

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Hana Štorkánová

Nové biomarkery a kandidátní molekuly antifibrotické terapie u systémové
sklerodermie

New biomarkers and candidate molecules of antifibrotic therapy in systemic sclerosis

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Michal Tomčík, Ph. D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 08. 2016

.....

Hana Štorkánová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mudr. Michalu Tomčíkovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a věcné připomínky při zpracování této diplomové práce. Rovněž děkuji prof. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, Ph. D. za možnost vypracování diplomového projektu v laboratoři Oddělení experimentální revmatologie v Revmatologickém ústavu v Praze a kolegyním za přínosné konzultace a naučení laboratorních technik, které byly v tomto projektu použity. Práce vznikla za podpory grantu AZV16-33542A a MZ ČR – Institucionální podpora, Koncepční rozvoj výzkumné organizace č. MZO 023728.

Abstrakt

Systémová sklerodermie (SSc) je systémové onemocnění pojivové tkáně postihující kůži a vnitřní orgány. V patogenezi SSc se uplatňuje zánět, vaskulopatie a fibróza. Žádný z dosud zkoušených léků zatím neprokázal přesvědčivou účinnost v léčbě SSc. Vzhledem k nedostatku vhodných biomarkerů u SSc, které by byly spolehlivým ukazatelem celkové aktivity nemoci nebo úspěšnosti léčby, bylo naším cílem zanalyzovat dosud nezkoumané extracelulární koncentrace S100A4 a Hsp90 (Heat shock protein 90) a IL-35 (interleukin-35). S100A4 a Hsp90 byly původně studovány zejména u nádorových onemocnění, u kterých již našly uplatnění jako markery prognózy a staly se kandidáty pro nádorovou terapii. Naše recentní práce popsaly důležitou profibrotickou roli S100A4 a Hsp90 v patogenezi SSc a jejich inaktivace vedla k účinnému zabránění rozvoje experimentální kožní fibrózy. Tyto výsledky jsme následně potvrdili analýzou jejich koncentrací v periferní krvi pacientů se SSc a prokázaly významné asociace s aktivitou nemoci a orgánovým poškozením. Dalším vhodným biomarkerem SSc by se mohl stát IL-35, jehož zvýšené hladiny jsme detekovali v postižené kůži, dermálních fibroblastech a séru pacientů se SSc. Hlavní profibrotický mediátor transformující růstový faktor beta (TGF- β) vyvolal zvýšenou sekreci IL-35, což vedlo k aktivaci fibroblastů a zvýšenému uvolnění kolagenu do supernatantu. Zvýšené hladiny sérového IL-35 také asociovaly s časnou, zánětlivou fází SSc.

Tato práce by mohla přispět k identifikaci nových potenciálních biomarkerů SSc, které by se mohly stát spolehlivými ukazateli celkové aktivity nemoci nebo účinnosti léčby.

Klíčová slova: systémová sklerodermie, S100A4, Hsp90, interleukin-35

Abstract

Systemic scleroderma (SSc) is a systemic connective tissue disease affecting skin and internal organs. The pathogenesis of SSc is characterized by inflammation, vasculopathy and fibrosis. No agent has been proven effective in the treatment of SSc. There is a lack of suitable biomarkers for monitoring the disease activity or the response to the treatment of SSc. Therefore our aim was to analyse the extracellular levels of S100A4, Hsp90 (Heat shock protein 90) and IL-35 (interleukin-35) in SSc. S100A4 and Hsp90 have been initially studied in tumours; in some of them considered as suitable prognostic markers and candidates for future therapies. We have recently described the profibrotic role of S100A4 and Hsp90 in the pathogenesis of SSc. Our results showed that inactivation of S100A4 and Hsp90 effectively prevented the development of experimental skin fibrosis. This was consequently confirmed by the analysis of S100A4 and Hsp90 in the peripheral blood of patients with SSc, where significant associations with disease activity and organ involvement were detected. IL-35 may become another potential biomarker of SSc. We detected increased expression of IL-35 in the affected skin, dermal fibroblasts and in serum of patients with SSc. Moreover, the main profibrotic mediator transforming growth factor (TGF- β) induces the secretion of IL-35 which results in activation of fibroblasts and increased collagen secretion into the supernatant. Furthermore, serum IL-35 is associated with the early, inflammatory phase of SSc.

This project could contribute to the identification of potential new biomarkers suitable for monitoring the disease activity or the treatment efficacy in SSc.

Keywords: systemic sclerosis, S100A4, Hsp 90, interleukin-35

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1. Úvod.....	10
2. Cíle diplomové práce.....	11
3. Teoretický úvod	12
3.1. Systémová sklerodermie.....	12
3.1.1. Definice.....	12
3.1.2. Epidemiologie.....	12
3.1.3. Klinický obraz	13
3.1.4. Patogeneze	16
3.2. S100A4 protein	24
3.2.1. Význam S100A4 u nádorových onemocnění.....	25
3.2.2. Význam S100A4 u autoimunitních onemocnění.....	27
3.2.3. Význam S100A4 u systémové sklerodermie	28
3.3. Interleukin-35	30
3.3.1. Význam IL-35 u nádorových onemocnění.....	31
3.3.2. Význam IL-35 u autoimunitních onemocnění.....	33
3.3.3. Význam IL-35 u systémové sklerodermie	34
3.4. Protein tepelného šoku 90 (Hsp90).....	35
3.4.1. Význam Hsp90 u nádorových onemocnění.....	37
3.4.2. Význam Hsp90 u autoimunitních onemocnění.....	38
3.4.3. Význam Hsp90 u systémové sklerodermie	40
4. Metodika	42
4.1. Biologický materiál.....	42
4.2. Použité metody	47
4.2.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	47
4.2.2. Izolace RNA.....	48
4.2.3. Reverzní transkripce a kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR).....	49
4.2.4. Kvantifikace genové exprese	53
4.2.5. Tkáňové kultury fibroblastů	53
4.2.6. Stimulace pomocí rekombinantního IL-35 a TGF- β	53
4.2.7. Stanovení koncentrace kolagenu v supernatantu	54

4.2.8.	Imunohistochemie a imunofluorescence	54
4.2.9.	Statistická analýza dat	55
5.	Výsledky	56
5.1.	S100A4	56
5.1.1.	Analýza sérového proteinu S100A4	56
5.1.2.	Analýza intracelulární exprese S100A4	59
5.2.	IL-35	60
5.2.1.	Analýza lokální exprese IL-35 v kůži pacientů se SSc	60
5.2.2.	TGF- β indukuje expresi a sekreci IL-35 u dermálních fibroblastů	62
5.2.3.	IL-35 indukuje aktivaci fibroblastů a syntézu kolagenu	65
5.2.4.	Analýza IL-35 v séru	67
5.2.5.	Analýza IL-35 mRNA v PBMC	69
5.3.	Hsp90	70
5.3.1.	Analýza Hsp90 α v plazmě	70
5.3.2.	Analýza mRNA exprese genů Hsp90AA a Hsp90AB v PBMC	73
6.	Diskuze	75
7.	Závěr	81
8.	Reference	82
9.	Přílohy	94

Seznam použitých zkratk

α -SMA	α -smooth muscle actin
17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin, tanespimycin
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, alvespimycin
AAV	Adeno-Associated Virus, adeno-asociovaný virus
ACA	Anti-Centromere Antibodies, anticentromerové protilátky
ACR	American College of Rheumatology, Americká kolej revmatologie
ANA	Anti-Nuclear Antibodies, antinukleární protilátky
	Anti-Scl-70 Anti-topoisomerase antibody-type of anti-nuclear autoantibodies, protilátka proti topoizomeráze typu I
	ATP Adenosintrifosfát
bcl-2	B-Cell Lymphoma2, genová rodina bcl
Breg	regulační B-lymfocyty
	CD4 / CD25 Cluster of Differentiation 4 / 25, diferenciační skupina povrchových glykoproteinů
Cdc37	cell division cycle 37
Cdk4	Cyclin Dependent Kinase 4, cyklin dependentní kináza 4
cDNA	complementary DNA, komplementární DNA
	C _T cycle treshold, počet cyklů potřebných pro fluorescenční signál na překonání práhu pro hodnoty pozadí
CTGF	Connetive Tissue Growth Factor, růstový faktor pojivové tkáně
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DC	Dendritic Cell, dendritické buňky
dcSSc	difúzní systémová sklerodermie
dH ₂ O	destilovaná voda
	DLCO Diffusing capacity of the Lung for Carbon monoxide (CO), difúzní kapacita plic pro oxid uhelnatý
DM	Dermatomyositis, dermatomyozitida
Ebi-3	Epstein-Barr virus Induced gene 3
ECM	extra celulární matrix
	EGFRvIII Epidermal Growth Factor Receptor variant III, receptor pro epidermální růstový faktor typu III
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
	EUSTAREULAR (European League Against Rheumatism) Scleroderma Trials and Research group
	FEV1 Forced Expiratory Volume in 1 second, usilovně vydechnutý objem za první sekundu
FoxP3	Forkhead box P3, transkripční faktor
FVC	Forced Vital Capacity, usilovná vitální kapacita plic
GA	geldanamycin
GIT	gastrointestinální trakt
GRP-94	Glucose-Regulated Protein 94 kDa
HDM2	Human Double Minute 2 homolog, E3-ubiquitin-protein ligáza
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293 cells
	HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, receptor 2 pro epidermální růstový faktor
HLA- DQA1*0501	gen pro hlavní histokompatibilní komplex II. třídy u lidí
HLA- DQB1*0301	gen pro hlavní histokompatibilní komplex II. třídy u lidí
Hsps	Heat Shock Proteins, proteiny tepelného šoku
IBM	Inclusion Body Myositis, myositida s inkluzními tělísky
IFN	interferon
IIM	Idiopathic Inflammatory Myositis, idiopatická zánětlivá myopatie
IL	interleukin
ILD	Interstitial Lung Disease, intersticiální plicní postižení
IQR-	InterQuartile Range, mezikvartilové rozpětí
IRF5	gen pro interferon regulující faktor 5
kDa	kilo Dalton, jednotka molekulární hmotnosti

IcSSc	limitovaná systémová sklerodermie
LKB1	Liver Kinase B1, jaterní kináza B1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells, myeloidní supresorové buňky
MMP	Matrix MetalloProteinase, matrix-metaloproteináza
mRSS	modified Rodnan Skin Score, modifikované Rodnanovo kožní skóre
NF- κ B	Nuclear Factor κ B, nukleární faktor kappa B
NK	Natural Killer cell, NK-buňky
NS	nesignifikantní
OA	osteoartróza
p21	protein tlumící činnost cyklin-dependentních kináz G1 fáze
P4H	prolyl-4-hydroxyláza
p53	protein kódovaný genem TP53, transkripční faktor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, mononukleární buňky periferní krve
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	Platelet Derived Growth Factor, růstový faktor krevních destiček
PM	Polymyositis, polymyozitida
p-Smad	fosforylované proteiny Smad
RA	revmatoidní artritida
Raf1	serine/threonine kináza
	RAGE Receptor for Advanced Glycation Endproducts, receptor pro pokročilé produkty glykace
rRNA	ribozomální RNA
SLE	systémový lupus erythematoses
	Smad Smad proteiny, homology jak proteinu Drosophily zvaného MAD (mothers against decapentaplegic) tak proteinu Caenorhabditis elegans zvaného SMA (small body size)
SpO2	Saturation of Peripheral Oxygen, saturace periferní krve kyslíkem
SSc	systémová sklerodermie
	STAT4 Signal Transducer and Activator of Transcription, přenašeč signálu a transkripční faktor 4
Tc	cytotoxické lymfocyty
TGF	Transforming Growth Factor, transformující růstový faktor
Th	pomocné lymfocyty
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, tkáňový inhibitor metaloproteinázy
TNF	Tumor Necrosis Factor, faktor nádorové nekrózy
	TRAP1 TNF-Receptor Associated Protein 1, protein 1 asociovaný s TNF receptorem
Treg	regulační T-lymfocyty
	VEGF Vascular Endothelial Growth Factor, vaskulární endoteliální růstový faktor
ZK	zdravé kontroly

1. Úvod

Systémová sklerodermie je vzácné (prevalence 30-350 / 1 mil.) chronické potenciálně letální systémové onemocnění pojiva nejasné etiologie postihující kůži, pohybový aparát, srdce, tepny, plíce, gastrointestinální trakt, ledviny a sexuální funkce. Mezi dominantní patologické procesy u SSc patří zánět a aktivace imunitního systému, vaskulopatie a fibróza, která postihuje jak kůži, tak vnitřní orgány - zejména plíce, srdce a gastrointestinální trakt (Gabrielli et al., 2009). Pro SSc je charakteristická nerovnováha v profilu exprese cytokinů s typickou preferenční sekrecí cytokinů Th2 (T helper) lymfocytů – IL (interleukin)-4 a IL-13, jež podněcují proliferaci a migraci fibroblastů, stimuluje je k produkci kolagenu a sekreci TGF- β (transformující růstový faktor- β) a CTGF (tkáňový pojivový růstový faktor). Na rozdíl od Th2 imunitní odpovědi je exprese Th1 antifibrotických cytokinů INF- γ (interferon- γ) a IL-10 u SSc redukována. B-buněčná humorální imunitní odpověď má zásadní význam pro diagnostiku SSc a pravděpodobně i přispívá k progresi nemoci. Aktivované a dysfunkční B-lymfocyty však nepřispívají k patogenezi SSc jen produkcí autoantilátok. Uvolňují také IL-6, jež stimuluje fibroblasty a podporuje rozvoj fibrózy u SSc (Denton, 2004, Varga, 2007). I když se kvalita života a přežívání pacientů se SSc v posledních letech stále zlepšuje, hlavně díky lepší léčbě orgánových manifestací a komplikací, SSc pořád zůstává nevléčitelnou nemocí (Gabrielli et al., 2009).

Vzhledem k neúčinnosti více než 70 dosud zkoušených preparátů v léčbě SSc a nedostatku vhodných biomarkerů u SSc, které by byly spolehlivým ukazatelem celkové aktivity nemoci nebo úspěšnosti léčby, je u této komplikované, potenciálně letální nemoci na místě pátrat po vhodných biomarkerech a analyzovat kandidátní molekuly pro terapii SSc, které by se mohly rovněž stát cílem terapie jiných fibrotických onemocnění.

2. Cíle diplomové práce

- Zjistit koncentrace Hsp90 v plazmě a expresi Hsp90 mRNA v mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC) u pacientů se SSc oproti zdravým jedincům
- Naměřit sérové koncentrace IL-35, S100A4 a jejich expresi na mRNA úrovni v PBMC u pacientů se SSc oproti zdravým jedincům
- Zhodnotit možné asociace naměřených parametrů s aktivitou onemocnění a orgánovým postižením u SSc

3. Teoretický úvod

3.1. Systémová sklerodermie

3.1.1. Definice

Systémová sklerodermie (SSc) je vzácné chronické onemocnění pojivové tkáně s doposud neznámou etiologií. SSc patří mezi systémové heterogenní onemocnění s variabilním, nepředvídatelným průběhem. Toto multiorgánové onemocnění postihuje zejména kůži, srdce, plíce, ledviny a gastrointestinální trakt. SSc je charakterizována zejména fibrotizací kůže a/nebo vnitřních orgánů, produkcí specifických autoantilát, zánětem a vaskulopatií (Abraham and Varga, 2005). Vzájemné propojení těchto tří klíčových patologických procesů odlišuje SSc od jiných systémových onemocnění pojiva a od různých nereumatických fibrotizujících postižení jednotlivých orgánů.

SSc lze podle klinických manifestací rozdělit na dva základní podtypy lišící se rozsahem kožního postižení – limitovaná (lcSSc, limited cutaneous SSc) a difúzní (dcSSc, diffuse cutaneous SSc) (Christopher P Denton, 2001; Silman, 1995). Limitovaná forma SSc je charakterizována zejména cévním poškozením, fibrózou kůže distálně od loktů a kolen, oblasti krku a obličeje a orgánů s pomalejším a pozvolnějším průběhem. Zatímco difúzní forma SSc, u které dochází k rychlé progresi fibrózy kůže (na rozdíl od lcSSc včetně oblastí proximálně od kolen a loktů, břicha a zad), plic a dalších vnitřních orgánů, nese nejvyšší riziko úmrtí ze všech systémových onemocnění pojiva s délkou přežití 10 let v 55% (Silman, 1995). Jelikož dosud nebyla objevena účinná kauzální terapie, zůstává SSc nevléčitelnou nemocí i přesto, že se kvalita a délka života pacientů v poslední době neustále zlepšuje díky účinnější symptomatické léčbě orgánových manifestací a komplikací (Christopher P Denton, 2001).

3.1.2. Epidemiologie

Světové studie zabývající se SSc zaznamenaly výskyt tohoto onemocnění po celém světě (Chiffot et al., 2008). Incidence SSc se pohybuje od 1,2 až do 23 případů na milion za rok (Ranque and Mouthon, 2010). Prevalence SSc je odhadována na 31 až 350 na milión obyvatel (Ranque and Mouthon, 2010). SSc se objevuje průměrně tři krát častěji u žen než u mužů (rozsah udávaný v různých studiích je 2-10x častěji u žen), což potvrzují všechny studie zabývající se tímto onemocněním (Chiffot et al., 2008). Nejčastěji dochází ke stanovení diagnózy SSc u žen v postmenopauzálním (průměrný

věk ve studiích 45 let, běžný rozsah věku 25 – 65 let) (Dieppe, 2002). V řadě dalších autoimunitních onemocnění je také popsáno vyšší zastoupení žen než mužů, které je často spojováno s poruchou v základním procesu náhodné inaktivace jednoho z chromosomů X, což může být vysvětlením i pro převahu žen u SSc (Knudsen et al., 2009). Původní práce vysvětlovaly převahu ženského pohlaví na základě mikrochimerických partikulí u žen po porodu (Cockrill et al., 2010). Avšak recentní práce na velké kohortě australských žen se SSc nepotvrdila žádné významné asociace mezi výskytem SSc a počtem, pořadím či pohlavím narozených dětí oproti kontrolní skupině (Russo et al., 2014). Prevalence SSc v rodinách (1,6%) je několikrát vyšší oproti běžné populaci (0,02-0,03%) a konkordance u monozygotních dvojčat se pohybuje okolo 5% (Feghali-Bostwick et al., 2003). Nedávná studie zabývající se genetickou podstatou SSc popsala určitou roli několika genů (alely HLA- DQA1*0501 a DQB1*0301, IRF5, STAT4 a gen pro fibrillin-1 atd.) účastnících se regulace imunitního systému, které zvyšují predispozici jedince pro rozvoj SSc (Agarwal et al., 2008; Assassi et al., 2013; Siracusa et al., 1996).

Mezi další potenciální spouštěcí činitele SSc patří environmentální faktory: např. práce s organickými rozpouštědly, oxidem křemičitým, vinyl chloridem, bakteriální či virové infekce, léky (bleomycin, pentazocin atd.) a pesticidy; avšak podíl skutečně prokázaných etiologických faktorů na všech nových případech SSc se pohybuje v jednotkách procent (Mora, 2009).

Etiologie SSc závisí pravděpodobně na interakci geneticky predisponovaných jedinců a určitých environmentálních faktorů, což může vést ke ztrátě imunologické tolerance a k aktivaci profibrotických mechanismů (Allanore et al., 2010).

3.1.3. Klinický obraz

SSc patří mezi onemocnění s velmi heterogenním průběhem i rozsahem postižení. Nedávná studie zkoumající skupinu téměř 500 pacientů se SSc uvedla, že mezi pěti nejčastějšími subjektivními příznaky uváděnými pacienty patří únava (89%), Raynaudův fenomén (86%), ztuhlost rukou (81%), artralgie (81%) a poruchy spánku (76%). K dalším nespecifickým projevům tohoto onemocnění patří nechutenství s následnou ztrátou na váze, febrilie a v pozdějším stádiu SSc i reaktivní deprese (Bassel et al., 2011; Gabrielli et al., 2009; Varga and Abraham, 2007). K nejtypičtějším projevům SSc patří kožní postižení (obr. 1A). U pacientů dochází na počátku onemocnění nejprve

k difúzním edematózním změnám na prstech, zejména horních končetin, na předloktích, krku a obličeji. V pozdějších fázích následuje ztuhnutí a ztlustění kůže, která je tuhá, silně napnutá a lesklá. Pacienti se SSc mívají charakteristický maskovitý vzhled obličeje, úzký nos a radiální rýhy kolem úst. Dále se často u pacientů objevují podkožní kalcifikace a teleangiektázie (rozšíření drobných cév) (Heldin and Westermarck, 1999; Krieg and Takehara, 2009; Varga and Abraham, 2007).

U SSc často dochází k postižení malých cév, což vede k rozvoji nejčasnějšího a nejhojnějšího symptomu tohoto onemocnění – Raynaudův fenomén (97%) (obr. 1B). Raynaudův fenomén je způsoben ataky reverzibilní vazokonstrikce a je charakterizován recidivujícími barevnými změnami a bolestmi periferních částí těla – prsty dolních a horních končetin, vzácněji nos, uši a jazyk. Mezi faktory vyvolávající tento syndrom patří nadměrný stres nebo chlad. Poruchy malých cév vedou k nedostatečnému krevnímu zásobení postižených oblastí a rozvoji digitálních ulcerací (obr. 1C), nekrózy a gangrény prstů. Poškození větších cév se může u SSc projevit jako plicní arteriální hypertenze, sklerodermická renální krize a antrální vaskulární ektázie žaludku (Gabrielli et al., 2009; Kahaleh et al., 1979; Varga and Abraham, 2007).

Mezi další symptomy SSc patří myalgie (bolest svalů), myopatie (postižení většinou proximálních svalových skupin projevující se svalovou slabostí), artralgie (bolest kloubů) a ranní ztuhlost kloubů (Boin and Rosen, 2007; Gabrielli et al., 2009). Dalším projevem SSc je postižení trávicího traktu, při kterém dochází k poruše motility, atrofii hladkého svalstva a fibrotizaci tkání. Gastrointestinální postižení může následně vést k rozvoji dysfagie (poruchy polykání), pyrózy (pálení žáhy), průjmu, nadýmání a zácpě (Gabrielli et al., 2009; Gyger and Baron, 2012; Varga and Abraham, 2007). Většina pacientů se SSc trpí plicním postižením, které je charakterizováno dušností a suchým kašlem. Dochází k postižení plicních cév (konkrétně k plicní arteriální hypertenzi), což může vést až k srdečnímu selhávání (Gabrielli et al., 2009; M. Hassoun, 2011; Varga and Abraham, 2007). Nejčastějšími manifestacemi srdečního postižení jsou palpitace (bušení srdce), dušnost a pacient pociťuje neobvyklé bolesti na hrudi (Parks et al., 2014). U SSc může docházet k rozvoji sklerodermické renální krize projevující se rychle progredující oligurií až anurií, arteriální hypertenzí a selháním ledvin s nutností hemodialýzy ve většině případů a/nebo končící transplantací ledvin (obr. 1D) (Sabir et al., 2013).

Mezi méně obvyklé projevy SSc patří postižení nervového systému, při kterém dochází k neuropatii hlavových a periferních nervů a k rozvoji syndromu karpálního

tunelu. Někteří pacienti se SSc v důsledku fibrotických změn na slinných žlázách vyvinou sekundární Sjögrenův syndrom, který se jinak může vyskytovat i jako samostatné primární/idiopatické revmatické onemocnění projevující se nejčastěji suchostí v očích (xeroftalmie) a ústech (xerostomie). Častým projevem SSc jsou i inkontinence, sexuální dysfunkce (impotence, pokles/ztráta libida, vulvodynie – bolesti v pochvě při pohlavním styku), spontánní aborty a předčasné porody (Gabrielli et al., 2009; Varga and Abraham, 2007).

Obrázek 1: Klinické projevy systémové sklerodermie

A



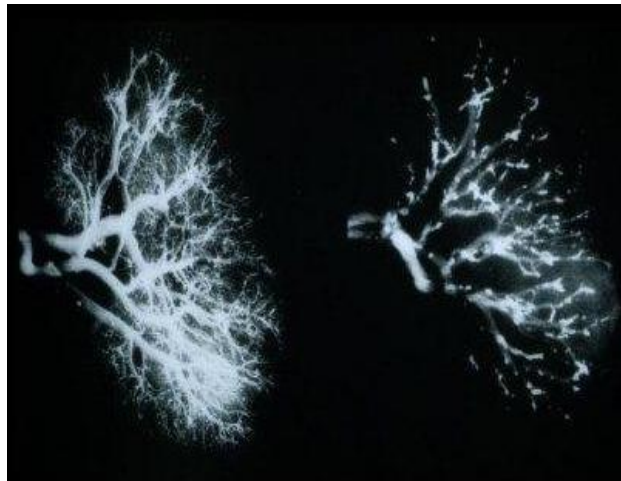
B



C



D



[A: kožní postižení, ztuhnutí a ztlustění kůže připomínající voskovitou struktura, snížená pohyblivost kloubů, dyspigmentace (porucha, tj. nadbytek či nedostatek pigmentu), retrakční defekty nad metakarpofalangeálními klouby, drápkovité postavení ruky vzhledem ke kontrakturám

B: Raynaudův fenomén, funkční tepenné poruchy vedoucí k charakteristickým dvou- nebo třífázovým barevným změnám- zblednutí / zfialověnutí / zčervenání konečků prstů

C: Vznik digitálních ulcerací na podkladě nedostatečného prokrvení postižených periferních oblastí (vaskulopatie)

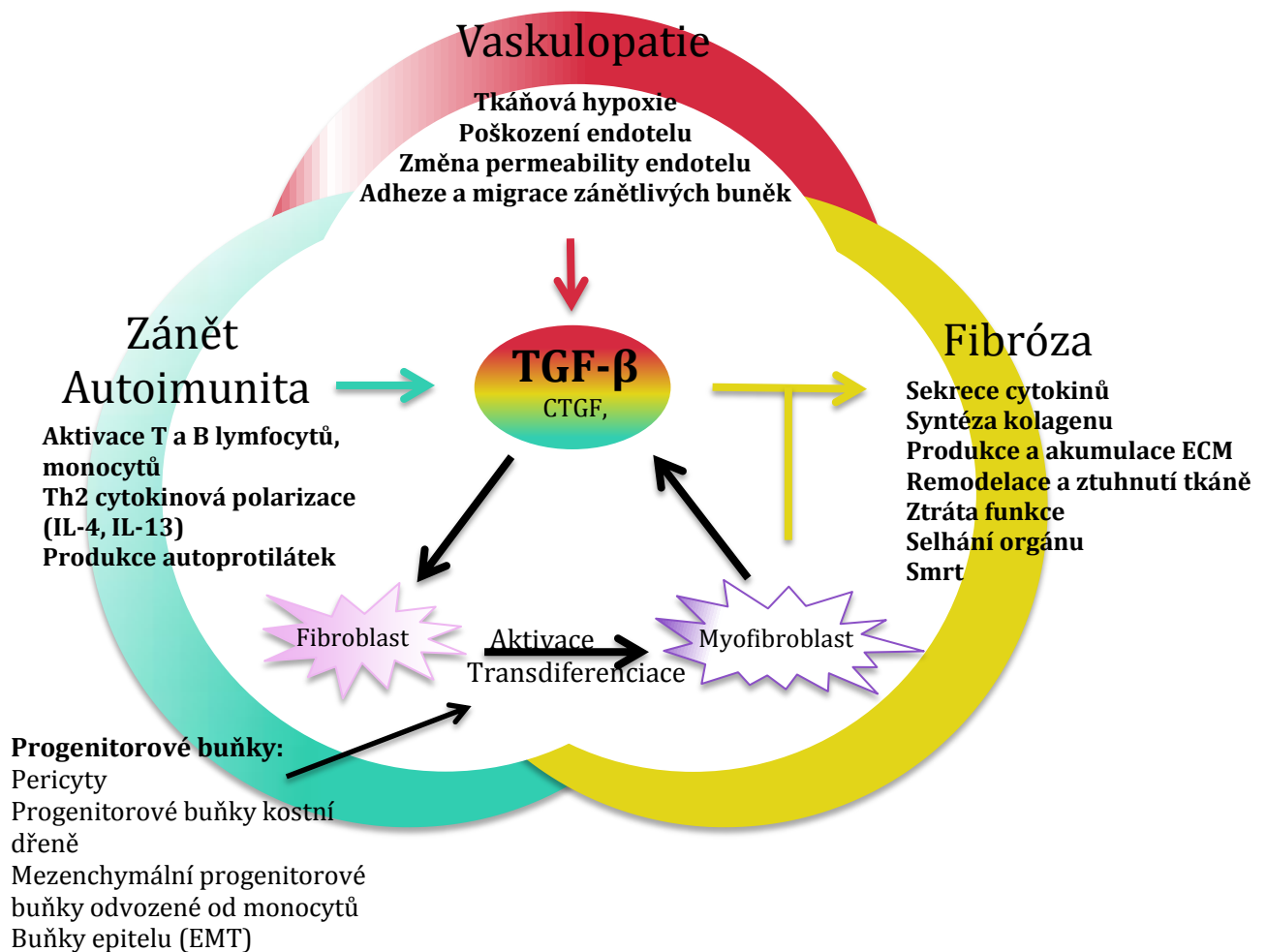
D: Zobrazení tepenního průtoku zdravé ledviny (vlevo) a ledviny u pacienta se sklerodermickou renální krizí (vpravo)]

Převzato z volně dostupné databáze EUSTAR- Euler Scleroderma Trials and Research (eustar.org)

3.1.4. Patogeneze

Současné poznatky o patogenezi SSc poukazují na tři vzájemně propojené patologické procesy (obr. 2): (i) vaskulopatie postihující cévní lůžka, (ii) autoimunitní a zánětlivé procesy a (iii) progresivní intersticiální a perivaskulární fibróza. Patogenezi SSc lze rozdělit na časnou, převážně zánětlivou, a pozdní, více fibrotickou fázi, ve které již postupně dochází k vstřebávání zánětlivého infiltrátu (Varga and Abraham, 2007).

Obrázek 2: Patologické procesy



(TGF-β: transformující růstový faktor beta, CTGF: růstový faktor pojivové tkáně, PDGF: růstový faktor krevních destiček, ECM: extracelulární matrix, EMT: epiteálně-mezenchymální tranzice)
Převzato a upraveno podle (Varga and Abraham, 2007).

3.1.4.1. Vaskulopatie

Vaskulopatie (poškození cév) a poškození endotelu se považuje za primární procesy v patogenezi SSc (Gabrielli et al., 2009), neboť Raynaudův fenomén se u pacientů s lcSSc vyskytuje i několik let před rozvojem dalších klinických manifestací, jako je kožní fibróza, a patří též mezi první nejčastější specifické symptomy u pacientů s dcSSc. V časných stadiích SSc tak dochází ke vzniku mikrovaskulárních změn: k rozšíření průsvitu a snížení počtu kapilár a ke vzniku mikrohemoragií (drobných krvácivých projevů) v důsledku poškození endotelu kapilár a extravazace. Na periférii dochází k apoptóze endoteliálních buněk kožních kapilár, což se zdá být také dalším časným patofyziologickým procesem, který předchází celkovému úbytku funkčních malých tepen a kožní fibróze, typických příznaků v pozdější fázi SSc (Kahaleh, 2008; Manetti et al., 2010; Wigley, 2009). Dodnes není stále přesně známo, co způsobuje toto progresivní vaskulární postižení. Mnoho studií se přiklání k chronickému zánětu, který z velké části přispívá k rozvoji vaskulopatie, ale některé práce poukazují i na možný vliv environmentálních faktorů, zmíněných v epidemiologii, na poškození endotelu (např. vibrace, práce v chladném prostředí).

Přítomnost perivaskulárních zánětlivých infiltrátů, zejména T-lymfocytů a makrofágů, v časně fázi onemocnění indukuje aktivaci imunitního systému (Manetti et al., 2010). Zánětlivé buňky, endoteliální buňky a krevní destičky infiltrující postižené tkáň jsou aktivovány a podněcují uvolňování prozánětlivých cytokinů (interleukinu 6, IL-6), růstových faktorů (VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor, PDGF – růstový faktor z krevních destiček) a chemokinů, což vede k další akumulaci zánětlivých buněk a k rozvoji vaskulopatie.

Během vaskulárních změn dochází k progresivní ztrátě endoteliálních buněk v důsledku indukce apoptotické buněčné smrti. Apoptóza endoteliálních buněk s následnou ztrátou funkčních kapilár vede k nedostatečnému zásobování tkání kyslíkem a živinami (Manetti et al., 2010). Chronická hypoxie následně aktivuje reparační mechanismy imunitního systému, které se snaží o její korekci a vyvolávají nadprodukcí VEGF a angiogenezi (novotvorbu kapilární sítě ze stávajících poškozených kapilár), jež je u SSc neefektivní, chaotická a desorganizovaná, díky čemuž vznikají cévní malformace, obrovské, vakovité a keříkovité kapiláry (Distler et al., 2004). Další snahou o nápravu je tvorba nových cév *de novo* (vaskulogeneze) z progenitorů endoteliálních buněk, jejichž počet je však u SSc snížen a vede tak k nedostatečné

vaskulogenezi (Distler et al., 2009). U SSc je porušena správná funkce pericytů, které tak zabraňují efektivní angiogenezi, migraci a proliferaci buněk endotelu a jsou zodpovědné za perivaskulární depozici extracelulární matrix (ECM) a fibrózu (Varga and Abraham, 2007).

3.1.4.2. Imunitní systém a autoimunita

Autoimunita je považována za jeden z hlavních dějů, který má významnou roli v patogenezi SSc (Chizzolini et al., 2011; Varga and Abraham, 2007). Aktivace imunitního systému je typická pro časnou fázi SSc, ale stále není známo, zda se jedná o příčinu nebo o důsledek endoteliálního poškození. Perivaskulární zánětlivé infiltráty jsou znatelné již v počátcích onemocnění, což naznačuje, že rozvoj chronického a perzistentního zánětu přispívá k patogenezi SSc. Přítomnost zánětu v SSc kůže je často detekovatelná již před počátkem výskytu projevů fibrózy. Předpokládá se tedy, že teprve cytokiny produkované zánětlivými buňkami působí na SSc fibroblasty, které následně zvyšují produkci ECM. Mezi hlavní profibrotické mediátory patří TGF- β (transformující růstový faktor beta), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) nebo CTGF (růstový faktor pojivové tkáně), které jsou produkované nejen zánětlivými buňkami, ale i keratinocyty, endoteliálními buňkami a fibroblasty (Christopher P Denton, 2001). Zvýšená exprese profibrotických mediátorů však přetrvává i po vstřebání zánětlivých infiltrátů. Ačkoliv tento mechanismus není doposud zcela objasněn, kontinuální sekrece profibrotických faktorů vede k vývoji aktivovaného fenotypu SSc fibroblastů s přetrvávající autonomní aktivací i bez exogenních (prozánětlivých a/nebo profibrotických) stimulů.

Perivaskulární infiltráty v SSc kůži jsou složeny zejména z T lymfocytů, makrofágů a žírných buněk a v menší míře i z B lymfocytů. Pro SSc je charakteristická převaha imunitní reakce zprostředkovaná Th2 lymfocyty nad reakcí cytotoxických Tc lymfocytů. Th2 imunitní odpověď má významnou roli v patogenesi SSc. Sérové hladiny IL-4, který je typickým cytokinem produkovaným Th2 lymfocyty, jsou zvýšené u pacientů se SSc (Distler and Distler, 2008; Pannu and Trojanowska, 2004). IL-4 je důležitým regulátorem humorální imunitní odpovědi, neboť podněcuje aktivaci B lymfocytů a produkci protilátek, dále pak stimuluje proliferaci fibroblastů, zvyšuje produkci kolagenu a diferenciaci fibroblastů v α -smooth muscle actin (α -SMA)-exprimující myofibroblasty (tzv. aktivované fibroblasty odpovědné za zvýšenou sekreci

složek ECM). Mimo jiné indukuje produkci profibrotických cytokinů TGF- β a CTGF. Th1 imunitní reakce jsou na rozdíl od Th2 značně potlačeny, což vede k snížené sekreci antifibrotických cytokinů IFN- γ (interferon gama) a IL-10 (Distler and Distler, 2008; Pannu and Trojanowska, 2004). B-lymfocyty utváří sice jen malou část buněk zánětlivého infiltrátu u SSc, i přesto hrají významnou roli v diagnostice SSc a pravděpodobně i v její progresi. Abnormální chronická aktivace B lymfocytů vede k nerovnováze cytokinů, která následně může indukovat Th2 predominanci i vznik fibrózy, neboť aktivované B-lymfocyty jsou zdrojem IL-6 a IL-10, které stimulují proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu (Gabrielli et al., 2009; Varga and Abraham, 2007). Zásadní patofyziologický význam B lymfocytů je potvrzen přítomností nespecifických antinukleárních protilátek (ANA) a dalších pro SSc specifických autoprotilátek v séru u většiny pacientů se SSc (Gabrielli et al., 2009): např. (i) anticentromerové protilátky (ACA) - jsou silně asociovány s podtypem lcSSc a s plicní arteriální hypertenzí (ii) protilátky proti topoizomeráze I (anti-Scl-70) jsou typické pro dcSSc a asociovány s horší prognózou a intersticiálním plicním postižením a (iii) protilátky proti RNA III polymeráze jsou zas asociovány s vyšším rizikem rozvoje sklerodermické renální krize a s výskytem nádorů tzv. synchronních s rozvojem SSc (tj. výskyt nádoru v průběhu +/- 2 let od prvních symptomů SSc). Dosud však nebylo objasněno, jakým způsobem přispívají tyto tři nejtypičtější specifické autoprotilátky k vyjádření daného fenotypu SSc, se kterým jsou asociovány; zdali je jejich role patognomická anebo se jedná o epifenomén. Autoprotilátky proti buňkám endotelu podněcují jejich apoptózu. Avšak přítomnost těchto autoprotilátek může být také epifenomémem následujícím po buněčné smrti (Carvalho et al., 1996; Gabrielli et al., 2009). Mezi další autoprotilátky patří protilátky proti receptorům pro PDGF (růstový faktor z destiček), které paradoxně stimulují syntézu kolagenu a produkci reaktivních forem kyslíku. Nedávno byly detekovány v séru pacientů se SSc protilátky proti receptoru pro angiotensin II a receptoru pro endothelin-1, které indukují profibrotickou odpověď fibroblastů. Kromě jejich stimulačních efektů na fibroblasty, tyto protilátky také korelují s vaskulárním poškozením a horším průběhem onemocnění (Riemekasten et al., 2011).

3.1.4.3. Fibróza

Fibróza, dominantní rys SSc, je výsledkem abnormální aktivity fibroblastů a jejich nadbytečné produkce kolagenních vláken a složek ECM. ECM je složena z proteinů, jako jsou zejména kolageny a proteoglykany, dále pak fibriliny, fibronektiny a adhezní molekuly. Za fyziologických podmínek je novotvorba a degradace ECM udržována a v rovnováze přísnou regulací dvou parametrů: (i) syntéza kolagenu fibroblasty a (ii) degradace komponent ECM metaloproteinázami a dalšími enzymy. Tato rovnováha je u SSc porušena ve prospěch nadměrné syntézy kolagenních vláken SSc fibroblasty, která není dostatečně kompenzována zvýšenou aktivitou kolagenáz (Geyer and Müller-Ladner, 2011; Hunzelmann and Brinckmann, 2010; Varga and Abraham, 2007).

Hlavními buněčnými efekty fibrogenese jsou fibroblasty, které za normálních podmínek udržují složení ECM uvolňováním jejich strukturních složek, kolagenu a fibronektinu a regulací degradace ECM sekrecí proteáz, kolagenáz. Během hojení ran jsou fibroblasty přechodně aktivovány a poté, co se rána zahojí a dojde k ústupu zánětu a profibrotických podnětů, se opět navrací do klidového stavu na rozdíl od fibroblastů u pacientů se SSc, které zůstávají trvale aktivovanými (Geyer and Müller-Ladner, 2011; Chang et al., 2002). Pro aktivovaný fenotyp fibroblastů je charakteristická nadprodukce kolagenu a dalších složek ECM, sekrece cytokinů a chemokinů a zvýšená exprese membránových receptorů vážících profibrotické mediátory (Pannu and Trojanowska, 2004). SSc fibroblasty také častěji podléhají transdiferenciaci v myofibroblasty, vysoce aktivovaný, kontraktilní fenotyp, pro nějž je charakteristická exprese α -SMA. Za fyziologických podmínek je přítomnost myofibroblastů limitována jen po dobu hojení a utváření jizev. Avšak myofibroblasty u SSc přetrvávají ve stavu podobného chronickému hojení ran (Desmoulière et al.) Počet myofibroblastů je zvýšen v kůži pacientů se SSc a koreluje s intenzitou kožního postižení. Kromě fibroblastů podléhajícím transdiferenciaci jsou dalším zdrojem pro myofibroblasty epitelové buňky a progenitory z kostní dřeně, které podléhají za patologických okolností (např. tumorigeneze, renální a plicní fibróza) epiteliálně-mezenchymální tranzici (Varga and Abraham, 2007).

Autokrinní aktivace TGF- β byla popsána jako jeden z mechanismů účastnících se endogenní aktivace SSc fibroblastů. SSc fibroblasty na svém povrchu exprimují zvýšený počet TGF- β receptorů, což vede k robustní odpovědi na TGF- β podnět (Pannu and Trojanowska, 2004). Dále SSc fibroblasty reagují na TGF- β stimulaci upregulací PDGF a CTGF receptorů. K dosažení plného fenotypu aktivovaných SSc fibroblastů však nestačí

pouze stimulace TGF- β , předpokládá se účast dalších mechanismů- epigenetické modifikace, změny signálních dráh integrinů a mezibuněčné kontakty s dalšími buněčnými typy včetně buněk zánětlivého infiltrátu, endotelu, epitelu a destiček (Varga and Abraham, 2007).

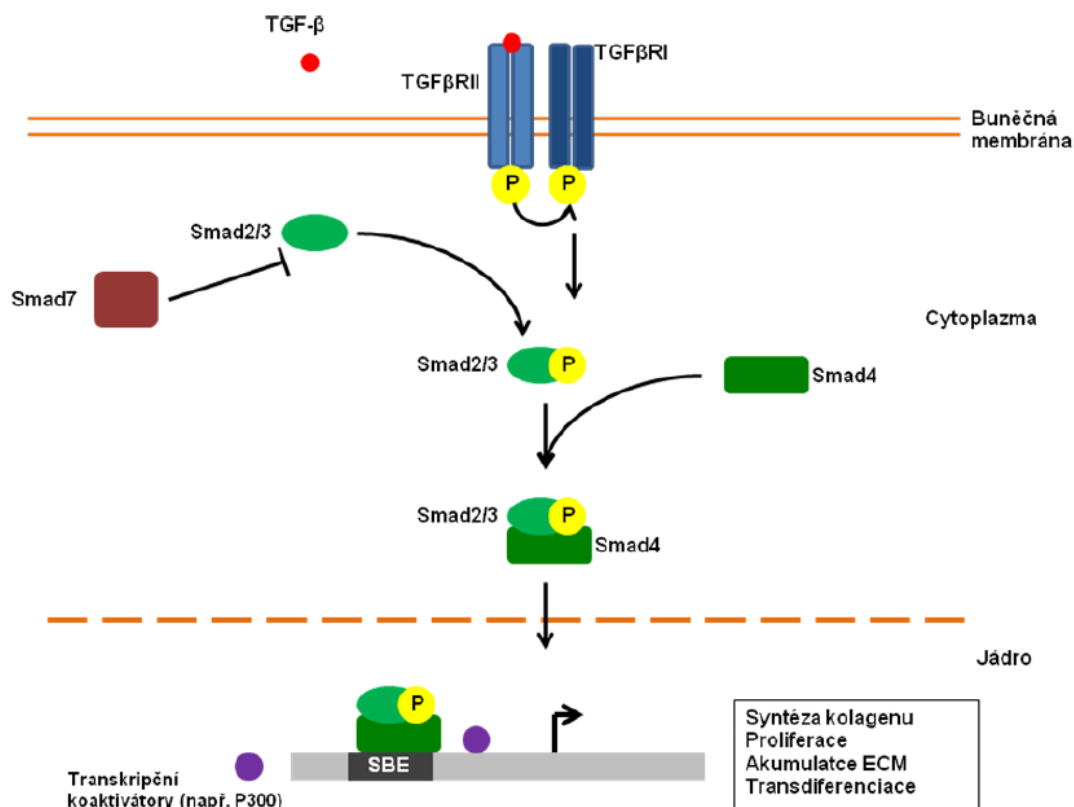
TGF- β je pluripotentní růstový faktor s inhibičními i stimulačními vlastnostmi, kterými působí na proliferaci, apoptózu a syntézu proteinů epiteliálních buněk, mezenchymálních buněk a buněk imunitního systému (monocyty, T lymfocyty) (Wahl, 2007) Má významnou roli jak v mnoha fyziologických procesech, jako je embryogeneze nebo hojení (Massagué, 1998; McCartney-Francis et al., 1998), tak i v patologických procesech - např. u nádorů. Tento růstový faktor je produkován celou řadou buněk, které jsou zapojeny do patogeneze SSc, včetně fibroblastů, endoteliálních buněk, destiček a lymfocytů. TGF- β je pro svou schopnost stimulovat fibroblasty k aktivaci a zvýšené produkci složek ECM řazen mezi hlavní regulátory fibrogenese (Varga and Abraham, 2007). U fibroblastů získaných od pacientů se SSc byla zjištěna změna v signální dráze TGF- β , která způsobuje autokrinní stimulaci TGF- β , jenž vede k syntéze kolagenu a dalších komponentů ECM. Bylo prokázáno, že transkripce kolagenu typu I a dalších více než 60 různých genů ECM je regulována Smad dependentní signální dráhou TGF- β (obr. 3). Je popsána i celá řada Smad nondependentních signálních dráh TGF- β , ve kterých je TGF- β signál přenášen z membrány do jádra pomocí různých kináz (např. JNK, Rho, ERK, atd.) (obr. 4). Transdiferenciace fibroblastů v myofibroblasty je také řízena TGF- β . TGF- β indukuje produkci i dalších profibrotických mediátorů jako CTGF, který je řazen také mezi důležité mediátory fibrogenese u SSc (Blobe et al., 2000; Leask, 2009).

CTGF vyvolává proliferaci fibroblastů a endoteliálních buněk a produkci složek ECM. CTGF slouží mimo jiné i jako chemoatraktant pro mezenchymální buňky. Několik studií popsalo schopnost CTGF indukovat profibrotické geny, včetně kolagenu typu I, v synergii s TGF- β (Abraham, 2008). Zvýšená exprese CTGF byla detekována v kůži pacientů se SSc i u experimentálních zvířecích modelů SSc. Byla prokázána signifikantně vyšší exprese CTGF v kožních biopsiích pacientů se SSc oproti kožním biopsiím od zdravých kontrol a zvýšené koncentrace CTGF uvolněného z SSc fibroblastů do supernatantu (Abraham, 2008).

PDGF je důležitým cytokinem v mnoha fyziologických procesech, ale je také součástí patologických reakcí a je považován za klíčového mediátorema u plicní

arteriální hypertenze a u plicní fibrózy (Heldin and Westermark, 1999). Makrofágy a krevní destičky jsou hlavním zdrojem tohoto cytokinu, ale je též uvolňován dalšími typy buněk, jako jsou fibroblasty. Exprese PDGF a jeho receptoru byla pomocí imunohistochemického barvení prokázána v kůži pacientů se SSc, nikoliv však v kůži zdravých kontrol. Podmíněná aktivace PDGF receptoru u myších modelů taktéž vede k rozvoji kožní i orgánové fibrózy (Trojanowska, 2008)(Stifano et al., 2011).

Obrázek 3: Smad-dependentní signální kaskáda TGF- β

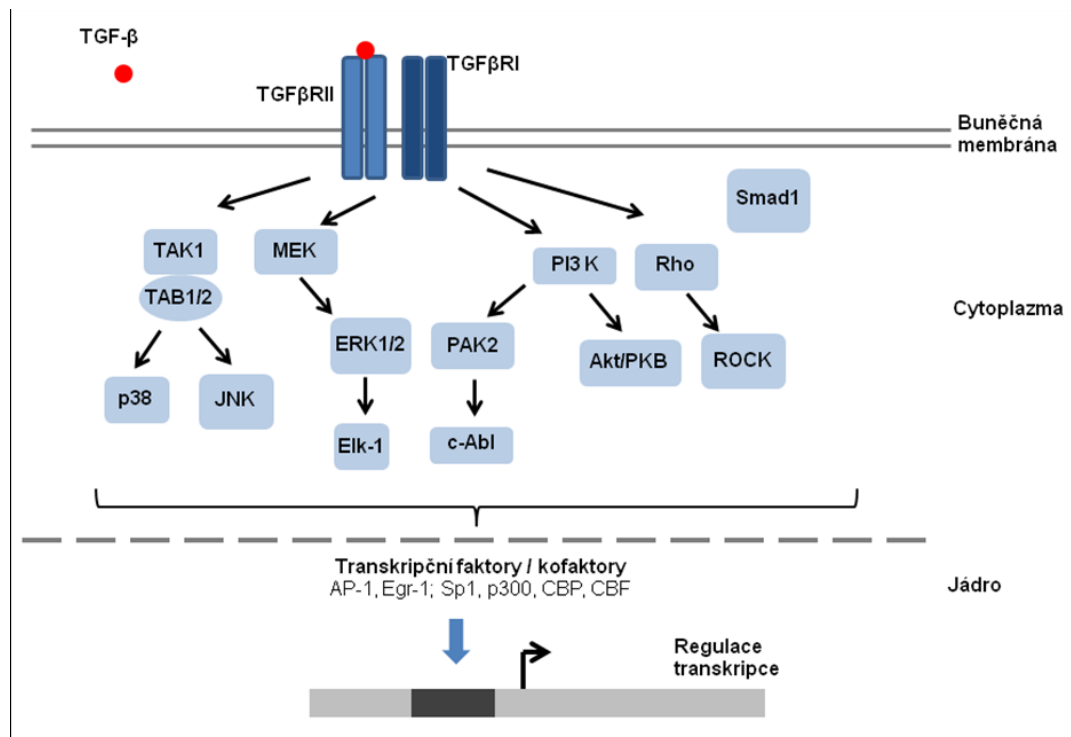


(Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu, která fosforyluje v cytoplasmě přítomné proteiny Smad2 a Smad3. Ty tvoří komplex se Smad4, který je translokován do jádra fibroblastu, váže se na Smad Binding Element-sekvenci DNA a společně s transkripčními faktory a kofaktory (např. P300) reguluje expresi cílových genů (hlavně komponent ECM).

TGF- β , transforming growth factor beta; TGF- β RII, transforming growth factor beta type II receptor; TGF- β RI, transforming growth factor beta type I receptor; SBE, Smad Binding Element; p300, E1A binding protein p300; ECM, extracelulární matrix)

Převzato (Varga and Abraham, 2007)

Obrázek 4: Smad-nedependentní signální kaskáda TGF- β



(Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu, která fosforyluje v cytoplazmě přítomné četné kaskády kináz, které společně s transkripčními faktory a kofaktory regulují expresi cílových genů (hlavně složek ECM) v jádře fibroblastu. Tyto signální cesty mohou interagovat se Smad-dependentní signální kaskádou i působit zcela nezávisle.

TGF- β , transforming growth factor beta; TGF β RII, transforming growth factor beta type II receptor; TGF β RI, transforming growth factor beta type I receptor; TAK1, TGF- β activated kinase 1; TAB1/2, TAK1-binding protein 1/2; p38, p38 a JNK (c-Jun N-terminal kinase) jsou MAPKs (mitogen-activated protein kinases); MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinases; Elk-1, E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinases; PAK2, p21-activated kinase 2; c-Abl, cytoplasm-Abelson tyrosine kinase; Akt/PKB, protein kinase B; ROCK, Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; AP-1, acivator protein 1; EGR-1, early growth response 1; SP1, specificity protein 1; p300, E1A binding protein p300; CBP, CREB-binding protein; CBF, Core binding factor)

Převzato (Varga and Abraham, 2007)

3.2. S100A4 protein

S100A4 protein (mts1 pEL, p9Ka, FspI, CAPL, calvasculin) patří do velké skupiny S100 proteinů, která je tvořena více než 25 kyselými proteiny o molekulové hmotnosti 10- 12 kDa. Poprvé byly detekovány v hovězím mozku a díky své schopnosti rozpouštět se ve 100% roztoku síranu amonného následně získaly pojmenování S100 (Moore, 1965). Dalším charakteristickým znakem těchto proteinů jsou dva strukturální proteinové motivy, tzv. „EF- vazebné domény“, prostřednictvím nichž jsou tyto proteiny schopné vázat vápenaté ionty s různou afinitou (Isobe and Okuyama, 1978). Po navázání kalcia dochází u S100 proteinů ke strukturním změnám, které umožňují navázání cílové molekuly (Santamaria-Kisiel et al., 2006). Kromě vápenatých iontů ovlivňují strukturu a působení S100 proteinů také zinečnaté a měďnaté ionty (Heizmann and Cox, 1998). S100 proteiny se podílejí na řadě buněčných procesů jak v intracelulárním, tak v extracelulárním prostředí. Převážná část proteinů z této skupiny se však vyskytuje intracelulárně, kde se podílejí na regulaci biologických pochodů, mezi které patří např. proliferace, apoptóza, buněčná motilita a remodelace ECM (Donato, 2003). V extracelulárním prostředí se S100 proteiny svými funkcemi a chováním podobají cytokinům (Hofmann et al., 1999; Huttunen et al., 2000). S100 proteiny a jejich modifikované exprese byly zkoumány a detekovány u řady onemocnění, jako jsou zánětlivá, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, diabetes mellitus či alergie (Donato, 2003). Poměrně značná část dosud identifikovaných členů S100 rodiny se však účastní a jejich zvýšená exprese je spojována s mnoha nádorovými onemocněními (Marx, 2004).

S100A4 je kyselý termolabilní protein o molekulové hmotnosti 11 kD a byl poprvé izolován u myši jako gen, který je tvořen metastatickými buňkami adenokarcinomu mléčné žlázy (Ebralidze et al., 1989). Přítomnost tohoto proteinu byla detekována jen ve velmi malém množství i ve zdravé tkáni, avšak doposud nejsou zcela objasněny jeho funkce ve fyziologickém prostředí (Gibbs et al., 1995; Takenaga et al., 1994).

Studie zabývající se S100A4 u myši popsaly jeho možnou tvorbu neurony, buňkami hladkého svalstva, endoteliálními buňkami krevních cév, epiteliálními buňkami, jaterními buňkami, parietálními buňkami žaludku, hnědou tukovou tkání a některými buňkami imunitního systému (Gibbs et al., 1995; Grigorian et al.). Přítomnost S100A4 proteinu, produkovaného imunitními buňkami (makrofágy, dendritickými a

žirnými buňkami, neutrofilními leukocyty a některým typem T lymfocytů), pericyty a také synoviálními fibroblasty, byla prokázána ve stádiu chronického zánětu (Klingelhöfer et al., 2007).

Funkční S100A4 protein je schopný utvářet homodimery, heterodimery (S100A4/S100A1), oligomery či multimery (Tarabykina et al., 2000; Wang et al., 2000). Jako člen S100 proteinové rodiny, má S100A4 jak intracelulární tak i extracelulární funkce. V intracelulárním prostředí ovlivňuje a reguluje buněčné pochody prostřednictvím vazby na cílové molekuly, mezi které patří např. liprin β 1 (Kriajevská et al., 2002) a nesvalový myosin II (Kriajevská et al., 1994), významné molekuly pro adhezi a motilitu buněk. Důležitou roli hraje vazba S100A4 na tumor supresorový protein p53, vedoucí k následné regulaci programované buněčné smrti – apoptóze (Davies et al., 1993; Grigorian et al., 2001). Extracelulární S100A4 působí na angiogenezi (Ambartsumian et al., 2001) a podílí se na remodelaci ECM svým vlivem na produkci proteolytických enzymů (Senolt et al., 2006; Schmidt-Hansen et al., 2004). Dále bylo zjištěno, že S100A4 je v extracelulárním prostředí schopen stimulovat migraci astrocytických tumorových buněk (Belot et al., 2002) a růst neuritů primárních hipokampálních neuronů (Novitskaya et al., 2000).

3.2.1. Význam S100A4 u nádorových onemocnění

Při tvorbě nádorového bujení dochází k aktivaci velkého množství regulačních molekul, které hrají klíčovou roli v tomto komplexním biologickém procesu (Ambartsumian et al., 1996). Mezi zkoumané a studované regulační molekuly nádorových onemocnění patří i S100A4 protein, u kterého byl popsán vztah k tumorům a metastázám jak u transgenních myších modelů, tak u člověka (Ambartsumian et al., 1996; Gupta et al., 2003; Lee et al., 2004). Schopnost intracelulárního S100A4 vázat se na cytoskeletální struktury vede k regulaci motility nádorových buněk. Bylo také zjištěno, že u metastatických buněk dochází k interakcím mezi S100A4 a těžkým řetězcem nesvalového myosinu, což má za následek změny dynamiky myosinu (Kriajevská et al., 1994). Obdobně, vztah S100A4 proteinu s nesvalovým tropomyosinem vede k rozkladu filament aktinu (Takenaga et al., 1994).

Podstatou vzniku metastáz je separace buněk z tumoru, jejich následný průnik do krevního řečiště a adheze k okolním buňkám. Tento proces je zprostředkován adhezivními molekulami, mezi které patří například E-cadherin a laminin. Ve studiích, zabývajících se myšími i lidskými nádory, byla prokázána korelace mezi expresí S100A4

proteinu a transmembránovým glykoproteinem E-cadherinem. Bylo popsáno, že utlumením exprese E-cadherinu by mohlo dojít k navození invazivního chování buněk tumorů exprimujících S100A4 (Keirsebilck et al., 1998; Kimura et al., 2000). Dále bylo pomocí *in vivo* pokusů zjištěno, že S100A4 protein je schopný se specificky vázat na transmembránový protein liprin β 1, který hraje důležitou roli v signální kaskádě regulující adhezi buněk (Kriajevska et al., 2002).

Dále byla důkladně zkoumána souvislost S100A4 proteinu s tumor supresorovým proteinem p53, který patří mezi nejvýznamnější faktory regulující cyklus buňky. Bylo zjištěno, že v transformovaných a nádorových buňkách dochází k signifikantnímu zvýšení tohoto proteinu oproti jeho množství v nemutovaných buňkách (Parker et al., 1994). Studie zabývající se proteinem p53 prokázala pomocí experimentů na buněčných liniích, že indukce S100A4 ovlivňuje expresi genů p21/WAF a bax, které jsou regulovány právě proteinem p53 (Grigorian et al., 2001). V počátku nádorové progresse může vést zvýšení apoptózy, jenž je způsobená vazbou S100A4 na p53, ke ztrátě normální funkce p53 a k zvýšení přítomnosti mutovaného p53 s následným vývojem agresivnějšího buněčného fenotypu (Grigorian et al., 2001). Redukce apoptózy byla pozorována u myši s inaktivovaným genem pro S100A4, které byly vystaveny gama záření (EL Naaman et al., 2004).

Angiogeneze je nedílnou součástí růstu tumorů a tvorby metastáz. S100A4 protein reguluje expresi trombospondinu 1 (Roberts, 1996) a enzymů podílejících se na degradaci matrix (Grigorian et al., 2001; Schmidt-Hansen et al., 2004), čímž je schopen ovlivňovat proces novotvorby kapilár. Stimulační experimenty u endotelových buněk s oligomerní formou S100A4 prokázaly snížení exprese genu pro trombospondin 1 (Grigorian et al., 2001; Schmidt-Hansen et al., 2004). *In vitro* pokusy odhalily indukční účinky S100A4 oligomeru na chemotaktickou motilitu buněk endotelu, což může přispívat k zvýšení angiogeneze (Schmidt-Hansen et al., 2004). U endoteliálních buněk byl také potvrzen vztah S100A4 proteinu k matrixmetaloproteinázám (MMPs), u nichž došlo po stimulaci extracelulárním S100A4 k zvýšení produkce MMP-13. Naopak snížení exprese S100A4 u buněčné linie metastazujících buněk vedlo ke snížení exprese mRNA pro MMP-2, MMP-14 a TIMP-1 (Bjørnland et al., 1999). U MMP-9 byly prokázány podobné výsledky (Saleem et al., 2006). Dosavadní informace o progresivní funkci S100A4 u nádorových onemocnění, které byly získány během posledního desetiletí, potvrzují, že S100A4 protein má významný vliv na agresivitu a invazivitu nádorových

buněk a vznik metastáz (Helfman et al., 2005).

3.2.2. Význam S100A4 u autoimunitních onemocnění

Experimenty s proliferujícími synoviálními fibroblasty od pacientů s revmatoidní artritidou (RA) prokázaly zvýšené exprese některých genů, včetně S100A4 (Masuda et al., 2002). Přítomnost S100A4 mRNA byla detekována v synoviální tkáni pacientů s RA, v intersticiu i povrchové vrstvě synoviální výstelky - synoviální intimně, oproti zdravé kontrolní tkáni. V naší laboratoři byla detekována zvýšená exprese S100A4 proteinu nejen v synoviální tkáni, ale byly také nalezené zvýšené koncentrace v synoviální tekutině a v plazmě pacientů s RA oproti kontrolní skupině s osteoartrózou (OA) (Klingelhöfer et al., 2007; Senolt et al., 2006). Dále byl zaznamenán rozdíl ve struktuře S100A4 proteinu, ve které se vyskytuje v plazmě a v synoviální tekutině u pacientů s RA a OA. U pacientů s RA se nachází S100A4 v podobě bioaktivních oligomerů, zatímco u pacientů s OA byl přítomen ve většině případů ve formě dimerů. S100A4 protein je exprimován většinou buněk synoviální tkáně (fibroblasty, buňkami imunitního systému a cévního endotelu) oproti dalším členům S100 rodiny, které se účastní zejména zánětlivých dějů (S100A7, S100A8, S100A9 a S100A12). Extracelulární S100A4 protein je schopný stimulovat tvorbu enzymů degradujících matrix – MMPs u synoviálních fibroblastů, stejně jako u výše zmíněných nádorových buněk. Indukce exprese byla prokázána pro MMP-1, MMP-3, MMP-9 a MMP-13 (Senolt et al., 2006). Klingelhöfer a jeho kolegové detekovali zvýšenou expresi proteinu p53 v místech synoviální tkáně u pacientů s RA na rozdíl od synoviální tkáně u pacientů s OA. Tumor supresorový protein p53 lze stabilizovat pomocí extracelulárního oligomeru S100A4, což vede k fosforylaci v místě aminokyseliny Ser37 a tím k transkripci cílových genů pro p53 (p21, bcl-2, HDM2)(Klingelhöfer et al., 2007). Dodnes však není zcela objasněna přesná funkce a vliv S100A4 na buněčnou proliferaci či apoptózu buněk synoviální tkáně.

Doposud získané informace o S100A4 a jeho souvislosti s RA potvrzují jeho zvýšenou přítomnost nejen lokálně v místě zánětu, ale také systémově v krevním řečišti u těchto pacientů. V místě porušení kloubní chrupavky je S100A4 produkován synoviálními fibroblasty a zánětlivými buňkami, kde může být součástí regulačních pochodů ovlivňujících buněčnou proliferaci, apoptózu a tvorbu MMPs. Jedna ze studií zkoumající S100A4 protein detekovala pomocí western blotu a imunohistochemického barvení jeho výskyt i v artrotické chrupavce a chondrocytech na rozdíl od normální tkáně a buněk, kde nebyla zaznamenána jeho přítomnost. U chondrocytů byl navíc

prokázán stimulační efekt extracelulárního S100A4 proteinu na produkci MMP-13 prostřednictvím receptoru pro pokročilé glykační produkty (RAGE). Aktivovaný RAGE receptor pomocí S100A4 následně vedl k aktivaci signální dráhy NF- κ B a k tvorbě reaktivních kyslíkatých radikálů (Yammani et al., 2006).

Nedávná studie potvrdila přítomnost S100A4 proteinu u zánětlivého autoimunitního onemocnění kůže, psoriázy. Zvýšená exprese S100A4 byla detekována v postižené kůži u pacientů s psoriázou a také byla prokázána zvýšená sekrece aktivních multimerních forem (Zibert et al., 2010). Obdobně jako u tumorů a RA i zde hraje S100A4 určitou roli při regulaci apoptózy skrze tumor supresorový protein p53. Inhibicí S100A4 proteinu u imunodeficientních myši došlo k zúžení epidermis a útlumu buněčné proliferace (Zibert et al., 2010).

Dosavadní výsledky poukazují na významnou roli S100A4 proteinu v patogenezi zánětlivých autoimunitních onemocnění. Dochází k lokální indukci exprese S100A4 proteinu v místech tkáňového poškození, kde se podílí na regulaci metabolických dějů. Avšak v současné době stále není zcela prostudován přesný mechanismus jeho působení.

3.2.3. Význam S100A4 u systémové sklerodermie

Ve studii naší laboratoře ve spolupráci s laboratoří v Erlangenu zabývající se proteinem S100A4 u SSc byl popsán stimulační efekt TGF- β na expresi tohoto proteinu. Indukce S100A4 zároveň zpětně podněcuje aktivaci a profibrotické účinky TGF- β (Tomcik et al., 2015). Vztah S100A4 k SSc byl zkoumán na dermálních fibroblastech, izolovaných z kožní biopsie pacientů se SSc. Zvýšená přítomnost S100A4 proteinu byla detekována v postižené kůži pacientů se SSc oproti zdravým jedincům, u nichž byla exprese proteinu velmi nízká. Dále se studie zaměřila na hlavní efekторы v patogenezi tohoto onemocnění - fibroblasty a myofibroblasty, izolované z kožní biopsie pacientů se SSc, u kterých pomocí imunofluorescence byla prokázána výrazná exprese S100A4 proteinu. Zvýšená koncentrace S100A4 přetrvávala v kultivovaných SSc fibroblastech i nadále po několika pasážích oproti fibroblastům zdravých jedinců (Tomcik et al., 2015). Tento fakt byl potvrzen analýzou S100A4 z bioptované kůže myších modelů s experimentálně navozenou kožní fibrózou. Vztah mezi TGF- β a S100A4 proteinem byl zkoumán na S100A4 pozitivních SSc fibroblastech, u nichž byla rovněž prokázána i přítomnost fosforylovaného Smad2/3, což poukazuje na aktivaci kanonické signální

kaskády TGF- β , která hraje klíčovou roli u fibrotických onemocnění. Inaktivací Smad3 došlo k útlumu stimulačních efektů TGF- β na expresi S100A4 (Tomcik et al., 2015). Tato hypotéza byla také ověřena na dermálních fibroblastech izolovaných ze zdravých jedinců, které byly stimulovány profibrotickým mediátorem TGF- β , což vedlo ke zvýšení exprese S100A4 proteinu. Interakce těchto molekul není jednostranná, neboť S100A4 se podílí na zesílení signální kaskády TGF- β u SSc a podněcuje její aktivaci ve fibroblastech. Stimulace zdravých dermálních fibroblastů pomocí S100A4 způsobila nahromadění p-Smad2/3 v jádře a aktivaci Smad- dependentní transkripce cílených genů jako je Smad7 či genů pro kolagen typu I, což vyvolalo nadprodukcí kolagenu do supernatantu buněk. Následná inhibice S100A4 proteinu nebo jeho deficit v myších dermálních fibroblastech vedly ke snížení stimulačních efektů TGF- β , snížení akumulace pSmad2/3, útlumu Smad- dependentní signalizace i úbytku kolagenu (Tomcik et al., 2015). Mechanismy, kterými S100A4 je schopen regulovat Smad- dependentní dráhu, jsou prozatím stále neobjasněné, avšak nedávná studie popsala u HEK-293 buněk (human embryonic kidney) vzájemnou interakci mezi S100A4 a Smad proteiny prostřednictvím vápenatých iontů, čímž může S100A4 zprostředkovávat vazbu Smad proteinů na DNA nebo propojení mezi Smad proteiny a kofaktory, které se podílejí na regulaci exprese TGF- β / Smad- dependentních genů (Matsuura et al., 2010). Výsledky této práce vedly k závěru, že S100A4 je schopen ovlivňovat signální dráhu TGF- β a přispívat tak k její abnormální aktivaci v patogenezi SSc.

3.3. Interleukin-35

Interleukin 35 (IL-35) je nejnovějším členem cytokinové rodiny IL-12, do které jsou dále řazeny kromě IL-12 také IL-23 a IL-27. Cytokiny skupiny IL-12 jsou heterodimerní proteiny složené ze dvou společných podjednotek α - (p19, p28 nebo p35) a β -řetězce (Ebi3 nebo p40) (Collison and Vignali, 2008). α -řetězec je tvořen čtyřmi vzájemně propojenými α -helixy, což je také typickou strukturou pro cytokin IL-6, granulocyty a makrofágy stimulující faktor (GM-CSF), zatímco β -řetězec sdílí společnou stavbu s řetězcem rozpustných cytokinových receptorů (IL-6R α). Propojení specifických jednotek α a β řetězců formuje jednotlivé cytokiny. Řetězec p40 se páruje buď s p35 nebo p19 a utváří IL-12 nebo IL-23 a druhý β -řetězec Ebi3, který byl poprvé identifikován v infikovaných B-lymfocytech virem Epstein-Barrové, je propojen s p28 v IL-27 nebo p35 v IL-35 (Vignali and Kuchroo, 2012). Pro správnou funkci a aktivitu cytokinů je nutná přítomnost obou podjednotek. Přestože mají společné jednotlivé podjednotky a strukturální vlastnosti, liší se expresí a efektorovými vlastnostmi na buňky imunitního systému. IL-12 jeví pro-zánětlivé vlastnosti, které indukují aktivaci CD4⁺T-lymfocytů prvního typu (Th1) a jejich imunitní odpověď. Je produkován antigen prezentujícími buňkami, zejména dendritickými buňkami (DC) a monocyty a jeho exprese může být spuštěna aktivovanými T-lymfocyty (Del Vecchio et al., 2007). Podobné vlastnosti najdeme u IL-23, který je také řazen mezi pro-zánětlivé mediátory spouštějící Th1 odpověď. IL-23 se dále podílí na aktivaci NK-buněk a populace Th17 lymfocytů (Croxford et al., 2012). Na rozdíl od IL-12 a IL-23, má IL-27 široké spektrum imunomodulačních schopností. IL-27 podporuje vývoj Th1 a zároveň je schopen inhibovat Th2 odpověď a potlačovat efektorové T-lymfocyty v závislosti na okolním mikroprostředí (Hunter and Kastelein, 2012).

První informace o IL-35 byly popsány Dariem Vignali et al. v roce 2007. Zatímco IL-12, IL-23 a IL-27 hrají významnou roli v zánětlivých imunitních reakcích, dle většiny dosavadních publikací patří IL-35 mezi imunosupresivní cytokiny. IL-35 je heterodimerní protein složený ze dvou podjednotek p35 a Ebi-3, který je produkován regulačními T-lymfocyty CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg), nikoliv efektorovými T-lymfocyty jako u ostatních členů IL-12 skupiny (Collison et al., 2007). Nedávné studie popsaly schopnost IL-35 vytvářet nový typ indukovaných regulačních T-lymfocytů (iT_h35) z naivních CD4⁺ buněk, které nevyžadují aktivaci transkripčního faktoru FoxP3 a nedochází k produkci inhibičních cytokinů TGF- β či IL-10 (Xiang and Xie, 2015).

Indukované Tr35 následně jeví silné tlumivé účinky. Wang et al. popsal další regulační účinek IL-35 na regulační B-lymfocyty, které po setkání s IL-35 formují novou subpopulaci Breg, a to Breg sekretující IL-35 a IL-10 (Wang et al., 2014). Nejnovější studie identifikovaly u autoimunitních a infekčních onemocnění přítomnost IL-35, jenž byl však produkován právě výše zmíněnými Breg, které se významně podílely na negativní regulaci imunitních odpovědí (Shen et al., 2014).

Hlavním mechanismem IL-35, prostřednictvím kterého dochází k regulaci imunitní odpovědi, je potlačení proliferace a efektorové funkce T-lymfocytů (Collison and Vignali, 2008). Bylo zjištěno, že za podmínek chronické infekce nebo chronického zánětlivého stavu potlačuje IL-35 úlohu T efektorových buněk, včetně Th17 buněk, což přispívá k utlumení aktivity zánětlivých autoimunitních onemocnění (Niedbala et al., 2007).

Poté, co je IL-35 exprimován, působí na okolní buňky navázáním na IL-35 receptor. Receptor pro IL-35 je také složen ze dvou podjednotek IL-12R β 2 a gp130, které se jednotlivě nacházejí i u receptorů ostatních členů IL-12 cytokinové rodiny (Collison and Vignali, 2008; Collison et al., 2012). Následně po navázání a propojení IL-35 s jeho receptorem dochází k signalizaci prostřednictvím proteinů STAT rodiny (Signal Transducer and Activator of Transcription), konkrétně přes STAT1 a STAT4, které se po aktivaci translokují do jádra, kde působí jako transkripční faktor ovlivňující geny pro p35 a Ebi3, což vede k zvýšené expresi samotného IL-35 (Collison et al., 2012). Na rozdíl od ostatních členů je IL-35 schopen vést signalizaci i přes homodimer tvořený jedním typem podjednotek IL-35 receptoru. Avšak tato signalizace vede k částečné ztrátě supresivní aktivity IL-35 oproti signalizacím indukovaných přes plně funkční heterodimerní receptor IL-12R β 2/gp130 (Collison et al., 2012).

3.3.1. Význam IL-35 u nádorových onemocnění

Regulační T-lymfocyty jsou specializované buňky imunitního systému, které udržují toleranci a zabraňují rozvoji autoimunitních onemocnění (Vignali et al., 2008), avšak zároveň brání v aktivaci nádorově specifických T-buněk. Vzájemné asociace mezi regulační imunitní odpovědí a rozvojem či progresí nádorů je popsána v řadě studií zabývajících se malignitami (Betts et al., 2006; Knutson et al., 2007). Deplece Treg či potlačení jejich supresorových vlastností vede ke zvýšení anti-tumorové odpovědi. Molekulární a buněčné pochody zodpovědné za zvýšené množství a udržování vyšších koncentrací Treg během onemocnění jsou prozatím stále nejasné. Pacienti s nádorovým

onemocněním vykazují zvýšený výskyt Treg, hlavně v místech výskytu tumoru, kde dochází zejména k inhibici infiltrovaných cytotoxických CD8+ T-lymfocytů (Cao, 2010). Jejich přítomnost v nádorovém prostředí následně indukuje expresi IL-35, jenž může být významným faktorem, který ovlivňuje reakci efektorových T-buněk a zároveň progresi nádoru (Turnis et al., 2016). Exprese IL-35 byla zaznamenána u mnoha typů nádorových onemocnění např. melanom, B-buněčný lymfom, rakovina plic, kolorektální karcinom (Long et al., 2013; Wang et al., 2013; Zeng et al., 2013). V nedávné studii Wang et al. popsal, že exprese a přítomnost IL-35 v mikroprostředí nádoru vede k akumulaci myeloidních supresorových buněk (MDSCs), které interagují s dalšími imunitními buňkami a regulují jejich funkci. Dále významně podporuje angiogenezi, což podněcuje růst nádorových buněk (Wang et al., 2013). Nedávná studie zkoumající vztah IL-35 k nádorovým onemocněním (melanom metastazující do plic, karcinom plic, adenokarcinom tlustého střeva) u myších modelů popsala inhibující vliv IL-35 na infiltrující lymfocyty v místě postižení a na proliferaci efektorových buněk. Přítomnost IL-35 dále podporovala progresi nádoru a korelovala i se zvýšenou úmrtností experimentálních modelů. Následná inhibice IL-35 vedla nejen k zvýšení proliferace a aktivace efektorových T-lymfocytů, ale i k zvýšené sekreci zánětlivých cytokinů, což přispívá k aktivaci účinné protinádorové imunitní odpovědi (Turnis et al., 2016). Vliv IL-35 byl dále zkoumán u rakoviny prostaty, kde byly identifikovány specifické regulační CD8+ CTLA-4+ T-lymfocyty, jenž vykazovaly supresorové vlastnosti jak in vivo, tak in vitro. Avšak přesný mechanismus tlumivých účinků těchto lymfocytů zůstává stále nejasný. V dané studii se domnívají, že kontinuální exprese CTLA-4+ by mohla mít sama o sobě supresivní efekt, neboť zabraňuje vazbě kostimulačních molekul mezi T-lymfocyty a antigen prezentujícími buňkami. Nicméně IL-35 exprimován CD8+ CTLA-4+ T-lymfocyty se zdá být důležitým mediátorem vedoucí k toleranci, aniž by došlo k přímému buněčnému kontaktu. Ačkoliv je známo, že IL-35 indukuje především vznik CD4+ Treg, v případě rakoviny prostaty byla popsána významná role IL-35 v indukci CD8+ Treg (Olson et al., 2012). Zvýšená koncentrace IL-35 byla dále detekována v cytoplasmě nádorových buněk u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (Long et al., 2016).

3.3.2. Význam IL-35 u autoimunitních onemocnění

Prozatím nebyla stanovena přesná role IL-35 u autoimunitních onemocnění. Většina studií, které se věnovaly účinkům tohoto cytokinu, byly provedeny zejména za použití experimentálních myších modelů (Pope and Shahrara, 2013). Bylo prokázáno, že Treg získané z myši s delecí genu pro jednotlivé podjednotky Ebi-3 či p35 měly sníženou regulační aktivitu, což naznačuje důležitou roli IL-35 v jejich správné funkci (Collison et al., 2007).

IL-35 hraje významnou roli při potlačení rozvoje kolagenem indukované artritidy u myších modelů. Mechanismus, kterým IL-35 zmírnil rozvoj zánětu, je prostřednictvím supresivního účinku na růstový faktor VEGF a jeho receptor, což vede ke snížení angiogeneze. Angiogeneze patří mezi klíčové procesy v rozvoji artritidy (Wu et al., 2016). Další studie prokázala tlumivé účinky IL-35 na funkci Th17 lymfocytů a produkci IL-17, což mělo také za následek útlum rozvoje kolagenem indukované artritidy. Supresivní účinky IL-35 na Th17 by mohly vést k potlačení zánětlivých autoimunitních onemocnění (Niedbala et al., 2007). Obě tyto studie popisují významný protizánětlivý účinek tohoto cytokinu v patogenezi kolagenem indukované artritidy u myších modelů. Zatímco některé studie potvrzují protizánětlivé účinky IL-35, které ovlivňují Treg, Breg a související cytokiny u zánětlivých onemocnění střev, kolagen indukované artritidy nebo jiných autoimunitních onemocnění (Collison et al., 2007, 2010; Kochetkova et al., 2010; Niedbala et al., 2007; Wang et al., 2014), další studie popisují naopak prozánětlivé vlastnosti IL-35 u Lymeské artritidy či kolagen indukované artritidy ovšem za odlišných experimentálních podmínek (Kuo et al., 2011; Thiolat et al., 2014).

Experimentální myokarditida je dalším typem autoimunitního onemocnění, ve kterém hrají významnou roli Th17 lymfocyty a jejich exprese IL-17. V této studii autoři poukázali na možné protektivní účinky IL-35 v rozvoji myokarditidy, prostřednictvím tlumivých a inhibičních účinků na Th17 lymfocyty a IL-17 (Collison and Vignali, 2008).

Naše laboratoř nedávno detekovala zvýšené sérové hladiny IL-35 u pacientů s RA oproti kontrolní skupině s OA. Zvýšené koncentrace byly zaznamenány zejména v časně fázi onemocnění u pacientů, kteří doposud nebyly léčeny na RA. Po zahájení léčby u těchto pacientů došlo ke snížení sérových hladin IL-35 (Šenolt et al., 2015a). V další práci naší laboratoře byla detekována i zvýšená lokální exprese IL-35 v synoviální tkáni pacientů s RA oproti kontrolní tkáni z OA či psoriatické artritidy. Obě podjednotky cytokinu byly exprimovány synoviálními fibroblasty i mononukleárními

buňkami periferní krve (PBMC), které byly stimulovány TNF- α , jenž je hlavním prozánětlivým cytokinem v patogenezi RA. Samotný IL-35 indukoval expresi dalších prozánětlivých molekul v PBMC, které na rozdíl od synoviálních fibroblastů exprimovaly na svém povrchu obě podjednotky receptoru pro IL-35. Zatímco přítomnost IL-12R β 2 podjednotky v RA i kontrolních tkáních byla srovnatelná, podjednotka gp130 byla výrazně exprimována v tkáni RA (Filková et al., 2015). Na základě těchto dat byl následně zkoumán IL-35 v synoviální tekutině, kde byla detekována výrazně zvýšená koncentrace cytokinu u RA pacientů oproti OA pacientům. Zvýšené hladiny IL-35 v synoviální tekutině korelovaly s vyšší aktivitou onemocnění, což může být způsobeno schopností IL-35 indukovat prozánětlivé molekuly v PBMC (Šenolt et al., 2015a). Zatímco setyto studie přiklání k faktu, že IL-35 má významnou prozánětlivou roli v patogenezi RA, a to zejména v lokálním místě zánětu, další dvě studie zabývající se sérovým IL-35 u RA popisují zcela opačné výsledky. U obou projektů byly naměřeny výrazně vyšší hladiny sérového IL-35 u zdravých jedinců v porovnání s RA pacienty (Nakano et al., 2015; Ning et al., 2015). Výrazně nižší hladiny sérového IL-35 u zdravých kontrol byly také detekovány oproti pacientům se systémovým lupusem erythematosus. Nižší hodnoty interleukinu asociovaly s vyšší aktivitou onemocnění. Zároveň bylo u daných pacientů zaznamenáno i významné snížení Treg oproti kontrolní skupině (Ouyang et al., 2014). Nedávná studie shrnula dosavadní poznatky všech členů rodiny IL-12 včetně IL-35 u sarkoidózy, kde popisují možné imunopresivní účinky IL-35 a IL-27 při navození remise u tohoto onemocnění, avšak pro potvrzení je zapotřebí dalších studií (Ringkowski et al., 2014).

3.3.3. Význam IL-35 u systémové sklerodermie

Prozatím není dostatek studií, které by se zabývaly rolí IL-35 v patogenezi SSc. Nedávná studie prokázala zvýšené hladiny IL-35 v séru pacientů s SSc oproti zdravým kontrolám. Nezaznamenali však žádné značné rozdíly hladin mezi jednotlivými typy SSc, difúzní a limitovanou. Pacienti, kteří vyvinuli plicní fibrózu, měli vyšší koncentrace IL-35 v séru oproti pacientům, u kterých se doposud neprojevovalo žádné plicní postižení. Asociace s jinými orgánovými postiženími zde nebyly prokázány (Dantas et al., 2015).

3.4. Protein tepelného šoku 90 (Hsp90)

První zmínky o existenci proteinů tepelného šoku (Hsps) byly popsány v roce 1974 v buňkách slinných žláz *Drosophily*, u nichž došlo ihned po expozici buněk vyšším teplotám k syntéze malého počtu proteinů (Schlesinger, 1990). Tato skutečnost vedla k objevu univerzálního ochranného mechanismu, který prokaryotické a eukaryotické buňky využívají k zachování buněčné homeostázy a biologických procesů (Lindquist and Craig, 1988). V eukaryotických buňkách může být syntéza Hsps indukována nejen hypertermií, ale i řadou různých stresových situací, které vedou k akumulaci non-nativních proteinů, včetně změn v intracelulárním prostředí, přítomnosti virové infekce (Santoro, 2000) procesů během hojení a remodelace tkání (Laplante et al., 1998) nebo vystavení buňky UV- záření (Cao et al., 1999). Transkripce genů pro Hsps je aktivována i za fyziologických podmínek v průběhu buněčného cyklu, vývoje či diferenciaci a proliferace buňky. Hlavní funkcí těchto proteinů je rozpoznat a navázat nesprávně sbalené proteiny, které následně stabilizují vytvořením správné prostorové konformace. Tímto způsobem jsou proteiny chráněny před degradací v proteozomech. Dále hrají důležitou roli během transportu proteinů přes membrány. Hsps jsou řazeny mezi molekulární chaperony, které jsou rozděleny do skupin podle své molekulární hmotnosti (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 a malé Hsp) (Lindquist and Craig, 1988).

Hsp90 s molekulární hmotností 90- kDa je vysoce konzervovaný molekulární chaperon, který je přítomen u bakterií a eukaryotních organismů. Hraje významnou roli v mnoha buněčných procesech, včetně řízení buněčného cyklu a přežití buňky (Burrows et al., 2004; Echeverria and Picard, 2010; Pearl and Prodromou, 2000). Hsp90 je vyžadován pro správné složení a aktivaci řady buněčných proteinů a proteinových komplexů. Proteiny, které s Hsp90 interagují, se komplexně nazývají „klienti“ a spousta z nich patří mezi protein kinázy, transkripční faktory, steroidní receptory, které hrají důležitou roli v transdukci signálních drah (McClellan et al., 2007). Hsp90 je důležitou součástí buněčné odpovědi na stresové situace a má klíčovou funkci při navození buněčné homeostázy (Taipale et al., 2010).

U eukaryotních organismů nalezneme více Hsp90 proteinových homologů přítomných v cytosolu (Hsp90- α , Hsp90- β) či v různých buněčných strukturách, jako jsou endoplazmatické retikulum (endoplasmín/GRP-94) a mitochondrie (TRAP- protein 1 asociovaný s TNF receptorem). Cytosolické isoformy Hsp90 jsou výsledkem genové

duplikace, které nastaly časně během evoluce eukaryot (Chen et al., 2006). Hsp90- α je kódován genem HSP90AA1 na lidském chromozomu 14q a patří mezi inducibilní proteiny, které jsou exprimovány pouze za jiných než fyziologických podmínek (Zuehlke et al., 2015). Hsp90- β je kódován genem HSP90AB1 na lidském chromozomu 6p a je konstitutivně exprimován. I přes to, že sdílí 85% identických sekvencí, mají tyto izoformy zcela odlišné vlastnosti (Millson et al., 2007; Taherian et al., 2008). Bakteriální forma Hsp90 se nazývá HtpG a je obvykle neesenciální. Na rozdíl od bakterií, eukaryota vyžadují funkční cytoplazmatický Hsp90 pro životaschopnost za všech fyziologických i nefyziologických podmínek (Lund, 2001). Nezbytná přítomnost Hsp90 tak umožnila za použití kvasinek podrobnější analýzu jeho strukturních a funkčních vlastností (Meyer et al., 2003; Obermann et al., 1998). Molekulární podstata Hsp90 ve vazbě a výběru svých klientů je však stále neznámá. Doposud byl nejpodrobněji prostudován vztah Hsp90 s intracelulárním receptorem steroidních hormonů. Interakci Hsp90 s receptorem předchází asociace s komplexem dvou chaperonů Hsp70/Hsp40, které jsou s Hsp90 propojeni pomocí ko-chaperonu Hop (Hsp70/Hsp90 organizující protein) (Kimmins and MacRae, 2000). Není však jasné, která molekula z daného komplexu spolupracujících chaperonů zprostředkovává specificitu ve výběru proteinu. Specificita pro protein kinázy, které představují nečastější klienty, není také dána samotným Hsp90, ale pravděpodobně adaptorovým proteinem Cdc37 (cell division cycle 37), který zprostředkovává vzájemnou vazbu obou molekul (Pearl, 2005).

Hsp90 je homodimer závislý na ATP (adenosintrifosfát), který je složený ze tří flexibilních částí: N-terminální doména vázající molekulu ATP; prostřední doména – vazebné místo pro klienty s katalytickou smyčkou; a C-terminální doména zprostředkovávající dimerizaci Hsp90 (Li and Buchner). Smyslem funkčnosti Hsp90 je vazba a následná hydrolýza ATP. Po vazbě ATP dochází ke konformační změně Hsp90 z hydrofobní otevřené pozice do uzavřené, kdy dojde k dočasnému spojení N-konců (Csermely et al., 1993). Prostřednictvím dimerizace N-terminálních domén dojde k hydrolýze ATP a aktivaci Hsp90, což umožní účinné navázání, stabilizaci a následné uvolnění klientských proteinů.

Mechanismus, kterým Hsp90 působí na své proteinové klienty, je prostřednictvím velkého komplexu pěti stěžejních proteinů: (i) samotný Hsp90; (ii, iii) ko-chaperon Hop nebo Cdc37, které slouží jako adaptor a zprostředkovatel vazby mezi Hsp70 a Hsp90; (iv) p23 protein (prostaglandin E syntáza 3), který zprostředkovává

vazbu klienta; a (v) komplex chaperonů Hsp70-Hsp40, který umožňuje interakci Hsp90-klient (Pratt et al., 2004).

V posledních letech se stal Hsp90 hlavním cílem pro léčbu nádorových onemocnění (Neckers and Workman, 2012). Dále byl zkoumán jako terapeutický cíl u neurogenerativních onemocnění a při rozvoji antivirotik (Geller et al., 2012; Kalia et al., 2010).

3.4.1. Význam Hsp90 u nádorových onemocnění

Proteiny tepelného šoku patří mezi často studované biologické markery malignit, vzhledem ke svým protektivním a stabilizačním vlastnostem, které usnadňují růst a přežití nádorových buněk. Zvýšené hladiny Hsp molekulárních chaperonů byly zaznamenány u řady nádorových onemocnění. Nadměrná exprese Hsp signalizuje u pacientů s konkrétními typy nádorů špatnou prognózu – horší odpověď na terapii a sníženou pravděpodobnost přežití (Blagosklonny, 2001; Ciocca and Calderwood, 2005). Většina buněčných pochodů je regulována molekulárními chaperony, zejména Hsp90 a Hsp70, které jsou schopny se vázat na několik regulačních faktorů. Hsp90 má hlavní roli v regulaci mitogeneze a progresi buněčného cyklu, zatímco Hsp70 se účastní ochrany buněk proti spontánní i léky indukované apoptotické smrti. Chaperon Hsp90 je nezbytný pro stabilizaci mnoha receptorů, protein-kináz a transkripčních faktorů, které jsou součástí signálních drah buněčného růstu (Neckers and Ivy, 2003). Hsp90 je vnímán jako zprostředkovatel rychlé reakce na extracelulární signály, které jsou důležité zejména v rozvoji a obnově buněk (Neckers and Ivy, 2003; Pratt et al., 2004). Cílené farmakologické inhibitory Hsp90 způsobují degradaci klientského substrátu a zamezení růstu nádoru prostřednictvím zastavení buněk v G1 fázi buněčného cyklu, zastavení morfologické a funkční diferenciaci a následné aktivace apoptotických signálů (Neckers and Ivy, 2003). Protein Hsp90 je vyžadován pro stabilitu, aktivaci onkogenu HER2 (receptor 2 pro epidermální růstový faktor) a proteinů účastnících se HER2 signální dráhy, které mají klíčovou úlohu v přežití a růstu nádorových buněk např. u rakoviny prsu (Mitri et al., 2012; Neckers and Ivy, 2003). Další souvislost Hsp90 s nádorovým bujením byla zkoumána ve studii zabývající se karcinomem prostaty. Zde byla popsána nadměrná aktivita ko-chaperonu Cdc37, který je vyžadován v Hsp90 komplexu, jenž reguluje buněčný růst (Pearl, 2005). Cdc37 patří mezi proteiny, jejichž nadměrná exprese je sama o sobě onkogenní. Nedávné studie popsaly asociaci Cdc37 s onkogenními protein kinázami, včetně Raf1 (serinová/treoninová kináza), Cdk4

(cyklin-dependentní kináza 4) a dalšími proteiny: EGFRvIII (receptor pro epidermální růstový faktor typu III) (Lavictoire et al., 2003), tumor supresor LKB1 (jaterní kináza B1)(Boudeau et al., 2003). Jedním z kontrolních faktorů, které zamezují vzniku nádoru, je transkripční faktor p53, který také patří mezi Hsp90 substráty. Tumor supresorový protein p53 je důležitým faktorem, který rozpoznává poškození DNA během buněčného cyklu. Je popsána zvýšená exprese Hsp90 a Hsp70 u tumorů s nesprávnou funkcí p53. Oběma chaperonům je tak přikládán značný efekt na stabilizaci a změně konformace mutovaného p53 proteinu (Pinhasi-Kimhi et al.).

Hsp90 patří mezi cíle protinádorové terapie, díky svým interakcím s velkým počtem proteinů, které jsou nedílnou součástí v řadě biologických regulačních procesů. Je identifikována řada molekul asociovaných s růstem a přežitím nádorových buněk, které vyžadují pro správnou funkci a aktivaci přítomnost chaperonu Hsp90. Tyto informace vedly k vývoji farmaceutik inhibujících funkce Hsp90 u různých typů malignit (Kim et al., 2009; Uehara et al., 1986; Wong and Chen, 2009). Oproti normálním buňkám jsou nádorové buňky výrazně citlivější k inhibici Hsp90. Mezi první dostupné inhibitory Hsp90 patří např. geldanamycin (GA), který byl objeven v *Streptomyces hydroscopicus* (He et al., 2006). GA inhibuje funkci Hsp90 tím, že se naváže na N-terminální doménu do míst, kam se váže molekula ATP potřebná k aktivaci Hsp90 (Neckers, 2006). Několik studií však již prokázalo nedostatky GA, jako je jeho špatná rozpustnost a hepatotoxicita. Některé nedostatky byly odstraněny vyvinutím derivátů GA – 17-AAG (tanespimycin) a 17-DMAG (alvespimycin), které jsou více rozpustné a méně toxické, stále však mají zachované protinádorové vlastnosti (Porter et al., 2010). V současné době jsou v klinickém vývoji další typy Hsp90 inhibitorů, synteticky vytvořené malé molekulové inhibitory, které vykazují obecně vyšší účinnost a nižší jaterní toxicitu. Do této třídy patří například sloučeniny resorcinolu (Luminespib, Onalespib, Ganetespib)(Butler et al., 2015). Nynější výzkumy se dále snaží zvýšit protinádorovu terapii zavedením kombinace Hsp90 inhibitorů s další cílenou terapií, chemoterapií či radioterapií.

3.4.2. Význam Hsp90 u autoimunitních onemocnění

Hsp proteiny neslouží pouze jako molekulární chaperony, ale jsou zapojeny v autoimunní a nádorové imunitní reakci a podílejí se na prezentaci antigenu. Hsp proteiny, konkrétně Hsp60, Hsp70 a Hsp90 jsou zvažovány jako účinné aktivátory vrozené imunitní odpovědi (Tsan and Gao, 2004). Autoprotilátky a buňky reagující na přítomnost Hsp proteinů byly detekovány u pacientů s revmatoidní artritidou,

systémovým lupus erythematoses (SLE)(Panchapakesan et al., 1992) a rouztroušenou sklerózou (Georgopoulos and McFarland, 1993). Prozatím však nebyly objasněny principy autoimunitních reakcí a produkce protilátek proti Hsp proteinům. Dosavadní studie prokázaly možnou asociaci protilátek proti Hsp90 s IL-6 u pacientů se SLE, neboť hladiny autoprotiátek signifikantně korelovaly s rostoucí koncentrací prozánětlivých cytokinu (Ripley et al., 2001).

Studie zabývající se funkcí Hsp90 u SLE vybrala tuto molekulu na základě jeho interakcí s receptory pro steroidní molekuly, protože většina pacientů se SLE podstupuje léčbu kortikosteroidy. Domnívali se, že hladina Hsp90 by měla korelovat s hladinou kortikosteroidů v intracelulárním prostředí (Stephanou et al., 1998). Domněnka však nebyla následně u 60 pacientů potvrzena. Nicméně, v této studii detekovali zvýšené hladiny Hsp90 v PBMC u pacientů s aktivnější formou onemocnění oproti pacientům s onemocněním v klidové fázi a zdravým jedincům, či pacientům s revmatoidní artritidou (Norton et al., 1989). Další studie zjistila vyšší expresi Hsp90 v PBMC u pacientů s trombocytopenií, což je častým projevem antifosfolipidového syndromu u SLE (Deguchi et al., 1987). Zvýšená povrchová exprese Hsp90 lymfocyty a monocyty byla prokázána pomocí průtokové cytometrie u pacientů se SLE, přičemž zvýšené hodnoty byly signifikantně odlišné od zdravých kontrol pouze v případě lymfocytů (Erkeller-Yüksel et al., 1992). U revmatoidní artritidy asociované s intersticiálním plicním postižením (RA-ILD) byly prokázány autoprotiátky proti citrulinovaným molekulám Hsp90. Vznik těchto autoprotiátek předchází vzniku RA-ILD, což poukazuje na významnou úlohu autoprotiátek proti citrulinovaným Hsp90 v iniciaci onemocnění plic (Deane and Nicolls, 2013). Zvýšené koncentrace protilátek proti Hsp90 byly naměřeny v séru pacientů s RA v porovnání s kontrolními séry. Pacienti s delším trváním onemocnění vykazovali vyšší hladiny anti-Hsp90 oproti pacientům s časnou fází RA (Hayem et al., 1999). Lokální exprese Hsp90 byla zkoumána u svalových onemocnění konkrétně u polymyozitidy (PM) a dermatomyozitidy (DM) v regenerujících svalových vláknech a následně porovnávána s normálními a non-regenerujícími svalovými vlákny. V případě regenerujících a vyvíjejících se svalových vláken DM a PM byla nalezena zvýšená exprese Hsp90 a ubiquitinu oproti kontrolním vzorkům. Zde se však autoři domnívají, že zvýšené exprese Hsp90 a ubiquitinu souvisí spíše s myogenezí, kdy je jejich sekrece do značné míry regulována aktivací vývojových mechanismů, než samotným onemocněním (Bornman et al., 1996). Role Hsp90 je zvažována v aktivaci

mechanismů zabraňujících vzniku tkáňového poškození, neboť byla detekována jeho zvýšená hladina spolu s Hsp70 v poškozených svalových vláknech u svalové dystrofie a idiopatických zánětlivých myopatií (IIM). Hsp90 byl signifikantně zvýšen v cytotoxických makrofázích invadujících non-nekrotická vlákna u PM a myozitidy s inkluzními tělísky (IBM). Hodnoty Hsp90 korelovaly s mírou svalového poškození (De Paepe et al., 2009). DM je spjata s vyšší expresí Hsp90 endoteliálními buňkami v cévách, což pravděpodobně slouží jako „danger“ signál v případě cévního poškození. Imunitní buňky, makrofágy a T-lymfocyty, které invadují non-nekrotická vlákna u PM a IBM, exprimovaly značné množství Hsp90 (De Paepe et al., 2012). Zatím tedy nebyla role Hsp90 u IIM zcela objasněna.

3.4.3. Význam Hsp90 u systémové sklerodermie

Role Hsp90 v patogenezi systémové sklerodermie není zcela objasněna, neboť prozatím je velmi málo studií, které by se věnovaly tomuto tématu. Naše laboratoř ve spolupráci s laboratoří v Erlangenu se zajímala o možnou roli Hsp90 u SSc (Tomcik et al., 2014). Již dřívější studie popisují důležitou roli Hsp90 ve stabilizaci a správném prostorovém uspořádání TGF- β receptoru (Wrighton et al., 2008) a Src kináz, které jsou nezbytnou součástí signální kaskády TGF- β (Beyer and Distler, 2013; Koga et al., 2006; Skhirtladze et al., 2008). Jak bylo zmíněno v kapitole o patogenezi SSc, TGF- β je považován za hlavní profibrotický mediátor. Inhibicí Hsp90 došlo k zvýšené degradaci TGF- β receptoru a Src kináz v proteozomech (Wrighton et al., 2008), což vedlo ke snížení aktivace signální dráhy TGF- β . Naše laboratoř detekovala zvýšené koncentrace Hsp90 v kůži pacientů se SSc oproti zdravým jedincům, konkrétně ve fibroblastech a endoteliálních buňkách ve svrchní vrstvě dermis a v keratinocytech epidermis. Zvýšená exprese Hsp90 byla taktéž detekována u experimentálních myších modelů s navozenou kožní fibrózou. Pomocí *in vitro* experimentů byly zaznamenány zvýšené koncentrace Hsp90 na mRNA a proteinové úrovni u kultivovaných SSc fibroblastů oproti zdravým fibroblastům, aniž by byly něčím stimulovány. Stimulační efekt TGF- β na produkci Hsp90 byl znatelnější u kultivovaných zdravých fibroblastů oproti SSc fibroblastům, neboť u SSc fibroblastů je kaskáda TGF- β nepřetržitě aktivována (Tomcik et al., 2014).

U myších modelů, u kterých byla navozena kožní fibróza injekcí replikačně deficientního adeno-asociovaného viru (AAV) kódujícího konstitutivně aktivní receptor pro TGF- β I. typu (T β RI), byla detekována zvýšená exprese Hsp90. Signální kaskáda

TGF- β tedy může významně ovlivnit účinky Hsp90 v kožní fibróze.

Tomčík et al. popsali snížené profibrotické účinky TGF- β prostřednictvím inaktivace molekuly Hsp90. Tento jev byl prokázán na základě experimentálních pokusů s kultivovanými fibroblasty z postižené kůže SSc pacientů. Fibroblasty byly inkubovány s Hsp90 inhibitorem 17-DMAG, což vedlo ke snížení nahromadění fosforylovaného Smad2/3 proteinu, zabránění diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty a kompletně k redukci stimulačních efektů TGF- β na produkci složek ECM do supernatantu. Autoři dále prokázali, že inhibice Hsp90 silně potlačuje profibrotické efekty signální dráhy TGF- β jak *in vitro*, tak *in vivo*. Léčebná terapie pomocí 17-DMAG výrazně snížila histologické fibrotické nálezy, přítomnost kolagenu a zabránila aktivaci fibroblastů u tří preklinických experimentálních myších modelů, které představovaly různá stadia SSc (Tomcik et al., 2014).

4. Metodika

4.1. Biologický materiál

Vzorky krevních plazem, sér a mononukleárních buňek periferní krve (PBMC) od pacientů se SSc a zdravých kontrol se srovnatelným věkem a pohlavím byly získány z ambulantního a lůžkového oddělení Revmatologického ústavu (RÚ) po podepsání informovaného souhlasu schváleného místní etickou komisí. Pacientům a kontrolní skupině byly odebrány vzorky krve, z nichž byly vyizolovány séra, plazmy a PBMC, které byly před dalším zpracováním uchovávány při -80°C. Klinické údaje pacientů se SSc byly získány z registru pacientů se SSc v RÚ pro následné statistické analýzy.

Do studie sérové koncentrace S100A4 proteinu bylo zahrnuto celkem 33 pacientů (29 žen a 4 muži) se SSc, s mediánem věku 57 let a 20 zdravých kontrol se srovnatelným věkem a pohlavím. Podskupina pacientů s lcSSc se skládala z 25 pacientů a podskupina dcSSc z 8 pacientů. Pacienti splňovali klasifikační kritéria pro SSc z roku 2013 podle EULAR (The European League Against Rheumatism) a ACR (American College of Rheumatology) (van den Hoogen et al., 2013; 1981). Klinická charakteristika pacientů a kontrolní skupiny je uvedena v tabulce 1.

Pro analýzu sérového IL-35 bylo použito 40 pacientů (35 žen a 5 mužů) se SSc s mediánem věku 57 let a 40 zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím. Podskupina lcSSc obsahovala 31 a skupina dcSSc 9 pacientů. Pacienti opět splňovali klasifikační kritéria pro SSc podle ACR/EULAR 2013. Klinická data tyto skupiny jsou zobrazena v tabulce 2.

Pro naměření extracelulárních koncentrací Hsp90 v krevní plazmě, bylo použito 40 pacientů se SSc (35 žen a 5 mužů) s mediánem věku 53,9 let a 40 zdravých kontrol se srovnatelným věkem a pohlavím. Pacienti se lcSSc tvořili skupinu 30 jedinců, zatímco dcSSc pacientů bylo 10. Pacienti splňovali klasifikační kritéria pro SSc dle ACR/EULAR 2013. Klinická data jsou zobrazena v tabulce 3.

Expresí výše zmiňovaných molekul S100A4, IL-35 a Hsp90 na mRNA úrovni z PBMC byla měřena u 40 pacientů se SSc (34 žen a 6 mužů), s mediánem věku 51 let a u 40 zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím. Podskupina pacientů s lcSSc byla tvořena 21 jedinci a podskupina dcSSc 19 pacienty. Pacienti opět splňovali kritéria pro SSc podle ACR/EULAR 2013. Klinické údaje jsou znázorněny v tabulce 4.

Dermální fibroblasty byly izolovány z bioptovaných kožních lézí 19 pacientů se

SSc (16 žen a 3 muži) s mediánem věku 52 let a 12 zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím. Sedm pacientů mělo diagnostikováno lcSSc a 12 dcSSc. Pacienti splňovali klasifikační kritéria pro SSc dle ACR/EULAR 2013. Klinická charakteristika je znázorněna v tabulce 5.

Kontrolní skupiny pro porovnání jednotlivých naměřených hodnot byly tvořeny zdravými jedinci, kterým doposud nebyla diagnostikována žádná nádorová či autoimunitní onemocnění. Kontrolní soubor jedinců byl dále vybrán na základě srovnatelného věku a pohlaví se souborem SSc pacientů (tab. 1,2,3,4). Všichni pacienti a zdraví jedinci poskytli informovaný souhlas se zařazením do studie.

Tabulka 1: Klinická charakteristika pacientů a zdravých kontrol pro analýzu sérového S100A4

Parametry	Pacienti se SSc	Zdravé kontroly
Počet	33	20
Pohlaví (žena / muž)	29 / 4	17 / 3
Věk medián (rozsah)	57 let (32 – 69)	56 let (30 – 67)
Trvání nemoci medián (rozsah)	4,2 let (0,5 – 11)	-
dcSSc / lcSSc	8 / 25	-
Pozitivita ANA	31 / 33 (94 %)	-
Pozitivita anti-Scl70	12 / 33 (36 %)	-
Pozitivita ACA	6 / 33 (18 %)	-
Raynaudův fenomén	33 / 33 (100 %)	-
Postižení GIT	27 / 33 (82 %)	-
Artralgie a/nebo artritida	17 / 33 (52 %)	-
Plicní fibróza	22 / 33 (67 %)	-
Plicní arteriální hypertenze	5 / 33 (15 %)	-
Postižení srdce	4 / 33 (12 %)	-
Postižení ledvin	1 / 33 (3 %)	-
Digitální ulcerace	10 / 33 (30 %)	-

(dcSSc: difúzní systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná systémová sklerodermie, ANA: anti-nukleární autoprotilátky, anti-Scl70: autoprotilátky proti topoisoméráze I, ACA: anti-centromerové autoprotilátky, GIT: gastrointestinální trakt)

Tabulka 2: Klinická charakteristika pacientů a zdravých kontrol pro analýzu sérového IL-35

Parametry	Pacienti se SSc	Zdravé kontroly
Počet	40	40
Pohlaví (žena / muž)	35 / 5	35 / 5
Věk medián (rozsah)	57 let (30 – 71)	55,5 let (30 – 70)
Trvání nemoci medián (rozsah)	3 roky (0,5 – 18)	-
dcSSc / lcSSc	9 / 31	-
Pozitivita ANA	38 / 40 (95 %)	-
Pozitivita anti-Scl70	12 / 40 (30 %)	-
Pozitivita ACA	9 / 40 (23 %)	-
Raynaudův fenomén	40 / 40 (100 %)	-
Postižení GIT	34 / 40 (85 %)	-
Artralgie a/nebo artritida	22 / 40 (55 %)	-
Plicní fibróza	24 / 40 (60 %)	-
Plicní arteriální hypertenze	10 / 40 (25 %)	-
Postižení srdce	12 / 40 (30 %)	-
Postižení ledvin	6 / 40 (15 %)	-
Digitální ulcerace	10 / 40 (25 %)	-

(dcSSc: difúzní systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná systémová sklerodermie, ANA: anti-nukleární autoprotiilátky, anti-Scl70: autoprotiilátky proti topoisomeráze I, ACA: anti-centromerové autoprotiilátky, GIT: gastrointestinální trakt)

Tabulka 3: Klinická charakteristika pacientů a zdravých kontrol pro analýzu plazmatického Hsp90

Parametry	Pacienti se SSc	Zdravé kontroly
Počet	40	40
Pohlaví (žena / muž)	35 / 5	35 / 5
Věk medián (rozsah)	53,9 let (30 – 71)	53,9 let (43 – 70)
Trvání nemoci medián (rozsah)	3 roky (0,5 – 18)	-
dcSSc / lcSSc	9 / 31	-
Pozitivita ANA	38 / 40 (95 %)	-
Pozitivita anti-Scl70	12 / 40 (30 %)	-
Pozitivita ACA	9 / 40 (23 %)	-
Raynaudův fenomén	40 / 40 (100 %)	-
Postižení GIT	34 / 40 (85 %)	-
Artralgie a/nebo artritida	22 / 40 (55 %)	-
Plicní fibróza	24 / 40 (60 %)	-
Plicní arteriální hypertenze	10 / 40 (25 %)	-
Postižení srdce	12 / 40 (30 %)	-
Postižení ledvin	6 / 40 (15 %)	-
Digitální ulcerace	10 / 40 (25 %)	-

(dcSSc: difúzní systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná systémová sklerodermie, ANA: anti-nukleární autoprotiálátka, anti-Scl70: autoprotiálátka proti topoisomerase I, ACA: anti-centromerové autoprotiálátka, GIT: gastrointestinální trakt)

Tabulka 4: Klinická charakteristika pacientů a zdravých kontrol pro analýzu PBMC

Parametry	Pacienti se SSc	Zdravé kontroly
Počet	40	40
Pohlaví (žena / muž)	34 / 6	34 / 6
Věk medián (rozsah)	50,5 let (27 – 70)	50,5 let (27 – 71)
Trvání nemoci medián (rozsah)	2 roky (0,5 – 18)	-
dcSSc / lcSSc	9 / 31	-
Pozitivita ANA	39 / 40 (97,5 %)	-
Pozitivita anti-Scl70	16 / 40 (40 %)	-
Pozitivita ACA	5 / 40 (12,5 %)	-
Raynaudův fenomén	39 / 40 (97,5 %)	-
Postižení GIT	15 / 40 (37,5 %)	-
Artralgie a/nebo artritida	18 / 40 (45 %)	-
Plicní fibróza	22 / 40 (55 %)	-
Plicní arteriální hypertenze	6 / 40 (15 %)	-
Postižení srdce	20 / 40 (50 %)	-
Postižení ledvin	26 / 40 (65 %)	-
Digitální ulcerace	8 / 40 (20 %)	-

(dcSSc: difúzní systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná systémová sklerodermie, ANA: anti-nukleární autoprotiálátka, anti-Scl70: autoprotiálátka proti topoisomerase I, ACA: anti-centromerové autoprotiálátka, GIT: gastrointestinální trakt)

Tabulka 5: Klinická charakteristika bioptovaných pacientů

Parametry	SSc pacienti	Zdravé kontroly
Počet	19	12
Pohlaví (žena / muž)	16 / 3	10 / 2
Věk medián (rozsah)	52 let (19 – 69)	50 let (20 – 67)
Trvání nemoci medián (rozsah)	4 roky (0,5 – 11)	-
dcSSc / lcSSc	12 / 7	-
Pozitivita ANA	19 / 19 (100 %)	-
Pozitivita anti-Scl70	8 / 19 (45 %)	-
Pozitivita ACA	4 / 19 (25 %)	-
Raynaudův fenomén	19 / 19 (100 %)	-
Postižení GIT	16 / 19 (85 %)	-
Plicní fibróza	3 / 19 (20 %)	-
Plicní arteriální hypertenze	8 / 19 (45 %)	-
Postižení srdce	2 / 19 (15 %)	-
Postižení ledvin	2 / 19 (15 %)	-

(dcSSc: difúzní systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná systémová sklerodermie, ANA: anti-nukleární autoprotilátky, anti-Scl70: autoprotilátky proti topoisoméráze I, ACA: anti-centromerové autoprotilátky, GIT: gastrointestinální trakt)

4.2. Použité metody

4.2.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Koncentrace sledovaných biomarkerů byla stanovena v krevní plazmě a séru pomocí metody ELISA s použitím komerčně dostupných kitů (tabulka 6). Absorbance byla naměřena pomocí ELISA readeru Sunrise (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) při vlnové délce 450 nm. Výsledná data byla vyhodnocena pomocí programu Kim 32 (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika).

Tabulka 6. Použité ELISA kity

Biomarker	Výrobce
S100A4	CycLex/CircuLex, Nagano, Japonsko
IL-35	Cloud-Clone Corp., Houston, USA
Hsp90	eBioscience, Vídeň, Rakousko

Vybrané vzorky byly vždy před použitím rozmrazeny a spolu s roztoky z ELISA kitu vytemperovány na laboratorní teplotu. ELISA kity obsahovaly i chemikálie, které nebyly připraveny k přímému použití. Dané složky i jednotlivé vzorky byly naředěny či rozpuštěny v uvedeném množství destilované vody (dH₂O) nebo přítomných ředících roztocích dle návodu. Standardní, tedy kontrolní, řada sedmi vzorků v doubletu byla vytvořena postupným ředěním standardu o předem známé koncentraci. Dvě poslední jamky obsahovaly pouze ředící roztok, který fungoval jako „blank“, jehož průměrná absorbance byla následně odečtena od výsledných absorbancí ostatních vzorků. Vzorky i jednotlivé roztoky byly před použitím vždy promíchány pomocí vortexu. Jednotlivé postupy pro naměření biomarkerů v séru či plazmě SSc pacientů a zdravých kontrol byly provedeny podle přiloženého návodu od výrobce.

4.2.2. Izolace RNA

Celková RNA byla izolována z mononukleárních buněk periferní krve pomocí izolačního kitu miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podle protokolu výrobce. Práce probíhala v laminárním boxu s využitím vhodných přístrojů a materiálu pro práci s RNA v místnosti určené pouze pro izolaci RNA. Zbytková kontaminace DNA byla odstraněna pomocí DNáza setu bez RNáz (Qiagen, Hilden, Germany) podle doporučení výrobce. Vyizolovaná mRNA byla následně uchovávána při -80°C.

Celková RNA z dermálních fibroblastů byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin® RNA II Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren, Německo) podle návodu výrobce.

Ověření koncentrace a čistoty izolované RNA bylo změřeno na spektrofotometru a následně vyhodnoceno počítačovým programem NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Pro ověření bylo použito 1,5 µl vzorku, jako blank byla použita voda bez RNáz. Koncentrace byla stanovena prostřednictvím absorbance při vlnové délce 260 nm, čistota při vlnových délkách 260 a 280 nm.

4.2.3. Reverzní transkripce a kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR)

Po dobu přípravy RNA na reverzní transkripci a komplementární DNA (cDNA) pro PCR byly vzorky a reakční směsi neustále na ledu. V případě, že ihned po skončení reverzní transkripce neproběhla kvantitativní PCR metoda, byly vzorky uchovány v -20°C. Genomická kontaminace a formace dimerů z primerů byly vyloučeny pomocí vzorků cDNA, které byly reverzně transkribovány bez použití reverzní transkriptázy a vzorků bez cDNA.

4.2.3.1. Reverzní transkripce a kvantitativní PCR RNA vzorků z PBMC

Ze všech vzorků izolované RNA bylo odebráno množství o koncentraci 100 ng/μl, které bylo použito pro přepis do cDNA. Pro reverzní transkripci provedenou v přístroji MyCycler (BioRad, Hercules, USA) s teplotním profilem, uvedeným v tabulce 7, bylo zapotřebí celkem 20 μl objemu, z něhož 10 μl tvořila samotná RNA a 10 μl reakční směs uvedená v tabulce 8. Výsledná cDNA byla naředěna 50 μL vody pro PCR, abychom získali koncentraci 2 ng/μl ve všech vzorcích.

Tabulka 7. Protokol pro průběh transkripční reakce

Cyklus (počet opakování)	Teplota	Čas
1. (1x)	25 °C	10 min
2. (2x)	37 °C	60 min
3. (1x)	85 °C	5 min
4. (1x)	4 °C	∞

Tabulka 8. Reakční směs (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

Reakční pufr (10x RT Buffer, 100 mM)	2 μl
Směs dNTP (dNTP Mix, 100 mM)	0,8 μl
10x Random Primers	2 μl
Reverzní transkriptáza (Mustiscribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL)	1 μl
Voda pro PCR (Nuclease free H ₂ O)	4,2 μl
Reakční směs (celkové množství na jednu reakci)	10 μl
RNA (celkové množství na jednu reakci)	10 μl

Vzniklé cDNA vzorky byly použity pro analýzu genů, uvedených v tabulce 9, prostřednictvím kvantitativní PCR metody. Jako endogenní kontrola byla použita eukaryotní ribozomální RNA (rRNA) 18S. Pro kvantitativní PCR reakci bylo zapotřebí celkem 25 μ l objemu, z něhož tvořila 3 μ l cDNA o koncentraci 2 ng/ μ L a 22 μ l reakční směs viz tabulka 10. Reakce probíhla v přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System s využitím programu SDS 2.4 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) za použití teplotního modulu popsaného v tabulce 11.

Tabulka 9. Použité sondy (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

Název sondy	Katalogové číslo
HSP90AA1 , ID:Hs00743767_sH	4331182
HSP90AB1 , ID:Hs03043878_g1	4331182
Ebi-3 , ID: Hs01057148_m1	4331182
IL-12A , ID: Hs01073447_m1	4331182
S100A4 , ID: Hs00243202_m1	4331182
18S , ID: Hs03003631_g1	4331182

Tabulka 10. Reakční směs pro PCR (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5 μ l
Sonda (viz tab. 9)	1,25 μ l
Voda pro PCR (Nuclease free H ₂ O)	8,25 μ l
Reakční směs (celkové množství na jednu reakci)	22 μl
cDNA (celkové množství na jednu reakci)	3 μl

Tabulka 11: Průběh kvantitativní PCR reakce

Cyklus (počet opakování)	Teplota	Čas
1. (1x)	50 °C	2 min
2. (1x)	95°C	10 min
3. (45x)	95°C	15 s
	60°C	1 min

4.2.3.2. Reverzní transkripce a kvantitativní PCR RNA vzorků z dermálních fibroblastů

RNA byla převedena do cDNA v celkovém objemu 10 μ l, z čehož 3,85 μ l tvořila vyizolovaná RNA a 6,15 μ l reakční směs viz tab. 12. Reverzní transkripce byla provedena v termocykleru Biometra Tpersonal thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Německo) s průběhem uvedeným v tabulce 13.

Tabulka 12: Reakční směs reverzní transkripce (Applied Biosystems, Darmstadt, Německo)

10x taqMan RT Buffer	1 μ l
Směs dNTP	2 μ l
Random hexamers	0,50 μ l
Reverzní transkriptáza	0,25 μ l
Inhibitor RNáz	0,20 μ l
MgCl ₂ 25nM	2,20 μ l
Reakční směs (celkové množství na jednu reakci)	6,15 μl
RNA (celkové množství na jednu reakci)	3,85 μl

Tabulka 13: Průběh reverzní transkripce

Cyklus (počet opakování)	Teplota	Čas
1. (1x)	20 °C	10 min
2. (1x)	48 °C	30 min
3. (1x)	95°C	5 min
4.	4 °C	∞

Expres vybraných genů byla kvantifikována pomocí SYBR Green real time-PCR (tab. 14, 15) s použitím detekčního systému ABI Prism 7300 Sequence (Life Technologies, Darmstadt, Německo). Specifické páry primerů pro daný gen byly navrženy v softwaru Primer3 odbornými pracovníky. Seznam sekvencí použitých primerů je uveden v tabulce 16. Analyzované geny byly normalizované vůči „housekeeping“ genu β -actinu, který sloužil jako endogenní kontrola.

Tabulka 14: Reakční směs pro PCR (Applied Biosystems, Darmstadt, Německo)

Master Mix SYBR	5 μ l
Primer fwd a rev (viz tab. 15)	2x 0,8 μ l
Voda pro PCR (Nuclease free H ₂ O)	2,9 μ l
Reakční směs (celkové množství na jednu reakci)	9,5 μl
cDNA (celkové množství na jednu reakci)	0,5 μl

Tabulka 15: Průběh kvantitativní PCR reakce

Cyklus (počet opakování)	Teplota	Čas
1. (1x)	95 °C	3 min
2. (40x)	95°C	20 s
	60°C	20 s
3. (1x)	95°C	1 min
	55°C	30 s
	95°C	30s

Tabulka 16: Seznam sekvencí použitých primerů pro analýzu genové exprese

Primer	Sekvence (5' → 3')
human β -actin fwd	AGAAAATCTGGCACCACACC
human β -actin rev	TAGCACAGCCTGGATAGC
human EBI3 fwd	CACGTACAGGCTCGGCAT
human EBI3 rev	AGCTCCCTGACGCTTGTAAC
human p35 fwd	TTCCCATGCCTTCACCACTC
human p35 rev	ACTCCATTAGTTATGAAAGAGGTC
human COL1A1 fwd	TCAAGAGAAGGCTCACGATGG
human COL1A1 rev	TCACGGTCACGAACCACATT
human COL1A2 fwd	GGTCAGCACCACCGATGTC
human COL1A2 rev	CACGCCTGCCCTTCCTT
human PAI-1 fwd	TCATTGCTGCCCTTATGA
human PAI-1 rev	GTTGGTGAGGGCAGAGAGAG
human CTGF fwd	AACTCACACAACAACCTTCCCCGC
human CTGF rev	GAGTCGCACTGGCTGTCTCCTCT

4.2.4. Kvantifikace genové exprese

Data z kvantitativní PCR reakce byla vyhodnocena pomocí programu RQ Manager 1.2.1 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), pomocí něhož byly získány hodnoty C_T (threshold cycle), které zobrazují cyklus PCR reakce, ve kterém došlo k překročení fluorescenčního prahu. Relativní genová exprese byla analyzována komparativní C_T metodou (Schmittgen and Livak, 2008). Pro stanovení hodnot ΔC_T byly analyzované geny normalizované vůči endogenní kontrole.

4.2.5. Tkáňové kultury fibroblastů

Ve spolupráci s Univerzitou v Erlangenu jsme získané fibroblasty z bioptované kůže kultivovali v Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM/F12), který obsahoval 10 % teplem inaktivované fetální hovězí sérum (FBS, fetal bovine serum), 100 U/ml penicillinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 2 mM L-glutaminu a 2,5 μ g/ml amphotericinu B (všechny od Invitrogen, Karlsruhe, Německo) při teplotě 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂ a vlhkosti vzduchu 90 %. Konfluentní buňky byly pasážovány trypsinizací po dobu 3 – 5 min při teplotě 37 °C. Fibroblasty použité pro stimulační experimenty byly ze 4. – 8. pasáže.

4.2.6. Stimulace pomocí rekombinantního IL-35 a TGF- β

Fibroblasty byly pro *in vitro* experimenty kultivovány v DMEM/F12 obsahujícím 0,1 % FBS a kyselinu askorbovou (50 μ g/ml) po dobu 3 dnů před stimulací určitým cytokinem. Pro daný experiment byly fibroblasty stimulovány rekombinantním TGF- β (10 ng/ml; PeproTech, Hamburg, Německo) nebo rekombinantním IL-35 proteinem v různých koncentracích (50 pg/ml a 1 ng/ml; ALEXIS Biochemicals, Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) po dobu devíti a šesti hodin. Koncentrace TGF- β byla vybrána dle standardní koncentrace používané pro stimulaci dermálních fibroblastů. Je založena na koncentracích sérového TGF- β u pacientů se SSc (Distler J. et al., 2007; Jungel A. et al., 2007). Koncentrace rekombinantního IL-35 proteinu byly zvoleny na základě naměřených koncentrací IL-35 v supernatantu kultivovaných dermálních fibroblastů a v séru SSc pacientů a kontrolních jedinců. Po 24 h stimulaci byly buňky lyzovány v lyzačním pufru [obsahujícím 1 % β -merkaptotanol v RA1 pufru (Macherey-Nagel, Dueren, Německo)] a kulturační médium bylo uchováno. Vzorky byly před dalším použitím skladovány při teplotě -80 °C.

4.2.7. Stanovení koncentrace kolagenu v supernatantu

Rozpusťný kolagen byl detekován v supernatantech buněčných kultur pomocí SirCol kolagenové eseje (Biocolor, Belfast, UK). Podle návodu výrobce bylo inkubováno 400 µl červeného barviva Sirius Red, které se specificky váže na bazické části kolagenu, se 150 µl supernatantu při mírném promíchávání po dobu 30 min při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byl komplex kolagenu a barviva stočen na 10 min při otáčkách 12000 x g a následně rozpuštěn ve 400 µl roztoku 0,5 M NaOH. Absorbance, která je přímo úměrná množství navázaného kolagenu, byla stanovena při vlnové délce 540 nm pomocí mikrodestičkového spektrofotometru Spectra MAX 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.2.8. Imunohistochemie a imunofluorescence

Vzorky bioptované kůže pacientů se SSc a zdravých kontrol, které byly zpracované odborným laboratorním pracovníkem, byly po fixaci ve 4 % PFA (paraformaldehyd) po dobu 6 h při pokojové teplotě zality do parafinu a nařezány pomocí rotačního mikrotomu na jednotnou tloušťku 5 µm podle standardních protokolů přípravy imunohistochemických preparátů. Parafinové řezy byly nejprve odparafinovány xylenem (3x 10 min), zavodněny sestupnou alkoholovou řadou (100% etanol 2x 5 min, 95% etanol 5min a 80% etanol 5min). Endogenní peroxidázová aktivita byla potlačena přidáním 3 % roztoku H₂O₂ po dobu 30 min. Kultivované dermální fibroblasty po *in vitro* experimentech byly fixovány 20 min 4 % PFA a následně permeabilizovány pomocí 0,25 % Triton X-100 po dobu 10 min při pokojové teplotě. Po blokování nespecifické vazby pomocí 2 % BSA v PBS po dobu 60 min při pokojové teplotě pak byly řezy nebo fibroblasty inkubovány (a) s monoklonálními králičími anti-Ebi-3 protilátkami (Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA) (b) s monoklonálními myšími anti-IL12a (anti-p35) protilátkami (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) (c) s monoklonálními myšími anti- α -smooth muscle actin (anti- α SMA) protilátkami (klon 1A4; Sigma-Aldrich), (d) s monoklonálními myšími anti-prolyl-4-hydroxyláza-beta (anti-P4H) protilátkami (Acris Antibodies, Herford, Německo). Jako sekundární protilátky byly použity protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP) (1:200, Dako) anebo fluorescenční protilátky Alexa Fluor (1:200, 488 – zelená fluorescence, 594 – červená fluorescence) (Life Technologies, Darmstadt, Německo). Kontrolní barvení bylo provedeno stejným způsobem pouze s vynecháním primární protilátky.

Imunohistochemicky obarvené řezy primárními protilátkami proti Ebi-3, p35, P4H a α SMA byly vizualizovány pomocí substrátu DAB [diaminobenzidine peroxidase substrate solution (Sigma-Aldrich)]. Stresová vlákna byla vizualizována pomocí rhodamin-faloidin konjugátu (Sigma-Aldrich). Ve všech imunofluorescenčních barveních byla jádra značena DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Německo). Vzniklé preparáty byly po obarvení prohlíženy a snímány na mikroskopu Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, Holandsko). Ke kvantifikaci intenzity fluorescence byl využit software ImageJ, verze 1.44.

4.2.9. Statistická analýza dat

Statistické analýzy a grafické znázornění byly zpracovány v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA). Vyhodnocení normální distribuce hodnot bylo vyhodnoceno D'Agostino-Pearsonovým testem. Pokud byly hodnoty rozloženy normálně, byl použit pro výpočet statistické významnosti rozdílů dané proměnné v porovnání dvou skupin parametricky dvouvýběrový t-test. Jestliže byly hodnoty nerovnoměrně distribuovány, byl pro výpočet použit neparametrický Mann-Whitneyho test. Vzájemný vztah dvou veličin byl definován prostřednictvím parametrického Pearsonova či neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu. Signifikantní hodnoty (p-hodnoty) jsou v grafech prezentovány následovně: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$; NS, nesignifikantní. Za statisticky signifikantní hodnotu byla považována hladina významnosti $p < 0,05$.

5. Výsledky

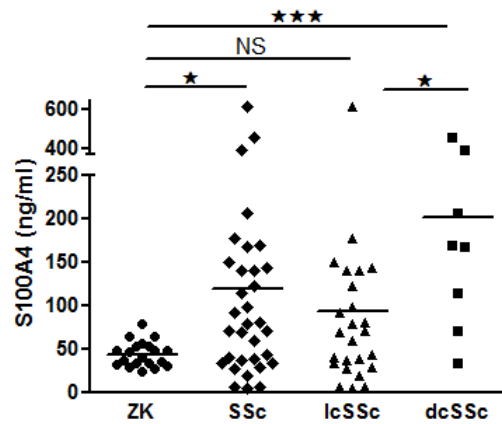
5.1. S100A4

5.1.1. Analýza sérového proteinu S100A4

Na základě předchozích studií o zvýšené lokální expresi S100A4 v dermis a dermálních fibroblastech pacientů se SSc, nás zajímala také jeho extracelulární exprese, konkrétně přítomnost S100A4 v séru SSc pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Detekovali jsme vyšší koncentrace S100A4 u pacientů se SSc oproti ZK {SSc: medián 78,60 ng/ml [mezikvartilové rozpětí (IQR) 35,25 – 146,5]

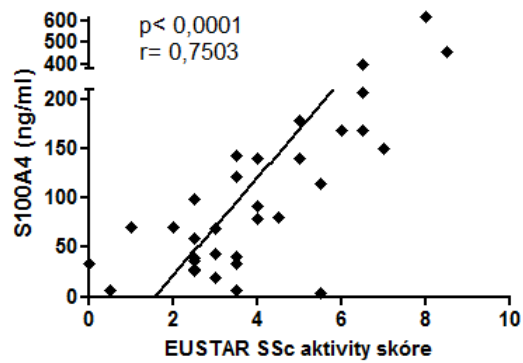
vs. ZK: 43,43 ng/ml (IQR 32,32 – 53,41), $p=0,0116$ }. Koncentrace byly rozdílné i u jednotlivých podskupin SSc, kdy vyšší hodnoty byly zaznamenány u pacientů se dcSSc oproti pacientům se lcSSc [dc: 168,5 ng/ml (81,49 – 347,5) vs. lc: 68,38 (30,94 – 130,6) ng/ml, $p=0,0208$] (obr. 5). Pacienti s dcSSc mají obecně rozsáhlejší a závažnější kožní i orgánové postižení. Dále nás zajímali možné asociace zvýšeného extracelulárního proteinu S100A4 s jednotlivými klinickými parametry SSc. Zjistili jsme, že hladiny S100A4 pozitivně korelují s aktivitou nemoci (obr. 6), která je definována pomocí EUSTAR skóre aktivity SSc (obr. 8A)(Valentini et al., 2003). Vyšší sérové hladiny S100A4 jsme detekovali u pacientů s větším rozsahem a intenzitou kožního postižení (obr. 7), které je stanoveno pomocí modifikovaného Rodnanova kožního skóre (mRSS)(Clements et al., 1993). Princip hodnocení mRSS je uveden na obrázku 8B. Vyšší hladiny S100A4 v séru jsme zaznamenali u pacientů, kteří vykazují zhoršenou aktivitu a funkčnost plic, která byla hodnocena pomocí základních parametrů funkčního vyšetření plic (spirometrie: FVC, FEV1; difúzní kapacita pro CO: DLCO; saturace O₂ v periferní krvi: SpO₂)(obr. 9). Sérové koncentrace S100A4 nebyly signifikantně ovlivněny dalšími sledovanými klinickými parametry.

Obrázek 5: Sérové koncentrace S100A4 jsou vyšší u pacientů se SSc oproti ZK a zároveň vyšší u pacientů s dcSSc než u lcSSc



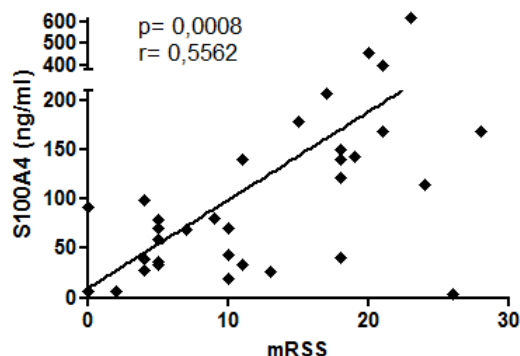
(ZK: zdravé kontroly, SSc: systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná SSc, dcSSc: difúzní SSc, horizontální linie znázorňuje medián, *, $p \leq 0,05$; ***, $p < 0,001$; NS, nesignifikantní)

Obrázek 6: Vyšší koncentrace S100A4 u pacientů se SSc korelují s aktivitou onemocnění



(hodnocení aktivity onemocnění podle EUSTAR skóre aktivity SSc je blíže popsána v obr. 8A)

Obrázek 7: Sérové koncentrace S100A4 pozitivně korelují s rozsahem a intenzitou kožního postižení hodnocenými pomocí modifikovaného Rodnanova kožního skóre (mRSS)



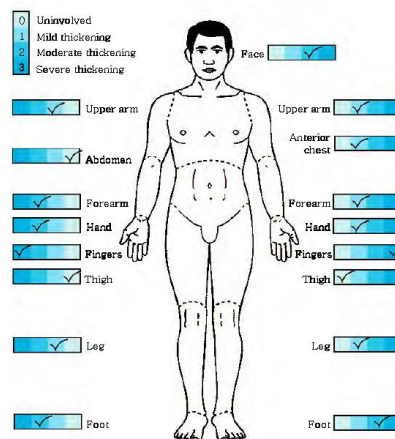
(hodnocení modifikovaného Rodnanova kožního skóre (mRSS) je vysvětlené na obr. 8B)

Obrázek 8: EUSTAR skóre aktivity SSc a modifikované Rodnanovo kožní skóre

A

Item	Score
Modified Rodnan Skin Score (mRSS > 14)	1.0
Scleredema	0.5
Delta-Skin	2.0
Digital necrosis	0.5
Delta-Vascular	0.5
Arthritis	0.5
DLCO < 80%	0.5
Delta-Heart, Lung	2.0
ESR > 30mm/1st h	1.5
Hypocomplementaemia	1.0
Total maximum disease activity index	10.0

B



[A: Výsledná hodnota charakterizující aktivitu onemocnění, je součtem hodnot deseti vybraných klinických parametrů, které patří mezi důležité ukazatele klinického stavu u SSc, a kterým je přidělena rozličná váha (skóre napravo od každého parametru; maximální skóre = 10, skóre $\geq 3,0$ znamená aktivní onemocnění).

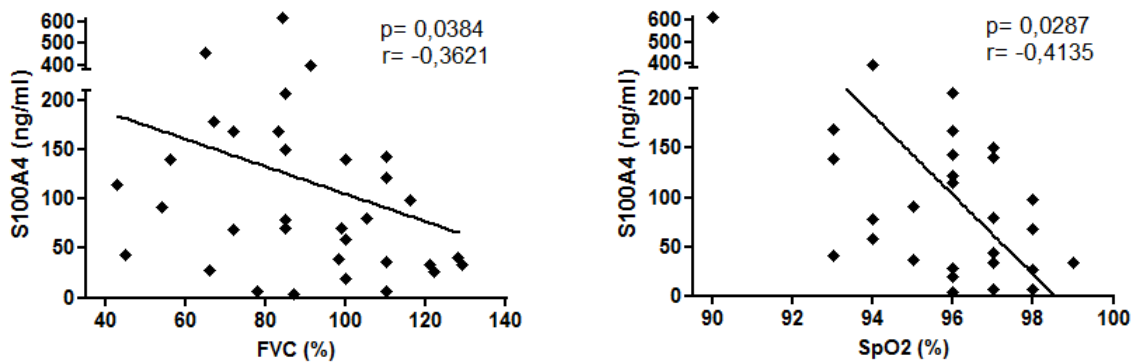
(DLCO: difúzní kapacita plic pro oxid uhelnatý, ESR: sedimentace erytrocytů)

Převzato a upraveno podle (van den Hoogen et al., 2013)

B: Kožní skóre mRSS zahrnuje 17 oblastí těla, na kterých je subjektivně lékařem hodnocena kožní tloušťka (bodové hodnocení: 0- kůže je normální, 1- je tužší, ale uchopitelná sevřením prstů v řasu, 2- je jednoznačně tužší, vytváří řasu, která však nelze uchopit, 3- je výrazně tuhá, nelze vytvořit kožní řasu)]

Převzato a upraveno podle (Clements et al., 1993)

Obrázek 9: Vyšší exprese S100A4 je asociována s nižší hladinou funkčních plicních testů

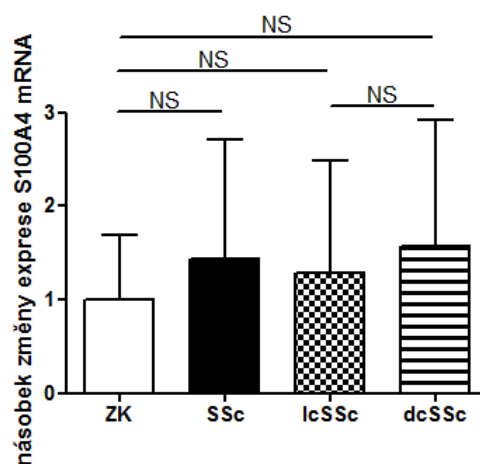


(FVC: usilovná vitální kapacita, SpO₂: saturace krve kyslíkem)

5.1.2. Analýza intracelulární exprese S100A4

Genová exprese S100A4 v PBMC se signifikantně nelišila u pacientů se SSc a zdravých kontrol [SSc: 1,165 (IQR 0,3037 – 2,195) vs. ZK: 0,4775 (IQR 0,6839 – 1,301), p= 0,3009], ani mezi jednotlivými podskupinami SSc lcSSc vs. dcSSc [lcSSc: 0,8998 (IQR 0,4209 – 1,742), p= 0,6208 / dcSSc: 1,547 (IQR 0,2342 – 2,711), p=0,2456] (obr. 10). Exprese S100A4 nebyla dále významně ovlivněna dalšími sledovanými klinickými parametry.

Obrázek 10: Genová exprese S100A4 v PBMC



(Expresse genu pro S100A4 nebyly signifikantně rozdílné u SSc pacientů a zdravých kontrol, ani mezi jednotlivými typy SSc lcSSc a dcSSc, ZK: zdravé kontroly, SSc: systémová sklerodermie, lcSSc: limitovaná SSc, dcSSc: difúzní SSc, znázorněn je průměr a směrodatná odchylka (SD); NS, nesignifikantní)

5.2. IL-35

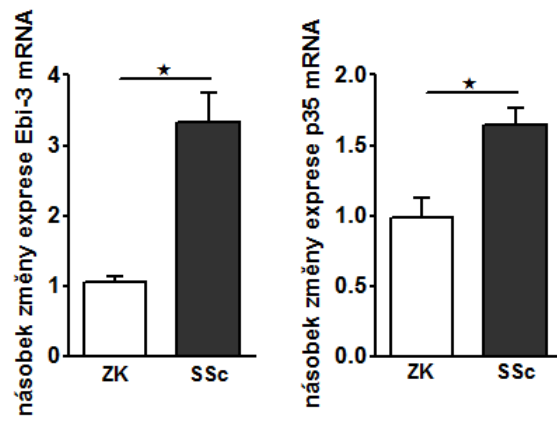
Díky již popsaným imunomodulačním vlastnostem IL-35 ve studiích zabývajících se různými typy autoimunitních onemocnění, jsme se zajímali, zda bude mít IL-35 určitou roli také v patogenezi SSc.

5.2.1. Analýza lokální exprese IL-35 v kůži pacientů se SSc

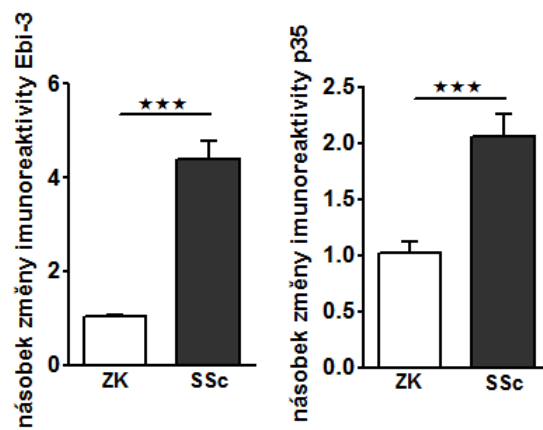
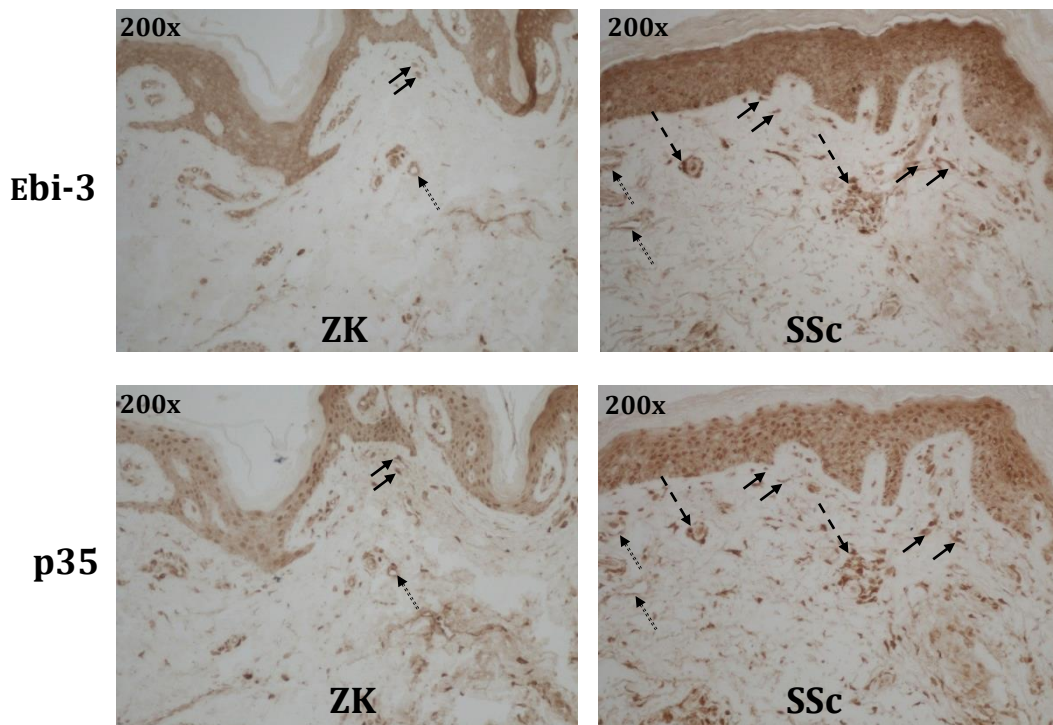
Nejprve jsme se zaměřili na stanovení lokální exprese IL-35 v bioptovaných kožních lézích pacientů se SSc a v kůži zdravých jedinců. Zjistili jsme zvýšenou expresi obou podjednotek IL-35, Ebi-3 a p35, v kožních lézích SSc pacientů oproti zdravým jedincům jak na mRNA (Ebi-3 $p = 0,0286$, p35 $p = 0,0220$), tak na proteinové úrovni (Ebi-3 $p = 0,0002$, p35 $p = 0,0009$)(obr. 11). Ve fibrotické kůži pacientů se SSc byla detekována zvýšená exprese Ebi-3 u velkého množství fibroblastů, v perivaskulárních zánětlivých infiltrátech a v bazální vrstvě epidermis oproti kontrolám, u nichž jsme zaznamenali celkově nižší expresi této podjednotky, která byla limitovaná pouze na malý počet fibroblastů a perivaskulární buňky. Množství Ebi-3 v endotelu cév dermis bylo srovnatelné mezi SSc pacienty a zdravými jedinci (obr. 11B). Exprese podjednotky p35 byla u kontrolní skupiny velmi slabá a omezená pouze na cévy, keratinocyty, perivaskulární buňky a na malý počet fibroblastů, zatímco u SSc pacientů byla naměřena intenzivní exprese p35 u většiny fibroblastů a v perivaskulárních infiltrátech. Koncentrace p35 byla srovnatelná v keratinocytech a cévách u fibrotické i zdravé kůže (obr. 11B). Obě podjednotky Ebi-3 i p35 byly dále detekovány v P4H-pozitivních fibroblastech (p4H je marker mesenchymálních buněk) i v α SMA-pozitivních myofibroblastech (α SMA je exprimován, mimo jiné, aktivovanými fibroblasty, tzv. myofibroblasty)(obr. 11C).

Obrázek 11: Zvýšená exprese obou podjednotek IL-35, Ebi-3 a p35 v kůži pacientů se SSc

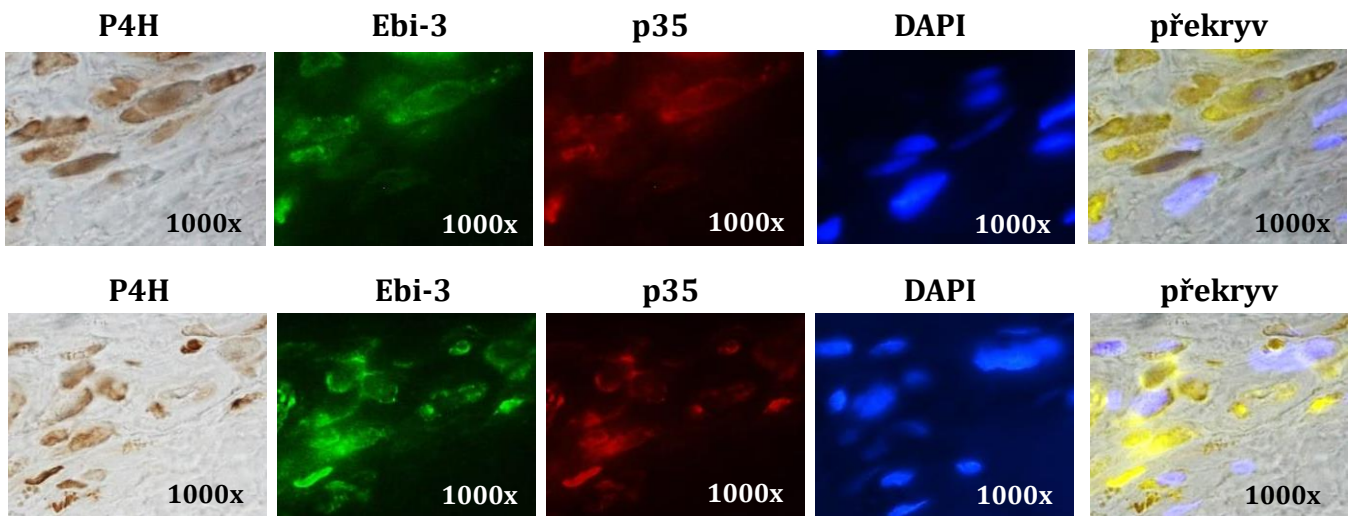
A



B



C



(A: mRNA exprese Ebi-3 a p35 je zvýšená v SSc kožních lézích oproti kůži ZK

B: Zvýšené exprese protein Ebi-3 a p35 byly detekovány v kůži pacientů se SSc oproti ZK a kvantitativně stanoveny pomocí softvéru imageJ. Šipky s plnou čarou ukazují na fibroblasty, šipky s přerušovanou čarou poukazují na perivaskulární zánětlivé buňky a šipky s tečkovanou čarou vyznačují endoteliální buňky cév (velikost, 50 μ m)

C: Exprese Ebi-3 a p35 kolokalizuje s markery fibroblastů a myofibroblastů (P4H, α SMA)

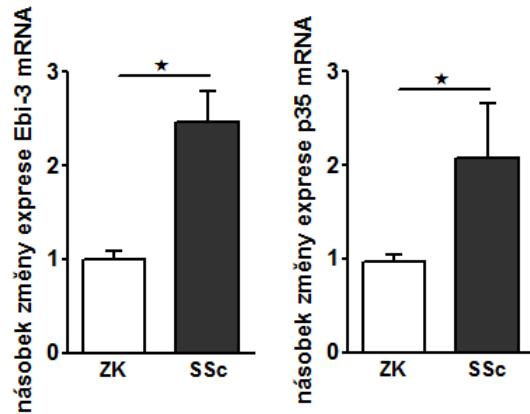
*, $p \leq 0,05$; ***, $p < 0,001$)

5.2.2. TGF- β indukuje expresi a sekreci IL-35 u dermálních fibroblastů

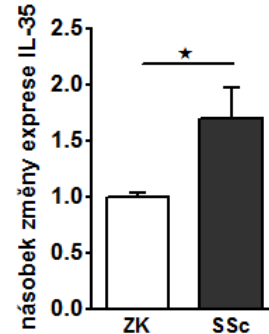
Zvýšená exprese obou řetězců IL-35 přetrvávala v kultivovaných SSc dermálních fibroblastech i v průběhu několika pasáží, což bylo potvrzeno jak dle zvýšených hladin mRNA (Ebi-3 $p = 0,0160$, p35 $p = 0,0286$), tak na proteinové úrovni. Dále jsme detekovali vyšší uvolněné koncentrace IL-35 do supernatantu u SSc dermálních fibroblastů oproti kontrolním fibroblastům ($p = 0,0190$)(obr. 12). U fibrotických onemocnění je prokázána nadměrná aktivace signální dráhy TGF- β , která má významnou roli a podílí se na vzniku aktivovaného fenotypu kultivovaných SSc fibroblastů. Proto jsme se vzhledem k výše uvedenému pozorování domnívali, že TGF- β má i stimulační efekt na expresi IL-35. Poněvadž pro SSc fibroblasty je již charakteristická nadměrná aktivita TGF- β , inkubovali jsme s tímto cytokinem pouze zdravé dermální fibroblasty, u kterých jsme zaznamenali zvýšené exprese na mRNA (Ebi-3 $p = 0,0220$, p35 $p = 0,0286$) i na proteinové úrovni. Stimulované zdravé dermální fibroblasty uvolňovaly do supernatnatu signifikantně větší množství IL-35 v porovnání s nestimulovanými zdravými fibroblasty ($p = 0,0376$)(obr. 13).

Obrázek 12: U kultivovaných SSc fibroblastů přetrvávají zvýšené exprese řetězců Ebi-3 a p35

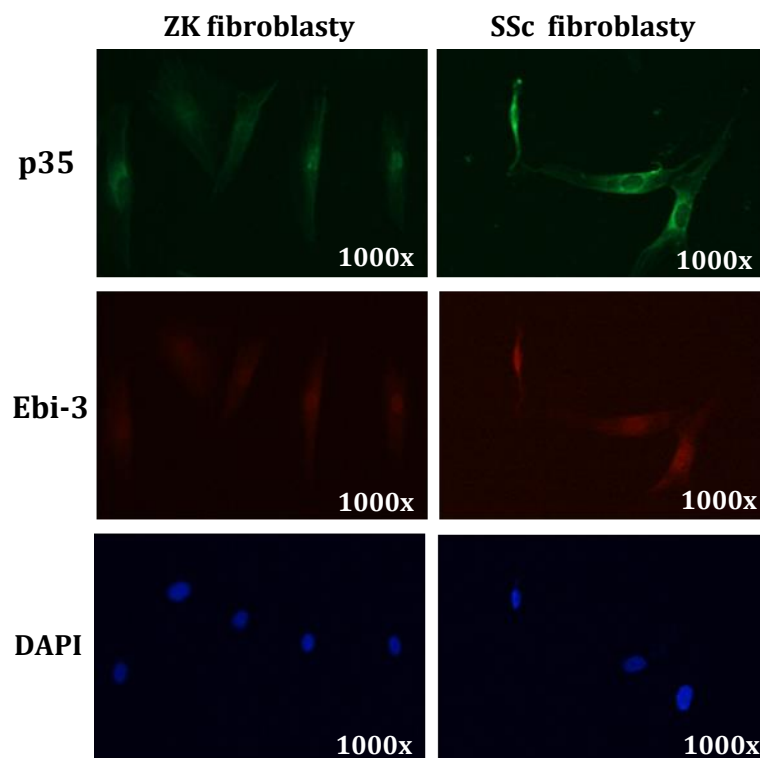
A



B



C



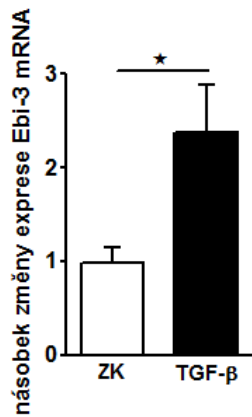
(A: Zvýšené exprese mRNA podjednotek Ebi-3 a p35 u SSc kultivovaných kožních fibroblastů oproti zdravým

B: Koncentrace IL-35v supernatantu jsou zvýšené u kultur se SSc fibroblasty oproti kulturám se zdravými fibroblasty

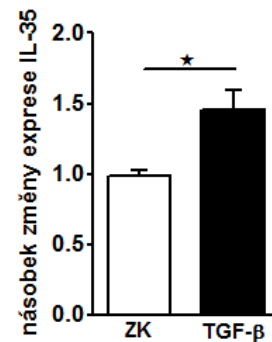
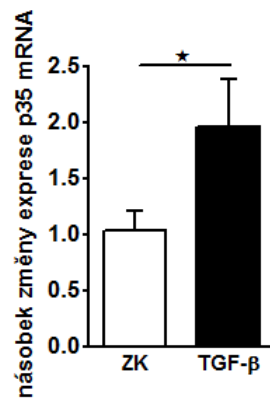
C: Kultivované SSc fibroblasty exprimují zvýšené proteinové hladiny Ebi-3 i p35 řetězců oproti kontrolním fibroblastům. Jádru bylo označeno fluorescenčním barvivem 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) (velikost, 25 μm)(* , p≤ 0,05)

Obrázek 13: TGF- β indukuje expresi Ebi-3 a p35 podjednotek

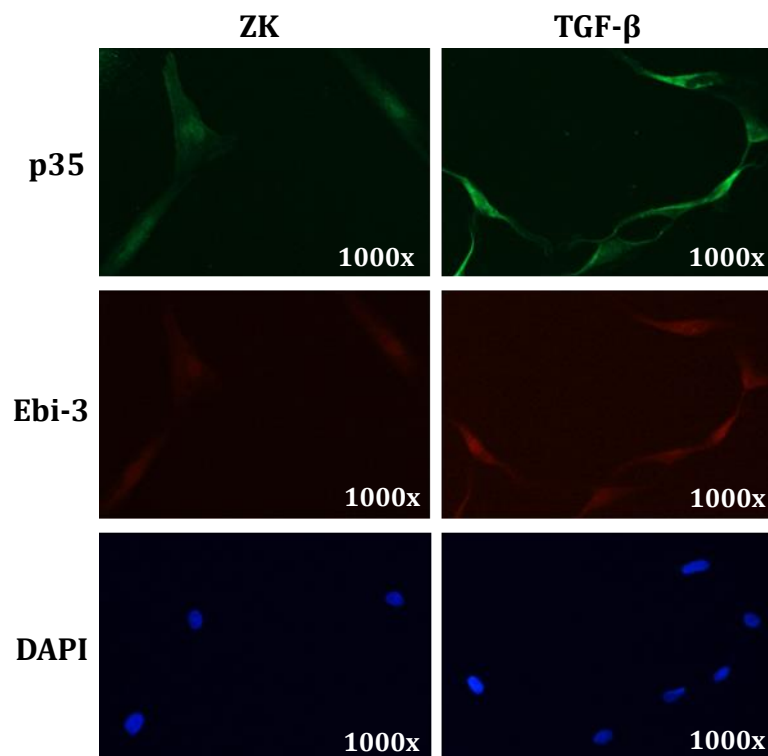
A



B



C



[A, C: Stimulace zdravých dermálních fibroblastů pomocí TGF- β vedla ke zvýšené mRNA (A) i proteinové (C) expresi obou podjednotek Ebi-3 a p35 oproti nestimulovaným zdravým fibroblastům (ZK). Jádru bylo značené fluorescenčním barvivem DAPI (velikost, 25 μ m)

B: Koncentrace IL-35 v supernatantu byly zvýšené u TGF- β stimulovaných zdravých dermálních fibroblastů v porovnání s nestimulovanými zdravými fibroblasty (ZK)

(* , p \leq 0,05)]

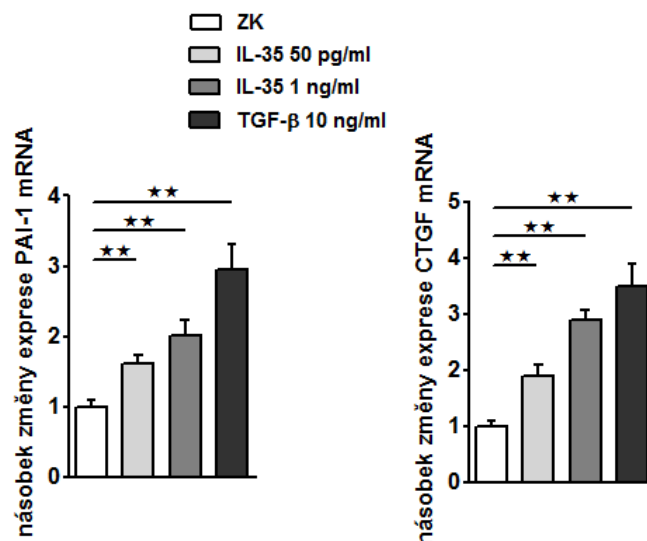
5.2.3. IL-35 indukuje aktivaci fibroblastů a syntézu kolagenu

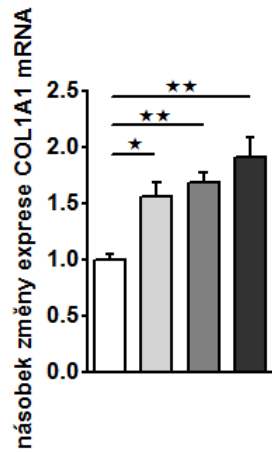
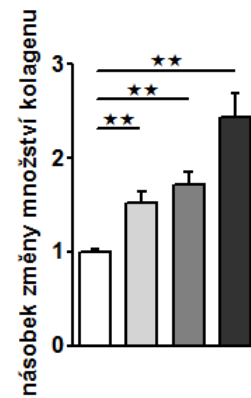
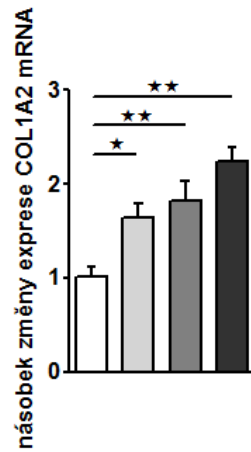
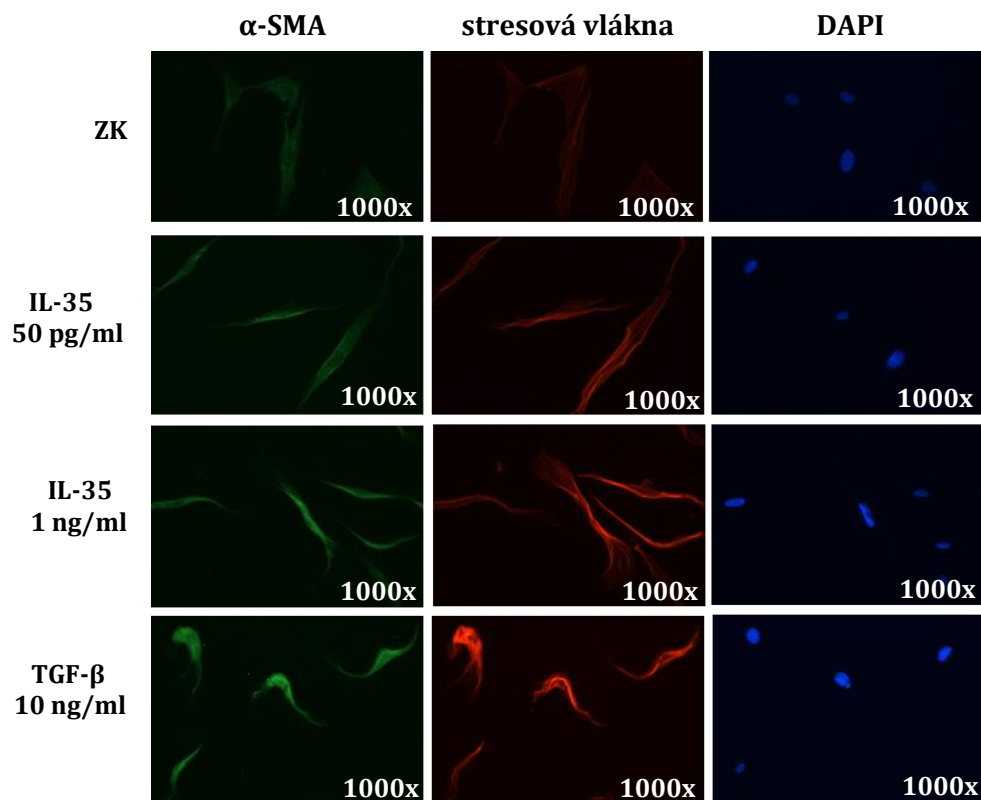
Jelikož aktivace signální dráhy TGF- β , typická pro SSc, vedla dle výše zmíněných pozorování k indukci exprese IL-35, zajímal nás důsledek zvýšené exprese IL-35 u pacientů s touto nemocí. Pro tyto účely jsme stimulovali fibroblasty ze zdravé kůže lidským rekombinantním IL-35 o koncentraci 50 pg/ml nebo 1 ng/ml. Tyto koncentrace byly vybrány na základě průměrných koncentrací IL-35 v supernatantu kultivovaných dermálních fibroblastů a v séru pacientů se SSc a zdravých jedinců. Stimulované fibroblasty lidským rekombinantním TGF- β zde sloužily jako pozitivní kontrola. Tvorba stresových vláken a exprese α -smooth muscle aktinu (α SMA), které reflektují aktivaci fibroblastů a jejich transdiferenciaci v myofibroblasty, vzrůstaly u stimulovaných fibroblastů v závislosti na podané dávce rekombinantního IL-35. Tímto experimentem jsme zjistili, že IL-35 je schopen aktivovat diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty i bez přítomnosti hlavního profibrotického cytokínu TGF- β (obr. 14A). Inkubace fibroblastů s rekombinantním IL-35 indukovala zvýšenou mRNA expresi tkáňového pojivového růstového faktoru (CTGF) a inhibitoru plazminogenového aktivatoru (PAI-1), které patří mezi geny indukované signální dráhou TGF- β .

Stimulace IL-35 dále vedla k nárůstu mRNA exprese genů pro kolagen typu 1, COL1A1 a COL1A2, a vedla ke zvýšené sekreci kolagenu do supernatantu opět v závislosti na koncentraci podaného IL-35 oproti nestimulovaným fibroblastům (obr. 14 B-D).

Obrázek 14: IL-35 aktivuje dermální fibroblasty a stimuluje produkci kolagenu

A



B**C****D**

[A: Zvýšení mRNA exprese PAI-1 a CTGF po stimulaci IL-35

B: Rostoucí mRNA exprese COL1A1 a COL1A2 v závislosti na koncentraci IL-35

C: Zvýšená sekrece kolagenu do supernatantu

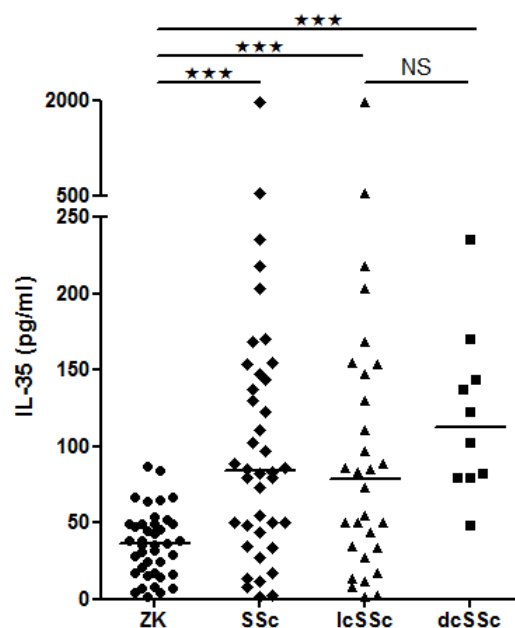
D: Stimulace zdravých dermálních fibroblastů rekombinantním IL-35 vedla k zvýšené expresi α -smooth muscle aktinu (α SMA) a stresových vláken. Jádru bylo značené fluorescenčním barvivem DAPI (velikost, 25 μ m)

(*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$)]

5.2.4. Analýza IL-35 v séru

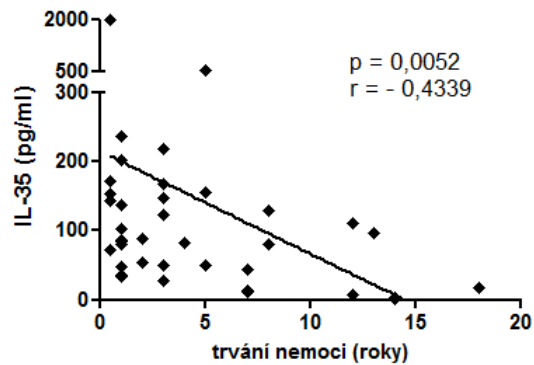
Sérové koncentrace IL-35 byly zvýšené u pacientů se SSc oproti zdravým jedincům [SSc: medián 83,9 pg/ ml (IQR 45,1 – 146,1) vs. ZK: 36,2 pg/ ml (IQR 17,2 – 49,4), $p < 0,0001$]. Hladiny IL-35 v séru byly vyšší u dcSSc oproti lcSSc, avšak rozdíl nebyl signifikantní (obr. 15). Sérové koncentrace IL-35 jsou u SSc pacientů zvýšené v časně (zánětlivé) fázi ($r = -0,4339$, $p = 0,0052$; obr. 16), což je v souladu se zaznamenanými vyššími hodnotami sérového IL-35 u pacientů s časným kapilaroskopickým nálezem v porovnání s aktivním a pozdním SSc nálezem [časný: 148,6 (IQR 80,8 – 660,3) vs aktivní: 52,5 (IQR 37,3 – 85,4) a pozdní: 79,5 (IQR 19,8 – 116,8); časný vs aktivní $p = 0,0441$ a časný vs pozdní $p = 0,0485$; obr. 17]. U všech pacientů se SSc nebyly hladiny sérového IL-35 ovlivněny dalšími sledovanými klinickými parametry.

Obrázek 15: Sérové koncentrace IL-35 jsou vyšší u pacientů se SSc a obou podskupin lcSSc / dcSSc v porovnání se zdravými jedinci



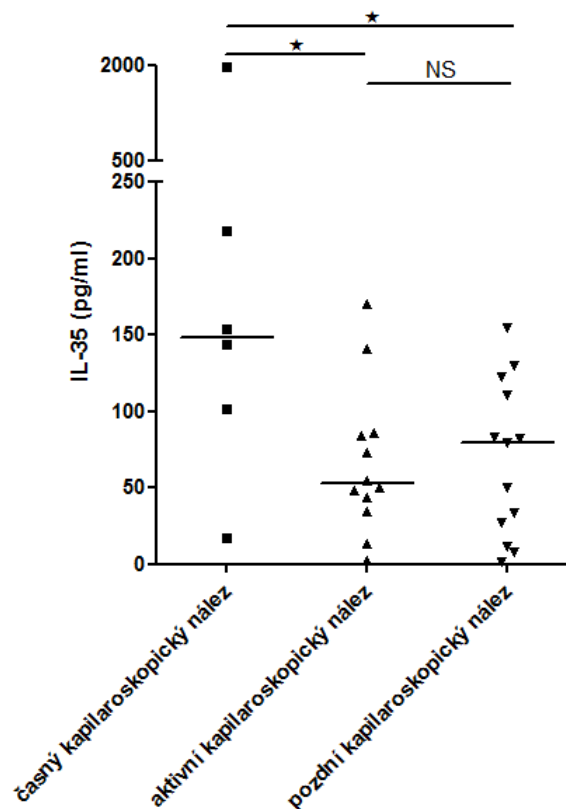
(horizontální linie znázorňuje medián, ***, $p < 0,001$; NS, nesignifikantní)

Obrázek 16: IL-35 v séru je zvýšen v časně (zánětlivé) fázi SSc



(Sérové koncentrace IL-35 negativně korelují s trváním nemoci)

Obrázek 17: Sérový IL-35 je zvýšen u časněho SSc kapilaroskopického nálezu

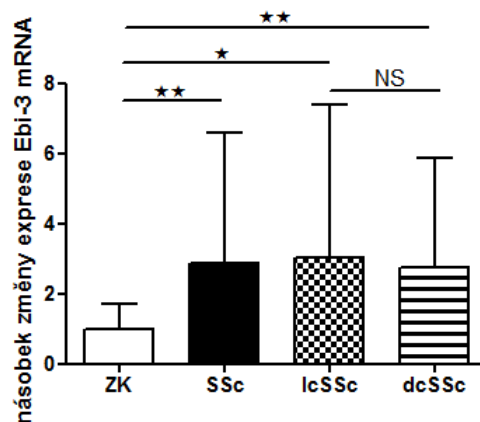


(Zvýšené hodnoty IL-35 jsme detekovali u pacientů s časným SSc kapilaroskopickým nálezem v porovnání s pacienty s aktivním/ pozdním SSc kapilaroskopickým nálezem, horizontální linie znázorňuje medián, *, $p \leq 0,05$, NS, nesignifikantní)

5.2.5. Analýza IL-35 mRNA v PBMC

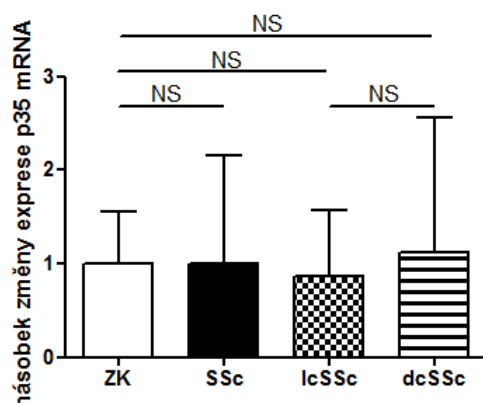
Na mRNA úrovni jsme analyzovali obě podjednotky IL-35, Ebi-3 a p35, v PBMC pacientů se SSc a zdravých kontrol. Expres genu Ebi-3 byla signifikantně zvýšená u pacientů se SSc v porovnání se zdravými kontrolami [SSc: medián 1,720 (IQR 0,7512 – 3,310) vs. ZK: 0,7846 (IQR 0,6023 – 1,220), $p= 0,0030$]. Expres Ebi-3 u zdravých kontrol byla významně snížena také oproti jednotlivým podskupinám lcSSc / dcSSc [lcSSc: 1,788 (IQR 0,5284 – 3,423), $p= 0,0450$ / dcSSc: 1,679 (IQR 0,9414 – 3,436), $p= 0,0050$] (obr. 18). Na mRNA úrovni podjednotky p35 jsme nezaznamenali žádné významné rozdíly mezi pacienty se SSc a zdravými kontrolami [SSc: 0,8093 (IQR 0,4827 – 1,142) vs. ZK: 0,8732 (IQR 0,5819 – 1,386), $p= 0,2505$], ani mezi lcSSc / dcSSc [lcSSc: 0,6339 (IQR 0,4534 – 1,164), $p= 0,1891$ / dcSSc: 0,9106 (IQR 0,4170 – 1,146), $p= 0,5559$] (obr. 19). Expres podjednotky Ebi-3 ani p35 nebyly dále významně ovlivněny jednotlivými sledovanými klinickými parametry.

Obrázek 18: Genová exprese IL-35 podjednotky Ebi-3



(Genová exprese Ebi-3 byla signifikantně vyšší u pacientů se SSc a u jednotlivých podtypů lcSSc / dcSSc v porovnání se zdravými kontrolami, znázorněn je průměr a směrodatná odchylka (SD), *, $p\leq 0,05$; **, $p\leq 0,01$; NS, nesignifikantní)

Obrázek 19: Genová exprese IL-35 podjednotky p35



(Genová exprese se nijak nelišila u pacientů se SSc a danými podtypy lcSSc / dcSSc oproti zdravým kontrolám, znázorněn je průměr a směrodatná odchylka (SD), NS, nesignifikantní)

5.3. Hsp90

5.3.1. Analýza Hsp90α v plazmě

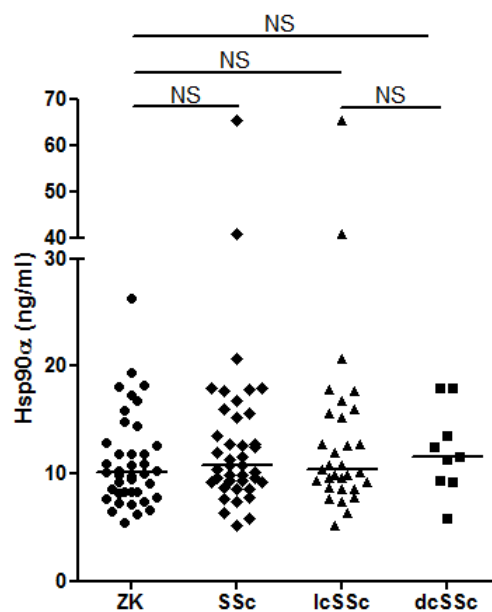
Na základě předchozí studie, která zkoumala roli Hsp90 v patogenezi SSc a vzájemné asociace Hsp90 a TGF-β, jakožto hlavního profibrotického mediátora (Tomcik et al., 2014), nás zajímala možná role inducibilního Hsp90α jako potenciálního biomarkeru SSc a asociace jeho hladin s klinickými parametry, které jsou specifické pro toto onemocnění. Nejprve jsme se zaměřili na systémové exprese Hsp90, které jsme měřili pomocí ELISA metody v plazmě pacientů se SSc a zdravých kontrol (ZK). Hodnoty Hsp90 v plazmě byly téměř srovnatelné mezi pacienty se SSc a ZK [10,10 ng/ ml, (IQR 5,48- 26,31) vs. 10,84 ng/ ml (5,17- 65,68), $p= 0,2502$], ani mezi ZK a jednotlivými podskupinami lcSSc/dcSSc nebyl detekován signifikantní rozdíl [10,43 ng/ ml (5,17- 65,67) vs. 11,60 ng/ ml (5,84- 18,02), $p= 0,7095$], leč pacienti se dcSSc měli hladiny Hsp90 nepatrně vyšší oproti lcSSc pacientům (obr. 20).

I přes minimální rozdíly mezi zkoumanými skupinami nás dále zajímaly možné asociace plazmatických koncentrací Hsp90α s jednotlivými klinickými parametry. Detekovali jsme zvýšené hladiny Hsp90α u pacientů s vyšší aktivitou onemocnění (obr. 21). Jak jsem již uvedla výše, u dcSSc pacientů jsme v plazmě zaznamenali oproti pacientům se lcSSc nepatrně zvýšené hladiny chaperonu Hsp90α. Zjistili jsme, že hladiny

plazmatického Hsp90 α u těchto pacientů s definovanou difúzní formou SSc pozitivně koreluje s rozsahem a intenzitou kožního postižení hodnoceného pomocí mRSS (obr. 22). Pacienti, u nichž je SSc asociována s plicním postižením, vykazovali vyšší exprese plazmatického Hsp90 α , které asociovaly s nižšími hodnotami funkčních plicních testů (obr. 23).

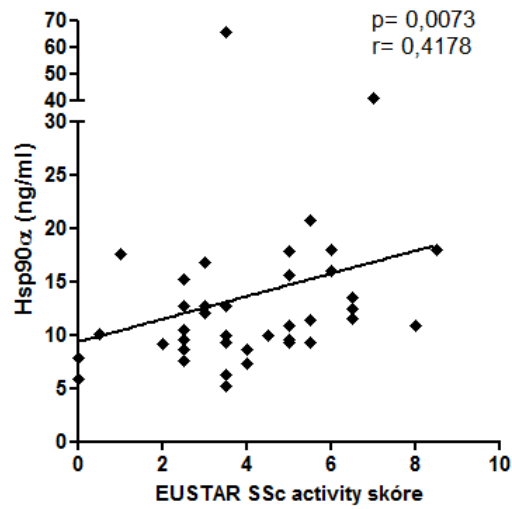
Plazmatické koncentrace Hsp90 α nebyly nijak signifikantně ovlivněny dalšími sledovanými klinickými parametry.

Obrázek 20: Plazmatické koncentrace Hsp90 α se nijak signifikantně neliší u pacientů se SSc a ZK, ani u jednotlivých podskupin SSc



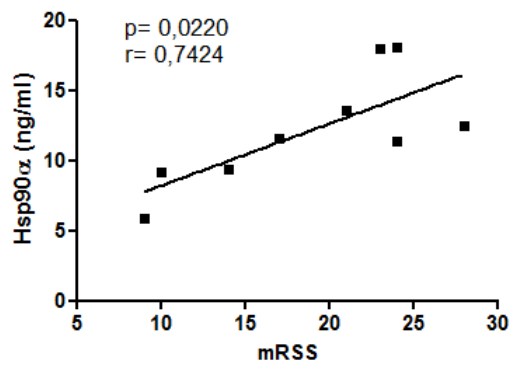
(horizontální linie znázorňuje medián, NS, nesignifikantní)

Obrázek 21: Pacienti s aktivnějším onemocněním mají vyšší hladiny Hsp90 α v plazmě



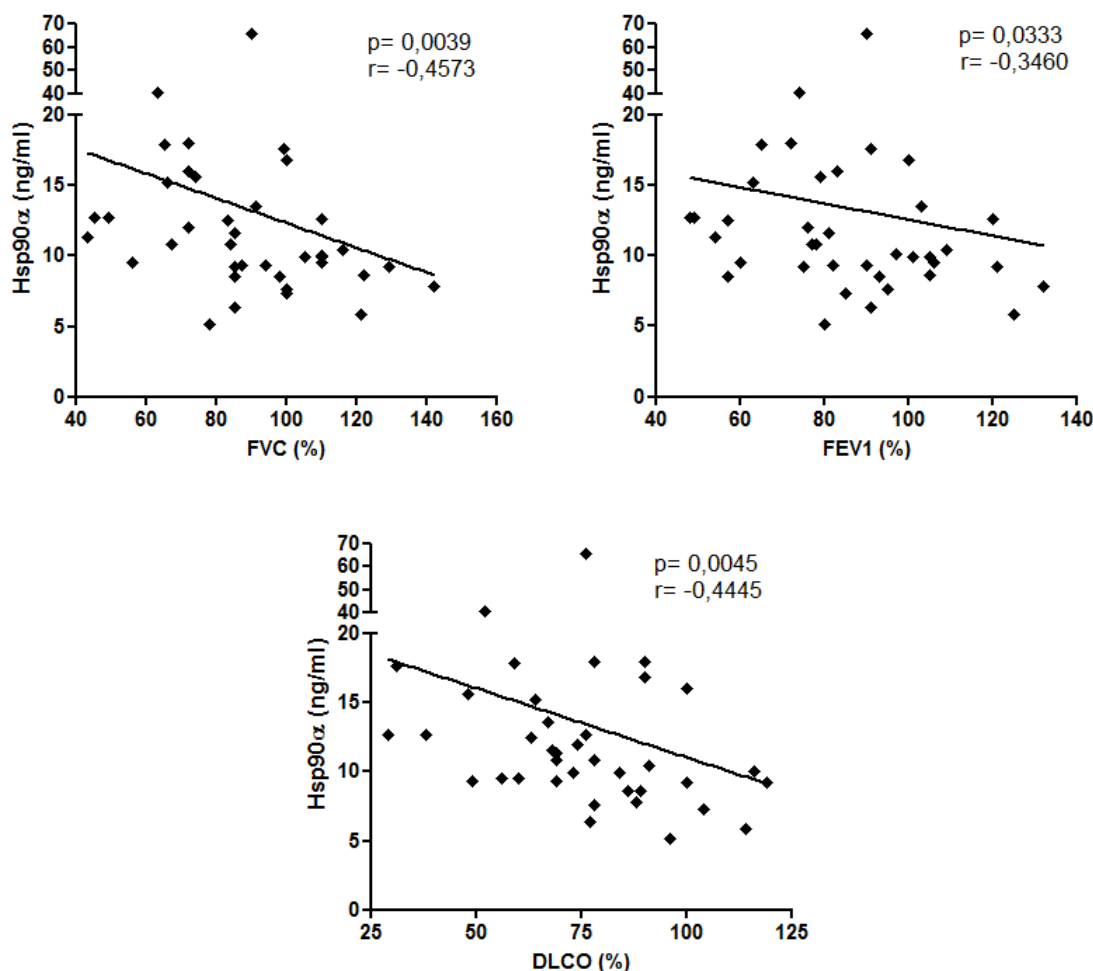
(aktivita onemocnění je určena pomocí hodnot EUSTAR skóre activity SSc uvedeného na obrázku 8A)

Obrázek 22: Hsp90 α v plazmě pozitivně koreluje s rozsahem a intenzitou kožního postižení u dcSSc



(hodnoty jsou stanovené dle mRSS viz obrázek 8B)

Obrázek 23: Hladiny Hsp90 α v plazmě negativně korelují s jednotlivými funkčními parametry plicního postižení



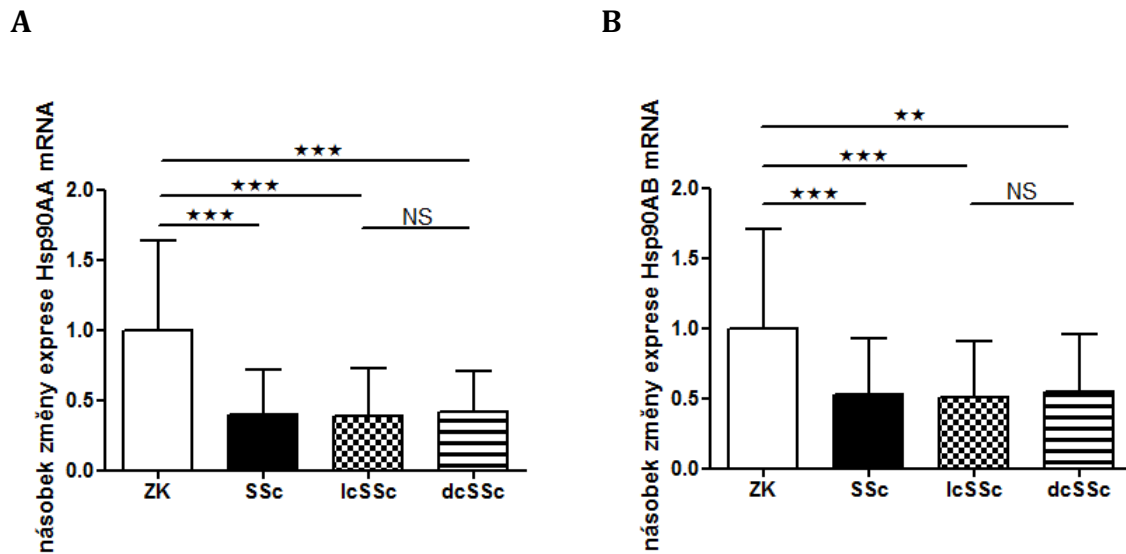
(FVC: usilovná kapacita plic, FEV1: usilovně vydechnutý objem za první sekundu, DLCO: difúzní kapacita plic pro oxid uhelnatý)

5.3.2. Analýza mRNA exprese genů Hsp90AA a Hsp90AB v PBMC

Expresse genu Hsp90AA v PBMC pacientů se SSc a zdravých kontrol, byla signifikantně vyšší u zdravých kontrol oproti SSc pacientům [median 0,9107 (IQR 0,6304 – 1,329) vs 0,3629 (IQR 0,00845 – 0,5557), $p < 0,0001$]. Významný rozdíl byl také u ZK oproti jednotlivým podskupinám lcSSc/dcSSc [lcSSc: 0,2859 (IQR 0,2053 – 0,4872), $p < 0,0001$ / dcSSc: 0,4163 (IQR 0,1679 – 0,5937), $p < 0,0001$] (obr. 24A). Podobně jako exprese genu Hsp90AA, byla exprese Hsp90AB signifikantně vyšší u zdravých kontrol oproti pacientům se SSc [ZK: 0,7729 (IQR 0,6343 – 1,225) vs SSc: 0,4645 (IQR 0,1855 –

0,8172), $p < 0,0001$]. Signifikantně významný rozdíl byl také u jednotlivých podtypů SSc oproti zdravým kontrolám [lcSSc: 0,4465 (IQR 0,2920 – 0,5585), $p < 0,0001$ / dcSSc: 0,5190 (IQR 0,1672 – 0,8802), $p = 0,0064$](obr. 24B). Expres obou genů nebyly u pacientů se SSc nijak ovlivněny jednotlivými sledovanými klinickými parametry.

Obrázek 24: Genová exprese Hsp90AA a Hsp90AB



(A, B: Expres genů Hsp90AA a Hsp90AB u pacientů se SSc a jednotlivých podskupin lcSSc / dcSSc byla signifikantně nižší v porovnání se zdravými kontrolami, znázorněn je průměr a směrodatná odchylka (SD), **, $p \leq 0,01$; ***, $p < 0,001$; NS, nesignifikantní)

6. Diskuze

V současné době je studován význam biologických markerů v řadě onemocnění, které by dopomohly k objasnění patogeneze či se staly spolehlivými ukazateli celkové aktivity nemoci, orgánového poškození, prediktorem prognózy či odpovědi na léčbu. Cílem této práce bylo zanalyzovat vybrané nové molekuly S100A4, IL-35 a Hsp90 s již prokázanou nebo ještě neznámou rolí u SSc a zdravých kontrol a zhodnotit jejich možné asociace s aktivitou nemoci a orgánovým postižením.

V naší práci, která plynule navazuje na předchozí výzkum naší laboratoře, jsme se zaměřili na hodnocení systémových hladin S100A4 u pacientů se SSc a zdravých kontrol. Doposud byl zkoumán S100A4 u SSc pouze lokálně v postižené kůži pacientů a kultivovaných SSc fibroblastech, kde byla detekována jeho zvýšená exprese, zejména na vrub aktivace signální dráhy TGF- β a ve dvou různých myších modelech SSc s experimentálně navozenou kožní fibrózou, pomocí kterých byla prokázána jeho profibrotická role (Tomcik et al., 2015). Zaznamenali jsme signifikantně vyšší sérové hladiny S100A4 u pacientů se SSc oproti zdravým jedincům, především u pacientů s difúzní formou SSc, kteří mají kvantitativně i kvalitativně výraznější kožní a orgánové postižení. Oba zmíněná pozorování jsou v souladu s detekovanou zvýšenou lokální expresí v SSc kůži, fibroblastech a experimentálních modelech kožní fibrózy. Dále jsme odhalili významnou asociaci s aktivitou SSc, podobně jako ve studii zabývající se S100A4 u revmatoidní artritidy (RA), ve které také prokázali významnou asociaci s aktivitou nemoci u pacientů před léčbou a detekovali významně vyšší sérové hladiny S100A4 oproti zdravým kontrolám (Šenolt et al., 2015b). Aktivita SSc hodnocena podle kompozitního EUSTAR skóre komplexně odráží klinické manifestace orgánového postižení na vrub tří základních procesů patogeneze SSc: zánětu, vaskulopatie a fibrózy. U pacientů se SSc jsme zaznamenali pozitivní korelaci sérových hladin S100A4 s rozsahem a intenzitou kožního postižení, což podporuje výsledky naší nedávné studie popisující zvýšenou lokální expresi tohoto proteinu v SSc kožních lézích a v kůži myších experimentálních modelů kožní fibrózy (Tomcik et al., 2015). Nadměrná produkce složek ECM aktivovanými fibroblasty vedoucí k rozvoji fibrózy je především podmíněna signální kaskádou TGF- β a dalšími cytokiny. Kooperace TGF- β s S100A4 proteinem byla demonstrována na několika úrovních *in vitro* a *in vivo* experimentů, které prokazují zvýšené exprese S100A4 v závislosti na aktivované signální dráze TGF- β (Tomcik et al., 2015). V porovnání s kůží zdravých jedinců byla exprese S100A4 signifikantně zvýšená

v postižené kůži pacientů se SSc, zejména ve fibroblastech a aktivovaných fibroblastech a perivaskulárních zánětlivých infiltrátech (Tomcik et al., 2015). Zvýšení lokální či systémové exprese S100A4 se nezdá být specifické jen pro SSc, ale lze jej nalézt také v dalších studiích S100A4 proteinu u jiných autoimunitních onemocnění jako je revmatoidní artritida (Klingelhöfer et al., 2007), psoriáza (Zibert et al., 2010) nebo zánětlivá myopatie (Cerezo et al., 2011), kde byla lokálně zvýšená exprese S100A4 detekována u makrofágů, granulocytů, fibroblastů, endoteliálních a dendritických buněk a T-lymfocytů v místě postižení. U pacientů se SSc byly dále zvýšené hladiny sérového S100A4 naměřeny u rozsáhlejšího plicního postižení se ztrátou funkční kapacity plic jako následkem fibrotizace plicní tkáně. Patomechanizmy plicní fibrózy jsou obdobné těm v průběhu fibrózy kůže či jiných orgánů a spojuje je aktivace signální dráhy TGF- β (Geyer and Müller-Ladner, 2011).

Vzhledem k výraznému podílu zánětu v časně fázi SSc (klinicky se projevujícím jako např. difúzní otok kůže, artritida, pleuritida, zvýšená produkce autoprotilátů, či histologicky detekovatelné zánětlivé perivaskulární infiltráty v kůži v časně fázi SSc) nás následně zajímala přítomnost S100A4 v mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC) pacientů se SSc a zdravých kontrol. Hladiny exprese S100A4 na úrovni mRNA byly vyšší u pacientů se SSc oproti zdravým kontrolám, avšak rozdíl nebyl statisticky významný a detekované exprese nebyly statisticky významně ovlivněné sledovanými parametry. V řadě onemocnění jsou prozatím popsány pouze lokální exprese S100A4, z toho důvodu je zapotřebí dalších experimentů (Šenolt Cerezo, Tomcik, Cerezo, Zibert,), které by identifikovaly subpopulace buněk PBMC exprimující daný protein a stanovily kvantitativní rozdíly v expresi jednotlivých subpopulací a zhodnotili potenciální klinické asociace.

V další studii naše laboratoř poprvé prokázala zvýšenou expresi obou podjednotek Ebi-3 i p35 v dermis SSc kožních lézí – zejména ve fibroblastech, myofibroblastech a perivaskulárních zánětlivých infiltrátech. Zatímco v jiné studii prokázali konstitutivní nízkou expresi p35 v širokém spektru buněk (Trinchieri et al., 2003), Ebi-3 podjednotka je selektivně produkována i vysoce inducibilní a její exprese byla nalezena v trofoblastu, DC, plazmatických buňkách, makrofágích, endoteliálních buňkách, v buňkách Hodgkinova a Reed-Sternbergova lymfomu a B-buněčném lymfomu (Larousserie et al., 2004, 2006; Niedobitek et al., 2002; Pflanz et al., 2002). Nedávná studie naší laboratoře týkající se role IL-35 u pacientů s RA prokázala zvýšenou expresi

Ebi-3 a p35 řetězců u makrofágů, DC, B-lymfocytů, T-lymfocytů a synoviálních fibroblastů v RA synoviální tkáni (Filková et al., 2015). Dále jsme prokázali, že zvýšené exprese IL-35 přetrvávají v kulturách fibroblastů izolovaných z biopované SSc kůže a že jeho exprese narůstá po stimulaci profibrotickým mediátorem TGF- β . Je známo, že dermální fibroblasty izolované z kožních SSc lézí si po několik (standardně až 8 pasáží) udržují aktivovaný fenotyp s typickou aktivací signální kaskády TGF- β , s indukcí exprese genů pro kolagen a se zvýšenou sekrecí složek ECM do supernatantu (Varga and Abraham, 2007). Stimulace dermálních fibroblastů rekombinantním IL-35 vedla k aktivaci fibroblastů a zvýšené sekreci kolagenu v závislosti na dávce IL-35. Vzhledem k tomu, že perivaskulární zánětlivé infiltráty obsahující T a B-lymfocyty, mononukleární buňky a makrofágy jsou charakteristické pro časně zánětlivé kožní postižení u SSc a kolagen typu I je výrazně exprimován fibroblasty přítomnými v kožních lézích infiltrovaných zánětlivými infiltráty, jsme usoudili, že perivaskulární zánětlivé buňky v časně fázi SSc mohou být zdrojem zvýšené exprese IL-35. Jeho parakrinní efekt na fibroblasty vede k aktivaci signální dráhy TGF- β , k aktivaci fibroblastů, jejich transdiferenciaci v myofibroblasty, ke zvýšené produkci kolagenu a zároveň k dalšímu zvýšení exprese a sekrece IL-35, což utváří jakousi autokrinní smyčku a přispívá k nadměrné chronické aktivaci signální kaskády TGF- β u SSc (Gabrielli et al., 2009; Scharffetter et al., 1988; Varga and Abraham, 2007). Avšak pro další studie je zapotřebí objasnit mechanismy, zdroje a cíle IL-35, které mohou hrát určitou roli v patogenezi SSc. Je známo, že receptor IL-35 aktivuje signální dráhu STAT1 a STAT4 (Collison and Vignali, 2008). Různé varianty STAT4 byly zařazeny mezi geneticky rizikové faktory u SSc (Dieudé et al., 2009; Radstake et al., 2010). Mimoto Avouac et al. (Avouac et al., 2011) nedávno prokázali, že transkripční faktor STAT4 projevuje silné profibrotické účinky, kontrolou aktivace T-lymfocytů, proliferace a uvolňování cytokinů. Role dalších členů rodiny IL-12 byla také nedávno prokázána v patogenezi SSc. Zatímco nedávna studie odhalila asociace genu IL12RB2 (kódující IL-12R β 2 řetězec receptoru pro cytokiny IL-12 a IL-35) se SSc, gen pro IL-23 receptor nebyl prozatím prokázán jako rizikový faktor SSc a ani jeho asociace se SSc fenotypem (Bossini-Castillo et al., 2012; Rueda et al., 2009). Navíc stimulací IL-27 došlo k zvýšení IgG produkce B-lymfocytů, IL-17 produkci CD4 T-lymfocytů a proliferaci a k syntéze kolagenu fibroblasty u pacientů se SSc oproti zdravým kontrolám (Yoshizaki et al., 2011). V neposlední řadě jsme detekovali zvýšené hladiny sérového IL-35 u SSc pacientů i u jednotlivých podtypů lcSSc

/ dcSSc v porovnání se sérovými hladinami zdravých kontrol. Zvýšené hodnoty IL-35 v séru korelovaly s časným stádiem onemocnění, s krátkým obdobím trvání nemoci a časnými kapilaroskopickými nálezy. Avšak zvýšené koncentrace u pacientů s časnou SSc bychom měli ještě potvrdit na větším souboru pacientů. Další členové rodiny IL-12 byli také zkoumány u SSc. Vyšší hladiny IL-12 byly naměřeny u v séru pacientů se SSc a mohou mít určitou roli při aktivaci Th1 lymfocytů u SSc a jsou asociovány s vaskulárním poškozením ledvin (Sato et al., 2000). Sérové hladiny IL-23 byly signifikantně zvýšené u pacientů se SSc oproti SLE a zdravým kontrolám a byly asociovány s délkou trvání nemoci a prevalencí plicní fibrózy (Komura et al., 2008). Hladiny IL-27 v séru také vzrůstaly u pacientů se SSc oproti zdravým jedincům a korelovaly s kožním poškozením a plicní fibrózou (Yoshizaki et al., 2011). V neposlední řadě nás zajímala exprese podjednotek IL-35, Ebi-3 a p35, v PBMC u pacientů se SSc v porovnání se zdravými kontrolami. Neprokázali jsme však žádné významné rozdíly v expresi podjednotky p35 mezi skupinami ani žádné asociace s jednotlivými klinickými parametry. Expresi podjednotky Ebi-3 byla významně vyšší u pacientů se SSc i u podskupin lcSSc / dcSSc oproti kontrolní skupině, ale též nebyla ovlivněna klinickými parametry. Tedy významnou přítomnost intracelulárního IL-35 u SSc jsme nepotvrdili, neboť nebyly zvýšené exprese obou podjednotek současně. Zvýšená mRNA exprese Ebi-3 v PBMC může mít také podíl na zvýšené sérové koncentraci IL-27, která byla již u SSc popsána (Yoshizaki et al., 2011), avšak je zapotřebí dalších experimentů pro další objasnění tohoto nálezu. Prozatím není dostatek studií, které by se věnovaly expresi IL-35 v PBMC.

Další molekulou, která nás zajímala a mohla by mít významnou roli v patogenezi SSc, je molekulární chaperon Hsp90. Jeho významem u SSc se nedávno zabývala naše laboratoř ve studii, ve které byla detekována zvýšená exprese Hsp90 v závislosti na hlavním profibrotickém mediátoru TGF- β v kůži a kultivovaných fibroblastech pacientů se SSc a v myších modelech s experimentálně navozenou kožní fibrózou (Tomcik et al., 2014). Hsp90 hraje významnou roli v účinnosti signální dráhy TGF- β prostřednictvím indukce konstitutivně aktivního receptoru TGF- β prvního typu (T β RI). Hsp90 podporuje správné konformační uspořádání a stabilitu klientských proteinů, včetně T β RI a Src kináz, které mají zásadní roli v profibrotické signální dráze (Wrighton et al., 2008). Dále Tomcik et al. (Tomcik et al., 2014) prokázal, že inhibicí Hsp90 dojde ke snížení stimulačních efektů TGF- β na produkci kolagenu a k zabránění rozvoje kožní fibrózy u tří preklinických myších modelů představujících různá stadia SSc.

Plynulým pokračováním této studie byla naše analýza systémové exprese Hsp90 v plazmě pacientů se SSc a zdravých jedinců. Na rozdíl od výše zmíněné zvýšené lokální exprese v SSc kůži jsme systémově nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly plazmatických hladin Hsp90 α mezi pacienty se SSc a zdravými kontrolami, ani mezi jednotlivými podtypy lcSSc / dcSSc. Hsp90 patří mezi běžně se vyskytující molekulární chaperony u eukaryotických organismů a jsou vyžadovány pro správné složení a aktivaci širokého spektra buněčných proteinů, které jsou důležitou součástí mnoha biologických procesů. Z tohoto důvodu je za určitých okolností důležité, jaký protein je Hsp90 aktivován a tedy i chráněn před nežádoucí degradací v proteozomu (Jackson, 2013). V našem případě je důležitým proteinem a zároveň klientem Hsp90 receptor T β RI pro profibrotický cytokin TGF- β , který je hlavním mediátorem vzniku a rozvoje fibrózy u SSc pacientů (Tomcik et al., 2014). Lokálně zvýšená exprese Hsp90 v SSc kůži může být vázána na zvýšenou expresi klientských proteinů, jako např. T β RI a Src, které jsou aktivovány v profibrotické signální dráze TGF- β a které tento chaperon stabilizuje. Lokální zvýšení v kůži se nemusí projevit do zvýšených koncentrací této molekuly detekované systémově v plazmě pacientů se SSc ve srovnání se zdravými kontrolami, jako jsme popsali v naší současné studii. Na rozdíl od SSc je situace u dalšího autoimunitního systémového onemocnění pojiva – idiopatických zánětlivých myopatií (IZM) - odlišná. Zvýšená exprese Hsp90 v (zánětem a degenerací) postižené svalové tkáni pacientů s IZM je provázána až průměrně čtyřnásobně vyšší systémovou koncentrací v plazmě pacientů s IZM oproti zdravým kontrolám (dosud nepublikovaná data naší laboratoře). Tento nálezný může být podmíněn nesrovnatelně větším objemem svalové tkáně u IZM než je tomu u postižených okrsků kůže u SSc a dále i větším masou zánětlivých infiltrátů v postižené svalové tkáni (endomyziálně nebo perivaskulárně) u IZM. U pacientů se SSc s vyšší aktivitou nemoci jsme však detekovali vyšší hladiny Hsp90 α v plazmě. Také u pacientů s výraznějším plicním postižením, které byly prokázány pomocí zhoršených funkčních plicních testů (FVC, FEV1 a DLCO), jsme detekovali vyšší hladiny Hsp90 α v plazmě. Zvýšené hladiny Hsp90 α byly dále asociovány s rozsahem a intenzitou postižení kůže hodnocenou dle mRSS, ale pouze u pacientů se dcSSc, pro které je typický větší rozptyl hodnot mRSS vzhledem k výraznějšímu kožnímu postižení, než je tomu u limitované formy SSc.

Nálezy vyšších systémových koncentrací Hsp90 u pacientů se SSc s výraznějším kožní a plicní fibrózou potvrzují námi předpokládanou a v nedávné studii popsanou roli

Hsp90 při aktivaci signální dráhy TGF- β a vzniku tkáňové fibrózy (Tomcik et al., 2014). EUSTAR skóre aktivity SSc zohledňuje několik zásadních klinických parametrů charakteristických pro toto onemocnění, mezi jinými závažnost a zejména zhoršení kožního a plicního onemocnění, kterým přiděluje poměrně výraznou váhu, což by mohlo vysvětlit nález vyšších plazmatických hladin Hsp90 u pacientů s vyšší aktivitou nemoci. Navíc jsme paradoxně detekovali sníženou expresi mRNA genů HSP90AA a HSP90AB v PBMC pacientů se SSc oproti zdravým PBMC, které však nekorelovaly s parametry klinického postižení. Exprese Hsp90 v PBMC u jiných autoimunitních revmatických onemocnění zatím byla zkoumána pouze u systémového lupus erythematoses (SLE), u něho byla detekována zvýšená exprese Hsp90, která korelovala se zvýšenými hladinami IL-6 a přítomností anti-Hsp90 protilátek (Ripley et al., 2001). K objasnění role PBMC v expresi tohoto chaperonu u SSc bude za potřebí dalších studií.

7. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se věnovala stanovení nových potenciálních biologických markerů SSc, které by se dle již prokázané významné role v patogenezi tohoto onemocnění (S100A4, Hsp90) mohly stát kandidátními molekulami antifibrotické terapie nejen u SSc, ale i jiných fibrotických onemocnění. Dále jsem se zaměřila na zhodnocení role nového cytokinu IL-35 v patogenezi SSc, u které dosud nebyl zkoumán.

Na základě dosavadních výsledků naší laboratoře jsme stanovovali systémové koncentrace S100A4, IL-35 a Hsp90 u pacientů se SSc a porovnali s naměřenými hodnotami u zdravých jedinců. Následně jsme zhodnotili možné asociace jednotlivých molekul s klinickými parametry a zjistili jsme, že koncentrace daných molekul jsou asociovány s mírou orgánového postižení a aktivitou SSc.

U IL-35 jsme dále demonstrovali zvýšenou expresi v kožních lézích a dermálních fibroblastech pacientů se SSc. Zjistili jsme, že hlavní profibrotický cytokin TGF- β indukuje sekreci IL-35, který zpětně amplifikuje signální kaskádu TGF- β , což vede k aktivaci fibroblastů a zvýšené produkci kolagenu.

Tato data podporují potenciální významnou roli IL-35 v patogenezi SSc, zejména v časně (zánětlivé) fázi SSc. Plazmatický Hsp90 i sérový S100A4 by se mohly stát vhodnými biomarkery aktivity SSc, kožního a plicního postižení. Je však zapotřebí dalších experimentů, zejména molekulárních mechanismů, kterými tyto molekuly působí na své okolní prostředí v případě SSc. Dosavadní data je dále nutno potvrdit na větším souboru pacientů se SSc a zdravých jedinců a ideálně pak validizovat na nezávislé kohortě z dalšího centra specializujícího se na vzácná systémová revmatická onemocnění. Cílem našeho dalšího zkoumání bude taktéž zhodnocení potenciálu těchto biomarkerů jako možného nového markeru prognózy a odpovědi na léčbu prostřednictvím analýzy longitudinálně sbíraného biomateriálu od pacientů s takzvanou časnou SSc nebo pre-SSc a zejména pacientů s již etablovanou SSc na léčbě (většinou po měsíci opakovanými intravenózními pulzy cyklofosfamidů). K potvrzení terapeutického potenciálu inhibice S100A4 a Hsp90 bude vhodné potvrdit slibná dosavadní data z preventivních modelů experimentální kožní fibrózy u léčebných modelů již etablované kožní fibrózy, které lépe reflektují reálnou situaci s pacienty v praxi.

8. Reference

- Abraham, D. (2008). Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? *Rheumatology (Oxford)*. *47 Suppl 5*, v8–v9.
- Abraham, D.J., and Varga, J. (2005). Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol.* *26*, 587–595.
- Agarwal, S.K., Tan, F.K., and Arnett, F.C. (2008). Genetics and Genomic Studies in Scleroderma (Systemic Sclerosis). *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *34*, 17–40.
- Allanore, Y., Dieude, P., and Boileau, C. (2010). Updating the genetics of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *22*, 665–670.
- Ambartsumian, N., Klingelhöfer, J., Grigorian, M., Christensen, C., Kriajevska, M., Tulchinsky, E., Georgiev, G., Berezin, V., Bock, E., Rygaard, J., et al. (2001). The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* *20*, 4685–4695.
- Ambartsumian, N.S., Grigorian, M.S., Larsen, I.F., Karlstrøm, O., Sidenius, N., Rygaard, J., Georgiev, G., and Lukanidin, E. (1996). Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene* *13*, 1621–1630.
- Assassi, S., Radstake, T.R.D.J., Mayes, M.D., and Martin, J. (2013). Genetics of scleroderma: implications for personalized medicine? *BMC Med.* *11*, 9.
- Avouac, J., FÜRnrohr, B.G., Tomcik, M., Palumbo, K., Zerr, P., Horn, A., Dees, C., Akhmetshina, A., Beyer, C., Distler, O., et al. (2011). Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *63*, 800–809.
- Bassel, M., Hudson, M., Taillefer, S.S., Schieir, O., Baron, M., and Thombs, B.D. (2011). Frequency and impact of symptoms experienced by patients with systemic sclerosis: Results from a Canadian National Survey. *Rheumatology* *50*, 762–767.
- Belot, N., Pochet, R., Heizmann, C.W., Kiss, R., and Decaestecker, C. (2002). Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1600*, 74–83.
- Betts, G.J., Clarke, S.L., Richards, H.E., Godkin, A.J., and Gallimore, A.M. (2006). Regulating the immune response to tumours. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *58*, 948–961.
- Beyer, C., and Distler, J.H.W. (2013). Tyrosine kinase signaling in fibrotic disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1832*, 897–904.
- Bjørnland, K., Winberg, J.O., Odegaard, O.T., Hovig, E., Loennechen, T., Aasen, A.O., Fodstad, O., and Maelandsmo, G.M. (1999). S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res.* *59*, 4702–4708.
- Blagosklonny, M. V (2001). Re: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 239–240.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1350–1358.
- Boin, F., and Rosen, A. (2007). Autoimmunity in systemic sclerosis: Current concepts. *Curr. Rheumatol. Rep.* *9*, 165–172.

- Bornman, L., Polla, B.S., and Gericke, G.S. (1996). Heat-shock protein 90 and ubiquitin: developmental regulation during myogenesis. *Muscle Nerve* 19, 574–580.
- Bossini-Castillo, L., Martin, J.-E., Broen, J., Gorlova, O., Simeón, C.P., Beretta, L., Vonk, M.C., Callejas, J.L., Castellví, I., Carreira, P., et al. (2012). A GWAS follow-up study reveals the association of the IL12RB2 gene with systemic sclerosis in Caucasian populations. *Hum. Mol. Genet.* 21, 926–933.
- Boudeau, J., Deak, M., Lawlor, M.A., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2003). Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem. J.* 370, 849–857.
- Burrows, F., Zhang, H., and Kamal, A. (2004). Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 3, 1530–1536.
- Butler, L.M., Ferraldeschi, R., Armstrong, H.K., Centenera, M.M., and Workman, P. (2015). Maximizing the Therapeutic Potential of HSP90 Inhibitors. *Mol. Cancer Res.* 13, 1445–1451.
- Cao, X. (2010). Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunol. Res.* 46, 79–93.
- Cao, Y., Ohwatari, N., Matsumoto, T., Kosaka, M., Ohtsuru, A., and Yamashita, S. (1999). TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 438, 239–244.
- Carvalho, D., Savage, C.O., Black, C.M., and Pearson, J.D. (1996). IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97, 111–119.
- Cerezo, L.A., Kuncová, K., Mann, H., Tomčík, M., Zámecník, J., Lukanidin, E., Neidhart, M., Gay, S., Grigorian, M., Vencovsky, J., et al. (2011). The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. 50, 1766–1772.
- Ciocca, D.R., and Calderwood, S.K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86–103.
- Clements, P.J., Lachenbruch, P.A., Seibold, J.R., Zee, B., Steen, V.D., Brennan, P., Silman, A.J., Allegar, N., Varga, J., and Massa, M. (1993). Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J. Rheumatol.* 20, 1892–1896.
- Cockrill, T., Del Junco, D.J., Arnett, F.C., Assassi, S., Tan, F.K., McNearney, T., Fischbach, M., Perry, M., and Mayes, M.D. (2010). Separate influences of birth order and gravidity/parity on the development of systemic sclerosis. *Arthritis Care Res.* 62, 418–424.
- Collison, L.W., and Vignali, D.A.A. (2008). Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.* 226, 248–262.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 11, 1093–1101.
- Collison, L.W., Delgoffe, G.M., Guy, C.S., Vignali, K.M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A.R., Garcia, K.C., Hunter, C.A., Drake, C.G., et al. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat. Immunol.* 13, 290–299.
- Croxford, A.L., Mair, F., and Becher, B. (2012). IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 42, 2263–2273.

- Csermely, P., Kajtár, J., Hollósi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C.R., Gergely, P., Söti, C., Mihály, K., and Somogyi, J. (1993). ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J. Biol. Chem.* *268*, 1901–1907.
- Dantas, A.T., Gonçalves, S.M.C., Pereira, M.C., Gonçalves, R.S.G., Marques, C.D.L., Rego, M.J.B. de M., Pitta, I. da R., Duarte, A.L.B.P., and Pitta, M.G. da R. (2015). Increased IL-35 serum levels in systemic sclerosis and association with pulmonary interstitial involvement. *Clin. Rheumatol.* *34*, 1621–1625.
- Davies, B.R., Davies, M.P., Gibbs, F.E., Barraclough, R., and Rudland, P.S. (1993). Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene* *8*, 999–1008.
- Deane, K.D., and Nicolls, M.R. (2013). Developing better biomarkers for connective tissue disease-associated interstitial lung disease: citrullinated hsp90 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *65*, 864–868.
- Deguchi, Y., Negoro, S., and Kishimoto, S. (1987). Heat-shock protein synthesis by human peripheral mononuclear cells from sle patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *148*, 1063–1068.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* *13*, 7–12.
- Dieppe, P. (2002). *Epidemiology of the Rheumatic Diseases Second Edition*. AJ Silman, MC Hochberg (eds). Oxford: Oxford University Press, 2001, pp. 377, pound95.00. ISBN: 0192631497. *Int. J. Epidemiol.* *31*, 1079 – a – 1080.
- Dieudé, P., Guedj, M., Wipff, J., Ruiz, B., Hachulla, E., Diot, E., Granel, B., Sibilia, J., Tiev, K., Mouthon, L., et al. (2009). STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* *60*, 2472–2479.
- Distler, J.H.W., and Distler, O. (2008). Criteria to select molecular targets for anti-fibrotic therapy. *Rheumatology* *47*, v12–v13.
- Distler, J.H.W., Beyer, C., Schett, G., Lüscher, T.F., Gay, S., and Distler, O. (2009). Endothelial progenitor cells: novel players in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* *60*, 3168–3179.
- Distler, O., Distler, J.H.W., Scheid, A., Acker, T., Hirth, A., Rethage, J., Michel, B.A., Gay, R.E., Müller-Ladner, U., Matucci-Cerinic, M., et al. (2004). Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* *95*, 109–116.
- Donato, R. (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* *60*, 540–551.
- Ebralidze, A., Tulchinsky, E., Grigorian, M., Afanasyeva, A., Senin, V., Revazova, E., and Lukanidin, E. (1989). Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev.* *3*, 1086–1093.
- Echeverria, P.C., and Picard, D. (2010). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1803*, 641–649.
- Erkeller-Yüksel, F.M., Isenberg, D.A., Dhillon, V.B., Latchman, D.S., and Lydyard, P.M. (1992). Surface expression of heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* *5*, 803–814.
- Feghali-Bostwick, C., Medsger, T.A., and Wright, T.M. (2003). Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* *48*, 1956–1963.

- Filková, M., Vernerová, Z., Hulejová, H., Prajzlerová, K., Veigl, D., Pavelka, K., Vencovský, J., and Šenolt, L. (2015). Pro-inflammatory effects of interleukin-35 in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 73, 36–43.
- Gabrielli, A., Avvedimento, E. V, and Krieg, T. (2009). Mechanisms of disease. *SCLERODERMA*. *N. Engl. J. Med.* 19, 1989–2003.
- Geller, R., Taguwa, S., and Frydman, J. (2012). Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 698–706.
- Georgopoulos, C., and McFarland, H. (1993). Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Immunol. Today* 14, 373–375.
- Geyer, M., and Müller-Ladner, U. (2011). The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 40, 92–103.
- Gibbs, F.E., Barraclough, R., Platt-Higgins, A., Rudland, P.S., Wilkinson, M.C., and Parry, E.W. (1995). Immunocytochemical distribution of the calcium-binding protein p9Ka in normal rat tissues: variation in the cellular location in different tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 169–180.
- Grigorian, M., Tulchinsky, E., Burrone, O., Tarabykina, S., Georgiev, G., and Lukanidin, E. Modulation of mts1 expression in mouse and human normal and tumor cells. *Electrophoresis* 15, 463–468.
- Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriaievska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G., et al. (2001). Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J. Biol. Chem.* 276, 22699–22708.
- Gupta, S., Hussain, T., MacLennan, G.T., Fu, P., Patel, J., and Mukhtar, H. (2003). Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 21, 106–112.
- Gyger, G., and Baron, M. (2012). Gastrointestinal manifestations of scleroderma: Recent progress in evaluation, pathogenesis, and management. *Curr. Rheumatol. Rep.* 14, 22–29.
- Hayem, G., De Bandt, M., Palazzo, E., Roux, S., Combe, B., Eliaou, J.F., Sany, J., Kahn, M.F., and Meyer, O. (1999). Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58, 291–296.
- He, W., Wu, L., Gao, Q., Du, Y., and Wang, Y. (2006). Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Curr. Microbiol.* 52, 197–203.
- Heizmann, C.W., and Cox, J.A. (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals* 11, 383–397.
- Heldin, C.H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 79, 1283–1316.
- Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E., and Grigorian, M. (2005). The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br. J. Cancer* 92, 1955–1958.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., et al. (1999). RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell* 97, 889–901.
- van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Carreira, P.E., et al. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 65, 2737–2747.

- Hunter, C.A., and Kastelein, R. (2012). Interleukin-27: Balancing Protective and Pathological Immunity. *Immunity* 37, 960–969.
- Hunzelmann, N., and Brinckmann, J. (2010). What are the new milestones in the pathogenesis of systemic sclerosis? *Ann. Rheum. Dis.* 69 *Suppl 1*, i52–i56.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 275, 40096–40105.
- Chang, H.Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P.O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12877–12882.
- Chen, B., Zhong, D., and Monteiro, A. (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7, 156.
- Chiffot, H., Fautrel, B., Sordet, C., Chatelus, E., Sibilia, J., Herrick, A.L., Worthington, A., Johnson, R.W., Tew, M.B., Arnet, F.C., et al. (2008). Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin. Arthritis Rheum.* 37, 223–235.
- Chizzolini, C., Brembilla, N.C., Montanari, E., and Truchetet, M.-E. (2011). Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 10, 276–281.
- Christopher P Denton, M. (2001). Updating the American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum.* 44, 735–738.
- Isobe, T., and Okuyama, T. (1978). The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 89, 379–388.
- Jackson, S.E. (2013). Hsp90: structure and function. *Top. Curr. Chem.* 328, 155–240.
- Kahaleh, B. (2008). Vascular Disease in Scleroderma: Mechanisms of Vascular Injury. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 34, 57–71.
- Kahaleh, M.B., Sherer, G.K., and LeRoy, E.C. (1979). Endothelial injury in scleroderma. *J. Exp. Med.* 149, 1326–1335.
- Kalia, S.K., Kalia, L. V, and McLean, P.J. (2010). Molecular chaperones as rational drug targets for Parkinson's disease therapeutics. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 741–753.
- Keirsebilck, A., Bonn e, S., Bruyneel, E., Vermassen, P., Lukanidin, E., Mareel, M., and van Roy, F. (1998). E-cadherin and metastasin (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families. *Cancer Res.* 58, 4587–4591.
- Kim, Y.S., Alarcon, S. V, Lee, S., Lee, M.-J., Giaccone, G., Neckers, L., and Trepel, J.B. (2009). Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 1479–1492.
- Kimmins, S., and MacRae, T.H. (2000). Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress Chaperones* 5, 76–86.
- Kimura, K., Endo, Y., Yonemura, Y., Heizmann, C.W., Schafer, B.W., Watanabe, Y., and Sasaki, T. (2000). Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 16, 1125–1131.
- Klingelh ofer, J., Senolt, L., Baslund, B., Nielsen, G.H., Skibsh oj, I., Pavelka, K., Neidhart, M., Gay, S., Ambartsumian, N., Hansen, B.S., et al. (2007). Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 779–789.

- Knudsen, G.P., Gleicher, N., Barad, D.H., Lleo, A., Battezzati, P.M., Selmi, C., Gershwin, M.E., Podda, M., Whitacre, C.C., Bouman, A., et al. (2009). Gender bias in autoimmune diseases: X chromosome inactivation in women with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *286*, 43–46.
- Knutson, K.L., Disis, M.L., and Salazar, L.G. (2007). CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol. Immunother.* *56*, 271–285.
- Koga, F., Xu, W., Karpova, T.S., McNally, J.G., Baron, R., and Neckers, L. (2006). Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 11318–11322.
- Kochetkova, I., Golden, S., Holderness, K., Callis, G., and Pascual, D.W. (2010). IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J. Immunol.* *184*, 7144–7153.
- Komura, K., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Ogawa, F., Hara, T., Muroi, E., Takehara, K., and Sato, S. (2008). Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *35*, 120–125.
- Kriajevska, M., Fischer-Larsen, M., Moertz, E., Vorm, O., Tulchinsky, E., Grigorian, M., Ambartsumian, N., and Lukanidin, E. (2002). Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J. Biol. Chem.* *277*, 5229–5235.
- Kriajevska, M. V., Cardenas, M.N., Grigorian, M.S., Ambartsumian, N.S., Georgiev, G.P., and Lukanidin, E.M. (1994). Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J. Biol. Chem.* *269*, 19679–19682.
- Krieg, T., and Takehara, K. (2009). Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology* *48*, iii48–iii118.
- Kuo, J., Nardelli, D.T., Warner, T.F., Callister, S.M., and Schell, R.F. (2011). Interleukin-35 enhances Lyme arthritis in *Borrelia*-vaccinated and -infected mice. *Clin. Vaccine Immunol.* *18*, 1125–1132.
- Laplante, A.F., Moulin, V., Auger, F.A., Landry, J., Li, H., Morrow, G., Tanguay, R.M., and Germain, L. (1998). Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J. Histochem. Cytochem.* *46*, 1291–1301.
- Larousserie, F., Pflanz, S., Coulomb-L'Herminé, A., Brousse, N., Kastelein, R., and Devergne, O. (2004). Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J. Pathol.* *202*, 164–171.
- Larousserie, F., Bardel, E., Coulomb L'Herminé, A., Canioni, D., Brousse, N., Kastelein, R.A., and Devergne, O. (2006). Variable expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 during normal B-cell differentiation and among B-cell lymphomas. *J. Pathol.* *209*, 360–368.
- Lavictoire, S.J., Parolin, D.A.E., Klimowicz, A.C., Kelly, J.F., and Lorimer, I.A.J. (2003). Interaction of Hsp90 with the nascent form of the mutant epidermal growth factor receptor EGFRvIII. *J. Biol. Chem.* *278*, 5292–5299.
- Leask, A. (2009). Signaling in fibrosis: targeting the TGF beta, endothelin-1 and CCN2 axis in scleroderma. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. *1*, 115–122.
- Lee, W.-Y., Su, W.-C., Lin, P.-W., Guo, H.-R., Chang, T.-W., and Chen, H.H.W. (2004). Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer. *Oncology* *66*, 429–438.
- Li, J., and Buchner, J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed. J.* *36*, 106–117.
- Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* *22*, 631–677.
- Long, J., Zhang, X., Wen, M., Kong, Q., Lv, Z., An, Y., and Wei, X.-Q. (2013). IL-35 over-expression increases apoptosis sensitivity and suppresses cell growth in human cancer cells.

- Long, J., Guo, H., Cui, S., Zhang, H., Liu, X., Li, D., Han, Z., Xi, L., Kou, W., Xu, J., et al. (2016). IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression. *Oncotarget*.
- Lund, P.A. (2001). Microbial molecular chaperones. *Adv. Microb. Physiol.* *44*, 93–140.
- M. Hassoun, P. (2011). Lung involvement in systemic sclerosis. *Presse Med.* *40*, e25–e39.
- Manetti, M., Guiducci, S., Ibba-Manneschi, L., and Matucci-Cerinic, M. (2010). Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: Angiogenesis versus vasculogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1241–1254.
- Marx, J. (2004). Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* *306*, 966–968.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.
- Masuda, K., Masuda, R., Neidhart, M., Simmen, B.R., Michel, B.A., Müller-Ladner, U., Gay, R.E., and Gay, S. (2002). Molecular profile of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis depends on the stage of proliferation. *Arthritis Res.* *4*, R8.
- Matsuura, I., Lai, C.-Y., and Chiang, K.-N. (2010). Functional interaction between Smad3 and S100A4 (metastatin-1) for TGF-beta-mediated cancer cell invasiveness. *Biochem. J.* *426*, 327–335.
- McCartney-Francis, N.L., Frazier-Jessen, M., and Wahl, S.M. (1998). TGF-beta: a balancing act. *Int. Rev. Immunol.* *16*, 553–580.
- McClellan, A.J., Xia, Y., Deutschbauer, A.M., Davis, R.W., Gerstein, M., and Frydman, J. (2007). Diverse Cellular Functions of the Hsp90 Molecular Chaperone Uncovered Using Systems Approaches. *Cell* *131*, 121–135.
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (2003). Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions. *Mol. Cell* *11*, 647–658.
- Millson, S.H., Truman, A.W., Rácz, A., Hu, B., Panaretou, B., Nuttall, J., Mollapour, M., Söti, C., and Piper, P.W. (2007). Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the alpha and beta isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS J.* *274*, 4453–4463.
- Mitri, Z., Constantine, T., and O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* *2012*, 743193.
- Moore, B.W. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *19*, 739–744.
- Mora, G.F. (2009). Systemic sclerosis: environmental factors. *J. Rheumatol.* *36*, 2383–2396.
- EL Naaman, C., Grum-Schwensen, B., Mansouri, A., Grigorian, M., Santoni-Rugiu, E., Hansen, T., Kriajevskaja, M., Schafer, B.W., Heizmann, C.W., Lukanidin, E., et al. (2004). Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene* *23*, 3670–3680.
- Nakano, S., Morimoto, S., Suzuki, S., Tsushima, H., Yamanaka, K., Sekigawa, I., and Takasaki, Y. (2015). Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. *54*, 1498–1506.
- Neckers, L. (2006). Chaperoning oncogenes: Hsp90 as a target of geldanamycin. *Handb. Exp. Pharmacol.* *259–277*.
- Neckers, L., and Ivy, S.P. (2003). Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol.* *15*, 419–424.
- Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* *18*, 64–76.

- Niedbala, W., Wei, X.-Q., Cai, B., Hueber, A.J., Leung, B.P., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 3021–3029.
- Niedobitek, G., Pätzolt, D., Teichmann, M., and Devergne, O. (2002). Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EB13, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J. Pathol.* *198*, 310–316.
- Ning, X., Jian, Z., and Wang, W. (2015). Low Serum Levels of Interleukin 35 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Tohoku J. Exp. Med.* *237*, 77–82.
- Norton, P.M., Isenberg, D.A., and Latchman, D.S. (1989). Elevated levels of the 90 kd heat shock protein in a proportion of SLE patients with active disease. *J. Autoimmun.* *2*, 187–195.
- Novitskaya, V., Grigorian, M., Kriajevska, M., Tarabykina, S., Bronstein, I., Berezin, V., Bock, E., and Lukanidin, E. (2000). Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* *275*, 41278–41286.
- Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P., and Hartl, F.U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* *143*, 901–910.
- Olson, B.M., Jankowska-Gan, E., Becker, J.T., Vignali, D.A.A., Burlingham, W.J., and McNeel, D.G. (2012). Human prostate tumor antigen-specific CD8+ regulatory T cells are inhibited by CTLA-4 or IL-35 blockade. *J. Immunol.* *189*, 5590–5601.
- Ouyang, H., Shi, Y., Wang, Z., Feng, S., Kong, S., Lu, Y., and Liu, Z. (2014). Decreased Interleukin 35 and CD4+EB13+T cells in Patients With Active Systemic Lupus Erythematosus. *Am. J. Med. Sci.* *348*, 156–161.
- De Paepe, B., Creus, K.K., Martin, J.-J., Weis, J., and De Bleecker, J.L. (2009). A dual role for HSP90 and HSP70 in the inflammatory myopathies: from muscle fiber protection to active invasion by macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1173*, 463–469.
- De Paepe, B., Creus, K.K., Weis, J., and De Bleecker, J.L. (2012). Heat shock protein families 70 and 90 in Duchenne muscular dystrophy and inflammatory myopathy: Balancing muscle protection and destruction. *Neuromuscul. Disord.* *22*, 26–33.
- Panchapakesan, J., Daglis, M., and Gatenby, P. (1992). Antibodies to 65 kDa and 70 kDa heat shock proteins in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Immunol. Cell Biol.* *70 (Pt 5)*, 295–300.
- Pannu, J., and Trojanowska, M. (2004). Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* *16*, 739–745.
- Parker, C., Whittaker, P.A., Usmani, B.A., Lakshmi, M.S., and Sherbet, G. V (1994). Induction of 18A2/mts1 gene expression and its effects on metastasis and cell cycle control. *DNA Cell Biol.* *13*, 1021–1028.
- Parks, J.L., Taylor, M.H., Parks, L.P., and Silver, R.M. (2014). Systemic Sclerosis and the Heart. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *40*, 87–102.
- Pearl, L.H. (2005). Hsp90 and Cdc37 – a chaperone cancer conspiracy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 55–61.
- Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 46–51.
- Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., et al. (2002). IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EB13 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity* *16*, 779–790.
- Pinhasi-Kimhi, O., Michalovitz, D., Ben-Zeev, A., and Oren, M. Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature* *320*, 182–184.

- Pope, R.M., and Shahrara, S. (2013). Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *9*, 252–256.
- Porter, J.R., Fritz, C.C., and Depew, K.M. (2010). Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *14*, 412–420.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., and DeFranco, D.B. (2004). Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell. Signal.* *16*, 857–872.
- Radstake, T.R.D.J., Gorlova, O., Rueda, B., Martin, J.-E., Alizadeh, B.Z., Palomino-Morales, R., Coenen, M.J., Vonk, M.C., Voskuyl, A.E., Schuerwegh, A.J., et al. (2010). Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat. Genet.* *42*, 426–429.
- Ranque, B., and Mouthon, L. (2010). Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* *9*.
- Riemekasten, G., Philippe, A., Näther, M., Slowinski, T., Müller, D.N., Heidecke, H., Matucci-Cerinic, M., Czirájk, L., Lukitsch, I., Becker, M., et al. (2011). Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 530–536.
- Ringkowski, S., Thomas, P.S., and Herbert, C. (2014). Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis. *Front. Pharmacol.* *5*.
- Ripley, B.J., Isenberg, D., and Latchman, D. (2001). Elevated Levels of the 90kDa Heat Shock Protein (hsp90) in SLE Correlate with Levels of IL-6 and Autoantibodies to hsp90. *J. Autoimmun.* *17*, 341–346.
- Roberts, D.D. (1996). Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J.* *10*, 1183–1191.
- Rueda, B., Broen, J., Torres, O., Simeon, C., Ortego-Centeno, N., Schrijvenaars, M.M.V.A.P., Vonk, M.C., Fonollosa, V., van den Hoogen, F.H.J., Coenen, M.J.H., et al. (2009). The interleukin 23 receptor gene does not confer risk to systemic sclerosis and is not associated with systemic sclerosis disease phenotype. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 253–256.
- Russo, P.A.J., Lester, S., and Roberts-Thomson, P.J. (2014). Systemic sclerosis, birth order and parity. *Int. J. Rheum. Dis.* *17*, 557–561.
- Sabir, O., Younas, H., Tanvir, I., and Tarif, N. (2013). Scleroderma renal crises: Case report and review of literature. *J. Pak. Med. Assoc.* *63*, 916–918.
- Saleem, M., Kweon, M.-H., Johnson, J.J., Adhami, V.M., Elcheva, I., Khan, N., Bin Hafeez, B., Bhat, K.M.R., Sarfaraz, S., Reagan-Shaw, S., et al. (2006). S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14825–14830.
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A.C., and Shaw, G.S. (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. J.* *396*, 201–214.
- Santoro, M.G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* *59*, 55–63.
- Sato, S., Hanakawa, H., Hasegawa, M., Nagaoka, T., Hamaguchi, Y., Nishijima, C., Komatsu, K., Hirata, A., and Takehara, K. (2000). Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *27*, 2838–2842.
- Senolt, L., Grigorian, M., Lukanidin, E., Simmen, B., Michel, B.A., Pavelka, K., Gay, R.E., Gay, S., and Neidhart, M. (2006). S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 1645–1648.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* *507*, 366–370.

- Scharffetter, K., Lankat-Buttgereit, B., and Krieg, T. (1988). Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *Eur. J. Clin. Invest.* 18, 9–17.
- Schlesinger, M.J. (1990). Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 12111–12114.
- Schmidt-Hansen, B., Ornås, D., Grigorian, M., Klingelhöfer, J., Tulchinsky, E., Lukanidin, E., and Ambartsumian, N. (2004). Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 23, 5487–5495.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Silman, A.J. (1995). Scleroderma. *Baillieres. Clin. Rheumatol.* 9, 471–482.
- Siracusa, L.D., McGrath, R., Ma, Q., Moskow, J.J., Manne, J., Christner, P.J., Buchberg, A.M., and Jimenez, S.A. (1996). A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res.* 6, 300–313.
- Skhirtladze, C., Distler, O., Dees, C., Akhmetshina, A., Busch, N., Venalis, P., Zwerina, J., Spriewald, B., Pileckyte, M., Schett, G., et al. (2008). Src kinases in systemic sclerosis: Central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 58, 1475–1484.
- Stephanou, A., Latchman, D.S., Isenberg, D.A., Yellon, D.M., Latchman, D.S., Ellis, R.J., Schultz, D.R., Arnold, P.I., Hickey, E., Brandon, S.E., et al. (1998). The regulation of heat shock proteins and their role in systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* 28, 155–162.
- Stifano, G., Affandi, A.J., Mathes, A.L., Rice, L.M., Nakerakanti, S., Nazari, B., Lee, J., Christmann, R.B., Lafyatis, R., Matsushita, T., et al. (2011). Induction of interferon-alpha by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: association of higher interferon-alpha activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum* 27, 2455–2463.
- Šenolt, L., Šumová, B., Jandová, R., Hulejová, H., Mann, H., Pavelka, K., Vencovský, J., and Filková, M. (2015a). Interleukin 35 Synovial Fluid Levels Are Associated with Disease Activity of Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 10, e0132674.
- Šenolt, L., Cerezo, L.A., Šumová, B., Pecha, O., Pleštilová, L., Forejtová, Š., Růžičková, O., Hušáková, M., Závada, J., Pavelka, K., et al. (2015b). High levels of metastasis-inducing S100A4 protein and treatment outcome in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort. <http://dx.doi.org.ezproxy.is.cuni.cz/10.3109/1354750X.2014.989544>.
- Taherian, A., Krone, P.H., and Ovsenek, N. (2008). A comparison of Hsp90alpha and Hsp90beta interactions with cochaperones and substrates. *Biochem. Cell Biol.* 86, 37–45.
- Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 515–528.
- Takenaga, K., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Hasegawa, Y., Sato, K., and Endo, H. (1994). Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J. Cell Biol.* 124, 757–768.
- Tarabykina, S., Kriajevska, M., Scott, D.J., Hill, T.J., Lafitte, D., Derrick, P.J., Dodson, G.G., Lukanidin, E., and Bronstein, I. (2000). Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett.* 475, 187–191.
- Thiolat, A., Denys, A., Petit, M., Biton, J., Lemeiter, D., Herve, R., Lutomski, D., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2014). Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice. *Cytokine* 69, 87–93.

- Tomcik, M., Zerr, P., Pitkowski, J., Palumbo-Zerr, K., Avouac, J., Distler, O., Becvar, R., Senolt, L., Schett, G., and Distler, J.H. (2014). Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1215–1222.
- Tomcik, M., Palumbo-Zerr, K., Zerr, P., Avouac, J., Dees, C., Sumova, B., Distler, A., Beyer, C., Cerezo, L.A., Becvar, R., et al. (2015). S100A4 amplifies TGF- β -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1748–1755.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity* *19*, 641–644.
- Trojanowska, M. (2008). Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. *47 Suppl 5*, v2–v4.
- Tsan, M.-F., and Gao, B. (2004). Heat shock protein and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.* *1*, 274–279.
- Turnis, M.E., Sawant, D.V., Szymczak-Workman, A.L., Andrews, L.P., Delgoffe, G.M., Yano, H., Beres, A.J., Vogel, P., Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2016). Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. *Immunity* *44*, 316–329.
- Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T., and Umezawa, H. (1986). Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinonoid ansamycins accompanies inactivation of p60src in rat kidney cells infected with Rous sarcoma virus. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 2198–2206.
- Valentini, G., Silman, A.J., and Veale, D. (2003). Assessment of disease activity. *Clin. Exp. Rheumatol.* *21*, S39–S41.
- Varga, J., and Abraham, D. (2007). Systemic sclerosis: A prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* *117*, 557–567.
- Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M.T., Wesa, A., Parmiani, G., and Anichini, A. (2007). Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin. Cancer Res.* *13*, 4677–4685.
- Vignali, D.A.A., and Kuchroo, V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* *13*, 722–728.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 523–532.
- Wahl, S.M. (2007). Transforming growth factor- β : innately bipolar. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 55–62.
- Wang, G., Rudland, P.S., White, M.R., and Barraclough, R. (2000). Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1. *J. Biol. Chem.* *275*, 11141–11146.
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M.B., Sergeev, Y. V., Wingfield, P.T., Kim, S.-H., and Egwuagu, C.E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* *20*, 633–641.
- Wang, Z., Liu, J.-Q., Liu, Z., Shen, R., Zhang, G., Xu, J., Basu, S., Feng, Y., and Bai, X.-F. (2013). Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis. *J. Immunol.* *190*, 2415–2423.
- Wigley, F.M. (2009). Vascular disease in scleroderma. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *36*, 150–175.
- Wong, C., and Chen, S. (2009). Heat shock protein 90 inhibitors: new mode of therapy to overcome endocrine resistance. *Cancer Res.* *69*, 8670–8677.
- Wrighton, K.H., Lin, X., and Feng, X.-H. (2008). Critical regulation of TGF β signaling by Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9244–9249.

Wu, S., Li, Y., Li, Y., Yao, L., Lin, T., Jiang, S., Shen, H., Xia, L., and Lu, J. (2016). Interleukin-35 attenuates collagen-induced arthritis through suppression of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Int. Immunopharmacol.* *34*, 71–77.

Xiang, X.G., and Xie, Q. (2015). IL-35: a potential therapeutic target for controlling hepatitis B virus infection. *J. Dig. Dis.* *16*, 1–6.

Yammani, R.R., Carlson, C.S., Bresnick, A.R., and Loeser, R.F. (2006). Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum.* *54*, 2901–2911.

Yoshizaki, A., Yanaba, K., Iwata, Y., Komura, K., Ogawa, A., Muroi, E., Ogawa, F., Takenaka, M., Shimizu, K., Hasegawa, M., et al. (2011). Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 194–200.

Zeng, J.-C., Zhang, Z., Li, T.-Y., Liang, Y.-F., Wang, H.-M., Bao, J.-J., Zhang, J.-A., Wang, W.-D., Xiang, W.-Y., Kong, B., et al. (2013). Assessing the role of IL-35 in colorectal cancer progression and prognosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 1806–1816.

Zibert, J.R., Skov, L., Thyssen, J.P., Jacobsen, G.K., and Grigorian, M. (2010). Significance of the S100A4 Protein in Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 150–160.

Zuehlke, A.D., Beebe, K., Neckers, L., and Prince, T. (2015). Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene* *570*, 8–16.

(1981). Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Bull. Rheum. Dis.* *31*, 1–6.

9. Přílohy

Součástí přílohy je publikace k tématu diplomové práce.

Seznam příloh:

Tomcik, M., Zerr, P., Palumbo-Zerr, K., Storkanova, H., Hulejova, H., Spiritovic, M., Kodet, O., Stork, J., Becvar, R., Vencovsky, J., et al. (2015). Interleukin-35 is upregulated in systemic sclerosis and its serum levels are associated with early disease. *Rheumatol.*