

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

STUDIJNÍ PROGRAM – BIOLOGIE
STUDIJNÍ OBOR – IMUNOLOGIE



Daniel Sánchez

**Autoprotilátky proti kalretikulinu u pacientů s dilatační a
hypertrofickou kardiomyopatií**

Autoantibodies against calreticulin in patients with dilated and hypertrophic
cardiomyopathy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Helena Tlaskalová-Hogenová, DrSc.

Praha, 2016

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

V Praze, 25. 4. 2016

Daniel Sánchez

.....

PODĚKOVÁNÍ

Mé největší poděkování patří paní Prof. MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. za odborné vedení diplomové práce, veškeré cenné rady, připomínky, inspiraci a profesní směřování k problematice autoimunitních a imunologicky mediovaných onemocnění. Současně děkuji paní Doc. RNDr. Ludmile Tučkové, DrSc., která problematiku studia kalretikulínu a antikalretikulinových protilátek do naší laboratoře uvedla. Poděkování patří nejširšímu kolektivu pracovníků Laboratoře buněčné a molekulární imunologie Mikrobiologického Ústavu AV ČR, v.v.i. za pomoc a podporu, ale zejména vedoucímu naší laboratoře a současně řediteli Mikrobiologického ústavu panu RNDr. Martinu Bilejovi, DrSc. za jeho pochopení a shovívavost k mému studiu a umožnění realizovat tuto diplomovou práci. Za pomoc a podporu děkuji kolegyni paní Ing. Věře Hábové. Poděkování patří také pedagogům Přírodovědecké fakulty UK v Praze, kteří mi umožnili doplnění vzdělání a prohloubení a rozšíření mé profesní specializace. V neposlední řadě patří zvláštní dík také mým spolužákům a spolužačkám za podporu a pomoc při studiu.

Zásadní význam pro vznik této diplomové práce mají pan Prof. MUDr. Pavel Gregor, DrSc. a pan MUDr. Karol Čurila, Ph.D., kteří poskytli definovaný a statisticky reprezentativní počet vzorků sér pacientů s idiopatickou dilatační a hypertrofickou kardiomyopatií. Neméně podstatnou úlohu při vytvoření této studie měla také paní MUDr. Iva Hoffmanová, Ph.D., které děkuji za poskytnutí rozsáhlé skupiny sér zdravých krevních dárců, pomoc při uvedení do vybrané klinické problematiky, a také za podporu při studiu.

Vypracování diplomové práce bylo umožněno díky finanční podpoře z prostředků poskytnutých Grantovou agenturou České republiky na projekt: „Analýza detailní specifity, heterogenity a úlohy antikalretikulinových protilátek u onkologických a autoimunitních chorob“ (č. 13-14608S).

Poděkování za pomoc a podporu patří také mé rodině a všem mým blízkým.

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
POUŽITÉ ZKRATKY	9
1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. Autoimunita	12
2.1.1. Autoprotilátky	12
2.1.2. Autoimunitní a imunologicky mediovaná onemocnění	13
2.1.3. Etiopatogeneze autoimunitních onemocnění	14
2.1.4. Autoprotilátky u srdečních onemocnění	16
2.1.4.1. Autoprotilátky proti β 1 adrenoreceptoru	16
2.1.4.2. Autoprotilátky proti muskarinovému receptoru	20
2.2. Kardiomyopatie	22
2.2.1. Hypertrofická kardiomyopatie	23
2.2.2. Dilatační kardiomyopatie	26
2.2.3. Syndromy spojené s dilatací levé komory srdeční	28
2.2.3.1. Akoholem indukovaná dilatační kardiomyopatie	29
2.2.3.2. Dilatační kardiomyopatie u svalových dystrofií	29
2.2.3.3. Těhotenská kardiomyopatie	30
2.2.3.4. Dilatační kardiomyopatie vyvolaná intoxikací	30
2.2.3.5. Zánětlivá kardiomyopatie	31
2.2.3.6. Symptomy dilatační kardiomyopatie u autoimunitních onemocnění	32
2.3. Kalretikulín a srdeční sval	32
2.3.1. Kalretikulín při vývoji srdce	34
2.3.2. Kalretikulín v patogenezi srdečního bloku	34
2.3.3. Kalretikulín – struktura a vlastnosti	35
2.3.4. Biologické funkce kalretikulínu	37
2.3.5. Kalretikulín jako autoantigen	38
3. MATERIÁL A METODY	42
3.1. Základní roztoky	42
3.2. Použité chemikálie, reagentie a protilátky	43
3.3. Přístroje a materiály	44
3.4. Pacientská a kontrolní séra	45
3.5. ELISA test sérových antikalretikulinových protilátek	47
3.6. SDS-PAGE	48
3.7. Imunoblot	49
3.8. Pepscan	50
3.9. ELISA test kalretikulínu v krevním séru	51
3.10. Statistická analýza	52

4. VÝSLEDKY	53
4.1. IgA protilátky proti kalretikulinu u kardiomyopatií	53
4.2. IgG protilátky proti kalretikulinu u kardiomyopatií	55
4.3. Titrační analýzy sérových IgA a IgG protilátek proti kalretikulinu	58
4.4. Ověření protilátkové reaktivity imunoblotem s kalretikulinem	61
4.5. B-buněčné epitopy kalretikulinu	63
4.6. Antikalretikulinové IgA1, IgA2 a IgG1 – IgG4 protilátky	68
4.7. Výskyt kalretikulinu v sérech pacientů s kardiomyopatiemi	73
5. DISKUZE	76
6. ZÁVĚRY	90
7. PŘEHLED LITERATURY	92

ABSTRAKT

Ca²⁺ vážící chaperon kalretikulin je jednou z významných molekul hrajících roli ve vývoji srdce. Kalretikulin je však současně i potenciálním autoantigenem, proti kterému se mohou tvořit autoprotilátky, jejichž úloha není doposud objasněna. Imunizace myši kalretikulinem (CRT) vede k poškození tkáně srdečního svalu. V této práci byly proto analyzovány hladiny protilátek proti CRT testem ELISA v sérech pacientů diagnostikovaných jako idiopatická dilatační kardiomyopatie a kardiomyopatie hypertrofická. U obou skupin byly prokázány zvýšené hladiny IgA (P < 0,001) a IgG (P < 0,05) protilátek proti CRT. Zvýšené hladiny IgA antikalkretikulinových protilátek jsme prokázali u 12 z 34 pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a u 13 z 38 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, zatímco zvýšené hladiny IgG protilátek proti CRT jsme detekovali u 7 z 34 pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a 11 ze 38 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Pouze 2 ze 79 sér kontrolní skupiny krevních dárců byly pozitivní v IgA a 1 ze 79 v IgG izotypu protilátek proti CRT. Rozvinutou protilátkovou odpověď proti CRT u vybraných testovaných pacientů s kardiomyopatiemi potvrzují nálezy IgG anti-CRT protilátek v titru 1/1600, IgA a IgA1 anti-CRT protilátek v titru 1/800 a IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 anti-CRT protilátek v titru 1/200. Metoda Pepscan dokumentuje protilátkovou reaktivitu pacientů s kardiomyopatiemi predominantně s těmito sekvencemi CRT: EVKIDNSQVESGSLED, IDDP TDSKPE, DKAPEHIPDPDA a RKEEEEEAE DKEDDAEDKDEDEEDE. Diplomová práce prokazuje zvýšenou koncentraci sérového CRT (P < 0,01) ve skupině pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (5 z 19). Avšak i 6 ze 17 sér pacientů s dilatační kardiomyopatií a pouze 1 z 24 testovaných sér kontrolní skupiny krevních dárců byly pozitivní na přítomnost kalretikulinu. Výsledky práce přispějí k rozšíření znalostí o prevalenci autoprotilátek proti CRT a hladině CRT v krevním séru u lidských onemocnění. Přítomnost antikalkretikulinových protilátek a detekce kalretikulinu v séru by mohla sloužit k vymezení forem značně heterogenních primárních kardiomyopatií, v jejichž patogenezi hrají roli autoimunitní reakce.

Klíčová slova: kalretikulin, sérové protilátky, antigenní epitopy, autoimunita, kardiomyopatie, ELISA, Pepscan

ABSTRACT

Distinct cellular level of the Ca^{2+} binding chaperone calreticulin (CRT) is essential for cardiac development and postnatal function. However, CRT is also a potential autoantigen eliciting formation of antibodies (Ab), whose role is not yet clarified. Immunization with CRT leads to cardiac injury, and overexpression of CRT in cardiomyocytes induces dilated cardiomyopathy (DCM) in experimental animals. Hence, we analysed levels of anti-CRT Ab and calreticulin in the sera of patients with idiopathic DCM and hypertrophic cardiomyopathy (HCM). ELISA and immunoblot using human recombinant CRT and Pepscan with synthetic, overlapping decapeptides of CRT were used to detect anti-CRT Ab. Significantly increased levels of anti-CRT Ab of IgA ($P < 0.001$) and IgG ($P < 0.05$) isotypes were found in patients with both DCM (12/34 seropositive for IgA, 7/34 for IgG) and HCM (13/38 seropositive for IgA, 11/38 for IgG) when compared with controls (2/79 for IgA, 1/79 for IgG). Titration analysis in seropositive DCM and HCM patients documented anti-CRT Ab detected at 1/1600 dilution for IgG and 1/800 for IgA (and IgA1) and at least at 1/200 dilution for IgA2, IgG1, IgG2 and IgG3. Pepscan identified several immunogenic CRT epitopes: EVKIDNSQVESGSLED, IDDP TDSKPE, DKAPEHIPDPDA and RKEEEEAEDKEDDAEDKDEDEEDE recognised by IgA and IgG Ab of these patients. Serum CRT concentration was tested by ELISA. Significantly increased levels of CRT relative to healthy controls were found in sera of patients with HCM ($P < 0.01$, 5/19). Six out of 17 patients with DCM and 1 out of 24 healthy controls were seropositive for serum CRT. These data extend the knowledge of seroprevalence of anti-CRT Ab and CRT, and suggest possible involvement of autoimmune mechanism in some forms of clinically heterogeneous cardiomyopathies.

Key words: calreticulin, anti-calreticulin antibodies, autoimmunity, antigenic epitopes, dilated cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, ELISA, Pepscan

POUŽITÉ ZKRATKY

AU	arbitrární jednotky
$\beta 1, \beta 2$	typy adrenoreceptorů
BSA	bovinní sérový albumin
Ca^{2+}	vápenatý kation
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
DCM	dilatační kardiomyopatie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fc γ IIa	receptor vážící Fc fragment protilátek
HCM	hypertrofická kardiomyopatie
IgA	imunoglobulin A
IgA1, IgA2	imunoglobulin podtřídy IgA1, IgA2
IgG	imunoglobulin G
IgG1-IgG4	imunoglobuliny podtřídy IgG1, G2, G3, G4
M2	muskarinový receptor M2
O.D.	optická denzita
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PBS-T	fosfátem pufovaný fyziologický roztok s Tween 20
Pepscan	celulózová membrána s kovalentně navázanými peptidy
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
TBS	Trisový pufr (pH 8)
TBS-T	Trisový pufr (pH 8) s Tween 20

1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Ca^{2+} vážící molekulární chaperon kalretikulin je molekulou esenciální pro vývoj srdce během embryogeneze a současně potenciálním autoantigenem, proti kterému se tvoří autoprotilátky u některých pacientů s autoimunitními a onkologickými gastrointestinálními onemocněními. V experimentálním myším modelu vyvolává imunizace kalretikulinem poškození srdečního svalu, avšak samotná nadprodukce kalretikulinu v kardiomyocytech dospělých myši vede k rozvoji dilatační kardiomyopatie. Antikalretikulinové protilátky byly nalezeny také u lidského kongenitálního srdečního bloku.

Dilatační a hypertrofická kardiomyopatie představují dvě základní skupiny primárních kardiomyopatií. Zatímco hypertrofická kardiomyopatie reprezentuje spíše genetické onemocnění, příčiny vzniku dilatační kardiomyopatie jsou nejasné a v části případů se uvažuje o imunologicky mediovaném mechanismu. Přítomnost antikalretikulinových protilátek však nebyla doposud u pacientů s dilatační ani hypertrofickou kardiomyopatií testována, přestože by nález těchto autoprotilátek mohl odhalit doposud nerozpoznané autoimunitní procesy v patogenezi těchto onemocnění.

V diplomové práci byly stanoveny následující experimentální cíle:

1) Definovat výskyt sérových autoprotilátek proti kalretikulinu u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a kardiomyopatií hypertrofickou. V rámci této studie testovat a statisticky analyzovat sérové hladiny protilátek proti kalretikulinu izotypu IgA a IgG a jejich subtypů IgA1, IgA2 a IgG1 – IgG4, které u zmíněných onemocnění doposud nebyly studovány. Současně stanovit nejvyšší detekovatelné titry sérových protilátek proti kalretikulinu. Pro tento účel modifikovat doposud užívaný ELISA test stanovující sérové hladiny protilátek proti kalretikulinu.

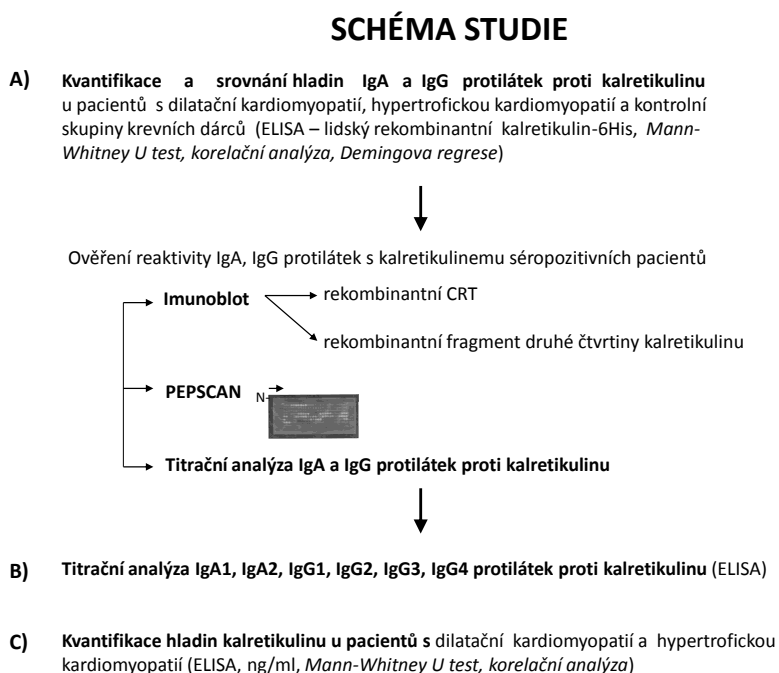
2) Ověřit přítomnost sérových protilátek proti kalretikulinu u testovaných pacientů s kardiomyopatiemi metodou imunoblotu s lidským rekombinantním kalretikulinem a jeho

vybranými fragmenty a technikou Pepscan, která využívá série syntetických decapeptidů kalretikulinu, jejichž sekvence se vzájemně překrývají osmi aminokyselinami.

3) Stanovit koncentrace sérového kalretikulinu u pacientů s hypertrofickou a dilatační kardiomyopatií a srovnat je s koncentracemi kalretikulinu u kontrolní skupiny krevních dárců.

Uspořádání experimentů v diplomové práci zjednodušeně zobrazuje Obrázek č. 1.

Obrázek č. 1: Schéma experimentů v diplomové práci



2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. AUTOIMUNITA

Nedílnou součástí homeostatických a ontogenetických mechanismů jsou imunitní reakce směřované proti strukturám vlastních tkání, tedy nezpochybnitelně autoimunitní reakce. Fyziologickou úlohou autoimunitních reakcí je odstraňování nepotřebných, poškozených, stárnoucích, virově infikovaných a nádorově transformovaných buněk z organismu. Vznik antiidiotypových protilátek je příkladem autoimunitní reakce, jež je integrální součástí regulace imunitní odpovědi. Během embryogeneze se navzdory nedostatečně rozvinutému imunitnímu systému ve smyslu antiinfekční imunity autoimunitní reakce účastní morfogenetických procesů. Působí-li však autoimunitní reakce chronické poškození organismu vnímáme ji jako patologickou (LACROIX-DESMAZES et al. 1998, CASALI & SCETTINO 1996).

2.1.1. Autoprotilátky

V závislosti na charakteru a vlastnostech vnímáme – ač s neostrou hranicí – některé autoprotilátky spíše jako fyziologické a jiné, které jsou prokazatelně spojeny s chorobným procesem, jako patologické. Fyziologické autoprotilátky nejsou asociovány s autoimunitními onemocněními. Autoprotilátky označované jako fyziologické jsou obvykle nízkoafinní, polyspecifické, multivalentní a převážně izotypu IgM a zpravidla se nevyskytují ve vysokých koncentracích. Při tvorbě fyziologických autoprotilátek je přednostně využíváno konzervativních segmentů IgV genů. Do skupiny fyziologických autoprotilátek principiálně náleží také tzv. přirozené protilátky, které se ostatně vyskytují jako jedny z prvních protilátek u novorozenců. Přirozené protilátky rozpoznávají díky své polyreaktivitě široké spektrum fylogeneticky konzervovaných molekul – aktin, tubulin, myosin, spektrin, $\beta 2$ mikroglobulin, dsDNA, fosfatidylserin, difosfatidylglycerol, avšak také cytokiny, hormony a imunoglobuliny. Autoprotilátky označované jako fyziologické váží i bakterie a viry. Zajímavou vlastností přirozených protilátek izotypu IgG je schopnost

měnit afinitu k antigenu a rozpoznávat složky přirozené imunity např. jako ficolin a manózu vázající lektin na povrchu bakterií, čímž usnadňují jejich fagocytózu. Subpopulace CD5⁺ B lymfocytů označovaná jako B1 buňky, jejichž výskyt a aktivita jsou nejčastěji spojovány s embryonálním a raným neonatálním obdobím lidí a myší, jsou považovány za nejvýznamnější producenty přirozených protilátek. Tyto buňky u novorozeného organismu patrně tvoří součást první linie imunitní obrany, avšak mají i imunoregulační funkce. Důležitou imunoregulační funkcí některých přirozených protilátek je stimulace zkřížené prezentace (*cross-presentation*) virových složek na MHC I glykoproteinech buněk prezentujících antigen, které internalizovaly komplexy virů s těmito protilátkami. Tímto způsobem mohou přirozené protilátky přispět k rozvoji buňkami zprostředkované antivirové imunity mechanismem *cross-priming* (HARDY & HAYAKAWA 1986, CASALI & NOTKINS 1989, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al. 1992, KASAIAN & CASALI 1993, DÜRRBACH et al. 2007, PANDA et al. 2013).

Autoprotilátky asociované s patologickou autoimunitou jsou vysokoafinní, převážně izotypu IgG, tvoří se ve vysokých koncentracích a váží a aktivují komplement. Antigenní specifita a fyzikálně-chemické vlastnosti patologických autoprottilátek určují jejich úlohu v onemocněních (CZAJA & HOMBURGER 2001).

2. 1. 2. Autoimunitní a imunologicky mediovaná onemocnění

Imunologicky mediovaná onemocnění včetně autoimunity jsou způsobena devastující aktivitou imunitního systému směřovanou proti vlastnímu organismu. Autoimunitní onemocnění jsou definována zvýšenou expresí MHC glykoproteinů a proteinů tepelného šoku na buňkách v místě chronického poškození, imunologickou reaktivitou proti definovanému autoantigenu, přítomností vysokých hladin autoprottilátek v sérech pacientů, asociací onemocnění se specifickými produkty genového komplexu MHC a schopností přenosu onemocnění mezi jedinci prostřednictvím séra nebo imunokompetentními buňkami. Autoimunitní onemocnění jsou charakterizována vzájemným sdružením, polygenním způsobem dědičnosti a častějším výskytem u žen. Pro autoimunitní onemocnění, podobně jako pro alergická i ostatní imunologicky mediovaná

onemocnění je typický terapeutický efekt kortikosteroidů a imunosupresiv. Termín „imunologicky mediovaná onemocnění“ označuje choroby, v jejichž patogenezi se uplatňuje chronický a nekontrolovaný zánět. Označení „imunologicky mediované onemocnění“ významově stírá hranici mezi definicí autoimunitních a alergických chorob (WITEBSKY et al. 1957, BONA 1991, ROSE & BONA 1993).

2. 1. 3. Etiopatogeneze autoimunitních onemocnění

Příčiny vzniku autoimunitních onemocnění nejsou doposud uspokojivě objasněné, avšak v jejich etiologii je předpokládána účast faktorů vnějšího prostředí i příspěvek genetické predispozice jedince. Geny průkazně asociované s rozvojem autoimunity kódují proteiny genového komplexu MHC včetně MHC glykoproteinů, T buněčný receptor, variabilní oblasti imunoglobulinů, cytokiny a geny spojené s apoptotickou smrtí. Vyšší výskyt autoimunitních onemocnění u žen naznačuje účast hormonů při jejich vzniku. Doposud platí předpoklad stimulačního vlivu estrogenů a inhibičního vlivu androgenů na imunitní reakci. Vyšší výskyt autoimunitních onemocnění u jedinců s imunodeficitu indikuje zásadní roli regulačních lymfocytů v potlačení nežádoucí autoreaktivity. Rozvoj autoimunity u imunodeficitů může být také výsledkem snahy o kompenzaci tohoto defektu generalizovanou expanzí a zvýšenou aktivitou zbytku imunocytů bez ohledu na jejich specifitu a možnost regulace (ROVENSKÝ et al. 1994).

Riziko vzniku autoimunitních onemocnění zvyšují některé vnější faktory jako expozice organismu ultrafialovým záření, těžkým kovům a některým chemikáliím a přítomnost chronické infekce. Zvláště významná pro rozvoj poškozující autoimunity se jeví infekce, která v tomto směru může působit rozdílnými mechanismy. Některé složky infekčního agens působí mitogenně na imunokompetentní buňky či vyvolávají polyklonální aktivaci T a B lymfocytů bez ohledu na specifitu jejich antigenního receptoru – tedy včetně buněk autoreaktivních. Tímto způsobem mohou působit v případě T buněk také virové superantigeny. Oproti tomu imortalizace autoreaktivních B-buněk virem Epstein-Barrové může vést k produkci autoprotilátek (ANSEL et al. 1985, NIELSEN & HULTMAN 2002, ELENKOV & CHROUSOS 2002, SEPA et al. 2002, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et

al. 1992, NAKAGAWA & HARRISON 1996). Přítomnost zánětu, zejména chronického, představuje riziko odhalení kryptických autoantigenů v poškozené tkáni, které byly doposud imunitnímu systému skryté. Proti těmto autoantigenům mohou existovat specifické T- či B-lymfocyty, jež nemají regulační charakter. V zánětlivém prostředí dochází ke zvýšené expresi MHC molekul II. třídy na buňkách poškozené tkáně, čímž se zvyšuje pravděpodobnost prezentace endogenního peptidu a rozšíření spektra rozpoznávaných autoantigenů imunitním systémem (*antigenic spreading*) za současné perpetuace či amplifikace zánětu (COHEN 2001). Se zvyšujícím se množstvím znalostí o způsobu generování antigenního repertoáru T lymfocytů se pozornost upíná k tzv. promiskuitní genové expresi tkáňově-specifických antigenů v medulárních buňkách thymu, která je řízena autoimunitním regulátorem (*Aire*). Mutace v genu pro *Aire* způsobuje vzácné monogenní onemocnění charakterizované multiorgánovou autoimunitou preferenčně poškozující endokrinní žlázy – Blizzardův syndrom (APECED, *autoimmune polyendocrinopathy – candidiasis – ectodermal dystrophy*) (DERBINSKI et al. 2001, BJÖRSES et al. 1998).

Navzdory skutečnosti, že každé onemocnění má svůj individuálně specifický charakter včetně jeho původu, patogeneze, rezistence organismu, terapeutických východisek a klinické odpovědi na konkrétní léčbu, lze v některých případech prokazatelně určit mechanismy poškození. Patogenetické působení autoprotilátek se odvíjí od jejich ukládání ve tkáních, vazby a aktivace složek komplementu a následné atrakce fagocytujících a prozánětlivých mononukleárních buněk. Protílátky však mohou působit i cytotoxicky prostřednictvím mechanismu cytotoxicity závislé na protilátkách (*antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC*). Rozvoj chronického zánětu způsobeného depozicí imunokomplexů obsahujících autoprotílátky ve tkáních je příčinou celé skupiny chorob označovaných jako imunokomplexová onemocnění. Příkladem jiného patogenetického působení protilátek je likvidace hematologických buněk, jejímž následkem je autoimunitní cypenie, či blokace nebo stimulace buněčných povrchových receptorů různých typů buněk (Gravesova choroba, myastenie gravis, atrofická gastritida) (BLANK & SHOENFELD 2007, PORDEUS et al. 2008).

2. 1. 4. Autoprotilátky u srdečních onemocnění

Přítomnost cirkulujících specifických autoprotilátek se může v různé míře vyskytovat jak u pacientů se srdečním onemocněním tak i u pacientů postižených srdečním selháním, aniž by u nich byla prokázána poškozující imunologicky-mediovaná reakce či atributy Witebského kritérií definujících autoimunitní onemocnění. Význam patologické úlohy autoprotilátek u srdečních onemocnění není v plné míře objasněn, neboť exprese identifikovaných autoantigenů není omezena pouze na tkáň srdečního svalu. Nicméně přítomnost autoprotilátek v sérech významné části pacientů se srdečními onemocněními zůstává skutečností. Pacienti s různými srdečními onemocněními mohou vyvíjet autoprotilátky proti HSP60, troponinu I, myozinu, Na-K-ATPáze a mitochondriím, u nichž byl identifikován *Adenine Nucleotide Transporter* jako imunodominantní molekula (CAFORIO et al. 1992, BABA et al. 2002, LEUSCHNER et al. 2008, BOTTAZZO et al. 1986, KAYA et al. 2012).

Z množství autoprotilátek vyskytujících se u pacientů srdečními onemocněními jsou nejvíce prostudovány protilátky proti adrenalinovému a muskarinovému receptoru.

2. 1. 4. 1. Autoprotilátky proti β_1 adrenoreceptoru

β_1 adrenoreceptor má zásadní úlohu v adrenergní regulaci srdeční kontrakce a protilátky proti tomuto receptoru jsou považovány v patogenezi srdečního selhání za klíčové. Dilatační kardiomyopatie byla jedním z prvních onemocnění, u kterého byl výskyt autoprotilátek proti β_1 adrenoreceptoru prokázán. Patogeneticky relevantní u srdečního selhání se jeví IgG izotyp protilátek proti β_1 adrenoreceptoru, který má prokazatelně inhibiční vliv na signalizační funkci tohoto receptoru (LIMAS et al. 1989). β_1 adrenoreceptor náleží do skupiny receptorů asociovaných s trimerními G-proteiny a je tvořen transmembránovým řetězcem sedminásobně procházejícím membránou. Vazba adrenalinu na tento receptor iniciuje signalizační kaskádu, jejíž součástí je aktivace enzymu adenylátcyklázy katalyzující tvorbu 3',5' cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), jenž je nezbytný pro aktivaci protein kinázy A. Protein kináza A fosforyluje transportní kanály pro

vápníkové iony v sarkoplazmatickém retikulu a plazmatické membráně, které se otevřou a umožní tak influx těchto ionů do cytoplazmy (CAPOTE et al. 2015).

Analýza specifity protilátek proti $\beta 1$ a $\beta 2$ adrenoreceptoru u pacientů s dilatační kardiomyopatií identifikovala imunodominantní epitopy v druhé extracelulární smyčce $\beta 1$ adrenoreceptoru na základě srovnání reaktivity těchto pacientů a kontrolní skupiny zdravých krevních dárců. Výsledky studie prokázaly přítomnost autoprotilátek proti druhé extracelulární smyčce $\beta 1$ adrenoreceptoru u 31 % pacientů s dilatační kardiomyopatií, zatímco pouze 12 % testovaných osob kontrolní skupiny zdravých krevních dárců bylo séropozitivních na tyto protilátky (MAGNUSSON et al. 1990).

Ačkoliv autoprotilátky proti $\beta 1$ adrenoreceptoru jsou spojovány s negativní prognózou srdečního onemocnění a vysokým rizikem srdečního selhání, konzistentní informace o příčině jejich tvorby, výskytu a kinetice jsou doposud limitované. Na buněčné a molekulární úrovni krátkodobá stimulace $\beta 1$ adrenoreceptoru protilátkami vede k apoptóze kardiomyocytů mechanismem závislým na kaspázách, který je zprostředkován aktivací cAMP dependentní protein kinázy A. Oproti tomu dlouhodobá stimulace $\beta 1$ adrenoreceptoru vede k jeho desenzitizaci vůči stimulaci protilátkami a snížené expresi na povrchu buněk. Snížená kontraktilita srdečního svalu může však být důsledkem obou případů (PATEL et al. 2009, FREEDMAN & LEFKOWITZ 2004).

Příčiny vzniku a patogenetická úloha protilátek proti $\beta 1$ adrenoreceptoru v případě srdečních onemocnění či srdečního selhání jsou doposud v rovině spekulací zejména proto, že exprese $\beta 1$ adrenoreceptoru není omezena na buňky kardiomyocytů. Hypotéza vzniku protilátek proti $\beta 1$ adrenoreceptoru předpokládá jeho uvolnění z buněk myokardu následkem poškození a zánětu, čímž je $\beta 1$ adrenoreceptor exponován imunitnímu systému, který je senzitivován pro tvorbu protilátek. Nezbytnost uvolnění adrenoreceptoru z buněk pro indukci tvorby autoprotilátek je však diskutabilní v případě $\beta 1$ adrenoreceptoru, neboť doména dominantně rozpoznávaná autoprotilátkami je permanentně exponována extracelulárnímu prostředí. Mechanismus „molekulární mimikry“ je respektovanou hypotézou vzniku protilátek proti $\beta 1$ adrenoreceptoru předpokládající existenci sdíleného epitopu (*epitope sharing*) – tedy sekvenční nebo strukturální podobnost – mezi infekčním agens a extracelulární doménou tohoto receptoru. Předpokládá se, že mechanismus

„molekulární mimikry“ je platný při rozvoji Chagasovy kardiomyopatie. Při vzniku Chagasovy kardiomyopatie se uplatňuje podobnost mezi povrchovými antigeny *Trypanosoma cruzi* a sekvencemi lidských proteinů (PIZARRO et al. 2011, WALLUKAT et al. 2010). Vysoká sekvenční homologie byla prokázána mezi sekvencemi lidských proteinů a proteinů některých virů, bakterií a kvasinek – enterobakteriálního fága RR69, fága KG1 stafylokoků, proteinů *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia thailandensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Legionella pneumophila*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus fumigatus* (LEVIN & HOEBEKE 2008). Koncept podobnosti mezi cizorodým antigenem a autoantigeny – zmiňované „molekulární mimikry“ – lze také využít k objasnění vzniku protilátek křížově reagujících s bakteriálním i lidským HSP60, myeloperoxidázou a cytokeratiny (HUITTINEN et al. 2002).

U idiopatické dilatační kardiomyopatie se vyskytuje významná koincidence mezi výskytem protilátek proti $\beta 1$ adrenoreceptoru a výskytem protilátek proti muskarinovému receptoru M2. Ve skupině pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií sérové protilátky 31 % pacientů rozpoznávaly antigenní epitopy $\beta 1$ adrenoreceptoru a současně 39 % těchto pacientů rozpoznávalo svými protilátkami muskarinový receptor M2 (FU et al. 1993, 1994, MATSUI et al. 1995).

Autoprotilátky stimulující adrenoreceptor $\beta 1$ mají průkazně kardiotoxický efekt. V závislosti na množství, protilátky proti adrenoreceptoru $\beta 1$ způsobují buď jeho desenzitizaci či blokaci (IWATA et al. 2001). Neutralizace nebo odstranění těchto autoprottilátek je prokazatelně terapeuticky účinné u séropozitivních pacientů se srdečními onemocněními. Vhodným technických řešení při odstranění těchto protilátek se jevila metoda plazmaferézy využívající selektivní imunoadsorpce, při které jsou protilátky za využití extrakorporálního krevního oběhu adsorbovány z krve na vhodný nosič. Imunoadsorpce je vysoce efektivní a umožní odstranění více než 80 % protilátek (SCHIMKE et al. 2005, STAUDT et al. 2002, 2005). Vlivem plazmaferézy na vývoj některých srdečních onemocnění a na možnost odvrácení srdečního selhání se zabývá řada autorů. Empirické odstranění autoprottilátek z krevního oběhu prokazatelně zlepšuje ejekční funkci levé komory, hladinu natriumuretického peptidu a upravuje hemodynamiku. Významné zlepšení klinického stavu u 163 pacientů indikovaných k transplantaci srdce, séropozitivních na protilátky proti $\beta 1$ adrenergnímu receptoru, bylo prokázáno po dobu 5 let od provedení plazmaferézy. Nejvyššího efektu na zlepšení zdravotního stavu těchto

pacientů, zahrnujícího zvýšení ejekční frakce levé komory, zmírnění fyzických obtíží a omezujících symptomů (hodnocených nižším stupněm NYHA stupnice), zvýšení hladiny natriumuretického peptidu a zlepšení kyslíkové konzumace, bylo dosaženo první rok po provedení plazmaferézy (DANDEL et al. 2012, MÜLLER et al. 2000, SCHIMKE et al. 2001). Jedna z mechanistických představ příčin terapeutického úspěchu odstranění protilátek proti adrenergnímu receptoru $\beta 1$ předpokládá obnovení jeho signalizační funkce. Úloha imunitního systému a protilátkové reaktivity proti $\beta 1$ adrenergnímu receptoru v patogenezi dilatační kardiomyopatie je však komplexnější, což naznačuje rozdílná terapeutická účinnost plazmaferézy u pacientů v závislosti na polymorfizmu jejich Fc receptorů. Vyšší terapeutický úspěch při využití plazmaferézy a odstranění imunoglobulinů z krevního oběhu byl prokázán u těch pacientů s dilatační kardiomyopatií, jež byli nositeli alely R/R131 receptoru Fc γ RIIa (STAUDT et al. 2010).

Patogeneze imunologicky mediovaných onemocnění obvykle zahrnuje komplexní účast složek imunitního systému včetně rozvoje širokého spektra autoproti látek. Také v případě idiopatické dilatační kardiomyopatie lze předpokládat rozvoj autoproti látek různých a doposud neznámých specifit, neboť prosté odstranění imunoglobulinů z krevního oběhu u pacientů s tímto onemocněním způsobí zlepšení srdečních funkcí bez ohledu na přítomnost a výšku hladin protilátek specifických proti $\beta 1$ adrenergnímu receptoru před vlastní plazmaferézou (MOBINI et al. 2003).

Analýza izotypů a subtypů sérových protilátek proti $\beta 1$ adrenergnímu receptoru u pacientů s kardiomyopatiemi prokázala dominanci subtypu IgG3 protilátek, který je spojován s patogenezi těchto chorob. Složitost vztahu subtypu IgG3 protilátek proti adrenergnímu receptoru $\beta 1$ k patogenezi dilatační kardiomyopatie dokumentuje skutečnost, že se terapeutický efekt selektivního odstranění IgG3 izotypu protilátek této specifity modifikovanou plazmaferézou projevil zlepšením ejekční funkce levé komory nejvíce u pacientů, kteří trpěli dilatační kardiomyopatií kratší dobu a u pacientů s vyšší mírou ejekční disfunkce (STAUDT et al. 2002).

Všeobecné přijetí představy o klíčové patogenetické úloze protilátek proti adrenergnímu receptoru $\beta 1$ u kardiomyopatií vedla ke snaze zvýšit specifitu a efektivitu odstranění těchto protilátek z krve pacientů plazmaferézou. Ke zvýšení specifčnosti odstranění protilátek proti adrenergnímu receptoru $\beta 1$ plazmaferézou byl vyvinut systém

zefektivňující imunoafinitní separaci založenou na využití syntetických peptidů obsahujících klíčové antigenní epitopy těchto protilátek (SCHIMKE et al. 2005, WALLUKAT et al. 2002). Selektivní odstranění subtypu IgG3 protilátek proti adrenergnímu receptoru β 1 tímto separačním postupem způsobuje zlepšení fyziologických a klinických parametrů, avšak toto zlepšení není výraznější než v případě využití technik neselektivního odstranění plazmatických IgG protilátek bez zřetele na jejich subtyp (HERDA et al. 2010, STAUDT et al. 2010).

Navzdory určitému zpochybňování zásadního patogenního vlivu protilátek proti adrenergnímu receptoru β 1 u pacientů s kardiomyopatiemi pokračovaly snahy vyvinout systém zefektivňující eliminaci těchto protilátek z krevního oběhu. Zmíněné snahy vyústily ve vývoj syntetických oligonukleotidových polymerů označovaných jako aptamery, které umožňují vysokoafinitní a tím i specifitější vazbu protilátek proti adrenergnímu receptoru β 1, čímž se v organismu neutralizuje jejich patologické působení a v konečném důsledku jsou tyto protilátky ve zvýšené míře eliminovány (WALLUKAT et al. 2012). Odlišným technickým řešením vycházejícím ze stejné logiky – tedy neutralizace a odstranění protilátek proti adrenergnímu receptoru β 1 z krevního oběhu specifickým neutralizačním agens – je využití cyklického peptidu COR-1. V první etapě klinických zkoušek eliminovala molekula COR-1 většinu cirkulujících protilátek proti adrenergnímu receptoru β 1. Současně bylo podávání této molekuly pacienty dobře tolerováno a nevyvolávalo protilátkovou odpověď (MÜNCH et al. 2012).

2. 1. 4. 2. Autoprotilátky proti muskarinovému receptoru

Druhou skupinou intenzivně studovaných autoprottilátek u kardiomyopatií jsou protilátky proti muskarinovému receptoru. Muskarinový receptor patří do skupiny receptorů pro acetylcholin, které jsou podobně jako β adrenoreceptory tvořeny polypeptidovým řetězcem sedminásobně procházejícím plazmatickou membránou. Signalizační funkce muskarinového receptoru je spojena s trimerními G-proteiny (KRUSE et al. 2014). Doposud skupina muskarinových receptorů zahrnuje 5 antigenně rozdílných typů, jejichž stimulace vede k iniciaci odlišných signalizačních drah. Protilátky proti

muskarinovému receptoru M2 byly identifikovány v 90. letech minulého století u pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů s Chagasovou chorobou (NUSSINOVITICH & SHOENFELD 2012).

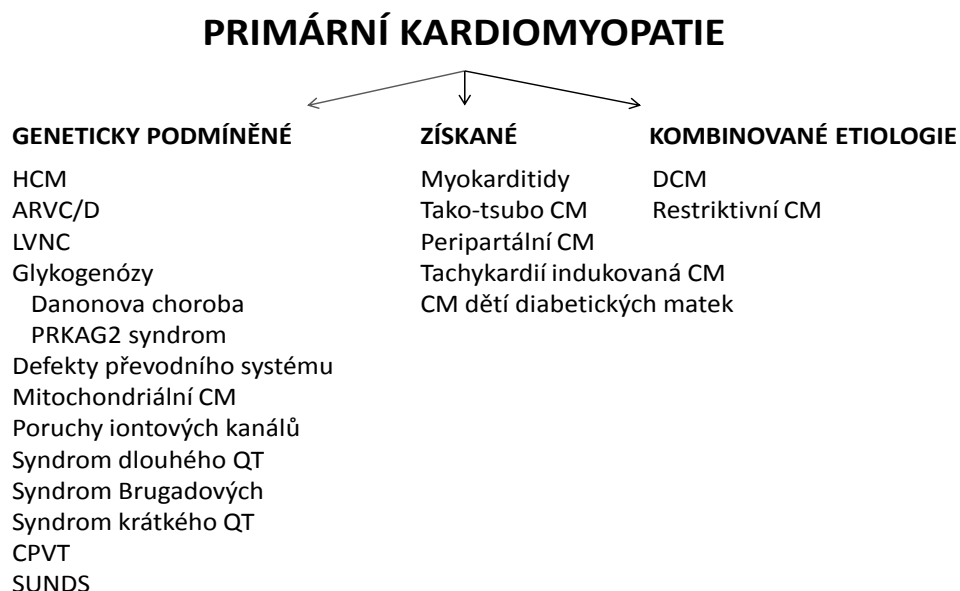
Analýzy detailní specifity sérových protilátek proti muskarinovému receptoru M2 u pacientů s dilatační kardiomyopatií prokázaly imunodominantní epitopy na druhé extracelulární smyčce tohoto typu receptoru. Studie protilátkové reaktivity proti lidskému muskarinovému receptoru M2 zdokumentovala séropozitivitu 39 % pacientů s dilatační kardiomyopatií na protilátky proti syntetickému peptidu korespondujícímu se sekvencí 169 – 193, jež se nachází v druhé extracelulární smyčce tohoto receptoru. Oproti tomu, zvýšené hladiny protilátek proti této aminokyselinové sekvenci lidského muskarinového receptoru M2 byly nalezeny pouze u 8 % zdravých krevních dárců (FU et al. 1993). Studium vlivu protilátek specifických pro sekvenci 169 – 193 muskarinového receptoru M2 prokázalo negativní chrono- a ionotropní efekt včetně schopnosti inhibice adenylátcyklázové aktivity (FU 1995, WANG et al. 1996). Imunizace králíků molekulou muskarinového receptoru M2, podobně jako imunizace peptidem sekvencně shodným s jeho druhou extracelulární smyčkou, vyvolala u experimentálních zvířat pravostrannou ventrikulární dilataci. Histologická analýza alterované oblasti ventrikulární stěny takto postiženého srdce králíků imunizovaných muskarinovým receptorem M2 a jeho fragmentem prokázala ohniskovou myofibrilární lýzu, ztrátu myofilament, zvětšení mitochondrií a jejich kondenzaci, vakuolizaci sarkoplazmy a depozici denzních granul v sarkoplazmě (MATSUI et al. 1997).

STAVRAKIS et al. (2011) prokázali, že cirkulující autoprottilátky proti muskarinovému receptoru M2 u pacientů s dilatační kardiomyopatií interferují s agonistickým ionotropním efektem cirkulujících protilátek proti $\beta 1$ adrenergnímu receptoru tím, že křížově reagují s muskarinovými receptory M2. Tito autoři předpokládají, že cirkulující protilátky proti muskarinovým receptorům mohou snižovat schopnost ventrikulární kontraktility a tím přispívat k srdečnímu selhání u pacientů s kardiomyopatiemi. Objasnění skutečného významu a vlivu protilátek proti M2 muskarinovému i $\beta 1$ adrenergnímu receptoru v rozvoji srdečních onemocnění a při srdečním selhání komplikuje skutečnost, že oba receptory nejsou selektivně exprimovány jen na buňkách srdečního svalu (STAVRAKIS et al. 2011).

2. 2. KARDIOMYOPATIE

Kardiomyopatie představují významnou, avšak různorodou skupinu onemocnění myokardu spojených s mechanickou dysfunkcí a poruchou převodního systému srdečního, které – jsou-li neléčeny – vedou k srdečnímu selhání a k takové míře poškození srdečního svalu, kdy je jedinou možností léčby srdeční transplantace. Patologicko-anatomicky se kardiomyopatie obvykle manifestuje různým stupněm ventrikulární hypertrofie nebo dilatace. Kardiomyopatie mají různé příčiny, mezi nimi však dominují vlivy genetické. Tato onemocnění často bývají součástí některých systémových onemocnění, ovšem mohou existovat i jako samostatné nosologické entity. Kardiomyopatie jsou obvykle rozdělovány na základě předpokládané příčiny poškození srdečního svalu a celkového klinického kontextu do dvou hlavních skupin na kardiomyopatie primární a sekundární. Primární kardiomyopatie jsou onemocnění charakterizovaná poškozením srdečního svalu bez přítomnosti jiného onemocnění vedoucího k podobné symptomatologii. Primární kardiomyopatie mohou být geneticky podmíněné, avšak i výlučně získané. Oproti tomu se sekundární (druhotné) kardiomyopatie vyskytují společně se systémovými (multiorgánovými) onemocněními, které mohou být také jejich příčinou. Primární kardiomyopatie se dle klasifikace Evropské kardiologické společnosti z roku 2008 rozdělují na kardiomyopatii hypertrofickou, dilatační, restriktivní, arytmogenní kardiomyopatii pravé komory a skupinu kardiomyopatií neklasifikovaných (THIENE et al. 2000, CHARRON et al. 2010, STANĚK 2014, ARBUSTINI et al. 2014). Postavení hypertrofické a dilatační kardiomyopatie v komplexnějším systému členění primárních kardiomyopatií nabízí klasifikace dle Marona (2008), kterou dokumentuje Obrázek č. 2.

Obrázek č. 2: Klasifikace primárních kardiomyopatií dle B. Marona



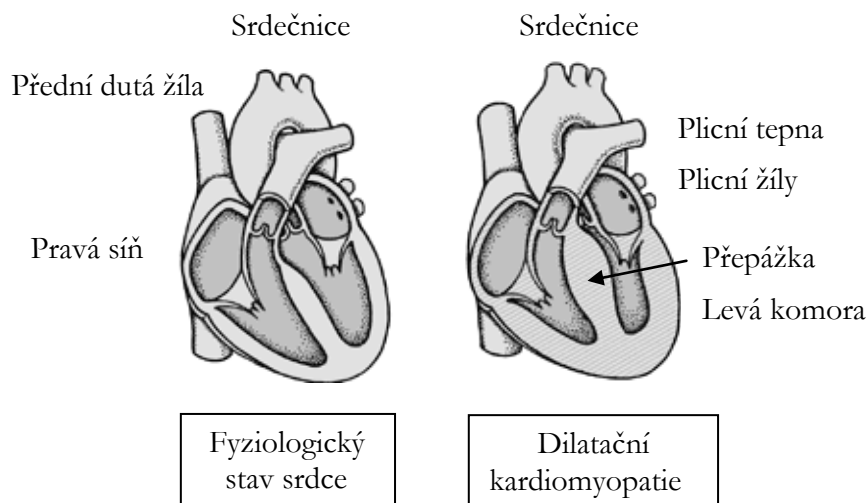
HCM, hypertrofická kardiomyopatie; ARVC/D, arytmogenní kardiomyopatie/dysplázie pravé komory; DCM, dilatační kardiomyopatie; CM, kardiomyopatie; LVNC, izolovaná non-kompaktní kardiomyopatie (levé komory); CPVT, katecholaminergní polymorfnní komorová tachykardie; SUNDS, syndrom náhlé nevysvětlitelné/kardiální smrti

Upraveno dle: Maron B., *Circ. Heart Fail.* 2008;1:72 – 75.

2. 2. 1. Hypertrofická kardiomyopatie

Hypertrofická kardiomyopatie je poměrně často se vyskytujícím druhem primární kardiopatie s incidencí přibližně 1:500 v Evropě a Severní Americe, charakterizovaná autozomálně-dominantní dědičností a klinicky heterogenním projevem. Hypertrofická kardiomyopatie je považována za nejčastěji se vyskytující kardiomyopatii u sportovců a mladých lidí a současně za nejčastější příčinu jejich náhlého srdečního selhání s následkem smrti. Hypertrofická kardiomyopatie je definovaná hypertrofií svaloviny nedilatované levé srdeční komory, jejíž příčinou není jiné známé srdeční onemocnění. Schématicky znázorněný rozdíl mezi zdravým srdcem a srdcem postiženým hypertrofickou kardiomyopatií znázorňuje Obrázek č. 3.

Obrázek č. 3: Schématické zobrazení morfologických změn, charakterizované zesílením srdeční stěny při hypertrofické kardiomyopatii oproti zdravému srdci



Upraveno dle: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cardiomyopathy.html>

Hypertrofie svaloviny levé komory srdeční je však poměrně častým jevem u řady srdečních onemocnění, jejichž příkladem mohou být některé srdeční chlopenní vady (typicky stenóza aortální chlopně) či systémová hypertenze. V těchto případech se však o hypertrofické kardiomyopatii nehovoří (STANĚK 2014, MARON et al. 1995, CHIEN et al. 2003).

Příčiny idiopatické hypertrofické kardiomyopatie jsou spojovány s mutací genů kódujících kontraktální proteiny myokardiálních sarkomer. Nejčastější mutace se vyskytují v genech kódujících těžký řetězec β -myosinu, myosin-vázací protein, troponin T a I, titin, α -tropomyosin, α -aktin a těžký řetězec α -myosinu. U pacientů trpících hypertrofickou kardiomyopatií byly popsány stovky mutací, z nichž nejčastější jsou záměnové (*missense*) mutace, avšak vyskytují se i delece a inserce. Zkrácené formy sarkoplazmatických proteinů vyskytujících se ve zvýšené míře u těchto pacientů mohou mít svůj původ v mutacích sekvencí využívaných k alternativnímu sestřihu genů kódujících tyto proteiny. U pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií se však vyskytuje množství mutací i v genech kódujících

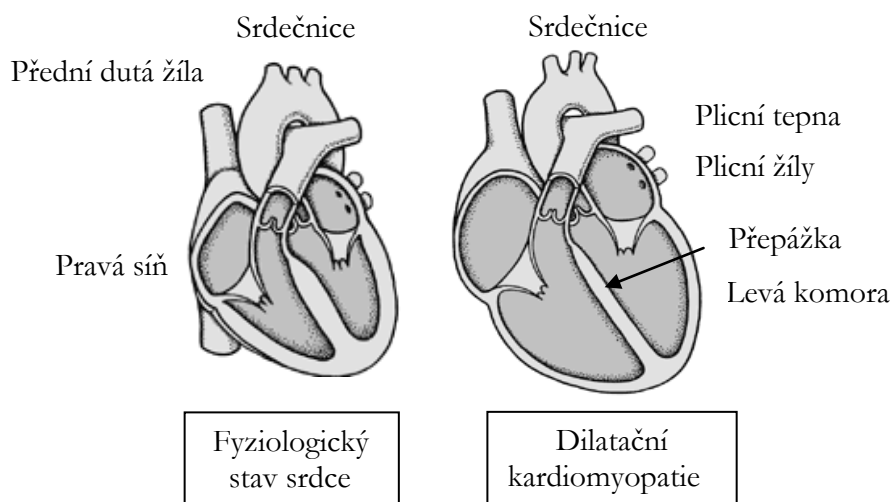
proteiny jiné než proteiny kontraktálního aparátu myokardiálních sarkomer. Příkladem mohou být mutace v genech odpovědných za depozici glykogenu, v genu kódujícím protein LAMP-2 (*lysosome-associated membrane protein 2*) a také genu γ_2 -regulační podjednotky AMP proteinkinázy (*PRKAG2*). Pozoruhodné je, že mutace v genu pro zmíněnou podjednotku jsou asociovány s různým stupněm levostranné hypertrofie (KELLY et al. 2009, ALCALAI et al. 2008, RICHARD et al. 2003, LAKDAWALA 2013).

Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie je založena na 2-dimensionální echokardiografii či magnetické rezonanci v klinickém kontextu nepřítomnosti jiného srdečního onemocnění, jež by vysvětlovalo hypertrofii stěny levé komory srdeční a zmenšení její dutiny. Obraz hypertrofické kardiomyopatie je poměrně častým nálezem u mnoha geneticky podmíněných a metabolických onemocnění. Ztlustění stěny levé srdeční komory mimikující typickou hypertrofickou kardiomyopatií způsobenou mutacemi sarkomerických proteinů se nicméně může vyskytovat bez zjevné příčiny, idiopaticky, což je nejvíce patrné u dětí do 4 let věku. Léčba hypertrofické kardiomyopatie zahrnuje vyloučení fyzické zátěže, z farmakoterapie pak aplikaci diuretik, β blokátorů, antiarytmik a periferních vasodilatancí, z nefarmakologické léčby implantací kardioverteru-defibrilátoru, chirurgické odstranění nadbytečné tkáně či perkutánní transluminální septální myokardiální alkoholickou ablací (THIENE et al. 2000, KEREN & POPP al. 1992, MARON et al. 2006, 2014, STANĚK 2014, CHIEN et al. 2003).

2. 2. 2. Dilatační kardiomyopatie

Ve srovnání s hypertrofickou kardiomyopatií, idiopatická dilatační kardiomyopatie představuje méně časté onemocnění myokardu, jehož prevalence se odhaduje na 1:2500 v Evropě a Severní Americe. Dilatační kardiomyopatie je onemocnění charakterizované progresivním rozšířením a zvětšením dutiny levé srdeční komory (často i pravé) aniž by současně došlo k zesílení stěny levé komory a jejíž příčinou není jiné srdeční či plicní onemocnění např. chlopenní vady, postižení koronárních tepen (ischemická choroba srdeční) a různé typy plicní hypertenze (MARON et al. 2006). Schématicky znázorněný rozdíl mezi zdravým srdcem a srdcem postiženým dilatační kardiomyopatií je na Obrázku č. 4.

Obrázek č. 4: Schématické zobrazení morfologických změn, charakterizované rozšířením srdečních oddílů a ztenčením srdeční stěny při dilatační kardiomyopatii oproti zdravému srdci



Upraveno dle: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cardiomyopathy.html>

Dilatace (a dysfunkce) pravé komory může být u pacientů přítomná, avšak není nutnou podmínkou pro splnění diagnostických kritérií v případě dilatační kardiomyopatie.

Dilatace levé srdeční komory způsobí poruchu její kontrakce, systolickou dysfunkci a difuzní poruchu srdeční kinetiky. Dilatační kardiomyopatii provází abnormality převodního systému srdečního vedoucí ke vzniku síňových a komorových arytmií. Charakteristickým nálezem u dilatační kardiomyopatie je nejen rozšíření srdečních dutin ale také chlopenních ústí. Poškození kontraktlní funkce srdce při tomto onemocnění vede v konečném důsledku k srdečnímu selhání. Poruchy funkce myokardu způsobené dilatační kardiomyopatií nabývají u některých nemocných takového stupně, ve kterém je jediným léčebným východiskem provedení transplantace srdce. Histologicky – zejména u familiární formy – je patrné zmnožení vaziva a zvýšená fibróza intersticia, hypertrofie některých kardiomyocytů či atrofie a zánik jiných. Mutace komponent myokontraktlního aparátu kardiomyocytů způsobí poruchu jejich funkce i změny tkáňové architektury, které společně s mechanismy kompenzujícími kontraktlní dysfunkci vedou k remodelaci levé srdeční komory. Dilatační kardiomyopatie se může klinicky manifestovat v různém období života, nejčastěji však ve třetí a čtvrté dekádě, nicméně může se vyskytnout i v dětském věku. Onemocnění je nejčastěji diagnostikováno na základě přítomnosti omezujících symptomů charakterizované stupnicí NYHA (NYHA klasifikace) – poklesem tělesné výkonnosti spojené s dušností (námahová dušnost a později i noční či klidová dušnost), únavou a nykturií (THIENE et al. 2000, ELLIOTT et al. 2008, JEFFERIES & TOWBIN 2010).

Dilatační kardiomyopatie je dle kontextu, ve kterém se vyskytuje, rozdělována na familiární (dědičnou) a nefamiliární (získanou). Dědičně podmíněná dilatační kardiomyopatie se vyskytuje přibližně u 20 – 48 % nemocných. Způsob dědičnosti dilatační kardiomyopatie může být rozdílný, tj. může být vázaný na X-chromozóm nebo autozomálně recesivní či dominantní, avšak pro autozomálně dominantní typ dědičnosti je charakteristická neúplná penetrance fenotypu. Příčiny vzniku dědičně podmíněné formy dilatační kardiomyopatie mohou být kumulace mutací v genech kódujících buněčné strukturální bílkoviny – dystrofin, emerin, sarkomerické proteiny, fosfolambam, kardiální α -aktin, troponin T, I a C, těžký řetězec β - a α -myosinu, myosin vázající protein C, proteiny Z-disku, titin, proteiny jaderného obalu (nejčastěji laminin A a C) a sarkomer, desmin, kalveolin a α - a β -sarkoglykan. Kromě mutací genů kódujících výše zmíněné strukturální buněčné proteiny může být dědičně podmíněná dilatační kardiomyopatie také způsobena mutacemi v proteinech dýchacího řetězce (KEREN & POPP al. 1992,

BURKETT & HERSHBERGER 2005, MARON et al. 2006, JEFFERIES & TOWBIN 2010).

Příčiny dilatace srdečních komor mohou být rozdílné a v mnoha případech idiopatické, avšak předpokládá se, že alespoň v jedné třetině případů je etiologie dilatační kardiomyopatie pravděpodobně způsobená autoimunitní reakcí provázenou výskytem autoprotilátek proti mnoha buněčným strukturám kardiomyocytů, z nichž nejznámější jsou muskarinové a adrenergní receptory β_1 a β_2 (LAPPÉ et al. 2008, MARON et al. 2006, DEUBNER et al., 2010).

V diagnostice dilatační kardiomyopatie je základní vyšetřovací metodou echokardiografie a její varianty (dvoudimenzionální, Dopplerovská, TDI - *Tissue Doppler Imaging*) avšak využívána je i počítačová tomografie (v kombinaci s koronarografií) a magnetická rezonance (JEFFERIES & TOWBIN 2010, ARBUSTINI et al. 2014).

V rámci terapie jsou u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií zaváděna režimová opatření: restrikce konzumace soli a tekutin, zákaz konzumace alkoholu a doporučení přiměřené pohybové aktivity. Farmakoterapie dilatační kardiomyopatie vychází ze standardní léčby srdečního selhání a zahrnuje podávání beta-blokátorů, antagonistů aldosteronu, diuretik, inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu či blokátorů receptoru pro angiotensin I. Nefarmakologická léčba využívá resynchronizační léčby či zavedení implantabilního kardioverter defibrilátoru v pokročilých stádiích onemocnění. Srdeční transplantace představuje zavedenou léčbu terminální fáze dilatační kardiomyopatie (HUNT et al. 2009, CHIEN et al. 2003).

2. 2. 3. Syndromy spojené s dilatací levé komory srdeční

Komplikovanost výběru pacientů do této studie dokumentuje skutečnost relativně častého nálezu dilatace levé srdeční komory u různých patologických stavů. Složitost a šíře tématu dilatační kardiomyopatie bohužel neumožňuje v této práci ani přibližný výčet příčin a stavů, které mohou vést ke vzniku dilatace levé srdeční komory. Poškození myokardu se znaky dilatační kardiomyopatie může být způsobeno zánětem myokardu, některými protinádorovými léčivy, abusem alkoholu i intoxikací. Dilatační kardiomyopatie může být

indukována hemochromatózou a některými onemocněními endokrinními a metabolickými (deficitem thiaminu). Symptomy dilatační kardiomyopatie se mohou objevit také v průběhu těhotenství.

2. 2. 3. 1. Alkoholem indukovaná dilatační kardiomyopatie

Široké spektrum příčin, jež mohou vést ke vzniku dilatace stěny levé srdeční komory, také dokumentuje vznik těchto změn pravidelnou a dlouhodobou konzumací alkoholu. Vztah mezi množstvím konzumovaného alkoholu a vznikem dilatační kardiomyopatie je závislý na dávce a délce konzumace, avšak tato závislost není v jednoduchém lineárním vztahu. Rozvoj dilatační kardiomyopatie následkem abusu alkoholu však předpokládá i podíl genetické dispozice a vliv pohlaví. Pro vznik alkoholem indukované dilatace levé srdeční komory mají vyšší predispozici muži dlouhodobě konzumující více než 90 g alkoholu denně. Zajímavý je vliv životosprávy na rozvoj této formy dilatační kardiomyopatie, neboť toxický vliv etanolu na rozvoj onemocnění bývá podpořen (či podmíněn) nutriční karencí. Počáteční stádium dilatační kardiomyopatie indukované alkoholem je charakterizované asymptomatickou dilatací levé srdeční komory bez přítomnosti kontraktilní dysfunkce levé komory. Progrese onemocnění se pak projevuje postupným nárůstem symptomů snížené systolické funkce levé komory, jež může vést až k srdečnímu selhání. Terapie alkoholem indukované dilatační kardiomyopatie vychází ze standardní léčby srdečního selhání a přísného dodržování abstinence alkoholu (PREEDY & RICHARDSON 1994, GUZZO-MERELLO et al. 2014).

2. 2. 3. 2. Dilatační kardiomyopatie u svalových dystrofií

Nález dilatační kardiomyopatie se současným postižením kosterních svalů je častý u některých pacientů trpících neuromuskulárními chorobami, jejichž příčinou jsou mutace genů kódujících dystrofin a emerin. Typickými představiteli těchto onemocnění jsou Duchenova svalová dystrofie (pro kterou je charakteristická mutace v dystrofinu) a svalová

dystrofie Bockerova a Emery-Dreyfussova (CHAOUCH et al. 2003, ROMFH & MCNALLY 2010).

2. 2. 3. 3. Těhotenská kardiomyopatie

Těhotenská kardiomyopatie představuje nefamiliární formu dilatační kardiomyopatie vznikající přibližně 1 měsíc před porodem a v průběhu 5 měsíců po porodu při současném vyloučení preexistujícího srdečního onemocnění a v nepřítomnosti jiné příčiny srdeční dysfunkce u pacientky. Navzdory tomu, že po porodu dochází k částečnému zlepšení nebo plné normalizaci stavu a funkce levé komory, případné následující těhotenství představuje zvýšené riziko vzniku této formy kardiomyopatie. Závažnost a význam těhotenské kardiomyopatie dokumentuje skutečnost, že pro 19 % postižených žen je toto onemocnění smrtelné (LEWEY & HAYTHE 2014).

2. 2. 3. 4. Dilatační kardiomyopatie vyvolaná intoxikací

Častým nežádoucím vedlejším účinkem mnoha chemoterapeutik a zvláště cytostatik je kardiotoxicita. Antracyklíny (doxorubicin, daunorubicin) způsobují v závislosti na své dávce a délce aplikace oxidativní poškození kardiomyocytů a jejich kumulativní ztrátu, která se může ve svém důsledku projevit sníženou systolickou funkcí levé komory vedoucí až k srdečnímu selhání. Dominantním nálezem histologického vyšetření tkáně srdečního svalu je ztráta myofibril. Chronické poškození srdečního svalu antracyklíny je ireverzibilní a může být fatální. Rizikovým faktorem pro rozvoj závažnějšího poškození srdce antracyklíny je předchozí radioterapie, zejména ozařování hrudníku. Kardiotoxický efekt podobné symptomatologie vyvolávají i taxany a cyklofosfamid, avšak také protilátka Trastuzumab. V neposlední řadě k symptomům dilatační kardiomyopatie může vést chronická intoxikace některými těžkými kovy, zejména rtuť (LUSHNIKOVA et al. 2004, KARMAKAR et al. 2012, LORSCHIEDER & VIMY 2000).

2. 2. 3. 5. Zánětlivá kardiomyopatie

Jedním z projevů avšak i předpokládaným iniciačním faktorem rozvoje autoimunitních onemocnění a s nimi související tvorbou autoprotilátek je chronický zánět, třebaže subklinický. Z tohoto důvodu bylo nutné brát na zřetel případný výskyt protilátek proti kalretikulínu u pacientů s dilatační kardiomyopatií, jejíž příčinou by bylo zánětlivé onemocnění myokardu nebo přítomnost konkomitantního imunologicky mediovaného onemocnění. Chronický zánět myokardu vyvolaný infekčními činiteli zahrnujícími viry (coxsackie virus, adenoviry, enteroviry, parvovirus B19, HHV-6, HIV), bakterie (borrelie, *Corynebacterium diphtheriae*), rickettsie či kvasinky může mít klinický i morfologický obraz dilatační kardiomyopatie. Parazitární invaze prvokem *Trypanosoma cruzi* způsobujícím Chagasovu kardiomyopatii má také podobné projevy jako dilatační kardiomyopatie. V diagnostice zánětlivé kardiomyopatie se kromě elektrokardiografie, echokardiografie, počítačové tomografie, magnetické rezonance, selektivní koronarografie a angiografie srdce využívá také endokardiální biopsie, která je považována za nejvíce specifickou. Histologická analýza vzorku srdeční biopsie odhaluje známky zánětu, ve kterém však již nemusí být přítomna infekce. Léčba zánětlivé kardiomyopatie se opírá o konvenční postupy terapie srdečního selhání, avšak oproti zavedeným léčebným postupům užívaných u dilatační kardiomyopatie se v případě terapie zánětlivé kardiomyopatie využívá také prostředků imunosuprese (kortikoidů, azathioprin) a imunomodulace (β -interferon). Aplikace kortikosteroidů a azathioprinu u pacientů se zánětlivou kardiomyopatií vedla ke zlepšení ejekční funkce levé komory, snížení enddiastolického rozměru levé komory a potlačení zánětu. Podávání β -interferonu vedlo u pacientů se zánětlivou kardiomyopatií ke zlepšení jejich zdravotního stavu hodnoceného sníženým stupněm v NYHA klasifikaci a eliminovalo virovou nálož (WOJNICZ et al. 2001, FRUSTACI et al. 2009, GUTBERLET et al. 2008, SCHULTHEISS et al. 2011).

2. 2. 3. 6. Symptomy dilatační kardiomyopatie u autoimunitních onemocnění

Koncepcí této studie bylo zanalyzovat u pacientů diagnostikovaných jako dilatační kardiomyopatie a u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií přítomnost protilátek proti kalretikulinu – molekuly esenciální v organogenezi a funkci srdce, avšak pravděpodobně se účastní také v patogenezi některých srdečních chorob. Kalretikulin je také potenciálním autoantigenem a protilátky proti kalretikulinu se vyskytují i v sérech některých pacientů s autoimunitními a imunologicky mediovanými onemocněními. Rovněž dilatační kardiomyopatie je výrazně spojena s autoimunitními chorobami. Symptomy dilatační kardiomyopatie se mohou sekundárně objevit zejména u diabetes mellitus I. typu, autoimunitních onemocnění štítné žlázy, psoriázy a vaskulitid. Naopak všechny tyto zmíněné choroby jsou ve zvýšené míře nalézány u pacientů s dilatační kardiomyopatií. Familiární predispozice k autoimunitním či imunologicky mediováným onemocněním je proto považována za rizikový faktor pro vznik dilatační kardiomyopatie (LIMAS et al. 2004, SEEMANN et al. 2012).

2. 3. KALRETIKULIN A SRDEČNÍ SVAL

Kalretikulin je hlavní Ca^{2+} vázající protein v lumen endoplazmatického/sarkoplazmatického retikula a molekulární chaperon, který se podílí na vytvoření konečné konformace nascentních proteinů a glykoproteinů. Kromě toho má však kalretikulin pravděpodobně zásadní úlohu v ontogenetickém vývoji srdce a patogenezi kongenitálního srdečního bloku (MICHALAK et al. 1999, SAITO et al. 1999, ELLGAARD et al. 1999, MICHALAK et al. 2002). Exprese genu pro kalretikulin je ovlivněna řadou transkripčních faktorů, které se účastní vývoje srdce (Nkx2.5, myocardin, myocyte enhancer factor 2C, GATA6). *Vice versa*, kalretikulin prostřednictvím ovlivňování vápníkové hladiny v cytoplazmě působí na signalizační kaskádu mezi endoplazmatickým retikulem a buněčným jádrem, jejíž komponentami jsou kalmodulin a kalcineurin aktivující transkripční faktor *myocyte enhancer factor 2C* (MEF2C). Asociace kalmodulinu a kalcineurinu je závislá na zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytoplazmě, kterou ovlivňuje právě kalretikulin. Kalretikulin dependentní kalmodulin/kalcineurin aktivace transkripčního faktoru MEF2C,

2. 3. 1. Kalretikulin při vývoji srdce

Transgenní myši s absencí či deficitem kalretikulinu umírají v důsledku nedostatečného vývoje srdce navzdory tomu, že je kalretikulin pouze minoritní komponenta jejich kardiomyocytů (MILNER et al. 1991, THARIN et al. 1992, IMANAKA-YOSHIDA et al. 1996, TSUTSUI et al. 1997). Exprese kalretikulinu je však velmi intenzivní ve vyvíjejícím se srdci. Studie provedené na buňkách deficitních pro kalretikulin prokázaly defekt uvolňování vápníku, který byl způsoben ztrátou schopnosti bradykininového receptoru vázat s vysokou afinitou svůj ligand (MESAELI et al. 1999, NAKAMURA et al. 2001b). Zajímavé je, že rozvoji malformací srdce, vedoucích k embryonální letalitě pozorované u transgenních kalretikulin-deficitních myší, zabránilo zvýšené množství kalcineurinu v kardiomyocytech. Kalcineurin – molekulární homolog kalretikulinu, který je oproti solubilnímu kalretikulinu integrální protein membrany endoplazmatického retikula, patří do skupiny serin/threonin fosfatáz a představuje komponentu mnoha kanonických signalizačních drah (ARAMBURU et al. 2000, RUSNAK & MERTZ 2000, CRABTREE 2001, GUO et al. 2002).

2. 3. 2. Kalretikulin v patogenezi srdečního bloku

Vysoká exprese kalretikulinu v kardiomyocytech je nutná pro správný vývoj embrya, avšak snížení množství kalretikulinu v kardiomyocytech postnatálně je nezbytné pro funkci srdce. Na tuto skutečnost poprvé upozornili GUO et al. (2001), kteří prokázali prudké postnatální snížení množství intracelulárního kalretikulinu v kardiomyocytech. Experimentální model využívající transgenní myši s konstitutivně zvýšenou expresí kalretikulinu v kardiomyocytech prokázal u těchto myší bradykardii asociovanou s dysfunkcí sinoatriálního uzlu a atrioventrikulárním blokem, v jehož důsledku zvířata umírají na neodvratné srdeční selhání. Elektrokardiogram u myší s postnatální nadprodukcí kalretikulinu v kardiomyocytech vykazuje významně prodlouženou periodu od počátku síňové depolarizace do začátku depolarizace komorové, tedy funkční poškození převodního systému srdečního (NAKAMURA et al. 2001a). V souvislosti se šířením

srdečního signálu se nabízí úvaha o kalretikulinu jako stabilní komponentě mezibuněčných spojení označovaných jako *gap junctions*, které jsou odpovědné za komunikaci mezi buňkami (GROS & JONGSMA 1996, KARDAMI & DOBLE 1998). Fenotyp transgenních myší s nadprodukcí kalretikulinu je podobný projevu kongenitálního srdečního bloku u dětí (NAKAMURA et al. 2001a, MICHAELSSON et al. 1997, MOAK et al. 2001).

2. 3. 3. Kalretikulin – struktura a vlastnosti

Fluktuace koncentrace Ca^{2+} v endoplazmatickém retikulu ovlivňuje schopnost chaperonů zprostředkovat získání konečné přirozené konformace mnoha nascentních proteinů a glykoproteinů. Endoplazmatické retikulum představuje rezervoár Ca^{2+} ionů, z nichž většina je vázána k jeho rezidentním proteinům, zatímco se zbylý, volný Ca^{2+} podílí na mnoha buněčných dějích včetně signalizace a adheze (BOOTH & KOCH 1989, LODISH & KONG 1990, LODISH et al. 1992, MELDOLESI & POZZAN 1998, CORBETT & MICHALAK 2000).

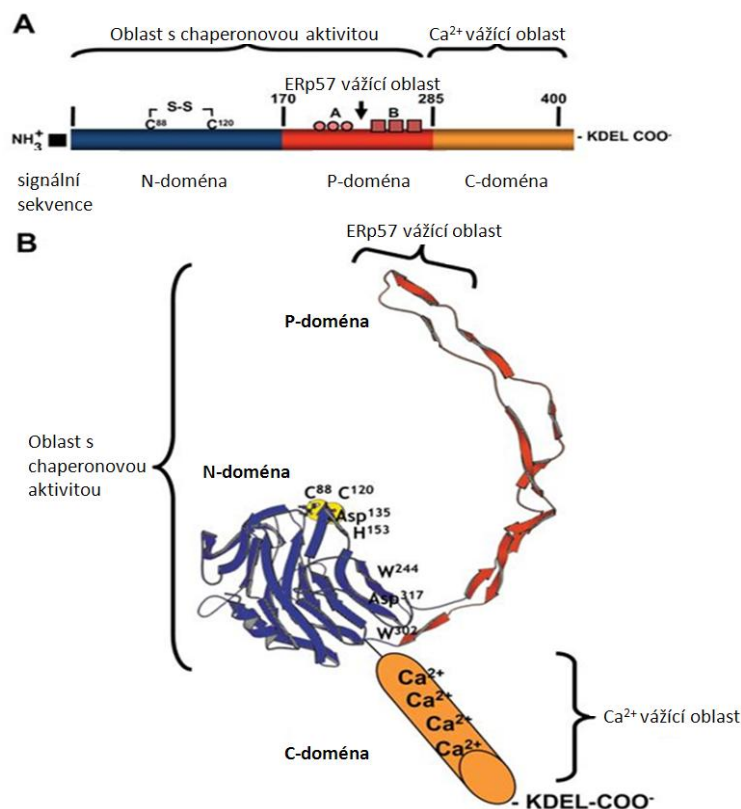
Kalretikulin je solubilní protein, jehož nejčastější molekulová hmotnost je 46 kDa, který však pro svůj izoelektrický bod ve výrazně kyselém pH (pI 4,65) migruje v polyakrylamidové elektroforéze s dodecyl sulfátem sodným (SDS-PAGE) jako molekula o hmotnosti 60 – 64 kDa. Ze širokého spektra možných biologických aktivit kalretikulinu zůstává jeho hlavní funkcí vazba a skladování Ca^{2+} ionů, asistence při konečném prostorového uspořádání nascentních (glyko)proteinů a kontrola kvality tohoto uspořádání v endoplazmatickém retikulu. Kalretikulin je schopný vázat jak posttranslačně nemodifikované polypeptidy tak monoglykosylované glykoproteiny s N-glykosidicky připojenými oligosacharidy (MICHALAK et al. 1999).

Prostorový model kalretikulinu byl zprvu odvozen z krystalové struktury blízkce příbuzného proteinu kalnexinu, který však není solubilní a je integrálním proteinem membrány endoplazmatického retikula. Arbitrárně bývá molekula kalretikulinu rozdělena na 3 funkčně odlišné domény (N, P, C). N terminální doména zahrnuje prvních 180 aminokyselin a je podobně jako N terminální doména kalnexinu tvořena antiparalelními β -listy (SCHRAG et al. 2001). N terminální úsek kalretikulinu zahrnuje domény N a P, které se uplatňují v chaperonové funkci, avšak kromě vazby chybně či nedostatečně

uspořádaných proteinů a glykoproteinů váže ATP, iony Zn^{2+} a malé množství Ca^{2+} . Iony Ca^{2+} váže N terminální úsek s vysokou afinitou (SAITO et al. 1999, FRICKEL et al. 2002, NAKAMURA et al. 2001b, KHANNA et al. 1986, BAKSH & MICHALAK 1991, BAKSH et al. 1995, OU et al. 1995, CORBETT et al. 1999, 2000). P doména, jejíž označení je odvozeno od vysokého zastoupení prolinu, se rozkládá mezi peptidy 181 – 290. C doména charakterizovaná vysokým obsahem glutamové kyseliny tvoří zbytek aminokyselinové sekvence kalretikulinu: 291 – 400. V této doméně je lokalizováno nízkoafinitní avšak vysokokapacitní Ca^{2+} vázající místo, díky němuž se kalretikulin účastní skladování tohoto ionu v lumen endoplazmatického retikula (NAKAMURA et al. 2001b). *In vitro* studie prokázaly schopnost C domény kalretikulinu vázat neglykosylované polypeptidy s defektní konformací a potlačovat ireverzibilní agregaci. Tato aktivita C domény je stimulována v případě buněčného stresu vyvolaného deplecí Ca^{2+} či tepelným šokem, který současně způsobí oligomerizaci kalretikulinu. C doména kalretikulinu by podle některých pramenů měla obsahovat sekvenci retenčního signálu KDEL umožňující návrat kalretikulinu z Golgiho aparátu retrográdním transportem do endoplazmatického retikula (CAPITANI & SALLESE, 2009, HUANG et al. 2013).

Stericky tvoří kalretikulin velká globulární doména, ve které je část helikální C-terminální domény vmezeřena mezi 2 β -listy tvořené částí N-terminálního úseku (Obrázek č. 6). Uvnitř této domény se nachází místo vázající N-glykosidicky spojené glykoproteiny. Globulární P doména kalretikulinu – podobně jako P doména kalnexinu – vybíhá v prodloužený, mírně zakřivený úsek tvořený vlásenkovou strukturou, která je vložena do středu velké globulární domény, kde se dostává do kontaktu s N doménou. P doména kalretikulinu je místem kontaktu s jinými chaperony. Vrchol P domény tvoří vazebné místo pro ERp57 (SCHRAG et al. 2001, FRICKEL et al. 2002, ELLGAARD et al. 2001).

Obrázek č. 6: Schématické znázornění funkčního rozdělení molekuly kalretikulinu do domén (A) a prostorový – páskový model kalretikulinu zohledňující terciální strukturu molekuly (B)



Upraveno dle: Michalak et al., Biochem. J. 2009; 417: 651 – 666.

2. 3. 4. Biologické funkce kalretikulinu

Kalretikulin se vyznačuje širokým spektrem biologických aktivit, z nichž nejprostudovanější jsou modulační buněčné Ca²⁺ homeostázy, chaperonová aktivita, regulace genové exprese, buněčné adheze i jaderného transportu, regulace přirozené imunity vazbou na C1q a CD91 i indukce protinádorové imunity (NAKAMURA et al. 2001b, HELENIUS et al. 1997, OPAS et al. 1996, BASU et al. 2001, KOVACS et al. 1998, FADEL et al. 1999, LIU et al. 1994, BASTIANUTTO et al. 1995, CAMACHO et al. 1995, MERY et al. 1996, JOHN et al. 1998, FASOLATO et al. 1998, RODERICK et al. 2000,

XU et al. 2000, HOLASKA et al. 2001, VANDIVIER et al. 2002, ZITVOGEL et al. 2010).

Chaperonová aktivita kalretikulinu se účastní jak na konečném prostorovém uspořádání MHC I tak i na procesu vkládání glykopeptidů do MHC I. Interakce kalretikulinu s MHC I se uplatňuje nejen v endoplazmatickém retikulu ale i na plazmatické membráně, zejména u aktivovaných (ovšem i klidových) T buněk a to jak CD8⁺ tak i CD4⁺, u nichž je kalretikulin asociován se samotným alfa-řetězcem MHC I (AROSA et al. 1999). Schopnost interakce kalretikulinu s ERp57, tapasinem a glykany je důležitá pro účast kalretikulinu v komplexu vkládajícího peptidy do MHC I (*peptide loading complex*) a pro stabilizaci interakce tapasinu a těžkého řetězce MHC I (DEL CID et al. 2010). V tomto komplexu kalretikulin spolu s ERp57, tapasinem a transportéry cytoplazmatických peptidů do endoplazmatického retikula kontroluje a koriguje prostorové uspořádání komplexu MHC I s peptidem. Buňky s nefunkčním kalretikulinem nebo jeho narušenou biosyntézou exprimují na svém povrchu nižší množství molekul MHC I. Kalretikulin asistující (v rámci *peptide loading complex*) při vkládání glykopeptidů do MHC I využívá převážně glykanové interakce, ačkoliv pro tento proces nejsou nezbytné a neumožňují stabilní vazbu kalretikulinu k substrátu (IRELAND et al. 2008, ZHANG et al. 2009). V komplexu molekul vkládajících peptid do MHC I je přítomnost kalretikulinu zajišťována kooperativním efektem jeho vazeb se sacharidem peptidu a současně s ERp57 prostřednictvím C terminální, kyselé domény. Interakce kalretikulinu a ERp57 umožňuje stabilnější vazbu kalretikulinu ke glykoproteinům v prooxidačním prostředí. Kalretikulin je schopen interagovat s molekulou MHC I také způsobem nezávislým na vazbě sacharidu v podmínkách buněčného stresu (RIZVI et al. 2004).

2. 3. 5. Kalretikulin jako autoantigen

Antigenicita kalretikulinu je doposud nejčastěji spojována se vznikem autoprotilátek detekovatelných v séru části pacientů s některými autoimunitními, onkologickými a parazitárními onemocněními. Výskyt protilátek proti kalretikulinu izotypu IgG a IgM byl v minulosti popsán u některých pacientů se systémovým lupus erythematoses,

kongenitálním srdečním blokem a u pacientů invadovaných parazity *Schistosoma mansoni*, *Onchocerca volvulus* a *Trypanosoma cruzi* (ORTH et al. 1996, KISHORE et al. 1997, ROKEACH et al. 1994, ROUTSIAS et al. 1993, CHENG et al. 1996, LUX et al. 1992, MARCELAIN et al. 2000, EL ASWAD BEL et al. 2011).

Na našem pracovišti byla identifikována molekula kalretikulinu jako jedna z několika molekul enterocytárního lyzátu, které byly rozpoznávány afinitně izolovanými antigliadinovými protilátkami pacientů s aktivní celiakií i myšimi monoklonálními antigliadinovými protilátkami (KARSKÁ et al. 1995, TUČKOVÁ et al. 1995, 1997). Následné studie, pro které jsme vyvinuli ELISA test, využívaly jako antigen fúzní protein rekombinantního králíčího kalretikulinu s fragmentem glutathion-S-transferázy a lidského rekombinantního kalretikulinu doplněného o šest histidinových zbytků na jeho C konci. V testu byl použit interní standard představující směs reálných lidských sér pacientů s různým stupněm séropozitivity na protilátky proti kalretikulinu. Těmito testy jsme prokázali u pacientů s aktivní celiakií pocházejících z Velké Británie séropozitivitu na protilátky proti kalretikulinu ve třídě IgA a IgG (SÁNCHEZ et al. 2000) a u pacientů pocházejících z Nizozemí, kteří trpěli nejzávažnější formou celiakie – refrakterní celiakií (u některých konkomitantní s T-buněčným lymfomem), séropozitivitu na antikalretikulinové protilátky ve třídě IgA protilátek (SÁNCHEZ et al. 2008). Obě skupiny pacientů vykazovaly vysoký stupeň alterace sliznice tenkého střeva ohodnocený jako MARSH IIIA – C a MARSH IV. Celiakální pacienti byli séropozitivní pro charakteristické znaky onemocnění – IgA a IgG protilátky proti vyvolávajícímu agens celiakie gliadinu a IgA a IgG autoprotiilátky proti tkáňové transglutamináze a endomyzium. U pacientů s refrakterní celiakií, u kterých přetrvává poškození střevní sliznice navzdory striktnímu dodržování bezlepkové diety, však mizí typické sérologické znaky celiakie – protilátky proti gliadinu a ve většině případů i protilátky proti tkáňové transglutaminase a endomyzium (SÁNCHEZ et al. 2008, KOSKINEN et al. 2010).

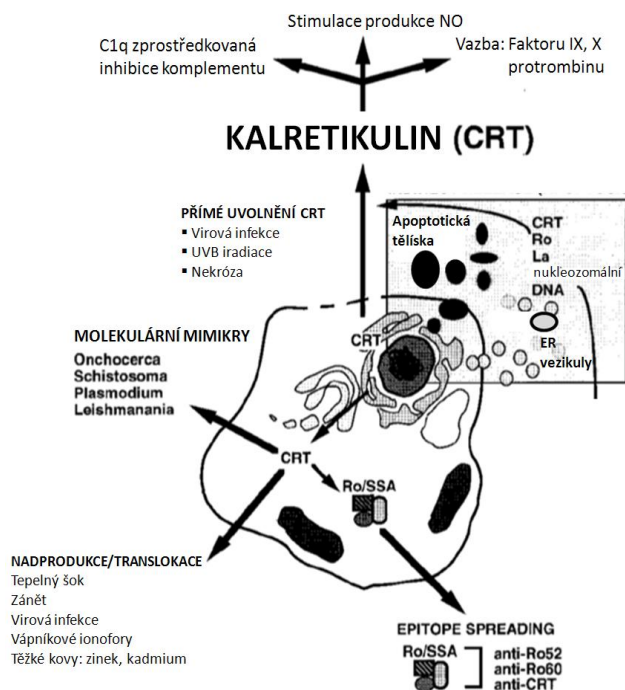
KREISEL et al. (1999) ve studii, využívající izolovaný lidský jaterní kalretikulin a kombinaci elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného (SDS-PAGE) a imunoblotu pro detekci antikalretikulinových protilátek, našli zvýšený výskyt těchto protilátek v sérech pacientů s primární biliární cirhózou. V rámci následné spolupráce s Prof. Kreiselem z Freiburgu jsme obdrželi originální soubor pacientů s primární biliární cirhózou, autoimunitní hepatitidou typu I a alkoholickou cirhózou, který

byl použit ve zmíněné studii. Kvantifikace hladin protilátek proti kalretikulinu byla provedena využitím obou forem rekombinantního kalretikulinu: fúzního kalretikulinu králičího s nekompletní molekulou glutathion-S-transferázy a lidského rekombinantního kalretikulinu s šesti molekulami histidinu na C konci. Reaktivita patientských protilátek proti oběma antigenům byla analogická. Oproti výsledkům studie vedené Prof. Kreiselem jsme našli nejvyšší výskyt – odpovídající přibližně polovině testovaných pacientů – u alkoholické cirhózy a autoimunitní hepatitidy typu I. Počet séropozitivních pacientů s primární biliární cirhózou byl v naší studii nižší (SÁNCHEZ et al. 2003). Ve skupině nově diagnostikovaných pacientů s hepatocelulárním karcinomem, adenokarcinomem pankreatu a kolorektálním adenokarcinomem jsme našli přibližně u jedné třetiny zvýšené hladiny protilátek proti kalretikulinu (PEKÁRIKOVÁ et al. 2010).

Chagasova choroba, parazitóza způsobená *Trypanosoma cruzi*, má ve své chronické fázi přibližně v třetině případů projevy kardiomyopatie (Chagasova kardiomyopatie). Předpokládá se, že právě imunitní reakce proti tomuto parazitu může iniciovat rozvoj Chagasovy kardiomyopatie, ve které se pravděpodobně uplatňuje poškozující autoimunitní reakce. Srdeční léze při Chagasově kardiomyopatii vykazují predominantní infiltraci T_H1 populace buněk (CUNHA-NETO & CHEVILLARD 2014). Experimentální důkaz na zvířecím modelu o možném příspěvku imunitního systému a zejména imunologické reaktivity proti kalretikulinu v rozvoji Chagasovy kardiomyopatie podala skupina Prof. Ferreiry z Chile. Imunizace zvířat rekombinantním kalretikulinem, a to jak kalretikulinem trypanozómy tak kalretikulinem lidským, vede u imunizovaných zvířat k rozvoji antikalretikulinových protilátek a k poškození srdce zahrnující edém, histologické změny a infiltraci imunocytů, z nichž dominovaly CD3+ T lymfocyty. Antikalretikulinové protilátky vytvořené jak imunizací lidským kalretikulinem tak kalretikulinem trypanozómy rozpoznávaly povrchové struktury kardiomyocytů *in vitro*. Současně byla u zvířat popsána křížová reaktivita protilátek mezi kalretikulinem lidským a kalretikulinem trypanozómy (RIBEIRO et al. 2009).

Důvody vzniku imunologické reaktivity proti kalretikulinu u onemocnění nejsou objasněny. Pravděpodobnou podmínkou vzniku autoimunitní reakce proti kalretikulinu je však uvolnění kalretikulinu do extracelulárního prostoru, jehož některé příčiny shrnuje doposud platné schéma na Obrázku č. 7 (EGGLETTON & LLEWELLYN 1999).

Obrázek č. 7: Příčina vzniku autoimunitní reakce proti kalretikulinu vychází z představy masivního uvolňování kalretikulinu (CRT) z buňky do extracelulárního prostoru při poškození



Upraveno dle: Eggleton & Llewellyn, Scand. J. 1999; 49: 466 – 473.

Kontakt kalretikulinu s mimobuněčným prostředím vzniká nejen při nekrotické smrti nebo buněčné lýze, avšak kalretikulin může být také translokován na buněčný povrch následkem virové infekce, chronické stimulace, metabolickými změnami i alteracemi způsobenými ozářením. Indukce autoimunitní reakce proti kalretikulinu může předcházet imunologické odpovědi na exogenní antigen vykazující strukturální či sekvenční podobnost – molekulární mimikry. Jinou možností je rozšíření imunologické reaktivity na kalretikulin při imunitní reakci proti molekule, se kterou je ve fyzické asociaci – *antigene spreading* (EGGLETON & LLEWELLYN 1999). K úvaze o uplatnění mechanismu *antigene spreading* při vzniku antikalretikulinových protilátek u pacientů s aktivní celiakií vybízí průkaz fyzické interakce kalretikulinu s tkáňovou transglutaminázou, která je hlavním autoantigenem u tohoto onemocnění (FENG et al. 1999).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. ZÁKLADNÍ ROZTOKY

- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS), pH 7,4 (1 L): NaCl 9 g, NaH₂PO₄·H₂O 0,2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 1,2 g doplněno destilovanou (dest.) H₂O do 1 L
- Citrátový pufr, pH 4,2: 2,94 g citronanu sodného neutrálního na 100 ml dest. H₂O, pH upraveno 0,1 M kyselinou citrónovou
- Roztok chromogenního indikátoru: citrátový pufr 10 ml, 7 mg ortofenylendiamin, 7 ml H₂O₂ těsně před aplikací
- 10% sodiumdodecylsulfát sodný (SDS): 10 g SDS, 100 ml dest. H₂O
- Tris pufr pH 8,8: 18,15 g Tris, 60 ml dest. H₂O, úprava pH HCl, doplnění do 100 ml dest. H₂O
- Tris pufr pH 8: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 6,1 g Tris do 1 L H₂O
- Tris pufr pH 6,8: 6 g Tris, 60 ml dest. H₂O, úprava pH HCl, doplnění do 100 ml dest. H₂O
- Elektródový pufr: 1 g SDS, 5 g Tris, 14,4 g glycinu, 1 L dest. H₂O
- 10% roztok aminopersíranu sodného (APS): 0,1 g APS, 1 ml dest. H₂O
- Coomassie brilliant blue 0,2% roztok: 1 g Coomassie brilliant blue, 250 ml methanol, 50 ml koncentrovaná kyselina octová, 200 ml dest. H₂O
- Odbarvovací roztok: 40 ml methanol, 10 ml konc. kys. octová, 50 ml dest. H₂O
- Sušící roztok (25% methanol; 5% glycerol)
- Vzorkový pufr: 0,5 ml Tris pufr (pH 6,8), 10% SDS, 20% glycerol, 5% β- merkaptoethanol, 0,01% bromfenolová modř
- Blotovací pufr: 3 g Tris, 14,4 g glycin, 200 ml methanol, doplnit do 1 L dest. H₂O

3. 2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, REAGENCIE A PROTILÁTKY

akrylamid-bisakrylamid (Bio-Rad, USA)
bromfenolová modř (Lachema n.p., Brno, ČR)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, SRN)
dodecylsulfát sodný (SDS; Serva, SRN)
ethanol (Merck, SRN)
glycerol (Lachema, ČR)
glycin (Serva, SRN)
kyselina chlorovodíková (HCl; Lachema, ČR)
 β -merkapt ethanol (Serva, SRN)
methanol (Lach-Ner, ČR)
mléko sušené (ARTIFEX Instant s.r.o., ČR)
peroxid vodíku (Chemapol, ČR)
elektroforetický standard molekulových hmotností (Prestained SDS-PAGE Standards, BioRad, USA)
tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; Serva, SRN)
Tween 20 (Serva, SRN)
konjugáty křenuvé peroxidázy s protilátkami proti lidským imunoglobulinům: Sheep Anti-Human IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 peroxidase conjugate; (The Binding Site, UK)
Anti-Human IgA1, IgA2 (LSBio, USA)
myší sérum, ovčí sérum (Sigma-Aldrich, USA)
bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
kalretikulín (Apronex s.r.o. ČR)
SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)
souprava Human Calreticulin (CRT) Elisa kit (BlueGene, Čína)

3. 3. PŘÍSTROJE A MATERIÁLY

blotovací jednotka Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad, USA)

centrifuga EBA 12 (Hettich Zentrifugen, SRN)

centrifuga Jouan BR4i (Jouan, S.A., Francie)

elektroforetická jednotka Mini-PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad, USA)

lékařské rentgenové filmy (MXB Film, Kodak, USA)

spektrofotometr Titertek Multiscan[®] MCC/340 ELISA Reader (Eflab, Finsko)

vyvolávačka filmů – Optimax (Fomei, Rumunsko)

zdroj elektrického proudu PowerPack[™] Universal Power Supply (Bio-Rad, USA)

nitrocellulose membrane NC2 (Serva, SRN)

membrána Pepscan (ABIMED Analysen-Technik, SRN)

3. 4. PACIENTSKÁ A KONTROLNÍ SÉRA

Pacientská a kontrolní séra byla získána z Fakultní nemocnice Královské Vinohrady na základě spolupráce s panem Prof. MUDr. Pavlem Gregorem, DrSc., MUDr. Karolem Čurilou, Ph.D. a paní MUDr. Ivou Hoffmanovou, Ph.D. Pro testování antikalretikulinových protilátek a analýzu antigenických epitopů kalretikulinu rozpoznávaných těmito protilátkami byla v této studii zvolena séra 34 dospělých pacientů diagnostikovaných jako idiopatická dilatační kardiomyopatie, 38 dospělých pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a 79 krevních dárců (46 mužů, 33 žen, průměrný věk 31,3, věkový rozsah 21 – 75 let). Obě kardiomyopatie byly diagnostikovány na základě echokardiografického vyšetření. Diagnóza dilatační kardiomyopatie byla stanovena na základě nálezu dilatace a systolické dysfunkce levé srdeční komory (ejekční frakce < 0,45) při současném vyloučení ostatních příčin systolické dysfunkce (hypertenze, chlopenní vady, a onemocnění koronárních tepen) (ELLIOTT et al. 2008). Hypertrofická kardiomyopatie byla diagnostikována na základě přítomnosti ztlustění (≥ 15 mm) stěny jednoho či více segmentů levé srdeční komory a při současném vyloučení jiných známých příčin ztlustění srdeční srdeční komory (amyloidóza, poruchy ukládání glykogenu) (ELLIOTT et al. 2014).

Séra krevních dárců byla testována na přítomnost základních sérologických znaků infekčních a autoimunitních onemocnění (autoimunitní tyreoiditida, diabetes mellitus I. typu, celiakie; protilátky proti lidskému thyreoglobulinu, thyreoidální peroxidáze, ostrůvkovému antigenu 2, dekarboxyláze kyseliny glutamové, tkáňové transglutamináze, endomyziu) a byly stanoveny celkové hladiny jednotlivých izotypů protilátek. Krevní dárci s nefyziologickými hodnotami sérologických znaků byli ze studie vyloučeni. Pacientské vzorky představují zbytky sér určených k biochemickým analýzám v rámci rutinního diagnostického algoritmu. Testování antikalretikulinových protilátek bylo schváleno etickou komisí. Tabulka č. 1 shrnuje základní demografická a klinická (pathofyziologická a pathoanatomická) data pacientů zařazených do studie.

Tabulka č. 1: Základní demografická a klinická data pacientů v testovaných skupinách

Diagnóza	Charakteristika	Hodnoty
DCM	Počet pacientů	34
	Věk: rozmezí, průměr	41 – 91 let, 56 let
	Muži/ženy	23 (68 %)/11 (32 %)
	NYHA I – II	18 (53 %)
	NYHA III – IV	16 (47 %)
	Kardiostimulátor	4 (12 %)
	ICD	22 (65 %)
	LVEF: rozmezí, průměr	15 – 40 %, 30 %
	LVEDD: rozmezí, průměr	50 – 85 mm, 71 mm
	LA: rozmezí, průměr	38 – 60 mm, 51 mm
HCM	Počet pacientů	38
	Věk: rozmezí, průměr	36 – 84 let, 49 let
	Muži/ženy	26 (68 %)/12 (32 %)
	NYHA I – II	32 (84 %)
	NYHA III – IV	6 (16 %)
	Kardiostimulátor	4 (11 %)
	ICD	8 (21 %)
	LVEF: rozmezí, průměr	60 – 75 %, 70 %
	LVOTO	3 (8 %)
	MLVWT: rozmezí, průměr	15 – 29 mm, 23 mm
	LA: rozmezí, průměr	29 – 63 mm, 40 mm

DCM, dilatační kardiomyopatie; HCM, hypertrofická kardiomyopatie; NYHA, funkční klasifikace srdečního selhání dle NYHA (the New York Heart Association); ICD, implantabilní kardioverter–defibrilátor; LVEF, ejekční frakce levé srdeční komory; LVEDD, end–diastolický průměr levé srdeční komory (průměr levé srdeční komory na konci diastoly); LA, průměr levé síně; LVOTO, obstrukce výtokového traktu levé srdeční komory (gradient > 30 mm Hg); MLVWT, maximální síla stěny levé srdeční komory

Pacienti byli konvenčně léčeni v závislosti na klinické symptomatologii beta-blokátory (metoprolol 50-100 mg/den), diuretiky (furosemid 40-120 mg/den nebo spironolacton 50-200 mg/den), inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (perindopril 5-10 mg/den či ramipril 2,5-10 mg/den), antiarytmiky (amiodaron, 200 mg/den), kyselinou

acetylsalicylovou (100 mg/den) a antikoagulancii (warfarin 3-10 mg/den nebo rivaroxaban 10 mg/den).

Získaná séra byla rozdělena do objemů umožňujících simultánní stanovení všech protilátkových izotypů a subtypů antikalkretikulinových protilátek, analýzu antigenních epitopů kalretikulinu i stanovení koncentrace sérového kalretikulinu a skladována v uzavíratelných plastových mikrozkuvkách (Eppendorf AG, Spolková republika Německo) při -20 °C.

3. 5. ELISA TEST SÉROVÝCH ANTIKALRETIKULINOVÝCH PROTILÁTEK

Lidský rekombinantní kalretikulín, který je v této diplomové práci využíván jako antigen v ELISA testech a imunoblotu, byl připraven na základě společných projektů a dlouhodobé spolupráce s firmou Apronex s.r.o. jako fúzní protein s 6 histidiny na C konci. ELISA test pro stanovení sérových hladin IgA a IgG protilátek byl vyvinut a modifikován naší laboratoří (KARSKÁ et al. 1995, TUČKOVÁ et al. 1995, 1997, SÁNCHEZ et al., 2000, 2003). Lidský rekombinantní kalretikulín naředěný ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS, 50 µg/ml) byl v množství 100 µl nanesen do jamek mikrotitrační nízkosorpční 96-jamkové destičky (Gama, České Budějovice, Česká Republika) a inkubován přes noc při 4 °C. Druhý den byl obsah jamek aspirován a místa neobsazená kalretikulínem byla vysycena bovinním sérovým albuminem (naředěným v PBS na 1% roztok a v množství 100 µl aplikovaným na jamku) při 2 hod. inkubaci za laboratorní teploty. Po odstranění roztoku BSA z jamek mikrotitrační destičky a promytí roztoky PBS a 0,1% roztokem Tween 20 v PBS (PBS-T) byl kalretikulín inkubován s lidskými séry naředěnými v blokačním roztoku. Séra byla ředěna 1:20 a 1:100 v případě testování sérových hladin IgA a 1:100 a 1:500 v případě testování IgG antikalkretikulinových protilátek. Naředěná séra a standard byly nanесeny do jamek mikrotitrační destičky, která byla ponechána přes noc při 4 °C. Druhý den byly destičky opakovaně promyty PBS a PBS-T a do jamek byly nanесeny naředěné detekční protilátky (konjugáty křenové peroxidázy s ovčími protilátkami proti lidským IgA a IgG protilátkám). Detekční protilátky

byly naředěny v 10% ovčím séru 1/750 a inkubovány při laboratorní teplotě 1 hod. Po tomto kroku byla destička promyta PBS a PBS-T a nanesen chromogenní indikátorový roztok. Barevná reakce byla zastavena po 10 min. 2 M H₂SO₄. Optická denzita vzorku byla bezprostředně měřena při vlnové délce 492 nm spektrofotometrem. V případě testování hladin celkových IgG a IgA protilátek proti kalretikulínu se využívalo interního referenčního séra (standardu) představujícího směs různě séropozitivních vzorků pacientů s autoimunitními a onkologickými chorobami, u kterých jsme v minulosti prokázali zvýšenou prevalenci protilátek proti kalretikulínu. Každé ředění séra bylo testováno v trojicích a naměřená optická denzita průměrována. Výsledky testování hladin protilátek proti kalretikulínu byly vyjádřeny v arbitrárních jednotkách (AU) představujících procentuální vyjádření průměrné optické denzity vzorků oproti průměru optické denzity standardu. Každý vzorek byl testován ve třech nezávislých experimentech, výsledky byly zprůměrovány.

Testování titru antikalretikulinových protilátek bylo provedeno stejným způsobem, avšak bez využití interního standardu. Detekční protilátky (konjugované s křenuvou peroxidázou) proti lidským IgA1 a IgA2 imunoglobulinům tvořily v tomto případě myší monoklonální protilátky, které byly před aplikací ředěny v myším séru naředěném na 10 % v PBS.

3. 6. SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu obsahujícím anionický detergent dodecylsulfát sodný (SDS-PAGE) byla provedena ve vertikálním uspořádání užitím tenkovrstevného gelu (1 mm) podle modifikované metody Laemmeliho a Favreho (LAEMLI & FAVRE 1973). Roztok pro přípravu 10% separačního gelu (složený z 4,05 ml H₂O, 2,5 ml Tris pufr (pH 8,8), 30% akrylamid-bisakrylamid 3,3 ml, 10% persíran amonný 50 µl, Temed 5 µl) byl nalit mezi skla vymezující vlastní separační pole a převrstven malým množstvím destilované H₂O. Polymerace probíhala při 37 °C dokud roztok nenabyl gelovité konzistence a mohla se odsát voda, která u gelu zaručovala rovný povrch čela. Na separační gel byl nalit roztok (složený z 6,1 ml H₂O, 2,5 ml Tris pufr (pH 6,8), 10% SDS

100 μ l, 30% akrylamid-bisakrylamid 1,3 ml, 10% APS 50 μ l, Temed 10 μ l), který po zpolymerování vytvořil zaostřovací gel. Do tohoto roztoku byl bezprostředně po jeho nalití vložen plastový profil, jenž byl po zpolymerování gelu vyjmut, čímž se vytyčil prostor pro nanášení vzorků a šíře separačních drah v gelu. Polymerace probíhala za stejných podmínek. Po sestavení separační aparatury a nalití elektrodového pufru byly vzorky a standard molekulových hmotností naneseny do jamek zaostřovacího gelu – podvrstveny pod elektrodový pufr. Kalretikulin v PBS (5 μ g/10 μ l) byl smíchán s redukujícím vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a před vlastní separací 5 min. povařen. Separace probíhala v systému s Tris elektrodovým pufrem v zařízení Bio-Rad Mini-Protean[®] 3 Cell se zdrojem napětí PowerPack[™] Universal Power Supply (Bio-Rad, USA) za konstantního proudu 35 mA (70 V) po dobu 45 min. Elektroforéza byla ukončena v okamžiku, když zóna bromfenolové modři dosáhla konce gelu. Vzorek kalretikulinu byl po elektroforetické separaci vizualizován barvením Coomassie Brilliant Blue R-250. Polyakrylamidový gel s elektroforeticky rozděleným vzorkem kalretikulinu byl ponořen do roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250, ve kterém byl ponechán 30 min. za současného třepání na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Následně byl gel několikrát promyt v odbarvovacím roztoku a sušícím roztoku. Analýza SDS-PAGE preparátu kalretikulinu využívaného jako antigen v ELISA testech i imunoblotech sloužila současně jako kontrola kvality.

3. 7. IMUNOBLLOT

Vzorek kalretikulinu rozdělený v SDS-PAGE byl přenesen na nitrocelulóзовou membránu (nitrocellulose membrane NC2, Serva, SRN) za použití zařízení Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, USA) a za konstantního proudu 250 mA a napětí 100 V. Přenos probíhal v blotovacím pufru 1 hod. Membrána s přeneseným kalretikulinem byla vysušena za laboratorní teploty. Druhý den po přenesení vzorku na nitrocelulóзовou membránu byla membrána použita pro vlastní imunodetekci antikalretikulinových protilátek. Volná místa na membráně byla vysycena inkubací s mléčnými proteiny z roztoku 2% nízkotučného mléka naředěného v 0,1% PBS-T při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Po následném trojnásobném promytí roztokem PBS-T a PBS byla membrána inkubována s

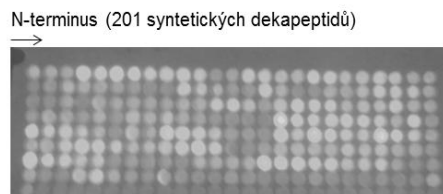
pacientskými séry či séry kontrolní skupiny krevních dárců naředěnými 1/100 v 1% roztoku nízkotučného mléka v 0,1% PBS-T přes noc při teplotě 4 °C za mírného třepání. Druhý den byly nenavázané protilátky odstraněny aspirací, membrána třikrát promyta roztoky PBS-T a PBS a inkubována 1 hod. s konjugáty peroxidázy a protilátek proti příslušnému izotypu lidských imunoglobulinů (anti-human IgA či anti-human IgG, The Bindig Site, UK) naředěných 1/1000 v 1% roztoku nízkotučného mléka v 0,1% PBS-T při laboratorní teplotě za mírného třepání. Po opakovaném promytí PBS-T a PBS byla detekována přítomnost navázaných protilátek s kalretikulinem či jeho fragmenty indukci chemiluminiscenční reakce přidáním roztoku ECL soupravy (Pierce, UK). Světelná kvanta byla zachycena na rentgenový film. Pro kontrolu byly membrány s přeneseným kalretikulinem či jeho fragmentem vystaveny popsané imunodetekční proceduře, avšak bez inkubace s lidským sérem.

3. 8. PEPSCAN

Ověření specifity protilátek proti kalretikulinu u pacientů s hypertrofickou a dilatační kardiomyopatií bylo provedeno metodou Pepscan využívající soubor (knihovnu) syntetických dekapeptidů korespondující s konsenzuální sekvencí kalretikulinu, která byla publikována v monografii Prof. Michalaka (MICHALAK 1996). Kalretikulinové peptidy, C koncem kovalentě navázané na celulózuovou matici (membráně), jsou lokalizovány do bodů o průměru 3 mm. Uspořádání jednotlivých skupin peptidů respektuje pořadí aminokyselin v molekule kalretikulinu (Obrázek č. 8). V sérii dekapeptidů na pepscanové membráně (sekvenčně orientovaných dle úzu N → C) se vždy shoduje osm N-koncových aminokyselin peptidu s třetí až desátou aminokyselinou předcházejícího peptidu. Každý následující peptid nově obsahuje dvě aminokyseliny na svém C- konci dle pořadí v jakém jsou lokalizovány na molekule kalretikulinu a naopak ztrácí dvě aminokyseliny na svém N- konci. Pepscanová membrána byla připravena firmou ABIMED Analysen-Technik (SRN) technikou „SPOT synthesis“ (simultánní, automatizovanou peptidovou syntézou na celulózuové matici) dle požadavku naší laboratoře. Pro zviditelnění přítomnosti (a pozice)

jednotlivých skupin dekapeptidů lze využít schopnosti peptidů absorbovat UV záření a emitovat světelná kvanta (Obrázek č. 8).

Obrázek č. 8: Celulózová membrána se syntetickými dekapeptidy kalretikulinu (Pepsan) vizualizovanými UV světlem



Způsob detekce reaktivity protilátek s peptidy byl principiálně obdobný metodě imunoblotu, avšak využíval namísto PBS Tris pufr pH 8. Blokační roztok obsahoval 4 % a ředící roztoky protilátek 2 % nízkotučného mléka (SÁNCHEZ et al. 2003).

3. 9. ELISA TEST KALRETIKULINU V KREVNÍM SÉRU

Pro stanovení a srovnání koncentrace kalretikulinu v krevním séru pacientů diagnostikovaných jako dilatační kardiomyopatie, pacientů s kardiomyopatií hypertrofickou a v séru kontrolní skupiny krevních dárců byla zvolena souprava Human Calreticulin (CRT) Elisa kit (BlueGene, Čína). Postup při testování se řídil doporučeními výrobce. Všechny vzorky i standardní séra byla naředěna 1/1 v PBS a testována v trojicích. Naředěné vzorky sér, standardy a PBS (užitý jako slepý vzorek) byly v množství 50 μ l naneseny do jamek a inkubovány 1 hod. při 37 °C. Po odsátí a pětinasobném promytí promývacím roztokem bylo do jamek přidáno na 1 hod. 100 μ l konjugátu detekčních protilátek konjugovaných s křenovou peroxidázou. Po vymytí nenavázaných detekčních protilátek, opakovaném promytí a odstranění promývacího roztoku byl přidán vyvíjecí roztok s chromogenní látkou. Barevná reakce byla zastavena po 15 minutách. Optická densita vzorků byla měřena při vlnové délce 450 nm ELISA spektrofotometrem. Množství

solubilního kalretikulinu ve vzorku bylo odečteno z kalibrační křivky vytvořené na základě regresní analýzy.

3. 10. STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad PrismTM (Prism 6). Statistické srovnání sérových hladin antikalretikulinových protilátek i kalretikulinu mezi skupinami pacientů a kontrolní skupinou krevních dárců bylo vzhledem k neparametrickému charakteru dat provedeno Mann-Whitney U testem. Korelační analýza a Demingova regrese byly využity k hodnocení míry závislosti mezi hladinami antikalretikulinových protilátek jednotlivých izotypů u pacientů. Míra závislosti mezi hladinami jednotlivých izotypů sérových antikalretikulinových protilátek a množstvím kalretikulinu v séru pacientů s kardiomyopatiemi byla stanovena korelační analýzou a vyjádřena Spearmanovým koeficientem.

4. VÝSLEDKY

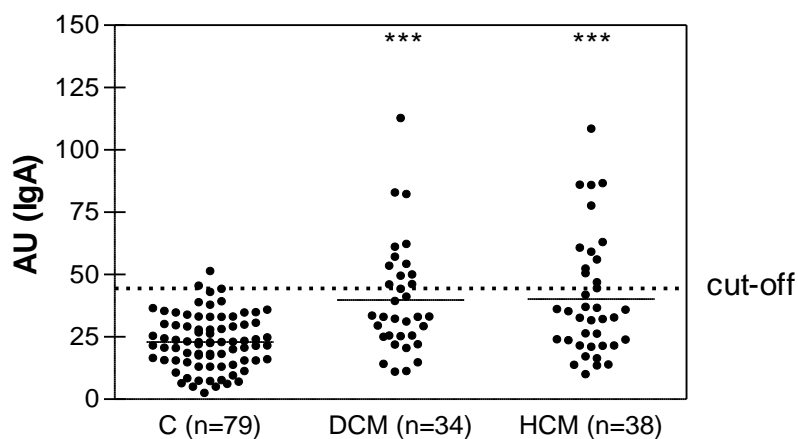
4.1. IgA PROTILÁTKY PROTI KALRETIKULINU U KARDIOMYOPATIÍ

Vývoj reprodukovatelných a robustních technik stanovujících specifické sérové protilátky a posuzování jejich klinického významu jsou předmětem intenzivního zájmu laboratorní medicíny. Výskyt protilátek proti kalretikulinu byl studován v sérech dvou skupin pacientů s primárními kardiomyopatiemi charakterizovanými odlišnou etiologií i patologií – dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií, které byly získány na základě spolupráce s III. Interní-kardiologickou klinikou a Kardiocentrem Fakultní nemocnice Královské Vinohrady.

Hypertrofická kardiomyopatie je charakterizovaná zmnožením vaziva a buněk srdeční stěny, za jejíž příčinu se považují geneticky podmíněné mutace genů kódující zejména proteiny myokontraktilního aparátu, zatímco u dilatační kardiomyopatie dochází ke zvýšené apoptóze kardiomyocytů a jejich substituci vazivem, rozšíření a ztenčení stěny levé srdeční komory a případně jiných oddílů srdce. V každém testu byly výšky hladin antikalretikulinových protilátek pacientů porovnány s hladinami těchto protilátek detekovaných u kontrolní skupiny zdravých krevních dárců. V sérech krevních dárců byly testovány vybrané sérologické znaky infekčních a některých autoimunitních onemocnění, u kterých jsme v minulosti prokázali zvýšené hladiny protilátek proti kalretikulinu a celkové hladiny imunoglobulinů, které by mohly ovlivnit hladiny specifických protilátek. Krevní dárce s nefyziologickými hodnotami v těchto testech byli ze studie vyloučeni. Kardiologičtí pacienti v testovaných skupinách nevykazovali klinické projevy ani indikátory onemocnění spojených se zvýšenou séroprevalencí antikalretikulinových protilátek. Distribuci hladin sérových IgA protilátek proti kalretikulinu u pacientů s dilatační kardiomyopatií, kardiomyopatií hypertrofickou a v kontrolní skupině krevních dárců dokumentuje Obrázek č. 9. Hladiny IgA antikalretikulinových protilátek byly u obou skupin pacientů s kardiomyopatiemi statisticky signifikantně zvýšené na hladině významnosti $P < 0,001$. Hladiny IgA antikalretikulinových protilátek dosahovaly hodnot $39,9 \pm 22,2$ AU (AU,

arbitrární jednotky, průměr \pm směrodatná odchylka) u pacientů s dilatační kardiomyopatií, $40,2 \pm 24,0$ AU u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, zatímco u kontrolní skupiny krevních dárců $22,9 \pm 10,7$ AU. Prahová hodnota (cut-off), od které vnímáme sérum jako pozitivní na antikalretikulinové protilátky, byla stanovena na základě součtu průměru a dvojnásobku směrodatné odchylky hladin příslušného izotypu antikalretikulinových protilátek u krevních dárců. Na základě tohoto kritéria 12 z 34 pacientů s dilatační kardiomyopatií a 13 ze 38 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo séropozitivních na IgA protilátky proti kalretikulinu. Pouze 2 ze 79 sér kontrolní skupiny krevních dárců byla pozitivní na tento izotyp protilátek.

Obrázek č. 9: Hladiny sérových IgA protilátek proti kalretikulinu u pacientů s dilatační a hypertrofickou kardiomyopatií

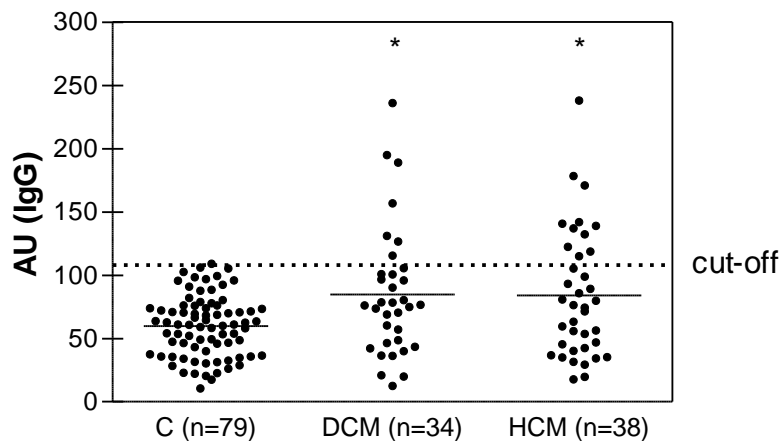


AU, arbitrární jednotky; C, kontrolní skupina krevních dárců; DCM, dilatační kardiomyopatie; HCM, hypertrofická kardiomyopatie; n, počet testovaných osob ve skupině; cut-off, prahová hodnota hladin protilátek, od které vnímáme sérum jako pozitivní; ***, $P < 0,001$; vodorovné linie označují průměrnou hodnotu výšek hladin protilátek v testované skupině; přerušovaná linie označuje prahovou hodnotu cut-off

4. 2. IgG PROTILÁTKY PROTI KALRETIKULINU U KARDIOMYOPATIÍ

Hladiny IgG izotypu antikalretikulinových protilátek byly podobně jako v případě izotypu IgA u obou skupin pacientů s kardiomyopatiemi statisticky signifikantně zvýšené oproti kontrolní skupině krevních dárců, avšak v tomto případě IgG izotypu protilátek na hladině významnosti $P < 0,05$. Obrázek č. 10 dokumentuje rozdělení hodnot sérových hladin IgG protilátek proti kalretikulinu u testovaných pacientů s kardiomyopatiemi. Z obrázku č. 10 je patrná séropozitivita 7 ze 34 testovaných pacientů s dilatační kardiomyopatií a 11 z 38 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, zatímco pouze jediný krevní dárců z celkových 79 testovaných převyšoval hladinou IgG protilátek proti kalretikulinu prahovou hodnotu cut-off. Naměřené sérové hladiny IgG antikalretikulinových protilátek dosahovaly hodnot $84,8 \pm 51,0$ AU (průměr \pm směrodatná odchylka) u pacientů s dilatační kardiomyopatií, $84,1 \pm 50,3$ AU u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, zatímco u kontrolní skupiny krevních dárců pouze $59,9 \pm 24,1$ AU.

Obrázek č. 10: Sérové hladiny IgG protilátek proti kalretikulinu u pacientů s dilatační a hypertrofickou kardiomyopatií



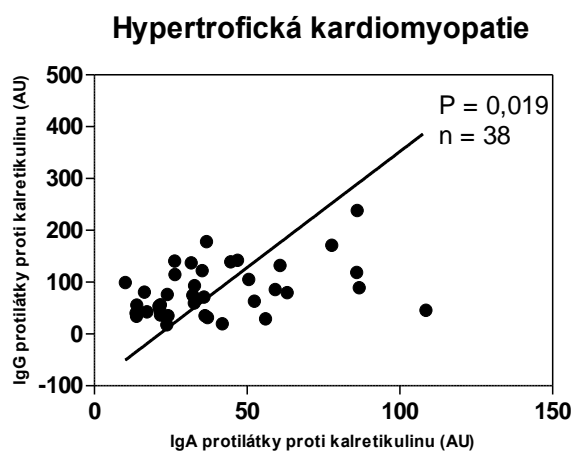
AU, arbitrární jednotky; C, kontrolní skupina krevních dárců; DCM, dilatační kardiomyopatie; HCM, hypertrofická kardiomyopatie; n, počet testovaných osob ve skupině; cut-off, prahová hodnota, od které vnímáme sérum jako pozitivní; *, $P < 0,05$; vodorovné linie označují průměrnou hodnotu výšek hladin protilátek v testované skupině; přerušovaná linie označuje prahovou hodnotu cut-off

Analýza síly závislosti mezi výskytem IgA a IgG antikalretikulinových protilátek prokázala pozitivní, statisticky signifikantní korelaci vyjádřenou Spearmanovým koeficientem pořadové korelace u obou skupin pacientů s kardiomyopatiemi, a to v případě dilatační kardiomyopatie $r_s = 0,48$ ($P = 0,0045$) a v případě hypertrofické kardiomyopatie $r_s = 0,36$ ($P = 0,0263$).

Hladiny sérových IgA protilátek proti kalretikulinu dosahovaly statisticky významnějšího rozdílu u obou skupin pacientů s kardiomyopatiemi oproti kontrolní skupině ve srovnání s hladinami antikalretikulinových protilátek třídy IgG. Z tohoto důvodu byla Demingovou lineární regresí analyzována míra závislosti hladin antikalretikulinových protilátek izotypu IgG na hladinách IgA antikalretikulinových protilátek u pacientů s kardiomyopatiemi. Tímto testem bylo prokázáno statisticky

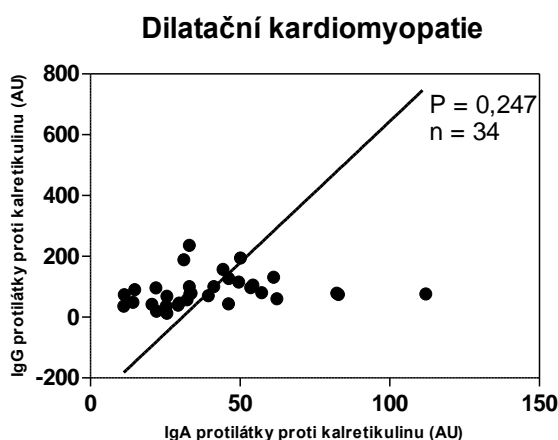
významná závislost hodnot hladin IgG na IgA protilátek proti kalretikulinu u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií ($P = 0,019$) zatímco u pacientů s dilatační kardiomyopatií statisticky významná závislost prokázána nebyla ($P = 0,247$) (Obrázek č. 11, 12).

Obrázek č. 11: Teoretická regresní přímka závislosti hodnot hladin IgG protilátek proti kalretikulinu na hladinách IgA protilátek proti kalretikulinu u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií



n, počet pacientů; AU, arbitrární jednotky

Obrázek č. 12: Teoretická regresní přímka závislosti hodnot hladin IgG protilátek proti kalretikulinu na hladinách IgA protilátek proti kalretikulinu u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií



n, počet pacientů; AU, arbitrární jednotky

4. 3. TITRAČNÍ ANALÝZY SÉROVÝCH IgA A IgG PROTILÁTEK PROTI KALRETIKULINU

Při stanovování hladin protilátek proti kalretikulinu metodou ELISA jsme doposud využívali k vyjádření hladin protilátek arbitrárních jednotek (AU), představujících procentuální vyjádření podílu optické denzity testovaných vzorků k optické denzitě vnitřního standardu. Vnitřní standard je tvořený směsí různě pozitivních patientských sér získaných a otestovaných v předchozích studiích. Vzorky sér a standardu byly v ELISA testu pro stanovení hladin antikalretikulinových protilátek jednotně ředěny 1/20 a 1/100 v případě IgA izotypu a 1/100 a 1/500 v případě IgG izotypu. V rozmezí těchto ředění je vztah množství antikalretikulinových protilátek těchto izotypů na optické denzitě testovaných vzorků sér blízký lineární závislosti. Nejvyšší citlivost a reprodukovatelnost využívaného ELISA testu vyvinutého v naší laboratoři docílíme zastavením barevné reakce v rozsahu optických denzit standardu 0,4 – 0,7, což současně dokumentuje i značnou

robustnost tohoto testu. Zmíněný metodický přístup umožňuje také objektivně porovnat hodnoty vzorků z různých testů. V klinické praxi se však v některých případech uplatňuje či je výhodné využít pro posouzení séropozitivity na specifické protilátky titrační analýzu. Množství specifických protilátek je vyjádřeno při této formě detekce titrem, vyjadřujícím nejvyšší možné ředění séra, při kterém jsou specifické protilátky použitým testem detekovatelné. Zejména v případech onemocnění, u kterých příslušné (auto)protilátky nebyly doposud popsány často vyvstává požadavek stanovit titer specifických protilátek jako přesvědčivý důkaz jejich přítomnosti.

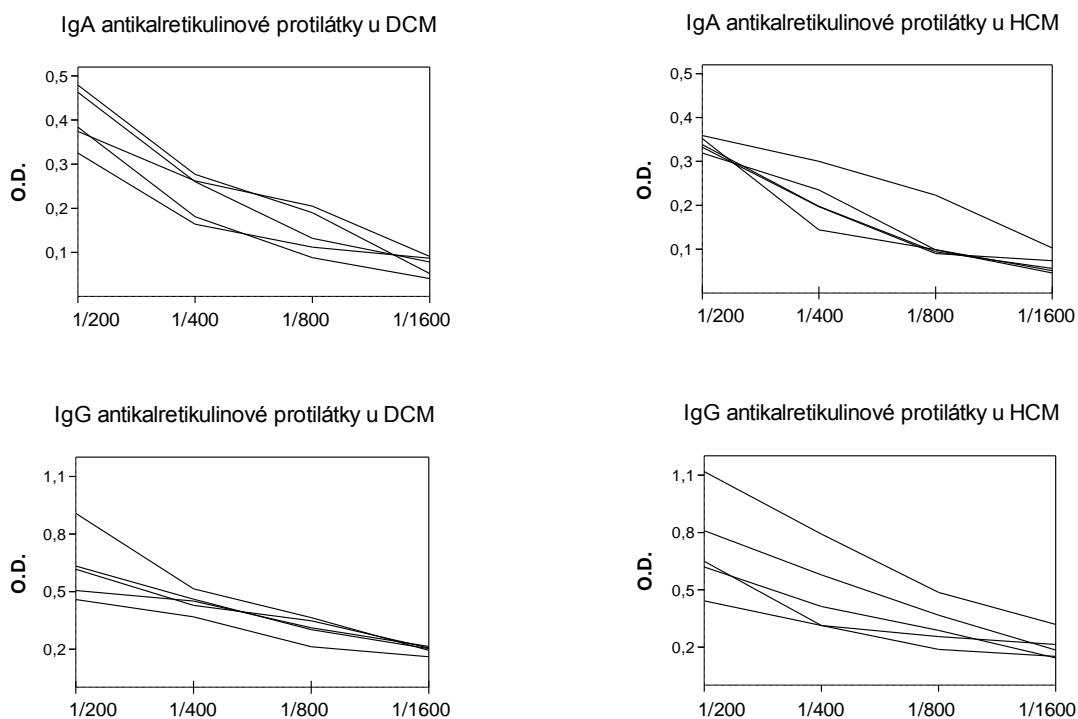
Antikalretikulinové protilátky nebyly doposud testovány ve skupině pacientů s dilatační kardiomyopatií ani u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Prokázaná séroprevalence u pacientů s kardiomyopatiemi v předkládané diplomové práci činila v případě dilatační kardiomyopatie 35 % a 21 % (IgA, IgG) a v případě hypertrofické kardiomyopatie 34 % a 29 % (IgA, IgG). Z tohoto důvodu bylo vhodné pro ověření alespoň u části pacientů s těmito kardiomyopatiemi, kteří byli séropozitivní na antikalretikulinové protilátky, provést titrační analýzu testovaných izotypů. Titrační analýzou je navíc možné získat představu o míře protilátkové reaktivity proti kalretikulinu u pacientů se zmíněnými diagnózami. Pro tento účel bylo otestováno 20 pacientů z každé skupiny a séra pacientů byla v tomto případě naředěna 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 v 1% BSA, neboť testování sérových hladin antikalretikulinových již bylo provedeno ELISA testem při ředění 1/20 a 1/100 v případě IgA, resp. 1/100 a 1/500 v případě IgG.

Obrázek č. 13 dokumentuje průběh titrace provedené ELISA testem využívající lidský rekombinantní kalretikulin – v ředící řadě 1/200, 1/400, 1/800 a 1/1600 – IgA a IgG antikalretikulinových protilátek v sérech pěti pacientů s dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií pozitivních v testu antikalretikulinových protilátek využívající interní standard a nižší ředění sér. Předkládané hodnoty optických denzit při jednotlivých měření představují aritmetické průměry třech nezávislých experimentů.

Navzdory nestejným hladinám antikalretikulinových protilátek v testovaných sérech pacientů (Obrázek č. 10), IgG antikalretikulinové protilátky u pěti nejpozitivnějších pacientů s dilatační kardiomyopatií i pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo možné průkazně detekovat v titru 1/1600 při optické denzitě 0,25 – 0,2. Izotyp IgA antikalretikulinových protilátek u pěti séropozitivních pacientů lze prokázat v titru 1/800 při optické 0,1 – 0,25. Hodnoty titru i rozsah intervalu optických denzit, při kterých byly

protilátky proti kalretikulinu detekovány u testovaných sér pacientů s kardiomyopatiemi, dokumentují značnou citlivost vyvinutého ELISA testu umožňujícího značné rozlišení míry séropozitivity na IgA a IgG antikalretikulinových protilátek.

Obrázek č. 13: Titrační analýza sérových IgA a IgG protilátek proti kalretikulinu u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií

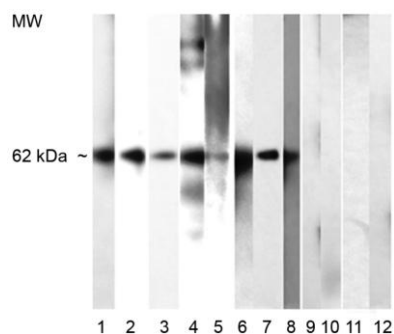


DCM, dilatační kardiomyopatie; HCM, hypertrofická kardiomyopatie; O.D., optická denzita; na vodorovné ose je indikováno ředění vzorku

4. 4. OVĚŘENÍ PROTILÁTKOVÉ REAKTIVITY IMUNOBLOTEM S KALRETIKULINEM

Metoda imunoblotu představuje standardní (převážně kvalitativní) způsob ověření reaktivity protilátek s antigenem. Reaktivita sérových protilátek proti kalretikulinu byla u některých pacientů s dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií potvrzena metodou imunoblotu využívající molekulu rekombinantního kalretikulinu, která sloužila jako antigen v našich ELISA testech (Obrázek č. 14). Analýzu reaktivity patientských protilátek metodou imunoblotu bylo možné provést pouze se séry, ve kterých byly ELISA testem prokázány vysoké hladiny autoprotiátek proti kalretikulinu.

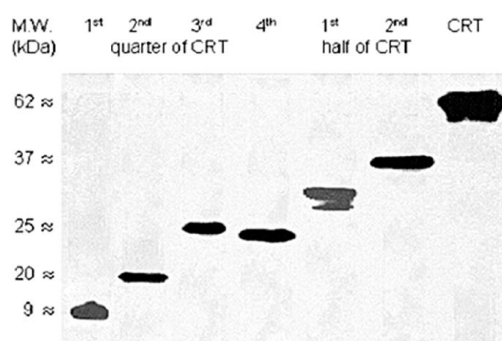
Obrázek č. 14: Reaktivita sérových IgA a IgG protilátek pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií s rekombinantním kalretikulinem



Membrána č. 1, 2: reaktivita sérových IgG protilátek pacientů s dilatační kardiomyopatií; č. 3, 4: reaktivita sérových IgG protilátek pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií; č. 5, 6: reaktivita IgA protilátek pacientů s dilatační kardiomyopatií; č. 7, 8: reaktivita IgA protilátek pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií; č. 9: kontrolní sérum zdravého krevního dárce (IgG); č. 10: kontrolní sérum zdravého krevního dárce (IgA); membrána č. 11, 12: kontrolní imunoblot pouze s detekčními protilátkami proti lidskému imunoglobulinu IgA a IgG bez přítomnosti lidského séra; MW, molekulová hmotnost

Ověření reaktivity protilátek pacientů s kardiomyopatiemi s kalretikulinem bylo realizováno také immunoblotem využívající rekombinantní fragment kalretikulinu korespondující s druhou čtvrtinou jeho molekuly. Rekombinantní fragmenty korespondující s čtvrtinami a polovinami lidského kalretikulinu jsme připravili v minulosti ve spolupráci s Prof. I. Swobodou z Vídeňské lékařské fakulty s cílem charakterizovat a srovnat detailní specifitu protilátek proti kalretikulinu u pacientů s celiakií a refrakterní celiakií (SÁNCHEZ et al. 2008). Elektroforetogram rekombinantních fragmentů kalretikulinu z této studie je zachycen na Obrázku č. 15.

Obrázek č. 15: Rekombinantní fragmenty kalretikulinu rozdělené SDS-PAGE



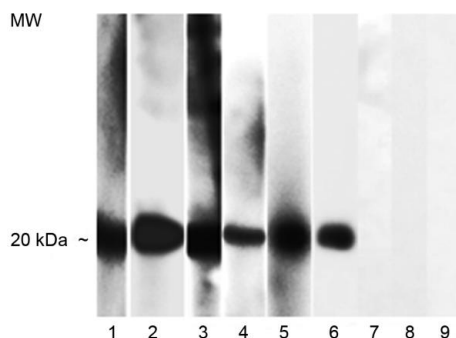
Rekombinantní fragmenty lidského kalretikulinu korespondující se čtvrtinami a polovinami této molekuly rozdělené SDS-PAGE (převzato ze SÁNCHEZ et al., Clin. Exp. Immunol. 2008; 153: 351 – 359)

Rekombinantní fragment odpovídající druhé čtvrtině lidského kalretikulinu byl využit jako antigen v imunoblotu, kterým byla rovněž ověřena reaktivita IgG protilátek pacientů s dilatační a hypertrofickou kardiomyopatií s prokázanou séropozitivitou na antikalretikulinové protilátky ELISA testem. Séra pacientů i kontrolní skupiny zdravých dárců byla testována při ředění 1/100.

Obrázek č. 16 dokumentuje reaktivitu IgG protilátek šesti pacientů (třech s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a třech s hypertrofickou kardiomyopatií) s rekombinantním fragmentem korespondujícím s druhou čtvrtinou molekuly kalretikulinu.

IgG protilátky sér kontrolní skupiny deseti zdravých krevních dárců tento fragment nerozpoznávaly.

Obrázek č. 16: Reaktivita IgG protilátek pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií s rekombinantně připravenou druhou čtvrtinou molekuly lidského kalretikulinu



Membrána č. 1, 2, 3: reaktivita sérových IgG protilátek pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií; č. 4, 5, 6: reaktivita sérových IgG protilátek pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií; č. 7, 8: negativní reakce kontrolních sér zdravých krevních dárců; č. 9: kontrolní imunoblot s detekčními protilátkami proti lidskému imunoglobulinu IgG při současné absenci lidského séra, MW, molekulová hmotnost

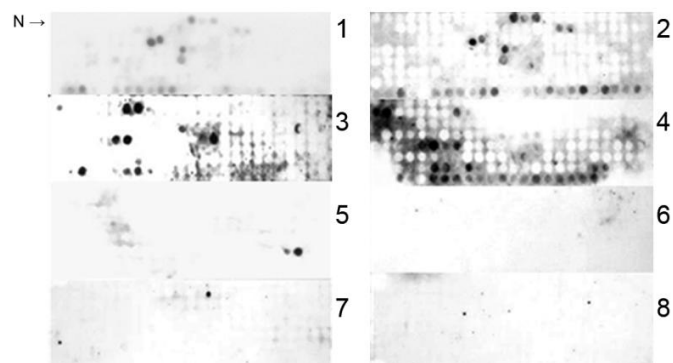
4. 5. B-BUNĚČNÉ EPITOPY KALRETIKULINU

Analýza specifity protilátek pacientů proti antigenům metodou Pepscan využívá soubor syntetických deka-peptidů, které společně odpovídají sekvenci lidského kalretikulinu. Sekvence sousedních peptidů (v závislosti na jejich posloupnosti v Pepscanovém souboru orientovaném ve směru N → C) se vždy shodují v osmi peptidech. Peptidy jsou kovalentně navázány na celulózové matrici C- koncem. Pepscan umožňuje charakterizovat rozsah protilátkové reaktivity a poskytuje také užitečné informace vedoucí k odhalení křížové reaktivity mezi antigeny, což lze využít pro objasnění

jedné z možných příčin vzniku autoimunitních reakcí – mechanismu „molekulární mimikry“. Současně je Pepscan důvěryhodným ověřovacím testem reaktivity protilátek s antigenem.

Analýza specifity antikalretikulinových protilátek metodou Pepscan v našich předcházejících studiích byla realizována při zředění lidských sér 1/100 (SÁNCHEZ et al. 2003, 2008, PEKÁRIKOVÁ et al., 2010). Testování míry reaktivity protilátek pacientů s kardiomyopatiemi s peptidy kalretikulinu vyžadovala ředit séra stejným způsobem jako ve zmíněných studiích. Hladiny antikalretikulinových protilátek u séropozitivních pacientů s kardiomyopatiemi však nedosahovaly hodnot pacientů s testovanými gastrointestinálními onemocněními (celiakii, refrakterní celiakii, alkoholickou cirhózou, autoimunitní hepatitidou, hepatocelulárním karcinomem, pankreatickým adenokarcinomem a primární biliární cirhózou), což se projevilo relativně nízkou reaktivitou patientských protilátek s peptidy kalretikulinu metodou Pepscan. Relativně nízké hladiny antikalretikulinových protilátek tedy neumožňovaly za dodržení stejného metodického postupu a srovnatelné délky expozičního času reprezentativnější studii protilátkové specifity metodou Pepscan v našem souboru pacientů s kardiomyopatiemi. Z těchto důvodů bylo provedeno základní testování detailní specifity IgA a IgG protilátek metodou Pepscan u 6 sér pacientů s kardiomyopatiemi séropozitivních v ELISA testech na antikalretikulinové protilátky a u 10 sér kontrolní skupiny krevních dárců. Reaktivita sér kontrolní skupiny byla z důvodů jejich séronegativity slabá a omezovala se pouze na několik rozdílných peptidů. Obrázek č. 17 podává příklad reaktivity IgA a IgG protilátek pacienta s dilatační kardiomyopatií a pacienta s hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolních sér krevních dárců. Z obrázku č. 17 je patrná rozvinutá reaktivita IgG protilátek u obou patientských sér s peptidy kalretikulinu.

Obrázek č. 17: Reaktivita sérových IgA a IgG protilátek pacientů s dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií s deka-peptidy kalretikulinu metodou Pepscan



Membrána č. 1: reaktivita protilátek IgG pacienta s dilatační kardiomyopatií; č. 2: IgG pacienta s hypertrofickou kardiomyopatií; č. 3: IgA pacienta s dilatační kardiomyopatií; č. 4: IgA pacienta s hypertrofickou kardiomyopatií; č. 5: IgG krevního dárce; č. 6: IgA krevního dárce; č. 7: kontrolní test s detekční protilátkou proti lidskému IgG; č. 8: kontrolní test pouze s detekční protilátkou proti IgA; N → (N-konec kalretikulinu)

Přehled kalretikulinových peptidů rozpoznávaných IgA a IgG protilátkami pacientů podává Tabulka č. 2a – c. Reaktivita protilátek pacientů s kardiomyopatiemi byla směřována do všech domén kalretikulinu. Epitopy rozpoznávané více než polovinou testovaných protilátek byly považovány za imunodominantní. Imunodominantní epitopy rozpoznávané protilátkami pacientů s kardiomyopatiemi však byly prokázány pouze v doméně P a C a byly tvořeny souborem peptidů, jenž korespondují se sekvencí EVKIDNSQVESGSLED lokalizovanou v místě spojení P a C domény a peptidy IDDP TDSKPE, DKAPEHIPDPDA a RKEEEEAEDKEDDAEDKDEDEEDE v C-doméně.

Tabulka č. 2a: Peptidy kalretikulinu rozpoznávané sérovými protilátkami izotypu IgA a protilátkami izotypu IgG pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Peptid č.	IgA protilátky						IgG protilátky						Sekvence	
	DCM1	DCM2	DCM3	HCM1	HCM2	HCM3	DCM4	DCM5	DCM6	HCM4	HCM5	HCM6		
1				+									+	EPAVYFKEQF
2				+									+	AVYFKEQFLD
3				+									+	YFKEQFLDGD
7			+											GDGWTSRWIE
8			+											GWTSRWIEAS
12				+									+	ASAKHSAAD
13				+						+			+	AKHKSADFA
14				+						+			+	HKSADFAGK
15										+				SAADFAGK FV
16				+									+	ADFAGK FVLS
17				+									+	FAGK FVLS SG
18				+									+	GK FVLS SGK F
26				+									+	DKGLQTSQDA
27				+									+	GLQTSQDARF
28				+		+							+	QTSQDARFYA
29				+									+	SQDARFYALS
30				+									+	DARFYALSAS
31				+		+							+	RFYALSASFA
32				+		+							+	YALSASF AEA
33		+		+	+						+		+	LSASF AEA PF
34		+		+	+						+		+	ASF AEA PFSN
35				+									+	FAEA PFSNKG
36				+									+	EAPFSNKGQT
37				+									+	PFSNKGQTLV
38				+									+	SNKGQTLVVQ
39				+									+	KGQTLVVQFT
40				+									+	QTLVVQFTVK
41													+	LVVQFTVKHE
42									+				+	VQFTVKHEQN
43										+				FTVKHEQNI
44				+									+	VKHEQNI DCG
54				+									+	LDQDMHGDS
55				+									+	QDMHG DSEY
56				+									+	DMHG DSEYNI
57				+									+	HGDSEY NIMF
58						+								DSEY NIMFGP
59	+				+					+			+	EY NIMFGPDI
60					+					+				NIMFGP DICG
61												+		MFGP DICGPG
62			+											GP DICGPGTK
65							+							PGTKKVHVIF
71	+											+		KGKNV LINKD
73			+											VLINKDIRCK
81		+	+											LYTLV RPDN
82			+		+									TLV RPDNTY
85								+						DNTYEVKIDN
86								+						TYEVKIDNSQ

DCM1-DCM6, sérum č. 1-6 pacientů s dilatační kardiomyopatií; HCM1-HCM6, sérum č. 1-6 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Tabulka č. 2b: Peptidy kalretikulinu rozpoznávané sérovými protilátkami izotypu IgA a protilátkami izotypu IgG pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Peptid č.	IgA protilátky						IgG protilátky						Sekvence
	DCM1	DCM2	DCM3	HCM1	HCM2	HCM3	DCM4	DCM5	DCM6	HCM4	HCM5	HCM6	
87	+	+			+		+	+	+		+		EVKIDNSQVE
88	+	+	+		+		+	+	+		+		KIDNSQVESG
89	+	+	+	+	+		+	+			+	+	DNSQVESGSL
90	+	+		+			+	+			+	+	SQVESGSL
97								+					LPPKKIKDPD
98				+				+				+	PKKIKDPDAS
99				+								+	KIKDPDASKP
102				+								+	ASKPEDWDER
104	+										+		EDWDERAKID
105	+										+		WDERAKIDDP
106	+				+	+		+			+		ERAKIDDP
107	+					+		+			+		AKIDDP
108	+			+	+			+			+	+	IDDP
109				+				+				+	DPTDSKPEDW
110				+				+				+	TDSKPEDW
111								+					SKPEDWKAP
112					+			+	+				PEDWDKAP
113	+				+		+	+		+			DWDKAP
114	+				+	+	+	+		+	+		DKAP
115	+				+	+	+	+		+	+		AP
116				+								+	EHIP
117				+								+	IP
118				+								+	DP
132								+					KG
133											+		EW
137					+	+		+					NP
138					+			+		+	+		DY
139					+			+		+	+		KG
140								+		+	+		TW
153			+										LG
155		+											LW
156		+			+			+					QV
157		+	+		+			+					K
158		+	+		+			+		+			G
159					+			+		+			I
160					+			+					F
161								+					N
162								+					F
163								+		+			I
164								+		+			N
165								+					E
166								+					E
167								+					
168				+				+				+	N
169	+			+			+	+				+	T
170	+	+					+	+					G

DCM1-DCM6, sérum č. 1-6 pacientů s dilatační kardiomyopatií; HCM1-HCM6, sérum č. 1-6 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií; šedou barvou jsou označeny peptidy, které byly rozpoznávané protilátkami alespoň poloviny testovaných sér

Tabulka č. 2c: Peptidy kalretikulinu rozpoznávané sérovými protilátkami izotypu IgA a protilátkami izotypu IgG pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Peptid č.	IgA protilátky						IgG protilátky						Sekvence
	DCM1	DCM2	DCM3	HCM1	HCM2	HCM3	DCM4	DCM5	DCM6	HCM4	HCM5	HCM6	
171				+								+	TKAAEKQMKD
172				+								+	AAEKQMKDKQ
173		+		+								+	EKQMKDKQDE
174		+				+							QMKDKQDEEQ
184	+	+		+	+		+	+	+		+	+	RKEEEAEDK
185	+	+		+	+		+	+	+		+	+	EEEEAEDKED
186	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	EEAEDKEDDA
187	+	+			+		+	+		+	+		AEDKEDDAED
188	+	+			+		+	+		+	+		DKEDDAEDKD
189	+	+		+	+		+	+		+	+	+	EDDAEDKDED
190	+	+					+	+	+	+	+		DAEDKDEDEE
191	+	+					+	+	+		+		EDKDEDEEDE
192		+							+				KDEDEDEED
193		+							+				EDEEDEDKE
194		+							+				EEDEEDKEED
195		+							+		+		DEEDKEEDEF
196									+		+		EDKEEDEFED
197									+				KEEDEFEDVP
198									+				EDEFEDVPAG
199									+				EEEDVPAGQA
200	+								+			+	EDVPAGQAKD

DCM1-DCM6, sérum č. 1-6 pacientů s dilatační kardiomyopatií; HCM1-HCM6, sérum č. 1-6 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií; šedou barvou jsou označeny peptidy, které byly rozpoznávané protilátkami alespoň poloviny testovaných sér

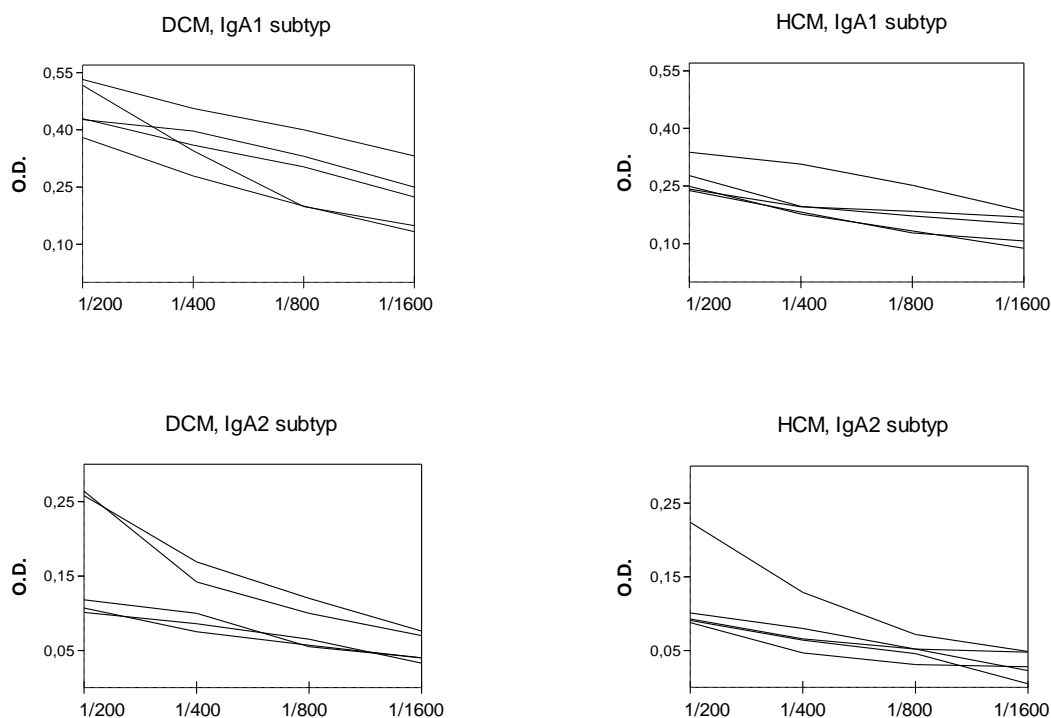
4. 6. ANTIKALRETIKULINOVÉ IgA1, IgA2 A IgG1 – IgG4 PROTILÁTKY

V našich studiích týkajících se výskytu a specifity sérových protilátek proti kalretikulinu u autoimunitních a onkologických onemocnění jsme se doposud zabývali pouze protilátkami izotypů IgA a IgG. Znalost zastoupení či poměru jednotlivých subtypů protilátek proti kalretikulinu a jejich změn spojených s určitým patologickým stavem může být klinicky využita. Stanovení určitého subtypu antikalkretikulínových protilátek by mohlo v některých případech mít diagnostický či prognostický význam. Analýza zastoupení jednotlivých subtypů protilátek proti kalretikulinu u onemocnění charakterizovaných jejich

zvýšenou prevalencí by mohla přispět k objasnění významu těchto protilátek v patologii. Z tohoto důvodu byl doposud používaný ELISA test adaptován na detekci subtypů IgA1, IgA2 a IgG1-IgG4 a poprvé využit pro účely studia fenoménu antikalretikulinových protilátek u pacientů s vybranými kardiomyopatiemi, jehož výsledky jsou poprvé uváděny v této diplomové práci. Princip stanovení sérových antikalretikulinových protilátek subtypů IgG1-IgG4 byla obdobný s ELISA testem detekujícím sérové hladiny antikalretikulinových protilátek IgA a IgG. V případě testování IgA1 a IgA2 antikalretikulinových protilátek bylo použito jako detekčních protilátek namísto ovčích konjugátů s křenuvou peroxidázou konjugátů myších monoklonálních protilátek, které by ředěny v 10% preimunním myším séru. Testování subtypů antikalretikulinových protilátek bylo provedeno u 20 pacientů s dilatační kardiomyopatií a u stejného počtu pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Séra pacientů byla ředěna identicky jako v případě testování titru IgA a IgG antikalretikulinových protilátek, tedy 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, tak aby bylo možné získat objektivní srovnání.

Obrázek č. 18 dokumentuje titraci sérových IgA1 a IgA2 protilátek proti kalretikulinu pěti nejpozitivnějších pacientů s dilatační kardiomyopatií a pěti nejpozitivnějších pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií provedenou ELISA testem. Z výsledků analýz jsou patrné vyšší titry IgA1 protilátek proti kalretikulinu u obou skupin pacientů oproti subtypu IgA2 antikalretikulinových protilátek. Optické denzity IgA1 protilátek proti kalretikulinu séropozitivních pacientů s dilatační kardiomyopatií při ředění séra 1/1600 dosahovaly hodnoty vyšší než 0,1. Nejvyšší ředění IgA1 protilátek proti kalretikulinu detekovatelné při této optické denzitě u séropozitivních pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo 1/800. IgA2 izotyp antikalretikulinových protilátek pěti nejpozitivnějších pacientů z obou skupin pacientů s kardiomyopatiemi bylo možno detekovat při ředění 1/200. Průběh dokumentovaných titračních křivek antikalretikulinových protilátek subtypu IgA1 a IgA2 je u většiny testovaných pacientů podobný.

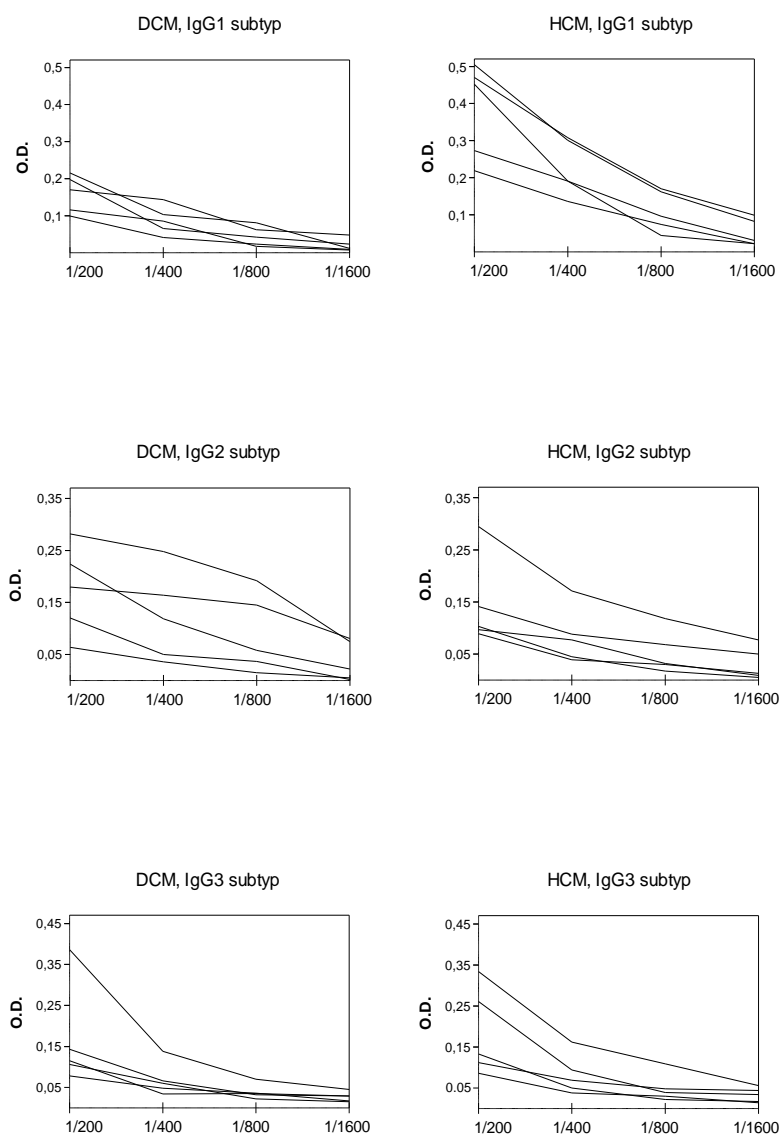
Obrázek č. 18: Titrační křivky IgA1 a IgA2 protilátek proti kalretikulinu u pěti nejpozitivnějších pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a pěti nejpozitivnějších pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií



DCM, idiopatická dilatační kardiomyopatie; HCM, hypertrofická kardiomyopatie; O.D., optická denzita; hodnoty ředění jsou vyneseny na vodorovné ose

Titrační křivky antikalretikulinových protilátek subtypu IgG1–IgG3 dokumentuje Obrázek č. 19. Z grafů je zřejmý odlišný průběh titračních křivek IgG2 subtypu antikalretikulinových protilátek u pacientů s dilatační kardiomyopatií. Vnímáme-li jako reprodukovatelnou mez citlivosti ELISA testu hodnotu optické denzity 0,1, nejvyšší titr odpovídající hodnotě 1/400 při této optické denzitě byl prokázán v případě IgG1 antikalretikulinových protilátek u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. IgG1 izotyp antikalretikulinových protilátek lze detekovat u pacientů s dilatační kardiomyopatií při ředění 1/200. Ostatní subtypy antikalretikulinových protilátek lze průkazně detekovat alespoň v titru 1/200 při optické denzitě 0,1.

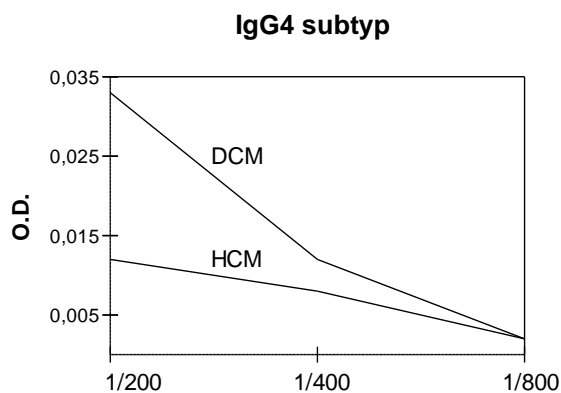
Obrázek č. 19: Titrační křivky IgG1, IgG2 a IgG3 protilátek proti kalretikulinu u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií



DCM: idiopatická dilatační kardiomyopatie; HCM: hypertrofická kardiomyopatie O.D.: optická denzita; hodnoty ředění jsou vyneseny na vodorovné ose

IgG4 protilátky patří k nejméně zastoupeným subtypům IgG protilátek v lidských sérech, nicméně zvýšení jejich hladin je charakteristické pro heterogenní skupinu onemocnění označovanou jako IgG4-asociovaná. Titr IgG4 subtypu antikalretikulinových protilátek odpovídající 1/200 byl detekován ze 40 testovaných pacientů (20 v každé patientské skupině) pouze u dvou pacientů s kardiomyopatiemi – jednoho pacienta s dilatační kardiomyopatií a jednoho pacienta s hypertrofickou kardiomyopatií při optické denzitě vyšší než 0,01 (Obrázek č. 20). Optické denzity při testování IgG4 antikalretikulinových protilátek těchto dvou nejpozitivnějších pacientů dosahovaly přibližně desetkrát nižších hodnot oproti optickým denzitám získaným při testování ostatních subtypů IgG antikalretikulinových protilátek. Navzdory relativně nízkým hodnotám optických denzit v případě testování titru IgG4 antikalretikulinových protilátek je z Obrázku č. 20 patrný detekovatelný pokles reaktivity těchto protilátek s molekulou kalretikulinu u obou pacientů při ředění 1/400 a 1/800.

Obrázek č. 20: Titrační křivky IgG4 protilátek proti kalretikulinu u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií



DCM: idiopatická dilatační kardiomyopatie; HCM: hypertrofická kardiomyopatie, O.D., optická denzita, hodnoty ředění jsou vyneseny na vodorovné ose

4. 7. VÝSKYT KALRETIKULINU V SÉRECH PACIENTŮ S KARDIOMYOPATIEMI

Výskytu kalretikulinu v extracelulárních tekutinách včetně krve byla doposud věnována pouze omezená pozornost, přestože uvolňování kalretikulinu do extracelulárních prostor může mít závažné konsekvence vzhledem k jeho různorodým aktivitám pozorovaným ve zdraví a nemoci. Závažnost potenciálního uvolňování kalretikulinu do krve – bez ohledu na jeho zdroj – tkví právě v možnosti hematogenní distribuce této molekuly i do orgánů a tkání s přirozeně nízkou expresí kalretikulinu, jejichž typickým představitelem je právě srdce. Kromě vlivu extracelulárního kalretikulinu na fyziologické funkce může mít přítomnost kalretikulinu v krvi a krevním séru zásadní vliv také na výšky hladin testovaných protilátek proti kalretikulinu. Z těchto důvodů byly testovány hladiny kalretikulinu v sérech vybraných pacientů s dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií a v kontrolní skupině krevních dárců. Séra pacientů zvolená do testování sérových hladin kalretikulinu byla vybírána s ohledem na pozitivitu IgA a IgG protilátek proti kalretikulinu, tak aby zastoupení séropozitivních a séronegativních pacientů v testovaných skupinách bylo rovnoměrné. Volba sér kontrolní skupiny krevních dárců do testu stanovujícího množství kalretikulinu byla provedena s ohledem na distribuci hodnot hladin antikalkretikulinových protilátek prokázaných v této skupině. Zohlednění míry séropozitivity na antikalkretikulinové protilátky při výběru subjektů do studie testování sérového kalretikulinu umožnilo, kromě získání informací o množství kalretikulinu v krvi pacientů s kardiomyopatiemi, získat také informace o vztahu hladin antikalkretikulinových protilátek a množství kalretikulinu u těchto pacientů.

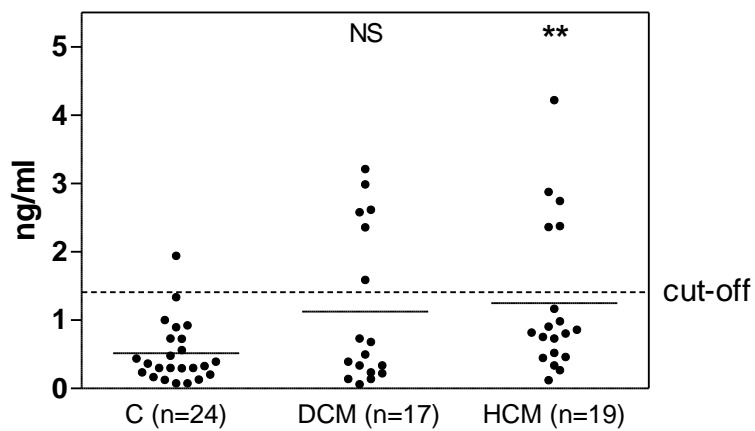
Stanovené množství sérového kalretikulinu u testovaných skupin (Obrázek č. 21) spadalo do intervalu 0,060 ng/ml – 4,220 ng/ml. Nejvyšší hladiny sérového kalretikulinu byly nalezeny u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, a to $1,25 \pm 1,11$ ng/ml (průměr \pm směrodatná odchylka). Rozdíl v množství kalretikulinu v krevním séru mezi skupinou pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolní skupinou krevních dárců ($0,51 \pm 0,45$ ng/ml) byl statisticky signifikantní na hladině významnosti $P < 0,01$. Hladiny sérového kalretikulinu u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií dosahovaly vyšších hodnot

($1,12 \pm 1,15$ ng/ml) ve srovnání s kontrolní skupinou, avšak toto zvýšení nebylo statisticky významně významné.

Z klinického hlediska vyžadujícího definování fyziologických hranic daného znaku byla pro množství sérového kalretikulinu stanovena prahová hodnota (cut-off), od které vnímáme vzorek jako pozitivní. Prahová hodnota byla stanovena identicky jako v případě sérových protilátek proti kalretikulinu, tedy součet průměru a dvojnásobku směrodatné odchylky kontrolní skupiny krevních dárců. Užitím tohoto přístupu lze definovat pozitivitu na sérový kalretikulin u 6 z 17 testovaných pacientů s dilatační kardiomyopatií, u 5 z 19 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a u 1 z 24 osob kontrolní skupiny zdravých krevních dárců. Pacienti se zvýšenými hladinami kalretikulinu v séru se však klinickými symptomy souvisejícími s kardiomyopatií neodlišovali od pacientů s nízkými hladinami kalretikulinu v séru.

Nález statisticky významně zvýšených hladin sérových protilátek proti kalretikulinu u testovaných pacientů s dilatační kardiomyopatií i hypertrofickou kardiomyopatií a současně statisticky významně zvýšené množství kalretikulinu v séru pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií oproti kontrolní skupině krevních dárců vybízelo k úvaze o míře závislosti mezi výškami hladin sérových antikalretikulinových protilátek a množstvím kalretikulinu v sérech pacientů s kardiomyopatiemi. Korelační analýza mezi hladinami IgA a IgG antikalretikulinových protilátek a sérového kalretikulinu neprokázala statisticky významnou závislost: hodnota Spearmanova koeficientu vyjadřující závislost mezi sérovými hladinami IgA antikalretikulinových protilátek a kalretikulinu u pacientů s dilatační kardiomyopatií byla $r_s = 0,46$ ($P = 0,0609$) a mezi hladinami IgG antikalretikulinových protilátek a množstvím kalretikulinu činila $r_s = 0,29$ ($P = 0,2641$). Závislost vztahu mezi hladinami IgA antikalretikulinových protilátek a množstvím kalretikulinu u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií je charakterizována hodnotami $r_s = 0,12$ ($P = 0,6318$) a mezi hladinami IgG antikalretikulinových protilátek a množstvím kalretikulinu $r_s = 0,21$ ($P = 0,3992$).

Obrázek č. 21: Množství kalretikulinu (potenciálního autoantigenu) u pacientů s dilatační kardiomyopatií a hypertrofickou kardiomyopatií



C: kontrolní skupina krevních dárců; DCM: dilatační kardiomyopatie; HCM: hypertrofická kardiomyopatie, n: počet osob ve skupině

5. DISKUZE

Dilatační kardiomyopatie představuje jednu z nejčastějších příčin srdečního selhání, jehož důvodem není ischemická etiologie, a je nejčastější indikací k transplantaci srdce. Výskyt dilatační kardiomyopatie není omezen na určitou věkovou skupinu a ve většině případů není známá její příčina, a proto se označuje jako idiopatická dilatační kardiomyopatie. Při studiu patogeneze dilatační kardiomyopatie vznikla představa o autoimunitní příčině tohoto onemocnění, která se opírala o nález protilátek proti srdečnímu svalu u podskupiny pacientů s touto chorobou (NAGATOMO & TANG 2014).

Nálezy poškození srdečního svalu protilátkami u pokusných zvířat imunizovaných kalretikulinem, rozvoj dilatační kardiomyopatie u transgenních myší s nadprodukovaným kalretikulinem v kardiomyocytech a přítomnost autoprotiátek proti kalretikulinu u některých pacientů s kongenitálním srdečním blokem a Chagasovou chorobou (ORTH et al. 1996, RIBEIRO et al. 2009, LEE et al. 2013) nás vedly k ověření hypotézy, zda u pacientů diagnostikovaných jako idiopatická dilatační kardiomyopatie a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií nejsou přítomny autoprotiátky proti kalretikulinu. Zmíněné skupiny chorob náleží do skupiny primárních kardiomyopatií a liší se jak svou patologickou anatomií, tak i předpokládanou patogenezí, která není u obou onemocnění doposud přesně definována. Zatímco se při vzniku dilatační kardiomyopatie se v některých případech předpokládá účast imunitního systému, příčiny hypertrofické kardiomyopatie jsou spojovány s mutacemi sarkomerických i jiných buněčných proteinů (CHIEN 2003, PORTIG et al. 2009).

V rámci této diplomové práce jsme poprvé popsali výskyt protilátek proti kalretikulinu u pacientů diagnostikovaných jako idiopatická dilatační kardiomyopatie a pacientů s kardiomyopatií hypertrofickou. Statistické analýzy prokázaly u obou skupin pacientů významné zvýšení hladin antikalretikulinových protilátek oproti kontrolní skupině krevních dárců, a to v případě izotypu IgA na hladině významnosti $P < 0,001$, zatímco u izotypu IgG na hladině významnosti $P < 0,05$. Hladiny antikalretikulinových protilátek se mezi pacienty obou skupin statisticky významně nelišily, přestože obě patientské skupiny zahrnovaly klinicky heterogenní populaci nemocných, u kterých nebyla přesně známa

příčina jejich srdečního onemocnění. Diplomová práce je integrální součástí v naší laboratoři dlouhodobě řešené problematiky vztahující se k mapování výskytu, kvantifikaci hladin a analýze specifity sérových antikalretikulinových protilátek a hodnocení klinického významu testování těchto protilátek u pacientů s autoimunitními, imunologicky mediovanými a onkologickými onemocněními. V minulosti jsme vyvinuli a optimalizovali reprodukcibilní ELISA test, jímž jsme stanovovali sérové hladiny IgA a IgG antikalretikulinových protilátek u pacientů s aktivní celiakií, celiakálních pacientů na bezlepkové dietě včetně pacientů s refrakterní celiakií a u pacientů s autoimunitními onemocněními asociovanými s celiakií – primární biliární cirhóza, autoimunitní hepatitida typu I, systémový lupus erytematodes, autoimunitní tyreoiditida, roztroušená skleróza a diabetes mellitus I. typ. Současně byl výskyt antikalretikulinových protilátek v naší laboratoři testován i u pacientů s nespecifickými střevními záněty a alkoholickou cirhózou (TUČKOVÁ et al. 1995, 1997, SÁNCHEZ et al. 2000, 2003).

Vztah mezi kalretikulinem a možnou indukci protinádorové imunity a současně nález antikalretikulinových protilátek u některých pacientů s hepatocelulárním a pankreatickým adenokarcinomem byl prokázán kombinací dvourozměrné elektroforézy a immunoblotu (LE NAOUR et al. 2002, HONG et al., 2004). Tento nález nás vedl k analýze hladin antikalretikulinových protilátek také u pacientů s gastrointestinálními malignitami a u pacientů s rizikem vzniku těchto nádorů – pacientů s virovou hepatitidou C a chronickou pankreatitidou. Současně byly hladiny antikalretikulinových protilátek testovány u pacientů s kolorektálním adenokarcinomem a adenokarcinomem žlučníku (PEKÁRIKOVÁ et al. 2010). Na základě těchto studií jsme byli osloveni Prof. Juranic z Oddělení radiologie a onkologie Lékařské fakulty v Bělehradě a Prof. L. Zitvogel z Institutu Gustave Roussy v Paříži, abychom otestovali hladiny antikalretikulinových protilátek u pacientek s nádory prsu a to nově diagnostikovaných, u kterých ještě nebyla zahájena protinádorová léčba a u pacientek neoadjuvantně léčených.

V předkládané diplomové práci bylo 35 % pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a 34 % pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií séropozitivních na IgA izotyp antikalretikulinových protilátek a 21 % pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a 29 % pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo séropozitivních na IgG antikalretikulinové protilátky. V testovaných skupinách pacientů s kardiomyopatiemi bylo pouze 12 % pacientů s dilatační kardiomyopatií a 16 % pacientů s hypertrofickou

kardiomyopatií séropozitivních na oba izotypy antikalretikulinových protilátek. Nicméně 44 % pacientů s dilatační kardiomyopatií a 47 % pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo séropozitivních alespoň na jeden z testovaných izotypů antikalretikulinových protilátek. Zastoupení séropozitivních pacientů v obou skupinách pacientů s kardiomyopatiemi bylo prokazatelně nižší než u celiakie, autoimunitní hepatitidy typu I, alkoholické cirhózy a u pacientů s gastrointestinálními malignitami. Zastoupení pacientů s kardiomyopatiemi séropozitivních na antikalretikulinové protilátky bylo však vyšší než u nově diagnostikovaných pacientek s nádorem prsu, které navíc vykazovaly selektivně zvýšené hladiny pouze IgA izotypu těchto protilátek ($P < 0,01$, 17/56) nikoliv však hladiny IgG izotypu (ERIC-NIKOLIĆ et al. 2012). Procento séropozitivních pacientů s kardiomyopatiemi bylo také významně vyšší než v případě neoadjuvantně léčených pacientek s nádorem prsu (HANNANI et al. 2014). Podíl pacientů s kardiomyopatiemi séropozitivních alespoň na jeden z testovaných izotypů antikalretikulinových protilátek byl přibližně srovnatelný s podílem pacientů s primární biliární cirhózou séropozitivních na tyto protilátky detekované v našich předchozích studiích (SÁNCHEZ et al. 2003). Reaktivita IgA a IgG protilátek s kalretikulinem u pacientů s kardiomyopatiemi byla potvrzena metodou imunoblotu, a to jak s kompletní molekulou lidského rekombinantního kalretikulinu, tak i s jeho rekombinantním fragmentem odpovídajícím druhé čtvrtině, a také metodou Pepscan využívající soubor syntetických dekapeptidů korespondujících s kompletní molekulou lidského kalretikulinu. U většiny pacientů s celiakií, alkoholickou cirhózou a autoimunitní hepatitidou typu I korespondovala míra séropozitivity mezi izotypy IgA a IgG protilátek proti kalretikulinu, zatímco u testovaných pacientů s kardiomyopatiemi byl nalezen podstatně nižší podíl pacientů současně séropozitivních na oba izotypy protilátek oproti skupině pacientů se zmíněnými gastrointestinálními onemocněními. Nicméně hladiny IgA a IgG antikalretikulinových protilátek vykazovaly statisticky významnou pozitivní korelaci vyjádřenou Spearmanovým korelačním koeficientem, a to u obou skupin pacientů s kardiomyopatiemi, zatímco Demingova regresní analýza prokázala statisticky významnou závislost mezi hladinami IgA a IgG antikalretikulinových protilátek pouze u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Objektivní srovnání míry séropozitivity a séroprevalence mezi jednotlivými studiemi komplikuje skutečnost, že standardní sérum bylo v každé studii tvořeno směsí odlišných sér a soubor kontrolní skupiny krevních dárců se v každé studii také zčásti lišil, což v určité

míře ovlivnilo prahovou hodnotu (cut-off), od které vnímáme sérum jako pozitivní. Jednotlivé skupiny testovaných pacientů pocházely také z různých oblastí Evropy (Velká Británie, Spolková republika Německo, Nizozemí, Srbsko, Francie a Česká republika). Při hodnocení a interpretaci séropozitivity na antikalretikulinové protilátky a srovnávání hladin antikalretikulinových protilátek mezi skupinami pacientů z různých studií by měla být brána v úvahu skutečnost, že do testování byli zařazeni pacienti diagnostikováni dle stejných kritérií, avšak s rozdílným genotypem, odlišnou příčinou onemocnění, jinými stravovacími návyky a specifickým mikrobiálním osídlením.

Klinický význam protilátek proti kalretikulinu dokumentuje skutečnost, že přibližně u poloviny séropozitivních pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií i kardiomyopatií hypertrofickou bylo možno průkazně detekovat IgG izotyp těchto protilátek při zředění séra 1/1600 a IgA izotyp a IgA1 subtyp při ředění 1/800. Výskyt a zastoupení antikalretikulinových protilátek podtříd IgA1, IgA2 a IgG1 – IgG4 nebylo doposud u žádného onemocnění studováno. V předkládané diplomové práci je tedy poprvé prokázána séropozitivita protilátkových subtypů IgA1, IgA2 a IgG1 – IgG3 u části pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. U testovaných sér pozitivních na protilátky proti kalretikulinu bylo možno reprodukovatelně prokázat přítomnost subtypů IgA2 a IgG1 – IgG3 protilátek proti této molekule v titru 1/200. Subtyp IgG4 antikalretikulinových protilátek byl prokázán v titru 1/200 pouze u jednoho pacienta v každé testované patientské skupině. Na základě výsledků této diplomové práce lze konstatovat, že u části pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a části pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií se průkazně vyskytují zvýšené hladiny sérových protilátek proti kalretikulinu.

Prevalence protilátek proti kalretikulinu prokázaná v této diplomové práci u pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií přibližně odpovídala popsané prevalenci protilátek proti β -adrenergnímu receptoru (MAGNUSSON et al. 1990) a protilátek proti aminokyselinové sekvenci 169 – 193 druhé extracelulární smyčky muskarinového receptoru M2 u pacientů s idiopatickou kardiomyopatií (FU et al. 1993).

Výsledky testování hladin antikalretikulinových protilátek získané ELISA testy i výsledky analýz B-buněčných epitopů metodou Pepscan naznačují rozvinutou a robustní

protilátkovou odpověď proti molekule kalretikulinu u některých pacientů, jež je podmíněná afinitní maturací a izotypovým přesmykem a izotypovou a subtypovou sérokonverzí. Pravděpodobné je i rozšiřování množství protilátkami rozpoznávaných epitopů (*epitope spreading*) v průběhu imunitní reakce proti kalretikulinu u séropozitivních pacientů. Uvážíme-li navíc skutečnost, že zvýšené hladiny antikalkretikulinových protilátek byly doposud prokázány pouze v asociaci s některými autoimunitními a onkologickými onemocněními a jen ojediněle u kontrolní skupiny krevních dárců, lze oprávněně předpokládat, že detekované antikalkretikulinové protilátky nejsou protilátkami přirozenými. Analýza B-buněčných epitopů metodou Pepscan u pacientů s kardiomyopatiemi, kteří byli v ELISA testech séropozitivní na protilátky proti kalretikulinu ve třídě IgA či IgG, prokázala preferenční rozpoznávání několika epitopů protilátkami většiny testovaných sér. Distribuce těchto klíčových imunodominantních epitopů nevylučuje ani možnost existence konformačních epitopů na molekule kalretikulinu, jež jsou protilátkami (B buňkami) rozpoznávány. Možnost existence konformačních epitopů naznačuje silná reaktivita patientských protilátek proti několika vzájemně topograficky izolovaným sekvencím na molekule kalretikulinu.

Analýzou B-buněčných epitopů kalretikulinu rozpoznávaných sérovými IgA či IgG protilátkami pacientů, u nichž jsme antikalkretikulinové protilátky prokázali s vyšší prevalencí (pacientů s aktivní celiakií, refrakterní celiakií, autoimunitní hepatitidou, primární biliární cirhózou, hepatocelulárním karcinomem a adenokarcinomem pankreatu), se zabývalo několik našich studií. Pro podání co nejobektivnějšího obrazu našich dosavadních nálezů, vztahujících se k analýze antigenních epitopů kalretikulinu rozpoznávaných patientskými protilátkami, je nutné zmínit skutečnost, že sérové protilátky pacientů s imunologicky mediovanými gastrointestinálními onemocněními výrazněji reagovaly se souborem dekapeptidů kalretikulinu ve srovnání s protilátkovou reaktivitou pacientů s gastrointestinálními malignitami. Analýza detailní specifity protilátek proti kalretikulinu u pacientů s výše zmíněnými gastrointestinálními onemocněními dokumentuje přítomnost antigenních epitopů ve všech třech doménách kalretikulinové molekuly (N, P, C). Zajímavé je, že převážná část imunodominantních epitopů kalretikulinu nebyla specificky rozpoznávána protilátkami pacientů pouze jedné patientské skupiny, nýbrž byla obvykle rozpoznávána protilátkami pacientů z různých patientských skupin (SÁNCHEZ et al. 2000, 2003, 2008, PEKÁRIKOVÁ et al. 2010).

V rámci řešení diplomové práce bylo charakterizováno několik kalretikulinových peptidů rozpoznávaných přinejmenším polovinou testovaných sér pacientů s kardiomyopatiemi, jež byli pozitivní v antikalretikulinových protilátkách: EVKIDNSQVESGSLED, IDDPTDSKPE, DKAPEHIPDPDA a RKEEEEAEDKEDDAEDKDEDEEDE. Porovnání specifit antikalretikulinových protilátek analyzovaných v našich předcházejících studiích se specifitou antikalretikulinových protilátek u pacientů s kardiomyopatiemi naznačuje možné selektivní rozpoznávání peptidu IDDPTDSKPE sérovými protilátkami pacientů s kardiomyopatiemi, zatímco imunodominantní sekvence N domény EVKIDNSQVESGSLED obsahovala epitop EVKIDNSQVESG, který byl rozpoznáván také protilátkami všech testovaných pacientů s hepatocelulárním karcinomem a pankreatickým adenokarcinomem. Epitop P domény DKAPEHIPDPDA rozpoznávaly také protilátky pacientů s pankreatickým adenokarcinomem a aminokyselinová sekvence RKEEEEAEDKEDDAEDKDEDEEDE obsahovala epitop významně rozpoznávaný protilátkami pacientů s pankreatickým adenokarcinomem. Epitop N-domény KGKNVLINKD, který byl imunodominantní pro pacienty s celiakií, refrakterní celiakií, autoimunitní hepatitidou, primární biliární cirhózou a alkoholickou cirhózou, nebyl výrazně rozpoznáván pacienty s kardiomyopatiemi. Analýza B-buněčných antigenních epitopů metodou Pepsan představuje efektivní metodický přístup pro analýzu specifity protilátek resp. B-buněčných epitopů, avšak umožňuje přesvědčivě získat informace pouze o lineárních epitopech studované molekuly. Imunogenicitu kalretikulinu však mohou vytvářet také konformační epitopy podmíněné terciální a kvartérní strukturou, která je formovaná interakcí kalretikulinu s jinými molekulami (SÁNCHEZ et al. 2000, 2003, 2008, PEKÁRIKOVÁ et al. 2010).

V současné době není pochyb o multivalentním vztahu mezi kalretikulinem, protinádorovou imunitou a autoimunitou. V experimentální terapii některých onkologických onemocnění se využívá imunogenicity kalretikulinu pro aktivaci imunitního systému pacienta. Imunogenicitu kalretikulinu prokazatelně zvyšuje jeho přirozená interakce s jinými buněčnými proteiny a zejména intracelulárními glykoproteiny (BASU & SRIVASTAVA 1999, ZITVOGEL et al. 2010). Nutnou podmínkou je však jeho translokace na buněčný povrch, které lze kontrolovaně docílit alespoň *in vitro* expozicí nádorových buněk antracyklinovými antibiotiky (doxorubicin, doxacyklin). Kalretikulin na

buněčném povrchu je považován za dominantní profagocytický signál, který se podílí na zprostředkování internalizace antigenních složek imunokompetentními buňkami (CHAO et al. 2010), které na základě kvality antigenu, aktivačního stavu imunocyty a kvality tkáňového prostředí polarizují imunitní odpověď. Polarizace imunitní odpovědi organismu při onemocnění pravděpodobně rozhoduje o úloze kalretikulinu translokovaného na buněčný povrch či do extracelulárních prostor. Vysoká imunogenita byla však důvodem proč považovat kalretikulin za důležitý autoantigen. U některých revmatologických onemocnění, zejména u systémového lupus erythematoses, byl kalretikulin identifikován jako součást nukleoproteinového komplexu Ro/SS-A, který tvořil složku depozit v postižené tkáni a působil patogenně (CHENG et al.1996).

Patogenetická úloha sérových protilátek proti kalretikulinu podobně jako příčina jejich vzniku nebyly doposud objasněny. Imunizace myši jak lidským rekombinantním kalretikulinem, tak rekombinantním antigenem trypanozómy způsobila kromě rozvoje antikalretikulinových protilátek u těchto zvířat degenerativní změny srdečního svalu charakterizované fragmentací myofibril, infiltrací imunocytů, z nichž dominovaly CD3+ T lymfocyty, srdečním edémem a eozinofilií. Protilátky specifické pro kalretikulin trypanozómy vytvářené u imunizovaných myši se *in vitro* vázaly na povrchové struktury jejich kardiomyocytů. Současně byla u imunizovaných zvířat popsána křížová reaktivita protilátek mezi kalretikulinem lidským a kalretikulinem trypanozómy (RIBEIRO et al. 2009). Kalretikulin je považován za dominantní antigen *Trypanosoma cruzi*, která endemicky způsobuje Chagasovu chorobu, při které se u některých pacientů vyvíjejí antikalretikulinové protilátky. Přibližně třetina pacientů trpících chronickou formou Chagasovy choroby vyvíjí dilatační kardiomyopatii (Chagasova kardiomyopatie). Imunitní reakce proti buněčným složkám tohoto parazita včetně kalretikulinu (který je vysoce homologní s kalretikulinem lidským) by mohla být jedna z možných příčin vzniku Chagasovy kardiomyopatie. Příspěvek imunitního systému v patogenezi Chagasovy kardiomyopatie je dokumentován také infiltrací T buněk s predominancí T_H1 populace v srdečních lézích pacientů (CUNHA-NETO & CHEVILLARD, 2014).

Patogenní úloha antikalretikulinových protilátek se pravděpodobně uplatňuje také v případě lidského kongenitální srdečního bloku, pro který je charakteristická blokáce přenosu signálu v převodním systému srdečním (ORTH et al. 1996). V případě idiopatické dilatační kardiomyopatie a hypertrofické kardiomyopatie byla zvýšená prevalence

antikalretikulínových protilátek popsána poprvé v rámci této diplomové práce. Pacienti séropozitivní na antikalretikulínové protilátky se klinickým nálezem vztahujícím se k jejich srdečnímu onemocnění nelišili od pacientů séronegativních. Testování pacientů v době odběru nevykazovali znaky onemocnění asociovaných s výskytem antikalretikulínových protilátek, ani indikátory onemocnění infekčních. Nicméně jsou známy případy, kdy výskyt specifických protilátek může předcházet klinickým projevům některých onemocnění (NIELEN et al. 2004, KOBOLD et al. 2010, DELLAVANCE & COELHO ANDRADE 2014, GULTEKIN et al. 2000).

Kardiologičtí pacienti, jejichž sér bylo užito v předkládané diplomové práci pro studium výskytu antikalretikulínových protilátek, byli bez známek jiného autoimunitního onemocnění. Nicméně průkaz vysokého titru antikalretikulínových protilátek u některých z těchto pacientů naplňuje jedno z kritérií pro autoimunitní onemocnění charakterizované Rosem (ROSE & BONA 1993). Příčiny vzniku antikalretikulínových protilátek, podobně jako jiných protilátek proti autologním antigenům, mohou být u jednotlivých pacientů odlišné. Detekce protilátek proti kalretikulínu však může být v některých případech i výsledkem křížové reaktivity s jiným např. mikrobiálním antigenem. Křížová reaktivita protilátek mezi složkami mikrobioty (streptokoky, coxsackie virus) a antigeny srdečního svalu je považována za patogeticky relevantní při vzniku karditid (GULIZIA et al. 1991, MAISCH et al. 1993, WU et al. 1998).

Vztahem mezi hladinami antikalretikulínových protilátek a vybranými klinickými parametry u pacientů s gastrointestinálními malignitami jsme se zabývali ve studii PEKÁRIKOVÉ et al. (2010). Míra séropozitivity na antikalretikulínové protilátky však nekorespondovala s pozitivitou pacientů na vybrané nádorové znaky (alfa-fetoprotein, karcinoembryonální antigen, Ca 19-9) ani s kvantitativní změnou v biochemických indikátorech (albumin, bilirubin, aspartát a alanin aminotransferázy, alfa-amylázy). Hladiny antikalretikulínových protilátek nekorelovaly ani s velikostí primárního nádoru ani s přítomností, velikostí a lokalizací metastáz. Studie také neprokázala vztah mezi hladinami antikalretikulínových protilátek a indexem tělesné hmotnosti (Body Mass Index, BMI) ani věkem onkologických pacientů (PEKÁRIKOVÁ et al. 2010). Oproti tomu, zvýšené hladiny IgA antikalretikulínových protilátek byly častěji přítomné u pacientek s nádorem prsu metastazujícím do lokoregionálních lymfatických uzlin (ERIC-NIKOLIĆ et al. 2012).

Patogenetická úloha antikalretikulinových protilátek u onemocnění je doposud neznámá. Je však pravděpodobné, že stejně jako mohou být odlišné příčiny jejich vzniku, mohou antikalretikulinové protilátky u jednotlivých pacientů působit rozdílně na základě izotypu a subtypu, afinity a přítomnosti a kvality sacharidických složek. Současně však může být působení antikalretikulinových protilátek ovlivněno mírou exprese a vzájemného poměru a polymorfizmu aktivačních a inhibičních Fc receptorů na imunokompetentních buňkách pacienta. Antikalretikulinové protilátky by mohly působit ve formě imunokomplexů patogeneticky. Imunokomplexy ukládané do tkání způsobují aktivaci komplementu a rezidentních makrofágů a atrakci a aktivaci monocytů a granulocytů. Pravděpodobně však antikalretikulinové protilátky působí nejspíše imunomodulačně. Získání představy o působení antikalretikulinových protilátek při onemocněních by mohly umožnit studie na zvířecích modelech. Sérum pacientů s vysokým titrem protilátek proti kalretikulinu by mohlo být přeneseno do myši typu RAG (RAG 1, RAG2), u kterých se nemohou plně diferencovat B a T buňky z důvodu delece *RAG1* či *RAG2* genu (MOMBAERTS et al. 1992, SHINKAI et al. 1992). RAG myši nemohou generovat imunoglobuliny, které by blokovaly biologické aktivity opakovaně přenášených patientských protilátek. Příspěvek ostatních složek imunitního systému při působení antikalretikulinových protilátek by mohl být analyzován využitím myších monoklonálních protilátek proti kalretikulinu, a to jak u zmíněných RAG myši, u kterých jsou zachovány plně funkční NK buňky, jež se navíc vyskytují abundantně, tak i v konvenčním myším modelu. Aplikace syngenních antikalretikulinových protilátek by umožňovala přirozenou interakci Fc části imunoglobulinů s Fc receptory buněk recipientní myši. Studium vlastností antikalretikulinových protilátek by mohlo být doplněno o jejich společnou aplikaci s molekulou kalretikulinu. Pro tyto účely zamýšlíme vytvořit ve spolupráci s pracovištěm B-Cell Design z Francie, reprezentovaným dr. G. Champierem, hybridní humanizované protilátky složené z myšího imunoglobulinového lehkého řetězce a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu alfa, gama či epsilon, které jsou již komerčně dostupné.

V případě kalretikulinu je známá – alespoň z myších experimentálních modelů – jeho fyziologicky snížená exprese v kardiomyocytech v postnatálním období (GUO et al. 2002, LEE et al. 2013). Nadprodukce kalretikulinu v kardiomyocytech a jeho translokace na buněčný povrch či jeho uvolnění z buněk do extracelulárních prostor je nutný předpoklad pro jeho rozpoznání imunitním systémem a případnou indukci autoimunitní

reakce namířenou proti této molekule. Fyziologicky nízká exprese kalretikulinu v kardiomyocytech je nezbytná pro fyziologickou funkci v srdci v postnatálním období (MESAELI et al. 1999). Aberantní exprese kalretikulinu v kardiomyocytech a jeho translokace na povrch těchto buněk simulovaná xenobiotiky či infekcí by mohla vést k tvorbě antikalretikulinových protilátek a následně k jejich vazbě na kalretikulin lokalizovaný na povrchu buněk srdečního svalu. Kalretikulin je však současně stresovým proteinem, jehož zvýšená exprese a extracelulární translokace mohou být způsobeny chronickým zánětem provázeným destrukcí tkáně (MICHALAK et al. 1999, EGGLETTON et LLEWELLYN 1999). Vazbou na povrchový kalretikulin by protilátky mohly ovlivnit jeho extracelulární aktivity, nebo být v komplexu s kalretikulinem internalizovány. Antikalretikulinové protilátky by mohly v rámci endocytických drah, pro které je charakteristické prooxidační prostředí, blokovat některé z promiskuitních interakcí kalretikulinu s buněčnými proteiny a tak interferovat s jejich funkcí.

Buněčná morfologie kardiomyocytů a myocytů kosterních svalů je charakteristická přítomností T-tubulů, které představují hluboké invaginace sarkolemy v blízkosti sarkoplazmatického retikula a jsou spojené s kontraktilní funkcí. Významné snížení hustoty těchto T-tubulů na kardiomyocytech bylo prokázáno při analýze srdeční tkáně všech pacientů, jež podlehli srdečnímu selhání, včetně pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (LYON et al. 2009). Vliv remodelace T tubulů na elektromechanickou dysfunkci kardiomyocytů byl studován v modelu hypertrofické kardiomyopatie využívající transgenní myši $\Delta 160E$ cTnT (MOORE et al. 2013) s mutací srdečního troponinu T (CROCINI et al. 2016). T-tubulární defekt u kardiomyocytů těchto myší vedl k jejich mechanické dysfunkci spojené s narušením uvolnění vápníku a zpožděnou aktivací myofilament (CROCINI et al. 2016).

V případě ektopické translokace kalretikulinu na povrch kardiomyocytů v blízkosti T-tubulů by interakce antikalretikulinových protilátek s kalretikulinem mohla vést k internalizaci celého komplexu. Následnou fúzí endocytického vesikulu obsahujícího komplex antikalretikulinových protilátek a kalretikulinu se sarkoplazmatickým retikulem by mohlo být narušeno uvolňování vápníku a s ním související kontraktilní funkce.

Rozptýl hodnot hladin antikalretikulinových protilátek u testovaných pacientů s kardiomyopatiemi podobně jako u dříve testovaných sér pacientů s gastrointestinálními a

onkologickými onemocněními indikuje značnou variabilitu v protilátkové odpovědi testovaných pacientů. Zmíněná variabilita je pravděpodobně způsobena individuálně-specifickými patologickými změnami u pacientů, rozdílným genetickým pozadím, medikací či biologickými vlivy (mikrobiotou). Zejména kontakt rozvíjejícího se imunitního systému s odlišným spektrem antigenů ovlivní v kontextu genotypu následnou imunologickou reaktivitu. V souvislosti se vznikem imunologické reaktivity proti autologním antigenům se jeví velmi důležitá mikrobiální kolonizace a její změny v průběhu života. Profesor Kreisel z Freiburgské univerzity předpokládá, že vznik autoprotilátek proti kalretikulínu u pacientů s autoimunitními onemocněními jater může být také důsledkem mikrobiální infekce působící prostřednictvím stimulace imunitního systému a mechanismem molekulární mimikry, tedy podobností molekul infekčního agens s tkáňovými antigeny, čímž může restimulovat anergizované patogenetické autoreaktivní T a B lymfocyty (KREISEL et al. 1999).

Přestože se nálezy antikalretikulinových protilátek u pacientů diagnostikovaných jako dilatační kardiomyopatie jeví přesvědčivé, hladiny specifických protilátek mohou být ovlivněny jak celkovou hladinou imunoglobulinů příslušných izotypů a subtypů, jejich stabilitou, tak i křížovou reaktivitou s doposud neznámým antigenem. Tento fakt komplikuje i klinické hodnocení nálezu specifických, diagnosticky rutinně využívaných protilátek u pacientů s alterací imunitního systému (CZAJA 2012, COLLINS et al. 2013, GUILHEM et al. 2013).

Příspěvek imunitního systému v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění není doposud objasněn. Přímý patogenetický vliv specifických protilátek na poškození srdce byl experimentálně prokázán imunizací králíků molekulou muskarinového receptoru M2 či peptidy korespondujícími s druhou, extracelulární smyčkou tohoto receptoru, která indukovala dilatační kardiomyopatii, kterou byla postižena pravá srdeční komora. Histologická analýza tkáně postižené oblasti srdce pokusných zvířat prokázala postižení fokální myofibrilární lýzou, ztrátou myofilament, mitochondriální kondenzací, vakuolizací sarkoplazmy a depozicí denzích granul v sarkoplazmě kardiomyocytů (MATSUI et al. 1997).

Přítomnost autoprotilátek u některých srdečních onemocnění je nezpochybnitelná. Odmítání představy o relevantní úloze autoprotilátek v patogenezi orgánově specifických autoimunitních onemocnění včetně kardiomyopatií spočívala ve skutečnosti, že identifikované autoantigeny rozpoznávané protilátkami pacientů jsou exprimované na

většinu tkání v organismu. Navzdory této skutečnosti bylo u autoprotilátek proti β adrenergnímu a muskarinovému receptoru prokázáno přímé patogenetické působení u srdečních onemocnění, přestože se jejich exprese neomezuje pouze na buňky srdečního svalu (LIMAS et al. 1989, IWATA et al. 2001, DANDEL et al. 2012, MÜLLER et al. 2000, SCHIMKE et al. 2001). Autoprotilátky proti angiotenzinovému receptoru prvního typu mají přímý patogenetický efekt v akutním koronárním syndromu, který je přisuzován schopnosti těchto protilátek stimulovat produkci prozánětlivých cytokinů (DA SILVA et al. 2014, LI et al. 2014). Protilátky proti aminokyselinové sekvenci 169 – 193 druhé extracelulární smyčky muskarinového receptoru M2 způsobovaly negativní chrono- a ionotropní efekt, byly schopné inhibovat andenylát cyklázovou aktivitu a snižovat kontraktilitu srdečních komor, jehož důsledkem bylo srdeční selhání (PATEL et al. 2009, FREEDMAN & LEFKOWITZ 2004). Možnost patogenního působení autoprotilátek u srdečních onemocnění podporuje průkaz terapeutického efektu, který následuje po jejich eliminaci z krevního oběhu plazmaferézou. Komplexní úlohu imunitního systému v patogenezi dilatační kardiomyopatie dokumentuje skutečnost, že zmíněný terapeutický efekt plazmaferézy u těchto pacientů byl závislý na přítomnosti alely Fc γ RIIa R/R131 (STAUDT et al. 2010).

Účast imunitního systému v patogenezi idiopatické dilatační kardiomyopatie naznačuje i srovnání množství a zastoupení lymfocytární populace mezi zdravou tkání srdečního svalu a alterovanou tkání srdce postiženého tímto onemocněním. Srdce pacientů postižených idiopatickou dilatační kardiomyopatií vykazovalo zvýšenou leukocytární infiltraci zahrnující buňky B, T, makrofágy a granulocyty. Imunocytární infiltrát je charakteristický relativním nárůstem zastoupení CD8⁺T buněk a makrofágů v infiltrující populaci imunocytů oproti zdravé srdeční tkáni. Oproti zdravému srdci je srdeční tkáň pacientů postižených dilatační kardiomyopatií charakteristická perivaskulární leukocytární infiltrací s dominancí IL-2R⁺ a CD45RO⁺ aktivovaných paměťových T lymfocytů. Ve srovnání se zdravou tkání přibližně 40 % CD4⁺ a CD8⁺ T buněk exprimovalo aktivační znaky IL-2R α , IL-2R β , IL-7R, HLA-DR a VLA-1 (HOLZINGER et al. 1995). Expresse antigenů HLA-DR na kardiomyocytech u podskupiny pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií je kromě již zmíněné přítomnosti definovaných autoprotilátek další ze znaků autoimunitního onemocnění, jež definoval Rose. Míra exprese HLA-DR antigenů na

kardiomyocytech těchto pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií byla asociována se zvýšeným množstvím cirkulujících CD4+ lymfocytů, jež exprimovaly cytokinový profil T_H2 buněk (IL-4, IL-5). Tento náleznaznačuje patogenetickou úlohu T_H2 lymfocytů a potažmo také protilátek u některých pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií (KUETHE et al. 2006).

V rámci této diplomové práce byla prokázána statisticky signifikantně zvýšená koncentrace kalretikulinu v sérech pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, avšak zvýšené koncentrace kalretikulinu byly prokázány i v některých sérech pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií. Hladiny kalretikulinu u pacientů s testovanými kardiomyopatiemi statisticky významně nekorelovaly s hladinami antikalretikulinových protilátek a proto lze předpokládat, že přítomnost kalretikulinu v krevním séru neinterferuje s hladinou antikalretikulinových protilátek. Kalretikulin uvolněný do krve by mohl s antikalretikulinovými protilátkami vytvářet imunokomplexy aktivující komplement a buňky přirozené imunity, zejména po jejich depozici ve tkáních. Přítomnost kalretikulinu v krvi testovaných osob vyvolává úvahu o hodnotě jeho biologického poločasu a jeho schopnosti vazby na krevní bílkoviny a povrchy buněk i o zdroji jeho uvolňování.

Výskyt kalretikulinu v krevním séru poprvé popsal v souvislosti s onemocněním systémový lupus erythematoses KISHORE et al. (1997). U pacientů s Alzheimerovou chorobou byly recentně testovány sérové hladiny kalretikulinu skupinou LIN et al. (2014), která spojuje jejich pokles s progresí onemocnění. Nález zvýšené koncentrace kalretikulinu v krevním séru pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, který dokumentuje tato diplomová práce, však doposud popsán nebyl. Přítomnost autologního kalretikulinu v extracelulárním prostředí, který se vyskytuje u systémového lupus erythematoses (KISHORE et al. 1997) i xenogenního kalretikulinu, uvolněného z těla parazitů, které popsal XIMÉNEZ et al. (2014), může způsobit inhibici aktivace klasické dráhy komplementu prostřednictvím jeho vazby k C1q komponentě. Inhibice aktivace klasické dráhy komplementu je jedním z předpokládaných patogenetických mechanismů u systémového lupus erythematoses a též obranou strategií parazitů před atakem imunitního systému hostitele (KISHORE et al. 1997, XIMÉNEZ et al. 2014).

Krevní sérum nebylo jedinou tělní tekutinou, ve které byla přítomnost kalretikulinu popsána. Zvláštní pozornost je věnována výskytu kalretikulinu v moči. Přítomnost kalretikulinu v moči je považována za možný doplňkový diagnostický či prognostický znak

karcinomů derivovaných z urotelu, jehož stanovení by nebylo spojeno se zátěží pacientů invazivním odběrem testovaného materiálu (KAGEYAMA et al. 2009).

Výsledky předkládané v této diplomové práci indikují výskyt antikalretikulinových autoprotilátek a autoantigenu kalretikulinu v sérech některých pacientů diagnostikovaných jako idiopatická dilatační kardiomyopatie a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Rozvinutá protilátková reaktivita proti kalretikulinu u těchto pacientů naznačuje možné autoimunitní pozadí vzniku jejich onemocnění, jejichž příčina je stále neznámá. Přítomnost sérových antikalretikulinových autoprotilátek by mohla sloužit jako další kritérium pro vymezení skupiny kardiologických pacientů, v jejichž patogenezi hrají roli autoimunitní mechanismy. Tuto představu budeme v naší laboratoři následně ověřovat testováním hladin antikalretikulinových protilátek a kalretikulinu v sérech pacientů s kardiomyopatiemi ve spolupráci s kardiologem dr. Ph. Sallé (Abbeville, Francie), který nám nabídl spolupráci na základě prezentace výsledků předkládaných v této diplomové práci na 10. mezinárodním kongresu o autoimunitě konaném v Lipsku 6. – 10. 4. 2016.

6. ZÁVĚRY

A) Existence doposud nepopsané rozvinuté a robustní protilátkové odpovědi proti kalretikulinu u významné části pacientů diagnostikovaných jako idiopatická dilatační kardiomyopatie a u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií byla prokázána na základě:

A1) statisticky signifikantně zvýšených hladin sérových IgA ($P < 0,001$) a IgG ($P < 0,05$) protilátek proti kalretikulinu stanovených metodou ELISA u obou skupin pacientů oproti kontrolní skupině krevních dárců; 12 z 34 pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a 13/38 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo séropozitivních na IgA protilátky proti kalretikulinu a 7/34 pacientů s idiopatickou dilatační a 11/38 pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií bylo séropozitivních na IgG protilátky proti kalretikulinu (pouze 2 ze 79 sér kontrolní skupiny krevních dárců byla pozitivní na IgA a 1 ze 79 na IgG protilátky proti kalretikulinu)

A2) titračních analýz antikalretikulinových protilátek IgA a IgG izotypů a subtypů IgA1, IgA2, IgG1-IgG3, které dokumentují u pěti séropozitivních pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a pěti pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií antikalretikulinové protilátky v titrech 1/1600 (IgG), 1/800 (IgA, IgA1) a alespoň v titru 1/200 (IgG1, IgG2, IgG3)

A3) průkazu reaktivity protilátek s rekombinantním kalretikulinem a jeho fragmentem metodou imunoblotu

A4) pilotních analýz antigenních epitopů kalretikulinu rozpoznávaných patientskými sérovými IgA a IgG protilátkami metodou Pepscan: EVKIDNSQVESGSLED, IDDPDTSKPE, DKAPEHIPDPDA, RKEEEEAEDKEDDAEDKDEDEEDE

B) Testování sérových hladin kalretikulinu u pacientů s dilatační kardiomyopatií a kardiomyopatií hypertrofickou prokázalo statisticky významné zvýšení sérové koncentrace tohoto autoantigenu ve skupině pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií ($P < 0,01$, 5/19); také 6 ze 17 pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a 1 krevní dárce ze 24 testovaných byli pozitivní na přítomnost kalretikulinu

C) Přítomnost autoprotilátek proti kalretikulinu a zvýšená koncentrace kalretikulinu v sérech skupiny pacientů s idiopatickou dilatační kardiomyopatií a pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií naznačuje možnou účast kalretikulinu a antikalretikulinových protilátek v patogenezi těchto chorob.

7. PŘEHLED LITERATURY

Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2008; 19: 104 – 110.

Ansel JC, Mountz J, Steinberg AD, DeFabo E, Green I. Effects of UV radiation on autoimmune strains of mice: increased mortality and accelerated autoimmunity in BXSB male mice. *J. Invest. Dermatol.* 1985; 85: 181 – 186.

Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: from structure to function. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2000; 36: 237 – 295.

Arbustini E, Narula N, Tavazzi L, Serio A, Grasso M, Favalli V, Bellazzi R, Tajik JA, Bonow RO, Fuster V, Narula J. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 64: 304 – 318.

Arosa FA, de Jesus O, Porto G, Carmo AM, de Sousa M. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 16917 – 16922.

Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 1153 – 1159.

Baksh S, Michalak M. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 21458 – 21465.

Baksh S, Spamer C, Heilmann C, Michalak M. Identification of the Zn²⁺ binding region in calreticulin. *FEBS Lett.* 1995; 376: 53 – 57.

Bastianutto C, Clementi E, Codazzi F, Podini P, De Giorgi F, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T. Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J. Cell Biol.* 1995; 130: 847 – 855.

Basu S, Binder RJ, Ramagalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14: 303 – 313.

Basu S, Srivastava PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 797 – 808.

Björnses P, Aaltonen J, Horelli-Kuitunen N, Yaspo ML, Peltonen L. Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7: 1547 – 1553.

Blank M, Shoenfeld Y. B cell targeted therapy in autoimmunity. *J. Autoimmun.* 2007; 28: 62 – 68.

Bona CA. Postulates defining pathogenic autoantibodies and T cells. *Autoimmunity* 1991; 10: 169 – 172.

Booth C, Koch GL. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1989; 59: 729 – 737.

Bottazzo GF, Todd I, Mirakian R, Belfiore A, Bujol-Borrell R. Organ-specific autoimmunity: a 1986 overview. *Immunol. Rev.* 1986; 94: 137 – 169.

Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 45: 969 – 981.

Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigen in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992; 5: 1734 – 1742.

Camacho P, Lechleiter JD. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca^{2+} waves. *Cell* 1995; 82: 765 – 771.

Capitani M, Sallese M. The KDEL receptor: new function for an old protein. *FEBS Lett.* 2009; 583: 3863 – 3871.

Capote LA, Mendez Perez R, Lymperopoulos. GPCR signaling and cardiac function. *Eur. J. Pharmacol.* 2015; 763: 143 – 148.

Casali P, Notkins AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today* 1989; 10: 364 – 368.

Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 210: 167 – 179.

Cohen IR. Antigenic mimicry, clonal selection and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 2001; 16: 337 – 340.

Collins AM, Batrawy SE, Gordon SB, Ferreira DM. Increased IgG but normal IgA anti-pneumococcal protein antibodies in lung of HIV-infected adults. *Vaccine* 2013; 31: 3469 – 3472.

Corbett EF, Michalak KM, Oikawa K, Johnson S, Campbell ID, Eggleton P, Kay C, Michalak M. The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 27177 – 27185.

Corbett EF, Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 307 – 311.

Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier DC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH, Michalak M. Ca^{2+} regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 6203 – 6211.

Crabtree GR. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2313 – 2316.

Crocini C, Ferrantini C, Scardigli M, Coppini R, Mazzoni L, Lazzeri E, Pioner JM, Scellini B, Guo A, Song LS, Yan P, Loew LM, Tardiff J, Tesi C, Vanzi F, Cerbai E, Pavone FS, Sacconi L, Poggesi C. Novel insights on the relationship between T-tubular defects and contractile dysfunction in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016; 91: 42 – 51.

Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflammation* 2014; 2014: Article ID 683230, 11 stran.

Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 239 – 249.

Czaja AJ. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57: 2248 – 2266.

da Silva FF, Levy RA, de Carvalho JF. Cardiovascular risk factors in the antiphospholipid syndrome. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: Article ID 621270, 6 stran.

Dandel M, Wallukat G, Englert A, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R. Long-term benefits of immunoadsorption in $\beta 1$ -adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Failure* 2012; 14: 1374 – 1388.

Del Cid N, Jeffery E, Rizvi SM, Stamper E, Peters LR, Brown WC, Provoda C, Raghavan M. Models of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 4520 – 4535.

Dellavance A, Coelho Andrade LE. Immunologic derangement preceding clinical autoimmunity. *Lupus* 2014; 23: 1305-1308.

Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 1032 – 1039.

Deubner N, Berliner D, Schlipp A, Gelbrich G, Caforio AL, Felix SB, Fu M, Katus H, Angermann CE, Lohse MJ, Ertl G, Störk S, Jahns R. Cardiac beta1-adrenoceptor autoantibodies in human heart disease: rationale and design of the Etiology, Titre-Course, and Survival (ETiCS) Study. *Eur. J. Heart Failure* 2010; 12: 753 – 762.

Dürrbach A, Baple E, Preece AF, Charpentier B, Gustafsson K. Virus recognition by specific natural antibodies and complement results in MHC I cross-presentation. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 1254 – 1265.

Eggleton P, Llewellyn DH. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scand. J. Immunol.* 1999; 49: 466 – 473.

El Aswad Bel D, Doenhoff MJ, EL Hadidi AS, Schwaeble WJ, Lynch NJ. Use of recombinant calreticulin and cercarial transformation fluid (CTF) in the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni*. *Immunobiology* 2011; 216: 379 – 385.

Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 966: 290 – 303.

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 1999; 286: 1882 – 1888.

Ellgaard L, Riek R, Herrmann T, Güntert D, Braun D, Helenius A, Wüthrich K. NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98: 3133 – 3138.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 2008; 29: 270 – 276.

Elliott PM, Anastakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, Hagege AA, Lafont A, Limongelli G, Mahrholdt H, McKenna WJ, Mogensen J, Nihoyannopoulos P, Nistri S, Pieper PG, Pieske B, Rapezzi C, Rutten FH, Tillmanns C, Watkins H. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 35: 2733–2779.

Erić-Nikolić A, Milovanović Z, Sánchez D, Pekáriková A, Džodić R, Matić IZ, Tučková L, Jevrić M, Buta M, Rašković S, Juranić Z. Overexpression of calreticulin in malignant and benign breast tumors: relationship with humoral immunity. *Oncology* 2012; 82: 48 – 55.

Fadel MP, Dziak E, Lo CM, Ferrier J, Mesaeli N, Michalak M, Opas M. Calreticulin affects focal contact-dependent but not close contact-dependent cell-substratum adhesion. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 15085 – 15094.

Fasolato C, Pizzo P, Pozzan T. Delayed activation of the store-operated calcium current induced by calreticulin overexpression in RBL-1 cells. *Mol. Biol. Cell* 1998; 9: 1513 – 1522.

Feng JF, Radon M, Yadav SP, Im MJ. Calreticulin down-regulates both GTP binding and transglutaminase activities of transglutaminase II. *Biochemistry* 1999; 38: 10743 – 10749.

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 1379 – 1382.

Frickel EM, Riek R, Jelesarov I, Helenius A, Wuthrich K, Ellgaard L. TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 1954 – 1959.

Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur. Heart J.* 2009; 30: 1995 – 2002.

Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Localization of functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 1964 – 1968.

Fu ML, Hoebeke J, Matsui S, Matoba M, Magnusson Y, Hedner T, Herlitz H, Hjalmarson A. Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1994; 72: 15 – 20.

Fu ML. Anti-peptide antibodies against an autoimmune epitope on human muscarinic receptor mimic functional autoantibodies against the same epitope in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 1995; 16 Suppl O: 89 – 91.

Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *BioEssays* 1996; 18: 719 – 730.

Guilhem A, Malcus C, Clarivet B, Plauchu H, Dupuis-Girod S. Immunological abnormalities associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J. Intern. Med.* 2013; 274: 351 – 362.

Gulizia JM, Cunningham MW, McManus BM. Immunoreactivity of anti-streptococcal monoclonal antibodies to human heart valves. Evidence for multiple cross-reactive epitopes. *Am. J. Pathol.* 1991; 138: 285 – 301.

Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000; 123: 1481 – 1494.

Guo L, Lynch J, Nakamura K, Fliegel L, Kasahara H, Izumo S, Komuro I, Agellon LB, Michalak M. COUP-TF1 antagonizes Nkx2.5-mediated activation of the calreticulin gene during cardiac development. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2797 – 2801.

Guo L, Nakamura K, Lynch J, Opas M, Olson EN, Agellon LB, Michalak M. Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 50776 – 50779.

Gutberlet M, Spors B, Thoma T, Bertram H, Denecke T, Felix R, Noutsias M, Schultheiss HP, Kühl U. Suspected chronic myocarditis at cardiac MR: diagnostic accuracy and association with immunohistologically detected inflammation and viral persistence. *Radiology* 2008; 246: 401 – 409.

Guzzo-Merello G, Cobo-Marcos M, Gallego-Delgado M, Garcia-Pavia P. Alcoholic cardiomyopathy. *World J. Cardiol.* 2014; 26: 771 – 781.

Hannani D, Locher C, Yamazaki T, Colin-Minard V, Vetizou M, Aymeric L, Viaud S, Sanchez D, Smyth MJ, Bruhns P, Kroemer G, Zitvogel L. Contribution of humoral immune responses to the antitumor effects mediated by anthracyclines. *Cell Death Differ.* 2014; 21: 50 – 58.

Hardy RR, Hayakawa K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Le-1 B. *Immunol. Rev.* 1986; 93: 53 – 97.

Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* 1997; 7: 193 – 200.

Herda LR, Trimpert C, Nauke U, Landsberger M, Hummel A, Beug D, Kieback A, Dörr M, Empen K, Knebel F, Ewert R, Angelow A, Hoffmann W, Felix SB, Staudt A. Effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin G substitution on cardiopulmonary exercise capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 2010; 159: 809 – 816.

Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J, Paschal BM. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell Biol.* 2001; 152: 127 – 140.

Holzinger C, Schlöhammer A, Imhof M, Reinwald C, Kamer G, Zuckerman A, Wolker E, Steiner G. Phenotypic patterns of mononuclear cells in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92: 2876 – 2885.

Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeonne DM, Longsdon CD, Hanash SM. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 5504 – 5510.

Huang SH, Zhao LX, Hong C, Duo CC, Guo BN, Zhang LJ, Gong Z, Xiong SD, Gong FY, Gao XM. Self-oligomerization is essential for enhanced immunological activities of soluble recombinant calreticulin. *PLoS One* 2013; 8: e64951, 11 stran.

Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L, Mänttari M, Virkkunen H, Pitkänen T, Wahlström E, Palosuo T, Manninen V, Saikku P. Autoimmunity to human heat shock protein 60, Chlamydia pneumoniae infection, and inflammation in predicting coronary risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 431 – 437.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53: e1 – e90.

Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, Weiskopf K, Willingham SB, Raveh T, Park CY, Majeti R, Weissman IL. Calreticulin is dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2: 63ra94, 21 stran.

Chaouch M, Allal Y, De Sandre-Giovannoli A, Vallat JM, Amer-el-Khedoud A, Chaouch A, Sindou P, Hammadouche T, Tazir M, Lévy N, Grid D. The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene. *Neuromuscular Disord.* 2003; 13: 60 – 67.

Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, Helio T, Keren A, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Perrot A, Rapezzi C, Ristic A, Seggewiss H, van Langen I, Tavazzi L. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 2010; 31: 2715 – 2726.

Cheng ST, Nguyen TQ, Yang YS, Capra JD, Sontheimer RD. Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *J. Immunol.* 1996; 156: 4484 – 4491.

Chien KR. Genotype, phenotype: upstairs, downstairs in the family of cardiomyopathies. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 175-178.

Imanaka-Yoshida K, Amitani A, Ioshii SO, Koyabu S, Yamakado T, Yoshida T. Alterations of expression and distribution of the Ca²⁺ – storing proteins in endo/sarcoplasmic reticulum during differentiation of rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996; 28: 553 – 562.

Ireland BS, Brockmeier U, Howe CM, Elliott T, Williams DB. Lectin-deficient calreticulin retains full functionality as a chaperone for class I histocompatibility molecules. *Mol. Biol. Cell* 2008; 19: 2413 – 2423.

Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Nakamura I, Wainai Y, Takahashi T, Ogawa S. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ. Res.* 2001; 88: 578 – 586.

Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010; 375: 752 – 762.

John LM, Lechleiter JD, Camacho P. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J. Cell Biol.* 1998; 142: 963 – 973.

Kageyama S, Isono T, Matsuda S, Ushio Y, Satomura S, Terai A, Arai Y, Kawakita M, Okada Y, Yoshiki T. Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. *Int. J. Urol.* 2009; 16: 481 – 486.

Kardami E, Doble BW. Cardiomyocyte gap junctions: a target of growth-promoting signaling. *Trends Cardiovasc. Med.* 1998; 8: 180 – 187.

Karmakar S, Dixit R, Nath A, Kumar S, Karmakar S. Dilated cardiomyopathy following trastuzumab chemotherapy. *Indian J. Pharmacol.* 2012; 44: 131 – 133.

Karská K, Tučková L, Steiner L, Tlaskalová-Hogenová H, Michalak M. Calreticulin – the potential autoantigen in celiac disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 209: 597 – 605.

Kasaian MT, Casali P. Autoimmunity-prone B-1 (CD5 B) cells, natural antibodies and self recognition. *Autoimmunity* 1993; 15: 315 – 329.

Kaya Z, Leib C, Katus HA. Autoantibodies in heart failure and cardiac dysfunction. *Circ. Res.* 2012; 110: 145 - 158.

Kelly BP, Russell MW, Hennessy JR, Ensing GJ. Severe hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a novel PRKAG2 gene mutation: potential differences between infantile and adult onset presentation. *Pediatr. Cardiol.* 2009; 30: 1176 – 1179.

Keren A, Popp RL. Assignment of patients into the classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 1992; 86: 1622 – 1633.

Khanna NC, Tokuda M, Waisman DM. Conformational changes induced by binding of divalent cations to calregulin. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 8883 – 8887.

Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN, Zappi EG, Hughes GR, Khamashta MA, Reid KB, Eggleton P. The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 108: 181 – 190.

Kobold S, Luetkens T, Cao Y, Bokemeyer C, Atanackovic D. Prognostic and diagnostic value of spontaneous tumor-related antibodies. *Clin. Dev. Immunol.* 2010; 2010: Article ID 721531, 8 stran.

Koskinen O, Lindfors K, Collin P, Peräaho M, Laurila K, Woolley N, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K. Intestinal transglutaminase 2 specific antibody deposits in non-responsive coeliac disease. *Dig. Liver Dis.* 2010; 42: 692 – 697.

Kovacs H, Campbell ID, Strong P, Johnson S, Ward FJ, Reid KBM, Eggleton P. Evidence that C1q binds specifically to C_H2-like immunoglobulin γ motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry* 1998; 37: 17865 – 17874.

Kreisel W, Siegel A, Bahler A, Spamer C, Schiltz E, Kist M, Seilnacht G, Klein R, Berg PA, Heilmann C. High prevalence of antibodies to calreticulin of the IgA class in primary biliary cirrhosis: a possible role of gut-derived bacterial antigens in its aetiology? *Scand. J. Gastroenterol.* 1999; 34: 623 – 628.

Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2014; 13: 549 – 560.

Kueth F, Braun RK, Foerster M, Schlenker Y, Siquusch HH, Kroegel C, Figulla HR. Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathy. Evidence of TH2-type CD4+T lymphocytes an association with myocardial HLA-DR expression. *J. Clin. Immunol.* 2006; 26: 33 – 39.

Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, Kazatchkine MD. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J. Immunol. Methods* 1998; 216: 117 – 137.

Laemli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 1973; 80: 575 – 599.

Lakdawala NK. Using genetic testing to guide therapeutic decisions in cardiomyopathy. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 2013; 15: 387 – 396.

Lappé J, Pelfrey C, Tang WH. Recent insights into the role of autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Card. Failure* 2008; 14: 521 – 530.

Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Bréchet C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 2002; 3: 197 – 203.

Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JR, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, Michalak M. Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2013; 8: e56387, 12 stran.

Leuschner F, Li J, Göser S, Reinhardt L, Ottl R, Bride P, Zehelein J, Pfitzer G, Remppis A, Giannitsis E, Katus HA, Kaya Z. Absence of auto-antibodies against cardiac troponin I predicts improvement of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2008; 16: 1949 – 1955.

Levin MJ, Hoebeke J. Cross-talk between anti-beta1-adrenoreceptor antibodies in dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *Autoimmunity* 2008; 41: 429 – 433.

- Lewey J, Haythe J. Cardiomyopathy in pregnancy. *Semin. Perinatol.* 2014; 38: 309 – 317.
- Li W, Li Z, Chen Y, Li S, Lv Y, Zhou W, Liao M, Zhu F, Zhou Z, Cheng X, Zeng Q, Liao Y, Wei Y. Autoantibodies targeting AT1 receptor from patients with acute coronary syndrome upregulate proinflammatory cytokines expression in endothelial cells involving NF- κ B pathway. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: Article ID 342693, 12 stran.
- Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* 1989; 1: 97 – 103.
- Limas CJ, Iakovis P, Anyfantakis A, Kroupis C, Cokkinos DV. Familial clustering of autoimmune diseases in patients with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 2004; 93: 1189 – 1191.
- Lin Q, Cao Y, Gao J. Serum calreticulin is a negative biomarker in patients with Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: 21740 – 21753.
- Liu N, Fine RE, Simons E, Johnson RJ. Decreasing calreticulin expression lowers the Ca²⁺ response to bradykinin and increases sensitivity to ionomycin in NG-108-15 cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 28635 – 28639.
- Lodish HF, Kong N, Wikström L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 12753 – 12760.
- Lodish HF, Kong N. Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 10893 – 10899.
- Lorscheider F, Vimy M. Mercury and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 819 – 820.
- Lushnikova EL, Klinnikova MG, Molodykh OP, Nepomnyashchikh LM. Morphological manifestations of heart remodeling in anthracycline-induced dilated cardiomyopathy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2004; 138: 607 – 612.
- Lux FA, McCauliffe DP, Büttner DW, Lucius R, Capra JD, Sontheimer RD, Lieu TS. Serological cross-reactivity between a human Ro/SS-A autoantigen (calreticulin) and the lambda Ral-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 1945 – 1951.
- Lynch JM, Chilibeck K, Qui Y, Michalak M. Assembling pieces of the cardiac puzzle; calreticulin and calcium-dependent pathways in cardiac development, health, and disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2006; 16: 65 – 69.
- Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Loss of T-tubes and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 6854 – 6859.
- Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson A, Hoebcke J. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1990; 5: 1658 – 1663.
- Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* 1993; 87 suppl 5: IV 49 – 65.
- Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguillón JC, Ferreira A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop.* 2000; 75: 291 – 300.

Maron BJ. The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is the gold standard. *Circ. Heart Fail.* 2008; 1: 72 – 75.

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation* 1995; 92: 785 – 789.

Maron BJ, Ommen SR, Semsarian C, Spirito P, Olivetto I, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy: present and future, with translation into contemporary cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 64: 83 – 99.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; 113: 1807 – 1816.

Matsui S, Fu ML, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N, Murakami E, Hoebcke J, Hjalmarson A. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997; 29: 641 – 655.

Matsui S, Fu ML, Shimizu M, Fukuoka T, Teraoka K, Takekoshi N, Murakami E, Hjalmarson A. Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein-coupled cardiovascular receptors. *Autoimmunity* 1995; 2: 85 – 88.

Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* 1998; 23: 10 – 14.

Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca^{2+} storage and decreases store-operated Ca^{2+} influx. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 9332 – 9339.

Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. Calreticulin is essential for cardiac development. *J. Cell Biol.* 1999; 144: 857 – 868.

Michaelsson M, Riesenfeld T, Jonzon A. Natural history of congenital complete atrioventricular block. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 1997; 20: 2098 – 2101.

Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 1999; 344: 281 – 292.

Michalak M, Lynch J, Groenendyk J, Guo L, Robert Parker JM, Opas M. Calreticulin in cardiac development and pathology. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1600: 32 – 37.

Michalak M. (1996): *Calreticulin*. R.D. Landes, Austin.

Milner RE, Baksh S, Shemanko C, Carpenter MR, Smillie L, Vance JE, Opas M, Michalak M. Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 7155 – 7165.

Moak JP, Barron KS, Hougen TJ, Wiles HB, Balaji S, Sreeram N, Cohen MH, Nordenberg A, Van Hare GF, Friedman RA, Perez M, Cecchin F, Schneider DS, Nehgme RA, Buyon JP. Congenital heart block: development of late-onset cardiomyopathy, a previously underappreciated sequela. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37: 238 – 242.

Mobini R, Staudt A, Felix SB, Baumann G, Wallukat G, Deinum J, Svensson H, Hjalmarson A, Fu M. Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J. Autoimmun.* 2003; 20: 345 – 350.

Mombaerts P, Iacomini J, Jonhson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papioannou VE. RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocyte. *Cell* 1992; 68: 869 – 877.

Moore RK, Grinspan LT, Jimenez J, Guinto PJ, Ertz-Berger B, Tardiff JC. HCM-linked Δ 160E cardiac troponin T mutation causes unique progressive structural and molecular ventricular remodeling in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 58: 188 – 198.

Müller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101: 385 – 391.

Münch G, Boivin-Jahns V, Holthoff HP, Adler K, Lappo M, Truöl S, Degen H, Steiger N, Lohse MJ, Jahns R, Ungerer M. Administration of the cyclic peptide COR-1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti- β 1-adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters. *Eur. J. Heart Failure* 2012; 14: 1230 – 1239.

Nagatomo Y, Tang WH. Autoantibodies and cardiovascular dysfunction: cause or consequence? *Curr. Heart Fail. Rep.* 2014; 11: 500 – 508.

Nakagawa K, Harrison LC. The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 1996; 152: 193 – 236.

Nakamura K, Robertson M, Liu G, Dickie P, Nakamura K, Guo JQ, Duff HJ, Opas M, Kavanagh K, Michalak M. Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J. Clin. Invest.* 2001a; 107: 1245 – 1253.

Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Müller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demarex N, Opas M, Michalak J. Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell Biol.* 2001b; 154: 961 – 972.

Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbrocke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 380 – 386.

Nielsen JB, Hultman P. Mercury-induced autoimmunity in mice. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110 Suppl 5: 877 – 881.

Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The diagnostic and clinical significance of anti-muscarinic receptor autoantibodies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2012; 42: 298 – 308.

Opas M, Szewczenko-Pawlikowski M, Jass GK, Mesaeli N, Michalak M. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J. Cell Biol.* 1996; 135: 1913 – 1923.

Orth T, Dörner T, Meyer Zum Buschenfelde KH, Mayet WJ. Complete congenital heart block is associated with increased autoantibody titers against calreticulin. *Eur. J. Clin. Invest.* 1996; 26: 205 – 215.

Ou WJ, Bergeron JJ, Li Y, Kang CY, Thomas DY. Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 18051 – 18059.

Panda S, Zhang J, Tan NS, Ho B, Ding JL. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria. *EMBO J.* 2013; 32: 2905 – 2919.

Patel PA, Tilley DG, Rockman HA. Physiologic and cardiac roles of beta-arrestins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 46: 300 – 308.

Pekáriková A, Sánchez D, Palová-Jelínková L, Šimšová M, Beneš Z, Hoffmanová I, Drastich P, Janatková I, Mothes T, Tlaskalová-Hogenová H, Tučková L. Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 160: 215 – 222.

Pizarro JC, Boulot G, Bentley GA, Gómez KA, Hoebeke J, Hontebeyrie M, Levin MJ, Smulski CR. Crystal structure of the complex mAb 17.2. and C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* P2 β protein: implication in cross-reactivity. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2011; 5: e1375, 10 stran.

Pordeus V, Szyper-Kravitz M, Levy RA, Vaz NM, Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity: a panorama. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2008; 34: 283 – 299.

Portig I, Sandmoeller A, Kreiling S, Maisch B. HLA-DQB1* polymorphism and associations with dilated cardiomyopathy, inflammatory dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Autoimmunity* 2009; 42: 33 – 40.

Preedy VR, Richardson PJ. Ethanol induced cardiovascular disease. *Br. Med. Bull.* 1994; 50: 152 – 163.

Ribeiro CH, López NC, Ramírez GA, Valck CE, Molina MC, Aguilar L, Rodríguez M, Maldonado I, Martínez R, González C, Troncoso R, Lavandero S, Gingras AR, Schwaeble W, Ferreira A. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity. *Mol. Immunol.* 2009; 46: 1092 – 1099.

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burbán M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnostic strategy. *Circulation* 2003; 107: 2227 – 2232.

Rizvi SM, Mancino L, Thammavongsa V, Cantley RL, Raghavan M. A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region. *Mol. Cell* 2004; 15: 913 – 923.

Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca²⁺ oscillations via an interaction with SERCA2b. *J. Cell Biol.* 2000; 149: 1235 – 1248.

Rokeach LA, Zimmerman PA, Unnasch TR. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3696 – 3704.

Romfh A, McNally EM. Cardiac assessment in duchenne and becker muscular dystrophies. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2010; 7: 212 – 218.

Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* 1993; 14: 426 – 430.

Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos-Daïtsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Calreticulin synthetic peptide analogues: anti-peptide antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 91: 437 – 441.

Rovenský J, Tlaskalová H, Fučíková T, Rauová L, Cebecauer L, Bošák V, Tučková L, Juránková E, Vencovský J, Dostál C. Autoimunita fyziologická a poškodující. *Fórum Imunol.* 1994; 6: 218 – 222.

Rusnak F, Mertz P. Calreticulin: form and function. *Physiol. Rev.* 2000; 80: 1483 – 1521.

Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Doyle MF, Williams DB. Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J.* 1999; 18: 6718 – 6729.

Sánchez D, Palová-Jelínková L, Felsberg J, Šimšová M, Pekáriková A, Pecharová B, Swoboda I, Mothes T, Mulder CJ, Beneš Z, Tlaskalová-Hogenová H, Tučková L. Anti-calreticulin immunoglobulin A (IgA) antibodies in refractory coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153: 351 – 359.

Sánchez D, Tučková L, Mothes T, Kreisel W, Beneš Z, Tlaskalová-Hogenová H. Epitopes of calreticulin recognised by IgA autoantibodies from patients with hepatic and coeliac disease. *J. Autoimmun.* 2003; 21: 383 – 392.

Sánchez D, Tučková L, Šebo P, Michalak M, Whelan A, Šterzl I, Jelínková L, Havrdová E, Imramovská E, Beneš Z, Krupičková S, Tlaskalová-Hogenová H. Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 2000; 15: 441 – 449.

Seemann A, De Prost N, Paoletti MT, Sbidian E, Brun-Buisson C, Valeyrie-Allanore L. Vascular purpura revealing a severe dilated cardiomyopathy with left ventricular apical thrombus. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* 2012; 3: 326 – 328.

Sepa A, Frodi A, Ludvigsson J. Could parenting stress and lack of support/confidence function as mediating mechanisms between certain environmental factors and the development of autoimmunity in children?: a study within ABIS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 958: 431 – 435.

Shinkai U, Rathburn G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG-2 deficient mice lack mature lymphocyte owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992; 68: 855 – 867.

Schimke I, Müller J, Dandel M, Gremmels HD, Bayer W, Wallukat B, Wallukat G, Hetzer R. Reduced oxidative stress in parallel to improved cardiac performance one year after selective removal of anti-beta 1-adrenoreceptor autoantibodies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: data of a preliminary study. *J. Clin. Apher.* 2005; 20: 137 – 142.

Schimke I, Müller J, Priem F, Kruse I, Schon B, Stein J, Kunze R, Wallukat G, Hetzer R. Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 178 – 183.

Schrag JD, Bergeron JJ, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY, Cygler M. The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell* 2001; 8: 633 – 644.

Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur. Heart J.* 2011; 32: 2616 – 2625.

Staněk V. (2014): *Kardiologie v praxi*. Axonite CZ, Praha.

Staudt A, Böhm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, Dahm JB, Borges A, Jochmann N, Wernecke KD, Wallukat G, Baumann G, Felix SB. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 106: 2448 – 2453.

Staudt A, Dörr M, Staudt Y, Böhm M, Probst M, Empen K, Plötz S, Maschke HE, Hummel A, Baumann G, Felix SB. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am. Heart J.* 2005; 150: 729 – 736.

Staudt A, Herda LR, Trimpert C, Lubenow L, Landsberger M, Dörr M, Hummel A, Eckerle LG, Beug D, Müller C, Hoffmann W, Weitmann K, Klingel K, Kandolf R, Kroemer HK, Greinacher A, Felix SB. Fcγ-receptor IIa polymorphism and the role of immunoadsorption in cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010; 87: 452 – 458.

Stavrakis S, Kem DC, Patterson E, Lozano P, Huang S, Szabo B, Cunningham MW, Lazzara R, Yu X. Opposing cardiac effects of autoantibody activation of β-adrenergic and M2 muscarinic receptors in cardiac-related diseases. *Int. J. Cardiol.* 2011; 148: 331 – 336.

Tharin S, Dziak E, Michalak M, Opas M. Widespread tissue distribution of rabbit calreticulin, a non-muscle functional analogue of calsequestrin. *Cell Tissue Res.* 1992; 269: 29 – 37.

Thiene G, Angelini A, Basso C, Calabrese F, Valente M. The new definition and classification of cardiomyopathies. *Adv. Clin. Path.* 2000; 4: 53 – 57.

Tlaskalová-Hogenová H, Mandel L, Štěpánková R, Bártová J, Barot R, Leclerc M, Kovářů F, Trebichavský I. Autoimmunity: from physiology to pathology. Natural antibodies, mucosal immunity and development of B cell repertoire. *Folia Biol.* 1992; 38: 202 – 215.

Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature* 2002; 415: 227 – 233.

Tsutsui H, Ishibashi Y, Imanaka-Yoshida K, Yamamoto S, Yoshida T, Urabe Y, Takeshita A. Alterations in sarcoplasmic reticulum calcium-storing proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: H168 – H175.

Tučková L, Karská K, Walters JR, Michalak M, Rossmann P, Krupičková S, Verdu EF, Saalman R, Hanson LA, Tlaskalová-Hogenová H. Anti-gliadin antibodies in patients with celiac disease cross-react with enterocytes and human calreticulin. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1997; 85: 289 – 296.

Tučková L, Tlaskalová-Hogenová H, Farré MA, Karská K, Rossmann P, Kolínská J, Kocna P. Molecular mimicry as a possible cause of autoimmune reactions in celiac disease? Antibodies to gliadin cross-react with epitopes on enterocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995; 74: 170 – 176.

Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, Walport MJ, Fisher JH, Henson PM, Greene KE. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J. Immunol.* 2002; 169: 3978 – 3986.

Wallukat G, Haberland A, Berg S, Schultz A, Freyse EJ, Dahmen C, Kage A, Dandel M, Vetter R, Salzsieder E, Kreutz R, Schimke I. The first aptamer-apheresis column specifically for clearing blood of β1-receptor autoantibodies. *Circ. J.* 2012; 76: 2449 – 2455.

Wallukat G, Müller J, Hetzer R. Specific removal of β1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med* 2002; 347: 1806.

Wallukat G, Muñoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borges AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55: 463 – 468.

Wang WZ, Zhao RR, Wu BW, Jin XH, Zhu L, Hjalmarsen A, Fu ML. Effects of anti-peptide antibodies against human M2 muscarinic receptors on cardiac function in rats in vivo. *Blood Pressure Suppl.* 1996; 3: 25 – 27.

Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J. Am. Med. Assoc.* 1957; 164: 1439 – 1447.

Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation.* 2001; 104: 39 – 45.

Wu X, Liu B, Van der Merwe PL, Kalis NN, Berney SM, Young DC. Myosin-reactive autoantibodies in rheumatic carditis and normal fetus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1998; 87: 184 – 192.

Ximénez C, González E, Nieves ME, Silva-Olivares A, Shibayama M, Galindo-Gómez S, Escobar-Herrera J, García de León Mdel C, Morán P, Valadez A, Rojas L, Hernández EG, Partida O, Cerritos R. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: Article ID 127453, 10 stran.

Xu W, Longo FJ, Wintermantel MR, Jiang X, Clark RA, DeLisle S. Calreticulin modulates capacitative Ca^{2+} influx by controlling the extent of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} store depletion. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 36676 – 36682.

Zhang Y, Kozlov G, Pocanschi CL, Brockmeier U, Ireland BS, Maattanen P, Howe C, Elliott T, Gehring K, Williams DB. ERp57 does not require interactions with calnexin and calreticulin to promote assembly assembly of class I histocompatibility molecules, and it enhances peptide loading independently of its redox activity. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 10160 – 10173.

Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3100 – 3104.