UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Disertační práce

Studium vybraných mediátorů zánětlivých a fibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními nemocemi

Ing. Regina Fillerová

Školitel: Dr. Eva Kriegová

Ústav imunologie

Olomouc 2017

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Dr. Ing. Evě Kriegové, která mě vedla celým mým studiem, za cenné rady a připomínky a zejména za lidský přístup, za který si jí nesmírně vážím a děkuji.

Děkuji svým kolegyním z Ústavu imunologie, zejména Mgr. Tereze Dýškové, Ph.D., Mgr. Anně Petráčkové, Mgr. Veronice Kraiczové, Bc. Petře Gregorové a Mgr. Petře Schneiderové za všestrannou pomoc a podporu během mého studia a za vytvoření přátelského a stimulujícího prostředí. Poděkování patří i všem ostatním členům laboratoře za týmovou spolupráci a skvělý kolektiv.

Neméně důležitá byla vynikající spolupráce klinických spolupracovníků. Především bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Vítězslavu Kolkovi, DrSc. a MUDr. Monice Žurkové, Ph.D. z Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci i kolegům z ostatních klinik, a to jmenovitě prof. MUDr. Jiřímu Gallo, Ph.D. z Ortopedické kliniky a MUDr. Tomášovi Tichému z Ústavu klinické a molekulární patologie. Bez jejich pacientů, trpělivosti při vyhledávání klinických charakteristik a zájmu a vyhodnocování bioptických preparátů by předkládaná práce nemohla vzniknout.

Poděkování patří také informatikům z Fakulty elektrotechniky a informatiky VŠB-TU Ostrava, kteří se významně podíleli na zpracování a analýzách dat. Poděkování patří zejména Mgr. Tomášovi Novosádovi, Ph.D., doc. Mgr. Miloši Kudělkovi, Ph.D. a Ing. Martinu Radvanskému, Ph.D.

V neposlední řadě děkuji za podporu a porozumění mé rodině.

Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA MZ ČR NT11117 a Interní grantové agentury Univerzity Palackého IGA_PU_LF_2017_009.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Dr. Ing. Evy Kriegové. Všechny použité literární a odborné zdroje řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 10.4.2017

Souhrn

Sarkoidóza a idiopatická plicní fibróza (IPF-UIP) jsou nejčastější difúzní plicní onemocnění. Etiopatogeneze těchto nemocí je velmi komplexní a není dosud zcela objasněna. K pochopení etiopatogeneze může významně přispět genové i proteinové expresní profilování, které může pomoci určit klíčové molekuly, které se na rozvoji onemocnění podílejí.

Tato práce je zaměřena na studium vybraných mediátorů zánětlivých a fibrotizačních procesů u těchto nemocí s využitím nejmodernějších molekulárně biologických a proteomických metod. Kromě identifikace vhodných referenčních genů pro normalizaci expresního profilování v buňkách bronchoalveolární laváže (BAL) jsme studovali příspěvek klíčového Th1 transkripčního faktoru, molekul podílejících se na Th17 imunitní odpovědi, cytokin/chemokinovou síť a její transkripční a post-trankripční regulaci a funkční dopad polymorfismu v genu pro annexin 11 (rs1049550, ANXA11). Současně jsme hledali vhodné biomarkery pro prognózování a sledování léčebné odpovědi, a to v séru i BAL tekutině pacientů se sarkoidózou i IPF.

Prioritním výsledkem našeho výzkumu bylo nejen prokázání zvýšené exprese Th1 transkripčního faktoru T-bet u sarkoidózy, ale také korelace exprese tohoto transkripčního faktoru T-bet s expresí IFNG a CXCR3 a dalších klíčových molekul účastnících se patogeneze onemocnění. U progredující sarkoidózy byla zjištěna zvýšená exprese transkripčního faktoru STAT-3, který je klíčovým regulátorem Th17 imunitní odpovědi. Imunohistochemie lokalizovala STAT3 a IL-17 protein v alveolárních makrofázích, a také v tkáňových histiocytech, lymfocytech, a to zejména u pacientů s progresí onemocnění. Prioritně byl popsán mikroRNA profil v BAL buňkách u sarkoidózy, který zatím ve světovém písemnictví nebyl publikován. Dále jsme charakterizovali komplexní cytokin/chemokinovou síť u sarkoidózy, včetně klíčové role

transkripčního faktoru T-bet a „fine tuning“ pomocí mikroRNA v její regulaci. Proteinové analýzy v séru a BAL tekutině identifikovaly řadu nových, dosud nepopsaných proteinů u sarkoidózy a IPF-UIP, včetně kandidátních proteinů vhodných pro prognózování a sledování léčebné odpovědi u těchto nemocí. Naše studie u sarkoidózy dále potvrdila, že nosiči ochranné alely rs1049550*T v genu ANXA11 nemají postižení plicního parenchymu a tvoří menší granulomy ve srovnání s nenosiči této alely.

Získaná data podporují klíčovou roli Th1 a Th17 imunitní odpovědi v etiopatogenezi sarkoidózy, včetně příspěvku Th1 trankripčního faktoru na regulaci cytokin/chemokinové sítě. Prokázali jsme také funkční dopad polymorfismu rs1049550 v genu ANXA11 na tvorbu granulomů u sarkoidózy. Výsledky této práce mohou přispět k pochopení mechanismu zánětlivých a profibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními onemocněními, a vrhnout tak světlo na příčiny vzniku a průběh těchto onemocnění a případně položit základy pro terapeutické využití.

Summary

Sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF-UIP) are two common forms of interstitial lung disease. Etiopathogenesis of these diseases is very complex and not yet fully elucidated. The understanding of disease-associated gene and protein expression profiles may substantially help to identify key molecules contributing to the pathogenesis of sarcoidosis and IPF.

This work is focused on the study of selected mediators of inflammatory and fibrotic processes in sarcoidosis and IPF using the latest molecular biological and proteomic methods. Besides the identification of suitable reference genes for the normalization of the expression profiling in bronchoalveolar lavage (BAL) cells, we studied the contribution of key Th1 transcription factor, molecules involved in Th17 immune response, cytokine/chemokine network and its transcriptional and post-transcriptional regulation, and functional impact of polymorphism in annexin 11 gene (rs1049550, ANXA11). At the same time, we were looking for useful biomarkers for predicting and monitoring treatment response in serum and BAL fluid of patients with sarcoidosis and IPF.

The primary result of our research was not only demonstration of increased expression of Th1 transcription factor T-bet in sarcoidosis but also the correlation of expression of this transcription factor with INFG and CXCR3 expression, and with other key molecules involved in the pathogenesis of the disease. In progressive sarcoidosis, increased expression of the transcription factor STAT-3, which is a key regulator of Th17 immune response, was reported. Immunohistochemistry localized STAT-3 and IL-17 proteins in alveolar macrophages as well as in tissue histiocytes and lymphocytes, particularly in patients with progressing disease. Importantly, we described the microRNA profile in BAL cells in sarcoidosis, which has not been published yet.

Furthermore, we characterized the complex cytokine/chemokine network in sarcoidosis, including the key role of the transcription factor T-bet in its regulation and microRNAs in its "fine tuning". Protein analysis in serum and BAL fluid identified a number of novel proteins in sarcoidosis and IPF, not previosly reported in these diseases, including candidate proteins useful for prediction of disease development and monitoring the response to therapy in these diseases. In sarcoidosis, our study further confirmed that the carriers of protective ANXA11 rs1049550*T allele did not displayed impaired lung parenchyma and formed smaller and less granulomas compared to non-carriers of this protective allele.

Obtained data support the crucial role of Th1 and Th17 immune responses in etiopathogenesis of sarcoidosis, including the contribution of Th1 transcription factor in the regulation of cytokine/chemokine network. We also demonstrated the functional impact of polymorphism ANXA11 rs1049550 on granuloma formation in sarcoidosis. The results of this study may help to understand the mechanism of inflammatory and profibrotic processes in patients with diffuse lung diseases, and thus shed light on the causes and course of the disease and possibly be used in therapy.

Obsah

1. Úvod 1

2. Teoretická část 3

2.1 Sarkoidóza 3

2.1.1 Etiologie a patogeneze sarkoidózy 4

2.2 Idiopatická plicní fibróza (IPF) 8

2.2.1 Etiologie a patogeneze IPF 9

2.3 Metody založené na PCR 11

2.3.1 Reverzní transkripce 11

2.3.2 Real-Time PCR 12

2.3.3 „Antibody-based Proximity Extension Assay“ technologie (PEA) 13

3. Cíle práce 15

4. Praktická část 16

4.1 Hledání vhodného referenčního genu pro normalizaci qRT-PCR pro buňky bronchoalveolární laváže (BAL) 16

4.1.1 Úvod do problematiky 16

4.1.2 Metody 18

4.1.3 Výsledky 21

4.1.4 Závěr 24

4.2 Studium exprese klíčového Th1 transkripčního faktoru T-bet a jeho regulačního vlivu na geny asociované se sarkoidózou 25

4.2.1 Úvod do problematiky 25
4.2.2 Metody 26
4.2.3 Výsledky 30
4.2.4 Závěr 35
4.3 Role Th17 imunitní odpovědi u progrese sarkoidózy 36
4.3.1 Úvod do problematiky 36
4.3.2 Metody 38
4.3.3 Výsledky 42
4.3.4 Závěr 48
4.4 Příspěvek transkripční a post-transkripční regulace na cytokin/chemokinovou síť u plicní sarkoidózy 50
4.4.1 Úvod do problematiky 50
4.4.2 Metody 52
4.4.3 Výsledky 57
4.4.4 Závěr 68
4.5 Proteinové expresní profily v séru a BAL tekutině u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF-UIP) a sarkoidózou 69
4.5.1 Úvod do problematiky 69
4.5.2 Metody 69
4.5.3 Výsledky 73
4.5.4 Závěr 78
4.6 Studium funkčního dopadu polymorfismu ANXA11 rs1049550 u sarkoidózy 79

4.6.1 Úvod do problematiky ... 79
4.6.2 Metody ... 82
4.6.3 Výsledky ... 85
4.6.4 Závěr ... 89
5. Diskuze ... 90
5.1 Volba vhodného referenčního genu pro měření genové exprese v BAL buňkách 90
5.2 Studium exprese klíčového Th1 transkripčního faktoru T-bet a jeho regulačního vlivu na geny asociované se sarkoidózou ... 93
5.3 Role Th17 imunitní odpovědi u progrese sarkoidózy ... 95
5.4 Příspěvek transkripční a post-transkripční regulace na cytokin/chemokinovou síť u plicní sarkoidózy ... 97
5.5 Studium funkčního dopadu polymorfismu ANXA11 rs1049550 u sarkoidózy ... 100
6. Závěr ... 102
7. Seznam použitých zkratek ... 105
8. Literatura ... 107
9. Seznam publikací a abstrakt ... 121
9.1 Publikace v časopisech s IF ... 121
9.2 Publikace v časopisech bez IF ... 122
9.3 Manuskripty v recenzním řízení/před zasláním ... 123
9.4 Abstrakta v časopisech s IF ... 123
9.5 Abstrakta v časopisech bez IF ... 125
9.6 Abstrakta ve sbornících ... 127

9.7 Souhrn publikačních aktivit během Ph.D. studia 131

1. Úvod

Difúzní plicní onemocnění (DPO), někdy též intersticiální plicní procesy (IPP), jsou heterogenní skupinou onemocnění postihujících dýchací ústrojí, která je charakterizována akutním i chronickým zánětem a obvykle irreverzibilním procesem fibrózy intersticia a alveolárních prostor (DuBois 2003). K nejčastějším intersticiálním plicním onemocněním patří sarkoidóza (S), idiopatická plicní fibróza (IPF-UIP, kryptogenní fibrotizující alveolitida), exogenní alergická alveolitida (EAA), plicní postižení v rámci systémového onemocnění pojiva a polékové postižení plic. K vzácnějším patří plicní vaskulitidy, lymfangioleiomyomatóza, granulomatóza z Langerhansových buněk, alveolární lipoproteinóza, alveolární mikrolitiáza, tuberózní skleróza a další.

Jedná se tedy o velmi širokou skupinu relativně vzácných onemocnění, kterým díky frekvenci svého výskytu a závažnosti dominují dvě klinické jednotky: sarkoidóza a idiopatická plicní fibróza, jejichž studiu se věnuje i předkládaná práce.

Sarkoidóza a další IPP jsou převážně onemocnění typické buněčnou infiltrací plicních sklípků a vmezeřené (intersticiální) tkáně v důsledku alveolárního a intersticiálního zánětu. Dochází k patologické změně struktury alveolů, k ukládání extracelulárních látek a dalšímu rozvoji zánětlivé reakce, což vede ke snížení funkční kapacity plic. Nejzávažnějším reprezentantem skupiny je IPF-UIP onemocnění, při němž dochází k rozsáhlému a nevratnému jizvení plicní tkáně, které působí pozvolnou ztrátu funkce plic a dechovou nedostatečnost. Při diagnostice IPP mají nezastupitelnou roli zobrazovací techniky. Dalším důležitým vyšetřením je pak bronchoalveolární laváž a plicní biopsie-bronchoskopická (transbronchiální) nebo chirurgická.

Etiopatogeneze těchto nemocí jsou velmi komplexní a nejsou dosud zcela objasněny. K pochopení etiopatogeneze může významně přispět genové i proteinové

expresní profilování, které může pomoci určit klíčové molekuly, které se na rozvoji nemoci podílejí. Tato práce je proto zaměřena na analýzu expresních profilů (RNA, proteinů) vybraných molekul účastnících se zánětlivých a profibrotizačních procesů u pacientů s DPO. Zejména sledování expresních profilů (EP) chemokinů, cytokinů, jejich receptorů a dalších molekul podílejících se na aktivaci fibroblastů, tvorbě proteinů extracelulární matrix a regulaci zánětu je předmětem této práce. Znalost EP může v budoucnu přispět k objasnění patogenetických mechanizmů fibrotizace, k rozšíření klasifikačního schématu fibróz dalších plicních nemocí charakteristických velmi špatnou prognózou, umožní stratifikovat pacienty s rizikem fibrotizace a sledovat léčebnou odpověď.

Výstupy těchto analýz umožňují v mnoha případech novou projekci etiopatogeneze chorobných procesů s určením kandidátních molekul pro praktický odraz v diagnostice, prognózování a neposlední řadě i v terapii těchto onemocnění.

2. Teoretická část

2.1 Sarkoidóza

Sarkoidóza je multisystémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie, které se vyznačuje akumulací aktivovaných imunokompetentních buněk (T-lymfocytů a makrofágů) v místě aktivního zánětu (ATS/ERS/WASOG Statement on sarcoidosis 1999, Kolek 1998). Obvykle postihuje pacienty mladého nebo středního věku, nejčastěji ženy mladší 40 let. Prevalence sarkoidózy kolísá mezi 6-213/100 000 obyvatel, v České republice je incidence tohoto onemocnění 3,1/100 000 obyvatel (Loštáková 2013).

Přestože se jedná o systémové onemocnění, velmi často se sarkoidóza projevuje ve formě klinicky limitované pouze na plíce (Kolek 1998). U přibližně 50 % případů se ovšem setkáváme také s mimohrudním postižením, které bývá ve více než 90 % asociováno s plicní sarkoidózou (Rodrigues 2011). Postiženy však mohou být všechny orgány, nejčastěji to bývají lymfatické uzliny, oči, kůže, játra, slezina a srdce (Zurkova 2014). Pro toto onemocnění je typická přítomnost nekazeifikujících epiteloidních granulomů v postižených tkáních (Kolek 1998).

Nemoc může být zcela asymptomatická; u klinicky manifestní sarkoidózy dochází u téměř poloviny pacientů k spontánní nebo léčbou navozené remisi (Baughman 2003), u 10-20 % pacientů však zánět progreduje ve fibrózu (Baughman 2003, Kolek 2011).

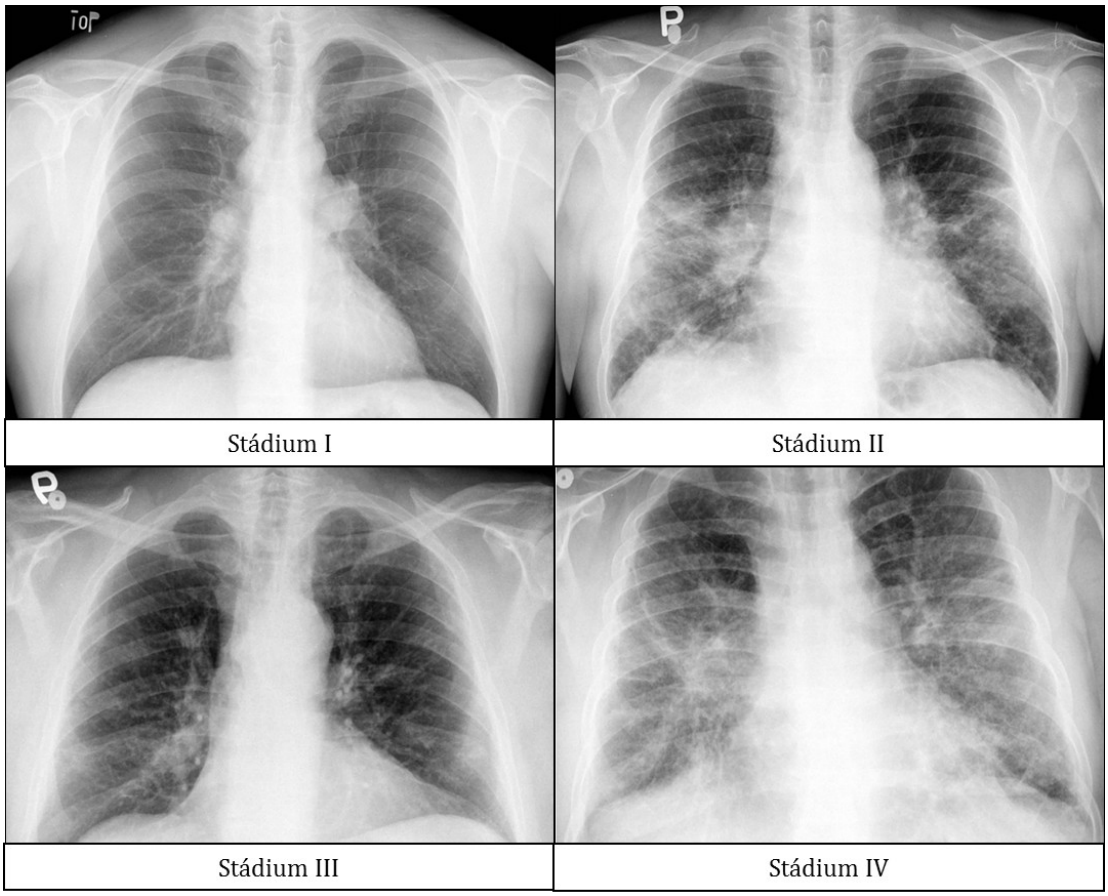
Skiagram hrudníku je základním vyšetřením nejen pro stanovení diagnózy, ale především pro určení stádia onemocnění. Někdy se tak odhalí jinak klinicky asymptomatické onemocnění. Podle nálezů na skiagramu hrudníku rozlišujeme rentgenologické (RTG) stádium I až IV (**Obrázek 1**):

I - postižení nitrohrudních uzlin (spontánní remise u 60-90 %)

II - zvětšené uzliny + infiltrace plic (spontánní remise u 40-70 %)

III - pouze plicní infiltrace (spontánní remise u 10-20 %)

IV - fibróza s průkazem voštiny (úplně ireverzibilní)



Obrázek 1. Skiagram hrudníku. Jednotlivá RTG stádia sarkoidózy. Z archivu MUDr. M. Žurkové, Ph.D.

2.1.1 Etiologie a patogeneze sarkoidózy

Etiologie onemocnění není stále objasněna. Předpokládá se, že sarkoidóza je vyvolána přítomností neznámé noxy antigenní povahy, která dočasně perzistuje v tkáni a vyvolává abnormální imunitní reakci u geneticky predisponovaných jedinců (Kolek 2011, Nunes 2005, McGrath 2001). Jako potenciální původci sarkoidózy byla také zvažována řada infekčních agens (*Mycobacterium tuberculosis*, *Propionibacterium acnes, Chlamydophila pneumoniae,* viry, mykobakteriofágy a další) a neinfekčních agens (kovy,

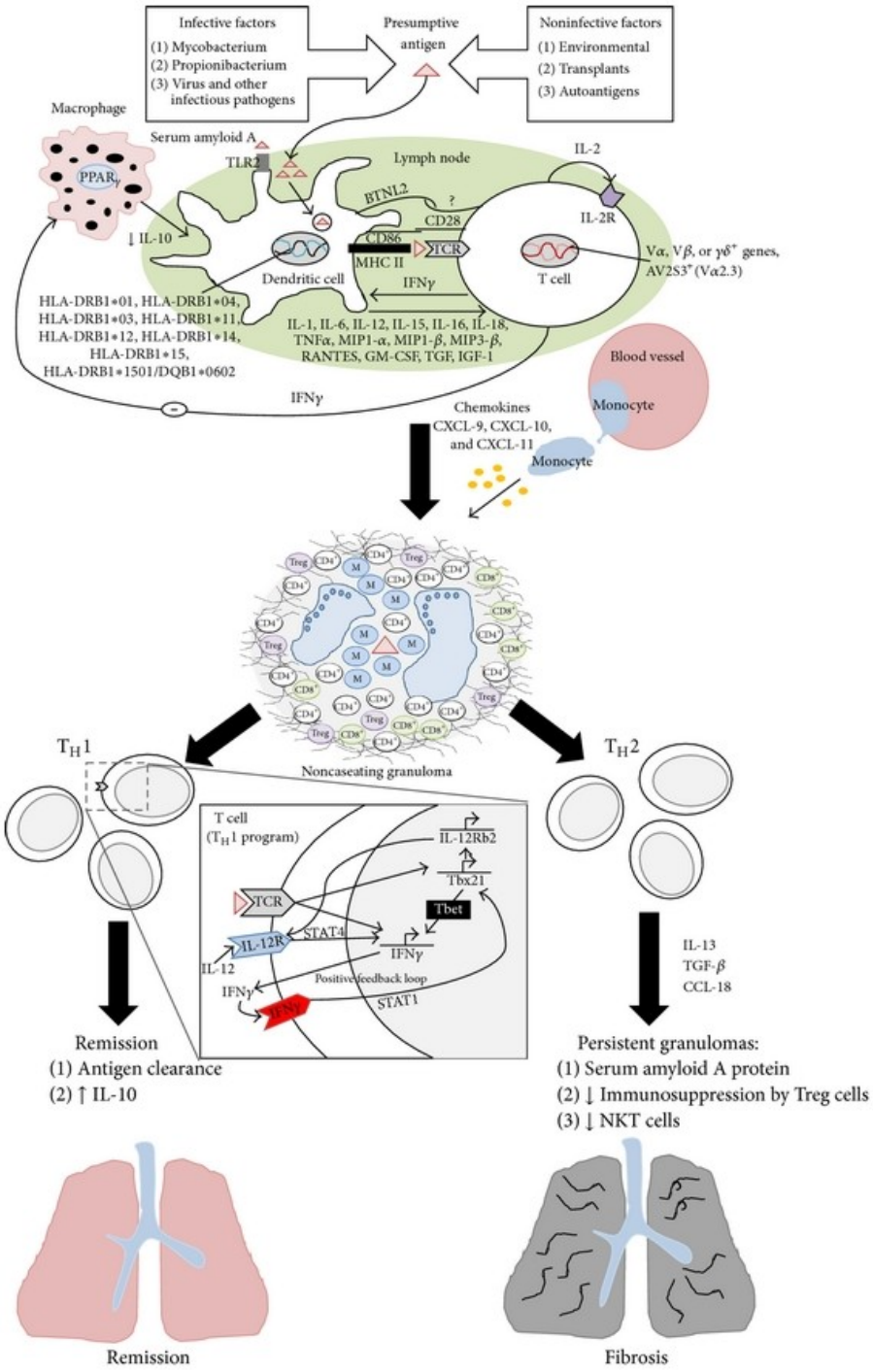
talek, pyl borovic, jíl, škrob), která však doposud nebyla jednoznačně potvrzena (Kolek 2011, Baugham 2003). Diskutabilní je i pravděpodobný podíl environmentálních faktorů (inhalace škodlivých plynů, prachů a kovů) na patogenezi onemocnění (Kolek 2011). Novější studie se dokonce přiklání ke klíčové úloze kovů jako spouštěče tohoto onemocnění (Bindoli 2016).

Z imunologického hlediska je pro sarkoidózu typická akumulace aktivovaných CD4+ T-lymfocytů a makrofágů v postižených tkáních. Při vyšetření bronchoalveolární laváže (BAL) je typická přítomnost lymfocytární alveolitidy se zvýšeným imunoregulačním indexem (poměr CD4+ a CD8+ lymfocytů). Vzniká tak oligoklonální buněčná odpověď s typickou akumulací CD4+ Th1-lymfocytů a aktivovaných makrofágů v místě postižení, kde dochází k expresi cytokinů (interleukiny IL-12, IL-18, interferon gamma (IFNG) a tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF-alfa)), chemokinů a jejich receptorů (CCL5, CXCR3, CXCR6) (Miyara 2006). Současné poznatky poukazují také na význam Th17 buněk v rozvoji granulomatózní i alveolitické fáze onemocnění a progresi k fibróze, ve spolupráci také s T-regulačními (T-reg) buňkami (Facco 2011, Miyara 2006) (**Obrázek 2**).

Důležitou roli v patogenezi sarkoidózy hraje genetická predispozice (Fischer 2014, Spagnolo 2013, Fingerlin 2015). V této souvislosti byl u pacientů se sarkoidózou popsán vyšší výskyt HLA A1, B8, B13, B27 a DR3 ve srovnání se zdravými jedinci. Některé asociace byly popsány ovšem pouze u některých populací. Mezi nejkonzistentnější nálezy patří asociace HLA alel DRB1*03 a DQB1*02 s akutní formou nemoci nazývanou Löfgrenův syndrom (LS) (Sato 2002, Mrazek 2005, Spagnolo 2008). Naopak u pacientů s progredujícím onemocněním byla popsána asociace s alelami HLA-DRB1*15 (Rutherford 2004, Voorter 2005) a HLA-DQB1*06:02 (Voorter 2005).

Dále byla popsána celá řada asociací mezi dalšími kandidátními geny a sarkoidózou, jejichž výčet by byl nad rámec této práce. Mezi nejvýznamnější nálezy

patří asociace s genem kódujícím butyrofilin (BTNL2, rs2076530) (Valentonyte 2005, Rybicki 2005, Adrianto 2012), který se podílí na aktivaci a regulaci T-lymfocytů. Další kandidátní geny byly nominovány na základě celogenomových asociačních studií (GWAS). Jedním z nich je gen kódující annexin 11 (ANXA11, rs1049550) (Hofmann 2008), který byl potvrzen v řadě populací (Mrazek 2011, Levin 2013, Adrianto 2012, Zhou 2016). Byla popsána i řada polymorfismů modifikujících onemocnění, jde o geny cytokinů a jejich receptorů TNF-alfa, IL-6, IL-1A, IL-1 beta, CCR5, CCR2, TGF-beta aj. (Mrazek 2011, Levin 2013, Adrianto 2012, Zhou 2016).



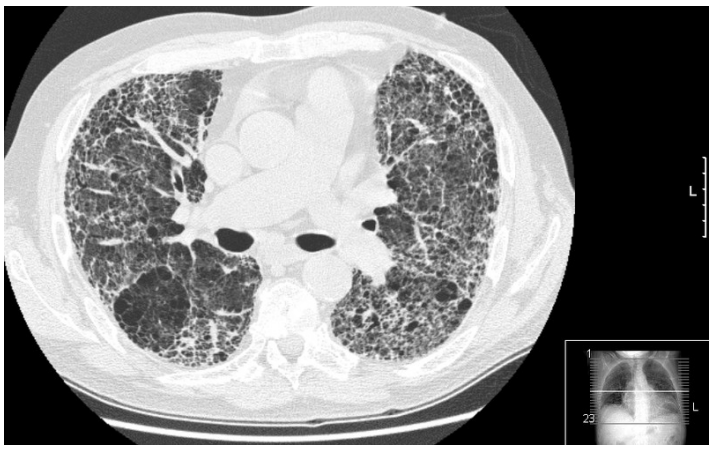
Obrázek 2. Imunopatogeneze sarkoidózy.
(Převzato: https://www.hindawi.com/journals/ijcd/2013/928601/#B2).

2.2 Idiopatická plicní fibróza (IPF)

Idiopatická plicní fibróza (IPF) patří mezi nejobtížněji léčitelné a zároveň prognosticky nejzávažnější plicní nemoci (**Obrázek 3**). Současná definice popisuje IPF jako specifickou formu chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie postihující pouze plíce a spojené s histopatologickým a/nebo radiologickým obrazem obvyklé intersticiální pneumonie (UIP) (Raghu 2011, Vašáková 2011, Vašáková 2014). Diagnóza IPF vyžaduje vyloučení jiných forem intersticiálních pneumonií, zvláště ostatní idiopatické intersticiální pneumonie (IIP), systémové nemoci pojiva a intersticiální plicní procesy (IPP) spojené s expozicí vlivům prostředí.

Výskyt IPF je nejčastější v dospělém věku nad 50 let. Typickými klinickými symptomy u IPF je postupně progredující ponámahová dušnost a neproduktivní kašel. Pokud je onemocnění včasně diagnostikováno a je zahájena antifibrotická léčba, lze onemocnění pozitivně léčebně ovlivnit, a tím výrazně zlepšit prognózu nemocných (Vašáková 2014). IPF je onemocnění se závažnou prognózou, průměrné přežívání pacientů je 3,2-5 let (Khalil 2004). Nejčastější příčinou smrti je respirační selhání (40 % pacientů) (ATS/ERS international consensus statement IPF 2000).

IPF postihuje asi 5 milionů lidí na celém světě. V ČR proběhlé epidemiologické studie (Kolek 1995, Homolka 1999) odhadují incidenci IPF na 1/100 000 obyvatel. IPF nemá dle provedených výzkumů žádnou jednoznačnou geografickou, sociální a rasovou distribuci. Obvykle se vyskytuje sporadicky, familiární případy jsou vzácné (5 %).



Obrázek 3. HRCT plicní fibrózy. Z archivu MUDr. M. Žurkové, Ph.D.

2.2.1 Etiologie a patogeneze IPF

Etiologie IPF je neznámá. Je také považována za multifaktoriální nemoc, na které se podílejí hereditární faktory ve spojitosti s faktory prostředí. Některé faktory prostředí, jako jsou kouření a některé druhy zaměstnání, byly asociovány s vyšší incidencí IPF (Khalil 2004).

Předpokládá se, že IPF vzniká jako odpověď na neznámý stimulus, jenž způsobuje opakované poškození výstelky plicních sklípků, vyúsťující v nekontrolované a progredující jizvení. Na začátku patologického procesu u IPF pravděpodobně dochází k obnažení bazální membrány, aktivaci řady cytokinů, chemokinů a enzymů a alternativní aktivaci alveolárních makrofágů, které se pak podílejí na dalším rozvoji a udržování procesu fibroprodukce a jizvení plicní tkáně (Noble 2003). Pro IPF je charakteristické selhání alveolární reepitelizace, perzistence fibroblastů v plicní tkáni, nadměrná tvorba extracelulární matrix a z toho plynoucí změna plicní architektury, která končívá respiračním selháním. Nedávné studie prokázaly, že ke vzniku IPF může přispívat také autoimunitní reakce (Rangarajan 2016, Feghali-Bostwick 2011, Donahoe

2015). Perspektivy zacílení na autoimunitní procesy v terapii bylo prokázáno u IPF pacientů s exacerbacemi (Donahoe 2015).

Také v případě IPF se předpokládá vliv genetických faktorů, které zvyšují vnímavost k onemocnění a mohou mít také podíl na heterogenitě onemocnění z hlediska podstatných rozdílů v klinickém průběhu a přežívání u postižených jedinců (Spagnolo 2014, Zhou 2016, Garcia 2011, Kropski 2013). Mezi klíčové geny predisponující k rozvoji IPF patří geny kódující telomerasu (TERT a TERC) (Mushiroda 2008). Dále byly popsány mutace v genech kódujících proteiny plicního surfaktantu (SFTPC a SFTPA2) (van Moorsel 2010), které ovlivňují alveolární epiteliální buňky. Současná práce také prokázala vliv vybraných polymorfismů v genech TOLLIP a MUC5B na účinnost imunosupresivní a antioxidační léčby u IPF (Lozano-Wilhelmi 2015). Mezi další geny predisponující k IPF patří geny kódující cytokiny (typu Th2 imunitní odpovědi) (Vasakova 2009), metaloproteinázy (MMP7) a další, které zvyšují sklon k fibroproliferativnímu hojení plicní tkáně.

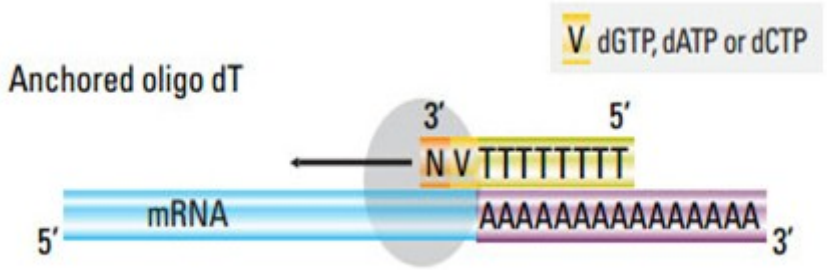
2.3 Metody založené na PCR

Metody molekulární biologie umožňují analýzu biologicky významných molekul, zejména těch, které nesou a následně uskutečňují genetickou informaci – nukleových kyselin a bílkovin. Dnes nejužívanější metody v diagnostice jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Výhody metod založených na PCR spočívají především ve vysoké specifičnosti, citlivosti, možnosti standardizovaného přístrojového provedení s minimálním množstvím biologického materiálu potřebného k vyšetření, což přispívá k dosažení včasných a přesných výsledků.

2.3.1 Reverzní transkripce

Analýza exprese genů na úrovni RNA má velký význam v základním lékařském, farmaceutickém a obecně biologicky orientovaném výzkumu. Určování přítomnosti RNA má rovněž vysokou vypovědní diagnostickou hodnotu. V současné době jsou tradiční metody identifikace přítomnosti mRNA nahrazovány metodou RT-PCR, která spočívá v reverzní transkripci RNA na komplementární DNA (cDNA) a následné amplifikaci cDNA fragmentu polymerázovou řetězcovou reakcí. Výhody této metody spočívají v rychlosti, snadnosti provedení a nezávislosti na použití radioaktivních látek.

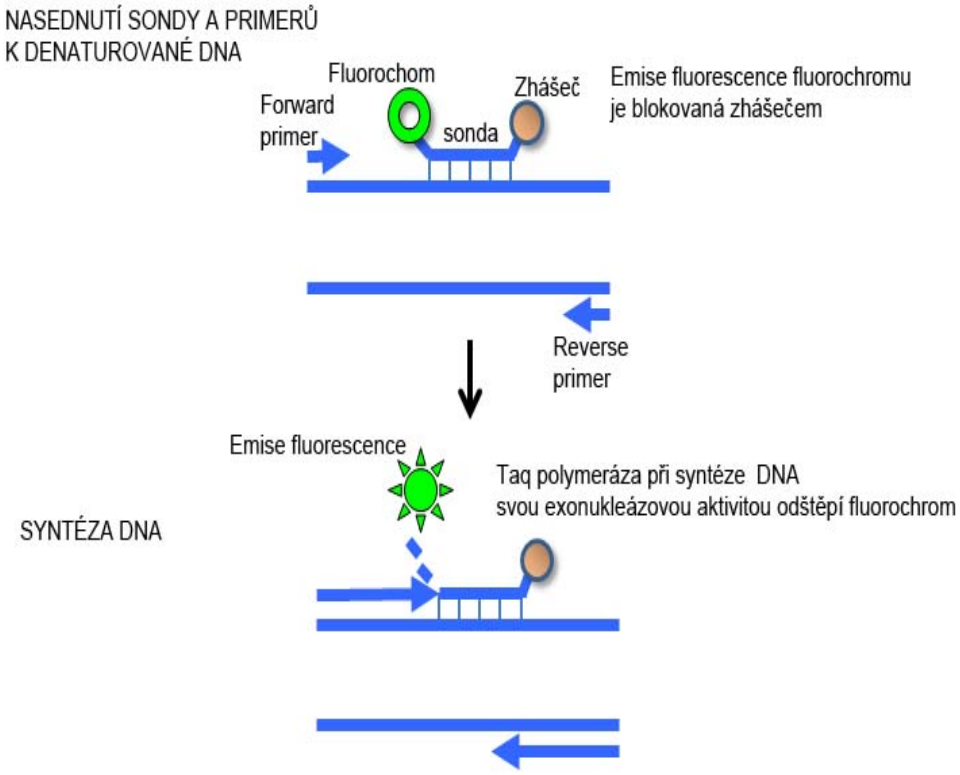
V této práci byla syntetizována cDNA z mRNA, která podléhá posttranskripční modifikaci – polyadenylaci. Procesem polyadenylace jsou na 3' konci mRNA navázány adeninové nukleotidové sekvence, které v buňkách usnadňují transport mRNA z jádra do cytoplazmy a přispívají k větší stabilitě mRNA. Schéma revezní transkripce využívané v této práci je uvedeno na **Obrázku 4**. Následně získaná cDNA sloužila k amplifikaci pomocí PCR.



Obrázek 4. Schéma reverzní transkripce s využitím anchored oligo dT primerů (Převzato: www.lifetechnologies.com)

2.3.2 Real-Time PCR

Real-time PCR (quantitative PCR, q-PCR) je metoda umožňující přesnou kvantifikaci cílové cDNA sekvence ve vzorku. Využívá se zde několika možností detekce. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescenčního signálu vlivem zvyšujícího se počtu nově syntetizovaných molekul DNA. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují mezi báze DNA (např. Sybr Green), narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku. V současnosti je ovšem asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5´-exonukleasové aktivity DNA polymerasy. Klíčovým bodem je zde použití oligonukleotidu – sondy (nejčastěji TaqMan sondy), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční značkou a na druhém konci zhášečem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymerasa díky své 5´-exonukleasové aktivitě TaqMan sondu, dojde k uvolnění navázaného fluoroforu a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase (**Obrázek 5**). Na základě standardizačních křivek lze přesně kvantifikovat množství cílové cDNA sekvence ve vzorku.



Obrázek 5. Znázornění qPCR procedury s využitím fluorescenčně značených sond (přepracováno podle www.labguide.cz).

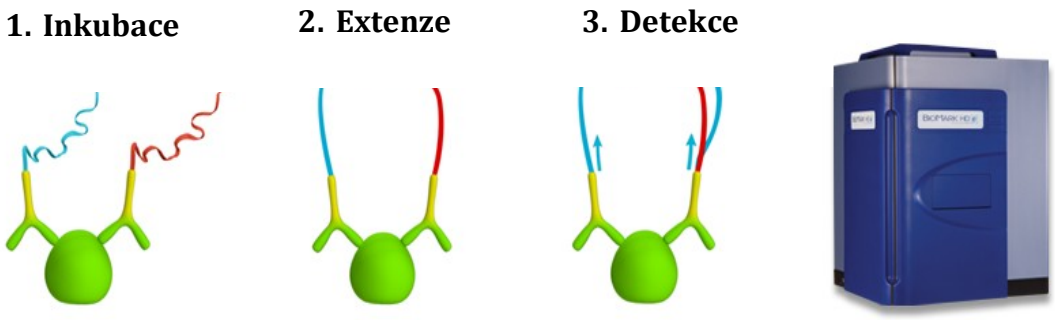
2.3.3 „Antibody-based Proximity Extension Assay“ technologie (PEA)

Tato inovativní, vysoce senzitivní metoda s velkým dynamickým rozsahem umožňuje stanovení limitních koncentrací proteinů pouze z 1 µl séra, plazmy nebo téměř jakéhokoli jiného typu biologického materiálu. S využitím imunologických či onkologických panelů umožňuje tato vysokokapacitní metoda stanovit až 92 biomarkerů u 96 vzorků během jedné analýzy.

Metoda pracuje na principu ELISA rozpoznáním cílového proteinu přidanou dvojicí protilátek. Každá dvojice protilátek obsahuje navázané specifické sekvence oligonukleotidů. Pouze po rozpoznání analytu a následném navázání obou protilátek

může dojít k hybridizaci a následné amplifikaci DNA s postupně přidanými amplifikačními primery. Real-time PCR produkt je pak detekován a kvantifikován HD Systémem BioMark (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA) (**Obrázek 6**).

Tato kombinace klasické imunochemické reakce s PCR technikou umožňuje detekovat proteiny v dynamickém rozsahu několika řádů a až s 100x vyšší citlivostí ve srovnání s klasickou metodou ELISA.



Obrázek 6. Schématické znázornění principu „Antibody-based Proximity Extension Assay“. (Převzato: http://www.olink.com/data-you-can-trust/technology/)

3. Cíle práce

Cílem disertační práce bylo studovat genové a proteinové expresní profily vybraných kandidátních molekul účastnících se zánětlivých a profibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními onemocněními s využitím molekulárně biologických metod založených na principu PCR.

Práce byla rozdělena do několika dílčích celků:

3.1 Hledání vhodného referenčního genu pro normalizaci qRT-PCR pro buňky bronchoalveolární laváže (BAL)

3.2 Studium exprese klíčového Th1 transkripčního faktoru T-bet a jeho regulačního vlivu na geny asociované se sarkoidózou

3.3 Role Th17 imunitní odpovědi u progrese sarkoidózy

3.4 Příspěvek transkripční a post-transkripční regulace na cytokin/chemokinovou síť u plicní sarkoidózy

3.5 Studium proteinových expresních profilů v séru a BAL tekutině u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF-UIP) a sarkoidózou a jejich klinické využití

3.6 Studium funkčního dopadu polymorfismu ANXA11 rs1049550 u sarkoidózy

4. Praktická část

4.1 Hledání vhodného referenčního genu pro normalizaci qRT-PCR pro buňky bronchoalveolární laváže (BAL)

4.1.1 Úvod do problematiky

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR) se stala naší metodou volby pro expresní studie genů asociovaných se sarkoidózou u klinických vzorků pacientů s tímto onemocněním. Aby však bylo možné přesně kvantifikovat změny na úrovni exprese cílových genů qRT-PCR, a tudíž i měření množství vzniklých transkriptů mRNA, je třeba stanovit gen(y), jejichž produkce (tj. množství vzniklých transkriptů) zůstává konstantní (standardní) bez ohledu na funkční stav buňky (Bustin 2005). Tyto geny se nazývají „referenční" nebo také „housekeepingové" geny a v ideálním případě by měly být konstitutivně exprimovány ve všech typech buněk a neměly by být ovlivněny onemocněním, ani experimentálními postupy a podmínkami (Dheda 2004). Ačkoli jsou housekeepingové geny exprimovány všemi buňkami, jejich exprese se liší mezi různými typy buněk/orgánů (Hsiao 2001, Warrington 2000). Použití vhodných referenčních genů pro určitý druh vzorku a experimentální podmínky by mělo být proto vždy ověřeno.

S cílem provést genové profilování v buňkách bronchalveolární laváže (BAL) získané u pacientů s intersticiálními plicními nemocemi bylo nutné najít gen(y) vhodné pro normalizaci mRNA exprese cílových genů v BAL buňkách. Navrhli jsme skupinu kandidátních genů: 1) geny běžně používané k normalizaci v literatuře (ACTB, GAPDH, G6PD) (Zhao 2006, Ye 2005, Choi 2006), 2) geny s nejkonstantnější expresí u 19 tkání dle mikročipových studií uváděných v literatuře (ARF1, CANX, GPS1, PSMB2, PSMD2)

(Hsiao 2001, Warrington 2000) a 3) geny validované u bronchoalveolárních makrofágů u chronické obstrukční plicní nemoci (GNB2L1, RPL32) (Ishii 2006).

Volba správného „normalizátoru“ má zásadní vliv na správnost výsledků získaných kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qRT-PCR), neboť stabilně exprimovaný gen(y) umožní normalizovat rozdíly v kvalitě a kvantitě získané RNA mezi jednotlivými klinickými vzorky. Abychom ověřili vhodnost výběru navrhovaných referenčních genů v BAL buňkách, sledovali jsme stabilitu jejich mRNA exprese v závislosti na BAL buněčném profilu u různých respiračních onemocnění a současně také vliv proměnných jako byly kouření, pohlaví, léčba a věk.

4.1.2 Metody

4.1.2.1 Studovaný soubor

Skupina studovaných jedinců byla rozdělena do dvou kohort, přičemž u obou byl proveden odběr BAL dle standardního postupu (Petrek 1993). První kohortu tvořilo 71 pacientů s plicními nemocemi, kteří byli diagnostikováni v letech 2004-2008 ve Fakultní nemocnici Olomouc. Diagnóza byla stanovena dle kritérií mezinárodních standardů pro jednotlivá onemocnění. Bližší klinická a laboratorní charakteristika je uvedena v **Tabulce 1**.

Tabulka 1. Charakteristika pacientů 1. kohorty (n=71)

1. kohorta pacientů	
Plicní onemocnění Intersticiální*/ nádory plic/CHOPN	26/19/26
Pohlaví (M/Ž)	45/26
Věk (<60/>60)	35/36
Kouření (ano/ne/není známo)	28/40/3
Léčba před odběrem BAL (ano/ne)	47/24
Počet makrofágů v BAL (N/P)†	37/28
Počet lymfocytů v BAL (N/P)†	46/19
Počet neutrofilů v BAL (N/P)†	48/17
Počet eosinofilů v BAL (N/P)†	45/20

*Skupina intersticiálních plicních onemocnění zahrnovala tato onemocnění: Sarkoidóza, Idiopatická intersticiální plicní pneumonie, Sekundární fibróza, Azbestóza, Lipoproteinóza a Silikóza.

†Hraniční hodnoty pro počty buněk v BAL byly stanoveny dle Meyer a spol (Meyer 2004): makrofágy ≥ 85 %, lymfocyty ≤ 11 %, neutrofily ≤ 3 %, eozinofily ≤ 1 %, N - negativní, P – pozitivní.

Druhou kohortu zvolenou pro validaci stability mRNA exprese studovaných referenčních genů tvořilo 63 pacientů se sarkoidózou a 17 kontrolních jedinců. Kontrolní skupina podstoupila BAL vyšetření kvůli nezánětlivému onemocnění (psychogenní kašel, kašel asociovaný s gastroesofageálním refluxem nebo plicní hypertenze). Všichni kontrolní jedinci měli normální výsledky cytologického,

imunologického a mikrobiologického vyšetření a také normální poměr CD4+/CD8+. Další charakteristiky podskupin 2. kohorty jsou popsány v **Tabulce 2**.

Tabulka 2. Charakteristika pacientů 2. kohorty (n=80)

2. kohorta pacientů		
	Sarkoidóza n=63	**Kontrolní skupina n=17**
Pohlaví (M/Ž)	26/37	11/6
Kouření (ano/ne/není známo)	18/45	5/11/1
RTG stádium I/II-III	17/46	
Löfgrenův syndrom (ano/ne)	11/52	
Počet makrofágů v BAL (N/P) †	15/48	
Počet lymfocytů v BAL (N/P) †	14/49	
Počet neutrofilů v BAL (N/P) †	56/7	
Počet eosinofilů v BAL (N/P) †	58/5	

†Hraniční hodnoty pro počty buněk v BAL byly stanoveny dle Meyer a spol (Meyer 2004): makrofágy ≥ 85 %, lymfocyty ≤ 11 %, neutrofily ≤ 3 %, eozinofily ≤ 1 %, N - negativní, P – pozitivní.

Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc. Všechny subjekty podepsaly informovaný souhlas s využitím biologického materiálu k diagnostickým i výzkumným účelům této studie.

4.1.2.2 Zpracování BAL buněk, qRT-PCR

BAL buňky (0,5 - 1,5 x 10^6) byly separovány od BAL tekutiny centrifugací (400 g, 20 min, 4°C), dvakrát promyty 10 ml fosfátového pufru (PBS) (Exbio, Olomouc, CR). Po okamžitém přidání 300 µl RNA lateru (Ambion, Austin, TX, USA) byly buňky skladovány při teplotě 4°C přes noc a následně při teplotě -20°C. Doba zpracování BAL buněk od jejich odběru do doby přidání protektivního činidla RNA lateru nepřesáhla 2 hodiny.

Celková RNA byla z BAL buněk izolována s použitím izolačního kitu mirVana™ miRNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dle doporučení výrobce. Reverzní

transkripce byla provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitu (Roche, Mannheim, Německo) při 50°C po dobu 60 min ve třech opakováních pro každý vzorek a skladována při -20°C až do použití.

Pro měření genové exprese vybraných genů (**Tabulka 3**) byla použita metoda qRT-PCR se 100 nM fluorescenčně značenými sondami LNA (Univerzal Probe Library; Roche Applied Science, Indianapolis, USA) a 900 nM primery (Metabion, Mnichov, Německo). 25 µl PCR reakční směsi bylo připraveno takto: 5 µl cDNA (což odpovídá 20 ng vstupní RNA) bylo přidáno k 20 µl PCR-mixu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Po počáteční denaturaci (94°C, 15 min) byla provedena v 40 cyklech amplifikace cDNA (94°C, 45 s a 60°C, 30 s) na přístroji RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Relativní exprese byla vypočtena s použitím metody druhé derivace (RotorGene Software 06.01.71, Corbett Research, Sydney, Austrálie), cDNA z lidské univerzální referenční RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA) byla použita jako kalibrátor (v kvadruplikátech) v koncentraci 1,25 ng vstupní RNA.

Tabulka 3. Popis studovaných genů

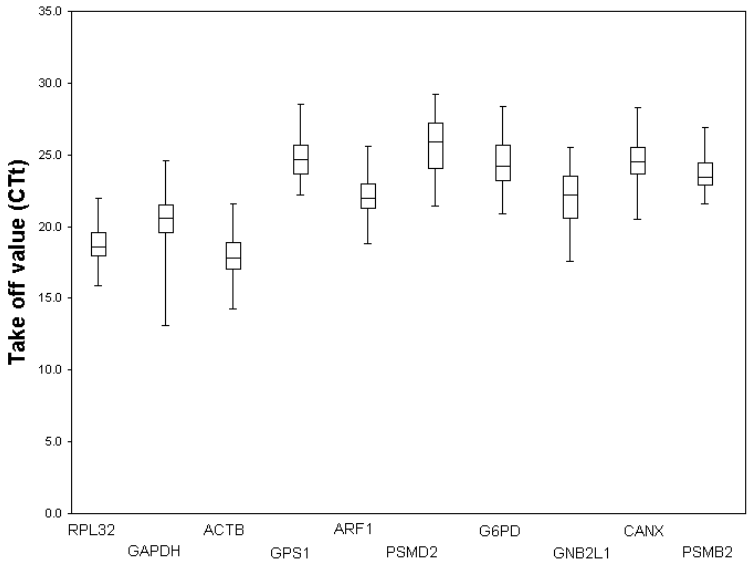
Symbol	*Název genu*	*GenBank číslo*	*Funkce*
ACTB	Actin, beta	NM_001101.2	Cytoskeletální strukturální protein
ARFI	ADP-ribosylation factor 1	NM_001658.3	Aktivátor fosfolipázy D
CANX	Calnexin	NM_001746.3	Molekulární chaperon
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	X03674.1	Produkce NADPH
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046.3	Glykolizační enzym
GNB2LI	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	NM_006098.4	Receptor aktivace C-kinázy
GPSI	G protein pathway suppressor 1	U20285.2	Supresor G proteinu
PSMB2	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	NM_002794.3	Štěpení peptidů
PSMD2	26S proteasome subunit p97	D78151.1	Štěpení peptidů
RPL32	Ribosomal protein L32, transcript variant 1	NM_000994.3	Ribosomální protein
IFNG	Interferon gamma	NM_000619.2	Cytokin

Logaritmická transformace relativních hodnot genové exprese byla provedena pomocí softwaru SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Pro porovnání stability genové exprese byly použity následující statistické testy: Test rovnocennosti (Wellek 2003, Haller 2004), BestKeeper (Pfaffl 2004), geNorm (Vandesompele 2002) a NormFinder test (Andersen 2004). Normalizační faktory pro jednotlivé geny a genové páry byly vypočteny podle Vandesompele a spol (Vandesompele 2002).

4.1.3 Výsledky

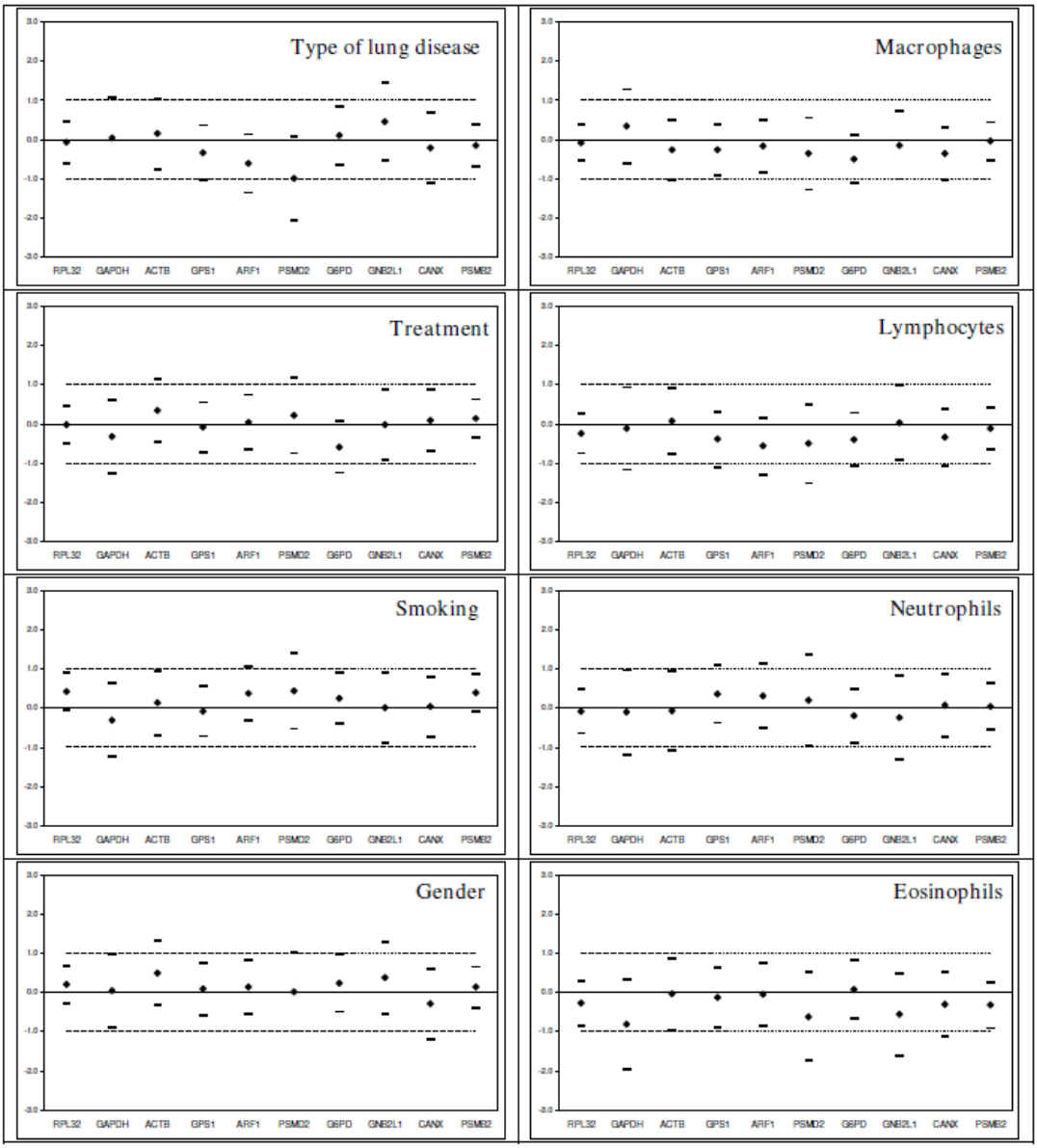
Abychom vyhodnotili stabilitu genové exprese studovaných referenčních genů, porovnali jsme hodnoty mRNA exprese BAL buněk všech pacientů z první kohorty. Jednotlivé geny vykazovaly rozdílnou variabilitu expresních hodnot, z nichž nejnižší byla nalezena

u genu PSMB2 (průměr Ct±SD, 23,66±0,86) a RPL32 (18,65±0,92) (**Obrázek 7**).



Obrázek 7. **Expresní profily 10 referenčních genů v BAL buňkách pacientů 1. kohorty** (n=71). Data jsou prezentována jako krabicové grafy, kde hranice boxů představují 25-75 percentil a linie mezi nimi vymezuje hodnotu mediánu. Hraniční linie znázorňují minimální a maximální hodnoty.

Pro potvrzení této skutečnosti byly použity čtyři statistické přístupy: Test rovnocennosti, BestKeeper test, geNorm test a NormFinder test, které srovnávaly stabilitu testovaných genů v závislosti na pohlaví pacientů, věku, kouření, léčby, typu onemocnění a počtu buněk v BAL (**Obrázek 8**).

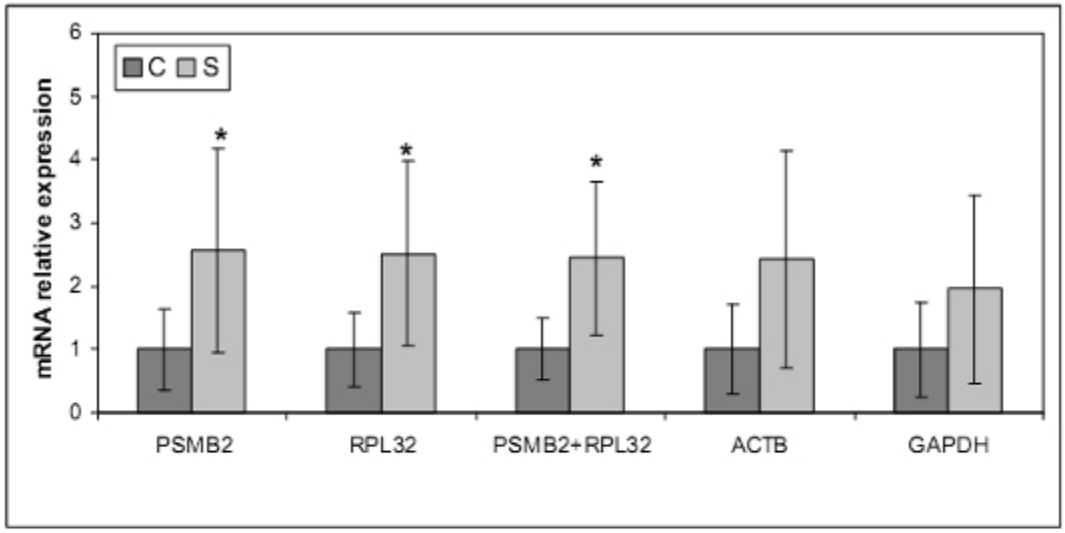


Obrázek 8. Test rovnocenosti pro srovnání stability exprese 10 referenčních genů u pacientů 1. kohorty v závislosti na proměnných parametrech. V grafu jsou znázorněny průměry a intervaly spolehlivosti log2 transformovaných relativních expresí. Osa Y znázorňuje fold change hodnoty exprese v rámci podskupin.

S cílem potvrdit skutečnost, že geny PSMB2 a RPL32 jsou nejstabilnější referenční geny u BAL buněk prokázané analýzou u první kohorty pacientů, provedli jsme tato srovnání také u druhé kohorty (63 pacientů se sarkoidózou a 17 kontrolních jedinců). Stabilitu referenčních genů jsme testovali v závislosti na vlivu těchto proměnných: pohlaví, status kouření, klinické charakteristiky, přítomnost Löfgrenova syndromu, postižení mimoplicních orgánů a diferenciální počty buněk v BAL. Z deseti testovaných referenčních genů, pouze geny PSMB2 a RPL32 vykazovaly stabilní expresi v závislosti na sledovaných proměnných.

Na příkladu demonstrovat vliv použití vhodného referenčního genu na výslednou expresi studovaných cílových genů v BAL buňkách, jsme vybrali cytokin interferon gamma (IFNG), jehož mRNA exprese byla zvýšena u sarkoidózy v dřívějších studiích. Pro srovnání mRNA exprese tohoto cytokinu mezi pacienty a kontrolami 2. kohorty jsme použili námi validované referenční geny PSMB2 a RPL32 a také tradiční referenční geny ACTB a GAPDH.

Relativní hladiny mRNA exprese IFNG byly vyšší u pacientů se sarkoidózou než u kontrolní skupiny, pokud jsme použili pro normalizaci gen PSMB2 (fold change±SD: 2,56±1,62; p=0,004), případně gen RPL32 (2,58±1,46; p=0,004) nebo jejich kombinaci PSMB2-RPL32 (2,44±1,20; p=0,02). Pokud byly k normalizaci použity geny ACTB (2,42±1,71; p=0,053) nebo GAPDH (1,95±1,48; p=0,09), mRNA exprese IFNG se nelišila mezi oběma skupinami (**Obrázek 9**).



Obrázek 9. Srovnání relativní (poměr exprese cílového genu/referenčního genu) mRNA exprese genu IFNG v buňkách BAL pacientů se sarkoidózou (S, n=63) a kontrolních jedinců (C, n=17) při použití rozdílných referenčních genů nebo jejich kombinací. Data jsou prezentována jako fold change relativní exprese, hranice boxů představují hodnoty SD. * p<0,05.

4.1.4 Závěr

V této studii zaměřené na identifikaci stabilních referenčních genů byly geny PSMB2 a RPL32 vyhodnoceny jako geny s nejkonstantnější genovou expresí u BAL buněk. Naopak geny ACTB a GAPDH se ukázaly jako nevhodné pro normalizaci qRT-PCR u dvou nezávislých souborů plicních vzorků. Exprese PSMB2 a RPL32 nebyla ovlivněna žádným ze studovaných parametrů (kouření, pohlaví, léčba, věk, typ plicního onemocnění a buněčný profil BALu). Na příkladu cytokinu IFNG, jehož mRNA exprese je zvýšena u sarkoidózy, jsme ilustrovali klinickou relevanci volby správného referenčního genu.

4.2 Studium exprese klíčového Th1 transkripčního faktoru T-bet a jeho regulačního vlivu na geny asociované se sarkoidózou

4.2.1 Úvod do problematiky

V imunopatogenezi zánětlivého procesu u plicní sarkoidózy a následné tvorby granulomů, hrají klíčovou roli cytokin IFNG (Semenzato 2005) a aktivované Th1 lymfocyty, které exprimují na svém povrchu chemokinový receptor CXCR3 (Agostini 2005). Bylo prokázáno, že obě tyto molekuly jsou přímo řízeny Th1 transkripčním faktorem T-bet (T-box, expressed in T-cells) (Beima 2006, Lewis 2007, Matsuda 2007). Přestože je sarkoidóza považována za onemocnění s převládající Th1 imunitní odpovědí (Zissel 2007, Katchar 2003) a CXCR3 a IFNG se významně podílejí na její patogenezi, neexistovaly žádné poznatky o zapojení transkripčního faktoru T-bet do patogeneze tohoto onemocnění.

Kromě jeho přímého vlivu na expresi genů CXCR3 a IFNG u všech typů buněk se T-bet podílí na regulaci řady genů imunitního systému, ovšem tato regulace může záviset na typu buněk a jeho vliv se tak může u jednotlivých genů lišit u různých buněčných subpopulací (Beima 2006). Příkladem toho je různý rozsah, v jakém T-bet indukuje expresi receptoru interleukinu (IL)-2, 2Rβ a CC chemokinu CCL3 u různých typů buněk (Beima 2006). Vztah mezi trankripčním faktorem T-bet a expresí dalších chemokinů a jejich receptorů u některých typů buněk a onemocnění je již znám. Příkladem je CCL5 chemokin v periferní krvi u astmatu (Ko 2007), receptory CCR5 a CXCR4 u T-buněk endometria (Ramhorst 2006) a chemokinové ligandy CCL5 a CXCL9 u glomerulonefritidy (Phoon 2008). I přes tato zjištění jsou stále poznatky o T-bet regulovaných genech a jejich mechanismech neúplné.

S cílem objasnit roli T-bet jako hodnověrného regulátoru imunitních mediátorů u sarkoidózy jsme studovali jeho vztah s cytokiny a jejich receptory, které byly již dříve

popsány v souvislosti s patogenezí tohoto onemocnění. Z těchto asociovaných genů jsme se zejména zaměřili na chemokiny podílející se na migraci aktivovaných T lymfocytů do plic, a to na CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10 a CXCL11 (Busuttil 2009, Arakelyan 2009, Petrek 2002) a na chemokinové receptory CCR5 (Katchar K 2003) a CXCR6 (Agostini 2005). Studovali jsme tedy jejich expresní profily, stejně jako expresi T-bet genu u 62 pacientů se sarkoidózou a 25 kontrol a sledovali rozdíly v expresních profilech u podskupin pacientů s odlišným fenotypem onemocnění. Pomocí imunohistochemie jsme hledali lokalizaci T-bet proteinu v alveolárních makrofázích a lymfocytech, dále v tkáňových obrovských mnohojaderných buňkách, makrofázích a lymfocytech.

4.2.2 Metody

4.2.2.1 Studovaný soubor

Skupina pacientů se sarkoidózou (n=62) byla diagnostikována dle kritérií mezinárodních standardů pro toto onemocnění (Statement on sarcoidosis 1999) a u všech byl proveden odběr BAL dle standardního protokolu (Petrek 1993). Klinická charakteristika studovaného souboru je uvedena v **Tabulce 4**. Kontrolní skupinu tvořilo 25 jedinců, kteří podstoupili BAL vyšetření jako součást stanovení diagnózy nezánětlivého plicního onemocnění (psychogenní kašel, kašel asociovaný s gastroesofageálním refluxem nebo plicní hypertenze). Všichni kontrolní jedinci měli normální výsledky cytologického, imunologického a mikrobiologického vyšetření, a také normální poměr CD4+/CD8+. Žádný z pacientů nepodstoupil léčbu kortikosteroidy před odběrem BAL.

Tabulka 4. Charakteristika studovaných souborů

	Sarkoidóza n=62	*Kontrolní skupina n=25*
Pohlaví (M/Ž)	26/36	16/9
Věk	48±12	45±16
Kouření (ano/ne/ex)	6/43/13	8/17
RTG stádium I/II/III/IV	17/33/8/4	
Löfgrenův syndrom (ano/ne)	11/51	
Počet makrofágů v BAL (%)	74,5±13,0 (40,0–97,1)	
Počet lymfocytů v BAL (%)	22,8±12,3 (2,0–54,0)	
Počet neutrofilů v BAL (%)	2,0±3,6 (0,0–18,0)	
Počet eosinofilů v BAL (%)	0,7±2,3 (0,0–17,0)	
CD3+ (%)	86,1±11,8 (36,0–98,0)	
CD4+ (%)	67,8±17,9 (23,0–92,0)	
CD8+ (%)	16,5±13,4 (2,0–74,0)	
CD19+ (%)	0,6±1,0 (0,0–6,0)	
Poměr CD4+/CD8+	7,6±7,3 (0,3–46,0)	

Data jsou prezentována jako průměr±SD (minimální-maximální hodnota).

Z důvodu vyloučení vlivu kouření na genovou expresi T-bet a dalších genů byla provedena subanalýza pouze u skupiny nekuřáků (n=56). Dále byly hodnoceny následující parametry: vývoj nemoci po dvou letech (remise n=23, progrese/perzistence n=26, u sedmi pacientů byla doba sledování kratší než 2 roky), přítomnost Löfgrenova syndromu (ano n=8, ne n=48) a BAL buněčný profil (pacienti s > 11% BAL lymfocytů n=45, pacienti s ≤ 11 % BAL lymfocytů n=11; pacienti s ≥ 85 % BAL makrofágy n=11, pacienti s < 85 % BAL makrofágy n=45). Referenční hodnoty počtu BAL buněk byly stanoveny dle Ziegenhagen (Ziegenhagen 2003).

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s využitím biologického materiálu k diagnostickým i výzkumným účelům této studie. Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc.

4.2.2.2 Zpracování BAL buněk, qRT-PCR

Postup zpracování BAL buněk, následná izolace RNA, podmínky reverzní transkripce i kvantitativní PCR v reálném čase byly popsány v kapitole 4.1.2.2 (**Obrázek 10**). PSMB2 gen byl použit jako referenční gen, dle naší předchozí studie (Kriegova 2008). Změny relativní exprese byly prezentovány jako průměr±směrodatná odchylka (SD) hodnoty fold change relativní exprese v poměru s kontrolními jedinci (Vandesompele 2002). Změny relativní mRNA exprese byly srovnávány neparametrickým Mann-Whitney U-testem a Spearmanův test byl použit pro korelační analýzy. K vyhodnocení byly použity statistické programy GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) a SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Obrázek 10. Schéma zpracování BAL od izolace buněk až po získání výsledků relativní exprese.

4.2.2.3 Imunohistochemická a imunocytochemická detekce T-bet proteinu v buňkách

Tenké řezy plicních tkání fixované v parafinu, získané transbronchiální biopsií (n=5), během video-thorakoskopické chirurgie (n=3) a vzorky mízních uzlin (n=1) byly zpracovány imunohistochemicky. Tkáňové řezy byly inkubovány s monoklonální protilátkou proti lidskému T-betu (klon 525803, ředění 1:50; R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) a vizualizovány standardní nepřímou metodou s použitím avidin-biotin křenové peroxidázy (EnVision+System-HRP, Dako, Glostrup, Dánsko). Řezy byly fixovány hematoxylinem. Pro potvrzení specificity použité T-bet protilátky bylo

barvení srovnáno s barvením izotopovou kontrolou myšího imunoglobulinu (Ig) G (klon DAK-GO1, ředění 1:50; Dako). Typ lymfocytů exprimujících T-bet byl identifikován specifickou protilátkou (CD3, klon F7238, CD 20, klon L26; ředění 1:50; Dako).

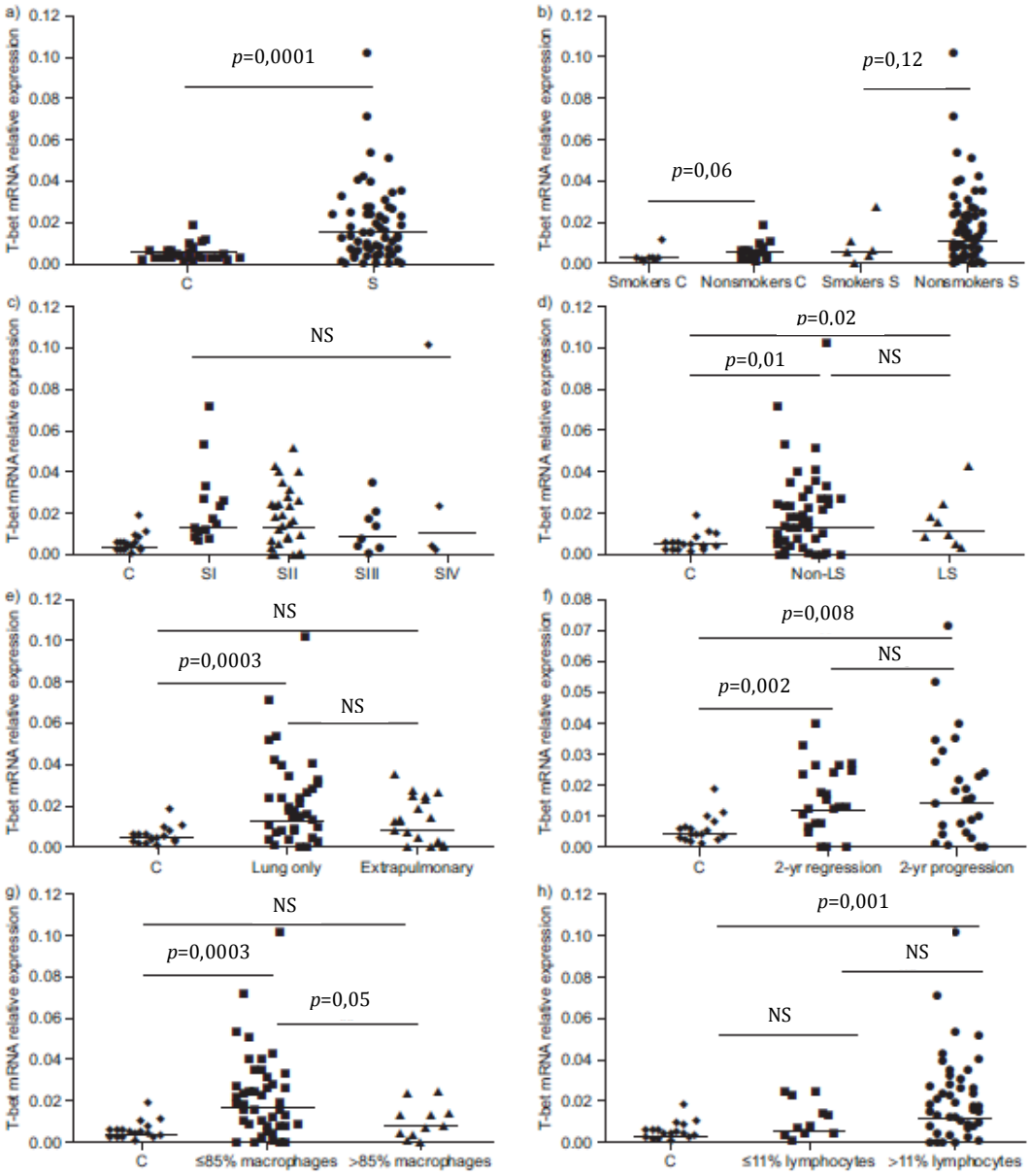
Pro imunocytochemickou detekci T-bet proteinu v BAL buňkách byly připraveny cytospiny a fixovány aceton-chloroformem. T-bet protein byl detekován pomocí avidin-biotin křenové peroxidázy s použitím anti-T-bet protilátky (klon 525.803, ředění 1:50; R & D Systems Inc.). Jako negativní kontrola byla použita myší IgG1 (klon DAK-GO1, ředění 1:50; Dako), jak bylo popsáno dříve (Arakelyan 2009).

4.2.3 Výsledky

4.2.3.1 mRNA expresní profilování transkripčního faktoru T-bet u sarkoidózy a jejích klinických fenotypů

Ve studovaném souboru byly nalezeny vyšší hladiny T-bet mRNA exprese u pacientů se sarkoidózou v porovnání s kontrolními subjekty (průměr±SD fold change, 3,64±1,72; p=0,0001). Během porovnání T-bet expresních hladin u kuřáků a nekuřáků pacientů i kontrol jsme pozorovali nižší hodnoty mRNA exprese u kuřáků jak kontrolní skupiny (p=0,06), tak i pacientů (p=0,12). Rozdíly však nedosáhly statistické signifikance (p>0,05). Dále byly posuzovány expresní profily T-bet vzhledem k RTG stádiím pacientů (I, II, III a IV). T-bet exprese se mezi těmito skupinami nelišila: 4,00±1,87; 3,00±1,40; 2,22±1,04 a 5,68±2,65 (p>0,05). Dalším srovnávacím parametrem byla přítomnost Löfgrenova syndromu, kdy nebyly nalezeny rozdíly v mRNA expresi T-bet (p>0,05). Obdobně nebyly nalezeny rozdíly v mRNA expresi mezi pacienty s izolovaným plicním postižením a pacienty s mimoplicním postižením (p>0,05) a pacienty s remisí a progresí/perzistencí onemocnění po dvou letech od diagnózy (p>0,05).

Další srovnávané podskupiny pacientů byly vytvořeny podle buněčného profilu BAL. Pacienti s normálním BAL profilem makrofágů (hraniční hodnota 85 %) (1,73±0,79) měli nižší expresi T-bet než pacienti < 85 % BAL makrofágů (3,72±1,69, p=0,05). Obdobně skupina pacientů s normálními hodnotami BAL lymfocytů (hraniční hodnota 11 %) vykazovala vyšší mRNA expresi (3,66±1,66) než skupina s hodnotami BAL lymfocytů < 11 % (1,98±0,90, p=0,15). Srovnání expresních profilů T-bet pro jednotlivé skupiny pacientů znázorňuje **Obrázek 11**.



Obrázek 11. Distribuce relativní mRNA exprese T-bet genu v neseparovaných BAL buňkách u **(a)** 62 pacientů se sarkoidózou (S) a 25 kontrolních jedinců (C), **(b)** podskupin rozdělených dle kouření. Další analýzy byly provedeny pouze u nekuřáků, kde byla exprese porovnána u skupiny pacientů rozdělených dle **(c)** RTG stádia (I, II, III a IV), **(d)** dle přítomnosti Löfgrenova syndromu, **(e)** podle postižení plicních a mimoplicních orgánů, **(f)** u pacientů s progresí nebo regresí onemocnění po dvou letech, **(g)** dle počtu BAL makrofágů a **(h)** dle počtu BAL lymfocytů. Hodnoty mediánu jsou znázorněny přímkou. NS-bez signifikance.

4.2.3.2 Korelace T-bet mRNA exprese s genovou expresí vybraných genů asociovaných se sarkoidózou

mRNA exprese T-bet korelovala se zvýšenou expresí genu IFNG (p<0,001), CCL5 (p<0,001), CXCL9 (p=0,033), CXCL10 (p=0,006), IL-2R/IL-15Rβ (p<0,001), CXCR3 (p<0,001) a CXCR6 (p=0,001). Ačkoli jsme pozorovali také pozitivní korelaci T-bet a CCR2-varianty B (p=0,003), exprese této transkripční varianty nebyla zvýšena u pacientů se sarkoidózou v porovnání s kontrolami. Naopak exprese CCR2-varianty A, která byla nalezena zvýšená u pacientů a nekorelovala s expresí T-bet (p<0,05). Podobně naše korelační analýza nenalezla asociaci exprese genů CCL2, CXCL11 a CCR5 (p>0,05) s T-bet expresí. Tyto výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 5**.

Tabulka 5. Korelace T-bet mRNA exprese s genovou expresí vybraných genů asociovaných se sarkoidózou.

	Korelace s T-bet mRNA expresí		
Gen	**S vs C *p*-hodnoty**	**Spearmanův koeficient**	***p*-hodnoty**
IFNG	0,00002**	0,660	<0,001**
IL-2R/IL-15Rb	0,01**	0,753	<0,001**
CCL2	0,410	0,169	0,200
CCL5	0,0002**	0,627	<0,001**
CXCL9	0,0007**	0,278	0,033*
CXCL10	0,0006**	0,353	0,006**
CXCL11	0,013*	0,259	0,052
CCR2-variant A	0,003**	0,232	0,116
CCR2-variant B	0,210	0,406	0,003*
CCR5	0,001**	0,209	0,149
CXCR3	0,0007**	0,738	<0,001**
CXCR6	0,00004**	0,455	0,001**

*: p<0,05; **: p<0,01

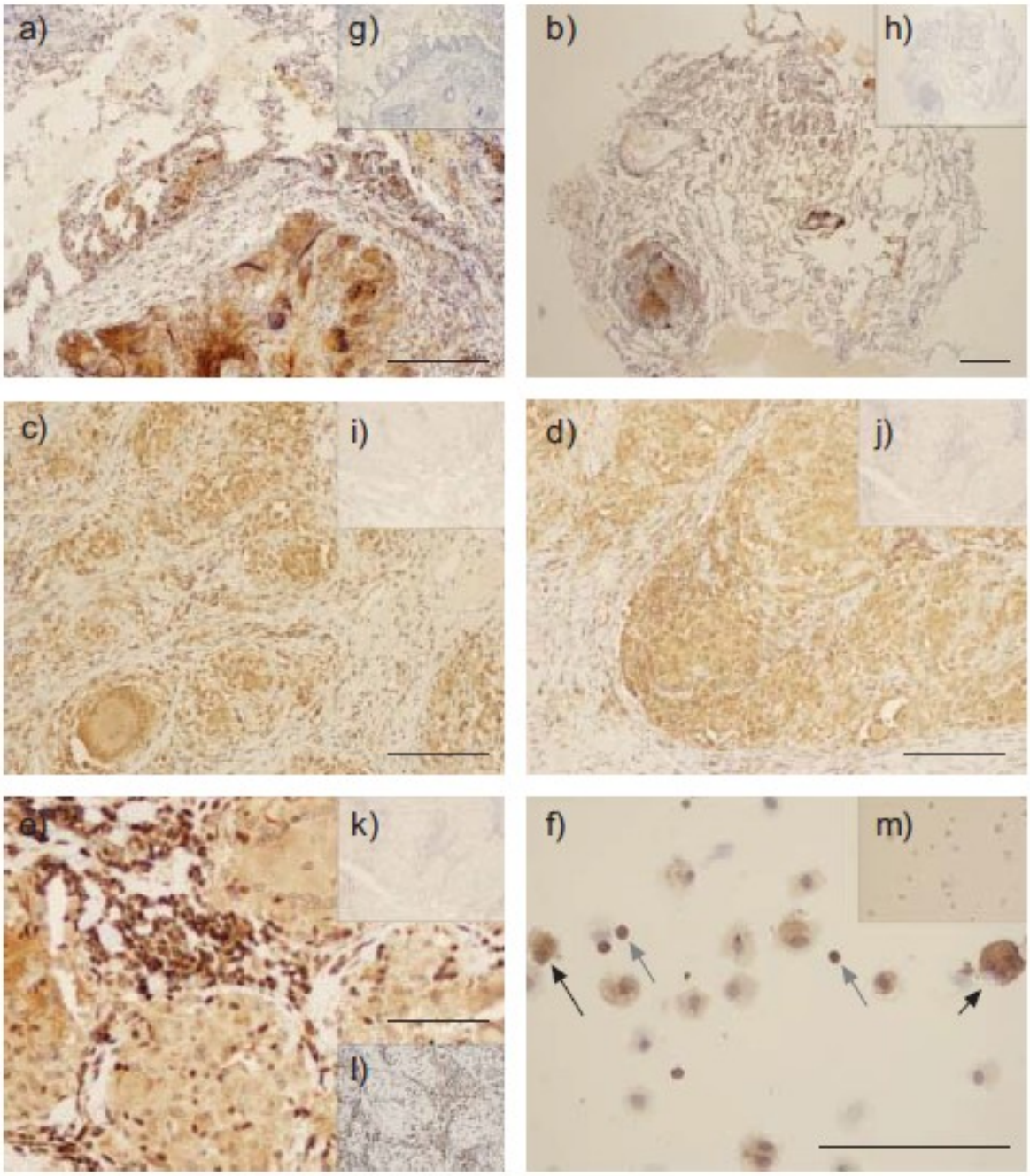
V rámci rozdělení pacientů do studovaných podskupin byly nalezeny rozdílné expresní profily u skupiny pacientů s přítomností a bez přítomnosti Löfgrenova

syndromu (LS), což je akutní forma sarkoidózy s dobrou prognózou, u genů: CCL5 (p=0,033), CXCL9 (p=0,041), IL-2R/IL-15Rβ (p=0,042), přičemž vyšší expresi vykazovali pacienti bez LS. Také při rozdělení pacientů do dvou skupin podle BAL buněčného profilu, jsme nalezli vyšší počet CCL5 transkriptů u pacientů s nižším počtem makrofágů (< 85 %) v BAL (p=0,003).

4.2.3.3 Lokalizace T-bet proteinu v BAL buňkách a tkáních

Buněčné preparáty v podobě cytospinů získané z BAL buněk, plicních biopsií a biopsií mízních uzlin pacientů se sarkoidózou byly zpracovány imunohistochemicky a imunocytochemicky, abychom lokalizovali přítomnost T-bet proteinu.

V plicních biopsiích byl T-bet detekován v makrofázích, mnohojaderných obrovských buňkách a epiteloidních buňkách granulomu a infiltrovaných lymfocytech pacientů se sarkoidózou (**Obrázek 12a-d**). Z lymfocytů byl T-bet protein nalezen pouze u T buněk. V mízní uzlině pacienta se sarkoidózou byl T-bet také silně exprimován T buňkami (**Obrázek 12e a 12l**). Při studiu BAL buněk pacientů se sarkoidózou byl T-bet protein detekován u alveolárních makrofágů a alveolárních lymfocytů (**Obrázek 12f**).



Obrázek 12. Detekce T-bet proteinu v řezech plicních a lymfatických uzlin a BAL buňkách pacientů se sarkoidózou. (a-d) U čtyřech reprezentativních vzorků pacientů byl T-bet protein exprimován v epiteloidních buňkách granulomu, v makrofázích, v mnohojaderných obrovských buňkách a lymfocytech plicní tkáně. **(e)** V lymfatických uzlinách pacienta se sarkoidózou byl T–bet exprimován T buňkami, **(g-k)** sérová isotypová kontrola po fixaci hematoxylinem. V BAL cytospinech byly nalezeny pozitivně značené buňky po inkubaci s **(f)** anti T-bet protilátkou, ale nebyly detekovány po barvení s kontrolní protilátkou **(m)**. Exprese T-bet proteinu byla lokalizována hlavně v cytoplasmě BAL makrofágů (černé šipky) a lymfocytů (šedé šipky). Použité měřítko: 100 μm (a, e, f), 200 μm (b-d).

4.2.4 Závěr

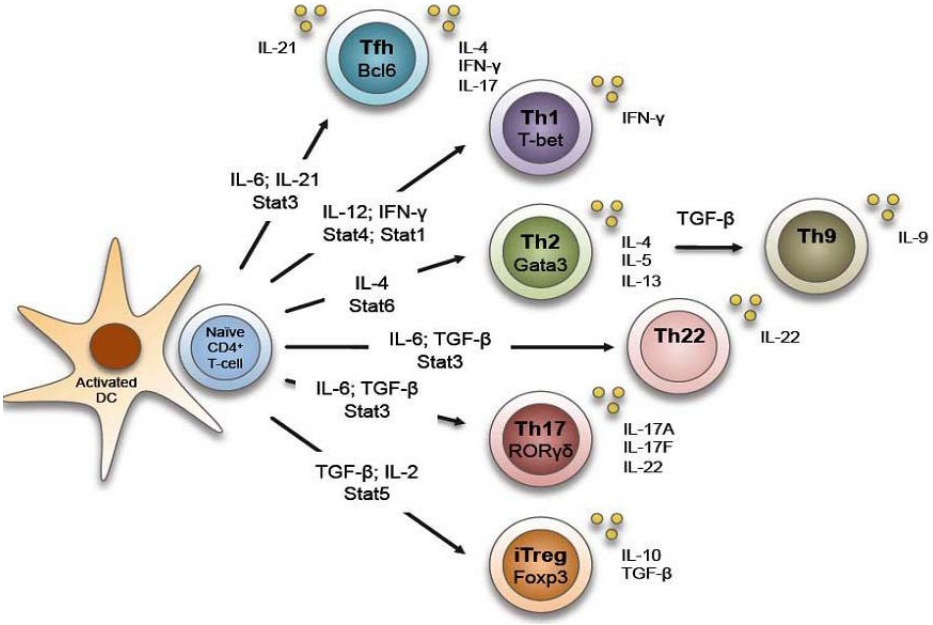
Prioritním výsledkem této studie bylo nejen prokázání zvýšené exprese T-bet u sarkoidózy, ale také korelace exprese tohoto transkripčního faktoru s expresí IFNG (p<0,001) a CXCR3 (p<0,001), dvou klíčových molekul v patogenezi sarkoidózy. Množství T-bet transkriptů korelovalo také s mRNA expresí cytokinů CCL5 (p<0,001), CXCL9 (p=0,033), CXCL10 (p=0,006) a receptorů IL-2R/15R beta (p<0,001) a CXCR6 (p=0,001). Korelační analýza neprokázala asociaci mezi T-bet a expresí genů CCL2, CXCL11, CCR2 a CCR5 (p≥0,05). Pomocí imunohistochemie jsme detekovali T-bet protein v alveolárních makrofázích a lymfocytech, dále v tkáňových obrovských mnohojaderných buňkách, makrofázích a lymfocytech. Mechanismus interakce mezi T-bet a studovanými geny bude nutno ověřit pomocí funkčních studií.

4.3 Role Th17 imunitní odpovědi u progrese sarkoidózy

4.3.1 Úvod do problematiky

Jak již bylo popsáno, plicní sarkoidóza je charakterizována tvorbou granulomů vznikajících zejména akumulací CD4+ Th1 lymfocytů a aktivovaných makrofágů v plicích (Baughman 2011). Kolektiv autorů Facco a spol (Facco 2011) však potvrdil, že Th17 imunitní odpověď hraje také důležitou roli v alveolární i granulomatózní fázi sarkoidózy. Navíc bylo prokázáno zvýšené množství Th17 lymfocytů u pacientů s progredujícím onemocněním s typickou fibrotizací (Facco 2011).

Th17 lymfocyty byly objeveny jako nezávislá skupina Th lymfocytů (Harrington 2005) s typickou produkcí interleukinů IL-17A, IL-17F a IL-22 (**Obrázek 13**). Hlavní funkcí této subpopulace pomocných lymfocytů je přispívat k obraně hostitele proti extracelulárním patogenům, zejména na povrchu sliznic (Gaffen 2009, Weaver 2006). Současné studie však potvrzují účast těchto buněk v patogenezi řady onemocnění, včetně plicních nemocí.



Obrázek 13. Diferenciace Th buněk. Ukázka produkce cytokinů typických pro jednotlivé podskupiny Th lymfocytů. (Převzato: https://www.erasmusmc.nl/content/3025942/3030149/thelper17subsetinpulmdiseases?lang=en).

Ovšem Th17 lymfocyty nejsou jedinými producenty cytokinu IL-17, také makrofágy (Song 2008, Nuovo 2012), CD8+ T buňky (Happel 2003), NK buňky (přirození zabíječi) a γδ T buňky (Stark 2009, Nembrini 2009) jsou schopny produkovat tento cytokin. Soustředíme-li se pouze na produkci IL-17 cytokinů Th17 buňkami, musíme si uvědomit, že iniciace, diferenciace a udržování produkce Th17 buněk vyžaduje spolupráci celé sítě faktorů, včetně transkripčních faktorů STAT3 a RORC (Korn 2007) a řady cytokinů jako je IL-6, IL-21, IL-23 a TGFB (Yang 2008). Na druhé straně bylo prokázáno, že rozvoj Th17 buněk je potlačován působením cytokinů IL-4, IL-27, IFNG, které jsou typickými produkty Th1 a Th2 lymfocytů, stejně jako je inhibován Th1 transkripčním faktorem T-bet (Guo 2010).

V rámci studia plicních onemocnění byly Th17 buňky studovány v patogenezi astmatu (Park 2010), plicní fibrózy (Kryczek 2008, Tesmer 2008, Kleinschek 2009), hypersenzitivní pneumonie (Joshi 2009), exacerbací u cystické fibrózy (Decraene 2010) a tuberkulózy (Babu 2009). V nedávné době byly Th17 buňky detekovány také v plicích a periferní krvi pacientů se sarkoidózou (Facco 2011). Nicméně pochopení funkce a aktivace Th17 linie u sarkoidózy a jejích jednotlivých klinických fenotypů je stále omezeno.

Cílem této studie tedy bylo rozšířit stávající znalosti o aktivaci a působení Th17 dráhy u plicní sarkoidózy zkoumáním expresních profilů regulačních molekul zapojených do aktivace (IL-6, IL-21, IL-23, TGFB, STAT3 a RORC) a inhibice (IL-27, T-bet) Th17 dráhy v buňkách bronchoalveolární laváže získané od 77 pacientů se sarkoidózou a 20 kontrolních jedinců. Vzhledem k tomu, že význam Th17 buněk byl prokázán zejména u progresivní formy onemocnění (Facco 2011), zaměřili jsme se dále na zkoumání expresních profilů aktivátorů, inhibitorů a produktů (IL-17A, IL-17F, IL-22) Th17 buněk v rámci skupin pacientů členěných dle průběhu onemocnění po 2 letech sledování.

4.3.2 Metody

4.3.2.1 Studovaný soubor

Do této studie bylo zařazeno 77 pacientů se sarkoidózou a 20 kontrolních jedinců. Pacienti se sarkoidózou byli diagnostikováni dle kritérií mezinárodních standardů pro toto onemocnění (Statement on sarcoidosis 1999). Pacienti byli dále rozděleni dle průběhu onemocnění po dvou letech sledování. Další charakteristiky jednotlivých skupin pacientů jsou uvedeny v **Tabulce 6**. Žádný z pacientů nepodstoupil léčbu před odběrem BAL. Kontrolní skupinu tvořilo 12 mužů a 8 žen v průměrném věku 46±17 let, z toho bylo 15 nekuřáků, 4 kuřáci a u jednoho jedince nebyla informace o kouření dostupná. Všichni jedinci podstoupili BAL vyšetření jako součást stanovení diagnózy nezánětlivého plicního onemocnění s normálními výsledky cytologického, imunologického a mikrobiologického vyšetření, a také s normálním poměrem CD4+/CD8+ lymfocytů.

Tabulka 6. Charakteristika studovaných pacientů

	Sarkoidóza n=77*	Remitující sarkoidóza n=27	Progredující sarkoidóza n=40
Pohlaví (M/Ž)	32/45	11/16	16/24
Věk	46±13 (25-77)	46±12 (25-70)	47±14 (25-77)
Kouření (ano/ne/ex)	11/50/16	2/17/8	5/28/7
RTG stádium I/II/III/IV	27/42/6/2	12/14/1/0	11/23/5/1
Löfgrenův syndrom (ano/ne)	22/55	5/22	11/29
Mimoplicní postižení (ano/ne)	27/50	11/16	14/26
Počet makrofágů v BAL (%)	78,3±10,5 (49,4-98,0)	77,1±12,5 (49,4-96,0)	78,4±9,3 (57,0-98,0)
Počet lymfocytů v BAL (%)	19,2±10,7 (2,0-49,0)	20,5±12,5 (3,0-49,0)	18,8±9,7 (2,0-41,0)
Počet neutrofilů v BAL (%)	1,6±2,1 (0,0-11,0)	1,3±1,6 (0,0-7,0)	1,9±2,5 (0,0-17,0)
Počet eosinofilů v BAL (%)	0,9±2,7 (0,0-17,3)	1,1±3,3 (0,0-17,0)	0,9±2,7 (0,0-17,3)
CD3+ (%)	82,7±13,4 (36,0-98,0)	87,4±9,8 (56,0-96,0)	78,9±14,7 (36,0-98,0)
CD4+ (%)	65,5±17,5 (23,0-92,0)	70,9±17,5 (34,0-92,0)	61,1±17,5 (23,0-90,0)
CD8+ (%)	16,3±11,8 (2,0-63,0)	14,9±13,0 (2,0-63,0)	17,4±10,2 (3,0-50,0)
CD19+ (%)	1,0±2,0 (0,0-14,0)	1,0±2,7 (0,0-14,0)	1,2±1,7 (0,0-8,0)
Poměr CD4+/CD8+	7,0±7,0 (0,5-46,0)	9,2±9,2 (0,5-46,0)	5,5±5,4 (0,5-30,0)

Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty±směrodatné odchylky (minimální a maximální hodnota). *u 10 pacientů byla doba sledování kratší než 2 roky.

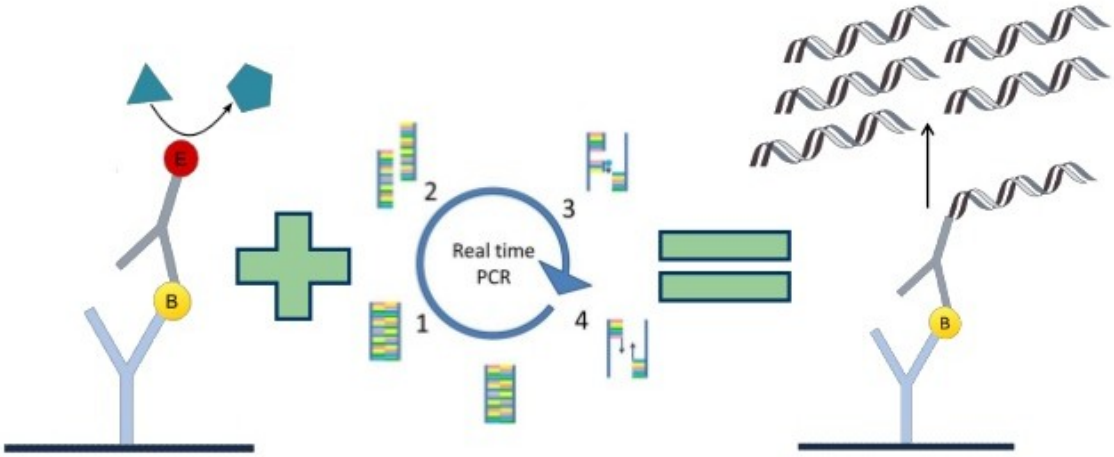
Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc. Všichni jedinci podepsali informovaný souhlas s využitím biologického materiálu (BAL a plicní biopsie) k diagnostickým i výzkumným účelům této studie.

4.3.2.2 Zpracování BAL buněk, qRT-PCR

Postup zpracování BAL buněk, následná izolace RNA, podmínky reverzní transkripce i kvantitativní PCR v reálném čase byly popsány v kapitole 4.1.2.2. PSMB2 gen byl použit jako referenční gen, dle výsledků předchozí studie (Kriegova 2008). Změny relativní mRNA exprese byly srovnávány neparametrickým Mann-Whitney U-testem a Spearmanův test byl použit pro korelační analýzy. K vyhodnocení byly požity statistické programy GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla**,** CA, USA) a SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

4.3.2.3 Detekce IL-17 proteinu v BAL tekutině imuno PCR metodou

Vzhledem k velmi nízkým koncentracím IL-17 proteinu v BAL tekutině byla využita inovativní Imuno PCR metoda (**Obrázek 14**) a byla modifikována dle již publikovaného postupu (Sano 1992).



Obrázek 14. Schématické znázornění Imuno PCR metody. Kombinace metod založených na principu ELISA a qPCR umožňuje detekci proteinů s koncentrací 1000 x nižší než je detekční limit standardních imuno esejí. (Převzato: Sano a spol. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates).

Pro navázání IL-17 proteinu byl během noční inkubace potažen povrch jamek speciálních zkumavek RoboStrip® PC clear (8 Well Strips, 0,2 ml, Analytic Jena, Jena, Německo) lidskou IL-17A protilátkou (ředění 50x, 0,5 mg/ml, eBioscience, Waltham, MA, USA). Po odmytí přebytečné protilátky promývacím pufrem (0,154M NaCl, 5mM Tris pH 7,75, 0,005% Tween 20) byly jamky zkumavek blokovány inkubačním pufrem (0,5% BSA, 0,05% Tween 20 v PBS) 1 h při 37°C. Zkumavky byly poté třikrát promyty promývacím pufrem. Do zkumavek bylo napipetováno 25 µl vzorků standardů (rekombinantní lidský IL-17A protein v rozmezí koncentrací 3,9–1000 pg/ml, eBioscience) nebo vzorky BAL tekutiny pacientů se sarkoidózou i kontrolních jedinců a inkubovány 1 h při 37°C. Poté byly jamky 6x promyty promývacím pufrem a do jamek byla pipetována 1000 x ředěná detekční anti-IL17A protilátka s konjugovanou DNA (TATAA, Biocenter, Göteborg, Švédsko) a inkubována 1 h při 37°C. Následovalo 6x promytí jamek promývacím pufrem a 6x promytí MilliQ vodou. Poté bylo do jamek přidáno 25 µl PCR master mixu (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche Applied Science), 0,5 µl každého primeru (10 µM) (5´-AGCGCGCGTAATACGACTC-3´ a 5´-ACCATGATTACGCCAAGCG-3´). qPCR byla provedena MiniOpticon™ Real-Time PCR

detekčním systémem (Bio-Rad, CA, USA) za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95°C, 7 min, 40 cyklů denaturace při 95°C, 10 s, přisednutí primerů při 60°C, 20 s a extenze při 72°C, 20 s (detekce signálu), analýza teplot tání byla provedena v rozmezí teplot 65-95°C.

4.3.2.4 Detekce IL-17 a STAT3 proteinu v plicních tkáních

Plicní biopsie získané transbronchiální (n=5) nebo video-asistovanou thorakoskopickou chirurgií (n=3) a cytospiny BAL buněk (n=9) byly zpracovány s použitím Envision + System-HRP (DAKO, Glostrup, Dánsko), jak již bylo popsáno v kapitole 4.2.2.3. Anti-IL-17 (H-132), králičí polyklonální protilátka (SC-7927, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, ředění 1:50) a anti-humánní STAT3 myší monoklonální protilátka (klon 232209, R & D Systems, ředění 1:200 pro plicní biopsie, 1:80 pro cytospiny) byly použity jako specifické protilátky. IS-Series Rabbit primární protilátka a negativní kontrolní myší protilátka (obě Dako; ředění 1:50) byly použity pro potvrzení specificity použitých protilátek.

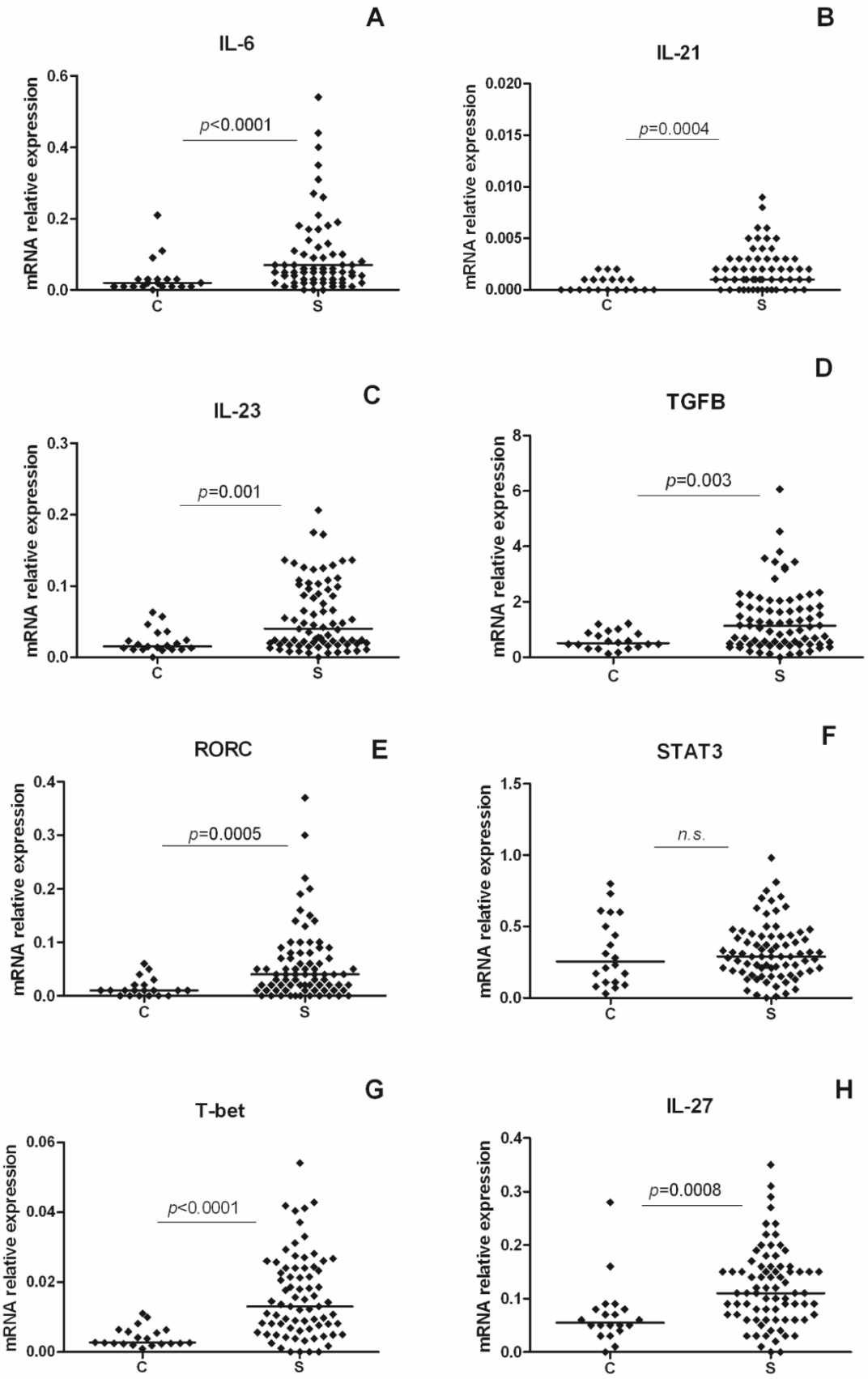
4.3.3 Výsledky

4.3.3.1 mRNA expresní profilování cytokinů (IL-17A, IL-17F, IL-22) produkovaných Th17 buňkami v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců

Při srovnávání skupiny kontrolních jedinců a pacientů se sarkoidózou nebyly nenalezeny rozdíly relativní exprese mRNA studovaných molekul: IL-17A (průměr±SD fold change: 0,88±0,48, p>0,05), IL-17F (0,81±0,53, p>0,05) a IL-22 (1,30±0,91, p>0,05). Možným důvodem může být velice nízká úroveň mRNA exprese těchto interleukinů. 60 % vyšetřovaných pacientů se sarkoidózou (55 pacientů pro IL-17A, 54 pacientů pro IL-17F, 51 pacientů pro IL-22) mělo expresi mRNA pod limitem detekce (CT hodnoty vyšší než 36. cyklus). Podobně u kontrolní skupiny byly asi 2/3 vzorků pod detekčním limitem pro všechny studované geny.

4.3.3.2 mRNA expresní profilování aktivátorů Th17 buněk (IL-6, IL-21, IL-23, TGFB, RORC, STAT3) v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců

Ze šesti studovaných aktivátorů byla nalezena zvýšená mRNA exprese genu IL-6 (10,40±7,05, p=0,00001; **Obrázek 15A**), IL-21 (2,86±1,43, p=0,0004, **Obrázek 15B**), IL-23 (2,77±1,30, p=0,001, **Obrázek 15C**), TGFB (2,27±0,93, p=0,003, **Obrázek 15D**) a RORC (3,92±2,13, p=0,0005, **Obrázek 15E**) v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou ve srovnání s kontrolními subjekty. Relativní mRNA expresní hladiny genu STAT3 se nelišily mezi pacienty (0,99±0,40) a kontrolními subjekty (p>0,05, **Obrázek 15F**).

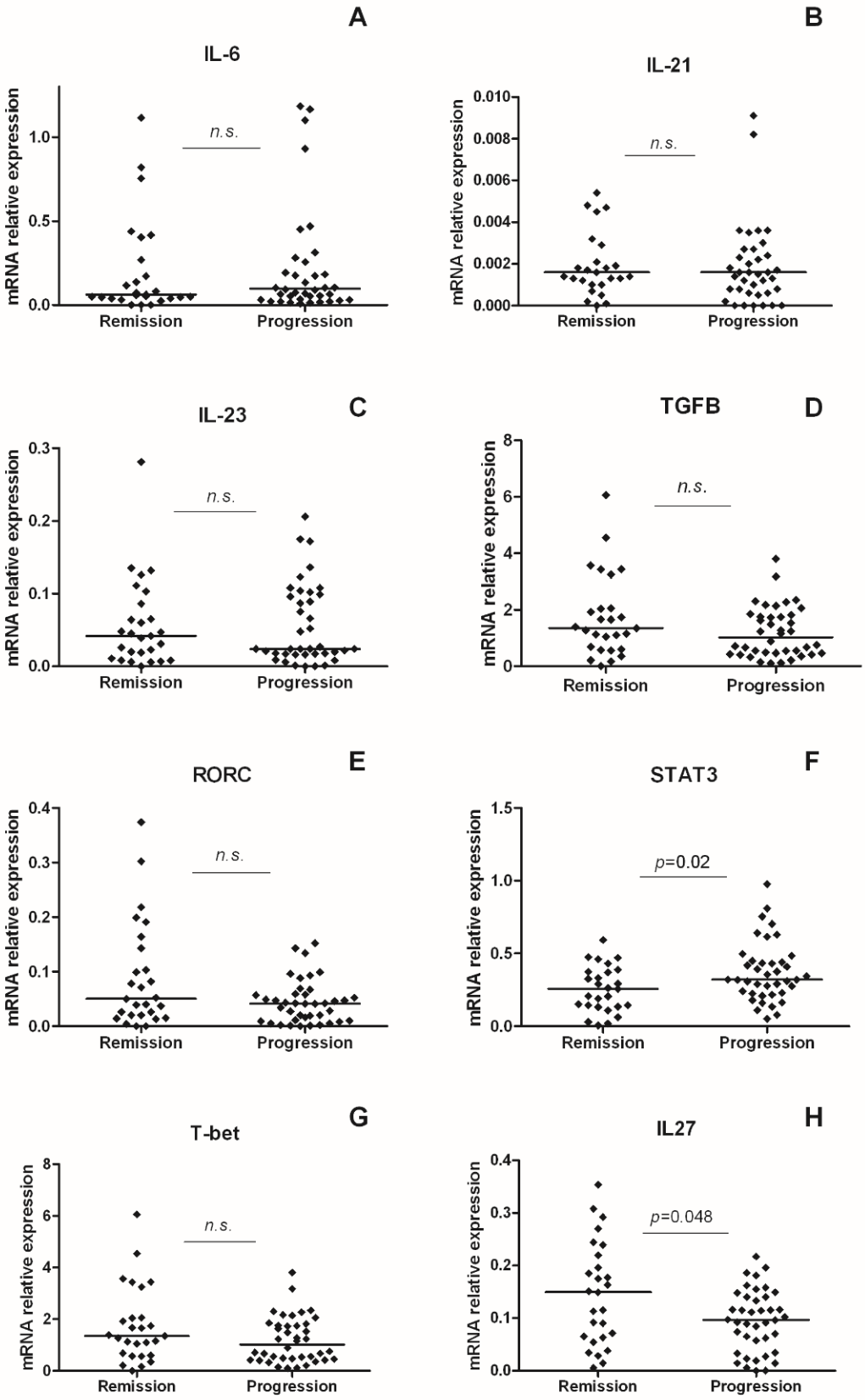


Obrázek 15. Srovnání mRNA relativní exprese aktivátorů a inhibitorů Th17 buněk v bronchoalveolární laváži 77 pacientů se sarkoidózou (S) a 20 kontrolních jedinců (C). Hodnoty průměru jsou znázorněny přímkou.

Skupina pacientů byla dále rozdělena dle průběhu onemocnění po dvou letech a byly srovnávány jejich expresní profily. Počet mRNA transkriptů pro IL-6 (remise 11,18±7,74, progrese 11,83±8,19, p>0,05, **Obrázek 16A**), IL-21 (9,30±7,02, 16,80±12,69; p>0,05, **Obrázek 16B**), IL-23 (2,10±1,02, 2,95±1,44; p>0,05, **Obrázek 16C**), TGFB (2,91±1,20, 1,97±0,82; p>0,05, **Obrázek 16D**) a RORC (5,99±3,07, 3,00±1,54; p>0,05, **Obrázek 16E**) se mezi pacienty s progresí a remisí onemocnění nelišil. Jediný aktivátor STAT3 byl up-regulován u pacientů s progredující sarkoidózou (remise 0,78±0,31, 1,17±0,47 progrese; p=0,02, **Obrázek 16F**).

4.3.3.3 mRNA expresní profilování inhibitorů Th17 buněk (T-bet a IL-27) v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců

Relativní úroveň mRNA exprese T-bet (3,72±1,55, p=0,0001, **Obrázek 15G**) a IL-27 (1,75±0,74, p=0,0008, **Obrázek 15H**) byla u pacientů se sarkoidózou vyšší než u kontrolních jedinců. Když byly srovnávány expresní profily mezi remitující a progredující sarkoidózou, počet T-bet transkriptů se nelišil (remise 5,01±2,39, progrese 5,04±2,41; p>0,05, **Obrázek 16G**). Na druhé straně exprese inhibitoru Th17 dráhy IL-27 byla snížena u pacientů s progredujícím onemocněním (remise 2,07±0,86, progrese 1,41±0,59, p=0,048, **Obrázek 16H**).



Obrázek 16. Srovnání mRNA relativní exprese aktivátorů a inhibitorů Th17 buněk v bronchoalveolární laváži 27 pacientů se sarkoidózou s remisí a 40 pacientů s progresí onemocnění po 2 letech sledování. Hodnoty průměru jsou znázorněny přímkou.

4.3.3.4 Vztah mezi aktivátory a inhibitory Th17 buněk u sarkoidózy a jejích klinických fenotypů

Protože imunitní odpověď Th17 buněk může být ovlivněna vztahem mezi jejími aktivátory a inhibitory, zkoumali jsme pomocí korelační analýzy možný vztah mezi expresními profily jednotlivých Th17 aktivátorů a inhibitorů u sarkoidózy, zejména nerovnováhu mezi inhibitory Th17 dráhy T-bet a IL-27 a transkripčním faktorem STAT3 asociovaným s progresí.

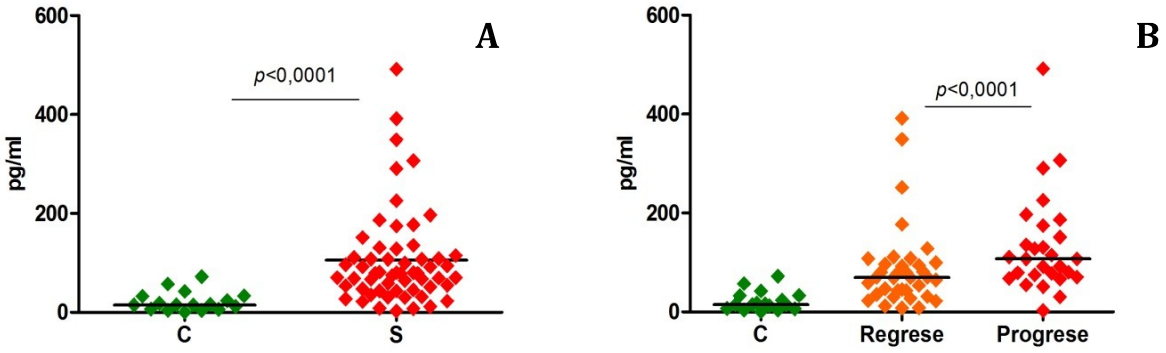
mRNA exprese Th17 aktivátorů TGFB (r_s=0,46, p<0,01), RORC (r_s=0,60, p<0,01), STAT3 (r_s=0,63, p<0,01), IL-23 (r_s=0,50, p<0,01) a IL-21 (r_s=0,28, p<0,05) korelovala se zvýšenou expresí T-bet. Podobně mRNA exprese studovaných aktivátorů TGFB (r_s=0,59, p<0,001), RORC (r_s=0,52, p<0,01), STAT3 (r_s=0,47, p<0,01) a IL-23 (r_s=0,58, p<0,01) korelovala se zvýšenou expresí IL-27. Kromě toho všechny zkoumané aktivátory TGFB, RORC a STAT3 korelovaly vzájemně (p<0,01).

Pokud jde o nerovnováhu aktivátorů a inhibitorů u jednotlivých klinických fenotypů, poměr STAT3/IL-27 byl zvýšen z 5,0±5,7 (střední hodnota±SD) u remitující sarkoidózy na 6,3±4,7 u progregující sarkoidózy (p=0,0003). Také jsme pozorovali zvýšení poměru STAT3/T-bet z 17,8±8,4 u pacientů s remisí na 32,9±16,2 u pacientů, u kterých došlo k progresi sarkoidózy během 2 let sledování (p=0,01).

4.3.3.5 Koncentrace IL-17 proteinu v BAL tekutině

Vzhledem k nízké koncentraci IL-17 proteinu v tekutině BAL bylo nutné nahradit standardní ELISA metodu citlivější imuno-qPCR technikou. Při porovnávání hodnot IL-17 proteinu v BAL tekutině 17 kontrolních jedinců (průměr±SD, pg/ml: 22,00±19,81), 25 pacientů v remisi (67,35±69,57), a 39 pacientů v progresi (132,60±98,94) jsme nalezli statisticky významné rozdíly mezi kontrolními jedinci a pacienty (p<0,0001,

Obrázek 17A) a také mezi podskupinami pacientů se sarkoidózou (p<0,0001, **Obrázek 17B**).



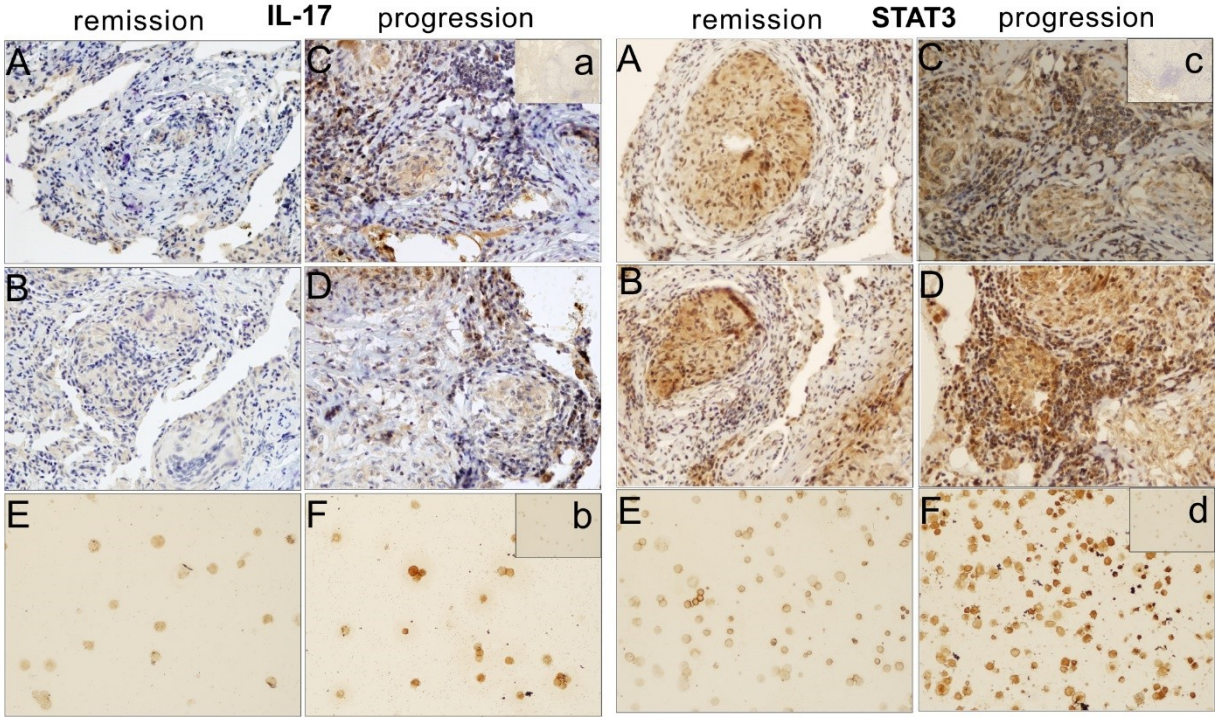
Obrázek 17. Srovnání koncentrace IL-17 proteinu v BAL tekutině: **(A)** 64 pacientů se sarkoidózou (S) a 17 kontrolních jedinců (C), **(B)** 25 pacientů s remisí a 39 pacientů s progresí onemocnění. Hodnoty průměru jsou znázorněny přímkou.

4.3.3.6 Lokalizace IL-17 a STAT3 proteinu

V plicních biopsiích byl IL-17 protein lokalizován v histiocytech a lymfocytech obklopujících granulom u pacientů s progresivní formou onemocnění (**Obrázek 18C, D**). U remitujících pacientů byl IL-17 protein lokalizován pouze v histiocytech granulomů, přičemž barvení bylo velmi slabé (**Obrázek 18A, B**). Také u cytospinových preparátů zhotovených z BAL buněk jsme pozorovali intenzivnější barvení IL-17 proteinu v alveolárních makrofázích u pacientů s progredujícím onemocněním (**Obrázek 18F**) než u pacientů s remisí (**Obrázek 18E**).

Lokalizace STAT3 byla patrná v histocytech přítomných v plicních sklípcích, dále v tkáňových histocytech v mnohojaderných obrovských buňkách a lymfocytech granulomu (**Obrázek 18A-D**). Při srovnání vývoje onemocnění po dvou letech bylo vyšší zastoupení pozitivních STAT3 histocytů a lymfocytů v plicních biopsiích pacientů

s progredující formou (Obrázek 18C, D) než s remitující formou onemocnění (**Obrázek 18A, B**). V BAL cytologických vzorcích bylo pozorováno intenzivnější barvení STAT3 proteinu v alveolárních makrofázích získaných od pacientů s progresivní sarkoidózou (**Obrázek 18F**) ve srovnání s pacienty s remitujícím onemocněním (**Obrázek 18E**).



Obrázek 18. Detekce IL-17 a STAT3 proteinu v plicních biopsiích od čtyř pacientů s remitující sarkoidózou **(A, B)** a progredující sarkoidózou **(C, D)** a v BAL cytologických vzorcích **(E, F)**.
a, b, c, d - sérové kontroly značené kontrastním barvením hematoxylinem. Původní zvětšení x 200 (x 100 u BAL cytospinů).

4.3.4 Závěr

Naše data potvrzují hypotézu o vlivu Th17 imunitní odpovědi na progresi sarkoidózy. Dále jsme prokázali klíčovou roli transkripčního faktoru STAT3, který je důležitým regulátorem Th17 buněk, v progresi tohoto onemocnění. Výzkum na myších modelech

fibrózy (Ma & Zhuang 2011) potvrdil naše nálezy prokazující klíčovou roli STAT3 při progresi onemocnění a v indukci fibrotizujících změn v plicích. Další studie budou nezbytné k porozumění funkčního dopadu deregulované Th17 dráhy a STAT3 na progresi sarkoidózy, případně jejich využití jako cílů terapeutického či profylaktického zásahu k prevenci vzniku fibrotizujících změn u tohoto onemocnění.

4.4 Příspěvek transkripční a post-transkripční regulace na cytokin/ chemokinovou síť u plicní sarkoidózy

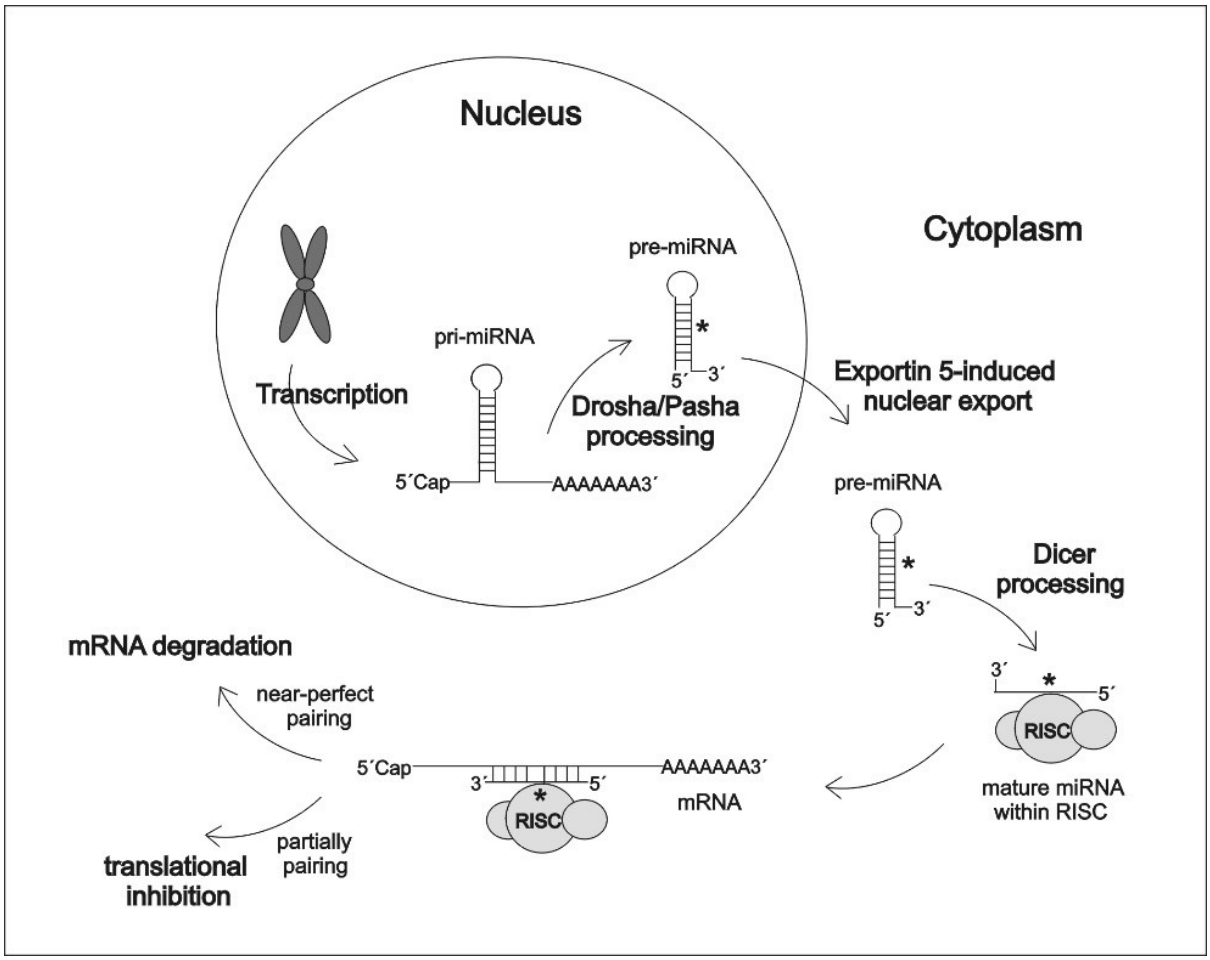
4.4.1 Úvod do problematiky

Klíčovou roli v patogenezi sarkoidózy, charakterizovanou akumulací aktivovaných Th1/Th17 lymfocytů a makrofágů v plicních sklípcích (Baughman 2003, Lynch 2005, Facco 2011), hrají prozánětlivé cytokiny a chemokiny, molekuly rozhodující a podílející se na aktivaci imunitních a zánětlivých buněk a jejich směřování do místa zánětu (Agostini 2000). Nicméně stále existuje pouze omezené množství informací o regulaci sítě cytokinových a chemokinových receptorů a jejich ligandů u plicní sarkoidózy a jejích fenotypů.

Bylo prokázáno, že stimulace zánětlivé odpovědi je velmi složitý proces, který vyžaduje koordinovanou účast a regulaci systémů jako jsou integrované sítě mikroRNA (miRNA) a transkripční faktory (Nazarov 2013, Zhang 2015). Klíčová úloha miRNA, což je třída jednovláknových nekódujících RNA o délce 19-25 nukleotidů (**Obrázek 19**), v regulaci zánětlivé odpovědi již byla popsána u chronických plicních chorob jako je astma (Greene 2013) a chronická obstrukční plicní onemocnění (Ezzie 2012). U sarkoidózy byl nalezen pozměněný miRNA vzorec v plicní tkáni (Crouser 2012), mononukleárních buňkách periferní krve (Crouser 2012, Maertzdorf 2012) a v séru (Jazwa 2015). Neexistuje však žádná informace týkající se miRNA profilu v buňkách bronchoalveolární laváže a jejich regulačních schopnostech souvisejících s cytokin/chemokinovou sítí u plicní sarkoidózy.

Také Th1 transkripční faktor T-bet byl objeven jako klíčový regulátor důležitých imunitních genů, jako je například interferon gamma a chemokinový receptor CXCR3 u granulomatózního zánětu (Kriegova 2011, Christophi 2014, Busuttil 2009), stejně jako

u dalších zánětlivých stavů (Beima 2006, Lewis 2007, Matsuda 2007). Opět ovšem nebyly dosud publikovány žádné informace o možné spolupráci Th1 transkripčního faktoru a zánětlivých microRNA při regulaci cytokin/chemokinové sítě v BAL buňkách u sarkoidózy.



Obrázek 19. miRNA biogeneze. miRNA jsou transkribovány RNA polymerasou II z genomové DNA, jako dlouhé (asi sto až tisíc nukleotidů) primární miRNA transkripty (pri-miRNA). Struktura vlásenky se smyčkou z pri-miRNA se potom v jádru štěpí dsRNA specifickou ribonukleázou Drosha/Pasha za vzniku 70 nukleotidů dlouhého prekurzoru miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA ve tvaru vlásenky je pak aktivně transportována z jádra do cytoplazmy. V cytoplasmě je pre-miRNA následně štěpena RNázou III Dicer na zhruba 22-nt miRNA duplexy, skládající se z „guide" vlákna a „passenger" vlákna. „Passenger" vlákno je dále degradováno, zatímco „guide"vlákno je začleněno do RNA-induced silencing komplexu (RISC) a slouží jako funkční, zralá miRNA, která působí dvěma odlišnými mechanismy podle komplementarity s cílovou mRNA.

V této kapitole jsme se zaměřili na studium genové exprese kandidátních miRNA souvisejících se zánětem v BAL buňkách získaných od pacientů se sarkoidózou

a kontrolních jedinců. Za účelem posouzení možných příspěvků miRNA molekul jako posttranskripčních regulačních prvků a T-bet molekuly, významného transkripčního faktoru ovlivňujícího Th1 imunitní odpověď vedoucí ke vzniku alveolitidy a následně granulomu a další produkce cytokinů podílejících se na tomto procesu, jsme hledali souvislosti a možné vztahy mezi miRNA, T-bet a cytokin/chemokinových sítí v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou a jejich podskupin s progredujícím a remitujícím onemocněním hodnoceným po dvou letech. Domníváme se, že pochopení transkripční a posttranskripční regulace této sítě by mohly vrhnout světlo na příčiny vzniku a průběh plicní sarkoidózy a dalších zánětlivých a autoimunitních onemocnění a nakonec položit základy pro terapeutické využití.

4.4.2 Metody

4.4.2.1 Studovaný soubor

Do této studie bylo zařazeno 48 pacientů se sarkoidózou a 14 kontrolních jedinců. Pacienti se sarkoidózou byli diagnostikováni dle kritérií mezinárodních standardů pro toto onemocnění (Statement on sarcoidosis. 1999). Pacienti byli dále rozděleni dle průběhu onemocnění po dvou letech sledování. Další charakteristiky jednotlivých skupin pacientů jsou uvedeny v **Tabulce 7**. Vzorky byly odebírány v době diagnózy, žádný z pacientů nepodstoupil léčbu před odběrem BAL. Všichni kontrolní jedinci podstoupili BAL vyšetření jako součást stanovení diagnózy při psychogenním kašli, při kašli spojeném s refluxní chorobou a plicní hypertenzí.

Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc. Všichni jedinci podepsali informovaný souhlas

s využitím biologického materiálu (BAL a plicní biopsie) k diagnostickým i výzkumným účelům této studie.

Tabulka 7. Charakteristika studovaných pacientů

	Sarkoidóza n=48	Regrese n=28	Progrese n=20	Kontroly n=14
Věk	47,9 (29–72)	45,8 (29–70)	50,9 (32–72)	39,6 (19–63)
Pohlaví (M/Ž)	23/25	12/16	11/9	9/5
Kouření (ano/ne/ex)	0/37/11	0/20/8	0/17/3	0/9/5
Mimoplicní postižení (ne/ano)	35/13	18/10	17/3	-
RTG stádium I/II	15/33	10/18	5/15	-
Löfgrenův syndrom (ano/ne)	7/41	4/24	3/17	-
Počet makrofágů v BAL (%)	75,6±5,8 (40,0–94,0)	74,3±6,6 (40,0–94,0)	77,5±4,5 (60,5–87,4)	92,2±13,5 (83,8–97,4)
Počet lymfocytů v BAL (%)	21,6±5,5 (4,6–49,0)	22,8±6,2 (6,0–49,0)	19,9±4,6 (4,6–36,0)	6,2±2,3 (1,6–1,0)
Počet neutrofilů v BAL (%)	2,1±1,6 (0,0–18,0)	2,3±1,8 (0,0–18,0)	1,8±1,2 (0,0–10,0)	1,5±0,8 (0,3–6,0)
Počet eosinofilů v BAL (%)	1,3±1,9 (0,0–17,3)	1,3±1,6 (0,0–17,0)	1,4±1,9 (0,0–17,3)	0,3±0,1 (0,3–0,6)
CD3+ (%)	83,6±6,4 (48,0–98,0)	83,8±7,1 (48,0–96,0)	83,3±5,7 (54,0–98,0)	74,1±7,2 (40,0–92,0)
CD4+ (%)	64,9±8,8 (23,0–92,0)	66,9±8,9 (27,0–92,0)	62,0±8,9 (23,0–86,0)	45,7±7,3 (22,0–67,0)
CD8+ (%)	16,8±5,7 (2,0–50,0)	14,4±4,9 (2,0–42,0)	20,3±6,4 (4,0–50,0)	27,4±5,5 (14,0–51,0)
CD19+ (%)	1,03±1,2 (0,0–14,0)	0,9±1,3 (0,0–14,0)	1,2±1,1 (0,0–8,0)	1,2±0,6 (0,0–3,0)
Poměr CD4+/CD8+	6,8±3,6 (0,8–46,0)	7,9±4,2 (1,1–46,0)	5,3±2,6 (0,8–21,3)	2,0±0,5 (0,5–3,7)

n=počet pacientů; data jsou prezentována jako průměr±SD (minimum-maximum)

4.4.2.2 Zpracování BAL buněk, miRNA/mRNA izolace, reverzní transkripce

BAL buňky byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2.2. Celková RNA byla izolována z BAL buněk s použitím mirVana™ miRNA kitu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Koncentrace a kvalita RNA byla měřena přístrojem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) s použitím kitů Nano RNA 6000 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Reverzní transkripce (RT) miRNA byla provedena s TaqMan mikroRNA Reverse Transkription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)

za použití specifických RT primerů zajišťující vysokou účinnost a specifičnost RT (Chen 2005) v souladu s pokyny výrobce. Reakce byly inkubovány po dobu 30 min při teplotě 16°C, 30 min při 42°C a 5 minut při teplotě 85°C. Získaná cDNA byla skladována při -20°C až do jejího použití.

4.4.2.3 Měření miRNA/mRNA exprese pomocí kvantitativní RT-PCR

Genová exprese pro každou miRNA a mRNA v BAL buňkách byla vyšetřována pomocí qRT-PCR s použitím specifických primerů a sond. qRT-PCR pro jednotlivé miRNA byla prováděna v 20 µl reakční směsi, která obsahovala 1,3 µl zředěného produktu RT, 1 µl 20X TaqMan individuální microRNA mixu, 10 µl 2X TaqMan Universal PCR master mixu, AmpErase UNG (Applied Biosystems) a 7,7 µl H_2O. qRT-PCR pro jednotlivé mRNA exprese byla provedena dle protokolu, jak již bylo popsáno dříve (4.1.2.2). RT-PCR reakce byly prováděny na systému RotorGene3000 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Reakční kroky byly následující: 95°C po dobu 10 minut, následovalo 40 cyklů při 95°C po dobu 15 s a 60°C po dobu 1 min. Pro výpočet relativní exprese mRNA a miRNA byla použita metoda druhé derivace (RotorGene Software 6.1.81, Corbett, Sydney, Austrálie); cDNA připravená z lidské univerzální referenční RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA) byla použita jako kalibrátor. Jako referenční gen pro miRNA analýzy byla použita endogenní kontrola savčí U6, pro mRNA analýzy byl použit referenční gen PSMB2 (Kriegova 2008). Změny exprese byly prezentovány jako průměr relativní exprese s 95 % intervalem spolehlivosti (CI).

4.4.2.4 Výběr kandidátních miRNA a identifikace vazebných míst

K výběru kandidátních miRNA asociovaných se zánětem byl použit webový server miRNA DIANA-mirPath v.3 (http://www.microrna.gr/miRPathv3/) (Vlachos 2015). Pro identifikaci vazebných míst mezi kandidátními miRNA a mRNA, jsme použili mirSystem (Lu 2012). Tento webový nástroj integruje sedm nejčastěji používaných predikčních algoritmů: DIANA, Miranda, miRBridge, PicTar, PITA, rna22 a TargetScan. Navíc obsahuje ověřené údaje o interakcích mezi jednotlivými kandidátními miRNA a jejich cílovými geny z TarBase a miRecords databází.

4.4.2.5 miRNA/mRNA korelační analýzy

Pro sledování vztahů mezi miRNA expresí a mRNA expresí T-bet a členů cytokin/chemokinové sítě asociované se sarkoidózou byly vypočítány korelační matice. Korelace byly vyjádřeny Spearmanovým koeficientem. Korelační matice byly znázorněny pomocí teplotních map, kde byla provedena hierarchická aglomerativní analýza shlukování za účelem znázornit vztahy mezi skupinami miRNA a mRNA. Barva každé buňky teplotní mapy odpovídá hodnotě Spearmanova korelačního koeficientu.

4.4.2.6 Vizualizace miRNA/mRNA vztahů pomocí Circos diagramů

Pro grafické znázornění vztahů mezi miRNA, mRNA a T-bet byl použit Chord diagram generovaný v systému Circos (Krzywinski 2009) (http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/) pro soubor (i) pacientů se sarkoidózou a podskupin pacientů s (ii) progresí onemocnění a (iii) remisí nemoci během 2 let sledování. V diagramu jsou znázorněny jen významné korelace (p<0,05). Intenzita korelací (w) mezi jednotlivými dvojicemi miRNA-mRNA odpovídala absolutní hodnotě Spearmanova korelačního koeficientu (r_s), pro které byla

provedena matematická transformace za účelem zdůraznění rozdílů v intenzitách korelací. Pro transformaci byl použit následující vzorec: $w = 1 + [10 \times (r_s\text{-}t)]^2$, kde t představuje práh pro nejvyšší signifikantní p hodnotu.

4.4.2.7 Analýza vztahů mezi miRNA/mRNA/T-bet

Pro schematické znázornění vztahů mezi miRNA, T-bet a cytokiny, chemokiny a jejich receptory byla zkonstruována síť vážených hodnot genové exprese (Horvath 2011). Dále byl aplikován algoritmus založený na analýze nejbližších sousedních hodnot studovaných molekul (znázorněných jako vrcholy) (Zehnalova 2014). Větší vrcholy sítě (znázorněny jako koule) znázorňují ještě bližší vzdálenosti sousedních molekul založené na korelační analýze. Byly zachovány pouze hrany, které spojují nejbližší sousedy (páry s nejvyšší korelací). Jinými slovy velikost vrcholů (koulí) a spojení mezi vrcholy znázorňují vztahy mezi zkoumanými molekulami v dané síti.

4.4.2.8 Statistické analýzy

Analýza dat byla provedena s použitím GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) a SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Rozdíly miRNA a mRNA expresních hodnot mezi kohortami byly hodnoceny pomocí neparametrické Kruskal-Wallis analýzy; neparametrický Mann Whitney test byl použit k určení významných rozdílů mezi dvěma skupinami. Spearmanův korelační koeficient a jeho odpovídající p hodnoty byly vypočteny za použití R statistického softwarového balíčku (http://www.r-project.org/).

4.4.3 Výsledky

4.4.3.1 Výběr studovaných miRNA

Kandidátní miRNA byly vybrány na základě jejich možného zapojení do regulace zánětlivé odpovědi, zejména se zaměřením na možnou regulaci cytokin/chemokinové sítě. S použitím DIANA-mirPath v.3 jsme nominovali 25 kandidátních miRNA (miR-let-7c, let-7d, miR-21, miR-24, miR-25, miR-92a, miR-125a, miR-126, miR-133a, miR-146a, miR-148a, miR-150, miR-155, miR-181, miR-199a, miR-202, miR-204, miR-206, miR-212, miR-214, miR-222, miR-223, miR-302c, miR-424 a miR-503), které mohou být cíleny na cytokiny, chemokiny a jejich receptory asociované se sarkoidózou.

4.4.3.2 miRNA expresní profilování

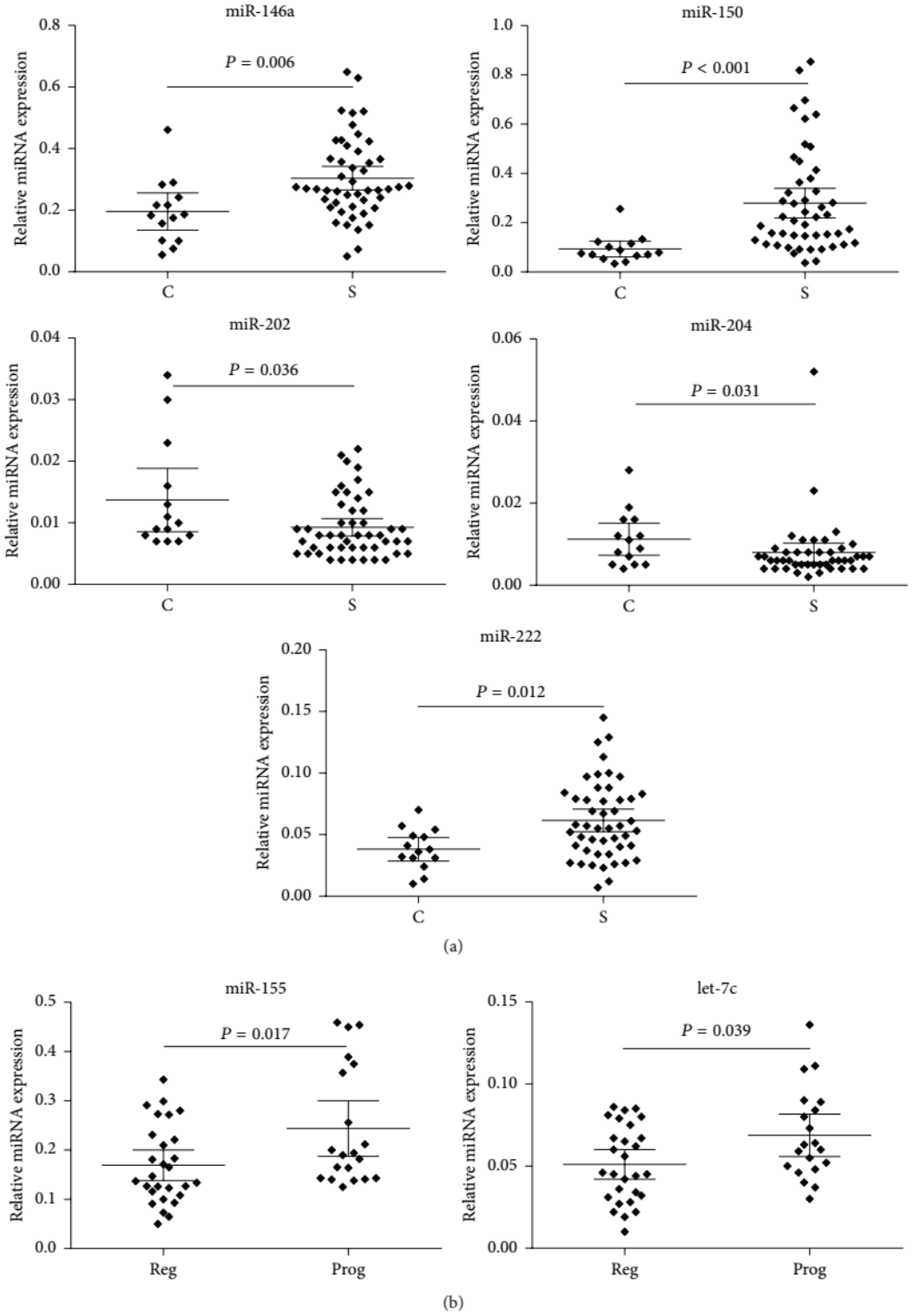
Analýza miRNA expresí u pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců

Srovnali jsme expresní profily 25 kandidátních miRNA v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců. U pacientů jsme nalezli zvýšenou expresi u miR-150 (p<0,001) a miR-146a (p=0,006) a naopak sníženou expresi u miR-202 (p=0,036), miR-204 (p=0,031) a miR-222 (p=0,012) ve srovnání s kontrolami (**Obrázek 20a**). Ostatní miRNA se svou expresí v rámci porovnání pacientů a kontrol nelišily. Výsledky expresního profilování všech sledovaných miRNA znázorňuje teplotní mapa (**Obrázek 21a**).

Analýza miRNA expresí u pacientů se sarkoidózou s progresí/remisí onemocnění

Srovnali jsme také miRNA expresní profily u pacientů s progredující a remitující sarkoidózou po dvou letech sledování. U pacientů, u kterých došlo k remisi, byly nalezeny zvýšené exprese miR-155 (p=0,017) a let-7c (p=0,039) ve srovnání s těmi,

u kterých byla zaznamenána progrese. Ostatní miRNA exprese se od sebe nelišily při porovnání obou podskupin (**Obrázek 20b**).

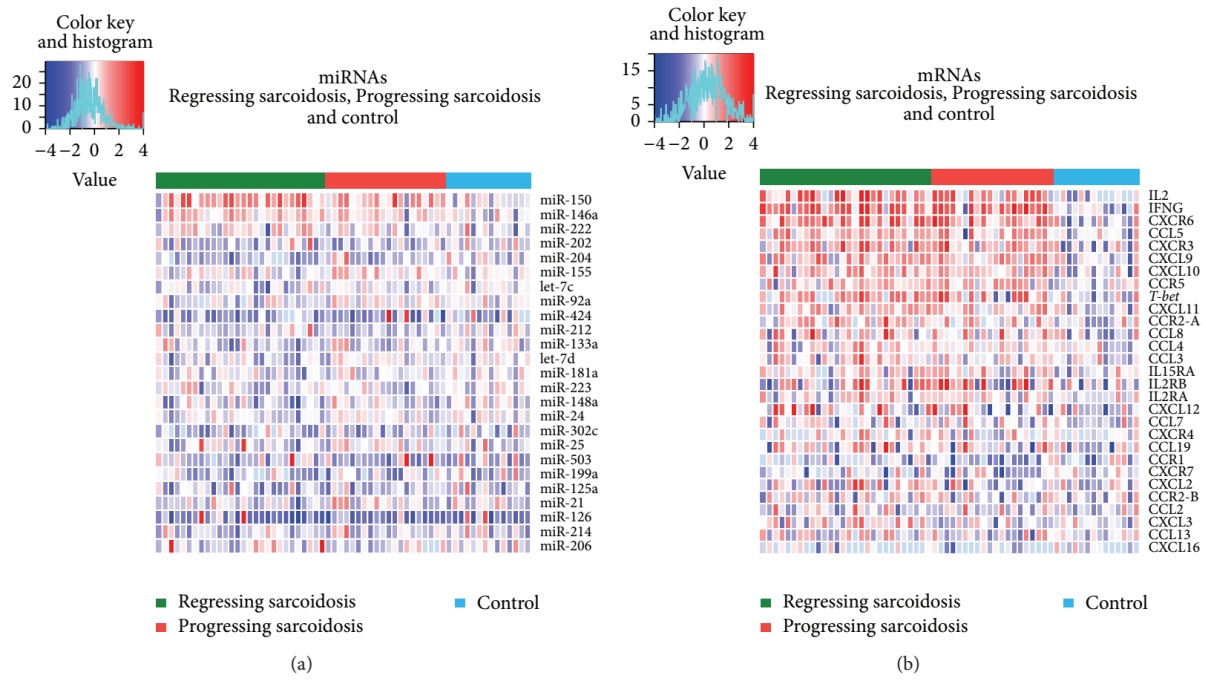


Obrázek 20: Distribuce relativní miRNA exprese (a) pěti deregulovaných miRNA u pacientů se sarkoidózou (S) a kontrolních jedinců (C), **(b)** dvou deregulovaných miRNA mezi pacienty s regresí (Reg) a progresí (Prog) onemocnění. Průměr hodnot je znázorněn horizontální úsečkou, chybové úsečky znázorňují 95 % CI.

4.4.3.3 mRNA expresní profilování

V této části práce jsme se zaměřili na studium genové exprese spektra cytokinů, chemokinů a jejich receptorů asociovaných se sarkoidózou (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL19, CXCL2, CXCL3, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL16, CCR1, CCR2A, CCR2B, CCR5, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CXCR7, IL-2, IL-2RA, IL-2RB, IL-15RA, IFNG) a transkripčního faktoru T-bet v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců.

Nalezli jsme zvýšenou expresi CC chemokinů CCL3 (p=0,043), CCL4 (p=0,034), CCL5 (p<0,001) a CCL8 (p=0,031) a CXC chemokinů CXCL9 (p<0,001), CXCL10 (p=0,002) a CXCL11 (p=0,008) u pacientů se sarkoidózou ve srovnání s kontrolami. Ze studovaných receptorů jsme u pacientů nalezli zvýšenou expresi genů CCR2-var.A (p=0,018), CCR5 (p=0,003), CXCR3 (p<0,001) a CXCR6 (p<0,001) a také exprese těchto genů IL-2 (p<0,001), IL-2RB (p=0,049), IL-15RA (p=0,048) a IFNG (p<0,001) byla zvýšena ve srovnání s kontrolními jedinci. Výsledky expresního profilování všech sledovaných mRNA znázorňuje teplotní mapa (**Obrázek 21b**).



Obrázek 21. Hierarchické shlukování dat genové exprese. Řádky představují jednotlivé **(a)** miRNA a **(b)** mRNA. Sloupce reprezentují jednotlivé vzorky, které byly předem rozděleny do tří kohort, pacienti s regresí (zelená zóna), pacienti s progresí (červená zóna) a kontrolní jedinci (modrá zóna). Barvy představují hladiny genové exprese (modrá: nízkou expresi, červená: vysokou expresi). Analýza byla provedena pomocí statistického softwarového balíku R (http://www.r-project.org/).

4.4.3.4 Korelační analýzy miRNA, t-bet a členů cytokin/chemokinové sítě

K posouzení vztahů mezi studovanými miRNA a mRNA v BAL buňkách jsme provedli srovnávací analýzu. Hraniční hodnota Spearmanova korelačního koeficientu byla nastavena pro p<0,05.

Korelace dvojic miRNA-mRNA byly posuzovány v rámci třech skupin: všichni pacienti se sarkoidózou, pouze progredující pacienti a pouze remitující pacienti. Nejvýznamnější korelace dvojic miRNA-mRNA pro jednotlivé skupiny jsou popsány v **Tabulce 8** a znázorněny pomocí Chord diagramů (**Obrázek 22**). Vzhledem k tomu, že

nebyly nalezeny žádné významné korelace pro skupinu kontrolních jedinců, data nejsou prezentována.

Tabulka 8. Významné korelace miRNA-mRNA u pacientů se sarkoidózou (všichni pacienti, podskupiny pacientů s progresí a remisí po 2 letech sledování)

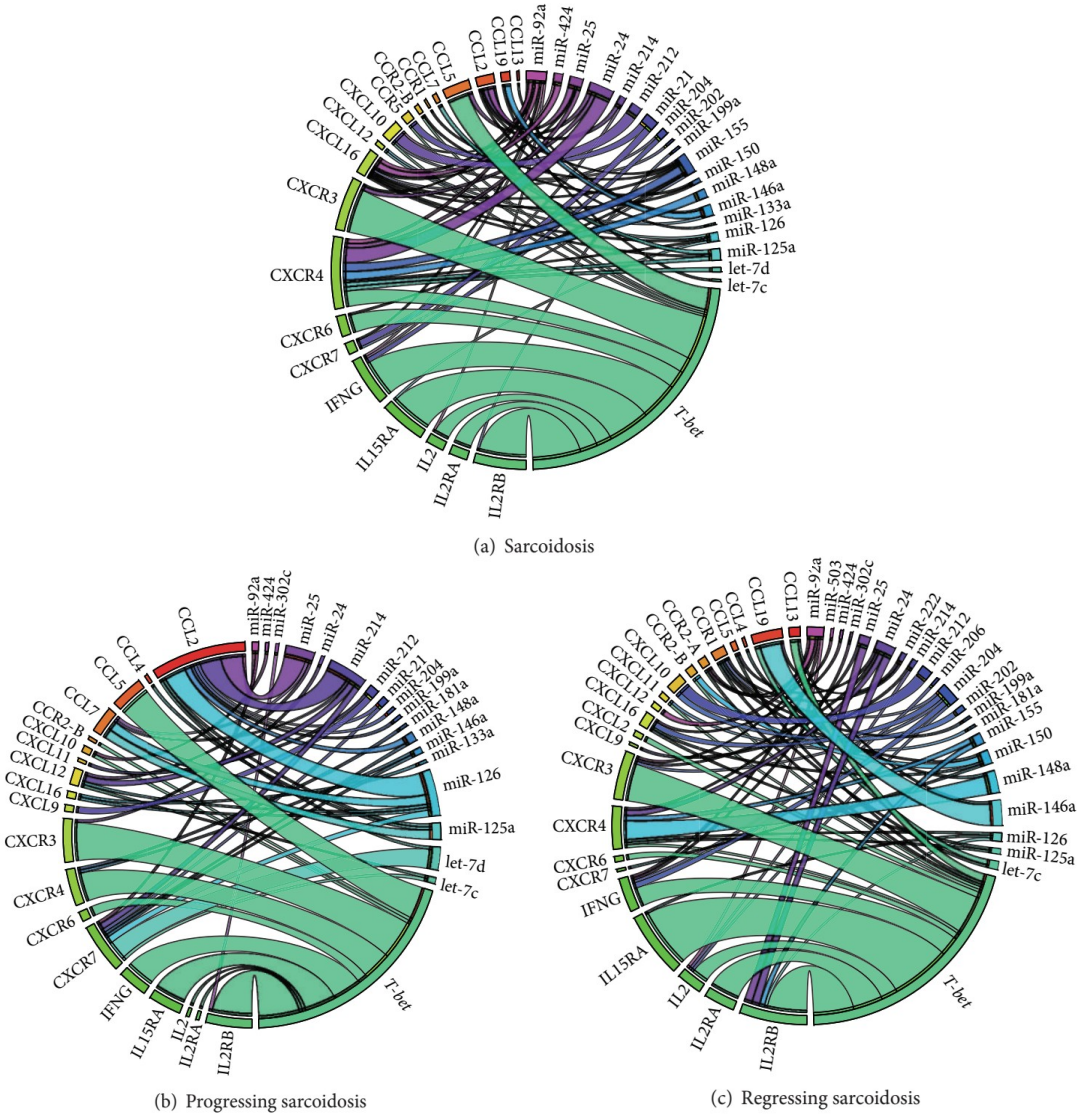
Sarkoidóza		Progrese		Regrese	
miRNA-mRNA	***p* hodnota**	**miRNA-mRNA**	***p* hodnota**	**miRNA-mRNA**	***p* hodnota**
miR-212-CXCL10	$p<0,001$	miR-25-CCL2	$p<0,001$	miR-146a-CCL19	$p<0,001$
miR-24-CXCR4	$p<0,001$	miR-126-CCL2	$p<0,001$	let-7c-CCL19	$p=0,007$
miR-125a-CCL7	$p=0,005$	miR-214-CCL2	$p<0,001$	miR-202-CXCL10	$p=0,010$
miR-146a-CCL19	$p=0,003$	miR-125a-CCL7	$p=0,008$	miR-212-CXCL10	$p=0,002$
miR-25-CCL2	$p=0,002$	miR-126-CCL7	$p=0,009$	miR-92a-CXCL12	$p=0,008$
miR-214-CCL2	$p=0,008$	let-7d-CXCR7	$p=0,001$	miR-148a-CXCR4	$p=0,002$
miR-24-CCL5	$p=0,010$	miR-126-CXCR7	$p=0,009$	miR-24-IL2RB	$p=0,006$
miR-24-CXCR3	$p=0,005$			miR-25-IL2RB	$p=0,006$
miR-21-CXCR7	$p=0,003$				
miR-204-IFNG	$p=0,008$				
miR-148a-CXCR4	$p=0,003$				
miR-155-CXCR4	$p=0,003$				

Obdobně nejvýznamnější korelace T-bet exprese s mRNA cytokinů/chemokinů a jejich receptorů pro tři skupiny pacientů (všichni pacienti, progredující a remitující pacienti) shrnuje **Tabulka 9**. Graficky je T-bet korelace také znázorněna v Chord grafu (**Obrázek 22**).

Tabulka 9. Významné korelace T-bet s mRNA cytokinů/chemokinů a jejich receptorů u pacientů se sarkoidózou (všichni pacienti, podskupiny pacientů s progresí a remisí po 2 letech sledování)

Sarkoidóza		Progrese		Regrese	
mRNA	***p* hodnota**	**mRNA**	***p* hodnota**	**mRNA**	***p* hodnota**
CCL5	$p<0,001$	CCL5	$p<0,001$	CXCR3	$p<0,001$
CXCR3	$p<0,001$	CXCR3	$p<0,001$	IL-2	$p<0,001$
CXCR4	$p<0,001$	CXCR4	$p<0,001$	IL2RA	$p<0,001$
CXCR6	$p<0,001$	IL2RB	$p<0,001$	IL2RB	$p<0,001$
IL-2	$p<0,001$	IL15RA	$p<0,001$	IL15RA	$p<0,001$
IL2RA	$p<0,001$	IFNG	$p<0,001$	IFNG	$p<0,001$
IL2RB	$p<0,001$	CXCR6	$p=0,005$	CCL13	$p=0,004$
IL15RA	$p<0,001$	CXCL10	$p=0,016$	CXCL2	$p=0,004$
IFNG	$p<0,001$	CCR2B	$p=0,029$	CXCR6	$p=0,007$
CCR2B	$p=0,004$	IL-2	$p=0,044$	CXCL11	$p=0,013$
CXCL10	$p=0,021$	IL2RA	$p=0,037$	CCL5	$p=0,018$
CCR5	$p=0,021$			CCR2A	$p=0,033$
				CCR2B	$p=0,023$
				CXCR4	$p=0,017$

U pacientů se sarkoidózou byly některé geny ve vzájemném vztahu s T-bet i miRNA geny současně: CCL5, CXCL10, CXCR3, CXCR4, CXCR6, IL-2, IL-15RA a IFNG (**Obrázek 22a, 23**). U skupiny pacientů s progresí onemocnění byla korelace s T-bet a miRNA současně pozorována u receptoru CXCR3 a IL-2RB (**Obrázek 22b**), zatímco v regresi onemocnění T-bet a miRNA korelovala s CCL5, CCL13, CXCL11, CCR2A, CCR2B, CXCR3, CXCR4, IL-2, IL-2RB, IL-15RA a IFNG geny (**Obrázek 22c**).

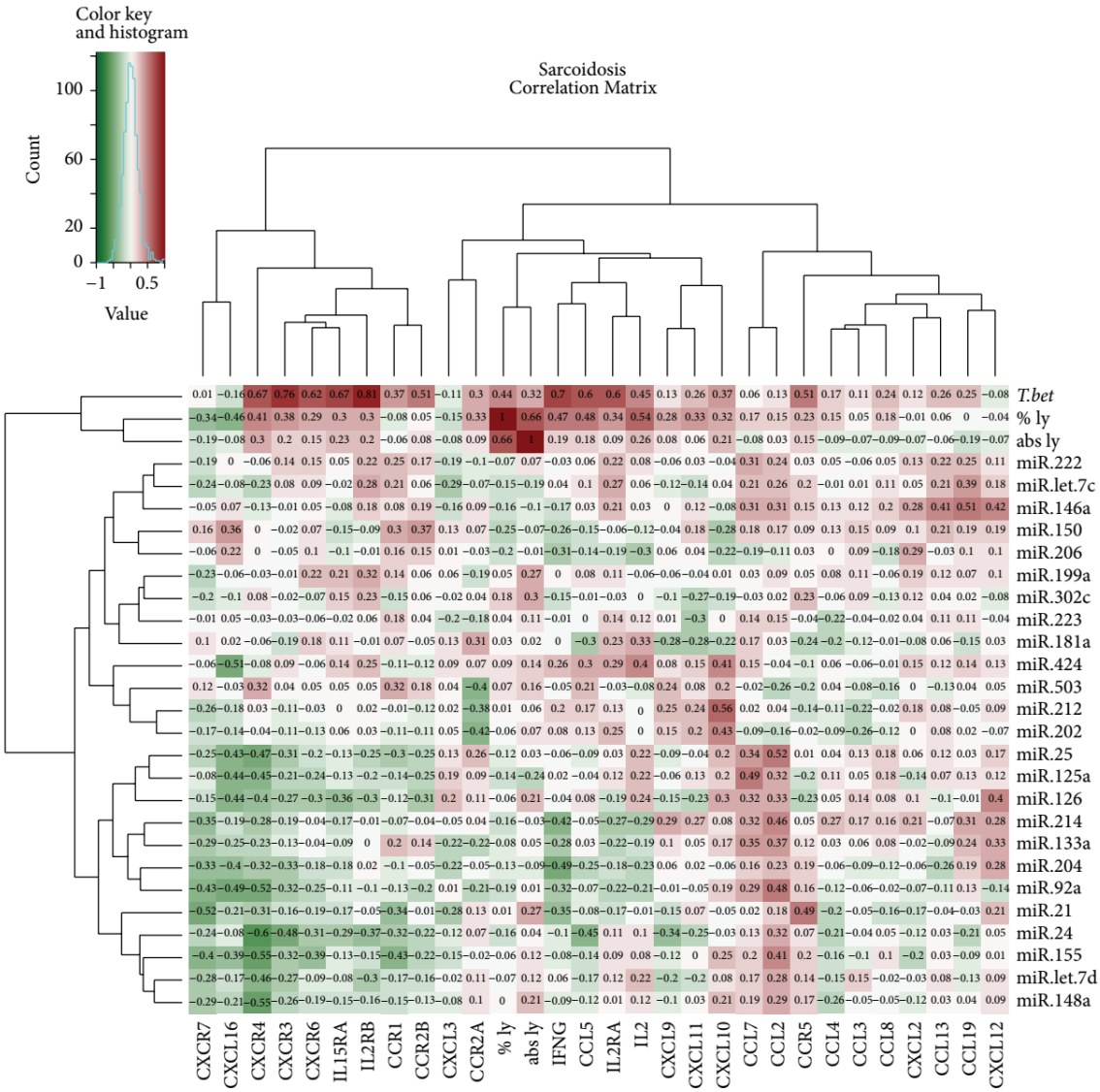


(a) Sarcoidosis

(b) Progressing sarcoidosis

(c) Regressing sarcoidosis

Obrázek 22. miRNA-mRNA-T-bet korelace genové exprese v BAL buňkách získaných **(a)** od pacientů se sarkoidózou, **(b)** podskupiny pacientů s progresí onemocnění a **(c)** podskupiny pacientů s regresí onemocnění jsou znázorněny Chord diagramy (kruhové grafy). Intenzita pásů odpovídá statistické signifikanci korelace mezi jednotlivými miRNA-mRNA-T-bet páry. V grafu jsou znázorněny pouze významné korelace (p<0,05), hodnocené dle Spearmanovy korelace.

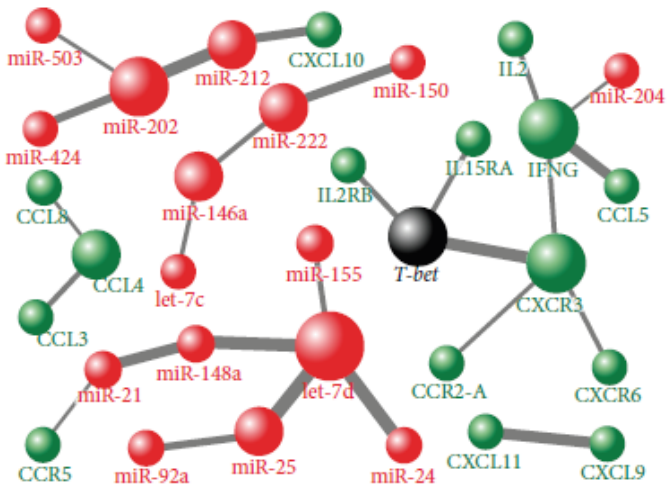


Obrázek 23. Hierarchická aglomerativní analýza shlukování s použitím teplotní mapy pro všechny pacienty se sarkoidózou. Barva každé buňky teplotní mapy odpovídá hodnotě koeficientu Spearmanovy korelace mezi miRNA-mRNA páry. % Ly: % lymfocytů v BAL tekutině, abs Ly: absolutní počet lymfocytů/1 ml BAL tekutiny.

4.4.3.5 Hledání miRNA-mRNA vazeb pomocí vážené analýzy genové exprese

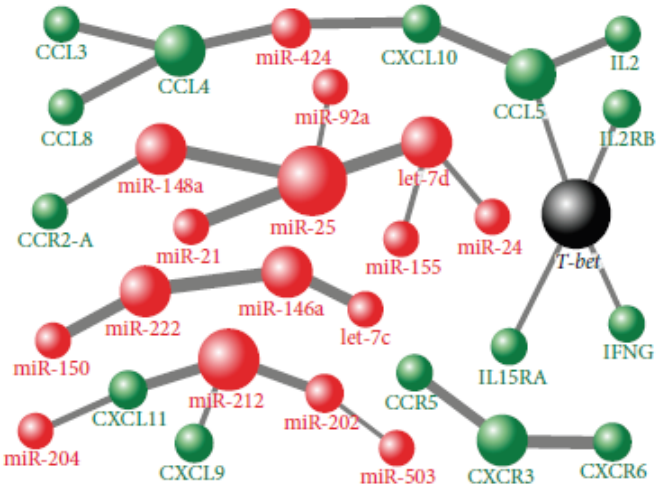
V rámci celého souboru pacientů se sarkoidózou byly nalezeny úzké vztahy mezi geny T-bet a IL-2RB, IL15RA a CXCR3, které souvisely s IFNG a CXCR6. IFNG byl nalezen v silné vazbě s IL-2 a CCL5 a také s miR-204. Pozorovali jsme také vztahy mezi miR-212-CXCL10 a miR-21-CCR5. V rámci studovaných miRNA jsme v této skupině také nalezli

vazby mezi let-7d, miR-155, miR-24 a miR-25 a mezi miR-202, miR-212, miR-424 a miR-503 (**Obrázek 24**).



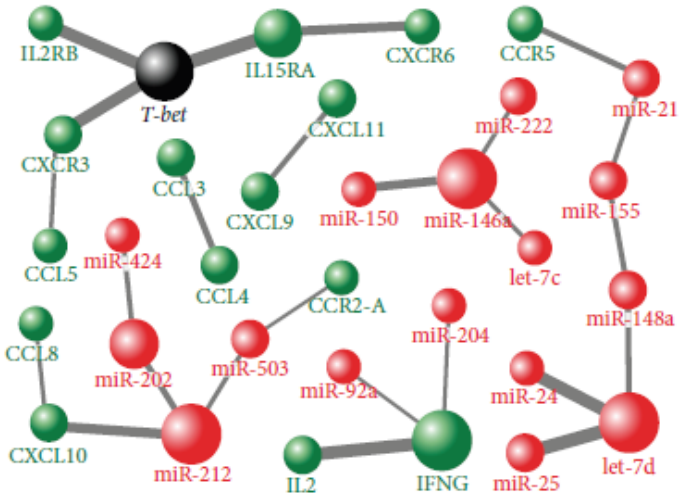
Obrázek 24. Vážená analýza sítí genové exprese miRNA-mRNA-T-bet a jejich vztahů v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou. Studované molekuly jsou prezentovány jako koule, kde jejich velikost ukazuje významnost vztahu s ostatními molekulami. Obrázek prezentuje pouze páry s nejvyšší korelací (šedé propojení).

U skupiny pacientů pouze s progredujícím onemocněním byly nalezeny vazby T-bet s CCL5, IL-2RB, IL-15RA a IFNG (**Obrázek 25**). Významné vztahy byly pozorovány také mezi miR-212 a IFNG, který indukuje chemokiny CXCL9 a CXCL11. Kromě toho byla nalezena vazba chemokinu CXCL11 s miR-204. Také byly pozorovány vztahy mezi miR-424 a CCL4 a CXCL10, a miR-148 a CCR2A. V rámci všech miRNA byly zjištěny vztahy mezi miR-21, miR-25, miR-148a, miR-92a a let-7d, dále také mezi miR-146a, miR-222 a let-7c (**Obrázek 25**).



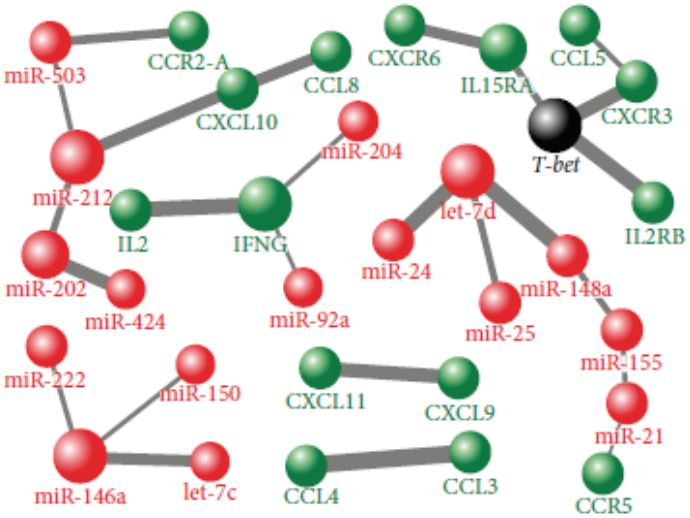
Obrázek 25. Vážená analýza sítí genové exprese miRNA-mRNA-T-bet a jejich vztahů v BAL buňkách pacientů s progredující sarkoidózou. Studované molekuly jsou prezentovány jako koule, kde jejich velikost ukazuje významnost vztahu s ostatními molekulami. Obrázek prezentuje pouze páry s nejvyšší korelací (šedé propojení).

U skupiny pacientů s remisí onemocnění byly pozorovány vztahy mezi T-bet a IL-2RB, IL-15RA, CXCR3, IL-2 a IFNG. Pozorovali jsme vztahy také mezi miR-212 a CXCL10 a mezi miR-503 a CCR2A. Mezi studovanými miRNA byly zjištěny vztahy mezi let-7d, miR-148a, miR-24 a miR-25, mezi miR-146a, miR-150, miR-222, a let-7c a mezi miR-212, miR-202 a miR-503 (**Obrázek 26**).



Obrázek 26. Vážená analýza sítí genové exprese miRNA-mRNA-T-bet a jejich vztahů v BAL buňkách pacientů s progredující sarkoidózou. Studované molekuly jsou prezentovány jako koule, kde jejich velikost ukazuje významnost vztahu s ostatními molekulami. Obrázek prezentuje pouze páry s nejvyšší korelací (šedé propojení).

U kontrolní skupiny jsme nenašli úzké vztahy mezi navrženými molekulami (malé vrcholy v obrázku) a jejich nalezené vztahy se lišily od vazeb nalezených u pacientů se sarkoidózou (**Obrázek 27**).



Obrázek 27. Vážená analýza sítí genové exprese miRNA-mRNA-T-bet a jejich vztahů v BAL buňkách kontrolních jedinců. Studované molekuly jsou prezentovány jako koule, kde jejich velikost ukazuje významnost vztahu s ostatními molekulami. Obrázek prezentuje pouze páry s nejvyšší korelací (šedé propojení).

4.4.4 Závěr

Tato část práce byla zaměřena na multifaktoriální analýzu expresních dat řady miRNA, mRNA cytokinů, chemokinů a jejich receptorů a klíčového transkripčního faktoru T-bet u BAL buněk získaných u pacientů se sarkoidózou. Korelační analýzy cytokin/chemokinové sítě a jejich kandidátních transkripčních a post-transkripčních regulátorů potvrdily koordinovaný příspěvek obou regulačních systémů. Naše analýzy poukázaly na klíčový příspěvek transkripčního faktoru T-bet a „fine-tuning“ pomocí miRNA u regulace cytokin-chemokinové sítě u sarkoidózy.

Velmi zajímavé bylo srovnání expresních profilů a korelační analýzy u podskupin pacientů s regresí a progresí choroby během 2 let sledování. U remitujícího onemocnění T-bet méně koreloval s IL-2 a receptory CXCR4, CXCR7 a IL-2RA než u progredujícího onemocnění. Byla také prokázána změna v miRNA profilu: u remitující nemoci jsme pozorovali korelaci miR-146a-CCL19 a miR-148a-CXCR4. U progrese silně koreloval T-bet s CCL5, IL-2RB, IL-15RA, IFNG; dále byly pozorovány korelace miR-212-CXCL9 a CXCL11, miR-204-CXCL11, miR-424-CCL4 a CXCL10, miR-148a-CCR2A. Naše studie významně přispěla k objasnění regulace cytokin-chemokinové sítě u plicní sarkoidózy a nominovala CCL2, CCL5 a CCL19 k dalšímu studiu, zejména vzhledem k jejich rozdílnému zapojení u skupin pacientů lišících se vývojem onemocnění po 2 letech.

4.5 Proteinové expresní profily v séru a BAL tekutině u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF-UIP) a sarkoidózou

4.5.1 Úvod do problematiky

Idiopatická plicní fibróza a sarkoidóza jsou nejčastější DPO charakteristické zánětlivými a fibrotizačními procesy (Vasakova 2011). U těchto nemocí se stále hledají neinvazivní biomarkery vhodné pro diagnostiku a prognózování, ale také k identifikaci dalších molekul podílejících se na patogenezi těchto nemocí.

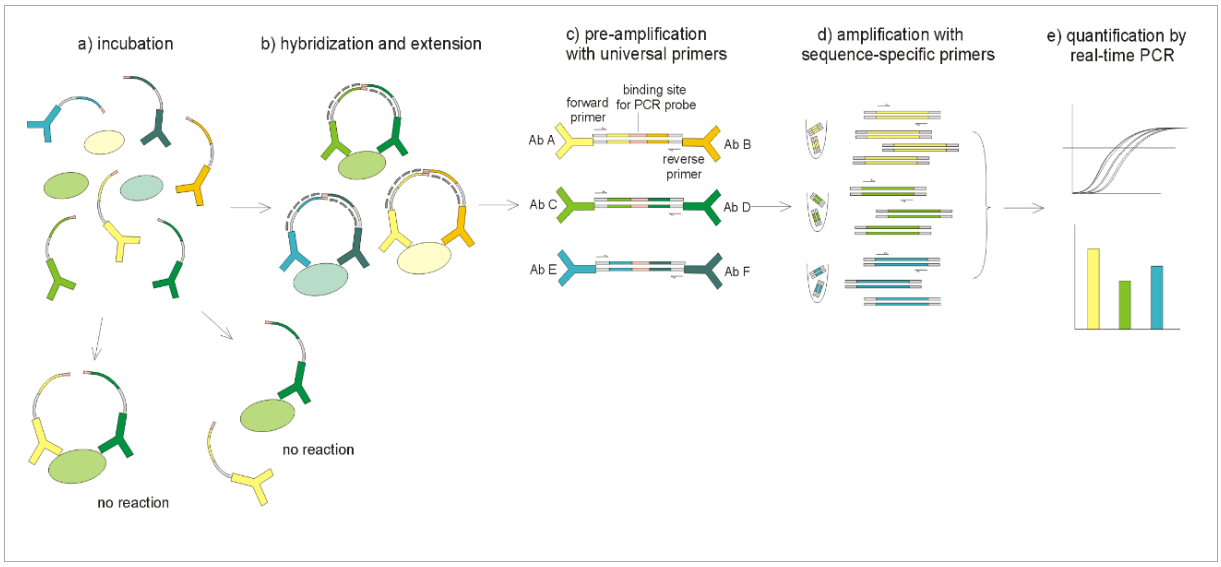
Z důvodu velmi nízkých koncentrací analytů v séru a bronchoalveolární lavážní tekutině jsme k analýze zavedli inovativní, velmi citlivou a specifickou techniku „antibody-based Proximity Extension Assay“ (PEA, Proseek Multiplex, Olink) pro vybrané cytokiny/chemokiny (CCL19, CCL21, CCL24, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, IL-17RB, TNF) a další molekuly asociované se zánětem, mezibuněčnou signalizací, angiogenezí a růstem buněk (TGFB, HB-EGF, HGF, Early activation antigen CD69, Amphiregulin, HE4, Prostasin, FasL, GDF-15). Tato technika kombinující klasickou imunoesej s PCR amplifikací umožňuje detekovat proteiny v dynamickém rozsahu několika řádů a až 100x vyšší citlivostí ve srovnání s klasickou metodou ELISA.

4.5.2 Metody

Do studie byla zařazena skupina pacientů s IPF-UIP a sarkoidózou, všichni byli diagnostikováni dle kritérií mezinárodních standardů pro tato onemocnění (Statement on IPF 2011 a Statement on sarcoidosis 1999). Analyzované vzorky zahrnovaly sérum 12 pacientů s IPF-UIP, 18 pacientů se sarkoidózou odebrané při diagnóze. Dále byla od zařazených pacientů se sarkoidózou získána BAL tekutina v době diagnózy, a to jak pro skupinu s progresí (n=9), tak s remisí (n=9) onemocnění po dvou letech sledování.

Dále bylo získáno sérum od 7 zdravých kontrolních jedinců. Všichni jedinci podepsali informovaný souhlas s využitím biologického materiálu k diagnostickým i výzkumným účelům této studie. Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc.

Sérum i BAL tekutina byla alikvotována a uložena v -80 °C do doby jejího použití. Antibody-based Proximity Extension Assay (Proseek Multiplex, Olink Bioscience, Sweden) byla použita pro stanovení panelu 92 sérových proteinů asociovaných zejména se zánětem, buněčnou signalizací, angiogenezí a růstem buněk (**Tabulka 10**). 1 µl séra/BAL tekutiny každého vzorku byl inkubován v přítomnosti 92 párů specifických protilátek značených oligonukleotidy. Jedna dvojice protilátek po navázání na odpovídající antigeny umožní pomocí připojených DNA konců zahájení PCR v reálném čase, která je detekována za přítomnosti fluorescenčních sond HD Systémem Biomark (Fluidigm Corporation). Generovaný fluorescenční signál přímo koreluje s koncentrací proteinu v séru/BAL daného vzorku (**Obrázek 28**).



Obrázek 28. Princip Proximity Extension Assay. **(a)** Páry protilátek specifické pro každý analyt jsou konjugovány s oligonukleotidovými sekvencemi **(b)** protilátky po navázání na cílové proteiny vytvářejí PCR templát **(c)** universální primery jsou přidány pro preaplifikaci různých DNA templátů současně, **(d)** jednotlivé DNA sekvence jsou amplifikovány se specifickými primery, **(e)** kvantifikace pomocí RT-PCR.

Data byla normalizována s použitím Olink Wizard (Olink). Detailní popis panelu, včetně parametrů citlivosti a specifičnosti byly dříve popsány v literatuře (Assarsson 2014). Pro statistické vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test spolu s Benjamini-Hochbergovou korekcí. Analýza hlavních komponent (principal component analyses, PCA) byla prováděna s využitím softwaru GenEx (bioMCC, Freiburg, Německo).

Tabulka 10. Panel 92 analyzovaných proteinů

Symbol	***Název***
ADM	Adrenomedullin
sAREG	Amphiregulin, soluble
sBAFF (TNFSF13B)	B-cell activating factor, soluble
sBTC	Betacellulin
CA125	Cancer antigen 125
CA242	CA 242 tumor marker
sCAIX	Carbonic anhydrase 9, soluble
CASP3	Caspase-3
sCathepsin D (CTSD)	Cathepsin D, soluble
CCL2/MCP1	Chemokine (C-C motif) ligand 2/monocyte chemotactic protein 1
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21
CCL24	Chemokine (C-C motif) ligand 24
sCD30L (TNFSF8)	CD30 ligand, soluble
sCD40L (TNFSF5)	CD40 ligand, soluble
sCD69	Cluster of Differentiation 69 (Early activation antigen CD69), soluble
CEA	Carcinoembryonic antigen
CSF1 (M-CSF)	Colony stimulating factor 1
CXCL5	C-X-C motif chemokine 5
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine 11
CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Cystatin B	Cystatin B
sE selectin (CD62E)	E-selectin, soluble
sEGF	Epidermal growth factor , soluble
sEGFR	Epidermal growth factor receptor, soluble
sEMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer, soluble
sEpCAM	Epithelial cell adhesion molecule , soluble
sEpiregulin (EPR)	Epiregulin, soluble
EPO	Erythopoietin
sER	Estrogen receptor, soluble
FABP4	Fatty acid binding protein 4
sFas (TNFRSF6)	Fas receptor, soluble
sFasL	Fas ligand, soluble
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
Follistatin (FS)	Follistatin
Galectin 3	Galectin-3
GDF15	Growth differentiation factor 15

GM-CSF (CSF2)	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
sFOLR1	Folate receptor alpha, soluble
sHBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor, soluble
HE4	Human Epididymis Protein 4
sHER2/neu (ERBB2)	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, soluble
sHER3 (ERBB3)	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3, soluble
sHER4 (ERBB4)	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4, soluble
sHGF	Hepatocyte growth factor/scatter factor, soluble
sHGFR	Hepatocyte growth factor receptor, soluble
hGH	Human Growth Hormone
IFNγ	Interferon gamma
IL1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
IL2	Interleukin 2
sIL2RA	Interleukin-2 receptor alpha chain, soluble
IL4	Interleukin 4
IL6	Interleukin 6
sIL6R	Interleukin 6 receptor, soluble
IL7	Interleukin 7
IL8 (CXCL8)	Interleukin 8
IL12	Interleukin 12
sIL17RB	Interleukin-17 receptor B, soluble
KLK6	Kallikrein-6
KLK11	Kallikrein-11
MIA	Melanoma-derived growth regulatory protein
sMICA	MHC class I polypeptide-related sequence A, soluble
Midkine (NEGF2)	Midkine; neurite growth-promoting factor 2
MMP3	Matrix metalloproteinase-3
MPO	Myeloperoxidase
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
OPG (TNFRSF11B)	Osteoprotegerin
sPDGFB	Platelet-derived growth factor subunit B, soluble
sPECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule, soluble
PGF	Placental growth factor
PRL	Prolactin
PRSS8	Prostasin
PSA	Prostate-specific antigen
REG4	Regenerating islet-derived protein 4
sSCF	Stem cell factor, soluble
sTF	Tissue Factor, soluble
sTGFA	Transforming growth factor alpha, soluble
TGFB1	Transforming growth factor beta 1
THPO	Thrombopoietin
sTIE2	Receptor tyrosine kinase Tie2, soluble
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
sTNFR1 (TNFRSF1A)	Tumor necrosis factor receptor 1, soluble
sTNFR2 (TNFRSF1B)	Tumor necrosis factor receptor 2, soluble
sTNFRSF4 (OX40)	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, soluble
TNFSF14 (LIGHT)	Tumor necrosis factor superfamily member 14
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
suPAR	Urokinase plasminogen activator receptor, soluble
sVEGFA	Vascular endothelial growth factor A, soluble
sVEGFD	Vascular endothelial growth factor D, soluble
sVEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2, soluble

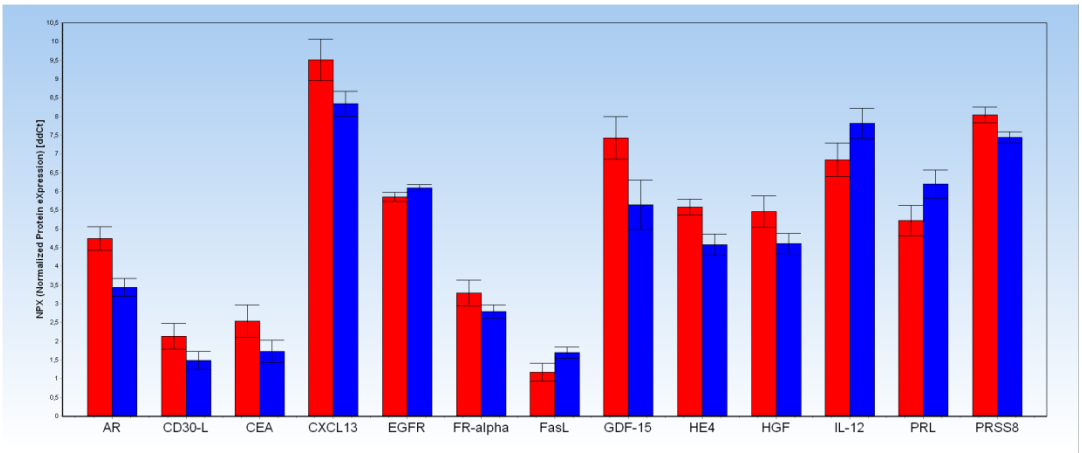
4.5.3 Výsledky

Stanovili jsme hladiny 92 proteinů v séru pacientů s IPF-UIP a sarkoidózou a kontrolních jedinců a dále také v BAL tekutině pacientů se sarkoidózou získanou v době diagnózy. U zařazených pacientů byl znám vývoj nemoci po 2 letech sledování. Pomocí statistických metod jsme hledali proteiny, které jsou deregulovány u těchto dvou nemocí a jejich koncentrace se v rámci skupin onemocnění významně liší.

V séru pacientů s IPF a sarkoidózou jsme detekovali rozdílné profily u třinácti proteinů (p<0,05), z nichž nejvíce se lišily hladiny následujících proteinů: Amphiregulin (fold change 2,46; p=0,0000001), HE4 (Epididymal secretory protein E4: 1,99; p=0,000008), Prostasin (1,50; p=0,00002), FasL (Fas antigen ligand: -1,43; p=0,0002), CXCL13 (2,25; p=0,0002), GDF-15 (Growth/differentiation factor 15: 3,45; p=0,0003) a HGF (Hepatocyte growth factor: 1,82; p=0,0005) (**Tabulka 11, Obrázek 29**).

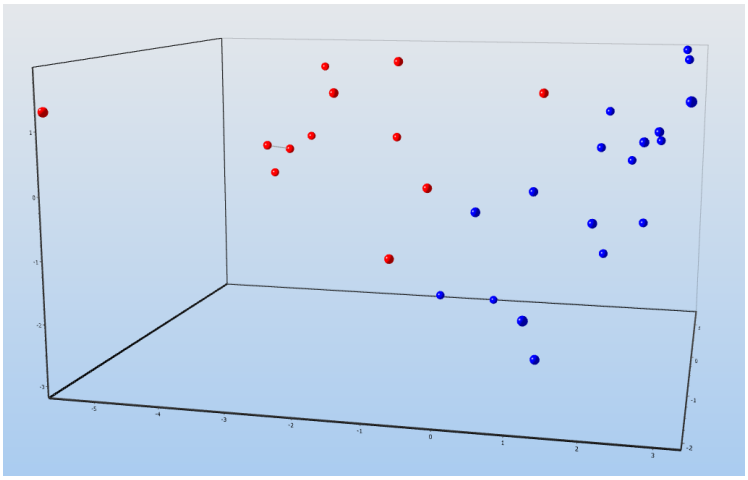
Tabulka 11. Přehled proteinů s vyššími a nižšími sérovými hladinami u pacientů s IPF ve srovnání se sarkoidózou (S).

IPF vs S	Fold change	*P* corr
IPF > Sarcoidosis		
Amphiregulin	2,47	<0,00001
HE4	1,99	0,0003
Prostasin	1,5	0,0005
CXCL13	2,25	0,0043
GDF-15	3,45	0,0044
HGF	1,82	0,0064
CD30-L	1,55	0,0172
FR-alpha	1,41	0,0323
IPF < Sarcoidosis		
FasL	-1,44	0,0043
Prolactin	-1,97	0,0128
CEA	1,76	0,0172
IL-12	-1,98	0,0172
EGFR	-1,17	0,0291



Obrázek 29. Srovnání sérových profilů regulovaných proteinů (p_{corr}<0,05) u pacientů s IPF (červené sloupce) a sarkoidózou (modré sloupce). Chybové úsečky znázorňují 95 % CI.

Analýza hlavních komponent (PCA) graficky znázornila využití regulovaných hladin proteinů k zařazení pacientů dle diagnózy do skupin s IPF, případně sarkoidózou (**Obrázek 30**).



Obrázek 30. Dynamická PCA analýza znázorňuje rozdělení pacientů na IPF pacienty (červené body) a pacienty se sarkoidózou (modré body) na základě rozdílných sérových koncentrací 13 proteinů (p_{corr} <0,05).

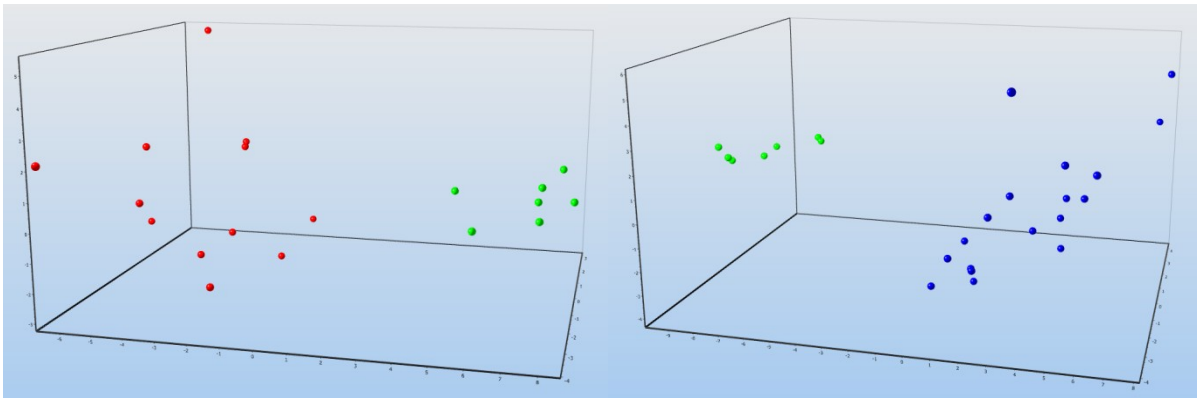
Obě skupiny pacientů se také ve svém proteinovém profilu významně lišily od kontrolní skupiny zdravých jedinců. U pacientů s IPF jsme nalezli 52 deregulovaných proteinů (p_{corr}<0,05) ve srovnání s kontrolami. U skupiny pacientů se sarkoidózou bylo 58 proteinů deregulováno ve srovnání s kontrolami. Nejvýznamněji deregulovanané proteiny u obou onemocnění jsou shrnuty v **Tabulce 12**.

Analýza PCA znázornila regulované proteiny, jejich hladiny hrají roli v rozdělení pacientů s IPF od zdravých kontrol (**Obrázek 30A**) a obdobně také identifikaci pacientů se sarkoidózou a zdravých kontrol (**Obrázek 30B**).

Tabulka 12. Přehled proteinů významně up-regulovaných a down-regulovaných u pacientů s IPF a se sarkoidózou ve srovnání se zdravými kontrolami.

IPF vs C	Fold change	*P* corr	S vs C	Fold change	*P* corr
IPF > C			*Sarcoidosis > C*		
EGFR	3,06271	<0,00001	EGFR	3,59254	<0,00001
GDF-15	21,65824	<0,00001	Galectin-3	3,36694	<0,00001
HE4	3,7892	<0,00001	CCL19	14,24585	<0,00001
BAFF	3,7372	<0,00001	MPO	4,24876	<0,00001
Galectin-3	3,4951	<0,00001	BAFF	4,28548	<0,00001
CCL19	8,6726	<0,00001	Prolactin	4,25655	<0,00001
IL2RA	2,05284	<0,00001	Osteoprotegerin	1,99863	<0,00001
IFN-gamma	2,1553	<0,00001	IL17RB	2,46588	<0,00001
Osteoprotegerin	2,45481	<0,00001	IL-12	4,40173	<0,00001
TNFRSF4	3,03036	<0,00001	TNF-RI	2,04727	<0,00001
Amphiregulin	4,61064	<0,00001	IL2RA	1,82281	<0,00001
TNF-RI	2,15743	0,00001	IL6RA	2,14539	<0,00001
Prostasin	2,29073	0,00001	MIA	3,11654	<0,00001
TR-AP	3,09216	0,00001	TNFRSF4	3,32602	<0,00001
MIA	2,77626	0,00002	E-selectin	3,94973	<0,00001
MPO	4,23373	0,00002	Kallikrein-6	2,62436	<0,00001
CEA	3,42394	0,00003	CSF-1	1,46306	0,0001
Kallikrein-6	2,40827	0,00003	Caspase-3	8,57842	0,0001
TNF-R2	2,66919	0,00004	IFN-gamma	2,46244	0,0001
CXCL13	4,03492	0,00011	Cystatin B	3,7664	0,0001
Cystatin B	4,71593	0,00012	GDF-15	6,27781	0,0001
CSF-1	1,42035	0,00013	Follistatin	2,32062	0,0001
IL17RB	2,43843	0,00024	FABP4	2,09325	0,0002
IL-6	3,63865	0,00025	TR-AP	2,55334	0,0002
REG-4	2,13941	0,00033	TNF-R2	3,19946	0,0003
E-selectin	3,76929	0,00035	Adrenomedullin	2,02869	0,0004
VEGF-D	1,72686	0,00047	Prostasin	1,52241	0,0005
Follistatin	1,89141	0,00047	CXCL9	4,76399	0,0008

FABP4	2,31962	0,00062	HE4	1,89968	0,0012
Cathepsin D	2,58988	0,00136	CEA	1,94958	0,0014
CXCL9	3,04702	0,00164	Ep-CAM	2,19305	0,0028
Prolactin	2,16267	0,00215	Amphiregulin	1,86872	0,0028
Caspase-3	10,84374	0,0025	IL-1ra	1,82152	0,0052
ErbB2/Her2	1,56953	0,00282	IL-6	3,70035	0,0052
FR-alpha	1,73544	0,00457	VEGF-A	1,37036	0,0055
IL-12	2,2248	0,00482	REG-4	1,67056	0,0056
CXCL10	2,44098	0,008	PECAM-1	1,74559	0,0057
Kallikrein-11	1,63286	0,00824	Cathepsin D	2,03174	0,0057
HGF	1,67456	0,02398	CXCL10	3,78935	0,0079
EPO	2,17308	0,02548	CXCL13	1,79296	0,0084
IL-1ra	1,95669	0,02659	ErbB2/Her2	1,34051	0,0091
IL6RA	1,55626	0,03028	CCL21	1,38878	0,0144
CCL21	1,42129	0,03206	VEGF-D	1,3736	0,0186
VEGF-A	1,64607	0,03542	EPO	1,62679	0,0269
IPF < C			ErbB3/Her3	1,13141	0,0381
GM-CSF	-1,94671	<0,00001	Growth Hormone	3,30179	0,0432
CA242	-1,97586	<0,00001	***Sarcoidosis < C***		
Epiregulin	-2,0565	0,01628	CA242	-2,09805	<0,00001
IL-7	-1,47216	0,02886	GM-CSF	-1,99607	<0,00001
TGF-alpha	-1,9964	0,03206	Epiregulin	-2,42533	<0,00001
CD40 ligand	-5,32441	0,04326	TGF-alpha	-3,11873	<0,00001
			CD40 ligand	-14,06473	<0,00001
			MYD88	-2,25314	0,0001
			EGF	-8,84035	0,0004
			EMMPRIN	-1,25865	0,0007
			IL-7	-1,60506	0,001
			HB-EGF	-2,66491	0,0052
			CD30-L	-1,50167	0,0082
			LAP TGF-beta-1	-1,71542	0,0269

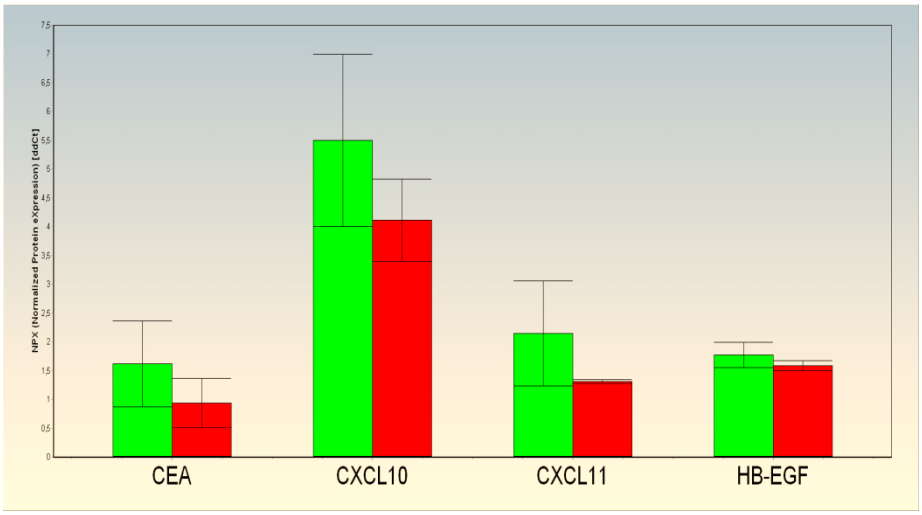


Obrázek 30. Dynamická PCA analýza (GenEx) znázorňuje **(A)** rozdělení pacientů s IPF (červené body) a zdravých kontrol (zelené body) a **(B)** rozdělení pacientů se sarkoidózou (modré body) a zdravých kontrol (zelené body) na základě rozdílných sérových koncentrací proteinů (p_{corr} <0,05).

Při vyšetření proteinového profilu BAL tekutiny pacientů se sarkoidózou jsme prokázali, že u čtyř proteinů (CXCL10, CXCL11, HB-EGF, CEA) byl trend k vyšším koncentracím u skupiny pacientů, u kterých došlo během doby sledování k remisi ve srovnání s pacienty s progredující formou nemoci (**Tabulka 13, Obrázek 31**). Největší rozdíly byly nalezeny u proteinů CXCL10 a CXCL11, což jsou ligandy chemokinového receptoru CXCR3, který je klíčovým receptorem asociovaným se sarkoidózou.

Tabulka 13. Přehled proteinů významně deregulovaných v BAL tekutině v době diagnózy u pacientů se sarkoidózou, u kterých došlo k regresi/progresi onemocnění po dvou letech

Regression > Progression	**Fold change**	***P* corr**
CXCL11	-1,78	0,051
CXCL10	-2,61	0,073
HB-EGF **Heparin-binding EGF-like growth factor**	-1,14	0,081
CEA **Glycoprotein involved in cell adhesion**	-1,61	0,083



Obrázek 31. Srovnání proteinových profilů v BAL tekutině deregulovaných proteinů u pacientů s remitující (zelené sloupce) a progredující (červené sloupce) sarkoidózou. Chybové úsečky znázorňují 95 % CI.

4.5.4 Závěr

Pomocí inovativní, vysoce senzitivní multiplexové proteinové PEA analýzy jsme popsali sérové proteinové profily asociované s IPF-UIP a sarkoidózou a proteinové profily BAL tekutiny pacientů s progredující/remitující sarkoidózou. Detekovali jsme 13 deregulovaných proteinů u pacientů s IPF ve srovnání s pacienty se sarkoidózou, přičemž nejvíce deregulován byl Amphiregulin, HE4, Prostasin, FasL, CXCL13, GDF-15, HGF. Celkově 52 proteinů bylo deregulováno v séru IPF pacientů a 58 proteinů v séru pacientů se sarkoidózou ve srovnání se zdravými kontrolami. Pacienti s remisí/progresí sarkoidózy se ve svém proteinovém profilu BAL tekutiny lišili zejména proteiny CXCR10 a CXCR11, což jsou významné ligandy klíčového receptoru CXCR3 u sarkoidózy.

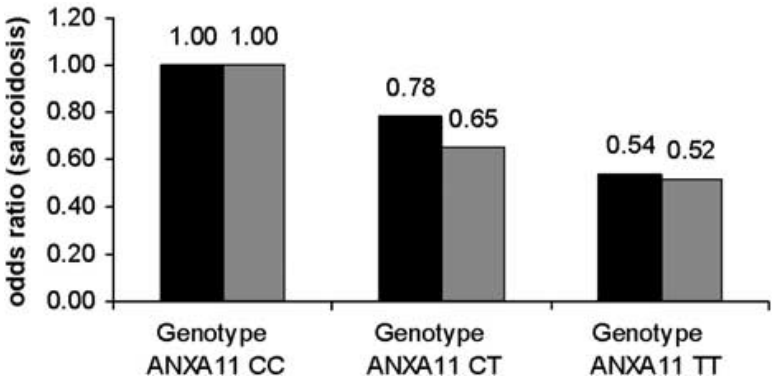
Řada identifikovaných cytokinů, solubilních receptorů a dalších imunitních molekul nebyla dosud u těchto nemocí popsána a bude určitě předmětem dalších studií. Identifikace sérových biomarkerů specifických pro studovaná onemocnění nabízí diagnostické i prognostické využití neinvazivních krevních testů a může také sloužit pro návrhy nových terapeutických cílů.

4.6 Studium funkčního dopadu polymorfismu ANXA11 rs1049550 u sarkoidózy

4.6.1 Úvod do problematiky

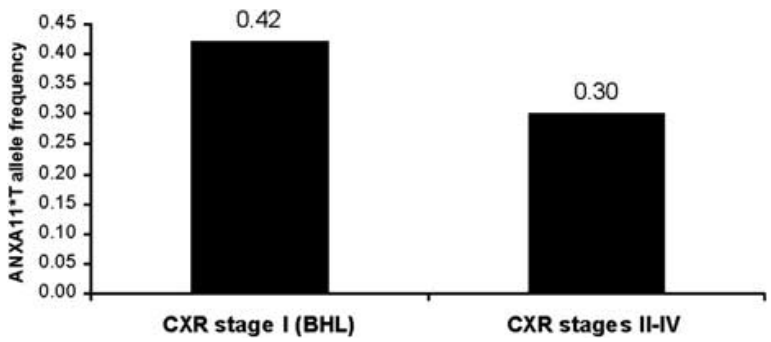
V celogenomové asociační studii (GWAS) v německé populaci byla popsána asociace variant genu ANXA11 (annexin A11) s vnímavostí k sarkoidóze (Hofmann 2008). Pro potvrzení souvislosti klíčového funkčního polymorfismu *ANXA11* rs1049550 se sarkoidózou a ověření výsledků GWAS v české populaci byla provedena genetická asociační studie (Mrázek 2011).

V této studii byla nalezena signifikantně nižší frekvence alely ANXA11 rs1049550*T u pacientů se sarkoidózou (35 %) oproti kontrolní skupině (42 %, p=0,04; OR=0,77). „Ochranný“ efekt alely ANXA11*T byl úměrný počtu jejích kopií v genotypu (**Obrázek 32**).



Obrázek 32. Odhadovaná rizika vzniku sarkoidózy ve vztahu k nosičství jedné nebo dvou kopií „ochranné“ T alely. Efekt genové dávky pro sarkoidózu v české populaci byl stanoven Cochran-Armitage testem. Černé bloky znázorňují výskyt jednotlivých genotypů u české populace a šedé bloky u německé populace (data byla přepočítána ze studie Hofmann a spol 2008).

Velmi zajímavým poznatkem byl méně četný výskyt alely ANXA11*T u pacientů s postižením plicního parenchymu (RTG stádia II-IV) ve srovnání s pacienty s izolovaným postižením hilových uzlin (RTG stádium I; p=0,01) (**Obrázek 33**). „Protektivní“ efekt alely ANXA11*T byl patrný i při subanalýze podle Löfgrenova syndromu: výskyt homozygotů TT byl častější mezi pacienty s prognosticky příznivějším LS (21 %) ve srovnání s pacienty bez známek LS (7 %, p=0,02; OR=0,31; 95 % CI=0,11-0,84). Tato data potvrdila nálezy z celogenomové studie v německé populaci, že genová varianta ANXA11 rs1049550*T snižuje riziko onemocnění sarkoidózou.



Obrázek 33. Frekvence výskytu ANXA11 rs1049550*T alely u pacientů se sarkoidózou rozdělených dle postižení pouze hilových uzlin (RTG stádium I) a pacientů s postižením plicního parenchymu (RTG stádia II-IV).

Nejvýznamnějším nálezem této studie je, že tato alela může onemocnění směrovat k prognosticky příznivějším formám (bez postižení plicního parenchymu). Polymorfismus ANXA11 rs1049550*T se jeví jako vhodný diagnostický marker pro stratifikaci pacientů se sarkoidózou dle vývoje onemocnění.

Doposud však nebyl objasněn mechanismus působení polymorfismu rs1049550 na patogenezi sarkoidózy. Proto jsme se v první části studie věnovali analýze genových profilů ANXA11 a prokázali, že polymorfismus rs1049550 nemá vliv na počet ANXA11

transkriptů v BAL buňkách. Proto jsme se v další části práce věnovali možnému funkčnímu dopadu tohoto polymorfismu na tvorbu granulomů.

Polymorfismus rs1049550 je zodpovědný za záměnu basického argininu na polární cystein v poloze 230 ve vysoce konzervativní doméně ANXA11 ovlivňující strukturu domény vázající vápník. Nicméně poslední studie potvrdila, že změna ANXA11 proteinu vlivem polymorfismu rs1049550 a jeho R230C varianta se z hlediska citlivosti na Ca^{2+} neliší (Fatimathas 2009). Kromě role v signalizaci vápníku, annexin A11 se podílí na mnoha dalších funkcích, jako je apoptóza (Gerke 2002), buněčný růst (Farnaes 2003), terminální fáze buněčného dělení (Tomas 2004), má vliv na funkci neutrofilů a přežití nádorových buněk (Duncan 2008).

V této souvislosti je vývoj a udržování granulomatózního zánětu u sarkoidózy opakovaně spojován s poruchou apoptózy aktivovaných zánětlivých buněk (Petzmann 2006). Stridh a spol již dříve ukázal, že BAL lymfocyty pacientů se sarkoidózou byly méně citlivé na apoptotické stimuly (hodnoceno u annexinu A5) než lymfocyty kontrolních jedinců (Stridh 2002). Tato pozorování umožňují spekulovat, že určité funkční genové varianty annexinu A11 (např. ANXA11 R230C) mohou mít vliv na apoptózu zánětlivých buněk, a tak ovlivňovat patogenezi sarkoidózy i její klinický průběh.

Proto jsme dále zkoumali možný vliv rs1049550 polymorfismu na tvorbu granulomů *in vitro*. Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) 10 pacientů se sarkoidózou byly kultivovány v přítomnosti Concanavalinu A a uhlíkových nanotrubic po dobu 8 dní. Velikost a charakter vytvořených granulomů byl srovnáván mezi podskupinami pacientů s rs1049550 CC (n=6) a TT (n=4) genotypem. Granulomy byly také hodnoceny v plicních tkáních biopsií pacientů se sarkoidózou s CC (n=10) a TT (n=8) genotypy.

4.6.2 Metody

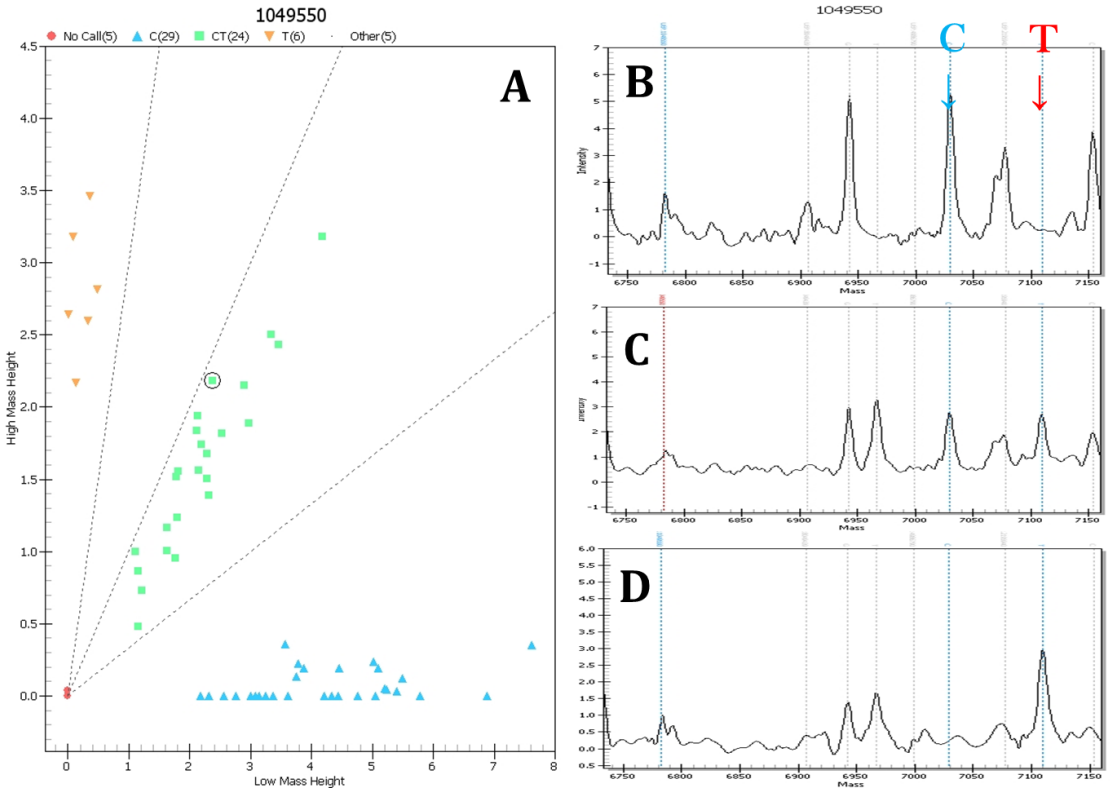
4.6.2.1 Studovaný soubor

Soubor pro studium genotypu ANXA1 byl složen z 245 pacientů se sarkoidózou (věk, medián (1-3 kvartil): 44 (36-53); pohlaví (M/Ž): 113/132) a 254 zdravých kontrol (30 (25-37); (111/143)) české národnosti. Absence plicního onemocnění u kontrolních jedinců byla ověřena zdravotním dotazníkem a pohovorem s důrazem na rodinnou anamnézu a příznaky respiračního onemocnění. Skupina pacientů se sarkoidózou byla diagnostikována dle kritérií mezinárodních standardů (Statement on sarcoidosis 1999) ve Fakultní nemocnici Olomouc.

Všichni jedinci podepsali informovaný souhlas s využitím biologického materiálu k diagnostickým i výzkumným účelům této studie. Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc.

4.6.2.2 Genotypování ANXA11 rs1049550 C/T (R230C) polymorfismu

Genotypizaci ANXA11 rs1049550 C/T (R230C) polymorfismu byla provedena s použitím MassARRAY IPLEX technologie (Agena Bioscience, USA) **(Obrázek 34)**. Primery byly navrženy s použitím Sequenom SNP test softwaru (verze 155 3.0 IPLEX reakce). Sekvence amplifikačních a extenčních primerů použitých pro genotypizaci byly následující: forward primer 3'-ACGTTGGATGTTCCTCCAGGGACGGATGAG-5', reverzní primer 3'-ACGTTGGATGAAGTAGGATCTGCTGCCGCT-5', extenční primer 3'-ACATCATTGACTGCCTGGGGAGT-5'. Protokol včetně reakčních podmínek byl proveden v souladu s výrobcem. Distribuce genotypu byla v Hardy-Weinbergově rovnováze (p>0,05).



Obrázek 34. Distribuce genotypů ANXA11 rs1049550 polymorfismu **(A)** a reprezentativní příklady hmotnostních spekter pro CC homozygoty **(B)**, CT heterozygoty **(C)** a TT homozygoty **(D)**.

4.6.2.3 Expresní profilování ANXA11 mRNA v BAL buňkách

mRNA exprese ANXA11 byla studována u skupiny pacientů se sarkoidózou (n=55) a kontrolních jedinců (n=14). Skupina pacientů byla složena z 21 mužů/34 žen; skupina byla dále rozdělena dle RTG stádia: stádium I (n=18), stádium II (n=28), stádia III-IV (n=9). Kontrolní skupina se skládala z 8 mužů/6 žen podstupující BAL odběr jako součást klinického vyšetřování, u nichž nebylo prokázano žádné zánětlivé plicní onemocnění. Všechny kontroly měly normální hodnoty BAL tekutiny cytologie, imunologie, mikrobiologie a poměr CD4+/CD8+. Žádný jedinec nepodstoupil léčbu kortikosteroidy před BAL. Pacienti i kontrolní jedinci byli ještě dále rozděleni na podskupiny dle genotypu ANXA11 rs1049550: nenosiči alely T (homozygoti CC) a nosiči alely T (heterozygoti CT, homozygoti TT).

Postup zpracování BAL buněk, následná izolace RNA, podmínky reverzní transkripce i kvantitativní PCR v reálném čase byly popsány v kapitole 4.1.2.2. Primery (5´-ttgaacttggactcgtctgttc-3´, 5´-actcgcccagagagatgc-3´) a sonda (UPL sonda # 17, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) byly navrženy pomocí Probe Finder Assay Design Center (http://www.universalprobelibrary.com) tak, aby zahrnovaly všechny tři známé ANXA11 transkripční varianty a, b, c.

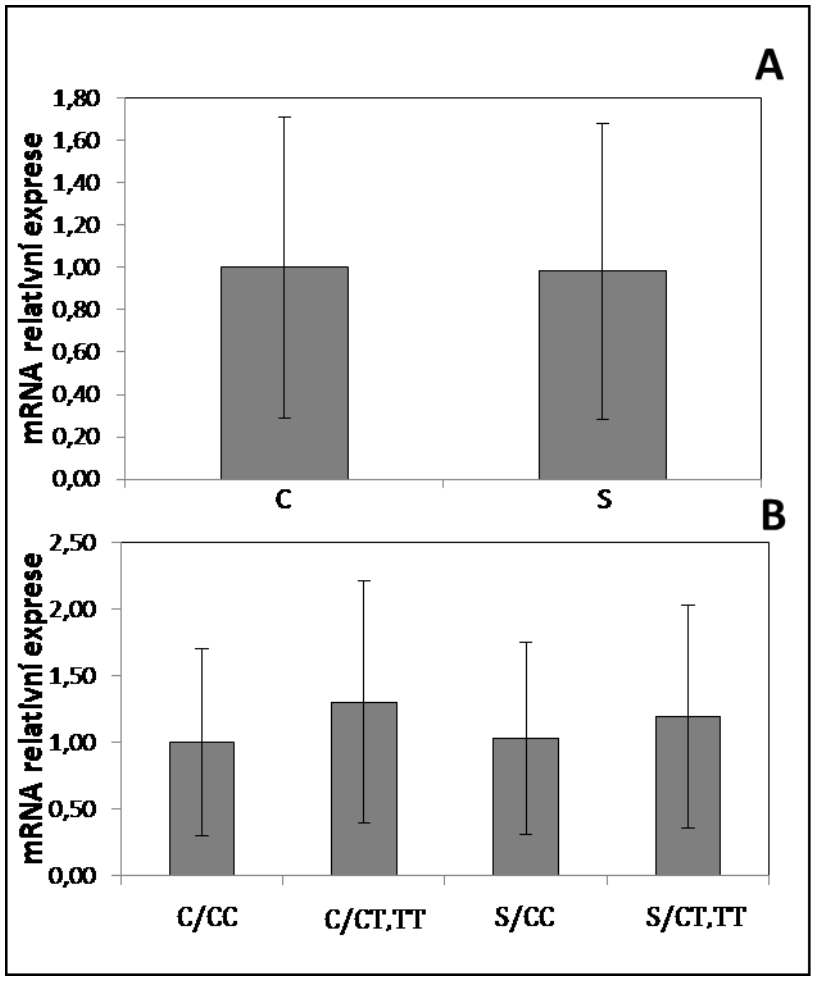
PSMB2 gen byl použit jako referenční gen, dle naší předchozí studie (Kriegova 2008). Změny relativní mRNA exprese byly srovnávány neparametrickým Mann-Whitney U-testem.

4.6.2.4 Stimulace granulomů ex vivo z mononukleárních buněk periferní krve (PBMC)

Pro funkční studii bylo vybráno 10 neléčených pacientů se sarkoidózou, z toho 6 jedinců s genotypem CC a 4 jedinci s genotypem TT polymorfismu ANXA11 rs1049550. Periferní mononukleární buňky byly izolovány centrifugací v hustotním gradientu. PBMC byly kultivovány v hustotě $1x10^6$ buněk na jamku 24-jamkové mikrotitrační destičky, v médiu RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA) s 10% FCS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) přes noc. V den 2 byla přidáním Concanavalinu A (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) na konečnou koncentraci 16 μg/ml indukována tvorba vícejaderných obrovských buněk (MGC). Po kultivaci v přítomnosti Concanavalinu A po 3 dnech byly přidány ultrazvukem ošetřené uhlíkové nanotrubice a inkubace pokračovala další 3 dny. 9. den byly buňky obarveny May-Grünwald-Giemsa barvivem.

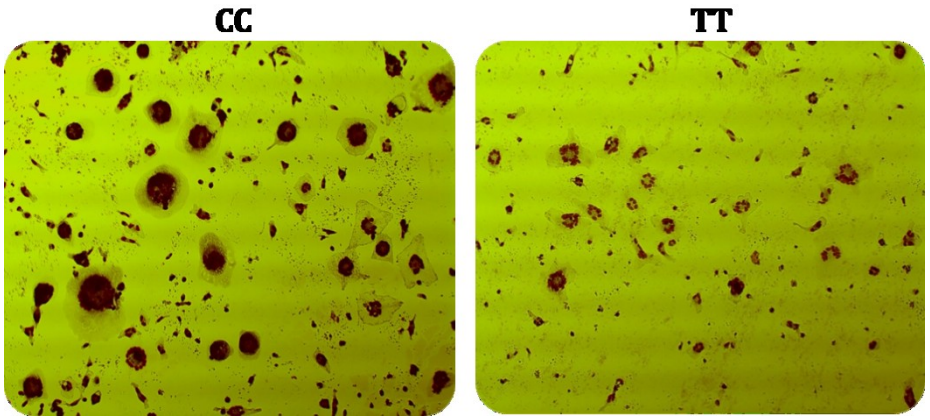
4.6.3 Výsledky

V první části studie jsme se věnovali analýze genových profilů ANXA11 u pacientů se sarkoidózou a jejich podskupin dle genotypu rs1049550. Při srovnání skupiny pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců jsme nenalezli rozdíly v genové expresi ANXA11 mRNA (p>0,05) **(Obrázek 35A).** Také při porovnání skupin pacientů a kontrol rozdělených dle nosičství T alely jsme nenalezli rozdíly mezi hladinami mRNA transkriptů pro ANXA11 (p>0,05) **(Obrázek 35B).** Proto jsme se v další části práce věnovali možnému funkčnímu dopadu tohoto polymorfismu na tvorbu granulomů.



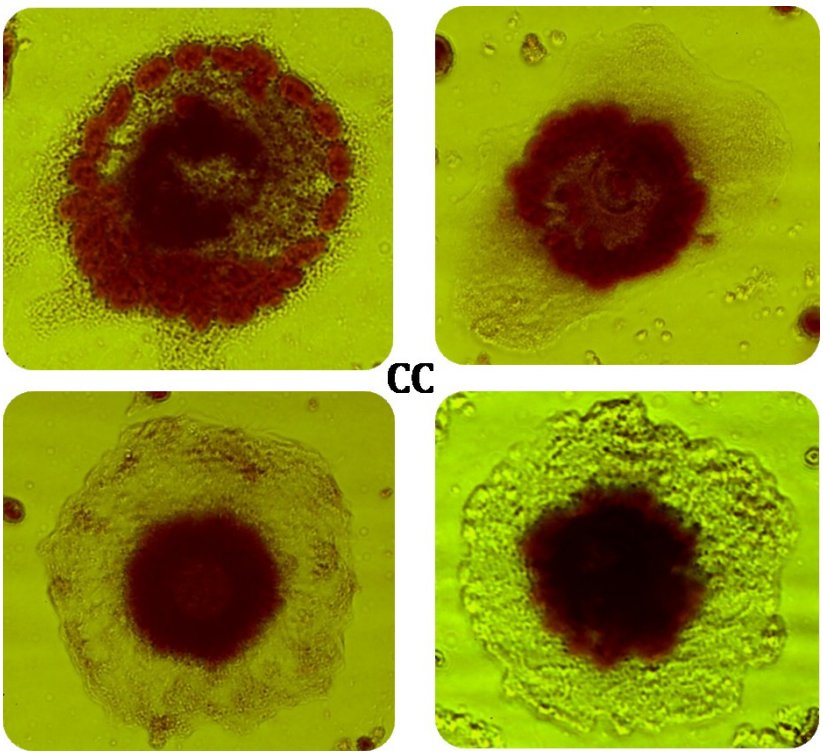
Obrázek 35. Srovnání relativní mRNA exprese genu ANXA11 v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou (S) a kontrolních jedinců (C) **(A)** a pacientů i kontrol rozdělených dle nosičství T alely **(B)**. Data jsou prezentována jako fold change relativní exprese, hranice boxů představují hodnoty SD.

Velikost a charakter vytvořených granulomů byl porovnán mezi podskupinami pacientů s genotypem CC (n=6) a TT (n=4) polymorfismu rs1049550. U pacientů s genotypem CC jsme pozorovali vyšší počet větších mnohojaderných obrovských buněk, které se formovaly z mononukleárních buněk periferní krve po stimulaci Concanavalinem A ve srovnání s TT pacienty (**Obrázek 36**).

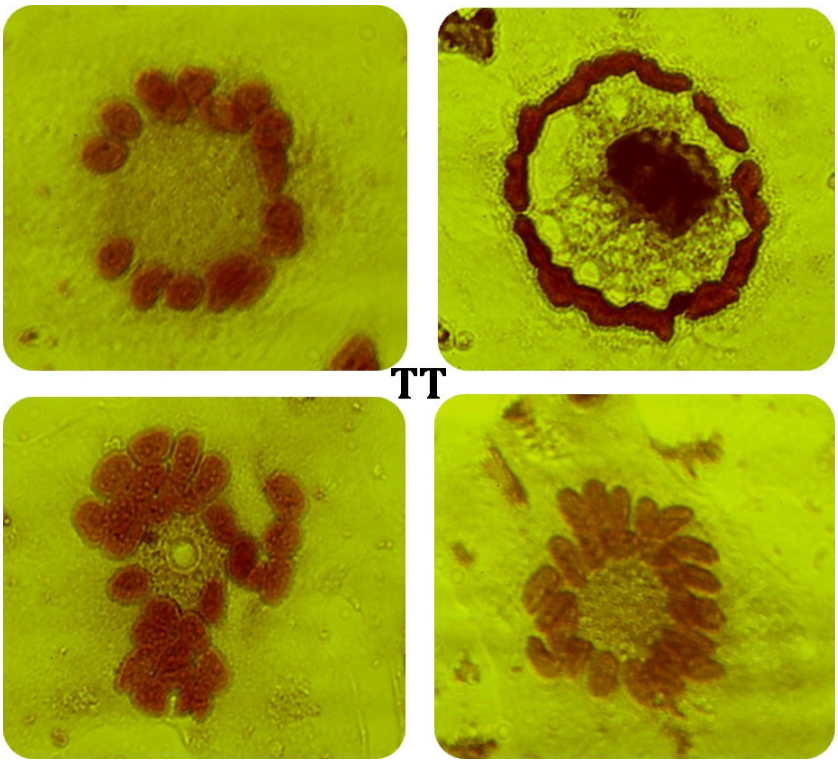


Obrázek 36. Tvorba mnohojaderných obrovských buněk z PBMC in vitro po stimulaci Concanavalinem A po dvou dnech. Rozdílná velikost i počet buněk u pacientů se sarkoidózou u genotypu CC vs TT rs1049550. Zvětšení 200x.

Po přidání nanočástic, u kterých bylo již dříve prokázáno, že jejich působení při častém vdechování v plicích umocňuje vznik granulomů a dokonce i zvyšuje riziko karcinomu, podobně jako u azbestových vláken, vytvářeli CC homozygoti větší granulomy hustě prostoupené lymfocyty (**Obrázek 37**) a jejich počet byl vyšší než u TT pacientů (**Obrázek 38**).

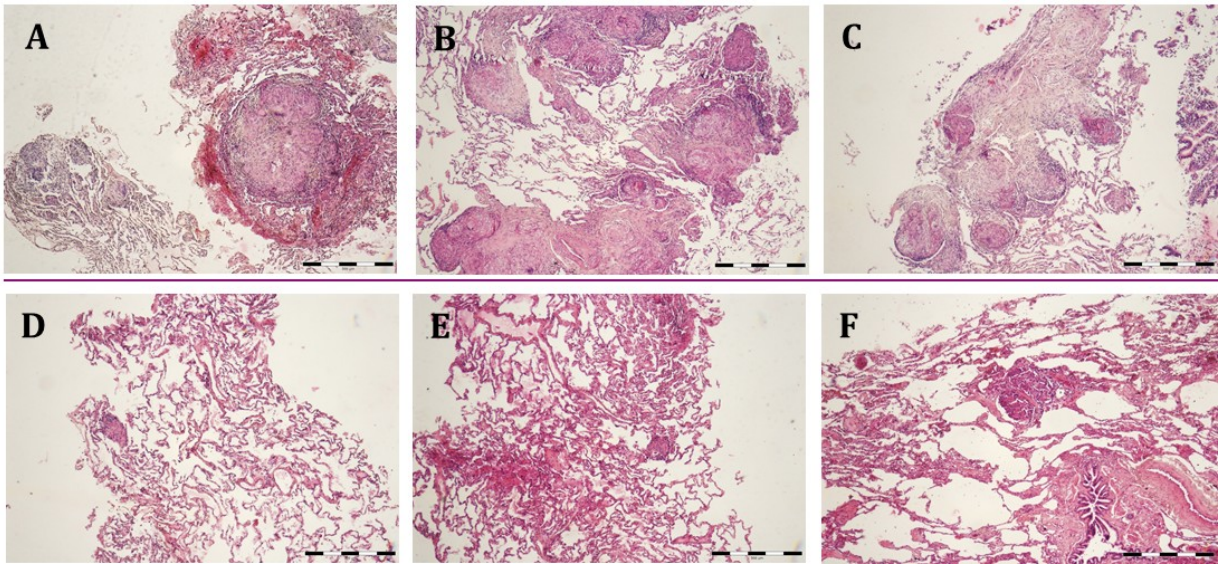


Obrázek 37. Tvorba granulomů z mnohojaderných obrovských buněk *in vitro* po stimulaci uhlíkových nanočástic po osmi dnech u pacientů se sarkoidózou s genotypem CC rs1049550. Zvětšení 400x.



Obrázek 38. Tvorba granulomů z mnohojaderných obrovských buněk *in vitro* po stimulaci uhlíkových nanočástic po osmi dnech u pacientů se sarkoidózou s genotypem TT rs1049550. Zvětšení 400x.

Granulomy byly také hodnoceny v biopsiích plicních tkání získaných v době diagnózy pacientů se sarkoidózou s CC (n=10) a TT (n=8) ANXA11 genotypem. Velikost a charakter granulomů a také stav alveolitidy byl hodnocen zkušeným patologem po fixaci a barvení tkání hematoxylinem a eosinem. V plicních biopsiích u pacientů s genotypem CC byly popsány větší, splývající granulomy (min-max: 0,5-2,0 mm) s fibrotickým lemem a v tkáni byla přítomna alveolitida v porovnání s pacienty s genotypem TT s malými granulomy (0,1-0,5 mm) a bez přítomnosti alveolitidy (**Obrázek 39**).



Obrázek 39. Plicní biopsie (H&E barvení) pacientů se sarkoidózou **(A-C)** s genotypem CC ANXA11 rs1049550 a **(D-E)** s genotypem TT ANXA11 rs1049550. Zvětšení 40x.

4.6.4 Závěr

V této studii jsme se zaměřili na prokázání možného vlivu rs1049550 polymorfismu na expresi genu ANXA11 a dále na tvorbu granulomů *ex vivo*.

Neprokázali jsme rozdíly v ANXA11 mRNA expresi v BAL buňkách mezi pacienty se sarkoidózou a kontrolami, ani podskupinami rozdělených dle nosičství T alely.

U pacientů se sarkoidózou jsme izolovali periferní mononukleární buňky (PBMC) a stimulovali u nich tvorbu granulomů pomocí Concanavalinu A a uhlíkových nanočástic. Velikost a charakter vytvořených granulomů byl porovnán mezi podskupinami pacientů s genotypem CC a TT polymorfismu rs1049550. U pacientů s genotypem CC jsme pozorovali vyšší počet větších mnohojaderných obrovských buněk ve srovnání s TT pacienty. Po přidání nanočástic vytvářeli CC homozygoti větší granulomy hustě prostoupené lymfocyty a jejich počet byl vyšší než u TT pacientů.

Granulomy byly také hodnoceny v biopsiích plicních tkání pacientů se sarkoidózou s CC a TT ANXA11 genotypem. Mezi nejvýznamnější výsledky této části studie jednoznačně patří nález rozdílů mezi velikostí a charakterem granulomů mezi CC a TT pacienty. Naše studie tímto potvrdila funkční vliv polymorfismu rs1049550 v genu ANXA11 na tvorbu granulomů u sarkoidózy. Přesný mechanismus vlivu rs1049550 na tvorbu granulomů bude určitě předmětem dalšího studia.

5. Diskuze

5.1 Volba vhodného referenčního genu pro měření genové exprese v BAL buňkách

Přestože je qRT-PCR již zavedenou metodou vhodnou pro kvantifikaci mRNA exprese v BAL vzorcích, je normalizace mezi jednotlivými vzorky hlavním úskalím této metodiky (Dheda 2004, Bustin 2004). I přes teoretickou možnost zmírnění variability měření použitím normalizace objemu vzorku či koncentrace RNA, nejsou tyto způsoby dostačující, zejména kvůli odlišnosti buněčného složení BAL vzorku i rozdílné kvalitě RNA (Freeman 1999). V současné době nejvhodnější a nejjednodušší způsob normalizace klinických měření qRT-PCR představuje použití referenčního genu (Dheda 2004, Trapnell 1993, Pfaffl 2001, Suzuki 2000, Karge 1998). V naší práci jsme potvdili, že kombinace podobné velikosti vzorku, podobné koncentrace RNA při reverzní transkripce a zejména používání validovaných referenčních genů představuje správnou normalizační strategii pro vzorky BAL.

I když je známo, že normalizace s nevhodně zvoleným referenčním genem může vést k nesprávné interpretaci výsledků genové exprese cílových genů (Glare 2002, Silver 2006), většina skupin zpravidla používá geny GAPDH a ACTB jako vhodné referenční geny při qRT-PCR studiích plicních vzorků (Bloor 2001, Muhlebach 2004, Zhao 2006, Ye 2005, Choi 2006). Důvodem může být skutečnost, že tyto referenční geny byly zavedeny a jejich stabilita prověřena především na buněčných kulturách a tkáních (Bustin 2005, Pfaffl 2004, Vandesompele 2002, Andersen 2004, de Kok 2005) a odtud byly převzaty i pro studium klinických vzorků. Také dosud nebyly provedeny studie, které by určily vhodný referenční gen aplikovatelný na studium BAL vzorků.

V naší studii jsme aplikovali čtyři různé matematické a statistické modely pro výběr stabilně exprimovaných referenčních genů v BAL vzorcích. Stejně jako v předchozích studiích (Ishii 2006, Glare 2002) jsme pozorovali, že „tradiční“ referenční geny, jako ACTB a GAPDH nejsou vhodné pro normalizaci genové exprese v BAL buňkách. Dokonce i v případě genu GNB2L1, který byl doporučen jako vhodný referenční gen pro studium BAL makrofágů pacientů s CHOPN (Ishii 2006), jsme pozorovali, že jeho exprese v BAL buňkách je ovlivněna plicní patologií, léčbou a zastoupením eosinofilů a neutrofilů v BAL.

V naší studii jsme se zaměřili na vyšetření vlivu mnoha proměnných (např. pohlaví, kouření, věk, BAL buněčné složení, plicní patologie a léčba) na stabilitu exprese zkoumaných genů. Získali jsme žebříček vhodných referenčních genů pro různé podskupiny, ovšem pouze PSMB2 a RPL32 geny byly odhaleny jako nejstabilněji exprimované geny v BAL vzorcích, osm zbývající genů bylo vyloučeno z další analýzy. Pro zvýšení průkaznosti tvrzení o stabilní povaze PSMB2 a RPL32 genů, byla jejich stabilita exprese dále ověřována na druhé, nezávislé BAL kohortě pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců. Jsme si vědomi toho, že jsme se zabývali převážně vzorky bronchoalveolárních buněk z intersticiálních plicních onemocnění a velikosti vzorků jiných onemocnění byly omezené.

PSMB2 gen patří do skupiny genů kódujících 20S proteazomální základní podjednotky, RPL32 je gen kódující součást ribozomální 60S podjednotky. Různé ribozomální proteiny byly již dříve testovány qRT-PCR: RPL13A pro slinivku a prostatické tkáně (Jesnowski 2002), LRP10 pro tukové tkáně (Gabrielsson 2005), RPL32 u BAL neutrofilů (Zhang 2005) a makrofágů pacientů s CHOPN, kde byla jejich exprese stabilní bez ohledu na závažnost onemocnění (Ishii 2006). PSMB2 gen vykazoval pouze 29 % kolísání exprese u 19 lidských tkání testovaných pomocí

microarray techniky (Hsiao 2001), čímž se poprvé ukázala jeho vhodnost použití jako referenční gen pro qRT-PCR také v neseparovaných BAL buňkách.

Vyvstává také otázka potřeby více než jednoho referenčního genu pro normalizaci za účelem zlepšení přesnosti výsledků, což mnohé studie potvrdily (Vandesompele 2002, Andersen 2004, Abruzzo 2005, Coulson 2008, Pombo-Suarez 2008). Jiné práce naopak ukazují, že použití jednoho referenčního genu je dostačující pro většinu aplikací (de Kok 2005, Lyng 2008, Dydensborg 2006, Ohl 2006). Také naše analýzy ukázaly, že kombinace dvou nejstabilnějších genů (PSMB2 a RPL32) nepřineslo zlepšení přesnosti během normalizace ve srovnání se samotnými PSMB2 nebo RPL32 geny.

Abychom prokázali, že normalizace s použitím nevhodného referenčního genu s proměnnou expresí může opravdu vést k nesprávné interpretaci výsledků genové exprese cílových molekul, použili jsme nově definovaných referenčních genů pro vyšetřování hladin mRNA cytokinu IFNG, jehož mRNA a protein byl nalezen zvýšený u Th1 polarizované sarkoidózy (Robinson 1985, Shigehara 2000). U našich pacientů bylo zvýšení mRNA exprese IFNG v BAL buňkách pozorováno pouze v případě normalizace s použitím referenčních genů PSMB2/RPL32. Pokud byly k normalizaci použity nejčastěji používané referenční geny ACTB/GAPDH, mRNA up-regulace IFNG genu nebyla pozorována.

Naše výsledky poskytují důležité a jasné poselství v oblasti studia genové exprese, protože pouze s použitím validovaných (tj. stabilně exprimovaných) referenčních genů pro normalizaci je možné detekovat změny v genové expresi cílových molekul v BAL vzorcích a zajistit, že jsou tyto výsledky validní, a proto klinicky významné. Naproti tomu volba nevhodného referenčního genu pro danou tkáň či populaci buněk vede k nesprávné interpretaci výsledků měření mRNA exprese cílového genu ve vzorcích plic.

5.2 Studium exprese klíčového Th1 transkripčního faktoru T-bet a jeho regulačního vlivu na geny asociované se sarkoidózou

S ohledem na rozhodující roli transkripčního faktoru T-bet v Th1 diferenciaci (Szabo 2000) a jeho vliv na CXCR3 a IFNG up-regulaci (Beima 2006, Lewis 2007, Matsuda 2007), jsme předpokládali, že T-bet se může podílet na patogenezi Th1 asociovaného zánětu u sarkoidózy. V souladu s touto hypotézou naše data ukázala, že mRNA exprese T-bet byla zvýšena u pacientů se sarkoidózou ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvýšené hladiny T-bet byly také prokázány u jiných onemocnění Th1 typu, jako je Crohnova nemoc (Matsuoka 2004) a celiakie (Jöhrens 2005, Frisullo 2008).

Na základě výsledků studií T-bet-deficientních myší, které ukázaly, že T-bet je klíčovým transkripčním faktorem pro indukci transkripce CXCR3 a IFNG u Th1 buněk (Beima 2006, Lewis 2007, Matsuda 2007), jsme studovali, zda T-bet může také modulovat expresi CXCR3 a IFNG genu u sarkoidózy. Studium regulace exprese CXCR3 u sarkoidózy je zajímavé, protože tento chemokinový receptor hraje klíčovou roli při hromadění T-buněk v plicích a následné tvorbě granulomů (Agostini 2005). Během studie jsme pozorovali silnou korelaci mezi T-bet a CXCR3 a IFNG expresí v BAL buňkách pacientů se sarkoidózou. Naše korelační analýza tedy podporuje koncept T-bet modulace CXCR3 a IFNG genové exprese v plicích pacientů. Dále jsou zapotřebí další funkční studie, které by potvdily přímou kontrolu CXCR3 a IFNG exprese pomocí T-bet u sarkoidózy.

Na rozdíl od přímého vlivu T-bet na expresi CXCR3 a IFNG bez ohledu na buněčný typ, regulace jiných genů pomocí T-bet může být ovlivněna mnoha dalšími faktory (Beima 2006). Studovali jsme proto také vztah T-bet s dalšími kandidátními cytokiny a jejich receptory, které se podílí na patogenezi onemocnění. Ze studovaných chemokinových receptorů jsme pozorovali silnou korelaci mezi T-bet a expresí CXCR6

genu, receptoru ko-exprimovaného spolu s CXCR3 na T-buňkách u sarkoidózy (Agostini 2005). Kromě toho byla pozorována silná korelace mezi T-bet a CCL5 a CXCL10 chemokiny, které hrají důležitou roli při alveolitidě u sarkoidózy (Agostini 2005, Nishioka 2007, Arakelyan 2009, Agostini 1998, Petrek 1997). Dále jsme pozorovali silnou korelaci mezi T-bet a IL-2R/IL-15Rb (CD122) na našem studovaném souboru. Toto zjištění již bylo pozorováno u zvířecích modelů a buněčných kultur (Beima 2006, Matsuda 2007). Tento nález je zajímavý, neboť receptory IL-2R a IL-15R ovlivňují proliferaci T-buněk u sarkoidózy (Katchar 2003, Agostini 1996).

Zajímalo nás také, jaký typ(y) buněk exprimují T-bet, protože chemokiny a jejich receptory, u nichž byla prokázána modulace T-bet, byly detekovány buď v alveolárních lymfocytech (IL-2R, CXCR3 a CXCR6) (Agostini 2005, Katchar 2003, Agostini 1996) nebo v makrofázích (CCL5 a CXCL10) (Agostini 1998, Petrek 1997). V našich experimentech byl T-bet lokalizován v alveolárních makrofázích a lymfocytech a v plicních biopsiích také na makrofázích, mnohojaderných obrovských buňkách, u epiteloidních buněk a lymfocytů infiltrujících granulomy. T-bet exprese byla již dříve zjištěna v různých typech buněk, jako například NK, dendritických a T a B-buňkách (Beima 2006); naše studie také popisuje T-bet expresi v plicních makrofázích.

Tato studie má svá omezení. Hodnotili jsme pouze čtyři pacienty již ve fibrotizující fázi sarkoidózy z důvodu omezené dostupnosti pacientů s tímto fenotypem. Také jsme použili pouze měření genové exprese ke studiu možného vztahu T-bet a chemokinů/receptorů u sarkoidózy a neprokázali jsme přímý mechanismus interakce mezi T-bet a příbuznými geny pomocí funkční studie. Za třetí, tato studie se zaměřila pouze na T-bet mRNA expresní profilování v BAL buňkách a nikoli v plicích a uzlinách tkání a buněk periferní krve. Nicméně na základě našich imunohistochemických experimentů je zřejmé, že T-bet je také exprimován v buňkách

tvořících granulom u sarkoidózy a infiltrující plicní tkáně, a to by mělo být předmětem zkoumání v dalších studiích.

5.3 Role Th17 imunitní odpovědi u progrese sarkoidózy

Sarkoidóza byla považována za typické Th1 imunitní onemocnění (Zissel 2007, Miyara 2006), ale poslední výzkumy ukázaly, že také Th17 imunitní odpověď hraje roli v její patogenezi (Facco 2011, Judson 2012). Výrazné zvýšení počtu Th17 buněk bylo detekováno zejména v bronchoalveolární laváži a tkáních pacientů s progresivní chorobou (Facco 2011). Proto jsme předpokládali, že ke zvýšení exprese Th17 buněk může docházet v důsledku dysregulace molekul podílejících se na aktivaci a udržování Th17 buněk u jednotlivých fenotypů sarkoidózy. Sledovali jsme proto expresní profily molekul zapojených do zahájení, diferenciace a udržování Th17 buněk u našich pacientů se sarkoidózou. Ve srovnání s kontrolami byla pozorována up-regulace TGFB, IL-6 a IL-21 cytokinů zapojených v počátečních krocích Th17 diferenciace (Dong 2008, Chen 2008)

v BAL buňkách získaných od pacientů se sarkoidózou bez ohledu na klinické fenotypy. Podobně byla zvýšena exprese cytokinu stabilizujícího Th17 linii IL-23 (Ivanov 2007, Mucida 2009), transkripčního faktoru RORC asociovaného s Th17 dráhou (Ivanov 2006) a inhibitoru Th17 dráhy T-bet (Korn 2007, Batten 2006, Ivanov 2007) u sarkoidózy a nelišila se mezi pacienty s různými klinickými fenotypy.

Důležitým zjištěním bylo, že zvýšená exprese STAT3, transkripčního faktoru důležitého pro differenciaci a proliferaci Th17 buněk (Yang 2007), byla zjištěna u pacientů s progresivní formou sarkoidózy ve srovnání s těmi, kteří dosáhli remise po dvou letech sledování. Navíc zjištění snížené exprese IL-27, což je imunoregulátor Th1 imunitní odpovědi (Stumhofer 2008) schopný potlačit Th17 dráhu (Harrington

2005), bylo spojeno s progresivním onemocněním naší skupiny pacientů. Pokles exprese IL-27 se může podílet na zvýšení produkce cytokinu IL-17, který patří mezi charakteristický produkt Th17 buněk, jak bylo uvedeno při studiích IL-27 blokády na zvířecích modelech (Kim 2011).

Jak se dalo očekávat, při srovnání STAT3/T-bet a STAT3/IL-27 genové exprese v rámci podskupin pacientů dle vývoje onemocnění po dvou letech, aktivátor STAT3 byl významně zvýšen u pacientů s progredující sarkoidózou. Klíčovou roli STAT3 v patogenezi sarkoidózy také podporovalo pozorování STAT3 up-regulace v kožních lézích a krvi u pacientů s kožní sarkoidózou (Judson 2012). STAT3 transkripční faktor byl identifikován jako klíčový regulátor Th17 diferenciace (Yang 2007, Ma 2011, Hwang 2010, Durant 2010, Chaudhry 2009). Kromě toho existují důkazy o požadavku STAT3 pro směrování imunitní odpovědí Th17 buněk *in vivo* (Harris 2007, Yu 2012). U člověka byla asociace STAT3 s Th17 imunitní odpovědí byla již popsána u systémového lupu erythematodes (Prado 2011) a u pacientů s hyper-IgE syndromem postrádajících Th17 buněk, u kterých byly zjištěny mutace v STAT3 (Renner 2008, Hanna 2011). A konečně byl STAT3 identifikován jako klíčový hráč u tkáňové fibrózy při studiu kultivovaných fibroblastů a různých zvířecích modelů (Ma 2011). Domníváme se, že up-regulace STAT3 může být důležitým hnacím faktorem v progresi sarkoidózy a zaslouží si další výzkum.

Zajímalo nás také, zda se dysregulace genové exprese STAT3 měřená na úrovni mRNA projeví i na úrovni proteinu. Ve skutečnosti jsme byli schopni detekovat vyšší procento STAT3 pozitivních buněk v plicních biopsiích a intenzivnější barvení STAT3 v BAL buňkách získaných od pacientů s progresivní sarkoidózou než u těch, kde byla pozorována remise po 2 letech sledování. Uvažovali jsme také, že i IL-17 cytokin bude up-regulována u pacientů s progresivní nemocí. Ovšem na úrovni mRNA, jsme nezjistili žádný rozdíl v expresi IL-17 cytokinu mezi podskupinami pacientů s progresí a remisí

a také mezi pacienty ve srovnání s kontrolní skupinou. Podobné pozorování bylo zaznamenáno i u kožní sarkoidózy (Judson 2012). Nicméně vysoké IL-17 proteinové hladiny byly detekovány v tkáňových histiocytech, lymfocytech a plazmatických buňkách v plicních biopsiích a v alveolárních makrofázích BAL buněk u progredující sarkoidózy. A podobně jsme zjistili vyšší koncentrace IL-17 proteinu i v BAL tekutině progredujících pacientů ve srovnání s těmi, u kterých došlo k remisi. Naše výsledky podporují teorii důsledků Th17 buněk v událostech, které vedou k progresi onemocnění.

Kromě případného příspěvku Th17 buněk na progresivní formu sarkoidózy, byly Th17 buňky také nalezeny ve spojení s fibrotickou fázi onemocnění (Facco 2011). Tento závěr je podporován pozorováním na zvířecích modelech, kde IL-17 a Th17 byly zapojeny do bleomycinem indukované plicní fibrózy (Wilson 2010), hypersenzitivní pneumonitidy a plicní fibrózy (Simonian 2009). V poslední době byl také IL-17 prokázán u lidské plicní fibrózy spojené s hypersenzitivní pneumonitidou (Abdelsamed 2011). V této souvislosti jsme u našich pacientů ověřovali hypotézu, že dysregulace STAT3/IL-27 u progresivního onemocnění může přispět k modulaci Th17 odpovědi, a proto by měl být předmětem dalšího zkoumání.

5.4 Příspěvek transkripční a post-transkripční regulace na cytokin/chemokinovou síť u plicní sarkoidózy

Naše analýza poprvé zkoumala profil genové exprese prozánětlivých miRNA v BAL buňkách získaných od pacientů se sarkoidózou ve srovnání s kontrolními jedinci a také u podskupin pacientů s remisí a progresí během 2 let sledování.

V patogenezi sarkoidózy je rozhodující role připisována zánětlivým cytokinům a chemokinům, kteří řídí migraci leukocytů do míst zánětu a kontrolují aktivaci leukocytů a makrofágů a produkci cytokinů, ale také angiogenezi a polarizaci Th buněk

(Agostini 2000, Facco 2007, Facco 2015). S ohledem na zásadní úlohu cytokinů, chemokinů a jejich receptorů v patogenezi sarkoidózy vyvstává zásadní otázka, jak je síť cytokinů, chemokinů, chemokinových receptorů regulována. Předpokládali jsme, že regulace cytokin/chemokinové sítě v BAL buňkách zahrnuje rovněž výrazné zapojení více regulačních systémů, včetně miRNA a klíčového Th1 transkripčního faktoru T-bet.

Proto jsme nejprve zkoumali expresní profily miRNA spojených se zánětem v BAL buňkách a odhalili down-regulované miR-202 a miR-204 a up-regulované miR-146a, miR-150 a miR-222 exprese u sarkoidózy ve srovnání s kontrolami. Při porovnávání progredující a remitující sarkoidózy byly detekovány vyšší počty miR-155 a let-7c transkriptů u progredující sarkoidózy. Všechny detekované miRNA spojené se sarkoidózou byly již dříve spojovány s regulací zánětlivé odpovědi. Zánětlivé miR-155 a miR-146a byly nalezeny v souvislosti se zvýšenou expresí NF-kB (Cheng 2013, Devier 2015), miR-150 se podílí na plicním zánětu (Rajput 2012), miR-202 byla nalezena u pacientů s revmatoidní artritidou (Murata 2013), miR-204 u produkce zánětlivých mediátorů a apoptózy (Li 2011) a let-7c byla nalezena u alergického zánětu dýchacích cest (Kumar 2011). Kromě toho byla také miR-204 nalezena u granulomu plicní tkáně (Crouser 2012). Je zajímavé, že při porovnání miRNA profilu v BAL buňkách u sarkoidózy jsme získali v této studii jiný profil deregulovaných miRNA, než bylo zjištěno v plicní tkáni (Crouser 2012), což podporuje skutečnost, že miRNA expresní profily se liší v závislosti na zkoumané tkáni.

V předchozí kapitole jsme diskutovali rozhodující úlohu Th1 transkripčního faktoru T-bet, který se ukázal jako klíčový regulátor IFNG a chemokinového receptoru CXCR3 a dalších imunitních genů u sarkoidózy (Kriegova 2011). V této studii jsme hledali důkazy o případné účasti transkripčních a posttranskripčních regulací pomocí miRNA a T-bet při kontrole zánětu u sarkoidózy v BAL buňkách. Naše korelační analýza

potvrdila vztah T-bet a IFNG, ale také klíčových cytokinových receptorů asociovaných se sarkoidózou IL-2RB, IL-15RA, CXCR3 a CXCR6 bez ohledu na průběh nemoci.

Důležitým zjištěním bylo, že vztahy mezi T-bet a zejména miRNA týkajících se chemokinových sítí se změnily mezi podskupinami pacientů, u kterých došlo k remisi ve srovnání s progresí nemoci po dvou letech sledování. Ve shodě s předchozími studiemi naše analýza nominovala jako klíčové kandidátní chemokiny spojené s prognózou plicní sarkoidózy dva chemoatraktanty CCL2 a CCL5 monocytů a žírných buněk (Palchevskiy 2011) a CCL19, chemokin účastnící se přitahování T-lymfocytů (Gibejova 2003). A podobně CXCR4 a CXCR7 a jejich ligand CXCL12, hrající roli v regulaci leukocytů a jejich mobilizaci (Chen 2015, Watanabe 2007) si zaslouží další výzkum. Vzhledem ke složitosti pochopení sítě miRNA-mRNA transkripce, přínosu jednotlivých členů sítě a pochopení regulačních mechanismů, je nutné provést další studie, které mohou odhalit funkční dopad interakce mezi studovanými molekulami.

Naše studie má několik omezení. Jsme si vědomi toho, že náš soubor studovaných prozánětlivých miRNA a studovaných cytokinů, chemokinů a jejich receptorů vybraných na základě jejich zapojení do patogeneze sarkoidózy, nepokrývá celý potenciál sítě molekul, které přispívají k patogenezi tohoto onemocnění. Dále jsme neprovedli funkční studie potřebné k potvrzení biologického významu získaných vztahů mezi T-bet, miRNA a členy chemokinové sítě. Domníváme se však, že naše studie může přispět k nominaci zajímavých vztahů pro budoucí studium regulačních mechanismů podílejících se na patogenezi plicní sarkoidózy a jejích fenotypů.

5.5 Studium funkčního dopadu polymorfismu ANXA11 rs1049550 u sarkoidózy

Četné genetické studie zjistily, že ANXA11 rs1049550 polymorfismus je asociován se sarkoidózou. Dokonce nosiči T alely jsou chráněni před infiltrací plicního parenchymu (Mrázek 2011, Feng 2014). V této studii jsme se zaměřili na objasnění mechanismu, kterým rs1049550 ovlivňuje náchylnost k sarkoidóze.

V našich experimentech jsme se nejprve zaměřili na studium ANXA11 mRNA exprese v BAL buňkách mezi pacienty se sarkoidózou a kontrolami a nepozorovali jsme žádný rozdíl, což bylo v souladu s předchozími údaji uvedenými ve studii GWAS (Hofmann 2008).

Dále ANXA11 mRNA exprese v BAL buňkách nebyla významně ovlivněna nosičstvím rs1049550*T alely u našich pacientů se sarkoidózou ani u kontrolních subjektů. S ohledem na možný mechanismus, kterým rs1049550 SNP ovlivňuje náchylnost k sarkoidóze nebo její fenotyp, můžeme tedy předpokládat, že tato varianta kódování mění funkční vlastnosti ANXA11 proteinu, spíše než že by ovlivňovala jeho kvantitativní výraz. Domníváme se, že hlavní vliv tohoto polymorfismu na průběh onemocnění může spočívat ve vlivu na tvorbu granulomů.

Hlavním limitujícím faktorem objasnění nového pohledu na patogenezi sarkoidózy je nedostatek studií na zvířecích modelech. V současné době bylo prokázáno, že uhlíkové nanočástice ve tvaru trubiček definovaných velikostí indukují spuštění granulomatózní reakce (Barna 2016). Proto se začal používat tento model pro *ex vivo* stimulace tvorby granulomů. To také potvrdily nedávné myší modely, u které se s použitím vícevrstvých uhlíkových nanotrubiček podařilo indukovat chronické granulomatózní onemocnění, které se podobalo svou patologií vzniku lidské sarkoidóze. Vzhledem k tomu, že použití uhlíkových nanotrubic u spotřebních výrobků stále roste,

počet jedinců trpících granulomatózním onemocněním se bude pravděpodobně zvyšovat. Kromě toho se ukazuje, že expozice uhlíkových nanočástic by mohlo představovat karcinogenní riziko podobné účinkům azbestových vláken (Varga 2010). Nicméně k dnešnímu dni potenciální markery působení expozice nanočásticemi dosud nejsou u člověka prozkoumány.

Naše studie podporuje možnost funkčního dopadu ANXA11 rs1049550 na tvorbu granulomů u sarkoidózy. Pacienti s ANXA11*T alelou vytvářeli in vitro menší granulomy ze stimulovaných PBMC, stejně jako bylo potvrzeno v plicních biopsiích těchto pacientů ve srovnání s pacienty s ANXA11*C alelou. Přesný mechanismus ochranné úlohy rs1049550*T alely na tvorbu granulomů by měl být rozhodně předmětem zkoumání v dalších funkčních studiích.

6. Závěr

Předkládaná práce je zacílena na studium mediátorů zánětlivých a fibrotizujících procesů u pacientů s nejčastějšími difúzními plicními nemocemi, zejména sarkoidózou a plicní fibrózou, a to zejména s využitím real time PCR technik. V první části této práce jsme se proto zaměřili na hledání vhodného normalizačního nástroje pro qRT-PCR studie zaměřené především na stanovení genové exprese cílových genů v buňkách bronchoalveolární laváže. S využitím dvou kohort pacientů a spektra kandidátních genů jsme identifikovali stabilní, referenční geny PSMB2 a RPL32 , jejichž exprese není ovlivněna vnějšími proměnnými jako je kouření, pohlaví, věk, plicní patologie, léčba a BAL buněčné složení, a proto představují vhodné normalizační geny pro qRT-PCR studie v BAL buňkách. Na příkladu cytokinu IFNG, jehož mRNA exprese je zvýšena u sarkoidózy, jsme ilustrovali klinickou relevanci volby správného referenčního genu.

Prioritním výsledkem další části výzkumu bylo nejen prokázání zvýšené exprese transkripčního faktoru T-bet u sarkoidózy, ale také korelace T-bet exprese s expresí cytokinů IFNG a CXCR3 v BAL buňkách získaných u pacientů se sarkoidózou. Množství T-bet transkriptů korelovalo také s mRNA expresí dalších chemokinů CCL5, CXCL9, CXCL10 a receptorů IL-2R/15R beta a CXCR6, které se na patogenezi onemocnění také podílí. Korelační analýza neprokázala asociaci mezi T-bet a expresí genů CCL2, CXCL11, CCR2 a CCR5. Pomocí imunohistochemie jsme detekovali T-bet protein v alveolárních makrofázích a lymfocytech, dále v tkáňových obrovských mnohojaderných buňkách, makrofázích a lymfocytech. Naše práce potvrdila klíčovou roli T-bet v regulaci plicního zánětu u sarkoidózy.

Dále jsme studovali regulační mechanizmy cytokin/chemokinové sítě na transkripční a post-transkripční úrovni. Prioritní byl popis klíčové role transkripčního faktoru T-bet v regulaci cytokin/chemokinové sítě a dalších složek Th1

imunitní odpovědi u sarkoidózy. Kromě příspěvku T-bet jsme potvrdili účast miRNA na regulaci cytokin/chemokinové sítě a popsali miRNA profil u buněk bronchoalveolární laváže u sarkoidózy a jejích fenotypů lišících se vývojem onemocnění po 2 letech (progrese vs. regrese), který zatím ve světovém písemnictví nebyl popsán.

Dalším našim klíčovým nálezem byl rozdíl v expresních profilech molekul Th17 dráhy mezi skupinami pacientů se sarkoidózou, u kterých došlo po 2 letech k progresi a remisi onemocnění. Podařilo se nám prokázat zvýšené hladiny IL-17, klíčového cytokinu Th17 skupiny, a STAT3, esenciálního aktivátoru Th17 buněk, u pacientů s progresí sarkoidózy v bronchoalveolárních buňkách, tekutině i plicní tkáni. Zvířecí modely fibrózy potvrdily klíčovou roli STAT3 v indukci fibrotizujících změn v plicích. Detailní znalost procesů, které předchází ireverzibilnímu poškození plic a fibrotizaci, může v budoucnosti významně přispět k návrhu preventivních a terapeutických přístupů zabraňujících těmto procesům.

V další části projektu jsme hledali nové sérové biomarkery pomocí inovativní a citlivé metody Proximity Extension ImmunoAssay. Popsali jsme proteinové profily typické pro IPF a sarkoidózu a její klinické fenotypy dle vývoje onemocnění (remise a progrese) v séru i bronchoalveolární tekutině a navrhli panel kandidátních biomarkerů využitelný k posouzení rizika progrese, personalizaci léčebného postupu a sledování léčebné odpovědi u těchto pacientů. Řada identifikovaných cytokinů, solubilních receptorů a dalších imunitních molekul nebyla dosud u těchto nemocí popsána a přispěje k objasnění patogenetických mechanizmů fibrotizace a progrese onemocnění. Zvláštní výhodou námi použité citlivé PEA spatřujeme v tom, že umožňuje simultánní detekci více proteinů a zmíněné testování se může provádět vyšetřením periferní krve.

V poslední části projektu jsme se zaměřili na studium polymorfismu ANXA11 rs1049550. Nejvýznamnějším nálezem byla souvislost klíčového funkčního

polymorfismu ANXA11 rs1049550 se sarkoidózou v české populaci a skutečnost, že ANXA11 rs1049550*T alela může onemocnění směrovat k prognosticky příznivějším formám (bez postižení plicního parenchymu). Polymorfismus ANXA11 rs1049550 se jeví jako vhodný diagnostický marker pro stratifikaci pacientů se sarkoidózou dle vývoje onemocnění. Neprokázali jsme rozdíly v genové expresi ANXA11 mRNA mezi pacienty se sarkoidózou a kontrolní skupinou a ani mezi pacienty a kontrolami rozdělenými dle nosičství alely T. Funkční *ex vivo* studie provedená v rámci tohoto projektu prokázala rozdíly mezi velikostí a charakterem granulomů mezi CC a TT pacienty a tento nález byl potvrzen v plicních biopsiích. Naše studie nominovala ANXA11 jako nový velmi slibný terapeutický cíl pro pacienty se sarkoidózou a dalšími granulomatózami.

Společným jmenovatelem všech studovaných okruhů této práce jsou molekulárně biologické, genetické a proteomické techniky, které představují jednoznačně novou úroveň studia imunopatologických a zánětlivých procesů. V budoucnosti očekáváme jejich širší uplatnění v biomedicíně a případné zavedení do klinické praxe s možností implementace do léčebných postupů. Při využívání moderních metod v klinické praxi však nutno zohlednit, že výsledky laboratorních analýz představují pouze jednu část komplexního obrazu zahrnujícího další vlivy vnějšího prostředí a celkového zdravotního stavu jedince. Využití nových přístupů a metodických postupů však nabízí pacientům i lékařské obci nové možnosti personalizace léčby a perspektivy imunologické cílené léčby.

7. Seznam použitých zkratek

ANXA - annexin

ATS - American thoracic society

BAL – bronchoalveolární laváž

BSA – bovine serum albumin

C - kontrola

CD4 - cluster of differentiation

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

CI – confidence interval (interval spolehlivosti)

Ct – cycle of treshhold

DPO - difusní plicní onemocnění

EAA - exogenní alergická alveolitida

ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay

EP – expresní profil

ERS - European respiratory society

GWAS - Genome-wide association study

HLA – human leucocyte antigen

HRCT - high-resolution computed tomography

IFNG – interferon gamma

Ig – imunoglobulin

IL - interleukin

IPF - idiopatická plicní fibróza

IPP - intersticiální plicní procesy

KFA - kryptogenní fibrotizující alveolitida

LNA – locked nucleic acid

LS – Löfgrenův syndrom

miRNA – mikro RNA

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

PBMC - peripheral blood mononuclear cell

PBS – phosphate buffered saline (fosfátový pufr)

PCA - principal component analyses

PCR – polymerase chain reaction

PEA - Proximity Extension Assay

qRT-PCR – quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

RISC - RNA-induced silencing komplexu

RNA – ribonukleová kyselina

RORC - RAR related orphan receptor C

rs- hodnota Spearmanova korelačního koeficientu

RT – reverzní transkripce

RTG – rentgenové vyšetření

S – sarkoidóza

SD – standard deviation (směrodatná odchylka)

SPSS - statistical package for the social sciences

Th – T helper (pomocný)

TNF – tumor necrosis factor

UIP – intersticiální pneumonie

w – intenzita korelací

WASOG - World association of sarcoidosis and other granulomatous disorders

8. Literatura

1. Abdelsamed HA, Desai M, Nance SC, Fitzpatrick EA. T-bet controls severity of hypersensitivity pneumonitis. J Inflamm (Lond). 2011;8:15.
2. Abruzzo LV, Lee KY, Fuller A, Silverman A, Keating MJ, Medeiros LJ, Coombes KR. Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data. Biotechniques. 2005;38:785-92.
3. Adrianto I, Lin CP, Hale JJ, Levin AM, Datta I, Parker R, Adler A, Kelly JA, Kaufman KM, Lessard CJ, Moser KL, Kimberly RP, Harley JB, Iannuzzi MC, Rybicki BA, Montgomery CG. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific Loci in sarcoidosis susceptibility. PLoS One. 2012;7:e43907.
4. Agostini C, Adami F, Semenzato G. New pathogenetic insights into the sarcoid granuloma. Curr Opin Rheumatol. 2000 Jan;12(1):71-6.
5. Agostini C, Cabrelle A, Calabrese F, Bortoli M, Scquizzato E, Carraro S, Miorin M, Beghè B, Trentin L, Zambello R, Facco M, Semenzato G. Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:1290–1298.
6. Agostini C, Cassatella M, Zambello R, Trentin L, Gasperini S, Perin A, Piazza F, Siviero M, Facco M, Dziejman M, Chilosi M, Qin S, Luster AD, Semenzato G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. J Immunol. 1998 Dec 1;161(11):6413-20.
7. Agostini C, Trentin L, Facco M, Sancetta R, Cerutti A, Tassinari C, Cimarosto L, Adami F, Cipriani A, Zambello R, Semenzato G. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. J Immunol. 1996 Jul 15;157(2):910-8.
8. American Thoracic Society, European Respiratory Society and World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Joint Statement on sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160:736-755.
9. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-64.
10. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165(2):277-304.
11. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res. 2004;64:5245-50.

12. Arakelyan A, Kriegova E, Kubistova Z, Mrazek F, Kverka M, du Bois RM, Kolek V, Petrek M. Protein levels of CC chemokine ligand (CCL)15, CCL16 and macrophage stimulating protein in patients with sarcoidosis. Clin Exp Immunol. 2009;155:457–465.
13. Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, Björkesten J, Thorsen SB, Ekman D. Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. PLoS One. 2014;9(4):e95192.
14. Babu S, Bhat SQ, Kumar NP, Jayantasri S, Rukmani S, Kumaran P, Gopi PG, Kolappan C, Kumaraswami V, Nutman TB. Human type 1 and 17 responses in latent tuberculosis are modulated by coincident filarial infection through cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and programmed death-1. J Infect Dis. 2009;200:288-98.
15. Barna BP, McPeek M, Malur A, Fessler MB, Wingard CJ, Dobbs L, Verbanac KM, Bowling M, Judson MA, Thomassen MJ. Elevated miRNA-33 in Sarcoidosis and a Carbon Nanotube Model of Chronic Granulomatous Disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016 Jun;54(6):865-71Dec 7.
16. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. Nat Immunol. 2006;7:929-36.
17. Baugham RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. Lancet. 2003;361:1111-18.
18. Baughman RP, Culver DA, Judson MA. A concise review of pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:573-81.
19. Baughman RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. Lancet. 2003 Mar 29;361(9363):1111-8.
20. Beima KM, Miazgowicz MM, Lewis MD, Yan PS, Huang TH, Weinmann AS. T-bet binding to newly identified target gene promoters is cell-type independent, but results in variable context-dependent functional effects. J Biol Chem. 2006;281:11992–12000.
21. Bindoli S, Dagan A, Torres-Ruiz JJ, Perricone C, Bizjak M, Doria A, Shoenfeld Y. Sarcoidosis and Autoimmunity: From Genetic Background to Environmental Factors. Isr Med Assoc J. 2016;18(3-4):197-202.
22. Bloor CA, Knight RA, Kedia RK, Spiteri MA, Allen JT. Differential mRNA expression of insulin-like growth factor-1 splice variants in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:265-72.
23. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. J Mol Endocrinol. 2005;34:597-601.
24. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reversetranscription polymerase chain reaction. J Biomol Tech. 2004;15:155-66.
25. Busuttil A, Weigt SS, Keane MP, Xue YY, Palchevskiy V, Burdick MD, Huang C, Zisman DA, Fishbein M, Lynch JP 3rd, Strieter RM, Elashoff RM, Belperio JA. CXCR3 ligands are augmented during the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J. 2009; 34: 676–686.

26. Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Irvine GB, Johnston JA. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. BMC Mol Biol. 2008;9:46.
27. Crouser ED1, Julian MW, Crawford M, Shao G, Yu L, Planck SR, Rosenbaum JT, Patrick Nana-Sinkam S. Differential expression of microRNA and predicted targets in pulmonary sarcoidosis. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 13;417(2):886-91.
28. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. Lab Invest. 2005;85:154-9.
29. Decraene A, Willems-Widyastuti A, Kasran A, De Boeck K, Bullens DM, Dupont LJ. Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. Respir Res. 2010;11:177.
30. Devier DJ, Lovera JF, Lukiw WJ. Increase in NF-κB-sensitive miRNA-146a and miRNA-155 in multiple sclerosis (MS) and pro-inflammatory neurodegeneration. Front Mol Neurosci. 2015 Mar 2;8:5.
31. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques. 2004;37:112-4.
32. Donahoe M, Valentine VG, Chien N, Gibson KF, Raval JS, Saul M, Xue J, Zhang Y, Duncan SR. Autoantibody-Targeted Treatments for Acute Exacerbations of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. PLoS One. 2015;10(6):e0127771.
33. Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. Immunol Rev. 2008;226:80-6.
34. DuBois TM, Costabel U. Diffuse lung disease: classification and diagnostic approach. In: Gibson GJ, Geddes DM, Costabel U, *et al,* eds. Respiratory medicine. London: Elsevier Science, 2003.1545–1556.
35. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, Murray GI. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. Br J Cancer. 2008;98:426-433.
36. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F, O'Shea JJ. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. Immunity. 2010;32:605-15.
37. Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu JF. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006;290:G1067-74.
38. Ezzie ME, Crawford M, Cho JH, Orellana R, Zhang S, Gelinas R, Batte K, Yu L, Nuovo G, Galas D, Diaz P, Wang K, Nana-Sinkam SP. Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation. Thorax. 2012 Feb;67(2):122-31.
39. Facco M, Baesso I, Miorin M, Bortoli M, Cabrelle A, Boscaro E, Gurrieri C, Trentin L, Zambello R, Calabrese F, Cassatella MA, Semenzato G, Agostini C. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. J Leukoc Biol. 2007 Oct;82(4):946-55.

40. Facco M, Cabrelle A, Calabrese F, Teramo A, Cinetto F, Carraro S, Martini V, Calzetti F, Tamassia N, Cassatella MA, Semenzato G, Agostini C. TL1A/DR3 axis involvement in the inflammatory cytokine network during pulmonary sarcoidosis. Clin Mol Allergy. 2015 Aug 3;13(1):16.
41. Facco M, Cabrelle A, Teramo A, Olivieri V, Gnoato M, Teolato S, Ave E, Gattazzo C, Fadini GP, Calabrese F, Semenzato G, Agostini C. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. Thorax. 2011;66(2):144-50.
42. Farnaes L, Ditzel HJ. Dissecting the cellular functions of annexin XI using recombinant human annexin XI-specific autoantibodies cloned by phage display. J Biol Chem. 2003;278:33120-33126.
43. Fatimathas L, Moss SE. Characterisation of the sarcoidosis-associated variant of annexin A11. Gen Physiol Biophys. 2009; 28(Spec No Focus):F29-38.
44. Feghali-Bostwick CA, Wilkes DS. Autoimmunity in idiopathic pulmonary fibrosis: are circulating autoantibodies pathogenic or epiphenomena? Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(6):692-3.
45. Feng X, Zang S, Yang Y, Zhao S, Li Y, Gao X, Zhang L. Annexin A11 (ANXA11) gene polymorphisms are associated with sarcoidosis in a Han Chinese population: a case-control study. BMJ Open. 2014;4(7):e004466.
46. Fingerlin TE, Hamzeh N, Maier LA. Genetics of Sarcoidosis. Clin Chest Med. 2015;36(4):569-84.
47. Fischer A, Grunewald J, Spagnolo P, Nebel A, Schreiber S, Müller-Quernheim J. Genetics of sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med. 2014;35(3):296-306.
48. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RTPCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999;26:112-5.
49. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Cammarota G, Mirabella M, Attilio Tonali P, Batocchi AP. Increased expression of T-bet in circulating B cells from a patient with multiple sclerosis and celiac disease. Hum Immunol. 2008 Dec;69(12):837-9.
50. Gabrielsson BG, Olofsson LE, Sjögren A, Jernås M, Elander A, Lönn M, Rudemo M, Carlsson LM. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. Obes Res. 2005;13:649-52.
51. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. Nat Rev Immunol. 2009;9:556-567.
52. Garcia CK. Idiopathic pulmonary fibrosis: update on genetic discoveries. Proc Am Thorac Soc. 2011 May;8(2):158-62. doi: 10.1513/pats.201008-056MS.
53. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. Physiol Rev. 2002;82:331-371.
54. Gibejova A, Mrazek F, Subrtova D, Sekerova V, Szotkowska J, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. Expression of macrophage inflammatory protein-3 beta/CCL19 in pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Jun 15;167(12):1695-703.
55. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. Thorax. 2002;57:765-70.

56. Greene CM, Gaughan KP. microRNAs in asthma: potential therapeutic targets. Curr Opin Pulm Med. 2013 Jan;19(1):66-72.
57. Guo S, Cobb D, Smeltz RB. T-bet inhibits the in vivo differentiation of parasite-specific CD4+ Th17 cells in a T cell-intrinsic manner. J Immunol. 2009;182:6179-86.
58. Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, von Heydebreck A, Sultmann H, Fuzesi L. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. Anal Biochem. 2004,335:1-9.
59. Hanna S, Etzioni A. New host defense mechanisms against Candida species clarify the basis of clinical phenotypes. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:1433-7.
60. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection. J Immunol. 2003;170:4432-6.
61. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005;6:1123-32.
62. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. J Immunol. 2007;179:4313-7.
63. Hofmann S, Franke A, Fischer A, Jacobs G, Nothnagel M, Gaede KI, Schürmann M, Müller-Quernheim J, Krawczak M, Rosenstiel P, Schreiber S. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. Nat Genet. 2008;40:1103-6.
64. Homolka J, Altmann V, Votava V. Increasing prevalence of idiopatic pulmonary fibrosis in the Czech Republic. Chest. 1999;116(Suppl. 2): 155.
65. Horvath S. Weighted Network Analysis: Applications in Genomics and Systems Biology. Springer Science & BusinessMedia, 2011.
66. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, Dillon W, Lee KF, Clark KE, Haverty P, Weng Z, Mutter GL, Frosch MP, Macdonald ME, Milford EL, Crum CP, Bueno R, Pratt RE, Mahadevappa M, Warrington JA, Stephanopoulos G, Stephanopoulos
G, Gullans SR. A compendium of gene expression in normal human tissues. Physiol Genomics. 2001;7:97-104.
67. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. Genes Immun. 2005;6:279-84.
68. Hwang ES. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. Yonsei Med J. 2010;51:484-91.
69. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. Science. 2009;326:986-91.

70. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2005 Nov 27;33(20):e179.
71. Chen H, Xu X, Teng J, Cheng S, Bunjhoo H, Cao Y, Liu J, Xie J, Wang C, Xu Y, Xiong W. CXCR4 inhibitor attenuates allergen-induced lung inflammation by down-regulating MMP-9 and ERK1/2. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Jun 1;8(6):6700-7.
72. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. Immunol Res. 2008;41:87-102.
73. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. EMBO Mol Med. 2013 Jul;5(7):1017-34.
74. Choi ES, Pierce EM, Jakubzick C, Carpenter KJ, Kunkel SL, Evanoff H, Martinez FJ, Flaherty KR, Moore BB, Toews GB, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, Travis WD, Hogaboam CM. Focal interstitial CC chemokine receptor 7 (CCR7) expression in idiopathic interstitial pneumonia. J Clin Pathol. 2006;59:28-39.
75. Christophi GP, Caza T, Curtiss C, Gumber D, Massa PT, Landas SK. Gene expression profiles in granuloma tissue reveal novel diagnostic markers in sarcoidosis. Exp Mol Pathol. 2014 Jun;96(3):393-9.
76. Ishii T, Wallace AM, Zhang X, Gosselink J, Abboud RT, English JC, Pare PD, Sandford AJ. Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients. Eur Respir J. 2006;27:300-6.
77. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell. 2006;126:1121-33.
78. Ivanov II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. Semin Immunol. 2007;19:409-17.
79. Jazwa A, Kasper L, Bak M, Sobczak M, Szade K, Jozkowicz A, Sladek K, Dulak J. Differential inflammatory microRNA and cytokine expression in pulmonary sarcoidosis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2015 Apr;63(2):139-46.
80. Jesnowski R, Backhaus C, Ringel J, Löhr M. Ribosomal highly basic 23-kDa protein as a reliable standard for gene expression analysis. Pancreatology. 2002;2:421-4.
81. Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Stein H. T-bet expression patterns in coeliac disease, cryptic and overt enteropathy-type T-cell lymphoma. Histopathology. 2005;47:368–374.
82. Joshi AD, Fong DJ, Oak SR, Trujillo G, Flaherty KR, Martinez FJ, Hogaboam CM. Interleukin-17-mediated immunopathogenesis in experimental hypersensitivity pneumonitis. Am J Respir Crit Care Med. 2009;179:705-16.
83. Judson MA, Marchell RM, Mascelli M, Piantone A, Barnathan ES, Petty KJ, Chen D, Fan H, Grund H, Ma K, Baribaud F, Brodmerkel C. Molecular profiling and gene expression analysis in cutaneous sarcoidosis: The role of interleukin-12, interleukin-23, and the T-helper 17 pathway. J Am Acad Dermatol. 2012 Jun;66(6):901-10,910.e1-2.

84. Karge WH, Schaefer EJ, Ordovas JM. Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. Methods Mol Biol. 1998;110:43-61.
85. Katchar K, Eklund A, Grunewald J. Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis. J Intern Med. 2003;254:564–571.
86. Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. CMAJ. 2004 Jul 20;171(2):153-60.
87. Kim HS, Go H, Akira S, Chung DH. TLR2-mediated production of IL-27 and chemokines by respiratory epithelial cells promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. J Immunol. 2011;187:4007-17.
88. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. J Exp Med. 2009;206:525-34.
89. Ko FW, Lun SW, Wong CK, Szeto CC, Lam CW, Leung TF, Hui DS. Decreased T-bet expression and changes in chemokine levels in adults with asthma. Clin Exp Immunol. 2007;147:526–532.
90. Kohonen T. Self-Organizing Maps. Springer. Berlin, Germany. 2nd edition, 1997.
91. Kolek V a spolupracovníci: Sarkoidóza - známé a neznámé. Praha: Grada, 1998.
92. Kolek V. Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia in the 1981–1990. L'internista. 1995;3:105–108.
93. Kolek V. Sarkoidóza a jiné plicní granulomatózy. s.253-262 In Kolek V, Kašák V, Vašáková M a kolektiv. Pneumologie. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2011.
94. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol. 2007;19:362-71.
95. Kriegova E, Arakelyan A, Fillerova R, Zatloukal J, Mrazek F, Navratilova Z, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. BMC Mol Biol. 2008;9:69.
96. Kriegova E, Fillerova R, Tomankova T, Hutyrova B, Mrazek F, Tichy T, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J. 2011 Nov;38(5):1136-44.
97. Kropski JA, Lawson WE, Young LR, Blackwell TS. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Dis Model Mech. 2013 Jan;6(1):9-17.
98. Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Aphale A, Vatan L, Szeliga W, Wang Y, Liu Y, Welling TH, Elder JT, Zou W. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. J Immunol. 2008;181:4733-41.
99. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. Genome Res. 2009 Sep;19(9):1639-45.
100. Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A, Agrawal A, Ghosh B. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2011 Nov;128(5):1077-85.e1-10.

101. Levin AM, Iannuzzi MC, Montgomery CG, Trudeau S, Datta I, McKeigue P, Fischer A, Nebel A, Rybicki BA. Association of ANXA11 genetic variation with sarcoidosis in African Americans and European Americans. Genes Immun. 2013;14(1):13-8.
102. Lewis MD, Miller SA, Miazgowicz MM, Beima KM, Weinmann AS. T-bet's ability to regulate individual target genes requires the conserved T-box domain to recruit histone methyltransferase activity and a separate family member-specific transactivation domain. Mol Cell Biol. 2007 Dec;27(24):8510-21.
103. Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Role of miR-204 in the regulation of apoptosis, endoplasmic reticulum stress response, and inflammation in human trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 May 6;52(6):2999-3007.
104. Loštáková V, Kolek V, Vašáková M. Sarkoidóza - doporučený postup diagnostiky, terapie a sledování vývoje onemocnění- str. č1, Standardy ČPFS- Sekce pro intersticiální plicní procesy. Praha 2013.
105. Lozano-Wilhelmi M. Genetics affect IPF treatment response to N-acetylcysteine. Lancet Respir Med. 2015 Oct;3(10):752.
106. Lu TP, Lee CY, Tsai MH, Chiu YC, Hsiao CK, Lai LC, Chuang EY. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. PLoS One. 2012;7(8):e42390.
107. Lyng MB, Laenkholm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. BMC Cancer. 2008;8:20.
108. Lynch JP 3rd, Ma YL, Koss MN, White ES. Pulmonary sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med. 2007 Feb;28(1):53-74.
109. Ma L, Zhuang S. The Role of STAT 3 in Tissue Fibrosis. Curr Chem Biol. 2011;5:44-51.
110. Maertzdorf J, Weiner J 3rd, Mollenkopf HJ; TBornotTB Network, Bauer T, Prasse A, Müller-Quernheim J, Kaufmann SH. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 15;109(20):7853-8.
111. Matsuda JL, George TC, Hagman J, Gapin L. Temporal dissection of T-bet functions. J Immunol. 2007;178:3457–3465.
112. Matsuoka K, Inoue N, Sato T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kishi Y, Sakuraba A, Hitotsumatsu O, Ogata H, Koganei K, Fukushima T, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. Gut. 2004 Sep;53(9):1303-8.
113. McGrath DS, Goh N, Foley PJ, du Bois RM. Sarcoidosis: genes and microbes--soil or seed?
114. Meyer KC. The role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. Clin Chest Med. 2004;25:637-49.
115. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Kambouchner M, Valeyre D, Chapelon-Abric C, Debré P, Piette JC, Gorochov G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. J Exp Med. 2006;203:359-70.

116. Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V, Welsh KI, Vacha J, du Bois RM, Petrek M. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Löfgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. Tissue Antigens. 2005;65:163-71.
117. Mrazek F, Stahelova A, Kriegova E, Fillerova R, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. Genes Immun. 2011;12:490-4.
118. Mucida D, Salek-Ardakani S. Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces. J Allergy Clin Immunol. 2009;123:997-1003.
119. Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. Pediatr Pulmonol. 2004;37:393-9.
120. Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, Imura Y, Fujii T, Ito H, Mimori T, Matsuda S. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. PLoS One. 2013 Jul 18;8(7):e69118.
121. Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Takahashi A, Nukiwa T, Kudoh S, Ogura T, Taniguchi H, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y; Pirfenidone Clinical Study Group. A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. J Med Genet. 2008 Oct;45(10):654-6.
122. Nazarov PV, Reinsbach SE, Muller A, Nicot N, Philippidou D, Vallar L, Kreis S. Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function. Nucleic Acids Res. 2013 Mar 1;41(5):2817-31.
123. Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2009;123:986-94.
124. Nishioka Y, Manabe K, Kishi J, Wang W, Inayama M, Azuma M, Sone S. CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages. Clin Exp Immunol. 2007 Aug;149(2):317-26.
125. Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. New insights into classification and pathogenesis usher in a new era therapeutic approaches. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Sep;29(3 Suppl):S27-31.
126. Nunes H, Soler P, Valeyre D. Pulmonary sarcoidosis. Allergy. 2005;60:565-582.
127. Ohl F, Jung M, Radonic A, Sachs M, Loening SA, Jung K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. J Urol. 2006;175:1915-20.
128. Park SJ, Lee YC. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. Respir Res. 2010;11:78.
129. Petrek M, Kolek V, Szotkowska J, du Bois RM. CC and C chemokine expression in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J. 2002;20:1206–1212.
130. Petrek M, Kolek V. T-lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage in pulmonary sarcoidosis and other interstitial pulmonary diseases. Cas Lek Cesk. 1993;132(12):365-368.

131. Petrek M, Pantelidis P, Southcott AM, Lympany P, Safranek P, Black CM, Kolek V, Weigl E, du Bois RM. The source and role of RANTES in interstitial lung disease. Eur Respir J. 1997 Jun;10(6):1207-16.
132. Petzmann S, Maercker C, Markert E, Kern I, Osolnik K, Pohl W. Enhanced proliferation and decreased apoptosis in lung lavage cells of sarcoidosis patients. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2006;23:190-200.
133. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett. 2004;26:509-15.
134. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29:e45.
135. Phoon RK, Kitching AR, Odobasic D, Jones LK, Semple TJ, Holdsworth SR. T-bet deficiency attenuates renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 2008;19:477–485.
136. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. BMC Mol Biol. 2008,9:17.
137. Prado C, de Paz B, Gómez J, López P, Rodríguez-Carrio J, Suárez A. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. Rheumatology (Oxford). 2011;50:1794-801.
138. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schünemann HJ. ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:788-824.
139. Rajput C, M. Tauseef M, Yazbeck P, Thennes T, Mehta D. miR-150 prevents pulmonary inflammation by regulating Interleukin-1R associated kinase-2 downstream of focal adhesion kinase. The FASEB Journal. 2012;26:10.
140. Ramhorst R, Patel R, Corigliano A, Etchepareborda JJ, Fainboim L, Schust D. Induction of maternal tolerance to fetal alloantigens by RANTES production. Am J Reprod Immunol. 2006;56:302–311.
141. Rangarajan S, Locy ML, Luckhardt TR, Thannickal VJ. Targeted Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Where To Now? Drugs. 2016;76(3):291-300.
142. Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, Zhu Q, Jansson AF, Barboza J, Schimke LF, Leppert MF, Getz MM, Seger RA, Hill HR, Belohradsky BH, Torgerson TR, Ochs HD. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:181-7.

143. Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. J Clin Invest. 1985;75:1488-95.
144. *Rodrigues SC, Rocha NA, Lima MS, Arakaki JS, Coletta EN, Ferreira RG, Gonzaga LR, Pereira CA. Factor analysis of sarcoidosis phenotypes at two referral centers in Brazil. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2011;28:34-43.*
145. Rutherford RM, Staedtler F, Kehren J, Chibout SD, Joos L, Tamm M, Gilmartin JJ, Brutsche MH. Functional genomics and prognosis in sarcoidosis--the critical role of antigen presentation. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2004 Mar;21(1):10-8.
146. Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and whites. Am J Hum Genet. 2005;77:491-499.
147. Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. Science. 1992;258:120–2.
148. Sato H, Grutters JC, Pantelidis P, Mizzon AN, Ahmad T, Van Houte AJ. HLA-DQB1*0201: a marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002;27:406-12.
149. Semenzato G, Bortoli M, Brunetta E. Immunology and pathophysiology. In: Drent M, Costabel U, eds. Sarcoidosis. Eur Respir Mon. 2005;32:49–63.
150. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Kon S, Shibuya Y, Takahashi R, Morita-Ichimura S, Tatsuno T, Hiraga Y, Abe S, Sato N. Enhanced mRNA expression of Th1 cytokines and IL-12 in active pulmonary sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2000;17:151-7.
151. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol Biol 2006;7:33-41.
152. Simonian PL, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. Gammadelta T cells and Th17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. Transl Res. 2009;154:222-7.
153. Spagnolo P, Grunewald J, du Bois RM. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. Lancet Respir Med. 2014;2(5):416-28.
154. Spagnolo P, Grunewald J. Recent advances in the genetics of sarcoidosis. J Med Genet. 2013;50:290–297.
155. Spagnolo P, Sato H, Grunewald J, Brynedal B, Hillert J, Mañá J, Wells AU, Eklund A, Welsh KI, du Bois RM. A common haplotype of the C-C chemokine receptor 2 gene and HLA-DRB1*0301 are independent genetic risk factors for Löfgren's syndrome. J Intern Med. 2008;264:433-41.
156. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. Immunity. 2005;22:285-94.
157. Stridh H, Planck A, Gigliotti D, Eklund A, Grunewald J. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis. Thorax. 2002;57:897-901.

158. Stumhofer JS, Hunter CA. Advances in understanding the antiinflammatory properties of IL-27. Immunol Lett. 2008;117:123–130.
159. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. Biotechniques. 2000;29:332-7.
160. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell. 2000 Mar 17;100(6):655-69.
161. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. Immunol Rev. 2008;223:87-113.
162. Tomas A, Futter C, Moss SE. Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis. J Cell Biol. 2004;165:813-822.
163. Trapnell BC. Quantitative evaluation of gene expression in freshly isolated human respiratory epithelial cells. Am J Physiol. 1993;264:L199-212.
164. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Müller-Quernheim J, Schürmann M, Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. Nat Genet. 2005;37:357-364.
165. van Moorsel CH, van Oosterhout MF, Barlo NP, de Jong PA, van der Vis JJ, Ruven HJ, van Es HW, van den Bosch JM, Grutters JC. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. Am J Respir Crit Care Med. 2010 Dec 1;182(11):1419-25.
166. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002;3:RESEARCH0034.
167. Varga C, Szendi K. Carbon nanotubes induce granulomas but not mesotheliomas. In Vivo. 2010 Mar-Apr;24(2):153-6.
168. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. Scand J Immunol. 2009 Mar;69(3):268-74.
169. Vašáková M. Novinky v léčbě idiopatické plicní fibrózy. Interní Med. 2014;16(5):189–191.
170. Vašáková M. Obecná charakteristika intersticiálních plicních procesů. s. 235-244. In Kolek V, Kašák V, Vašáková M a kolektiv. Pneumologie. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2011.
171. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. Nucleic Acids Res. 2015 Jul 1;43(W1):W460-6.
172. Voorter CE, Drent M, Hoitsma E, Faber KG, van den Berg-Loonen EM. Association of HLA DQB1 0602 in sarcoidosis patients with small fiber neuropathy. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2005 Jun;22(2):129-32.

173. Voorter CE, Drent M, van den Berg-Loonen EM. Severe pulmonary sarcoidosis is strongly associated with the haplotype HLA-DQB1*0602-DRB1*150101. Hum Immunol. 2005 Jul;66(7):826-35.
174. Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. Physiol Genomics. 2000;2:143-7.
175. Watanabe M, Matsuyama W, Shirahama Y, Mitsuyama H, Oonakahara K, Noma S, Higashimoto I, Osame M, Arimura K. Dual effect of AMD3100, a CXCR4 antagonist, on bleomycin-induced lung inflammation. J Immunol. 2007 May 1;178(9):5888-98.
176. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, and Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity. 2006;24:677–688.
177. Wellek S. Testing Statistical Hypotheses of Equivalence. London: Chapman and Hall/CRC Press; 2003.
178. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, Wynn TA. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. J Exp Med. 2010;207:535-52.
179. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. Nature. 2008;454:350-2.
180. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Donq C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. J Biol Chem. 2007;282:9358-63.
181. Ye SQ, Simon BA, Maloney JP, Zambelli-Weiner A, Gao L, Grant A, Easley RB, McVerry BJ, Tuder RM, Standiford T, Brower RG, Barnes KC, Garcia JG. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:361-70.
182. Yu CR, Lee YS, Mahdi RM, Surendran N, Egwuagu CE. Therapeutic Targeting of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) Pathway Inhibits Experimental Autoimmune Uveitis. PLoS One. 2012;7:29742.
183. Zehnalova S, Kudelka M, Platos J, Horak Z. Local representatives in weighted networks. in Proceedings of the IEEE/ACM International Conference on Advances in Social Networks Analysis and Mining (ASONAM '14), pp. 870–875, IEEE, Beijing, China, August 2014.e-1.
184. Zhang X, Ding L, Sandford AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. BMC Mol Biol. 2005;6:4-11.
185. Zhang XM, Guo L, Chi MH, Sun HM, Chen XW. Identification of active miRNA and transcription factor regulatory pathways in human obesity-related inflammation. BMC Bioinformatics. 2015 Mar 7;16:76.
186. Zhao L, Leung JK, Yamamoto H, Goswami S, Kheradmand F, Vu TH. Identification of P311 as a potential gene regulating alveolar generation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006;35:48-54.
187. Zhou W, Wang Y. Candidate genes of idiopathic pulmonary fibrosis: current evidence and research. Appl Clin Genet. 2016;9:5-13.

188. Ziegenhagen MW, Rothe ME, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. Eur Respir J 2003; 21: 407–413.
189. Zissel G, Prasse A, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis-immunopathogenetic concepts. Semin Respir Crit Care Med. 2007;28:3–14.
190. Zurkova M, Kolek V, Tomankova T, Kriegova E. Extrapulmonary involvement in patients with sarcoidosis and comparison of routine laboratory and clinical data to pulmonary involvement. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014 Dec;158(4):613-20.

9. Seznam publikací a abstrakt

V této kapitole je uveden seznam publikací a souhrnů vzniklých v průběhu doktorského studia.

9.1 Publikace v časopisech s IF

1. Schneiderova P, Pika T, Gajdos P, **Fillerova R**, Kromer P, Kudelka M, Minarik J, Papajik T, Scudla V, Kriegova E. Serum protein fingerprinting by PEA immunoassay coupled with a pattern-recognition algorithms distinguishes MGUS and multiple myeloma. Oncotarget. 2016;5. (IF2016: 5,008)
   Práce oceněna Cenou děkana LF UP 2016.

2. Jarosova M, Kriegova E, Schneiderova P, **Fillerova R**, Prochazka V, Mikesova M, Flodr P, Indrak K, Papajik T. A Novel Non-Immunoglobulin (non-Ig)/BCL6 Translocation in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Involving Chromosome 10q11.21 Loci and Review on Clinical Consequences of BCL6 Rearrangements. Pathol Oncol Res. 2016 Apr;22(2):233-43. (IF2016: 1,940)

3. *Dyskova T†, **Fillerova R†**, Novosad T, Kudelka M, Zurkova M, Gajdos P, Kolek V, Kriegova E. Correlation Network Analysis Reveals Relationships between MicroRNAs, Transcription Factor T-bet, and Deregulated Cytokine/Chemokine-Receptor Network in Pulmonary Sarcoidosis. Mediators Inflamm. 2015;2015:121378. (IF2015: 3,236)
   †Autoři se podíleli stejným dílem, pořadí autorů řazeno abecedně
   Práce oceněna Cenou děkana LF UP 2015.

4. Tománková T, Kriegová E, **Fillerová R**, Lužná P, Ehrmann J, Gallo J. Low expression of TLR-1, -2, -4 and IL-2, -2R, -10, -10R and TGF-β1 in pseudosynovial tissue collected at revision total knee arthroplasty for aseptic loosening. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2015;82(1):67–75. (IF2015: 0,388)

5. Pizova K, Bajgar R, **Fillerova R**, Kriegova E, Cenklova V, Langova K, Konecny P, Kolarova H. C-MYC and C-FOS expression changes and cellular aspects of the photodynamic reaction with photosensitizers TMPyP and ClAlPcS2. J Photochem Photobiol B. 2015 Jan;142:186-96. (IF2015: 3,188)

6. Tomankova T, Kriegova E, **Fillerova R**, Luzna P, Ehrmann J, Gallo J. Comparison of periprosthetic tissues in knee and hip joints: differential expression of CCL3 and DC-STAMP in total knee and hip arthroplasty and similar cytokine profiles in

primary knee and hip osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 2014;22(11):1851-60. (IF2014: 4,165)
Práce oceněna Cenou děkana LF UP 2014.

7. Musova Z, Kaiserova M, Kriegova E, **Fillerova R**, Vasovcak P, Santava A, Mensikova K, Zumrova A, Krepelova A, Sedlacek Z, Kanovsky P. A novel frameshift mutation in the AFG3L2 gene in a patient with spinocerebellar ataxia. Cerebellum. 2014;13(3):331-7. (IF2014: 2,717)

8. Manukyan G, Petrek M, Kriegova E, Ghazaryan K, **Fillerova R**, Boyajyan A. Activated phenotype of circulating neutrophils in familial Mediterranean fever. Immunobiology. 2013 Jun;218(6):892-8. (IF2013: 3,180)

9. *****Mrazek F, Stahelova A, Kriegova E, **Fillerova R**, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. Genes Immun. 2011 Sep;12(6):490-4. (IF2011: 3,872)

10. *****Kriegova E, **Fillerova R**, Tomankova T, Hutyrova B, Mrazek F, Tichy T, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. Th1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J. 2011;38(5):1136-44. (IF2011: 5,895)
Práce oceněna Cenou děkana LF UP 2011.

11. *****Kriegova E, Arakelyan A, **Fillerova R**, Zatloukal J, Mrazek F, Navratilova Z, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. BMC Mol Biol. 2008 Jul 31;9:69. (IF2008: 2,810)

12. Mrazek F, Kvezereli M, Garr E, Kubistova Z, Kriegova E, **Fillerova R**, Arakelyan A, Ruven HJ, Drabek J, van den Bosch JM, Kolek V, Welsh KI, Grutters JC, du Bois RM, Petrek M. Complement receptor 1 single nucleotide polymorphisms in Czech and Dutch patients with sarcoidosis. Tissue Antigens. 2008;71(1):77-80. (IF2008: 2,076)

* Publikace vztahující se k disertační práci.

9.2 Publikace v časopisech bez IF

1. ***Fillerová R**, Dýšková T, Žurková M, Kolek V, Kriegová E. Chemokinové receptory a perspektivy jejich terapeutického využití u idiopatické plicní fibrózy na základě výsledků studií na zvířecích modelech. Stud Pneumol Phthiseol. 2016;76(4):135-141.

2. Lošťáková V, Kolek V, Petřek M, Bartová R, Losse S, **Fillerová R**. Klinické hodnocení a srovnání toberkulinového kožního testu (TST) s metodami IGRA (T-SPOT.*TB* a Quantiferon-TB Gold) u pacientů s podezřením na tuberkulózní infekci. Stud Pneumol Phthiseol. 2013;73(3):118-123.

9.3 Manuskripty v recenzním řízení/před zasláním

1. **Fillerova R**, Gallo J, Radvansky M, Kraiczová V, Kudelka M, Kriegova E. Excellent diagnostic characteristics for ultra-fast gene profiling of DEFA1-IL1B-LTF in the detection of prosthetic joint infections.

2. **Fillerova R**, Gregorova P, Zurkova M, Dyskova T, Lostakova V, Tichy T, Kolek V, Kriegova E. Polymorphism ANXA11 rs1049550 affects the formation of granulomas in sarcoidosis.

3. **Fillerova R**, Tomankova T, Zurkova M, Tichy T, Kolek V, Kriegova E. Expression profiling of Th17 cell activators revealed elevation of STAT3 in progressing sarcoidosis.

9.4 Abstrakta v časopisech s IF

1. **Fillerova R**, Ordeltova M, Mrazek F, Zurkova M, Kolek V, Kriegova E. Is functional variant of ANXA11 R230C associated with impaired apoptosis? European Journal of Human Genetics 2013, Vol. 21, Suppl. 2, P09/21.
   (European Human Genetics Conference 2013, Paris, France, June 8-11, 2013)

2. Tomankova T, **Fillerova R**, Zurkova M, Kolek V, Petrek M, Kriegova E. Progressing sarcoidosis is associated with the upregulated expression of interleukin (IL)-23 and its receptor IL-23R. ERS Abstract book 2012; PP158.
   (10th ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal, March 30 – April 1, 2012)

3. **Fillerova R**, Mrazek F, Zurkova M, Kolek V, Petrek M, Kriegova E. Is functional variant of ANXA11 R230C associated with impaired apoptosis? Pilot data. European respiratory Journal 2012; Vol. 40, Suppl. 56, P777.
   (European Respiratory Society, Annual Congress, Vienna, Austria, September 1-5, 2012)

4. **Fillerova R**, Kriegova E, Mrazek F, Stahelova A, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Expression of ANXA11 gene in patiens with sarcoidosis is not associated with

sarcoidosis susceptibility marker ANXA11 R230C. Tissue antigens, immune response genetics 2011; Vol. 77, Number 5, May 2011, P256.
(25th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference Prague, Czech Republic May 4-7, 2011)

5. **Fillerova R**, Kriegova E, Tomankova T, Mrazek F, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Expression profiling of Th17 cell activators revealed elevation of STAT-3 in progressing sarcoidosis. European respiratory Journal 2011, abstracts - Vol. 38, Suppl. 55, P4762.
(European Respiratory Society, Annual Congress, Amsterdam, The Netherlands, September 24-28, 2011)

6. Kriegova E, Tomankova T, **Fillerova R**, Zurkova M, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. miRNA profiling in pulmonary sarcoidosis – pilot data. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:A3527.
(American Thoracic Society 2011 International Conference, Denver, Texas, May 13-18, 2011)

7. **Fillerova R**, Kriegova E, Tomankova T, Mrazek F, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Expression profiling of Th17 cell activators revealed elevation of STAT-3 in progressing sarcoidosis. Eur Respir J. 2011;38(Suppl. 5):870s.

8. Tomankova T, **Fillerova R**, Zurkova M, Kolek V, Petrek M, Kriegova E. Upregulation of IL-23R is associated with progressing sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2011;28(Suppl. 1):10.
(2nd joint Meeting of WASOG and the International Conference on BAL, Maastricht, Netherlands, June 15-18, 2011)

9. **Fillerova R**, Kriegova E, Tomankova T, Kolek V, Petrek M. Role of Th17 cells in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J. 2010;36(Suppl.54):3431.
(European Respiratory Society, Annual Congress, Barcelona, Spain, September 18-22, 2010)
Abstract selected for Oral Presentation

10. Tomankova T, **Fillerova R**, Mrazek F, Zurkova M, Kolek V, Petrek M, Kriegova E. Expression profile of Th1/Th2 transcription factors T-bet and GATA-3 in sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2010;36(Suppl.54):E5224.
(European Respiratory Society, Annual Congress, Barcelona, Spain, September 18-22, 2010)

11. Kriegova E, **Fillerova R**, Tomankova T, Mrazek F, Zurkova M, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. CCL7, CCL8 and CCL13 are augmented during the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:A5747.

(American Thoracic Society 2010 International Conference, New Orleans, Louisiana, May 14-19, 2010)

12. Kriegova E, **Fillerova R**, Arakelyan A, Mrazek F, Tomankova T, Hutyrova B, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. Up-regulated T-bet in sarcoidosis is associated with the modulation of IL-2R/15R beta chain (CD122). Eur J Immunol 2009;39(Suppl.1):S218.
(2nd European Congress of Immunology, September 13-16, 2009, Berlin, Germany)

9.5 Abstrakta v časopisech bez IF

1. Schneiderová P, Pika T, Gajdoš P, **Fillerová R**, Krömer P, Kudělka M, Minařík J, Papajík T, Ščudla V, Kriegová E. Studium sérových proteinových profilů u monoklonální gamapatie nejasného významu a mnohočetného myelomu. Transfuze a hematologie dnes 2016: 22 (suplementum):102-103.(XXX. Olomoucké hematologické dny, 29.-31.5.2016)
Oceněno: nejlepší poster

2. Manukyan G, Papajík T, Gregorová P, **Fillerová R**, Urbanová R, Jarošová M, Jiskrová E, Turcsányi P, Procházka V, Kriegová E. Profilování chemokinových receptorů u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií. Transfuze a hematologie dnes 2016: 22 (suplementum):126. (XXX. Olomoucké hematologické dny, 29.-31.5.2016)

3. Kriegová E, Schneiderová P, Jarošová M, Procházka V, **Fillerová R**, Jiskrová E, Urbanová R, Papajík T. Detekce mutací v TP53 genu u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií pomocí sekvenování nové generace. Transfuze a hematologie dnes 2016: 22 (suplementum):90. (XXX. Olomoucké hematologické dny, 29.-31.5.2016)

4. **Fillerová R**, Petráčková A, Radvanský M, Kudělka M, Gallo J, Kriegová E. Využití ultrarychlé kvantitativní QRT-PCR k detekci infekce v periprotetické tkáni. Alergie 2016:18(1):86. (XXXIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 12.-15.10.2016, Plzeň)

5. Schneiderová P, Pika T, Gajdoš P, **Fillerová R**, Krömer P, Kudělka M, Minařík J, Papajík T, Ščudla V, Kriegová E. Srovnání komplexních sérových proteinových profilů u mnohočetného myelomu a jeho prekurzorového stadia monoklonální gamapatie nejasného významu. Alergie 2016:18(1):106. (XXXIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 12.-15.10.2016, Plzeň)
Oceněno: 3. nejlepší poster v sekci Onkoimunologie

6. Tománková T, **Fillerová R**, Schneiderová P, Žurková M, Lošťáková V, Kolek V, Kriegová E. Multiplexová analýza sérových proteinových profilů u pacientů s IPF-UIP, sarkoidózou a zdravých jedinců. Alergie 2014:16(2):73.
   (XXXI. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 15.-18.10.2014, Ostrava)

7. **Fillerová R**, Tománková T, Čapková Z, Gallo J, Kriegová E. Srovnání expresních profilů pro-zánětlivých a osteoklatogenních cytokinů u časných a pozdních stádií periprotetické osteolýzy u totální endoprotézy kyčelního kloubu. Alergie 2014:16(2):81.
   (XXXI. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 15.-18.10.2014, Ostrava)

8. Schneiderová P, **Fillerová R**, Tománková T, Mrázek F, Gallo J, Kriegová E. Vliv funkčních polymorfismů ovlivňujících sérové hladiny zánětlivých markerů na riziko komplikací umělých kloubních náhrad. Alergie 2014:16(2):83.
   (XXXI. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 15.-18.10.2014, Ostrava)

9. Kriegová E, Schneiderová P, Pika T, Tománková T, **Fillerová R**, Minařík J, Ščudla V. Přínos multivariantní analýzy sérových proteinových profilů u pacientů s monoklonální gamapatií nejistého významu a mnohočetného myelomu. Alergie 2014:16(2):43.
   (XXXI. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 15.-18.10.2014, Ostrava)

10. **Fillerová R**, Mrázek F, Žurková M, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. Studium vlivu funkčního polymorfismu v genu pro ANNEXIN A11 (ANXA11 R230C) na apoptózu periferních buněk u pacientů s plicní sarkoidózou-pilotní studie. Alergie 2012:14(2):P1/05.
    (XXIX. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, 10.-13.10.2012, Liberec)

11. Tomanková T, **Fillerová R**, Žurková M, Mrázek F, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. Zvýšená exprese receptoru pro interleukin (IL)-23 je asociována s progredující sarkoidózou. Alergie 2012:14(2):63.
    (XXIX. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, 10.-13.10.2012, Liberec)

12. **Fillerová R**, Tománková T, Žurková M, Tichý T, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. Zvýšená exprese Th1 transkripčního faktoru T-bet u sarkoidózy je asociována s expresí cytokinů/receptorů asociovaných s tímto onemocněním. Studia Pneumologica et Phthiseologica 2011:Supl.:112.

(XVII. Kongres české a slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Plzeň, 23.-25.6.2011)

13. **Fillerová R**, Kriegová E, Tománková T, Mrázek F, Žurková M, Kolek V, Petřek M. Expresní profil aktivátorů Th17 buněk u plicní sarkoidózy. Klinická imunológia a alergológia 2011;21(3):21.
(XXVIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Košice 19.-22. října 2011)

14. Tománková T, **Fillerová R**, Mrázek F, Žurková M, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. Srovnání expresních profilů Th1/Th2 transkripčních faktorů T-bet a GATA-3 u sarkoidózy, idiopatické plicní fibrózy a chronické obstrukční plicní nemoci. Alergie 2010;12(1 Suppl.):80.
(XXVII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc 6.-9. října 2010)

15. Kriegová E, **Fillerová R**, Tománková T, Mrázek F, Žurková M, Kolek V, Petřek M. Změny v expresním profilu chemokinů CCL7, CCL8 a CCL13 u pacientů s různou klinickou manifestací plicní sarkoidózy. Alergie 2010;12(1 Suppl.):71.
(XXVII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc 6.-9. října 2010)

16. Tomankova T, **Fillerova R**, Mrazek F, Navratilova Z, Zurkova M, Kolek V, Petrek M, Kriegova E. Involvement of Th1 transcription factor T-bet and Th2 transcription factor GATA-3 in interstitial lung diseases. Biological Journal of Armenia 2010;LXII(Suppl.1):105-109.
(International young scientists conference: Perspectives for development of molecular and cellular biology II, Yerevan, Armenia, November 10-12, 2010)

17. Kriegová E, **Fillerová R**, Tománková T, Mrázek F, Hutyrová B, Kolek V, du Bois RM, Petřek M. Zvýšená exprese T-bet u sarkoidózy je asociována s modulací exprese chemokinů CCL5 a CXCL10 a receptorů CXCR3 a CXCR6. Klinická imunológia a alergológia 2009;19(3):31.
(XXVI. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Žilina 28.-31. října 2009)

9.6 Abstrakta ve sbornících

1. **Fillerova R**, Petrackova A, Gajdos P, Kudelka M, Gallo J, Kriegova E. Utility of Toll-like receptor pattern as biomarkers for deep joint infection in total joint arthroplasty. Aegean Conferences Series vol. 98:101. (6th International

Conference on Osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems, June 17-22, 2016, Crete)

2. **Fillerova R**, Gregorova P, Zurkova M, Tichy T, Lostakova V, Kolek V, Kriegova E. In vitro functional study of the effect of polymorphism ANXA11 rs1049550 on the formation of granulomas. Abstract book, p.102, P.B.06.04.
   (4th European Congress of Immunology, September 6-9, 2015, Vienna, Austria)

3. Dyskova T, Gallo J, Schneiderova P, **Fillerova R**, Kriegova E. Immune-related protein signature in pseudosynovial tissue from patients with various stages of periprosthetic osteolysis in total knee arthroplasty. Abstract book, p.494, P.B.37.14.
   (4th European Congress of Immunology, September 6-9, 2015, Vienna, Austria)

4. Dyskova T, **Fillerova R**, Novosad T, Tiscordio SB, Zurkova M, Kolek V, Kriegova E. Progressing sarcoidosis is associated with altered miRNA profile in bronchoalveolar (BAL) cells obtained from sarcoidosis patients. Abstract book, p.545, P.C.24.08.
   (4th European Congress of Immunology, September 6-9, 2015, Vienna, Austria)

5. **Fillerova R**, Dyskova T, Schneiderova P, Zurkova M, Lostakova V, Kolek V, Kriegova E. CXCL11 and IL-17 in bronchoalveolar lavage fluid and TGF-beta, TNF and CD69 in serum reflect severity and progression in sarcoidosis. Abstract book, p.382, P.D.17.05.
   (4th European Congress of Immunology, September 6-9, 2015, Vienna, Austria)

6. Schneiderová P, Jarošová M, **Fillerová R**, Dýšková T, Procházka V, Urbanová R, Papajík T, Kriegová E. Detekce klonální heterogenity u chronické lymfocytární leukemie pomocí hlubokého sekvenování nové generace. Sborník abstrakt OHD, str. 20.
   (XXIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 31.5.-2.6.2015, Olomouc)

7. Tomankova T, Gallo J, Schneiderova P, **Fillerova R**, Kriegova E. High Protein Levels Of Amphiregulin, STNFR2, B-Cell Activating Factor (BAFF), And Kallikrein-6 In Pseudosynovial Tissue From Patients With Aseptic Loosening In TKA. Abstract book (16th EFORT Congress, May 27-29, 2015, Prague)

8. Tománková T, **Fillerová R**, Schneiderová P, Žurková M, Lošťáková V, Kolek V, Kriegová E. Stanovení sérových proteinových profilů u pacientů s IPF-UIP, sarkoidózou a zdravých jedinců pomocí nové, vysoce senzitivní multiplexové analýzy. Sborník abstrakt str. 109.
   (II. Kongres České pneumologické a ftizeologické společnosti ČLS JEP, 18.-20.9.2014, Olomouc)

Poster awarded: Best poster Award 1st place

9. **Fillerová R**, Tománková T, Schneiderová P, Žurková M, Lošťáková V, Kolek V, Kriegová E. Lze využít proteinových profilů v séru a bronchoalveolární tekutině k predikci vývoje onemocnění u sarkoidózy? Sborník abstrakt str. 34.
   (II. Kongres České pneumologické a ftizeologické společnosti ČLS JEP, 18.-20.9.2014, Olomouc)

10. Kriegová E, **Fillerová R**, Schneiderová P, Čapková Z, Tománková T. Přehled současných metod k detekci genových variant u plicních nemocí. Sborník abstrakt str. 58.
    (II. Kongres České pneumologické a ftizeologické společnosti ČLS JEP, 18.-20.9.2014, Olomouc).

11. Gallo J, Tomankova, T, **Fillerova, R**, Kriegova E. Low Expression Of TLR-1, -2, -4 And IL-2, -2R, -10, -10R In Pseudosynovial Tissues Obtained From Aseptically Failed Total Hip And Knee Arthroplasty. Poster session 1.
    (European Federation of National Associations of Orthopaedics and Tramatology EFORT 15th Congress, June 4-6, 2014, London, UK)
    Poster awarded: Jacques Duparc Award

12. Tomankova T, **Fillerova R**, Schneiderova P, Zurkova M, Lostakova V, Kolek V, Kriegova E. Multiplex protein profiling in serum of patients with IPF-UIP, sarcoidosis and healthy controls. Abstract book, poster nr.21.
    (Fibrosing Interstitial Lung Diseases of Idiopathic and Exogenous Origin. Phenotype Approach. June 19-21, 2014, Prague)
    Poster awarded: Best poster Award 1st place

13. **Fillerova R**, Tomankova T, Schneiderova P, Zurkova M, Lostakova V, Kolek V, Kriegova E. Protein levels of CXCL11 and IL-17 in bronchoalveolar lavage fluid and TGF-beta, TNF and CD69 in serum reflect severity and progression in sarcoidosis. Abstract book, poster nr.3.
    (Fibrosing Interstitial Lung Diseases of Idiopathic and Exogenous Origin. Phenotype Approach. June 19-21, 2014, Prague)

14. **Fillerova R**, Tomankova T, Capkova Z, Kriegova E, Gallo J. Upregulation of TNF, NF-kB, and CCL18 in periprosthetic tissues from early revisions in stable implants comparing to tissues from aseptically loosened total hip arthroplasty. Abstract book, P5.2.
    (European Orthopaedic Research Society EORS, 22nd Annual Meeting, July 2-4, 2014, Nantes, France)

15. **Fillerova R,** Schneiderova P, Tomankova T, Mrazek F, Gallo J, Kriegova E. Do genes influencing pro-inflammatory molecules (IL-6, CCL2/MCP-1, CRP) affect the prosthesis failure? – A pilot study. Abstract book, P5.3.
(European Orthopaedic Research Society EORS, 22nd Annual Meeting, July 2-4, 2014, Nantes, France)

16. **Fillerova R**, Tomankova T, Luzna P, Ehrmann J, Kriegova E, Gallo J. Low expression of TLR-1, -2, -4 and IL-2, -2R, -10, -10R in pseudosynovial tissues obtained from aseptically failed total hip and knee arthroplasty. Abstract book, P9.2 (http://www.cors2013.org/abstracts.php)
(8 th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies (CORS 2013), Venice, Italy, 13-16 October 2013)

17. **Fillerova R**, Zurkova M, Mrazek F, Kolek V, Petrek M, Kriegova E. Influence of ANXA11 genotype on sensitivity of peripheral blood mononuclear cells to apoptosis in sarciodosis and its phenotypes. Book of abstract, P4/004.
(Symposium Chronic Inflammatory Disorders of The Lung, Freiburg, Germany, September 28-29, 2012)

18. Tománková T, **Fillerová R**, Žurková M, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. MiRNA expresní profil u plicní sarkoidózy. Sborník abstrakt, 978-80-244-2847-5:56-57.
(Konference vědeckých prací studentů DSP 2011, 6.-7.9.2011, LF UP Olomouc)
Oral presentation awarded: 2nd Place

19. **Fillerová R**, Tománková T, Žurková M, Tichý T, Kolek V, Petřek M a Kriegová E. Zvýšená exprese Th1 stranskripčního faktoru T-bet u sarkoidózy je asociována s expresí cytokinů/receptorů asociovaných s tímto onemocněním. Studia pneumologica et phthiseologica Suplement.
(XVII. Kongres české a slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Plzeň, 23.-25.6.2011)

20. Tománková T, **Fillerová R**, Žurková M, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. Úloha mikroRNA v patogenezi plicních onemocnění. Sborník abstrakt, 978-80-244-2862-8:26.
(XX. Movavskoslezské dny pneumologie, Olomouc 7.-8. října 2011)

21. Tománková T, **Fillerová R**, Žurková M, Kolek V, Petřek M, Kriegová E. Zvýšená exprese T-bet u sarkoidózy je asociována s modulací exprese interferonu gamma a chemokinového receptoru CXCR3. Sborník abstrakt, 978-80-244-2562-7:68-69.
(Konference vědeckých prací studentů DSP 2010, 7.-8.9.2010, LF UP Olomouc)

22. Tománková T, Kriegová E, **Fillerová R**, Mrázek F, Gallo J, Petřek M. Changes in gene expression profiles of cytokines MIF and RANKL in periprosthetic tissues

obtained during revision of total hip/knee arthroplasty. Aegean Conferences Series - Vol. 49, Programme and abstracts, page 99.
(3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal System, June 20-25, 2010, Fira, Santorini, Greece)

23. Tománková T, Kriegová E, **Fillerová R**, Kolek V, Petřek M. Zvýšená exprese Th1 transkripčního faktoru T-bet u plicní sarkoidózy. Sborník abstrakt, 978-80-244-2330-2:66-67.
(Konference vědeckých prací studentů DSP 2009, 8.-9.9.2009, LF UP Olomouc)

9.7 Souhrn publikačních aktivit během Ph.D. studia

	Počet
Publikace v časopisech s IF (celkový impact faktor)	12 (**38,475**)
Publikace v časopise bez IF	2
Manuskripty v recenzním řízení/před zasláním	3
Abstrakta v časopisech s IF	12
Abstrakta v časopisech bez IF	17
Abstrakta ve sbornících	23
Celkový počet citací (Web of Science, ke dni 4.4.2017)	**181**