelických variantách (Tarlow et al. 1993). Alela 2 (IL-1RN*2) obsahující dvě repetice se vyskytovala ve zvýšených frekvencích u různých autoimunitních chorob jako je systémový lupus erytematoses, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, psoriáza nebo vnímavost k závažné sepsi (Blakemore et al. 1994, Perrier et al. 1998, Tarlow et al. 1997, Fang

et al. 1999). U juvenilní dermatomyozitidy byla naopak prokázána asociace s alelou IL-1RN*1 se čtyřmi tandemovými repeticemi (Danis et al. 1995).

Funkční význam nosičství alely IL-1RN*2 není znám, avšak u normálních dárců byla v případě přítomnosti této alely objevena zvýšená sekrece IL1RA a redukovaná produkce IL-1 α (Danis et al. 1995). Je také možné, že vyšší frekvence IL-1RN*2 alely je dána vazbou na jiný gen, neboť byla nalezena asociace mezi zvýšenou frekvencí IL-1 β +3953 alely IL-1RN*1 a alely IL-1 β -511 s vyšší produkcí IL-1 β monocyty in vitro mezi nositeli IL-1RN*2 alely (Santilla et al. 1998). V jiné studii byl však zjištěn pokles hladiny IL-1RA proteinu v monocyttech pacientů s ulcerativní kolitidou a kontrol nesoucích IL-1RN*2 alelu (Tountas et al. 1999). Přes různorodost publikovaných nálezů je pravděpodobné, že udržování rovnováhy mezi prozánětlivým IL-1 a protizánětlivým IL-1RA je důležité pro rozvoj a propagaci zánětu (systémově i lokálně) a že alespoň u některých nemocí jako je JIA by přítomnost IL-1RN*2 alely mohla v patogenezi hrát klíčovou roli.

Revmatoidní artritida (RA) je chronické systémové autoimunitní onemocnění postihující až 1% světové populace a vyskytující se 2,5x častěji u žen než u mužů (Lawrence et al. 1998). Onemocnění je charakterizováno symetrickým zánětem malých a velkých kloubů, proliferací synoviální membrány a následnou kloubní destrukcí (Zvaifler 1973).

Právě u pacientů s RA byly podány první důkazy o genetické predispozici autoimunitních chorob. Epidemiologické analýzy výskytu RA u dvojčat ukázaly, že konkordance pro RA je 15-30% u jednovaječných dvojčat a pouze 5-7% u dvouvaječných (Wordsworth a Bell 1992). To znamená, že predispozice je polygenní, ale počet genů zodpovědných za vznik choroby nebude velký. Jako první byla potvrzena asociace RA a genů pro hlavní histokompatibilní systém, přesněji druhou třídu lidských leukocytárních antigenů (HLA II, Stastny 1978).

Pro pacienty kavkazské populace (obyvatelstvo evropského původu) jde především o HLA-DR1 a HLA-DR4, pro jiné etnické skupiny také o další antigeny. Až 70% pacientů je HLA DR4 pozitivní, zatímco u zdravé populace je frekvence 20-25% (Dostál et al. 1981). Alely DRB1*0101, DRB1*0401 a DRB1*0404 jsou charakteristické pro kavkazskou populaci, alely DRB1*1402 a HLA-Dw16 pro některé americké Indiány, alela DRB1*0405 pro japonskou populaci. V kavkazské populaci jsou s RA asociovány alely DRB1*0101, DRB1*0404 a DRB1*0401,

příčemž zejména posledně jmenovaná alela předznamenává závažnější prognózu onemocnění (Weyand et al. 1992). Hlavní roli v patogenezi RA hraje tzv. sdílený epitop (shared epitope, SE), který se vyskytuje u všech asociovaných alel. Jde o sekvenci 5 aminokyselin ve třetí hypervariabilní oblasti β řetězce vazebného žlábků pro peptid v pozici 70-74 (Gln-Arg/Lys-Arg-Ala-Ala) (Gregersen et al. 1987; Weyand et al. 1992, viz tabulka). Přítomnost SE epitopu je spojena se závažnějším průběhem choroby, zejména je-li SE v homozygotní formě (efekt genové dávky, Weyand et al. 1992). Alely asociované s RA tvoří oproti neasociovaným alelám relativně nestabilní DR-CLIP komplexy (komplex zabraňující navázání vlastních peptidů na MHC II molekulu), což potenciálně vede k prezentaci autoantigenů, následnému prolomení autotolerance a vzniku autoreaktivních klonů (Patil et al. 2001). Pro úlohu HLA genů svědčí také přítomnost IgG4 autoprotilátek (zatímco izotypy IgG2 a IgG3 se vyskytují pouze velmi vzácně), které jsou charakteristické pro imunitní odpověď závislou na T lymfocytech a prezentaci antigenů pomocí HLA II molekul (Engelmann et al. 2008).

<i>Alela HLA DRB1</i>	<i>Aminokyselinová sekvence (70-74)</i>	<i>Asociace s RA</i>
*0101	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
*0401	Gln-Lys-Arg-Ala-Ala	+
*0402	Asp-Glu-Arg-Ala-Ala	-
*0403	Gln-Arg-Arg-Ala-Glu	-
*0404	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
*0405	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
*0408	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
Dw16	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
*1001	Arg-Arg-Arg-Ala-Ala	-
*1402	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+

U neasociovaných alel jsou odlišné aminokyseliny označeny červeně.

Asociace HLA DR alel s RA není absolutní, na základě studií rodin s výskytem RA byl vypočítán pouze 37% podíl HLA DR alel na vnímavosti k RA (Deighton et al. 1989).

To je v souladu s výsledky ze studií na dvojčatech a předpokladem účasti dalších non-HLA genů v patogenezi RA.

Takovými geny jsou imunoglobulinové geny, byla ukázána korelace některých polymorfismů v konstantní oblasti kappa řetězců s vnímavostí k RA nebo delece genu Humh3005 byla přítomna u 24% pacientů s RA oproti 2% kontrol (Moxley 1992, Yang et al. 1990, Olee et al. 1991).

Dalšími potenciálními kandidáty jsou polymorfismy v genech pro cytokiny a další proteiny, jako je TNF α - hlavní prozánětlivý cytokin a mediátor zánětu (Vassali 1992). V promotoru tohoto genu byly popsány G/A záměny v pozicích -308 a -238 (Wilson et al. 1997, Kaijzel et al. 1998). Byla zjištěna korelace mezi stupněm destrukce kloubů a genotypem -238GG a alela -238A byla v nerovnováze s G/A polymorfním místem v pozici -308 (Kaijzel et al. 1998). Alela -308A (TNF2) je součástí extendovaného haplotypu HLA A1-B8-DR3-DQ2, což patrně souvisí s lokalizací TNF α genu v tzv HLA oblasti krátkého raménka chromosomu č. 6 (Wilson et al. 1997). Pomocí transfekce uvedeného haplotypu do lidské B-buněčné linie Raji bylo prokázáno, že konstrukt s TNF2 alelou mnohem účinněji aktivoval transkripci než v přítomnosti -308G alely (TNF1, Wilson et al. 1997).

Cytokin IL-10 má důležité místo v regulaci buněčné a humorální imunity, neboť inhibuje produkci TNF α , IL-1, IL-6, expresi HLA II molekul a tím blokuje Th1 odpověď aktivaci a funkci monocytů/makrofágů (Isomaki et al. 1996). Tento cytokin stimuluje naivní a aktivované B lymfocyty k terminální diferenciaci a produkci IgG a IgA (Defrance et al. 1992). IL-10 považován za protizánětlivý cytokin a suprese jeho produkce v kultuře synoviálních buněk vedla ke zvýšení hladin TNF α a IL-1 (Katsikis et al. 1994).

V genu pro IL-10 byly popsány tři dimorfní polymorfismy v promotorové oblasti ovlivňující produkci IL-10 (Turner et al. 1997). Alela -1082A je asociovaná s nižší produkcí IL-10 in vitro, kdežto alela -1082G s vyšší produkcí. Z tohoto hlediska není role IL-10 v rozvoji RA známa a jeho příspěvek bude pravděpodobně závislý na hladině produkce (lokálně i v periferně) dané konkrétním genotypem (Turner et al. 1997).

Systémový lupus erythematosus (SLE) je systémové autoimunitní onemocnění s roční incidencí přibližně 10/100 000 obyvatel (Hanly 2005). Také tato choroba je

z hlediska klinických projevů heterogenní a pacienti se dělí do skupin s postižením ledvin, srdce, plic, kloubů, kůže a s neuropsychiatrickou formou choroby (Hochberg 1997). Jednou z nejzávažnějších komplikací je právě postižení CNS, k němuž dochází u 60-70% všech nemocných s SLE (Hanly 2005). Projevuje se neurologicky (křeče, poruchy motoriky, bolesti hlavy a neuropatie) a psychiatricky (psychózy, psychoneuróza, deprese a neurokognitivní dysfunkce), přičemž projevy jsou smíšené. Proto je tato choroba označována jako neuropsychiatrické SLE (NP-SLE). Pro pacienty vždy znamená významné snížení kvality života od pracovní neschopnosti přes trvalou hospitalizaci v psychiatrických zařízeních až po úmrtí (Hanly 2005). Nebezpečí NP-SLE spočívá zejména v tom, že se objevuje velmi časně během rozvoje SLE (během 2,5 roku), rozvíjí se nepozorovaně, rychle progreduje, symptomy jsou ireverzibilní a dochází k atrofiím v neuronální tkáni (Appenzeller 2005, Fragoso-Loyo a Sanchez-Guerrero 2007, Hanly et al. 2007, 2009). Patogeneze této choroby souvisí s defektem v odstraňování apoptotických buněk a je spojená se zvýšenou produkcí IFN α monocyty/dendritickými buňkami a poprvé pozorované již před 30 lety (Hooks et al. 1979), Tato produkce je pravděpodobně indukovaná tvorbou imunokomplexů anti-ds-DNA autoprotilátek a ds-DNA (Valin et al. 1999).

Genetická podstata vzniku SLE je nejasná, a tak jako u pacientů s RA genetické studie v rodinách s SLE mají potomci až 20x vyšší riziko onemocnění (Nath et al. 2004, Croker a Kimberley 2005). V rodinách s NP-SLE pozorován zvýšený výskyt této formy nemoci u jejich potomků (Steup-Beekman et al. 2007). Pro význam genetické predispozice k SLE svědčí také studie na jednovaječných dvojčatech, u nichž je desetinásobně vyšší konkordance ve srovnání s dvouvaječnými dvojčaty (Rhodes a Vyse 2008).

Tak jako u RA je vnímavost k SLE podmíněna přítomností HLA alel I. a II. třídy - v tomto případě HLA-B8 a HLA-DR3 a DR4 (Harley et al. 1989). Zatímco pacienti s HLA-B8 a HLA-DR3 byli pozitivní na anti-La/SS-B autoprotilátky, nositelé HLA-DR4 byli pozitivní na autoprotilátky anti-RNP. Byla prokázána korelace s některými polymorfismy v genu pro TNF α a vnímavostí k SLE u italských pacientů s touto chorobou (D'Alfonso et al. 1996).

Recentně byla prokázána zvýšená exprese a alternativní sestřih genu pro interferon regulující faktor 5 (IRF5) u pacientů se SLE oproti kontrolám. Byl identifikován tzv. rizikový haplotyp definovaný přítomností T alely v lokusu rs2004640, A alely v SNP

rs 10954213, C alely v lokusu rs10488631 a CGGGG inserce/delece. Pacienti s tímto haplotypem vykazovali kvantitativně vyšší hladiny IRF5 transkripce a translace v buňkách periferní krve (Feng et al. 2010).

Podobně byl v genu pro interferon regulující faktor 7 (IRF7) identifikován v lokusu rs702966 C/T dimorfismus, kdy CC genotyp byl asociován s vyššími hladinami interferonu alfa (IFNa) a přítomností anti-ds-DNA autoprotilátek u Američanů s SLE evropského a hispánského původu. U pacientů afrického původu byl s vyššími hladinami IFNa asociován CT a TT genotyp v lokusu rs4963128 s vyššími titry antiSm-autoprotilátek (Salloum et al. 2010).

Sjögrenův syndrom (SjS) je autoimunitní exokrinopatie charakterizovaná lymfocytárním zánětem slzných a slinných žláz, které podléhají destrukci (Fox et al. 2000, Xanthou et al. 1999). Postižené žlázy jsou infiltrovány CD45RO⁺CD4⁺ T lymfocyty a B lymfocyty, které jsou aktivované a mají vysokou proliferační schopnost (Stott et al. 1998, Bodeutsch et al. 1998, Bahler a Swerdlow 1998). Z hlediska imunopatogenetického je SjS méně prozkoumán ve srovnání s JIA, RA nebo SLE a tak jedna z mála popsaných genetických asociací je významně zvýšená frekvence IL-1RN*2 alely u pacientů s tímto onemocněním oproti zdravým kontrolám (Perrier et al. 1998).

Choroba chladových aglutininů (cold agglutinin disease, CAD) byla poprvé popsána v 60. letech minulého století (Schuboth 1966). Jejím hlavním projevem je hemolýza erytrocytů, která nastává při teplotách pod 37°C a je provázena modráním až nekrózou) marginálních částí lidského těla (nos, uši a prsty u nohou; Ulvestad et al. 1998, 1999). V séru pacientů jsou přítomny tzv. chladové aglutininy (CA), což jsou autoprotilátky nejčastěji izotypu IgMκ vyskytující se ve formě paraproteinu (Ulvestad et al. 1999, Thorpe 1997, Potter 2000). CA reagují s tzv. I-antigenem na povrchu vlastních erytrocytů (Ulvestad et al. 1998, 1999; Potter 2000). Bylo prokázáno, že variabilní oblast těžkého imunoglobulinového řetězce chladových aglutininů s anti-I aktivitou je kódována VH4-34 (VH4.21) genovým segmentem (Pascual et al. 1992, Jefferies et al. 1993, Thorpe et al. 1997). Výskyt CAD bývá často popisován u pacientů s B buněčnou chronickou leukémií (B-CLL) a není jasné, zda se B-CLL nemůže v některých případech vyvinout z CAD obecně považovaného za pomalu proliferující lymfom (Mauro et al. 2000). Genetické pozadí této choroby stejně jako

asociace s přítomností HLA alel nebylo dosud systematicky studováno, zřejmě díky vzácnosti tohoto onemocnění.

Obecně platí, že jak se rozšiřují naše znalosti především díky různým expresním studiím založených na použití cDNA nebo SNP čipů, přibývá také proteinů a jim odpovídajících genů s potencionálním významem v imunopatogenezi autoimunitních chorob. Často tyto geny kódují kinázy, transkripční faktory nebo jiné signální molekuly jako např. STAT4, PTPN22, BANK1, BLK, IRF5 a IRF7 (Gregersen a Olsson 2009; Imboden 2009).

Autoprotilátky, autoantigeny a jejich využití:

Role autoprotilátek je u autoimunitních chorob obecně nejasná. Protože ale přibývá důkazů asociací jejich hladin, typu nebo přítomnosti s klinickým průběhem nemoci, je pravděpodobný jejich podíl na vzniku a rozvoji choroby.

Prototypem autoprotilátek jsou revmatoidní faktory (RF), které jsou namířeny proti Fc části vlastních IgG a poprvé byl jejich objev publikován již v roce 1940 (Waalers 1940). Objeveny byly náhodně při komplement fixačním testu na syfilis u pacientky s RA. Později se ukázalo, že RF nejsou specifické jen pro RA, ale lze je nalézt v sérech pacientů s SjS, SLE, chronickými infekčními nemocemi (TBC, syfilis, lepra, bakteriální endokarditida, chřipka infekční mononukleóza, hepatitida, AIDS) nebo po vakcinaci (Symmons et al. 1993). Rovněž se nacházejí u zdravých jedinců, kde se předpokládá jejich fyziologická úloha v odstraňování IgG pravděpodobně vázaného v imunokomplexech, u osob starších 60-ti let hladina RF stoupá (Soltys et al. 1997). Zatímco u zdravých jedinců se RF vyskytují v nízkých hladinách a jsou převážně izotypu IgM s nízkou afinitou, u nemocných s RA jsou vysokoafinitní a převažuje izotyp IgG ve vysokých titrech (Soltys et al. 1997).

Mechanismus patologické funkce RF není znám a přenos RF ze zdravých dárců na zdravé osoby nevyvolá žádné známky RA (Symmons et al. 1993, Soltys et al. 1997). To znamená, že RF u autoimunitních chorob mají pravděpodobně jiné vlastnosti (vyšší stupeň glykosylace, vyšší afinita) anebo je nějak pozměněna jejich schopnost prezentovat IgG v imunokomplexech T lymfocytům, zvláště pak lokálně v zánětlivém kloubu, neboť B lymfocyty představují jeden z typů antigen prezentujících buněk (APB; Carson et al. 1991, Roosnek a Lanzavecchia 1991). Další možností je, že

nadprodukce RF zejména izotypu IgG vede k tomu, že se samotné RF, respektive jejich Fc část stávají antigenem vázaným Fab částí jiné RF molekuly a tak v kloubu vznikají velké imunokomplexy složené z IgG RF (Natvig et al. 1975). Bylo jednoznačně prokázáno, že u RA vysoké hladiny IgG RF v séru korelují se závažnějším průběhem nemoci a mimokloubním postižením organismu (Vollertsen a Conn 1990).

U RA byla popsána řada dalších autoprotilátek: anti-keratinové (AKA), anti-perinukleární faktory (APF), anti-RA33, anti-SA a anti-kalpastatinové protilátky, protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP; Youinou et al. 1985, Vincent et al. 1989, Janssens et al. 1988, Hassfeld et al. 1993, Haven et al. 1999, Mimori et al. 1995, Schellekens et al. 2000). Bylo prokázáno, že cílový autoantigen je pro anti-CCP, AKA a APF tentýž a že se jedná o acidickou nebo neutrální isoformu filagrinu. Filagrin (filament-aggregating protein) je produkován během pozdních stádií epidermální diferenciace u savců ve formě prekurzorového profilagrinu proteolyticky štěpeného na filagrin a celý proces je doprovázen defosforylací a zejména posttranslační citrulinací (McKinley et al. 1989, Girbal-Neuhauser et al. 1999). Citrulinace je prováděna deiminací argininu enzymem peptidylarginin deiminázou, přičemž tento proces byl úspěšně napodoben in vitro na lidském rekombinantním filagrinu (Girbal-Neuhauser et al. 1999, Vossenaar et al. 2004). Přítomnost citrulinu byla prokázána také na vimentinu v Sa systému, kolagenu II, α -enoláze, histonech a Ca^{2+} vazebném proteinu S100A3 (Menard et al. 2000, Schellekens et al. 2000, Vossenaar et al. 2003a, 2003b; Kinloch et al. 2005, Burkhardt et al. 2005, Kizawa et al. 2008, Van Steendam et al. 2010). Citrulin je biochemikům znám již od roku 1930 (Wada 1930), ale teprve o mnoho desítek let později rozpoznání jeho důležitosti v klinické revmatologii vedlo ke znovuobjevení této aminokyseliny a docenění významu jejího nálezu.

Postupně byly vytipovány antigenní determinanty s citrulinem na lidském filagrinu a podle nich syntetizovány lineární nebo cyklické oligopeptidy v délce 13-18 aminokyselin s 1-2 citruliny. Ty pak byly použity v komerčním ELISA kitu ke stanovení sérových aCCP v séru (Schellekens 1998, 2000). V současné době používaný ELISA kit Mark2 obsahuje sadu cyklických oligopeptidů, jejichž sekvence byly softwarově vytvořeny a neodpovídají žádné dosud známé proteinové sekvenci přirozeně se vyskytující v lidském organismu (Van Venrooij et al. 2002).

Přítomnost AKA nebo APF byla asociována s rychlou progresí nebo závažnějším průběhem nemoci (Meyer et al. 1997, Munoz-Fernandez et al. 1999). Podobné asociace byly poté prokázány také pro anti-CCP protilátky, zvláště v časných stádiích RA (van Jaarsveld 1999, Schellekens et al. 2000, Kroot et al. 2000, Visser et al. 2002). Protilátky AKA, APF a anti-CCP jsou v séru přítomny mnoho let před objevením se prvních příznaků choroby (Kurki et al. 1992, Berthelot et al. 1997, Rantapää-Dahlquist et al. 2003). Séra pacientů s RA vykazují značnou variabilitu v reaktivitě s různými variantami peptidů obsahujících citrulin, což znamená, že pro antigenicitu epitopu jsou důležité kromě citrulinu samotného také přilehlé aminokyseliny a že protilátková odpověď je tedy spíše polyklonální (Schellekens et al. 1998).

Kombinace IgM nebo IgA RF s anti-CCP se stala velmi používanou a slouží jako prediktivní marker pro erozivní formu časně RA (Schellekens et al. 2000, Van Gaalen et al. 2004).

Pro SLE jsou charakteristické anti-dsDNA (proti dvoušroubovicové DNA) a antinukleosomální autoprottilátky, které je možno v séru pacientů detekovat až 10 let před začátkem nemoci (Isenberg a Rahman 2006). Navíc tyto autoprottilátky korelují s výskytem nefritidy a částečně s NP-SLE (Shoenfeld et al. 2009). Pro SjS jsou typické autoprottilátky proti Ro/SS-A nebo La/SS-B a RF, které se vyskytují také u pacientů s SLE (Fox et al. 2000, Isenberg a Rahman 2006).

Přítomnost autoprottilátek byla zaznamenána také u jiných patologických stavů, např. při virovém nebo rakovinném onemocnění a dále chorobách vyvolaných expozicí agens pracovního a životního prostředí nebo kontaminované potravě (Haustein a Ziegler 1985).

V sérech pacientů s infekční mononukleózou nebo hepatitidou C lze detekovat autoprottilátky proti komplexům mRNA a snRNP (malé jaderné ribonukleoproteiny; Eystathioy et al. 2002a, Strassbourg et al. 2003). U pacientů s karcinomy jater a slinivky se vyskytují autoprottilátky antinukleární, proti mRNA-vazebným proteinům (p62, Koc), proti proteinům Golgiho aparátu nebo kalciretikulinu (Imai et al. 1993, Tan 2001, Zhang et al. 2001, Mozo L et al. 2002, Hong et al 2004).

Expozice uhelnému prachu u horníků nebo konzumace řepkového oleje s anilínem vedly k produkci autoprottilátek antinukleárních nebo proti proteinům akutní fáze

(CRP, α 1-antitrypsin a fibrinogen; Rom et al. 1983, Bell et al. 1995). U myšího modelu řepkový olej s anilínem nebo rtuť navíc indukovaly expresi IL-1 β , IL-6, aktivaci B buněk a změny v poměru CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů (Bell et al. 1992, Hultman et al. 1995). Autoprotilátky proti antigenům lokalizovaným v místech aktivní transkripce (nascentní RNA, aktivní fosforylovaná forma RNA polymerázy II, 20S proteasomy a acetylovaný histon 4) se objevily po podání platiny (Chen et al. 2002).

Ačkoli jsou autoprottilátky z hlediska patogeneze uvedených chorob vnímány spíše negativně, ve vědeckém výzkumu sehrály neočekávanou pozitivní roli. Ukázalo se totiž, že mohou sloužit k poznání funkce molekul nebo objevení nových struktur na buněčné a sub-buněčné úrovni (Pollard 2005).

V roce 1979 bylo sérum pacientů se SLE poprvé v historii použito k identifikaci 6 U snRNA molekul (uridilované malé jaderné RNA, U1A, U1B, U2, U4, U5 a U6; Lerner a Steitz 1979). Později byla definována jejich kritická funkce v sestřihu prekurzorové mRNA (pre-mRNA), která byla pomocí sér pacientů in vitro úplně blokována (Lerner et al. 1980, Faig a Lutz 2003). Séra pacientů s myositidou napomohla zjištění, že se histidyl-tRNA syntetáza nachází v lidském organismu ve dvou formách lišících se resistencí ke štěpení granzymem B, přičemž resistantní forma byla v plicní tkáni v nadbytku (Levine et al. 2007). V cytoplazmě pak byla objevena organela nového typu, tzv. GW tělísko, které nekolokalizuje s Golgiho aparátem, obsahuje mRNA vazebný protein GW182 protein a hraje pravděpodobně roli v degradaci mRNA (Eystathioy et al. 2002b, Stinton 2004).

Využití autoprottilátek k identifikaci molekul nebo určení jejich funkce se stalo základem nového technologického směru v molekulární a buněčné biologii.

Pro autoimunitní choroby je charakteristické, že se imunitní systém prostřednictvím humorální a buněčné aktivity zaměřuje na vlastní antigeny (autoantigeny, autoAg) exprimované ve vlastních tkáních a buňkách.

Množství popsaných buněčných nebo tkáňových autoAg se každoročně zvyšuje a u řady nemocí jako je RA, JIA, SLE, SjS, Scl a DM/PM je v organismu současně přítomno více typů autoprottilátek specifických proti více typům vlastních antigenů. K nejznámějším patří dsDNA, nukleozomy, ribonukleoproteiny spliceosomu,

topoizomeráza I, proteiny centromery, aminoacyl-tRNA syntetázy (Koffer et al. 1971, Rosa et al. 1983, Mathews et al. 1983, Stollar a Schwartz 1986, Earnshaw et al. 1986, Shero et al. 1986, Reichlin a Harley 1988, Harris et al., 2003, Rosen a Casciola-Rosen 2010). U choroby chladových aglutininů se autoprotilátky vyskytují ve formě paraproteínu a naopak rozeznávají jediný autoAg, v tomto případě I-protein na vlastních erytrocytech (Pascual et al. 1992, Jefferies et al. 1993, Ulvestad et al. 1999, Berentsen et al. 2007).

Význam autoAg spočívá v jejich prezentaci antigen prezentujícími buňkami (APB) CD4⁺ T lymfocytům prostřednictvím HLA II molekul a tedy schopnosti aktivovat imunitní systém. Bohatým zdrojem takových antigenů je u RA např. kloubní chrupavka, kde byly identifikovány dva proteiny, HC gp-39 (human cartilage glykoprotein-39) a MIA (melanoma inhibitory; Verheijden et al. 2007, Steenbakkers et al. 2003). Navíc bylo zjištěno, že HC gp-39 se vyskytuje v revmatoidní synoviální tkáni v místech přítomnosti CD16⁺ monocytů (Baeten et al. 2000). Otázkou je, zda oba proteiny endogenně přítomné v zánětlivém kloubu u pacientů s RA jsou aktivně prezentovány T lymfocytům, zda je aktivují a zda je tato prezentace HLA DRB1 SE dependentní.

Role B lymfocytů v rozvoji autoimunitních chorob:

Ačkoli podstata příspěvku B lymfocytů k etiopatogenezi autoimunitních chorob není známa, důkazem jejich účasti v patogenetickém procesu je léčebná účinnost anti-CD20 terapie eliminující CD20⁺ B lymfocyty u RA (Edwards et al. 2001). Jejich význam je nepochybný zejména vzhledem ke schopnosti produkovat imunoglobuliny (Ig). Tyto molekuly ať už ve formě fyziologických protilátek nebo patologických autoprotilátek mají totiž stejnou stavbu a jejich geneze je determinována týmiž pravidly.

Tato sekce se týká pouze zralých CD19⁺IgD⁻ B lymfocytů, které se vyskytují v organismu jako naivní, paměťové případně pre-plazmatické buňky definované absencí nebo přítomností molekuly CD27 (Klein et al. 1997, 1998). Zvláštní pozornost je věnována paměťovým B lymfocytům, produkci Ig mRNA izotypů IgM, IgG anebo IgA a jejich variabilním oblastem těžkých řetězců.

Težké řetězce (heavy chains) vznikají uspořádáním zárodečných (nemutovaných) VH (variable, celkem 50 segmentů), DH (diversity, celkem 27 segmentů) a JH (joining, celkem 6 segmentů) genových segmentů lokalizovaných na chromozomu č. 14 spolu

s geny C pro konstantní oblasti určující izotyp Ig molekuly (viz schéma, Hořejší a Bartůňková 2009).

V	D	J	C μ	C δ	C γ 3	C γ 1	$\psi\epsilon$	C α 1	$\psi\gamma$	C γ 2	C γ 4	C ϵ	C α 2
1-50	1-27	1-6	IgM	IgD	IgG3	IgG1		IgA1		IgG2	IgG4	IgE	IgA2

Nejprve jsou na úrovni DNA spojeny VH, DH a JH segmenty za vzniku tzv. VDJ uspořádání (oblast, VDJ rearrangement) obsahující vždy po jednom ze segmentů a C segment je připojen ve finální mRNA molekule kódující konkrétní izotyp (viz schéma, Hořejší a Bartůňková 2009).

Nejdůležitější je právě VDJ oblast, neboť obsahuje 3 CDR oblasti (complementarity determining region 1-3) ohraničené čtyřmi FR úseky (frame work region 1-4; Hořejší a Bartůňková 2009).

Zatímco FR oblasti se podílejí na udržování stability imunoglobulinové molekuly, CDR oblasti (zejména CDR3) jsou zodpovědné za rozpoznání a vazbu (auto)antigenů. Jak je vidět na dalším schématu, CDR3 oblast je tvořena koncovou částí VH segmentu, celým DH segmentem a začátkem JH segmentu (Hořejší a Bartůňková 2009).



Jedná se o velmi variabilní strukturu určující finální specifitu Ig molekuly, neboť tato část podléhá největším změnám, tj. mutacím, duplikacím, inverzím, delecím nebo adicím nukleotidů podmiňujícím schopnost Ig molekul rozpoznat široké spektrum antigenů a zvyšovat svou afinitu. Její význam spočívá v tom, že B lymfocyty selektované stejným (auto)antigenem mají stejnou délku a aminokyselinovou sekvenci, tj. jsou klonálně příbuzné (Klein et al. 1997, 1998; Hořejší a Bartůňková 2009).

Neméně důležitý je VH segment, do jehož sekvence jsou během afinitní maturace a antigenem řízené selekce v germinálním centru zaváděny somatické hypermutace, rozložené především v CDR oblastech. Tyto mutace jsou známkou B buněk paměťového typu, které prošly antigenem řízenou reakcí v germinálním centru, dále

připívají ke zvýšení afinity a jejich počet se zvyšuje s vyšším izotypovým přesmykem (IgM < IgG < IgA < IgE; Klein et al. 1997, 1998; Hořejší a Bartůňková 2009).

Úloha B lymfocytů v rozvoji RA nebyla dlouhou dobu pokládána za příliš podstatnou. Kvůli nemožnosti korelace množství autoprotilátek v periferní krvi a stavu pacienta, byla RA považována za onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí prakticky výhradně T lymfocyty, konkrétně CD4⁺ T lymfocyty. Také počet T buněk v synoviální tkáni postižené RA je výrazně vyšší než počet B buněk a množství prozánětlivých cytokinů produkovaných T lymfocyty je značné (Weinstein et al. 2004). Bylo však prokázáno, že samotné T lymfocyty nejsou pro rozvoj RA dostačující a že jejich aktivace v revmatoidní synovii je závislá na přítomnosti B lymfocytů (Takemura et al. 2001). B buňky spolu s ostatními buněčnými typy přímo infiltrují synoviální membránu revmatického kloubu a dokonce zde mohou tvořit tzv. ektopická (pseudo) germinální centra, kde vyžívají do plazmatických buněk (Feldmann et al. 1996, Schroder et al. 1996, Kim et al. 1999). Kromě toho jsou B buňky 100 – 1000x účinnější aktivátory T buněk v porovnání s ostatními APC, jako jsou makrofágy nebo dendritické buňky (Kotzin 2005; Panayi 2005). V tomto kontextu je schopnost B buněk pomocí svého imunoreceptoru v podobě membránového RF se vázat na Fc části IgG molekul nebo IgG RF v imunokomplexech (Natvig et al. 1975). Tak by docházelo k aktivaci potenciálně autoreaktivních B lymfocytů a permanentní stimulaci jejich proliferace. Takové B lymfocyty pak mohou častěji procházet buněčným cyklem a tak být více náchylné k maligní transformaci (Carson et al. 1991). To je pravděpodobně také podstatou zvýšené frekvence B buněčných lymfomů u SLE, SjS nebo CAD (Bodeutsch et al. 1993, Bahler a Swerdlow 1998).

Rovněž u SjS B lymfocyty v zánětlivých slinných nebo slzných žlázách tvoří útvary připomínající germinální centra a přispívají k charakteristické manifestaci lymfocytárního zánětu v podobě tzv. lymfoepiteliální sialydenitidy (Bahler a Swerdlow 1998). Bylo ukázáno, že VDJ uspořádání v B lymfocytech z periferní krve a žláz jsou polyklonální a že podle typu a rozložení somatických hypermutací prošly (auto)antigenem řízenou selekcí (Hansen et al. 2003).

U pacientů s SLE převažují v periferní krvi B lymfocyty exprimující VDJ uspořádání s VH4-34 segmentem a jejich počet dokonce koreluje s aktivitou nemoci (Odendahl

et al. 2000). Tyto B lymfocyty produkují anti-dsDNA autoproti látky a pravděpodobně unikly negativní selekci v periferních germinálních centrech (Zhang et al. 2008). Práce zabývající se problematikou B buněk u RA, SLE a SjS, a používající techniku analýzy uspořádaných imunoglobulinových genů pro variabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců v jedné B buňce, ať již na úrovni DNA nebo RNA (single-cell PCR, RT-PCR resp.), přinesly mnoho důkazů svědčících pro klonální expanzi synoviálních B lymfocytů, aktivaci Rag (recombination activating genes) genů, přítomnost Ig mRNA pro IgG a IgA a permisivitu k reakci v germinálních centrech (exprese GC-specifických markerů bcl-6 a antigenem indukované cytidin deiminázy; Cattoretti et al. 1995, Muramatsu et al. 1999). Některé z publikovaných studií pracují přímo s B buňkami izolovanými ze synoviální membrány, jiné zase využívají hybridomovou techniku (Clausen et al. 1998, Kren et al. 1999, Itoh et al. 1999; Jacobi et al. 2000, Odendahl et al. 2000, Heimbächer et al. 2001, Dörner T et al. 2001, Hansen et al. 2002, 2003). Ačkoliv tyto práce přinesly přímé důkazy o existenci klonů v periferní krvi a synoviální tkáni, oběma přístupům je společný jeden důležitý limitující faktor a to, že jsou analyzovány všechny B buňky bez ohledu na jejich antigenní specificitu. Tento problém by bylo možné vyřešit, kdybychom mohli detekovat B lymfocyty, o nichž bychom věděli, že rozeznávají zcela konkrétní definovaný autoantigen nebo ještě lépe jeho část.

Právě takovou možnost představují již výše zmíněné citrulinované peptidy/proteiny. Byl vyvinut syntetický cyklický citrulinovaný peptid (Schellekens et al. 1998), stejnou pracovní skupinou byly vytipovány antigenní determinanty obsahující citrulin na filagrinu (viz výše). Byla vytvořena sada syntetických peptidů, obsahujících 1 - 2 citruliny a lišících se délkou řetězce (13 - 18 aminokyselin). Tyto peptidy pak byly testovány pomocí sér pacientů s časnou erozivní RA a sekvence publikovány (Schellekens et al. 2000). Protože jsou malé, nebudou interferovat s velikostí buněk samotných a navíc je lze konjugovat např. se streptavidinem a tak B lymfocyty s příslušným autoreaktivním BCR detekovat a vytřídit. Lze předpokládat, že frekvence těchto buněk bude velmi nízká (Newman et al. 2003). Např. frekvence B lymfocytů specifických pro ds-DNA v periferní krvi u SLE pacientů je 1 na 10 000 B buněk, tj. 0,01%; ve slezině myši vnímavých k SLE je 1 takový B lymfocyt na 1 000 B buněk (Ando et al. 1986, Klinman et al. 1991).

Analýza VH, JH a DH segmentů a CDR3 oblastí v IgM a IgG mRNA na úrovni jedné B buňky specifické pro definovaný peptid obsahující citrulin by tak mohlo vést ke

zjištění, zda mají tyto autoantigenně-specifické B lymfocyty společný rys na molekulární úrovni využitelný v budoucnosti např. k jejich cílené a specifické eliminaci buď z periferní krve anebo lokálně z kloubů.

Literatura:

- Ando DG, Ebling FM, Hahn BH. **Detection of native and denatured DNA antibody forming by the enzyme-linked immunospot assay. A clinical study of (New Zealand black x New Zealand white)1 mice.** Arthritis Rheum 1986; 29:1139-46.
- Appenzeller S, Rondina JM, Li LM, Costallat LT, Cendes F. **Cerebral and corpus callosum atrophy in systemic lupus erythematosus.** Arthritis Rheum 2005; 52:2783-9.
- Baeten D, Boots AM, Steenbakkers PG, Elewaut D, Bos E, Verheijden GF et al. **Human cartilage gp-39+, CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 2000; 43:1233-43.
- Bahler DW, Swerdlow SH. **Clonal salivary gland infiltrates associated with myoepithelial sialadenitis (Sjögren's syndrome) begin as nonmalignant antigen-selected expansion.** Blood 1998; 91:1864-72.
- Bell SA, Hobbs MV, Rubin RL. **Isotype-restricted hyperimmunity in a murine model of the toxic oil syndrome.** J Immunol 1992; 148:3369-76.
- Bell SA, Du Clos TW, Khursigara G, Picazo JJ, Rubin RL. **Autoantibodies to cryptic epitopes of C-reactive protein and other acute phase proteins in the toxic oil syndrome.** J Autoimmun 1995; 8:293-303.
- Berthelot JM, Maugars Y, Castagné A, Audrain M, Prost A. **Antiperinuclear factors are present in polyarthritis before ACR criteria for rheumatoid arthritis are fulfilled.** Ann Rheum Dis 1997; 56:123-5.
- Blakemore AIF, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Duff GW. **Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus.** Arthritis Rheum 1994; 37: 1380-5.
- Bodeutsch C, deWilde PC, Kater L, van den Hoogen FH, Hene RJ, van Houwelingen JC et al. **Monotypic plasma cells in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: prognosticator for systemic lymphoproliferative disease.** J Clin Pathol 1993; 46:123-8.
- Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P et al. **Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist.** Arthritis Rheum 1998; 41:2196-2204.
- Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engström A, Kalden JR, Holmdahl R. **Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis.** Eur J Immunol 2005; 35:1643-52.
- Carson DA, Chen PP, Kipps TJ. **New roles for rheumatoid factor.** J Clin Invest 1991; 87:379-83.
- Cassidy JT, Nelson AM. **The frequency of juvenile arthritis.** J Rheumatol 1988; 15:535-36.
- Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B et al. **BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells.** Blood 1995; 86:45-53.

- Clausen BE, Bridges SL jr, Lavelle JC, Fowler PG, Gay S, Koopman WJ, Schroeder HW Jr. **Clonally-related immunoglobulin VH domains and nonrandom use of DH gene segments in rheumatoid arthritis synovium.** *Mol Med* 1998; 4:240-57.
- Crocker JA, Kimberly RP. **Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus.** *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17:529-37.
- D'Alfonso S, Colombo G, Della Bella S, Scorza R, Momigliano-Richiardi P. **Association between polymorphisms in the TNF region and systemic lupus erythematosus in the Italian population.** *Tissue Antigens* 1996; 47:551-5.
- Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. **Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 antagonist (IL-1RA) gene polymorphism.** *Clin Exp Immunol* 1995; 99:303-10.
- Defrance T, Vanbervliet B, Brière F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. **Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A.** *J Exp Med* 1992; 175:671-82.
- Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. **The contribution of HLA to rheumatoid arthritis.** *Clin Genet* 1989; 36:178-82.
- Dörner T, Kaschner S, Hansen A, Pruss A, Lipsky PE. **Perturbations in the impact of mutational activity on V-lambda genes in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res* 2001; 3:368-74.
- Dostal C, Ivaskova E, Mucurova H, Hana I, Susta A, Zvarova J. **HLA antigens of A, B, C and DR loci in adult rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1981; 8:864-6.
- Edwards JC, Cambridge G. **Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes.** *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:205-11.
- Engelmann R, Brandt J, Eggert M, Karberg K, Krause A, Neeck G, Mueller-Hilke B. **IgG1 and IgG4 are the predominant subclasses among auto-antibodies against two citrullinated antigens in RA.** *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:1489-92.
- Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. **Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies.** *J Clin Invest* 1986; 77:426-30.
- Eystathioy T, Peebles CL, Hamel JC, Vaughn JH, Chan EK. **Autoantibody to hLSm4 and the heptameric LSm complex in anti-Sm sera.** *Arthritis Rheum* 2002; 46:726-34.
- Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ. **A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles.** *Mol Biol Cell* 2002; 13:1338-51.
- Faig OZ, Lutz CS. **Novel specificity of anti-U1A autoimmune patient sera.** *Scand J Immunol* 2003; 57:79-84.
- Fang XM, Schroder S, Hoefft A, Stuber F. **Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis.** *Crit Care Med* 1999; 27:1330-4.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. **Rheumatoid arthritis.** *Cell* 1996; 85:307-10.

- Feng D, Stone RC, Eloranta M-L, Sangster-Guity N, Nordmark G, Sigurdsson S et al. **Genetic variants and disease-associated factors contribute to enhanced interferon regulatory factor γ expression in blood cells of patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2010; 62:562-73.
- Fox RI, Stern M, Michelson P. **Update in Sjögren's syndrome.** *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:391–8.
- Fragoso-Loyo HE, Sánchez-Guerrero J. **Effect of severe neuropsychiatric manifestations on short-term damage in systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 2007; 34:76-80
- Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C et al. **The epitopes triggered by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues.** *J Immunol* 1999; 162:585-94.
- Glass DN, Giannini EH. **Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait (review).** *Arthritis Rheum* 1999; 42:2261-68.
- Gregersen PK, Olsson LM. **Recent advances in the genetics of autoimmune disease.** *Annu Rev Immunol* 2009; 27:363-91.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. **The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of rheumatoid arthritis susceptibility.** *Arthritis Rheum* 1987; 30:1205-13.
- Heimbächer C, Hansen A, Pruss A, Jacobi A, reiter K, Lipsky PE et al. **Immunoglobulin V κ light chain gene analysis in patients with Sjögren's syndrome.** *Arthritis Rheum* 2001; 44:626-37.
- Hanly JG. **Neuropsychiatric lupus.** *Rheum Clin N Am* 2005; 31:273-98.
- Hanly JG, Su L, Farewell V, McCurdy G, Fougere L, Thompson K. **Prospective study of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 2009; 36:1449-59.
- Hanly JG, Urowitz MB, Sanchez-Guerrero J, Bae SC, Gordon C, Wallace DJ et al. **Neuropsychiatric events at the time of diagnosis of systemic lupus erythematosus: an international inception cohort study.** *Arthritis Rheum* 2007; 56:265-73.
- Hansen A, Jacobi A, Pruss A, Kaufmann O, Scholze J, Lipsky PE et al. **Comparison of immunoglobulin heavy chain rearrangements between peripheral and glandular B cells in a patient with primary Sjögren's syndrome.** *Scand J Immunol* 2003; 57:470-9.
- Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J et al. **Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary gland of patients with Sjögren's syndrome.** *Arthritis Rheum* 2002; 46:2160-71.
- Harley JB, Sestak AL, Willis LG, Fu SM, Hansen JA, Reichlin M. **A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease.** *Arthritis Rheum* 1989; 32:826-36.
- Harris ML, Rosen A. **Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenic role, and clinical significance of autoantibodies.** *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:778-84.
- Hassfeld W, Steiner G, Graninger W, Witzmann G, Schweitzer H, Smolen JS. **Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis.** *Br J Rheumatol* 1993; 32:199–203.

Haustein UF, Ziegler V. **Environmentally induced systemic sclerosis-like disorders.** *Int J Dermatol* 1985; 24:147-51.

Hayem G, Chazerian P, Combe B, Elias A, Haim T, Nicaise P et al. **Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1999; 26:7-13.

Hochberg MC. **Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.

Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK et al. **An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer.** *Cancer Res* 2004; 64:5504-10.

Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL. **Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease.** *N Engl J Med* 1979; 301:5-8.

Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A et al. **Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice.** *J Exp Med* 2000; 191:303-11.

Hořejší V, Bartůňková J (ed.). **Základy imunologie** (4. vydání, Triton, Praha), 2009.

Howard JF, Sigsbee A, Glass DN. **HLA genetics and inherited predisposition to JRA.** *J Rheumatol* 1985; 12: 7-12.

Hultman P, Johansson U, Dagnaes-Hansen F. **Murine mercury-induced autoimmunity: the role of T-helper cells.** *J Autoimmun* 1995; 8:809-23.

Chen M, Hemmerich P, von Mikecz A. **Platinum-induced autoantibodies target nucleoplasmic antigens related to active transcription.** *Immunobiology* 2002; 206:474-83.

Imai H, Nakano Y, Kiyosawa K, Tan EM. **Increasing titers and changing specificities of antinuclear antibodies in patients with chronic liver disease who develop hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1993; 71:26-35.

Imboden JB. **The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; 4:417-34.

Isenberg F, Rahman A. **Systemic lupus erythematosus – 2005 annus mirabilis?** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:145-52.

Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J. **Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium.** *Arthritis Rheum* 1996 Mar; 39:386-95.

Itoh K, Patki V, Chartash EK, Jain RI, Lane L, Asnis SE, Chiorazzi N. **Clonal expansion is a characteristic feature of the B-cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res* 1999; 2:50-8.

Jacobi AM, Hansen A, Burmester GR, Dörner T, Lipsky PE. **Enhanced mutational activity and disturbed selection of mutations in V(H) gene rearrangements in a patient with systemic lupus erythematosus.** *Autoimmunity* 2000; 33:61-76.

Janssens X, Veys EM, Verbruggen G, Declercq L. **The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1988; 31:315-24.

Jefferies LC, Carchidi CM, Silberstein LE. **Naturally occurring anti-i/I cold agglutinins may be encoded by different VH3 genes as well as the VH4.21 gene segment.** *J Clin Invest* 1993; 92:2821-33.

- Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM et al. **Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis.** *Mol Med.* 1998; 4:724-33.
- Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. **Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis.** *J Exp Med* 1994; 179:1517-27.
- Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. **Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis.** *J Immunol* 1999; 162:3053-62.
- Kinloch A, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P. **Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R1421-9.
- Kizawa K, Takahara H, Troxler H, Kleinert P, Mochida U, Heizmann CW. **Specific citrullination causes assembly of a globular S100A3 homotetramer: a putative Ca²⁺ modulator matures human hair cuticle.** *J Biol Chem* 2008; 283:5004-13.
- Klein U, Küppers R, Rajewsky K. **Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans.** *Blood* 1997; 89:1288-98.
- Klein U, Rajewsky K, Küppers R. **Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells.** *JEM* 1998; 188:1679-89.
- Klinman DM, Shirai A, Ishigatsubo Y, Conover J, Steinberg AD. **Quantitation of IgM- and IgG-secreting B cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1991; 34:1404-10.
- Koffler D, Carr R, Agnello V, Thoburn R, Kunkel HG. **Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease.** *J Exp Med* 1971; 134:294-312.
- Kotzin BL. **The role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2005; 32:14-18.
- Krenn V, Koenig A, Hensel F, Berek C, Souto Carneiro MM, Haedicke W et al. **Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated Ig VL/K genes.** *Clin Exp Immunol* 1999; 115:168-75.
- Kroot EJA, de Jong BW, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FHJ, van't Hof M et al. **The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000; 43:1831-5.
- Kurki P, Aho K, Palosuo T, Heliövaara M. **Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede clinical disease.** *Arthritis Rheum* 1992; 5:914-7.
- Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH et al. **Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.** *Arthritis Rheum* 1998; 41: 778-99.
- Lerner MR, Steitz JA. **Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:5495-9.
- Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA. **Are snRNPs involved in splicing?** *Nature* 1980; 283:220-4.

Levine SM, Raben N, Xie D, Askin FB, Tuder R, Mullins M et al. **Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis.** *Arthritis Rheum* 2007; 56:2729-39.

Mathews MB, Bernstein RM. **Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity.** *Nature* 1983; 304:177-9.

Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, Girelli G. **Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features.** *Blood* 2000; 95:2786-92.

McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, Parry DA, Cannizzaro L, Croce CM et al. **Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 848-52.

Menard HA, Lapointe E, Rochdi MD, Zhou ZJ. **Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system.** *Arthritis Res* 2000; 2:429-32.

Meyer O, Combe B, Elias A, Benali K, Clot J, Sany J et al. **Autoantibodies predicting the outcome of rheumatoid arthritis: evaluation in two subsets of patients according to severity of radiographic damage.** *Ann Rheum Dis* 1997; 56:682-5.

Mimori T, Suganuma K, Tanami Y, Nojima T, Matsumura M, Fujii T et al. **Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases.** *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:7267-71.

Moxley G. **Variable-constant segment genotype of immunoglobulin kappa is associated with increased risk for rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1992; 35:19-25.

Mozo L, Simó A, Suárez A, Rodrigo L, Gutiérrez C. **Autoantibodies to Golgi proteins in hepatocellular carcinoma: case report and literature review.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:771-4.

Munoz-Fernandez S, Alvarez-Doforno R, Gonzalez-Tarrio JM, Balsa A, Richi P, Fontan G et al. **Antiperinuclear factor as a prognostic marker in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1999; 26:2572-7.

Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO et al. **Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the mRNA-editing deaminase family in germinal center B cells.** *J Biol Chem* 1999; 274:18470-6.

Nath SK, Kilpatrick J, Harley JB. **Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture.** *Curr Opin Immunol* 2004; 16:794-800.

Natvig JB, Munthe E. **Self-associating IgG rheumatoid factor represents a major response of plasma cells in rheumatoid inflammatory tissue.** *Ann N Y Acad Sci* 1975; 256:88-95.

Nicklin MJH, Weith A, Duff GW. **A physical map of the region encompassing the human interleukin-1a, interleukin-1b and interleukin-1 receptor antagonist genes.** *Genomics* 1994; 19:382-4.

Newman, J., Rice, J.S., Wang, C et al. **Identification of an antigen-specific B cell population.** *J Immunol Methods* 2003; 272:177-87.

Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Buremester GR et al. **Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus.** *J Immunol* 2000; 165:5970-9.

- Olee T, Yang PM, Siminovitch KA, Olsen NJ, Hillson J, Wu J, Kozin F, Carson DA, Chen PP. **Molecular basis of an autoantibody-associated restriction fragment length polymorphism that confers susceptibility to autoimmune diseases.** *J Clin Invest* 1991 ;88:193-203.
- Panayi GS. **B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?** *Rheumatology* 2005; 44:ii3-ii7.
- Pascual V, Victor K, Spellerberg M, Hamblin TJ, Stevenson FK, Capra JD. **VH restriction among human cold agglutinins. The VH4-21 gene segment is required to encode anti-I and anti-i specificities.** *J Immunol* 1992; 149:2337-44.
- Patil NS, Pashine A, Belmares MP, Liu W, Kaneshiro B, Rabinowitz J, McConnell H, Mellins ED. **Rheumatoid arthritis (RA)-associated HLA-DR alleles form less stable complexes with class II-associated invariant chain peptide than non-RA-associated HLA-DR alleles.** *J Immunol* 2001; 167:7157-68.
- Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albussion E, Sauvezie B. **IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis.** *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87:309-13.
- Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P et al. **Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997.** *J Rheumatol* 1998; 25:1991-94.
- Pollard M. (Ed.). **Autoantibodies and autoimmunity (Molecular mechanisms in health and disease)** (WILEY-VCH, Weinheim, Germany), November 2005.
- Potter KN. **Molecular characterization of cold agglutinins.** *Transfus Sci* 2000; 22:113-9.
- Rantapää-Dahlquist, S., De Jong B.A., Berglin, E., Hallmans G, Wadell G, Stenlund H et al. **Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003; 48:2741-9.
- Reichlin M, Harley JB. **Immune response to the RNA protein particles in systemic lupus erythematosus. A distinctive dichotomy.** *Am J Med* 1988; 85:35-7.
- Rhodes B, Vyse TJ. **The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies.** *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:1603-11.
- Rom WN, Turner WG, Kanner RE, Renzetti AD Jr, Peebles C, Tan E, Olsen DM. **Antinuclear antibodies in Utah coal miners.** *Chest* 1983; 83:515-9.
- Roosnek E, Lanzavecchia A. **Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells.** *J Exp Med* 1991; 173:487-9.
- Rosa MD, Hendrick JP Jr, Lerner MR, Steitz JA, Reichlin M. **A mammalian tRNA^{His}-containing antigen is recognized by the polymyositis-specific antibody anti-Jo-1.** *Nucleic Acids Res* 1983; 11:853-70.
- Rosen A, Casciola-Rosen L. **Autoantigens in systemic autoimmunity: critical partner in pathogenesis.** *J Intern Med* 2009; 265:625-31.
- Runstaler JA, Saila H, Savolainen A, Leirisalo-Repo M, Aho K, Tuomilehto-Wolf E et al. **Analysis of MHC region genetics in Finnish patients with juvenile idiopathic arthritis: evidence for different locus-specific effects in polyarticular vs pauciarticular subsets and a shared DRB1 epitope.** *Genes Immunity* 2003; 4:326-35.

- Salloum R, Franek BS, Kariuki SN, Rhee L, Mikolaitis RA, Jolly M et al. **Genetic variation at the IRF7/PHRF1 locus is associated with autoantibody profile and serum interferon- α activity in lupus patients.** *Arthritis Rheum* 2010; 62:553-61.
- Santilla S, Savinainen K, Hurme M. **Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 β production in vitro.** *Scand J Immunol* 1998; 47:195-8.
- Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. **High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Sci-70) in sera from scleroderma patients.** *Science* 1986; 231:737-40.
- Shoenfeld N, Agmon-Levin N, Flitman-Katzevman I, Paran D, Katz BS, Kivity S, Langevitz P, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. **The sense of smell in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2009; 60:1484-7.
- Schiff MH. **Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2000; 59: i103-i108.
- Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. **Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific.** *J Clin Invest* 1998; 101:273-81.
- Schellekens GA, Visser H, De Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC et al. **The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide.** *Arthritis Rheum* 2000; 43:155-163.
- Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akeson A et al. **A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with antagonist.** *Nature* 1997; 386:194-200.
- Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. **Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:221-5.
- Schuboth H. **The cold hemagglutinin disease.** *Semin Hematol* 1966; 3:27-47.
- Soltys AI, Axford JS, Sutton BJ. **Rheumatoid factors: where are we now?** *Ann Rheum Dis* 1997; 56:285-6.
- Stastny P. **Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med* 1978 20; 298:869-71.
- Steenbakkers PG, Baeten D, Rovers E, Veys EM, Rijnders AW, Meijerink J et al. **Localization of MHC class II/human cartilage glycoprotein-39 complexes in synovia of rheumatoid arthritis patients using complex-specific monoclonal antibodies.** *J Immunol* 2003; 170:5719-27.
- Steup-Beekman G, Steens S, van Buchem M, Huizinga T. **Anti-NMDA receptor autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and their first-degree relatives.** *Lupus* 2007; 16:329-34.
- Stollar BD, Schwartz RS **Monoclonal anti-DNA antibodies. The targets and origins of SLE autoantibodies.** *Ann N Y Acad Sci* 1986; 475:192-9.
- Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. **Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease: the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome.** *J Clin Invest* 1998; 102:938-46.

Strassburg CP, Vogel A, Manns MP. **Autoimmunity and hepatitis C.** Autoimmun Rev 2003; 2:322-31.

Symmons DP, Chakravarty K. **Can immunisation trigger rheumatoid arthritis?** Ann Rheum Dis 1993; 52:843-4.

Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. **T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent.** J Immunol 2001; 167:4710-18.

Tan EM. **Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis.** J Clin Invest 2001; 108:1411-5.

Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A et al. **Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of 86-bp tandem repeat.** Hum Genet 1993; 91:403-4.

Tarlow JK, Cork MJ, Clay FE, Schmitt-Egenolf M, Crane AM, Stierle C et al. **Association between interleukin-1 receptor antagonist (IL1ra) gene polymorphism and early and late-onset psoriasis.** Br J Dermatol 1997; 136:147-8.

Thomas E, Barrett JH, Donn RP, Thomson W, Southwood TR, and the British Paediatric Rheumatology Group. **Subtyping of juvenile idiopathic arthritis using latent class analysis.** Arthritis Rheum 2000; 43: 1496-1503.

Thorpe SJ, Boulton CE, Stevenson FK, Scott ML, Sutherland J, Spellerberg MB, Natvig JB, Thompson KM. **Cold agglutinin activity is common among human monoclonal IgM Rh system antibodies using the V4-34 heavy chain variable gene segment.** Transfusion 1997; 37:1111-6.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. **An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.** Eur J Immunogenet 1997; 24:1-8.

Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang. **Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis.** Gastroenterology 1999; 117:806-13.

Ulvestad E, Berentsen S, Bø K, Shammas FV. **Clinical immunology of chronic cold agglutinin disease.** Eur J Haematol 1999; 63:259-66.

Ulvestad E, Berentsen S, Mollnes TE. **Acute phase haemolysis in chronic cold agglutinin disease.** Scand J Immunol 2001; 54:239-42.

Vallin H, Blomberg S, Alm GV, Cederblad B, Rönnblom L. **Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells.** Clin Exp Immunol 1999; 115:196-202.

Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, Van Venrooij WJ et al. **Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis.** Arthritis Rheum 2004; 50:709-15.

Van Jaarsveld CHM, ter Borg EJ, Jacobs JWG, Schellekens GA, Gmelig-Meyling FHJ, van Booma-Frankfort C et al. **The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis.** Clin Exp Rheumatol 1999; 17:689-97.

Van Steendam K, Tilleman K, de Ceuleneer M, De Keyser F, Elewaut D, Deforce D. **Citrullinated vimentin as an important antigen in imine complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins.** Arthritis Res Ther 2010; 12:R132.

- Van Venrooij, W.J., Hazes, J.M., Visser, H. **Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis.** *Neth J Med* 2002; 60:383-8.
- Vassalli P. **The pathophysiology of tumor necrosis factors.** *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-52.
- Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, van Staveren CJ, Miltenburg AM et al. **Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1997; 40:1115-25.
- Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournie B, Ayrolles C, Fournie A et al. **High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so called “antikeratin antibodies”.** *Ann Rheum Dis* 1989; 48:712-22.
- Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JMW. **How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis.** *Arthritis Rheum* 2002; 46:357-65.
- Vollertsen RS, Conn DL. **Vasculitis associated with rheumatoid arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 1990; 16:445-61.
- Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB et al. **Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003a; 48:2489-500
- Vossenaar ER, Radstake TR, Van der Heiden et al. **Expression and activity of citrullinating PAD enzymes in monocytes and macrophages.** *Ann Rheum Dis* 2004; 63:373-81.
- Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. **PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease.** *Bioessays* 2003b; 25:1106-18.
- Waalder E. **On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles.** *Acta Pathol Microbiol Scand* 1940; 17:172-8.
- Wada M. **Über Citrullin, eine neue Aminosäure im Presssaft der Wassermelone, Citrullus vulgaris Schrad.** *Biochem Zeit* 1930; 224: 420.
- Weinstein E, Peeva E, Putterman C, Diamond B (). **B-cell biology.** *Rheum Dis Clin N Am* 2004; 30:159-74.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. **The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis.** *Ann Intern Med* 1992; 117:801-6.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3195-9.
- Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. **Chronic thyroiditis and autoimmunization.** *J Am Med Assoc* 1957; 164:1439-47.
- Wordsworth BP, Bell JI. **The immunogenetics of rheumatoid arthritis.** *Springer Semin Immunopathol* 1992; 14:59-78.
- Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. **CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjögren’s syndrome.** *Clin Exp Immunol* 1999; 118:154-63.

Yang PM, Olsen NJ, Siminovitch KA, Olee T, Kozin F, Carson DA, Chen PP. **Possible deletion of a developmentally regulated heavy-chain variable region gene in autoimmune diseases.** Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:7907-11.

Youinou P, Le Goff P, Colaco CB, Thivolet J, Tater D, Viac J et al. **Antikeratin antibodies in serum and synovial fluid show specificity for rheumatoid arthritis in a study of connective tissue diseases.** Ann Rheum Dis 1985; 44:450-4.

Zhang J, Jacobi AM, Wang T Diamond B. **Pathogenic autoantibodies against in systemic lupus erythematosus are derived from both self-reactive and non-self-reactive B cells.** Mol Med 2008; 165:675-81.

Zhang JY, Chan EK, Peng XX, Lu M, Wang X, Mueller F, Tan EM. **Autoimmune responses to mRNA binding proteins p62 and Koc in diverse malignancies.** Clin Immunol 2001;100:149-56.

Hypotézy:

- 1) Předpokládali jsme možnou asociaci různých alterací s predispozicí k vybraným autoimunitním chorobám. Jednalo se o geny kódující cytokiny, imunoglobuliny, HLA alely, dále transkripční faktory a regulační proteiny, jejichž exprese by měla mít vliv na humorální i buněčnou složku imunity.
- 2) Autoimunitní choroby jako SjS, SLE nebo CAD jsou obecně považovány za nízko proliferující lymfomy vznikající z proliferace aktivních autoreaktivních lymfocytů, avšak dosud nebyl podán přímý důkaz. Na případu pacienta s CAD, jenž vyvinul B buněčnou leukemii, jsme chtěli tuto hypotézu ověřit.
- 3) U pacientů s RA, SLE a SjS jsou pozorovány vyšší frekvence aktivovaných paměťových B lymfocytů často spontánně secernujících autoprotiátky do média. Kromě větší proliferace je pravděpodobná změněná exprese nebo retence Ig mRNA – zvláště u izotypů vyšších tříd (IgG, IgA).
- 4) Jednou z možností specifické léčby autoimunitních chorob by mohla být cílená identifikace a následně eliminace autoreaktivních B lymfocytů rozeznávajících cílový autoepitop o známé aminokyselinové sekvenci. Pokud by takové B buňky měly stejnou CDR3 oblast zodpovědnou za rozpoznání a vazbu autoantigenů – např. proteinu obsahujícího citrulin, pak by bylo možné je pomocí tohoto proteinu cíleně odstraňovat z organismu a tak modulovat autoimunitní stav.

Cíle práce:

Obecné cíle práce zahrnovaly:

- 1) Zjištění podílu genových polymorfismů na rozvoji některých autoimunitních chorob. Dále analýzu asociace genových variabilit s průběhem nebo formou určité nemoci.
- 2) Studium významu produkovaných patologických autoprotilátek pro diagnostické účely nebo predikci průběhu a závažnosti choroby. Zde je také věnována pozornost využití autoprotilátek ke studiu buněčných a sub-buněčných struktur a molekul, dále identifikaci kloubních (auto)antigenů a jejich roli v indukci kloubního zánětu.
- 3) Analýza B lymfocytárních populací z hlediska rozvoje leukémie z autoreaktivních klonů a z hlediska podílu na rozvoji autoimunitní odpovědi. Dále vývoj metody detekce a studia B lymfocytů specifických pro definovaný autoantigen.

Specifické cíle byly následující:

- 1) Analýza příspěvku VNTR polymorfismu v genu IL-1RN ke vnímavosti, závažnosti nebo průběhu JIA; dále podílu SNP v imunoglobulinovém genu VH1-69 (DP-10) pro variabilní oblast těžkého řetězce na rozvoji RA.
- 2) Analýza asociace polymorfismů v genech pro NF κ B, PDCD1, IRF5, prolaktin, ITGAM, STAT4, TYK2, MECP2, BANK1, PDK a dalších s vnímavostí k SLE.
- 3) Studium sérových hladin anti-CCP, RF, AKA, APF autoprotilátek jako prognostických markerů závažnosti a průběhu časné RA.
- 4) Shrnutí využití autoprotilátek ke studiu buněčných struktur a molekul v rámci základního výzkumu obecně. Analýza chrupavkových antigenů MIA a HC gp-39 a jejich role v indukci kloubního zánětu u RA.
- 5) Potvrzení rozvoje B-CLL z autoreaktivního VH4-34⁺ B buněčného klonu u pacienta s CAD.
- 6) Analýza role naivních CD27⁻ a paměťových CD27⁺ B lymfocytárních populací pomocí průtokové cytometrie a tzv. single-cell RT-PCR u SjS.
- 7) Vývoj metody k detekci B buněk specifických pro proteiny obsahující citrulin a studium jejich vztahu k hladinám anti-CCP autoprotilátek.

Teze práce:

1. Alela 2 genu pro antagonistu receptoru pro interleukin 1 je častější u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou (Příloha 1)

Cíl studie:

Zjistit význam VNTR polymorfismu ve druhém intronu IL-1RN genu u pacientů s JIA a jeho asociaci k vnímavosti, formě nebo závažnosti choroby.

Metody a materiál:

Celkem bylo analyzováno 185 vzorků pacientů s JIA a 168 kontrol z České republiky; 50 pacientů a 52 kontrol z Turecka; a 79 kontrol z Anglie. VNTR polymorfismus byl stanoven pomocí PCR s využitím primerů specifických pro 86-bp tandemovou repetici ve druhém intronu IL-1RN genu. Statistické zhodnocení rozdílů mezi pacienty a kontrolami a kohortami vzorků mezi jednotlivými populacemi bylo provedeno pomocí Fišerova exaktního testu a programu GraphPad Prism 3.0.

Výsledky:

U souboru českých pacientů s JIA byla zjištěna významně zvýšená frekvence alely IL-1RN*2 a frekvence jejích nositelů (carriage rate) oproti kontrolám (27,6% vs. 15,8%; $p < 0,001$; OR=2,03; 95%CI 1,4-2,9 pro frekvenci alely IL-1RN*2; a pro frekvenci jejích nositelů 44,3% vs. 26,2%; $p < 0,001$; OR=2,24; 95%CI 1,4-3,5). U souboru pacientů a kontrol byla nalezena také vyšší frekvence alely IL-1RN*2 a frekvence jejích nositelů, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Po stratifikaci českých pacientů podle typu JIA bylo zjištěno, že na významném rozdílu v hodnotách pro alelu IL-1RN*2 mezi pacienty a kontrolami se podílí především zvýšené hodnoty sledovaných parametrů u pacientů s rozšířenou oligoartritidou a entesitidou (viz tabulka).

Zajímavým nálezem byla zvýšená frekvence alely IL-1RN*2 u kontrol z Anglie ve srovnání s kontrolami českými nebo tureckými. Korelace s formou JIA sice nebyla potvrzena, avšak u pacientů s rozšířenou oligoartritidou bylo pozorováno nevýznamné zvýšení frekvence této alely u pacientů s pokročilými radiologickými změnami.

Závěry:

Byla potvrzena asociace přítomnosti alely IL-1RN*2 a predispozice k rozvoji JIA, nebyla však jednoznačně prokázána korelace s klinickými parametry a průběhem nebo formou nemoci.

Tento nález byl potvrzen také u jiných autoimunitních a zánětlivých chorob. Je tedy pravděpodobné, že se jedná o obecný faktor predisponující k těmto nemocem s tím, že je nutný příspěvek dalších genů spolu s působením faktorů prostředí. Při konečném posouzení a interpretaci vlivu konkrétního polymorfismu je však nutné pamatovat na etnicko-geografické rozdíly ve frekvencích jednotlivých alel.

<i>Subjekty souboru z ČR</i>	<i>Frekvence alely 2</i>		<i>Fr. nositelů alely 2</i>	
	<i>počet (%)</i>	<i>p</i>	<i>počet (%)</i>	<i>p</i>
<i>Kontroly (n=168)</i>	<i>53 (15,8)</i>	<i>-</i>	<i>44 (26,2)</i>	<i>-</i>
<i>Pacienti s JIA celkem (n=185)</i>	<i>102 (27,6)</i>	<i><0,001</i>	<i>82(44,8)</i>	<i><0,001</i>
Podskupiny JIA				
<i>Systémová artritida (n=17)</i>	<i>10 (29,4)</i>	<i>0,055</i>	<i>7 (41,2)</i>	<i>0,25</i>
<i>Persistující oligoartritida (n=27)</i>	<i>7 (13,0)</i>	<i>0,69</i>	<i>5 (18,5)</i>	<i>0,48</i>
<i>Rozšířená oligoartritida (n=22)</i>	<i>23 (52,3)</i>	<i><0,001</i>	<i>19 (86,4)</i>	<i><0,001</i>
<i>Polyartikulární RF negativní (n=26)</i>	<i>8 (15,4)</i>	<i>1,0</i>	<i>8 (30,8)</i>	<i>0,64</i>
<i>Polyartikulární RF pozitivní (n=18)</i>	<i>6 (16,7)</i>	<i>0,81</i>	<i>5 (27,8)</i>	<i>1,0</i>
<i>Artritida s entesitidou (n=56)</i>	<i>35 (31,3)</i>	<i><0,001</i>	<i>28 (50,0)</i>	<i>0,002</i>
<i>Psoriatická artritida (n=5)</i>	<i>1 (10,0)</i>	<i>1,0</i>	<i>1 (20,0)</i>	<i>1,0</i>
<i>Jiná artritida (n=14)</i>	<i>12 (42,9)</i>	<i>0,001</i>	<i>9 (64,3)</i>	<i>0,005</i>

2. Polymorfismus v imunoglobulinovém VH genu V1-69 ovlivňuje vnímavost k revmatoidní artritidě u jedinců bez HLA-DRB1 sdíleného epitopu (Příloha 2)

Cíl studie:

Zjistit příspěvek G/A polymorfismu v 73. kodonu imunoglobulinového genu pro variabilní část těžkého řetězce VH1-69 k rozvoji RA.

Metody a materiál:

Celkem bylo do studie zahrnuto 109 pacientů s RA a 79 kontrol z České republiky a britský soubor byl tvořen 159 pacienty s RA a 79 kontrolami. Byla provedena HLA DRB (sub)typizace pomocí PCR se sekvenčně specifickými primery a polymorfismus

73^{G/A} byl stanoven pomocí RFLP PCR (HinfI) a následné separace fragmentů v agarózovém gelu. Statistické zhodnocení rozdílů mezi pacienty a kontrolami a kohortami vzorků mezi jednotlivými populacemi bylo provedeno pomocí Fišerova exaktního testu a programu GraphPad Prism 3.0.

Výsledky:

V českém souboru byl častější homozygotní genotyp 73^{A/A} u pacientů s RA ve srovnání s kontrolami [28,4% (31/109) vs. 15,2% (12/79)]. Po stratifikaci frekvence jednotlivých genotypů podle přítomnosti HLA DRB1 SE (shared epitope, sdílený epitop), byla zjištěna statisticky významně zvýšená frekvence toho genotypu u českých pacientů s RA, kteří byli SE-negativní oproti SE-positivním [34,2% (13/38) vs. 23,7% (18/76)]. U SE-negativních kontrol tento genotyp byl přítomen pouze ve 14% (8/57; OR=3,19; 95% CI 1,61-6,3; p<0,001). Přitom ani jedna z těchto kontrol neměla alternativní homozygotní genotyp 73^{G/G}, což nebylo pozorováno u britského souboru.

Závěry:

Homozygotní stav pro 73^A dimorfni sekvenci predisponuje k rozvoji RA i bez přítomnosti SE. Opět byly nalezeny rozdíly mezi dvěma etnicky i geograficky odlišnými populacemi.

Interpretace dat je obtížná vzhledem k tomu, že VH1-69 (DP-10) je obecně spojován s aktivitou RF, ale konkrétně 73^{A/A} genotyp je nepoměrně méně exprimován oproti 73^{A/G} nebo 73^{G/G} kombinacím. Důvody tohoto jevu jsou nejasné. Přítomnost 73^{A/A} genotypu pravděpodobně nějak omezuje nebo potlačuje produkci VH1-69 a ten pak není k dispozici v rámci fyziologických funkcí imunitního systému, což vede posléze k rozvoji RA.

- 3. Analýza polymorfismů v genech pro nukleární faktor κ B (NF κ B), jeho inhibitor (I κ B), gen programované buněčné smrti (PDCD1), interferon regulující faktor 5 (IRF5), prolaktin, integrin alfa-M (ITGAM), „signal transducer and activator of transcription“ 4 (STAT4), tyrosin kinázu 2 (TYK2), metyl-CpG-vazebný protein 2 (MECP2), „B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 (BANK1), PXX doménu obsahující THR/SER kinázu (PXX) a dalších s vnímavostí k SLE**
(Přílohy 3 - 7)

Cíle studií:

Zjistit příspěvek různých polymorfismů ve vybraných genech k rozvoji SLE, případně k typu jeho klinické manifestace.

Metody a materiál:

Jednotlivé analýzy byly prováděny na souborech pacientů se SLE a kontrol, ve třech případech (ve spolupráci s prof. A. Gonzalesem ze Španělska) se jednalo o tzv. GWA (genome-wide analysis) multiparametrické analýzy provedené na souborech mnoha set vzorků DNA ze zemí střední a západní Evropy a zahrnující celou řadu SNP polymorfismů v mnoha genech. Tomu také odpovídalo použití pokročilejších statistických metod a programů (ke zjištění vlivu velikosti souboru, jeho homogenity, pohlaví a věku pacientů, geografických rozdílů ve frekvencích alel atd.). Do analýz byl zahrnut soubor 110 českých pacientů se SLE a 110 kontrol.

Výsledky:

V genu pro NF κ B1 pro NF κ B byl předmětem studia VNTR polymorfismus dinukleotidové CA tandemové repetice analyzovaný pomocí PCR a následné fragmentační analýzy; a v genu NF κ B1A pro I κ B substituce A/G v 3'-nepřekládané oblasti stanovená s využitím RFLP PCR (HaeIII).

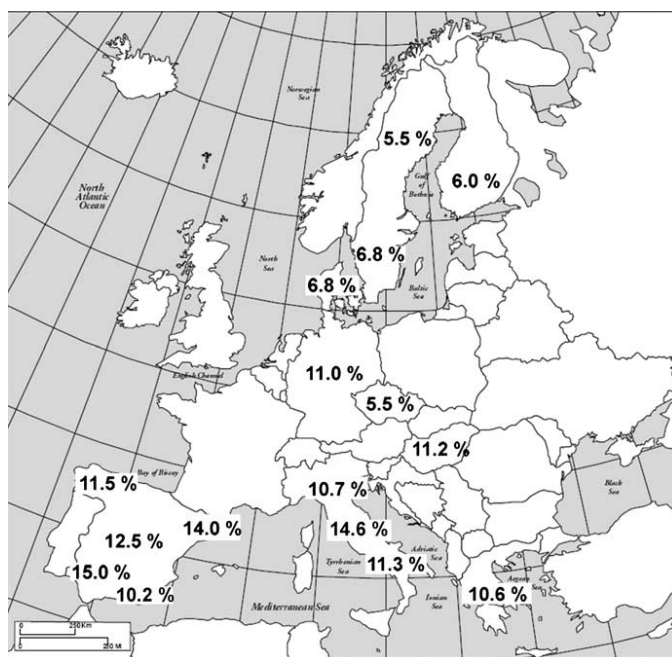
Dalším analyzovaným polymorfismem byla G/T záměna v pozici -1149 promotoru genu pro prolaktin. I když po rozdělení SLE pacientů do podskupin podle orgánového postižení byla ukázána významně vyšší frekvence G alely u pacientů s artikulárním postižením ($p=0.0086$; OR=2,56; 95% CI 1,51-4,33), celkové frekvence obou alel a všech genotypů byly prakticky totožné ve skupině SLE pacientů a kontrol.

Nejzajímavější výsledky byly získány během analýzy genu pro programovanou smrt buněk 1 (PDCD1), konkrétně se jednalo o PD1.3 G/A dimorfismus (rs11568821 SNP; ve 4. intronu, v němž se nachází vazebné místo pro RUNX1 protein (jeho vazba je přítomností adeninu znemožněna). V tomto případě je za predisponující k SLE považována alela PD1.3A stanovená pomocí RFLP PCR (PstI). Analýza přinesla velmi překvapivý objev vlivu geografického původu populace na asociaci této alely a predispozice k SLE. Zatímco její frekvence byla zvýšená u pacientů se SLE ze severní a střední Evropy (včetně České republiky), u pacientů se SLE v jihovýchodní Evropě byla její četnost dokonce nižší. Totéž platilo pro ženy se SLE po rozdělení podle pohlaví. Avšak u mužských pacientů tento gradient frekvencí alely PD1.3A nebyl vůbec patrný a frekvence alely byla u všech zvýšená napříč Evropou.

Jak ukazuje mapka frekvencí alely PD3.1A v jednotlivých zemích, u zdravých jedinců byl pozorován její gradient se zvyšujícími se hodnotami od severovýchodní části

kontinentu po jihovýchodní země. Navzdory poloze naší země ve středoevropském regionu se frekvencí 5,5% blížíme spíše severoevropské populaci.

V genu pro interferonový regulační faktor 5 (IRF5) bylo vybráno celkem osm SNP (rs729302, rs2004640, rs752637, rs13242262, rs10488630, rs10488631, rs2280714 a rs4731535 – vesměs dinukleotidové záměny) stanovené pomocí multiplexové PCR nebo tzv. TaqMan Genotyping Assay. Zjištěné frekvence byly vždy významně zvýšené nebo snižené u pacientů se SLE, přičemž rozdíly ve frekvencích mezi pacienty se SLE a kontrolami v případě SNP rs729302, rs2004640 a rs10488631 dosáhly nejvyšších hodnot koeficientu p ($2,2 \times 10^{-7}$; $4,3 \times 10^{-8}$ a $7,8 \times 10^{-18}$ respektive). Avšak po vyhodnocení vlivu velikosti různých souborů u žádného z uvedených polymorfismů nebyla jednoznačně prokázána jejich asociace s vnímavostí k SLE. Byl tím podán důkaz, že velikost souboru může významným způsobem ovlivnit konečné hodnocení asociace konkrétního polymorfismu s konkrétní chorobou.



Další práce si kladla za úkol ověřit genetickou asociaci se SLE u již dříve popsanych polymorfismů v různých genech s kontroverzními výsledky pomocí GWA metody na velkých souborech vzorků z celé Evropy. Jednalo se vesměs o SNP dimorfismy vyskytující se v intronech nebo exonech následujících genů: STAT4, Tyk2, MECP2, PXX, IGTAM, BANK1 a Ly9. Asociace byla potvrzena u SNP v genu STAT4 (OR=1,62; $p=2.4 \times 10^{-12}$), Tyk2 (OR=0,79; $p=2.5 \times 10^{-5}$), MECP2 (OR=1,26;

$p=0,00085$), PXX (OR=1,19; $p=0,0038$) IGTAM (OR=1,7; $p=1.1 \times 10^{-16}$) a BANK1 (OR=0,83; $p=0,0062$); u Ly9 naopak asociace nebyla potvrzena.

Závěry:

Ačkoli je prokázáno, že NF κ B a jeho inhibitor I κ B hrají důležitou roli v indukci exprese mnoha mediátorů zánětu a autoimunitní reakce, u obou analyzovaných polymorfismů nebyl nalezen žádný rozdíl mezi pacienty se SLE a kontrolami. Prolaktin funguje v podstatě jako cytokin, který je schopen přímo ovlivnit maturaci a diferenciaci B lymfocytů, a je považován za jeden z mediátorů vzniku a rozvoje SLE. Avšak ani v tomto případě jsme nenalezli u -1149 G/T polymorfismu žádné signifikantní rozdíly mezi skupinou pacientů se SLE a kontrol.

Analýza frekvence alely PD3.1A genu PDCD1 ukázala jednak existenci rozdílů v různých zemích Evropy, její jednoznačnou asociaci se SLE u mužů. Avšak u pacientek ze severní a střední Evropy byla zvýšená, zatímco v jihovýchodní Evropě snižená. Pozoruhodné je, že se Česká republika s frekvencí uvedené alely 5,5% blíží spíše skandinávským zemím než středoevropskému regionu. Bylo by zajímavé vyšetřit kontroly a pacienty také z Irska, Skotska a Francie, protože např. u fenyketonurie nebo cystické fibrózy jsou běžně v genomu nacházeny mutace tzv. keltského typu vyskytující se v Irsku, Skotsku nebo francouzské Bretani. Je možné, že frekvence alely PD1.3A by byla velmi podobná frekvenci objevené pro naši populaci.

U polymorfismů v IRF5 genu po aplikaci testů hodnotících vliv velikosti různých souborů na zjištěné rozdíly nebyla prokázána asociace se SLE ani s aktivitou nemoci. Tato práce však přinesla jasný důkaz toho, že při hodnocení vztahu mezi konkrétními alelami a chorobou je nutné velmi dobře zvážit právě velikost souborů pacientů a kontrol.

Asociace mezi SNP a vnímavostí k SLE byla potvrzena u genů STAT4, Tyk2, PXX, IGTAM, BANK1 a MECP2 (zde pouze u pacientek se SLE), u Ly9 byla asociace naopak vyloučena. Tato práce ukazuje, že detailní genetická a statistická analýza na velkém souboru vzorků (1500 SLE pacientů) vede k jasnému potvrzení nebo vyvrácení asociací SNP se SLE získaných dříve na malých souborech.

Přesný význam objevených polymorfismů v různých genech v patogenezi autoimunitních chorob není znám. Jednotlivé SNP mohou mít nejen vliv na aminokyselinové složení a tedy funkci výsledného proteinu, ale také na vlastní transkripci genu ve smyslu kvantitativním nebo na stabilitu mRNA. Při výše uvedených genetických asociačních studiích se navíc ukázaly etnicko-geografické rozdíly ve frekvenci alel, které je třeba uvážit při finální interpretaci biologického významu jednotlivých nálezů.

4. Autoprotilátky jako prognostický marker erozivní formy časně revmatoidní artritidy (Příloha 8)

Cíl studie:

Zhodnotit prognostický význam stanovení sérových hladin autoprotilátek proti cyklickému citrulinovanému proteinu (anti-CCP), antikeratinových protilátek (AKA), antiperinukleárních faktorů (APF), izotypů revmatoidních faktorů (IgM/IgG/IgA RF) u pacientů s časnou RA a korelovat nálezy s klinickými parametry.

Metody a materiál:

Do studie bylo zahrnuto 104 pacientů s RA v délce trvání delší než dva roky. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin na základě radiologické progresse na pacienty s erozivní RA (n=67) a ne-erozivní RA (n=37). Statistické zhodnocení rozdílů mezi oběma skupinami jednotlivých populací bylo provedeno pomocí Fišerova exaktního testu, testu Mann-Whitneyové a Spearmanova korelačního testu a programu GraphPad Prism 3.0.

Výsledky:

Ve skupině pacientů s erozivní formou časně RA byly nalezeny významně vyšší hladiny všech sledovaných autoprotilátek (viz tabulka).

<i>Autoprotilátka</i>	Erozivní RA n (%)	Ne-erozivní RA n (%)	p
<i>AKA+</i>	33 (49)	6 (16)	0,001
<i>APF+</i>	30 (45)	8 (22)	0,021
<i>anti-CCP</i>	36 (54)	8 (22)	0,002
<i>IgM RF+</i>	39 (58)	11 (30)	0,008
<i>IgG RF+</i>	36 (54)	11 (30)	0,024
<i>IgA RF+</i>	30 (45)	8 (22)	0,021

Radiologická progresa byla hodnocena pomocí tzv. Larsenova skóre a ukázalo se, že jeho hodnoty jednak významně korelovaly s hladinami anti-CCP, IgM RF a IgA RF. Korelace radiologické progresa s iniciálními hodnotami progresa byla ještě významnější s tím, že do ní byly zahrnuty také hladiny IgG. Nejrychlejší progresa byla zaznamenána u pacientů s anti-CCP a IgM RF dvojitou pozitivitou.

Závěry:

Byl prokázán význam iniciálních hladin AKA, APF, anti-CCP, IgM RF, IgG RF a IgA RF pro predikci kloubních erozí u pacientů s časnou RA. Jako nejcitlivější se ukázaly anti-CCP autoprottilátky v kombinaci s IgM RF. Toto stanovení tak umožňuje předpovědět možný průběh nemoci poměrně rychlým a navíc snadným způsobem. Je třeba však zmínit, že ne všichni pacienti pozitivní na výše uvedené autoprottilátky nutně vyvinou časné eroze. Senzitivita při použití kombinace stanovení anti-CCP anebo IgM RF je asi 68%. Jedná-li se o pozitivitu na obě autoprottilátky, pak 90% těchto pacientů skutečně eroze vyvine v časné fázi nemoci. Z toho vyplývá vysoká prognostická hodnota tohoto stanovení.

5. Autoprottilátky jako molekulární a buněčné sondy (Příloha 9)

Cíl studie:

Cílem této přehledné práce bylo ukázat duální povahu výzkumu v oblasti autoprottilátek na jedné straně v klinické medicíně a na druhé straně v základním výzkumu.

Výsledky:

Zpočátku byla detekce autoprottilátek součástí běžné klinické praxe a postupně s přesnější charakterizací (auto)antigenů, pro něž jsou specifické, byl odhalen také jejich význam z hlediska prognózy průběhu onemocnění. I když etiopatogeneze autoimunitních chorob je stále neznámá, v oblasti molekulární a buněčné biologie se autoprottilátky staly velmi užitečným nástrojem.

Jako tzv. „reportérové sondy“ napomohly k identifikaci a mnohdy také k poznání funkce molekul a struktur, které jsou evolučně konzervované a mají klíčovou roli v tak základních buněčných procesech jako je DNA replikace, transkripce, translace, transport proteinů nebo fáze buněčného cyklu.

Tak byly objeveny funkce např. tRNA syntetáz v proteosyntéze, ale především byly poznány funkce a lokalizace komponent buněčného jádra eukaryotních buněk jako chromatin, jaderná lamina, jadérko a jeho složky, Cajalova a PML tělíska.

Rozšíření našich znalostí se však také týká buněčné cytoplasmy, kde byla recentně identifikována místa degradace mRNA organizovaná do nového typu organel tzv. GW tělísek.

Závěry:

Tento vědní obor je názorným příkladem propojení orientovaného (klinického) a bazálního výzkumu. Detailní charakterizace molekul nebo struktur cílových pro konkrétní typ autoprotilátek může zpětně vést k vývoji nových diagnosticko-terapeutických postupů v klinické praxi.

6. Endogenní HLA-DR-restringovaná prezentace lidského chrupavkového HC gp-39 a melanomového inhibičního antigenu v chrupavce zánětlivého revmatoidního kloubu (Příloha 10)

Cíl studie:

Ověřit potenciální imunogenní roli chrupavkových proteinů MIA (melanoma inhibitory antigen) a HC gp-39 (human cartilage) v zánětu kloubů u RA.

Metody a materiál:

Do studie bylo zahrnuto celkem 39 pacientů s RA, jimž byla odebrána periferní krev a synoviální tekutina a byla provedena HLA DRB (sub)typizace pomocí PCR se sekvenčně specifickými primery. K analýze imunogenicity byly využity rekombinantní MIA a HC gp-39 proteiny a T-buněčné HLA DRB1*0401 transgenní hybridomy. Jejich aktivace byla určena produkcí IL-2 stanoveného ELISA metodou.

Výsledky:

Synoviální tekutina (ST) HLA DRB1*0401 pozitivních pacientů s RA byla inkubována s T-buněčnými hybridomy, v přítomnosti peptidů odvozených od MIA nebo HC gp-32 proteinů byla indukována produkce IL-2, která byla inhibována pomocí anti-HLA DR monoklonální protilátky. To dokazuje přítomnost antigenprezentujících buněk v ST pacientů schopných oba proteiny prezentovat pomocí HLA molekul. Indukce produkce IL-2 však nastala také v případě nepřítomnosti obou rekombinantních peptidů, což svědčí o endogenní přítomnosti obou proteinů v ST pacientů s RA.

Závěry:

Byla prokázána endogenní přítomnost proteinů MIA a HC gp-39 v synoviální tekutině RA pacientů a jejich schopnost indukovat produkci v T-buněčných hybridomech. Tato reakce byla patrná pouze u vzorků HLA DRB1*0401-pozitivních jedinců. Důležitost

přítomnosti HLA DRB1 SE epitopu pro prezentaci obou proteinů a aktivaci T-hybridomů byla potvrzena úspěšnou inhibicí IL-2 produkce pomocí anti-HLA DR protilátky.

Zatím zůstává otázkou, zda přítomnost obou proteinů v zánětlivém kloubu skutečně může aktivovat autoreaktivní T lymfocyty infiltrující kloub. Další studium imunogenicity proteinů MIA a HC gp39 by mohlo vést k jejich budoucímu využití v imunomodulační léčbě RA.

7. **Chronická lymfocytární leukemie předcházená chorobou chladových aglutininů: intraklonální diversita lehkého imunoglobulinového řetězce u jednotlivých B buněk exprimujících VH4 -34** (Příloha 11)

Cíl studie:

Experimentálně prokázat, že u některých autoimunitních chorob považovaných za tzv. pomalu proliferující lymfomy se mohou autoreaktivní B lymfocyty maligně zvrhnout a tak zapříčinit rozvoj B-buněčné lymfocytární leukémie (B-CLL).

Metody a materiál:

Byly vytrženy periferní CD19⁺/CD5⁺/sIgMκ⁺ B lymfocyty od pacienta s primární chorobou chladových aglutininů a to ve dvou časových úsecích: ze vzorku z doby před B-CLL a po 7 letech, kdy byla potvrzena diagnóza leukémie. K analýze Ig mRNA produkce bylo použito Ig-specifické RT-PCR na úrovni jedné buňky (dále jen single-cell).

Výsledky:

Zatímco v leukemických B lymfocytech bylo nalezeno 28 klonálně příbuzných mutovaných C_μ transkriptů VH4-34/VκA27 pozitivních, v B lymfocytech z doby před B-CLL byly takové transkripty nalezeny jen čtyři. Sdílely však stejné mutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce, obsahovaly identické VH4-34 – DH3-22 – JH3 /VκA27 uspořádání a navíc měly stejnou unikátní CDR3 oblast o délce 42 párů bází. To znamená, že musely být selektovány stejným typem antigenu v době primární CAD. V leukemických vzorcích byla prokázána přítomnost bcl-2 mRNA a bcl-2/IgH fúzovaného transkriptu – dvou molekulárních markerů B-CLL, které ve vzorcích z doby před B-CLL detekovány nebyly. Další zajímavým nálezem byla detekce intraklonální diversifikace v genu VκA27 a klonální invariance VH4-34 genu v leukemických buňkách.

Závěry:

V této práci byl poprvé přímo potvrzen vývoj B-CLL na pozadí autoimunitního onemocnění z původně autoreaktivního klonu B buněk. Ty po získání proliferační výhody a aktivaci anti-apoptických molekul (bcl-2) postupně v organismu expandovaly a staly se základem maligního klonu. Intraklonální diversita genu V κ A27 může být důsledkem maligní transformace leukemických B lymfocytů. Zvýšený výskyt CD19⁺ lymfomů je popisován nejen u CAD, ale také u SLE nebo SjS, jde tedy o obecnější jev pravděpodobně spojený s hyperregulací imunitního systému, respektive hyperaktivací B lymfocytů.

8. Abnormality v periferní B buněčné paměti u pacientů s primárním Sjögrenovým syndromem (Příloha 12)

Cíl studie:

Analyzovat poruchy B buněčné homeostáze se zaměřením na paměťové B lymfocyty u primárního Sjögrenova syndromu (SjS).

Metody a materiál:

Single-cell RT-PCR specifické pro IgM, IgG a IgA mRNA bylo použito k analýze Ig mRNA exprese ve vyříděných periferních naivních CD19⁺CD27⁻ a paměťových CD19⁺CD27⁺ B lymfocytech od tří pacientek s primárním SjS (n=205) a třech kontrol (n=385).

Výsledky:

Byla zjištěna významně zvýšená frekvence B lymfocytů exprimujících IgM, IgG a IgA mRNA u pacientů se SjS ve srovnání s kontrolami (58% vs. 14,3%; p<0,0001). U SjS pacientů byla zaznamenána signifikantně zvýšená frekvence B lymfocytů produkujících současně Ig mRNA více izotypů se stejným VH-DH-JH uspořádáním, u kontrol to bylo jen 12,7% (p<0,0001). Tyto buňky ale byly negativní pro povrchovou expresi pro více než jeden izotyp a postrádaly expresi AID (aktivací indukovaná cytidin deamináza) a bcl-6 (oba markery specifické B lymfocyty selektované v germinálních centrech). B lymfocyty exprimující všechny tři izotypy v kontrolní skupině úplně chyběly, což nasvědčuje pro abnormální retenci mRNA transkriptů v B buňkách periferní krve pacientů.

Na rozdíl od kontrol, periferní CD19⁺CD27⁺ B lymfocyty pacientů vykazovaly následující charakteristiky:

- a) IgVH mRNA byly významně více mutovány (8,6% u SjS vs. 4,3 % u kontrol; $p < 0,0001$);
- b) významně výrazněji mutované IgM transkripty (9,6% u SjS vs. 2,5 % u kontrol; $p < 0,0001$);
- c) vysoké procento B buněk s transkripty pro více Ig izotypů (61,2%);
- d) výskyt CD27⁺ buněk paměťového typu u subpopulace B lymfocytů produkujících mutované IgM mRNA.

Závěry:

Molekulární analýza na úrovni jedné buňky potvrdila abnormality u obou sledovaných populací naivních a paměťových B lymfocytů u pacientů se SjS. Kromě významně vyšších mutačních frekvencí a frekvencí buněk současně produkujících mRNA dva a více izotypů byla objevena přítomnost CD27⁺ B buněk vykazující vlastnosti paměťových CD27⁺ B lymfocytů. Ty však nebyly zaznamenány u kontrol, jde tedy zřejmě o jev spojený s deregulovaným imunitním systémem pacientů se SjS. V kontrolní skupině chyběly B lymfocyty produkující Ig mRNA pro všechny tři izotypy, což by svědčilo o prolongované retenci těchto transkriptů u pacientů (pravděpodobně z důvodů abnormální stability transkriptů nebo jejich snížené degradace).

9. Periferní a synoviální CD19⁺ B lymfocyty specifické pro peptidy obsahující citrulin pacientů s revmatoidní artritidou nekorelují se sérovými hladinami autoprotilátek proti citrulinovaným proteinům (Příloha 13)

Cíl studie:

Vyvinout metodu detekce B lymfocytů rozeznávajících peptidy obsahující citrulin, dále zjistit přítomnost těchto B lymfocytů specifických pro citrulin obsahující peptidy v periferní krvi a synoviální tkáni pacientů s revmatoidní artritidou a analyzovat Ig mRNA expresi.

Metody a materiál:

Pomocí průtokové cytometrie byla analyzována frekvence CD19⁺ B specifických pro citrulin obsahující peptidy v periferní krvi (PK) a synoviální tkáni (ST) od 13 pacientů s revmatoidní artritidou, v PK 5 pacientů s JIA, 1 pacienta se smíšenou chorobou pojiva a 5 kontrol. K detekci byly použity tři biotinylované peptidy obsahující citrulin odvozené od přirozeně se vyskytujících lidských proteinů (filagrin - P1, agrekan - P3 a fibrin - P0428). Bylo provedeno single-cell RT-PCR specifické pro IgM, a IgG mRNA k analýze Ig mRNA exprese. Sérové hladiny anti-CCP autoprotilátek byly

stanoveny pomocí ELISA kitu Mark2. Statistická analýza byla provedena pomocí Fischerova přesného testu a Mann-Whitney t-testu a GraphPad softwaru.

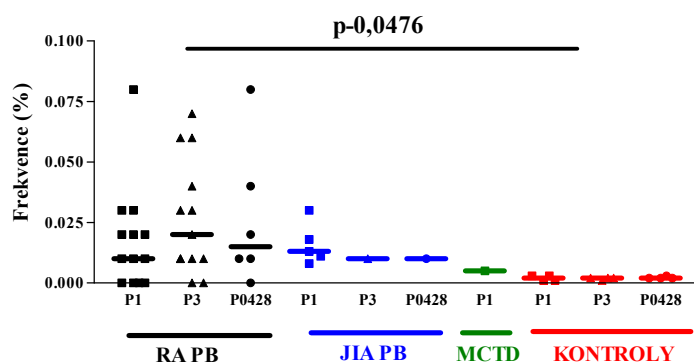
Výsledky:

Principem detekce byla vizualizace CD19⁺ B lymfocytů s navázaným biotinylovaným peptidem s citrulinem na příslušné BCR pomocí myší monoklonální CD19-FITC protilátky a konjugátu streptavidin-phycoerytrin.

Pomocí tzv. inhibičního testu byla ověřena specifická námi vyvinuté detekční metody. V případě synoviální tkáně bylo nutné použít anti-CD45 monoklonální protilátku k vymezení leukocytů.

Analýza vzorků PK od 13 pacientů s revmatoidní artritidou, 5 pacientů s JIA, 1 pacienta se smíšenou chorobou pojiva a 5 kontrol prokázala přítomnost B lymfocytů specifických pro příslušné peptidy obsahující citrulin a rozeznávajících více než jeden ze tří použitých peptidů s citrulinem (obr. 1).

Obr. 1. Frekvence B lymfocytů specifických pro peptidy s citrulinem v periferní krvi pacientů s autoimunitními chorobami a kontrol. Vodorovná čára označuje mediány.



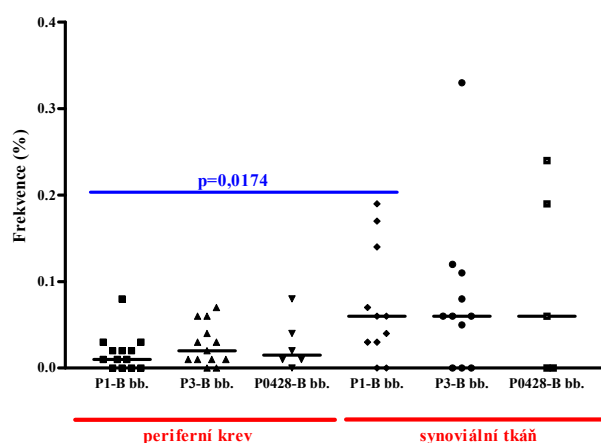
U 13 pacientů s RA jsme analyzovaly také vzorky ST. Frekvence B lymfocytů specifických pro příslušné peptidy s citrulinem byly u pacientů s RA zvýšené oproti ostatním vzorkům, pro peptid P3 se jednalo o mírně signifikantní zvýšení ($p=0,0474$; obr. 2).

Frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro jednotlivé peptidy obsahující citrulin byly u pacientů s RA v ST zvýšené oproti PK, pro peptid P1-filagrin bylo však toto zvýšení frekvence statisticky významné ($p=0,0174$; obr. 2).

Frekvence těchto B lymfocytů byly následující: pro peptid P1-filagrin v rozsahu od 0,0 do 0,08 (medián $0,01\pm 0,01$) v PK a od 0,0 do 0,19% (medián $0,06\pm 0,02$) v ST; pro peptid P3-agrekan od 0,0 do 0,07% (medián $0,02\pm 0,01$) v PK a od 0,0 do 0,33%

(medián $0,06 \pm 0,03$) v ST; a pro peptid P0428-fibrin od 0,0 do 0,08% (medián $0,02 \pm 0,01$) v PK a od 0,0 do 0,24% (medián $0,06 \pm 0,04$) v ST.

Obr. 2. Frekvence $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428 obsahující citrulin v periferní krvi a synoviální tkáni pacientů s RA. Vodorovná čára označuje mediány.



Od jednoho pacienta s RA byly z PK a ST vyčleněny $CD19^+$ B lymfocyty specifické pro peptid P1 (filagrin) a v nich sledována produkce IgM/IgG mRNA. Celkem byly analyzovány 3 V_H přestavby z 15 buněk PK a 5 V_H přestaveb z 15 buněk ze ST (tab. 1).

Byla zjištěna produkce IgM i IgG mRNA (s převahou IgG transkriptů v ST), všechny transkripty byly mutované (mutační frekvence 9,1%), přičemž vyšší frekvence mutací byla u IgG transkriptů. Z V_H genových segmentů byly zastoupeny VH4-39 a VH5-51 a z JH genových segmentů JH3, JH4 a JH6 (tab. 1). Délka CDR3 oblastí byla 11-17 aminokyselin a na základě jejich sekvence byly detekovány klonálně příbuzné B lymfocyty (tab. 1).

Závěry:

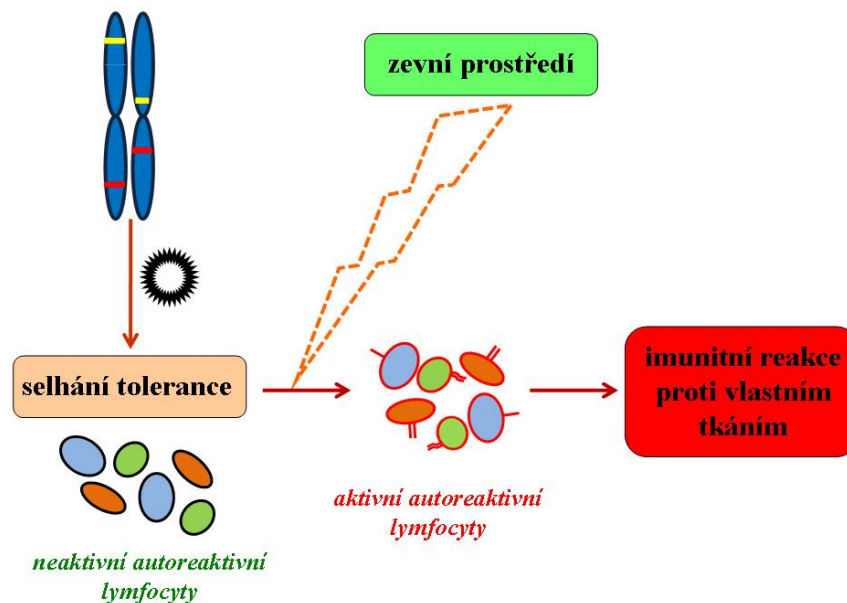
Jako dosud první jsme vyvinuli metodu detekce $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro citrulinované proteiny v periferní krvi a synoviální tkáni. Přítomnost těchto B lymfocytů byla zaznamenána jak u pacientů s různými autoimunitními chorobami tak u kontrol. Nejde tedy o jev specifický pouze pro RA a tyto B lymfocyty vždy představují velmi minoritní B buněčnou populaci. B lymfocyty specifické pro peptidy s citrulinem se vyskytovaly v zánětlivém kloubu a v určitém množství také v periferní krvi pacientů s RA. Naše nálezy naznačují přítomnost několika B buněčných

subpopulací specifických pro různé substráty obsahující citrulin. B lymfocyty synoviální tkáně produkují převážně IgG mRNA, byla v nich zaznamenána vyšší mutační frekvence a klonální příbuznost. Vyšší frekvence B lymfocytů specifických pro peptidy s citrulinem v synoviální tkáni pravděpodobně odráží autoantigenem řízenou aktivaci B buněk probíhající v tomto kompartmentu nebo selektivní migraci těchto B lymfocytů rozeznávajících citrulinované peptidy do místa zánětu. Výsledky svědčí spíše pro jistý stupeň vnitřní heterogenity populací B lymfocytů rozeznávající proteiny s citrulinem. To by však znamenalo, že tyto buňky pravděpodobně nebudou moci být v budoucnu využity k cílenému terapeutickému zásahu zaměřenému na eliminaci patologické autoimunitní reakce.

Tab. 1: Přehled získaných dat z B lymfocytů specifických pro peptid P1 periferní krve a synoviální tkáně. pb – páry bazí, ak – aminokyselina, hvězdička - klonálně příbuzné buňky.

sekvence	původ	V _H gen	J _H gen	izotyp	délka V _H oblasti (bp)	počet mutací ve V _H oblasti	mutační frekvence (%)	délka CDR3 oblasti (ak)
47.1*	ST	V _H 4-39	J _H 4	IgG	222	27	12,16	11
47.2*	ST	V _H 4-39	J _H 4	IgG	213	26	12,2	11
47.3*	PK	V _H 4-39	J _H 4	IgM	210	25	11,9	11
*47.4	ST	V _H 5-51	J _H 6	IgG	213	16	7,51	17
*47.5	ST	V _H 5-51	J _H 6	IgG	216	12	5,56	17
47.6	ST	V _H 5-51	J _H 4	IgG	219	13	5,94	17
47.8	PK	V _H 5-51	J _H 4	IgG	222	21	9,46	13
47.7	PK	V _H 5-51	J _H 3	IgM	225	18	8	15

Jak již bylo zmíněno, etiopatogeneze autoimunitních chorob zůstává prozatím nevyřešena. Nicméně jak naše data, tak dosavadní poznatky získané na základě genetických analýz, výzkumu humorálních mediátorů zánětu nebo studia funkcí imunitních buněk ukazují, že rozvoj těchto chorob je determinován především individuální kombinací variant různých genů, zodpovědných mimo jiné také za udržování tolerance. Při expozici jedince s vhodným genetickým pozadím např. infekcím může dojít k selhání tolerance. V tomto stádiu však ještě nedochází k autoimunitní reakci, ale v organismu mohou od tohoto okamžiku perzistovat neaktivní nicméně funkční autoreaktivní lymfocyty. Ty se pak po další expozici (infekci nebo jinému stresoru prostředí) aktivují a teprve tím je spuštěna imunitní odpověď namířená proti vlastním tkáním a dojde k navození autoimunitní reakce.



Závěr:

Autoimunitní choroby patří v současné době k nejzávažnějším medicínským tématům, zejména díky obecně se zvyšujícímu počtu pacientů s těmito chorobami.

Etiopatogeneze většiny z nich není zcela známá, avšak z recentních dat vyplývá, že za iniciací patologické imunitní odpovědi stojí pravděpodobně z velké části dědičné faktory a dále buněčné a humorální interakce ovlivněné faktory zevního prostředí.

Pochopení patogeneze těchto chorob je důležité nejen z hlediska vývoje nových diagnostických, predikčních nebo terapeutických přístupů, ale může přinést mnoho zajímavých poznatků v oblasti bazální imunologie.

Cílem této práce bylo najít vztah genetických alterací a produkce autoprotilátek a dále ke klinické manifestaci onemocnění; definovat kloubní autoantigeny a jejich význam v zánětu kloubu. Dále prokázat autoreaktivní původ leukemických buněk; roli B lymfocytů v patogenezi onemocnění a konečně vypracovat metodu detekce B lymfocytů rozeznávajících definovaný autoantigen a zjistit jejich korelaci s hladinou autoprotilátek.

Genetickou analýzou byly sice identifikovány některé predipoziční polymorfismy, nicméně asociace vnímavých alel nebyla vždy spojena s klinickými formami onemocnění. Stejně tak zjištěné variability nebudou využitelné jako jednoznačné predikční markery průběhu nemoci. Největším přínosem je poznání, že frekvence některých alel vykazují značné etnicko-geografické rozdíly (IL-1RN*2 nebo PD1.3 alela) a přímo kritickou roli hraje velikost souborů (GWA studie SNP v genech pro IGTAM, STAT4, TYK2, MECP2 atd.). To je důležité, zejména při posuzování významnosti konkrétního polymorfismu v patogenezi autoimunitních chorob.

Dalším zajímavým výstupem byla statisticky významně zvýšená frekvence 73^{A/A} genotypu v imunoglobulinovém genu VH1-69 u pacientů s RA, kteří neměli ve svém genomu ani jednu z vnímavostních HLA DRB alel (tj. SE-negativní). To jednak nepřímo ukazuje na účast B lymfocytů v rozvoji choroby a jednak na příspěvek non-HLA genů k predispozici k této nemoci.

Stanovením sérových hladin autoprotilátek anti-CCP, AKA, APF a RF izotopů IgM, IgG a IgA a jejich vztažením k radiologické progresi bylo zjištěno, že jako klinicky nejpřesnější a nejcitlivější marker k predikci progresu erosivní formy RA je kombinace stanovení anti-CCP a IgM RF.

V synoviální tekutině a tkáni pacientů s RA byla potvrzena endogenní přítomnost chrupavkových proteinů MIA a HC gp-39 s imunogenními vlastnostmi. Jde o zajímavý nález především z hlediska jejich možné aplikace s cílem navodit toleranci proti autoantigenům. Tento terapeutický potenciál obou proteinů bude nutné ověřit nejprve na zvířecím modelu onemocnění.

Byl podán přímý důkaz rozvoje leukemického onemocnění z původně autoreaktivního klonu specifického pro definovanou antigení strukturu na povrchu erytrocytů u pacienta s CAD. Z klinického hlediska tento objev podporuje požadavek lékařů na častější cytometrická vyšetření periferní krve pacientů s autoimunitními nemocemi za účelem časného záchytu rozvoje leukémie. Teoreticky by struktura autoantigenů mohla být využita k přímému specifickému vychytávání autoreaktivních B lymfocytů s onkogenním potenciálem založeném např. na principu plasmaferezy.

U pacientů se SjS byla u paměťových B lymfocytů prokázána heterogenita na molekulární úrovni, navíc byl identifikován nový typ paměťových B buněk bez povrchové exprese CD27 molekuly a vykazujících abnormální retenci Ig mRNA. Byla vyvinuta metoda přímé detekce CD19⁺ B lymfocytů rozeznávajících peptidy obsahující citrulin, avšak také tyto nálezy potvrdily značnou heterogenitu B buněčných subpopulací specifických pro různé peptidy s citrulinem a to i na molekulární úrovni. Specifické odstraňování těchto B lymfocytů z periferní krve nebo kloubní tkáně tedy pravděpodobně nebude prakticky proveditelné.

Seznam příloh:

Příloha 1

Jiří Vencovský, Kateřina Jarošová, Šárka Růžičková, Dana Němcová, Jaroslava Niederlová, Seza Ozen, Mehmet Alikasifoglu, Aysin Bakkaloglu, William E. R. Ollier, Rizgar A. Mageed. Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:2387-2391. (IF 7,677)

Příloha 2

Jiří Vencovský, E. Žďárský, S. P. Moyes, A. Hajeer, Š. Růžičková, Z. Cimburek, W. E. Ollier, R. N. Maini, R.A. Mageed. Polymorphism in the immunoglobulin VH gene V1-69 affects susceptibility to rheumatoid arthritis in subjects lacking the HLA-DRB1 shared epitope. *Rheumatology* 2002; 41:401-409. (IF 4,136)

Příloha 3

Romzova M, Hohenadel D, Kolostova K, Pinterova D, Fojtikova M, Ruzickova S, Dostal C, Bosak V, Rychlik I, Cerna M. NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Hum Immunol.* 2006; 67:706-713. (IF 2, 901)

Příloha 4

Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, Migliaresi S, Sebastiani GD, Endreffy E, Mavromati M, Kappou-Rigatou I, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun.* 2007; 8:138-146. (IF 4,088)

Příloha 5

Ferreiro-Neira I, Calaza M, Alonso-Perez E, Marchini M, Scorza R, Sebastiani GD, Blanco FJ, Rego I, Pullmann R Jr, Pullmann R, Kallenberg CG, Bijl M, Skopouli FN, Mavromati M, Migliaresi S, Barizzone N, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Papasteriades C, Kappou-Rigatou I, Endreffy E, Kovacs A, Ordi-Ros J, Balada E,

Carreira P, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE. *Genes Immun.* 2007; 8:429-438. (IF 4,088)

Příloha 6

Fojtíková M, Cerná M, Cejková P, Ruzicková S, Dostál C. Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66:706-707. (IF 6, 411)

Příloha 7

Marian Suarez-Gestal, Manuel Calaza, Emöke Endreffy, Rudolf Pullmann, Josep Ordi-Ros, Gian Domenico Sebastiani, Sarka Ruzickova, Maria Jose Santos, Chryssa Papasteriades, Maurizio Marchini, Fotini N Skopouli, Ana Suarez, Francisco J Blanco, Sandra D'Alfonso, Marc Bijl, Patricia Carreira, Torsten Witte, Sergio Migliaresi, Juan J Gomez-Reino, Antonio Gonzalez for the European Consortium of SLE DNA Collections. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study. *Arthritis Res. Ther.* 2009; 11:R69. (IF 4,49)

Příloha 8

J Vencovský, S Macháček, L Šedová, J Kafková, J Gatterová, V Pešáková, Š Růžičková. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheu. Dis.* 2003; 62:427-430. (IF 6,411)

Příloha 9

Raska I., Ruzickova S. Autoantibodies as molecular and cellular probes (Chapter 16) in: M. Pollard (Ed.). *AUTOANTIBODIES and AUTOIMMUNITY (Molecular mechanisms in health and disease)* (WILEY-VCH, Weinheim, Germany); November, 2005.

Příloha 10

van Lierop MJ, den Hoed L, Houbiers J, Vencovsky J, Ruzickova S, Krystufkova O, van Schaardenburg M, van den Hoogen F, Vandooren B, Baeten D, De Keyser F, Sønderstrup G, Bos E, Boots AM. Endogenous HLA-DR-restricted presentation of the

cartilage antigens human cartilage gp-39 and melanoma inhibitory activity in the inflamed rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:2150-2159. (IF 7,677)

Příloha 11

Ruzickova S, Pruss A, Odendahl M, Wolbart K, Burmester GR, Scholze J, Dorner T, Hansen A. Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intraclonal immunoglobulin light-chain diversity in V(H)4-34 expressing single leukemic B cells. *Blood* 2002; 100(9): 3419-3422. (IF 10,119)

Příloha 12

Hansen A, Gosemann M, Pruss A, Reiter K, Ruzickova S, Lipsky PE, Dörner T. Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004; 50, 6:1897-1908. (IF 7,677)

Příloha 13

Šárka Růžičková, Walter van Venrooij, Dominique Baeten, Jan Walter Drijfhout, Ivan Raska. Peripheral blood and synovial tissue CD19⁺ B lymphocytes specific for citrullinated peptides in patients with rheumatoid arthritis do not correlate with serum titres of autoantibodies against citrullinated proteins. Připraveno k publikaci.

Příloha 1

Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis.

Arthritis Rheum. 2001; 44:2387-2391.

Příloha 2

Polymorphism in the immunoglobulin VH gene V1-69 affects susceptibility to rheumatoid arthritis in subjects lacking the HLA-DRB1 shared epitope.

Rheumatology 2002; 41:401-409.

Příloha 3

**NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its
microvascular and atherosclerotic complications.**

Hum Immunol. 2006; 67:706-713.

Příloha 4

Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe.

Genes Immun. 2007; 8:138-146.

Příloha 5

**Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to
SLE.**

Genes Immun. 2007; 8:429-438.

Příloha 6

Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis. 2007; 66:706-707.

Příloha 7

Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case–control study.

Arthritis Res. Ther. 2009; 11:R69.

Příloha 8

**Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early
rheumatoid arthritis.**

Ann. Rheu. Dis. 2003; 62:427-430.

Příloha 9

**Autoantibodies as molecular and cellular probes (Chapter 16) in: M. Pollard
(Ed.). AUTOANTIBODIES and AUTOIMMUNITY (Molecular mechanisms in
health and disease)**

(WILEY-VCH, Weinheim, Germany); November, 2005.

Příloha 10

Endogenous HLA-DR-restricted presentation of the cartilage antigens human cartilage gp-39 and melanoma inhibitory activity in the inflamed rheumatoid joint.

Arthritis Rheum. 2007; 56:2150-2159.

Příloha 11

Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intracлонаl immunoglobulin light-chain diversity in V(H)4-34 expressing single leukemic B cells.

Blood 2002; 100(9): 3419-3422.

Příloha 12

Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren's syndrome.

Arthritis Rheum 2004; 50, 6:1897-1908.

Příloha 13

Peripheral blood and synovial tissue CD19⁺ B lymphocytes specific for citrullinated peptides in patients with rheumatoid arthritis do not correlate with serum titres of autoantibodies against citrullinated proteins.

Připraveno k publikaci.