

Imunologický ZPRAVODAJ

VYDÁVÁ ČESKÁ IMUNOLOGICKÁ SPOLEČNOST, Z. S.

WWW.BIOMED.CAS.CZ/CIS/



Česká imunologická
společnost

Ročník XXXIII (XLVII)

Číslo 1-2, 2018

Imunologický zpravodaj vydává Česká imunologická společnost, z. s.
jako informační bulletin pro členy společnosti s finanční podporou Akademie věd ČR

Redakční rada: RNDr. Jiřina Bártová, CSc.
Jindřiška Emmerová
prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.
prof. MUDr. Helena Tlaskalová-Hogenová, DrSc.
prof. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.

Grafická úprava a sazba: Bohuslav Šír

Adresa: Česká imunologická společnost, z. s.
Víteňská 1083, 142 20 Praha 4
cis@biomed.cas.cz

www.biomed.cas.cz/cis

Příspěvky do IZ přijímáme na adrese: cis@biomed.cas.cz

Příspěvky nebyly jazykově upraveny.

Imunologický zpravodaj je evidován u Ministerstva kultury ČR pod číslem MK ČR E 11167

ISSN 2533-6606

Obsah

Zápis z jednání výboru České imunologické společnosti, z. s., 7. 12. 2017	1
Zápis z Valného shromáždění České imunologické společnosti, z. s., 7. 12. 2017	3
Zápis z jednání výboru České imunologické společnosti, z. s., 26. 4. 2018	4
Ceny ČIS, z. s., za rok 2016 byly předané 7. prosince 2017 u příležitosti Valného shromáždění ČIS, z. s.	6
Vzpomínka na profesora Iva Hánu.....	8
13th Host Pathogen Interaction Forum 2018.....	10
Zpráva o hospodaření	12
Zveme na zajímavé akce v roce 2018	12
Den imunologie 2018.....	13
Role nových profibrotických molekul v patogenezi systémové sklerodermie	
Ing. Barbora Šumová	18
Study of extracellular placental specific microRNAs in maternal circulation and their utilization in clinical diagnostics of pregnancy-related complications	
Mgr. Kateřina Kotlabová.....	29
Vývoj metod k určení proteinového profilu maligních i nemaligních krevních buněk	
Mgr. Daniela Kužílková	45
Terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk v myším experimentálním modelu	
Mgr. Michaela Hájková	56

Zápis z jednání výboru České imunologické společnosti, z. s., 7. 12. 2017

Prezenční listina je součástí tohoto zápisu.

1. Prof. B. Říhová přivítala přítomné a informovala o tom, že prof. I. Hána 29. listopadu 2017 zemřel. Sdě-
lila, že jménem společnosti byl rodině zaslán kondolenční dopis. Rovněž oznámila, že za ČIS, z. s., byla
na pohřeb poslána kytice.

2. Prof. B. Říhová informovala o rozhodnutí odborných komisí o udělení Cen ČIS, z. s., za články publiko-
vané v r. 2016.

• Cena Jaroslava Šterzla:

1. cena

- Ondřej Ballek, Jan Valečka, Martina Dobešová, Adéla Broučková, Jasper Manning, Pavel Řehulka, Jiří Stulík, Dominik Filipp „TCR Triggering Induces the Formation of Lck-RACK1-Actinin-1 Multiprotein Network Affecting Lck Redistribution“, *Frontiers in Immunology*. 2016, 7: 1–16

2. cena

- Stepan Coufal, Alena Kokesova, Helena Tlaskalova-Hogenova, Jiri Snajdauf, Michal Rygl, Miloslav Kverka „Urinary Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Can Distinguish Necrotizing Enterocolitis from Sepsis in Early Stage of the Disease“, *Journal of Immunology Research*. 2016, Article ID 5727312: 1–8

Finanční odměny poskytl nadační fond Homunkulus.

• Cena Milana Pospíšila a Maria Campy:

1. cena byla udělena za dva články:

- Jitka Fucikova, Iva Truxova, Michal Hensler, Etienne Becht, Lenka Kasikova, Irena Moserova, Sarka Vosahlikova, Jana Klouckova, Sarah E. Church, Isabelle Cremer, Oliver Kepp, Guido Kroemer, Lorenzo Galluzzi, Cyril Salek, Radek Spisek „Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients“, *Blood*. 2016, 128(26): 3113–3124;

- Jitka Fucikova, Etienne Becht, Kristina Iribarren, Jeremy Goc, Romain Remark, Diane Damotte, Marco Alifano, Priyanka Devi, Jerome Biton, Claire Germain, Audrey Lupo, Wolf Herve Fridman, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Guido Kroemer, Catherine Sautes-Fridman, Isabelle Cremer „Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis“, *Cancer Research*. 2016, 76(7): 1746–1756;

2. cena

- Barbora Tomalova, Milada Sirova, Pavel Rossmann, Robert Pola, Jiri Strohalm, Petr Chytil, Viktor Cerny, Jakub Tomala, Martina Kabesova, Blanka Rihova, Karel Ulbrich, Tomas Etrych, Marek Kovar „The structure-dependent toxicity, pharmacokinetics and anti-tumour activity of HEMA copolymer conjugates in the treatment of solid tumours and leukaemia“, *Journal of Controlled Release*. 2016, 223: 1–10.

Finanční odměny poskytl Fondazione Arpa, Pisa, Itálie.

3. Prof. Říhová přítomné seznámila s odpoledním programem Valného shromáždění ČIS, z. s., které se dle stanov koná pravidelně každý rok:

- zahájení Valného shromáždění;
- předání Cen ČIS;
- vystoupení pěveckého kroužku Větrník ze ZŠ v Kunraticích;
- pravidelný čtvrtletní seminář ČIS (doc. Slavčev, IKEM);
- poté bude v souladu se stanovami a jednacím řádem Valné shromáždění společnosti pokračovat;
- zprávu o hospodaření a činnosti ČIS, z. s., za minulé období přečte dr. M. Kverka.

4. Dr. Kverka, hospodář společnosti uvedl, že někteří členové dosud nezaplatili členské příspěvky a doporučil jim odeslat e-mail s žádostí, aby si ověřili číslo účtu, na které se příspěvky od června 2016 posílají (č. ú. 2901016930/2010).
Dále výbor informoval o konferenci „Food, Microbiota and Immunity“, která se začátkem června konala v Třešti; byla finančně podpořena EFIS (European Federation of Immunological Societies) a nadací Homunkulus.
5. Den imunologie 2018 – navržený termín 26. 4. 2018 byl schválen. S hlavní odpolední přednáškou vystoupí RNDr. M. Schwarzer, Ph.D., oslovený na základě úspěšné publikace v časopise Science. Dopoledne vystoupí čerství nositelé cen ČIS, z. s.
Dr. Hrdý, t. č. na stáži v USA, se elektronicky dotázal na možnost zařazení přednášky doc. Z. Hela, působícího v USA. K tomuto bodu proběhla diskuze se závěrem přednášku nezařazovat a nabídnout termín v programu pravidelných seminářů ČIS.
6. Předsedkyni společnosti, prof. B. Říhovou, oslovil Mgr. Tomáš Raboch z agentury Guarant International, s. r. o., s dotazem, zda by se v r. 2024 mohl kongres ECI uspořádat v ČR. Byl pozván na jednání výboru, ale pro nenadálou změnu v pracovním programu se z tohoto jednání omluvil. Nicméně diskuze k dotazu proběhla s následujícím závěrem: Mgr. Tomáš Raboch pošle výboru ČIS konkrétní plán, o kterém se bude diskutovat na dalším jednání výboru, které se uskuteční při příležitosti Dne imunologie 26. dubna 2018.
7. EFIS (European Federation of Immunological Societies) vyzvala dopisem ze 17. listopadu 2018 členské imunologické společnosti k zaslání stanoviska týkajícího se účasti na ECI (European Congress of Immunology) v Istanbulu v roce 2021, a to do 15. prosince 2017.
Tato výzva vzešla ze stanovisek několika imunologických společností, které z bezpečnostních důvodů účast na kongresu odmítly. Dopis EFIS i vyjádření Turecké imunologické společnosti jsou přílohou tohoto zápisu.
O výzvě se diskutovalo a poté hlasovalo. Pro konání kongresu v Turecku v roce 2021 nebyl nikdo z přítomných členů výboru ČIS. Nikdo se hlasování nezdržel. Tento výsledek byl EFIS oznámen.
8. Semináře na I. pololetí 2018 jsou připraveny, prof. B. Říhová přečetla přehled.
Důležitá je návštěvnost seminářů, která však bohužel není příliš velká. Opět se diskutovalo o možnosti vrátit semináře do zasedací místnosti imunologie (28 míst) v budově C Mikrobiologického ústavu. Nakonec byl potvrzen závěr, který byl výsledkem ankety v roce 2016, že důstojnějším a vhodnějším místem pro konání seminářů zůstává kinosál FGÚ AV ČR, v. v. i.

Diskutovala se také propagace seminářů:

- upoutávku umísťovat na obrazovku u vchodu do budovy A;
- možnost k pozvánce přikládat abstrakt přednášky.

Dr. L. Vannucci navrhl, že s ohledem na zahraniční studenty a pracovníky by semináře mohly být v angličtině. U přednášek v angličtině se předpokládá větší účast. O tom, v jakém jazyce přednáška bude, si rozhodne přednášející. Preferovány budou přednášky v angličtině. Název přednášky v konečném seznamu bude uveden v jazyce, ve kterém bude přednáška prezentována.

Zápis z Valného shromáždění České imunologické společnosti, z. s., 7. 12. 2017

Prezenční listina je součástí tohoto zápisu.

1. Valné shromáždění zahájila předsedkyně společnosti prof. B. Říhová. Konstatovala, že není přítomna nadpoloviční většina členů České imunologické společnosti, a proto bylo dle Stanov pokračování shromáždění odloženo o jednu hodinu. Po uplynutí jedné hodiny další jednání Valného shromáždění pokračovalo.
2. MUDr. Kverka, hospodář společnosti, přednesl Zprávu o hospodaření a činnosti ČIS, z. s., za rok 2017.
 - 2.1. Hospodaření společnosti – viz příloha.
 - 2.2. Společnost poskytla záštitu 19. ročníku „Colours of Sepsis“ (7.–10. února 2017, Clarion Congress Hotel Ostrava) a 5. mezinárodní konferenci Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CL-TIM), 24.–27. dubna 2017, Praha.
 - 2.3. Světový Den imunologie 2017 se konal místo v tradičním termínu v pátek 29. 4. ve čtvrtek 4. 5. 2017. Hlavní přednášku měla prof. Zdenka Ulčová-Gallová.
 - 2.4. 18.–21. 10. 2017 se ve Vysokých Tatrách, Hotel Bellevue, Smokovec, Slovensko konal XXXIV. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů a XV. Kongres českých a slovenských imunologů.
 - 2.5. Byl organizován VII. Workshop o vztahu mezi strukturou a biologickými vlastnostmi polymerních léčiv (23.–24. 11. 2017, Jáchymov).
 - 2.6. Byly pořádány pravidelné odborné semináře na regionální bázi pro klinické a teoretické pracovníky.
 - 2.7. Proběhl kurz „Buněčné a molekulární základy imunologie“ prof. Tlaskalové-Hogenové, prof. Holáně a dr. Bileje. Pod stejným názvem byla vydána nová skripta.
 - 2.8. Uskutečnila se Jarní škola ESID (10.–14. 5. 2017) prof. Šedivé.
 - 2.9. Byl zorganizován II. Workshop o regulačních buňkách dr. Hrdého (22.–23. 6. 2017)
 - 2.10. Mezinárodní konferenci „Food, Microbiota and Immunity“, která se konala v Třešti 7.–10. 6. 2017, pořádala prof. Tlaskalová-Hogenová.
 - 2.11. V roce 2017 vydala ČIS dvě dvojčísla (1–2 a 3–4) Imunologického zpravodaje. Počínaje rokem 2018 bude Imunologický zpravodaj posílán na mailovou adresu členům ČIS ve formě přílohy.
 - 2.12. Byly uděleny Ceny ČIS, z. s.
- Cena Jaroslava Šterzla:
 1. cena
 - Ondřej Ballek, Jan Valečka, Martina Dobešová, Adéla Broučková, Jasper Manning, Pavel Řehulka, Jiří Stulík, Dominik Filipp „TCR Triggering Induces the Formation of Lck-RACK1-Actinin-1 Multiprotein Network Affecting Lck Redistribution“, *Frontiers in Immunology*. 2016, 7: 1–16
 2. cena
 - Stepan Coufal, Alena Kokesova, Helena Tlaskalova-Hogenova, Jiri Snajdauf, Michal Rygl, Miloslav Kverka „Urinary Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Can Distinguish Necrotizing Enterocolitis from Sepsis in Early Stage of the Disease“, *Journal of Immunology Research*. 2016, Article ID 5727312: 1–8
- Cena Milana Pospíšila a Maria Campy:
 1. cena byla udělena za dva články:
 - Jitka Fucikova, Iva Truxova, Michal Hensler, Etienne Becht, Lenka Kasikova, Irena Moserova, Sarka Voshlikova, Jana Klouckova, Sarah E. Church, Isabelle Cremer, Oliver Kepp, Guido Kroemer, Lorenzo Galluzzi, Cyril Salek, Radek Spisek „Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients“, *Blood*. 2016, 128(26): 3113–3124;
 - Jitka Fucikova, Etienne Becht, Kristina Iribarren, Jeremy Goc, Romain Remark, Diane Damotte, Marco Alifano, Priyanka Devi, Jerome Biton, Claire Germain, Audrey Lupo, Wolf Herve Fridman, Marie-Caroli-

ne Dieu-Nosjean, Guido Kroemer, Catherine Sautes-Fridman, Isabelle Cremer „Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis“, Cancer Research. 2016, 76(7): 1746–1756;

2. cena

- Barbora Tomalova, Milada Sirova, Pavel Rossmann, Robert Pola, Jiri Strohalm, Petr Chytil, Viktor Cerny, Jakub Tomala, Martina Kabesova, Blanka Rihova, Karel Ulbrich, Tomas Etrych, Marek Kovar „The structure-dependent toxicity, pharmacokinetics and anti-tumour activity of HPMA copolymer conjugates in the treatment of solid tumours and leukaemia“, Journal of Controlled Release. 2016, 223: 1–10.

2.14. ČIS má v současnosti 354 členů.

2.15. Světový den imunologie bude Česká imunologická společnost v roce 2018 slavit 26. dubna (čtvrtek). S hlavní přednáškou vystoupí RNDr. Martin Schwarzer, Ph.D.

3. Zpráva o činnosti byla Valným shromážděním přijata. Všichni přítomní byli pro, nikdo nebyl proti, nikdo se nezdržel hlasování.

Zpráva o hospodaření – viz strana 12

VÝŠE ČLENSKÝCH PŘÍSPĚVKŮ ČIS, Z. S., PRO ROK 2018:

pro řádné členy – 240 Kč, pro studenty a seniory 150 Kč,

čestní členové příspěvek neplatí

Fio banka, č. ú. 2901016930/2010

Zápis z jednání výboru České imunologické společnosti, z. s., 26. 4. 2018

Prezenční listina je součástí tohoto zápisu.

1. Prof. B. Říhová informovala o přípravě a obsahu Imunologického zpravodaje č. 1–2, 2018.
2. Prof. B. Říhová informovala o zprávě Rady vědeckých společností České republiky (RVS ČR). Bylo přijato několik nově založených společností – zapsaných spolků.
Do výboru RVS ČR byla za ČIS zvolena prof. A Šedivá, členka výboru ČIS.
3. Prof. Říhová poděkovala prof. A. Šedivé za přípravu otázek do kvízu, jenž bude připraven pro účastníky Evropského imunologického kongresu 2018 v Amsterdamu.
4. Prof. Říhová sdělila, že na webových stránkách České společnosti alergologie a klinické imunologie (ČSAKI) je odkaz na semináře ČIS.

5. Zásadním bodem jednání výboru bylo zvážení a rozhodnutí o možnosti pořádání Evropského imunologického kongresu (ECI) 2024 v České republice. Přihláška má být zaslána EFIS do 1. 6. 2018.

a) O pořádání projeví zájem dvě firmy, které prof. Říhová pozvala k prezentaci:

- Guarant International, spol. s r. o., zastoupená p. Tomášem Rabochem,
- Czech-IN, zastoupená p. Lukášem Čápem.

Nabídky obou společností prof. Říhová poslala členům výboru k prostudování již s předstihem.

b) Zvažovaly se tyto body:

- vhodné prostory: uvažuje se i o nově vybudovaném kongresovém centru v blízkosti O2 Arény (plánované dokončení stavby v červnu 2019); součástí centra má být i nový hotel;
- datum: pořadatel si může vybrat a stanovit vyhovující termín, výbor ČIS se domluvil na září jako nejvhodnějším termínu;
- město: Praha; Olomouc a Brno se nabídly k satelitním konferencím;
- vše by mělo být na jednom místě: plenární přednášky, semináře, workshopy, prostor pro firmy, prostory a zázemí pro pořadatele a administrativu;
- všude musí být připojení k internetu;
- možnost stravování v průběhu dne: cateringová služba, stálé bufety, malé jídelny apod.

c) V Amsterdamu proběhnou krátké prezentace uchazečů o pořadatelství kongresu a bude se rozhodovat o přidělení.

d) Prof. MUDr. Anna Šedivá, DSc. předběžně souhlasila s tím, že by se stala prezidentkou ECI 2024. Členové výboru ČIS a řada členů ČIS byla e-mailem požádána o účast v organizačním výboru.

6. Prezentace firem ucházejících se o uspořádání ECI 2024.

a) Guarant International, spol. s r. o. – p. Tomáš Raboch

- Firma může vše předfinancovat. ČIS nehrozí žádné finanční riziko, v případě neúspěchu nepožadují žádné kompenzace.
- Nový komplex pro pořádání velkých kongresů bude vybudován do r. 2019 v sousedství O2 Arény s kapacitou až 10 000 míst v několika sálech a saloncích. Součástí bude i nový hotel s 300 pokoji. Další nejbližší možnosti ubytování jsou v dosahu cca 10 min. chůze.
- Stravování v průběhu kongresu (dotaz prof. Říhové): cateringové jednotky + další možnosti vhodného stravování.
- Spolupráce se sponzory (dotaz prof. Šedivé): mají oddělení zabývající se sponzorstvím, mohou sjednat i další odborné sponzory.
- Možnost zařízení satelitních konferencí v jiných městech, např. Brno, Olomouc (dotaz prof. Kopeckého).

Přítomní dostali obrazovou dokumentaci.

b) Czech-IN – p. Lukáš Čáp

- Místo: Kongresové centrum (KC) Praha nebo nově vybudovaný komplex O2 Aréna; přiklání se spíše ke KC, které má být do r. 2024 rozšířeno.
- Předložený rozpočet je zpracovaný na 3000 delegátů; výnos se předpokládá cca 10 mil. Firma zajistí sekretariát kongresu a ručí za případné ztráty. V případě kandidatury firma zajistí předfinancování a připraví všechny náležitosti.

P. Čáp nabídl k nahlédnutí propagační materiály společnosti.

7. Pro hlasování o pořadatelské firmě bylo rozdáno čtrnáct lístků se jménem Guarant International, spol. s r. o. – Tomáš Raboch a čtrnáct lístků se jménem Czech-IN – Lukáš Čáp. Odevzdáno bylo čtrnáct lístků – všechny se jménem Guarant – Tomáš Raboch.

8. Prof. Říhová požádá p. Rabocha o zpracování a předložení podkladů.

Ceny ČIS, z. s., za rok 2016 byly předané 7. prosince 2017 u příležitosti Valného shromáždění ČIS, z. s.

O udělení jednotlivých Cen ČIS rozhodly odborné komise ustanovené výborem společnosti.

Cenu Jaroslava Šterzla pro mladé imunology do 35 let obdrželi:

1. cena

Ondřej Ballek, Jan Valečka, Martina Dobešová, Adéla Broučková, Jasper Manning, Pavel Řehulka, Jiří Stulík, Dominik Filipp „TCR Triggering Induces the Formation of Lck-RACK1-Actinin-1 Multiprotein Network Affecting Lck Redistribution“, *Frontiers in Immunology*. 2016, 7: 1–16



Ondřej Ballek přebírá cenu od prof. Blanky Říhové.

2. cena

Stepan Coufal, Alena Kokesova, Helena Tlaskalova-Hogenova, Jiri Snajdauf, Michal Rygl, Miloslav Kverka „Urinary Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Can Distinguish Necrotizing Enterocolitis from Sepsis in Early Stage of the Disease“, *Journal of Immunology Research*. 2016, Article ID 5727312: 1–8

Finanční odměnu vítězům poskytl Nadační fond Homunkulus.

Cenu Milana Pospíšila a Maria Campy za články z oblasti přirozené a protinádorové imunity získali:

1. cena za dva články:

Jitka Fucikova, Iva Truxova, Michal Hensler, Etienne Becht, Lenka Kasikova, Irena Moserova, Sarka Vosahlikova, Jana Klouckova, Sarah E. Church, Isabelle Cremer, Oliver Kepp, Guido Kroemer, Lorenzo Galluzzi, Cyril Salek, Radek Spisek „Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients“, *Blood*. 2016, 128(26): 3113–3124

Jitka Fucikova, Etienne Becht, Kristina Iribarren, Jeremy Goc, Romain Remark, Diane Damotte, Marco Alifano, Priyanka Devi, Jerome Biton, Claire Germain, Audrey Lupo, Wolf Herve Fridman, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Guido Kroemer, Catherine Sautes-Fridman, Isabelle Cremer „Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis“, *Cancer Research*. 2016, 76(7): 1746-1756

2. cena

Barbora Tomalova, Milada Sirova, Pavel Rossmann, Robert Pola, Jiri Strohalm, Petr Chytil, Viktor Cerny, Jakub Tomala, Martina Kabesova, Blanka Rihova, Karel Ulbrich, Tomas Etrych, Marek Kovar „The structure-dependent toxicity, pharmacokinetics and anti-tumour activity of HPMA copolymer conjugates in the treatment of solid tumours and leukaemia“, *Journal of Controlled Release*. 2016, 223: 1–10

Cena je sponzorovaná italskou nadací Fondazione Arpa, Pisa.



Štěpán Coufal přebírá cenu od prof. Blanky Říhové.



Barbora Tomalová přebírá cenu od Dr. Lucy Vannucciho.

Slavnostní předávání Cen v adventním čase bylo provázeno předvánočními melodiemi v podání pěveckého kroužku Větrník ze ZŠ v Kunraticích.

Vzpomínka na profesora Iva Hánu

**Začátkem prosince minulého roku přišla smutná zpráva:
29. 11. 2017 zemřel ve věku 89 let prof. MUDr. Ivo Hána, CSc.**

Široká lékařská veřejnost v Česku i na Slovensku ho zná především v souvislosti s postgraduálním vzděláváním, atestacemi: od roku 1968 pracoval v Institutu pro další vzdělávání lékařů a farmaceutů (ILF), v r. 1984 zde založil Katedru lékařské imunologie, v letech 1990–1994 byl ve funkci ředitele. Koncepčně, obsahově i organizačně transformoval toto pracoviště na Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví (IPVZ), na kterém se školili nejen naši, ale i zahraniční lékaři a další vysokoškoláci pracující ve zdravotnictví.

Čeští a slovenští imunologové, ale i mikrobiologové a epidemiologové ho mají spojeného s výborem Imunologické sekce Československé biologické společnosti při ČSAV později Československé a dnes České imunologické společnosti (ČIS): v letech 1994–2003 byl po dvě funkční období předsedou výboru, v roce 1994 byl presidentem 7. kongresu českých a slovenských imunologů s mezinárodní účastí v Praze, zorganizoval dvaadvacet úspěšných «Pracovních imunologických konferencí» a v neposlední řadě prohloubil propojení naší společnosti s Mezinárodní unií a Evropskou federací imunologických společností (IUIS, EFIS). Řadu let byl ve funkci styčného referenta u Evropské federace imunologických společností. Svě přesvědčení o významu komunikací odborných pracovníků vyjádřil na pražském imunologickém kongresu (1994) slovy «my všichni víme, že nejenom každodenní práci v laboratoři nebo v ordinacích je živ náš imunolog, ale že podněty i poučení pro další práci přinášejí vědecká a pracovní setkání».

Pro klinické imunology a alergology je spjat s realizací koncepce oboru: zásadně přispěl k uznání a pro-sazení oboru klinická imunologie a alergologie na Ministerstvu zdravotnictví ČR, kde působil dlouhou dobu v řadě jejich orgánů včetně Interní grantové agentury a Komise pro imunopreparáty. V r. 1984 založil samostatnou Katedru lékařské imunologie na ILF a stal se jejím vedoucím a předsedou komise pro specializační zkoušky z lékařské imunologie, později alergologie a klinické imunologie pro lékaře i vysokoškoláky nelékaře. Zavedl do kvalifikační atestace lékařů praktickou část zkoušky u lůžka nemocného, profílizoval obor jako klinický s nezbytným laboratorním zázemím a začal vyžadovat na uchazečích písemnou práci na určené téma. Katedru vedl až do roku 1995.

Profesní život prof. Hány je však naplněn také činností lékaře v praxi, vysokoškolského pedagoga a vědce. Již jako student Lékařské fakulty UK v Praze pracoval na interní klinice prof. Netouška, na dětské klinice prof. Švejcara, našel zálibu ve vědecké práci v hematologii u prof. Heřmanského a v mikrobiologii u prof. Patočky. Po promoci v r. 1952, byl „na umístěnkou“ poslán na mikrobiologii v Ústí nad Labem, třebaže ještě jako student absolvoval přijímací zkoušky na vědeckou aspiranturu u prof. Patočky, ale v době tehdejšího politického prostředí nebyl shledán pro tuto dráhu vhodným. Po roce se mu podařilo získat místo vědeckého aspiranta v nově zřízeném Ústavu epidemiologie a mikrobiologie u prof. Rašky, kde se vypracoval do pozice vědeckého tajemníka ústavu a stal se samostatným vědeckým pracovníkem. V centru jeho výzkumných objektů byly zpočátku streptokoky, zvláště tzv. pozdní následky streptokokových infekcí. Zapojil se též do tehdy aktuální epidemiologické problematiky dětské obrny a respiračních virových infekcí v dětských kolektivech.

Je pozoruhodné, že si již v té době uvědomoval přesahy tradiční antiinfekční imunologie: u nestora naší alergologie, MUDr. J. Lišky, se v jeho ambulanci seznamoval s diagnostickými a terapeutickými postupy v alergologii. Odtud pochází také jejich společná práce o „specifické desenzibilizaci“ alergiků, která patří mezi zcela ojedinělé publikace dr. Lišky (Čs. oftalmologie 1967; 23: 117–125). Začal také studovat autoimunitní choroby (výskyt autoprotilátek při různých chorobných stavech) a stal se konsultantem a vedoucím laboratoře ve Výzkumném ústavu chorob revmatických. Později, již jako přednosta Imunologického pracoviště Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) významně přispěl k rozvoji transplantačního programu: společně s dr. Ivaškovou internacionalizovali typizaci HLA a zřídili první Registr dárců kostní dřeně v zemích bývalého východního bloku. Zde také směřoval imunologickou diagnostiku a terapii k problematice nemocných s podlomenou imunitou, sekundárních imunodeficiencí, a se svými spolu-



pracovníky se zúčastňoval klinických studií o imunomodulačním využití tzv. „transfer-faktoru“ (dialyzátu homogenátu z leukocytů), vyráběného v ČR. Zcela prioritní i v mezinárodním kontextu byla jeho prospektivní studie úspěšné imunomodulační léčby recidivujících předních uveitid, které mohou končit slepotou. K prezentaci svých výsledků byl vyzván organizátory 13. mezinárodního imunologického kongresu v Rio de Janeiro.

Vědecko-výzkumná činnost prof. Hány má charakter aplikační resp. translační. Velmi úzce spolupracoval s Imunologickým oddělením Mikrobiologického ústavu ČSAV vedeného prof. Šterzlem. Publikoval více než 250 odborných článků, z nichž na 90 vyšlo

v mezinárodních časopisech, na domácích i zahraničních kongresech prezentoval výsledky svých prací ve formě plakátových sdělení a přednášek, k nimž byl často vyzván. Opakovaně byl žádán o předsednictví a koordinaci tematických bloků na těchto akcích. Mezi jeho zahraničními studijními a přednáškovými pobyty je např. Minneapolis, Chicago, Londýn, Paříž, Leiden, Freiburg, Bologna, Budapešť, Varšava, ale také Moskva a Delhi. Oceňována byla, kromě odborných znalostí, také jeho jazyková výbava: plynule hovořil anglicky, francouzsky, německy, částečně italsky a rusky. Byl dlouholetým členem České Lékařské Společnosti J. Event. Purkyně, bylo mu uděleno čestné členství České i Slovenské imunologické společnosti a České společnosti alergologie a klinické imunologie JEP. Byl členem American Society for Microbiology, International Society for Clinical Immunology, European Federation of Immunogenetics. Kolegium molekulární a buněčné biologie ČSAV mu udělilo pamětní medaili J. E. Purkyně.

Prof. Hána vykonával také lékařskou praxi v oboru alergologie a klinické imunologie. Tento obor vždy půjímal jako klinický a laboratorní. Byl zkušeným laboratorním pracovníkem (vypracoval např. originální test na určování protilátek proti dvoupentlicové DNA, který je využíván při diagnostice systémového erythematodu), v ambulanci se těšil pověsti charismatického lékaře. Své hluboké epidemiologické, mikrobiologické a imunologické znalosti a praktické zkušenosti zúročil prof. Hána na poli vakcinologie: hlavní úřadovna WHO v Ženevě si ho vybrala jako svého konsultanta v imunologii, v období let 1982-1987 pracoval v různých rozvojových zemích, i v době jejich válečných konfliktů, jako vedoucí imunizačního programu (WHO Expanded Program on Immunization).

Svou pedagogickou činnost prof. Hána zaměřoval především na postgraduální vzdělávání lékařů v oboru alergologie a klinické imunologie. Zvláště se zaměřoval na laboratorní diagnostiku v klinické imunologii, na problematiku transplantační imunologie a na oblast imunoterapie a vakcinace. Po návratu ze studijního pobytu v Minneapolis, USA, v letech 1967-1968 pomáhal v ILF vést kurzy Světové zdravotnické organizace pro stipendisty z celého světa. Za zmínku stojí, že řadu let pracoval ve výkonném výboru EuroTransMed v Leidenu a v Londýně, v organizaci, která realizovala postgraduální vzdělávání lékařů všech oborů cestou televizního vysílání v celé Evropě a v severní Africe. Do těchto programů se podařilo prof. Hánovi prosadit i naše specialisty a to jako jediné ze států tehdejšího východního bloku. V roce 1990 byl jako první v naší republice jmenován profesorem pro obor imunologie a alergologie. Spolu s prof. Johnem se podílel na etablování imunologie jako samostatného předmětu na lékařských fakultách v intencích WHO.

Prof. MUDr. Ivo Hána, CSc. bude mít své čestné místo v české medicíně nejen jako imunolog, ale i jako osobnost, která svým dlouholetým, soustavným a cíleným organizačním úsilím a prací v oblastech zdravotnictví, výuky i vědy vytvářela podmínky pro práci jiným. Česká imunologická společnost mu udělila, jako výraz poděkování za přínos imunologii své nejvyšší ocenění – granátový imunoglobulin. Jeho mimořádnost celospolečenská byla ohodnocena v r. 2008 prezidentem V. Klausem udělením Medaile za zásluhy o stát v oblasti vědy.

Odešel dobrý člověk. Čest jeho památce.

*prof. MUDr. Jindřich Lokaj, CSc.
Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU Brno*



13th Host Pathogen Interaction Forum 2018

Ve dnech 16.–19. dubna 2018 proběhl v krásném historickém městě Slavonice již 13. ročník konference s názvem 13th Host Pathogen Interaction Forum 2018. Tato konference je tradičně pořádána Fakultou vojenského zdravotnictví Univerzity obrany spolu s Českou imunologickou společností, z. s., jako hlavním spolupřátatelem. Toto setkání vyniká především účastí zahraničních hostů z celého světa, lze tedy hovořit o velmi zajímavém setkání na mezinárodní úrovni.

Jako malé zastavení si dovoluji pro úvod napsat pár slov o místě konání konference, které jistě stojí za povšimnutí. Malebné město Slavonice na pomezí Čech, Moravy a Rakouska, na okraji přírodního parku Česká Kanada, území hlubokých lesů, romantických rybníků, potoků a nekončících luk proslavily především překrásné renesanční památky, řady renesančních měšťanských domů s bohatě zdobenými štíty, psaníčkovými nebo figurálními sgrafity, které lemují dvě náměstí v centru města. Díky této nádheře tedy také není divu, že se právě Slavonice staly historickým městem roku 2017. Konference 13th Host Pathogen Interaction Forum 2018 se konala v mezinárodním konferenčním centru Institut Slavonice, který slouží jako vzdělávací zařízení a prostor pro rozličné události. Tento institut sídlí v rekonstruovaných prostorech staré školy Slavonice, založené již v roce 1903 a pro organizaci konference si účastník nemůže vybrat lepšího místa.

Hlavním tématem konference je jako tradičně interakce hostitele s vybranými patogeny bakteriálních a virových onemocnění se zaměřením na využití pokročilých technologií laboratorních metodik v oblasti imunologie, mikrobiologie či proteomiky. Interakce mezi hostitelem a patogenem je všeobecně definována jako možnost/schopnost udržení známých mikrobiálních agens nebo virů v hostitelských organismech na molekulární, buněčné, organizační nebo populační úrovni. V současné době se mnoho vědců snaží porozumět genetické variabilitě a jejího příspěvku k interakci a variabilitě patogenů v hostiteli. Pro porozumění, patogenita se týká schopnosti organismu způsobit onemocnění (tj. poškodit hostitele). Tato schopnost představuje genetickou složku patogenu a zjevné poškození provedené vybranému hostiteli je vlastností interakce mezi hostitelem a patogenem. Oportunní patogeny postrádají tuto inherentní schopnost způsobit onemocnění. Nicméně onemocnění není nevyhnutelným výsledkem interakce mezi hostitelem a patogenem a navíc mohou veškeré patogeny vyjadřovat širokou škálu virulence. Virulence, termín často používaný zaměnitelně s patogenitou, se týká stupně patologie způsobené organismem. Rozsah virulence je obvykle korelován se schopností patogenu množit se uvnitř hostitele a může být ovlivněn jinými faktory.

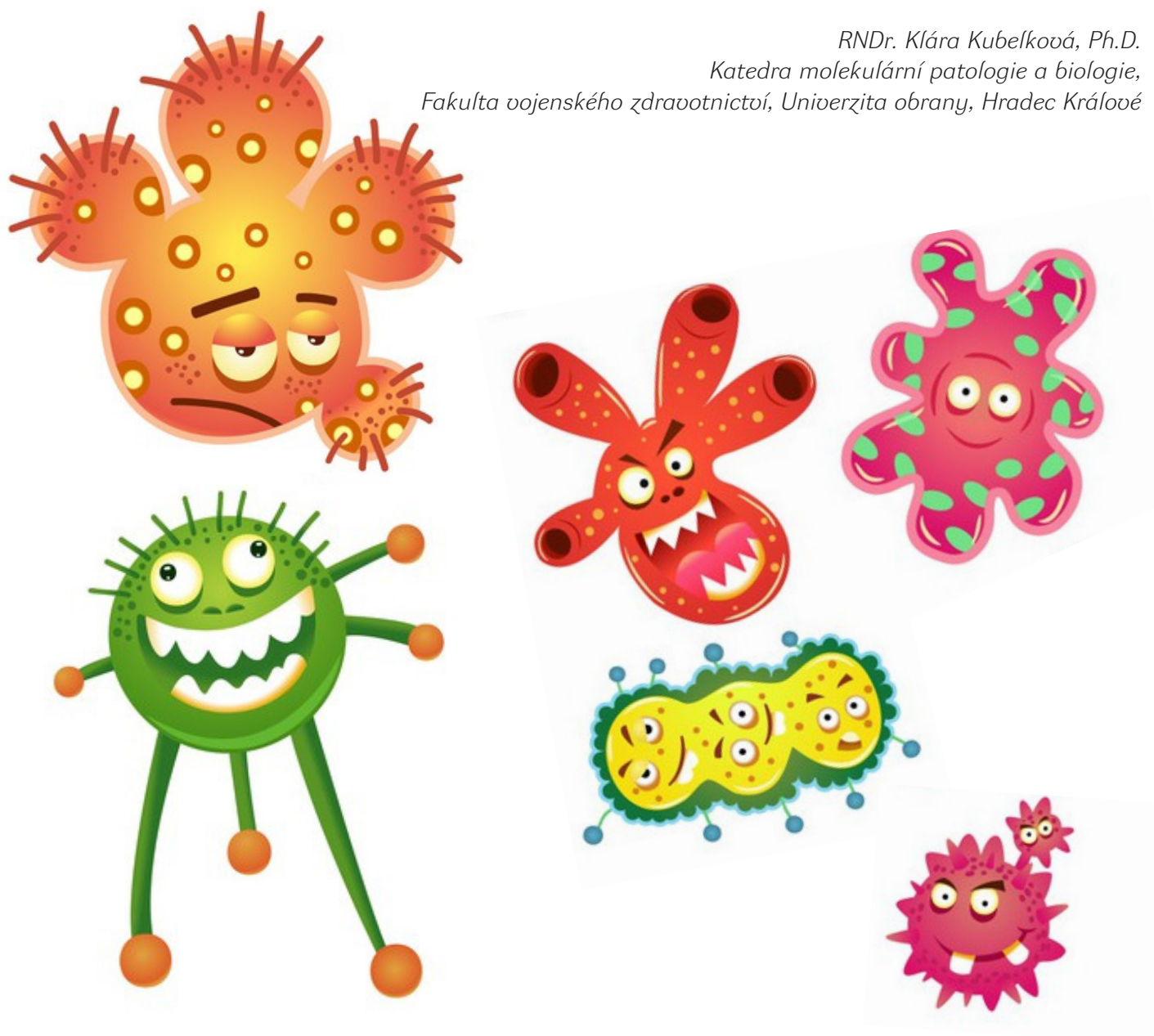
Vědecký program konference byl rozvržen do několika nezávislých sekcí. V rámci programu bylo představeno mnoho zajímavých témat, která velice zajímavými a cílenými metodami studují vztahy hostitele s vybranými patogenními mikroorganismy, mezi které lze zařadit např. *Francisella tularensis*, *Bordetella pertussis*, *Coxiella burnetii*, *Campylobacter jejuni* nebo *Chlamydia trachomatis*. Úvodní přednáškou celé konference zahájil prof. Anders Sjöstedt (Univerzita Umeå, Umeå, Švédsko) velmi aktuální otázku možnosti vakcinace proti vybraným intracelulárním patogenům, především bakterie *Francisella tularensis*. Během dalších konferenčních dnů bylo představeno několik klíčových přednášek. Dr. Alain Charbit (INSERM, Paříž, Francie) ve své přednášce vyzdvihl důležitou roli vybraných metabolických drah v patogenezi mikroba *Francisella tularensis*, Dr. Sherry Mou (USAMRIID, Maryland, USA) představila velice zajímavé výsledky

proteinové analýzy bakteriálních proteinů *Coxiella burnetii* ve vztahu k sekrečnímu systému a replikaci této bakterie uvnitř hostitelské buňky. Velice aktuální otázkou ve vztahu hostitel-pathogen je také existence a účinnost antimikrobiální léčby, kterou ve své přednášce představil Dr. Charles L. Bevins (Univerzita Kalifornie, Davis, USA). Mezi další vybraná témata přednášek lze zařadit přednášku prof. Lokeshe Joshiho (Univerzita Galway, Irsko), který představil unikátní technologii dekontaminace biologických agens na základě znalostí interakce mezi hostitelem a patogenem a zároveň využívající oblast glykobiologie. Neméně zajímavým tématem přednášky byl také rozvoj infekce papillomaviry a sledovaný vztah k nádorovým buňkám, který představil prof. Frank Roesl (Cancer Research Institut, Heidelberg, Německo) či studium proteinového profilu intracelulární bakterie *Rickettsia akari* (Dr. František Csicsay, Slovenská akademie věd, Bratislava, Slovensko).

Konference byla provázena také bohatým společenským programem, v rámci kterého měli účastníci možnost navštívit historickou část Slavonicka, včetně nedaleké městské části Maříž, kde měli možnost obdivovat a zároveň zakoupit originální ručně vyráběné hrnky, keramické talíře či praktické keramické květináče. V rámci doprovodného programu měli účastníci také příležitost k návštěvě nedaleké jaderné elektrárny Dukovany, kde zajímavým výkladem získali základní povědomí o jejím fungování.

Závěrem bych ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na organizaci této výjimečné konference, všem účastníkům za jejich zajímavé přednášky a již se těším na další ročník 14th Host Pathogen Interaction Forum 2020 konference, která se bude, jako tradičně, konat v některém z malebných měst České republiky.

RNDr. Klára Kubelková, Ph.D.
Katedra molekulární patologie a biologie,
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové



Zpráva o hospodaření:

- ČIS během roku 2017 (do 30. 11. 2017) měla příjmy 356 588 Kč a výdaje 370 923 Kč, což znamená nárůst o 37 % v porovnání s rokem 2016. Hlavní složka příjmů byla dotace AVČR a hlavní složku výdajů tvořila podpora imunologických akcí (viz. zpráva za činnost). Schodek obsahuje i tisk skript, která se ovšem budou prodávat ještě v rámci kurzu Buněčné a molekulární základy imunologie 2019.
- V prosinci 2017 neočekáváme výrazné změny. Očekáváme ještě výdaje zejména za údržbu webových stránek a mezi příjmy bude doplatek EFIS za konferenci „Food, Microbiota and Immunity“ a chybějící členské příspěvky. V současnosti chybí příspěvky od zhruba 220 členů, patrně kvůli změně čísla účtu. Byl jim odeslán e-mail se všemi potřebnými informacemi.
- Na rok 2018 ČIS zažádala RVS ČR o podporu tradičních imunologických akcí: Imunologický zpravodaj (od roku 2018 pouze v elektronické podobě) a webové stránky; Diskuzní fórum „Host Pathogen Interaction“; ESID Spring School; Workshop o polymerních léčivech; Workshop o subpopulacích CD4+ T lymfocytů a Odborné semináře včetně Dne Imunologie 2018.

Zveme na zajímavé akce v roce 2018:

5th European Congress of Immunology

2–5 September 2018, Amsterdam, Netherlands

www.eci2018.org

18th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2018)

24–27 October 2018, Lisbon, Portugal

<https://esid.kenes.com/2018#.Wuw3uWch3cs>

MCIS 2018, Mucosal Immunology, Course and Symposium

17–20 July 2018, Oxford, United Kingdom

<http://www.socmucimm.org/mics-2018/>



Den imunologie 2018

Den imunologie 2018 byl letos s malým předstihem slaven 26. dubna v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. Evropskou federací imunologických společností a Mezinárodní unií imunologických společností je oficiálně vyhlášeným Dnem imunologie 29. duben.

Dopolední program byl sestaven z prezentací držitelů Cen ČIS za rok 2016 a neoceněných uchazečů o tyto ceny.

- Ondřej Ballek, **Cena Jaroslava Šterzla**
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Lck in the first minutes of T-cell activation: The Time and Place matters

The initiation of T-cell signalling pathway is critically dependent on the function of Lck kinase. Unfortunately, up today there is no clear consensus what are the specific molecular mechanisms of the initiation of T-cell activation, so-called T-cell receptor (TCR) triggering. In our study we investigated three particular problems. The first concerns spatiotemporal organization of critical signalling molecules before and after TCR engagement in the context of lipid microdomains, because we and others have previously suggested that TCR triggering requires the activation-induced redistribution of active Lck within the plasma membrane. Next we further characterize this kinase. We found out that in naïve T-cells there is a small pool of basal active Lck (pY394Lck) which is exclusively associated with high molecular weight complexes. Upon TCR engagement levels of this pY394Lck dramatically increase and partially redistribute to lipid microdomains. Our final question concern principles of molecular mechanism of aforesaid Lck redistribution process within plasma membrane upon T-cell activation. In our comparative screen, we have identified RACK1 – receptor for activated kinase C, as a candidate Lck-interacting protein that is involved in the regulation of this redistribution. The formation of transient Lck-RACK1 complexes was detectable in primary CD4+ T cells with their maximum levels peaking 5-10 seconds after TCR-CD4 co-aggregation. In addition, Lck redistribution was dramatically diminished in primary CD4+ T cells where RACK1 was knock-down. In agreement with our biochemical data, various types of microscopic examination of primary CD4+ T cells and Jurkat cell line mutants expressing fluorescent protein-tagged Lck and RACK1 revealed that these proteins briskly and transiently co-redistribute to the forming immunological synapse (IS). Together, these results demonstrates potency and importance of spatiotemporal membrane organisation in the regulation of both Lck activity and TCR triggering and describe RACK1 as a relevant intracellular signalling component involved in the regulation of Lck redistribution within plasma membrane by linking CD4-Lck complex to the cytoskeletal network.

- Zuzana Paračková
Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol

Neutrofilné extracelulárne pasce u diabetu mellitu 1. typu

Neutrofilné extracelulárne pasce (NETy) predstavujú efektívny mechanizmus pri boji proti infekciám, vďaka ich schopnosti zachytiť a eliminovať rôzne druhy patogénov. Tieto zložité štruktúry, pozostávajúce predovšetkým z dekonzenzovaného chromatinu a antimikrobiálnych proteínov, dokážu stimulovať rôzne bunkové populácie, napríklad makrofágy, dendritické bunky či T lymfocyty. Efekt NETov je často spájaný s rôznymi autoimunitnými ochoreniami, ako je lupus erythematodes, rôzne vaskulitídy či diabetes mellitus 1. typu (DM1). Hlavným dôvodom sú NETy ako významný zdroj autoantigénov a už ich spomínaná schopnosť aktivovať ďalšie bunky imunitného systému. Avšak presný mechanizmus ostáva stále nejasný.

U DM1 dochádza k ničeniu inzulín-produkujúcich beta buniek pankreasu. Najväčšiu úlohu tu zohrávajú autoreaktívne T lymfocyty, ale tie sú len jednou časťou veľkej skladačky. Významnou súčasťou patogenézie DM1 je aj vrodená imunita, ktorá podnecuje reakcie voči vlastným antigénom.

Pre objasnenie ako neutrofilny prispievajú k rozvoju T1D, rozhodli sme sa študovať vplyv NETov na funkcie dendritických buniek u diabetických pacientov. Naše predbežné výsledky ukazujú, že NETy rozdielne ovplyvňujú expresiu maturačných znakov u myeloidných dendritických buniek (mDC) u pacientov a u kontrol, no podobný efekt sme nepozorovali u plazmacytoidných dendritických buniek (pDC). Prítomnosť NETov spôsobovala zvýšenie produkcie prozápalových cytokínov – IFN α a IL-1 β . A naopak, DC pacientov kultivované s NETmi (DC-NETs) produkovali menej IL-10, protizápalového cytokínu. DC-NETs diabetických pacientov indukovali viac IFN γ -produkujúcich CD4⁺ T lymfocytov a menej T regulačných lymfocytov (Treg) v porovnaní so zdravými darcami. Tieto Tregy exprimujú nižšie množstvo IL-2 α , dôležitú molekulu pre vykonávanie svojich supresívnych funkcií. Navyše, DC-NETs dokážu pohlcovať viac antigénov a glukózy ako DC kultivované samostatne.

NETy diabetických pacientov vplývajú na dendritické bunky rozdielne ako tie od zdravých darcov. Navyše sa medzi sebou líšia svojím zložením. NETy diabetických pacientov obsahujú viac DNA viazanej na históny, ale menej napríklad antimikrobiálneho proteínu LL-37. Líšia sa aj aktivitou neutrofilnej elastázy.

Naše predbežné výsledky by mohli osvetliť zapojenie dendritických buniek v patogenéze DM1, skrz ich interakcie s neutrofilmi a NETmi.

- Jitka Palich Fučíková, **Cena Milana Pospíšila a Maria Campy**

Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol

Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients

Cancer cell death can be perceived as nonimmunogenic or immunogenic, depending on the initiating stimulus. Immunogenic cell death (ICD) is characterized by emission of the so-called damage-associated molecular patterns (DAMPs). Calreticulin (CRT) exposure represents the major checkpoint determining the immunogenicity of cell death as documented by numerous preclinical in vitro and vivo mice studies. Preapoptotic translocation of CRT from the endoplasmic reticulum (ER) to the cell surface is a result of an ER stress response accompanied by the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α). We report that level of CRT expression on tumor cells, irrespective of chemotherapy treatment, positively influenced the clinical outcome of acute myeloid leukemia (AML), non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and ovarian cancer (OVCa) patients. In our studies, CRT expression correlated with the constitutive phosphorylation of eIF2 α . This suggests that a subgroup of cancer patients is associated with a strong constitutive ER stress response that culminates in CRT exposure. Moreover, the high-levels of surface exposed CRT correlated with an increased activation of antigen-specific immune response both in tumor microenvironment of NSCLC and OVCa patients and peripheral blood of AML patients. We conclude that CRT expression constitutes a novel prognostic biomarker in different cancer malignancies, facilitating anticancer immunosurveillance.

- Barbora Tomalová, **Cena Milana Pospíšila a Maria Campy**

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

HPMA copolymer conjugates: structure-dependent toxicity, pharmacokinetics and anti-tumor activity

This study was focused on polymer drug carriers for cancer therapy based on N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymers. We compared linear (Mw ~27 kDa, Rh ~4 nm) and non-degradable star (Mw ~250 kDa, Rh ~13 nm) HPMA copolymer conjugates bearing anthracycline antibiotic doxorubicin (DOX) bound via pH sensitive hydrazone bond.

We determined the in vitro and in vivo toxicity of both conjugates and their maximum tolerated dose (MTD). We found that MTD was higher for the linear conjugate (85 mg DOX/ kg) and lower for the star conjugate (22.5 mg DOX/kg).

We also assessed anti-tumor activity of these conjugates in mouse B-cell leukaemia (BCL1) and a mouse T-cell lymphoma (EL4) experimental model. The therapy of BCL1 leukaemia by both of the polymeric conjugates using the MTD or its fraction (i.e., equitoxic dosage) showed better results in the case of the star conjugate. On the other hand, treatment of EL4 lymphoma seemed to be more efficient when the linear conjugate was used. We concluded that the anti-cancer treatment of solid tumors and leukaemias require alternative therapeutics to maximize the efficacy. We hypothesise that the most suitable HPMA copolymer-DOX conjugate for the treatment of solid tumors should have an HMW structure with increased Rh that would be stable for three to four days after the conjugate administration and then rapidly disintegrate into short polymer chains, which are excretable from the body by glomerular filtration. On the other hand, the treatment of leukaemia requires a drug conjugate with a long circulation half-life. This would provide an active drug, whilst slowly degrading to excretable fragments.

- Štěpán Coufal, **Cena Jaroslava Šterzla**

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Využití proteinu vázajícího mastné kyseliny ve střevě (I-FABP) ve včasné diagnostice nekrotizující enterokolitidy

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je závažné multifaktoriální onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT) postihující zejména předčasně narozené novorozence a novorozence s nízkou porodní hmotností. Mezi hlavní rizikové faktory NEC patří vývojová nezralost organismu s příslušnou nezralostí GIT, střevní bariéry a imunitního systému, dále enterální výživa a abnormální bakteriální kolonizace.

Onemocnění propuká náhle, má velmi rychlý průběh a devastující následky. Klinické příznaky jsou v počáteční, rané fázi NEC značně nespecifické a tím pádem snadno zaměnitelné s jinými poruchami GIT či s novorozeneckou sepsí. NEC je proto jednou z nejčastějších příčin chirurgické intervence u novorozenců a současné také významným důvodem morbidit a mortality na neonatálních jednotkách intenzivní péče.

Klinicky se onemocnění projevuje systémovými a abdominálními příznaky. Mezi nejčastější počáteční příznaky patří letargie, teplotní nestabilita, zhoršení prokrvení, apnoické pauzy, bradykardie, vzednutí břicha, intolerance stravy a zvýšení gastrických residuí. I přes značný pokrok v diagnostických metodách je dnes časná a přesná diagnostika NEC problematická. Diagnóza NEC se opírá o kombinaci typických abdominálních příznaků (distenze břicha, intolerance stravy, příměs krve ve stolici) a radiologického nálezu plynu ve stěně střevní (tzv. pneumatosis intestinalis), případně nálezu plynu v portálním řečišti během ultrasonografického vyšetření. Hlavní nevýhodou těchto přístupů je však nízká senzitivita a pozdní nástup, který neumožňuje včasnou diagnostiku tohoto onemocnění, která je zásadní pro průběh a prognózu onemocnění. Nově se však objevují biomarkery, které umožňují nejen odhalení NEC ještě před rozvojem plných klinických projevů, ale umožňují i její odlišení od novorozenecké sepse, včetně pooperační.

Protein vázající mastné kyseliny ve střevě (I-FABP) je malý (14-15 kDa) protein lokalizovaný v cytoplasmě epitelových buněk střeva. V případě poškození epitelových buněk střeva je protein I-FABP uvolňován do krevního oběhu odkud se díky své malé molekulové hmotnosti dostává glomerulární filtrací do moči. Zjistili jsme, že jedinci se spontánní i pooperační NEC mají významně vyšší hladinu proteinu I-FABP v séru i moči v porovnání s novorozenci se sepsí a zdravými jedinci. V průběhu léčby NEC dochází k významnému poklesu hladiny I-FABP jak v séru tak moči. Doplnění standardního postupu diagnostiky NEC o vyšetření hladiny I-FABP umožnilo odhalit do té doby radiologicky a ultrasonograficky nediodagnostikované pacienty, u kterých došlo později k rozvoji NEC. Analýza ukázala, že stanovení proteinu I-FABP v moči má vyšší citlivost než v séru.

- Tomáš Milota
Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol

Mechanismy dysregulace imunitního systému u pacientů s běžným variabilním imunodeficitem – úloha pomocných T lymfocytů

Úvod: Běžný variabilní imunodeficit (CVID) je heterogenní skupinou primárních humorálních deficietů charakterizovanou narušenou tvorbou protilátek a dysregulací imunitního systému manifestující se lymfoproliferativními, granulomatózními a autoimunitními komplikacemi. Změny na úrovni B lymfocytů s poklesem zralých a zvýšením počtu nezralých forem jsou dobře zdokumentovány. Role T lymfocytů však zůstává ne zcela zřejmá v patogenezi neinfekčních komplikací. V naší studii jsme se proto zaměřili především na úlohy pomocný T-lymfocytů.

Metody: Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly izolovány pomocí Ficoll-Paque gradientu. Po izolaci byla část PBMC stimulována ionomycinem a PMA (Phorbol myristate acetát) po dobu 6 hodin. Po stimulaci byla měřena exprese aktivačních markerů (CD69, CD154, HLADR), chemokinových receptorů (CXCR3, CRTH2, CCR6) a transkripčních faktorů (T-Bet, Gata-3, Ror-gamma) a intracelulární produkce cytokinů (IFN-gamma, IL-5, IL-17) použitím standardizovaných cytometrických protokolů. U druhé části PBMC bylo stanoveno zastoupení jednotlivých vývojových stádií pomocných T-lymfocytů (stanovením exprese povrchových znaků CD3, CD4, CD8, CD45RO, CCR7).

Výsledky: Celkem bylo vyšetřeno 21 pacientů s CVID a 14 věkem a pohlavím odpovídajících zdravých kontrol. Byly zjištěny významné rozdíly v expresi chemokinových receptorů a transkripčních faktorů a také v intracelulární produkci cytokinů směrem k Th1 odpovědi. K významným změnám dochází také u subpopulací T-lymfocytů s redukcí naivních a expanzí zralých forem T-lymfocytů. Navíc pacienti s CVID měli vysokou bazální expresi aktivačního markeru HLADR a omezenou odpověď na stimulaci se snížením nárůstu exprese CD69 ve srovnání se zdravými kontrolami.

Závěr: K dysregulaci imunitního systému u pacientů s CVID nedochází pouze na úrovni B-lymfocytů, ale významně postihuje také T-lymfocyty. V naší studii jsme odhalili narušený vývoj pomocných T-lymfocytů s redukcí naivních a expanzí zralých forem, polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th1, známky chronicky aktivovaného imunitního systému a jeho vyčerpání (vysoká exprese aktivačních markerů, snížená exprese aktivačních znaků po jejich stimulaci). Předpokládám, že tyto změny významně přispívají k dysregulaci imunitního systému a k rozvoji neinfekčních komplikací.

- Po polední přestávce vystoupil od 13:00 hodin s hlavní přednáškou Martin Schwarzer, **vítěz soutěže Neuron Impuls 2017 do 40 let**
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Laboratoř gnotobiologie, Nový Hrádek

Gut microbiota: puppeteer of the host juvenile growth

In most animal species, the juvenile growth period is marked by the exponential gain in body weight and size (Schwarzer 2018). These two physical traits can manifest large phenotypic range based on the interaction between nutritional input and the organism's hormonal cues. In this respect childhood undernutrition is a global health challenge. It is associated with a number of adverse outcomes, including persistent stunting. Both epidemiologic studies and animal model experiments have emphasized that undernutrition cannot be ascribed to food insecurity alone and gut microbiota has an active role in disease aetiology.

In Drosophila model it has been shown that microbiota promotes larval growth upon nutrient (protein) scarcity. Monocolonization of larvae by Lactobacillus plantarum WJL strain (LpWJL), a commensal bacterium found in the Drosophila intestine, is sufficient on its own to recapitulate the natural microbiota growth-promoting effect. This growth promoting effect is strictly strain specific. LpWJL exerts its benefit by acting genetically upstream of the TOR-dependent host nutrient sensing system controlling hormonal growth signaling (Storelli 2011).

To probe the ability of microbiota and Drosophila-selected LpWJL growth promoting strain to boost juvenile growth in mammals we used a gnotobiotic mouse model. In this model microbiota sustained

weight gain and longitudinal growth both upon normal- and under-nutrition. We found that the liver and peripheral tissues of germ-free mice bear hallmarks of reduced Growth Hormone (GH) sensitivity indicating that the intestinal microbiota sustains somatotropic axis activity. Furthermore, using monoxenic mouse models we showed that lactobacilli, previously qualified in *Drosophila* model, promote juvenile growth in a strain dependent manner and LpWJL can fully recapitulate the microbiota effect on growth and on the somatotropic axis activity (Schwarzer 2016).

Further, we tested the ability of LpWJL to promote host juvenile growth in conventional undernourished mice. We found that oral supplementation with LpWJL alleviates the GH resistance, increases the production and levels of Insulin Growth Factor (IGF)-1 and improves the growth kinetics of conventional juvenile mice upon undernutrition. Similar to the monoxenic model, LpWJL mediated growth promotion was strictly strain specific.

Our findings reveal the contribution of the host's microbial environment in supporting juvenile growth both in invertebrate and mammalian models and the sufficiency of selected *Lactobacillus* strain to buffer the adverse effects of chronic undernutrition on post-natal growth. Microbiotherapy with validated strains has the potential to improve the current treatment of juvenile malnutrition and to alleviate its long-term adverse outcomes in human population.

Schwarzer, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2018, DOI:10.1097/MCO.0000000000000463

Storelli et al., *Cell Metab* 2011, DOI:10.1016/j.cmet.2011.07.012

Schwarzer et al., *Science* 2016, DOI:10.1126/science.aad8588



Role nových profibrotických molekul v patogenezi systémové sklerodermie

Ing. Barbora Šumová

Reumatologický ústav, Klinika reumatologie 1. LF UK

Školitel: prof. MUDr. Ladislav Šenoft, Ph.D.

ABSTRAKT

Systémová sklerodermie (SSc) je imunitně zprostředkované fibrotické onemocnění neznámé etiologie. Mezi dominantní patogenní projevy SSc řadíme vaskulární změny, tvorbu autoprotilátů, aktivaci vrozených a adaptivních imunitních odpovědí a fibrotické procesy. Transformující růstový faktor beta (TGF- β) byl identifikován jako nejvýznamnější profibrotický faktor stimulující fibroblasty k perzistentní nadprodukci kolagenu. Existuje však celá řada mediátorů účastnících se patologických změn SSc. Právě vzájemné aktivace a amplifikace těchto profibrotických molekul a jejich signálních drah jsou pokládány za centrální mechanismus patogeneze SSc. Hedgehog (Hh) signální dráha hraje významnou roli v rozvoji a progresi fibrotických onemocněních. Exprese Hh cílových genů může být regulována skrze kanonickou či nekanonickou signální kaskádu. Nekanonická aktivace GLI transkripčních faktorů pomocí TGF- β nebyla doposud v SSc prozkoumána. Studium vzájemné interakce TGF- β a Hh signální dráhy se zabývá podstatná část této disertační práce. *In vitro* analýzy potvrdily TGF- β /SMAD3 dependentní aktivaci GLI2 v dermálních fibroblastech. Specifická delece *GLI2* genu v dermálních fibroblastech zabránila rozvoji experimentální fibrózy *in vivo*. Kombinované ovlivnění kanonické a nekanonické Hh signální dráhy pomocí GLI2 inhibitoru vykazovalo silnější protifibrotický efekt než individuální inhibice Hh kanonické signální kaskády u experimentálních myších modelů kožní a plicní fibrózy. Vzhledem k současnému vývoji selektivních GLI2 inhibitorů mají tyto výsledky přímý translační potenciál. Zbylá část disertační práce popisuje roli nových profibrotických molekul (TRB3, Twist1, S100A4 a Sirt1) v patogenezi SSc. Výsledky této práce přispěly k hlubšímu pochopení patogeneze SSc a charakterizaci nových potenciálních terapeutických cílů.

1 ÚVOD

Systémová sklerodermie

Systémová sklerodermie (SSc) je vzácné chronické systémové onemocnění pojivové tkáně neznámé etiologie. Různorodost klinických manifestací je reflektována nepředvídatelným průběhem SSc¹. Kumulativní doba desetiletého přežití od diagnózy činí 62,5 %². Mezi nejsilnější rizikové faktory pro rozvoj onemocnění patří pozitivní rodinná anamnéza^{3,4}. Ve většině případů však vzniká onemocnění sporadicky. I přes zlepšení kvality života pacientů se SSc, především díky lepším možnostem léčby orgánových manifestací, neexistuje v současné době specifická terapie⁵. Dominantním rysem SSc je fibróza a sklerotizace kůže, stěny cév a parenchymu vnitřních orgánů. Tkáňové poškození, indukované kombinací vnějších environmentálních a genetických faktorů, vyvolává vznik zánětlivých a autoimunitních procesů iniciujících transformaci rezidentních fibroblastů na myofibroblasty. Tyto kontraktilní buňky mesenchymálního původu konstitutivně sekretují nadměrné množství komponent extracelulární matrix (ECM)⁶. Tkáňová architektura je postupnou akumulací produktů ECM narušena a ztrácí své funkční vlastnosti.

Signální dráhy systémové sklerodermie

Molekulární podstata chronické aktivace fibroblastů není v současné době zcela známa. Mediátory imunitních a vaskulárních změn přispívají k aktivaci fibroblastů v časně fázi onemocnění. V pozdější fázi je však aktivace fibroblastů závislá především na autokrinních a parakrinních signálech⁷. Diferenciaci a proliferaci fibroblastů regulují signální dráhy nezbytné pro růst, rozvoj a reparaci tkání. Tyto dráhy jsou vzájemně propojené pomocí individuálních mediátorů a vytvářejí tak komplexní signalizační síť. Jedním z hlavních mediátorů integrujících širokou škálu signálních kaskád je TGF- β ^{8,9}. Buňky imunitního a mesenchymálního původu produkují tento pleiotropní cytokin za účelem ovlivnění celé řady buněčných procesů, jako jsou např. apoptóza, homeostáza, angiogeneze a hojení ran^{10,11}. TGF- β je produkován ve formě latentního komplexu a přeměna na biologicky aktivní formu probíhá např. skrze integrin zprostředkovanou aktivaci¹². Navázáním aktivního ligandu na TGF- β receptor typu II (TGFBRII) nastává heteromerizace s TGF- β receptorem typu I (TGFBRI). Serin-treoninová kináza receptoru II fosforyluje GS-doménu receptoru I. Aktivovaná GS-doména mění konformaci a fosforyluje, v případě klasické SMAD dependentní signalizace, SMAD2/3 (Sma and mothers against decapentaplegic homolog 2/3) cytosolické signální transduktory, které v cytosolu interagují se SMAD4 a vytváří trimerní komplex. V jádře tento komplex interaguje s vazebnými partnery a reguluje expresi cílových genů, jako jsou např. *Col1a1* a *Col1a2* (collagen type I alpha 1 chain a collagen type I alpha 2 chain), *PAI-1* (plasminogen activator inhibitor type 1), α -SMA (alpha-Smooth muscle actin), *CTGF* connective tissue growth factor) a *SMAD7*¹³⁻¹⁶. Ligand TGF- β rovněž navozuje aktivaci celé řady dalších signálních mediátorů nezávisle na SMAD transkripčním faktoru (mluvíme o tzv. nekanonické TGF- β signální dráze)¹⁷.

Morfogenní evolučně konzervované signální kaskády jako např. Wnt, Hedgehog (Hh) a Notch určují buněčný osud během embryonálního vývoje a tkáňové homeostázy. Za fyziologických podmínek jsou tyto dráhy striktně kontrolovány a v dospělém organismu aktivovány pouze během tkáňové regenerace a obnovy buněk. Jejich patologická aktivace přispívá k rozvoji různých onemocnění, jako je např. SSc¹⁸. Hedgehog (Hh) signální dráha je u savců stimulována pomocí tří různých ligandů: Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) a Sonic hedgehog (Shh). Zda bude signální dráha aktivovat či potlačovat cílovou genovou expresi záleží na rovnováze GLI transkripčních faktorů, které mohou sloužit jako aktivátory (GLI1, GLI2) i represory (GLI2, GLI3) genové exprese. V nepřítomnosti ligandu je Hh signální dráha inaktivovaná vzájemnou interakcí SMO (Smoothed) a PTCH (Patched) receptorů. Navázáním ligandu na PTCH receptor dochází k inhibici blokace SMO receptoru. Fosforylovaný SMO receptor se přesouvá do primárního cilia a přispívá k přesunu SUFU (Suppressor of fused)-GLI proteinového komplexu k ciliárnímu konci, kde je umístěn KIF7 (kinesin-like protein) protein. KIF7 zajišťuje přesun GLI2 a GLI3 aktivátorových forem do jádra. Mezi cílové geny GLI transkripčních faktorů patří např. *Gli1*, *Ptch1*, *Myc*, *cyklin D*. Významné profibrotické mediátory, jako je např. TGF- β , aktivují Hh kaskádu nezávisle na přítomnosti Hh ligandů a SMO receptoru¹⁹⁻²³. Mechanismus integrace jednotlivých signálních profibrotických kaskád a možnosti terapeutického ovlivnění integrujících faktorů jsou předmětem intenzivního výzkumu²⁴.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo studium profibrotických faktorů (především pak Gli2 transkripčního faktoru) a jejich vzájemných interakcí s TGF- β signální dráhou pomocí *in vitro* a *in vivo* analýz.

Specifické cíle práce:

1. Analýza exprese profibrotických faktorů v kožních biopsiích pacientů se SSc a buněčných kulturách dermálních fibroblastů.
2. Analýza exprese profibrotických faktorů v kožních biopsiích a plicní tkáni myších modelů experimentálních fibrózy.
3. Analýza vlivu farmakologické a genetické inhibice profibrotických faktorů na expresi cílových genů a produkci kolagenu buněčnými kulturami dermálních fibroblastů.

4. Analýza vlivu farmakologické a genetické inhibice profibrotických faktorů na rozvoj fibrotických procesů u myších experimentálních modelů fibrózy.

3 MATERIÁL A METODIKA

Použité materiály a metodiky jsou uvedeny v příslušných sekcích originálů prací.

4 VÝSLEDKY

4.1 Role GLI2 transkripčního faktoru v SSc

4.1.1 Exprese GLI2 v dermálních fibroblastech je TGF- β /SMAD3 dependentní

Prokázali jsme, že mRNA a proteinová exprese GLI2 byla zvýšená v kůži SSc pacientů v porovnání se zdravými kontrolami jak na úrovni mRNA, tak i na proteinové úrovni. Tato exprese byla prominentní v P4H β (prolyl 4-hydroxyláza beta) pozitivních fibroblastech. TGF- β indukovaná transformace buněčných kultur lidských dermálních fibroblastů (zobrazená zvýšenou formací stresových vláken) byla doprovázená zvýšenou expresí GLI2 závislou na čase jak na mRNA, tak i na proteinové úrovni. Zvýšená exprese GLI2 proteinu byla rovněž detekována v kůži AdTBRLact (TBRact) experimentálního modelu fibrózy v porovnání s kontrolní skupinou AdlacZ (LacZ). GLI2 pozitivní fibroblasty v postižené kůži SSc pacientů (Supl. 1A) a experimentálního AdTBRLact modelu (Supl.1B) zvýšeně exprimovaly fosforylovanou formu SMAD2/3 (pSMAD2/3). Naopak inaktivace TGFBR1 pomocí SD-208 inhibitoru vedla k potlačení proteinové exprese pSMAD2/3 v experimentálním AdTBRLact (TBRact) modelu (Supl.1B). Dále, inaktivace TGFBR1 pomocí SD-208 inhibitoru v myších experimentálních modelech fibrózy (TBRact, bleomycinem indukovaná fibróza a Tsk-1 model) vedla k narušení zvýšené exprese GLI2 jak na mRNA, tak i na proteinové úrovni (Supl. 2). Zvýšená mRNA (Supl. 3A) a proteinová exprese (Supl. 3B) SHH ligandu v kožních biopsiích myší s bleomycinem indukovanou fibrózou byla pouze částečně narušena inhibicí TGF- β signální dráhy (Supl. 3). Blokace SMAD3 miRNA pomocí specifické siRNA (Supl.4A) vedla k narušení zvýšené mRNA (Supl.4B) a proteinové exprese GLI2 (Supl. 4C) v TGF- β stimulovaných kulturách lidských dermálních fibroblastů. Stejného efektu blokace SMAD3 mRNA (Supl. 4D), tzn. snížené exprese GLI2 na mRNA (Supl.4E) a proteinové úrovni (Supl. 4F), bylo dosaženo v kůži myší s AdTBRLact (TBRact) indukovanou fibrózou. Tato data demonstrují zvýšenou expresi GLI2 transkripčního faktoru v lidských a myších dermálních fibroblastech indukovanou TGF- β /SMAD3 kaskádou.

4.1.2 GLI2 deficientní fibroblasty jsou méně sensitivní k TGF- β indukované aktivaci

Indukce TGF- β cílených genů jak jsou např. Pai-1 a Ctgf byla signifikantně potlačena v myších dermálních fibroblastech, kterým byl geneticky deletován gen pro GLI2. Dále došlo k potlačení myofibroblastové diferenciaci v GLI2 deficientních fibroblastech stimulovaných pomocí TGF- β . Narušená diferenciaci byla reflektována sníženou mRNA a proteinovou expresí α -SMA a formací stresových vláken. Stimulační efekt TGF- β na mRNA expresi Col1a2 a na vylučování kolagenu byl inhibován v GLI2 deficientních fibroblastech. In silico analýzy predikovaly dvě vazná místa pro GLI2 v promotorové oblasti Ctgf a Pai-1 genů (Supl. 5A). Výsledky chromatografického imunoprecipitačního (ChiP) eseje potvrdily „obohacení“ predikovaných vazných míst CTGF promotoru GLI2 proteinem v závislosti na TGF- β (Supl. 5B). Zvýšená vaznost GLI2 proteinu do promotorové oblasti CTGF genu byla narušena inaktivací GLI2 transkripčního faktoru pomocí GANT-61 inhibitoru (Supl. 5B). Aktivita CTGF reportérového eseje byla indukována pomocí TGF- β a tato indukce byla redukována mutací predikovaných vazných míst pro GLI2 (Sup. 5C). Tato data demonstrují sníženou senzitivitu dermálních fibroblastů k TGF- β indukované transformaci a přítomnost vazných míst pro GLI2 transkripční protein v promotorové oblasti TGF- β cílových genů.

4.1.3 Fibroblast specifická delece GLI2 zabraňuje rozvoji TBRact indukované fibrózy

Selektivní delece GLI2 genu v dermálních fibroblastech narušila profibrotický efekt TGF- β signální dráhy *in vivo*. Fibroblast specifická delece GLI2 transkripčního faktoru redukovala ztluštění dermální oblasti kůže, počet myofibroblastů a hydroxyprolinový obsah v myším modelu TBRact indukované fibrózy. Gene-

tická delece GLI2 dále inhibovala zvýšenou expresi TGF- β cílových genů Pai-1 a Ctgf a rovněž Hh cílových genů Ptch1, Ptch2, CyclinD1 a GLI2. Tato data demonstrují GLI2 transkripční faktor jako mediátora patogenních procesů TBRact indukované experimentální fibrózy.

4.1.4 Farmakologická inhibice GLI2 potlačuje TGF- β dependentní aktivaci fibroblastů

GANT-61 (inhibitor GLI indukované transkripce) redukoval stimulační efekt TGF- β na lidské dermální fibroblasty. Indukce TGF- β cílených genů Pai-1 a Ctgf byla signifikantně potlačena přidáním GLI2 selektivního inhibitoru k TGF- β stimulovaným lidským dermálním fibroblastům. Narušená transformace dermálních fibroblastů byla reflektována sníženou expresí α -SMA na mRNA a proteinové úrovni a sníženou formací stresových vláken. Stimulační efekt TGF- β na mRNA expresi Col1a2 a na vylučování kolagenu byl rovněž inhibován. Tyto výsledky potvrzují roli GLI2 transkripčního faktoru v aktivaci fibroblastů a účinnost farmakologického selektivního inhibitoru GLI2 na potlačení transformace dermálních fibroblastů.

4.1.5 Farmakologická inhibice GLI2 narušila rozvoj experimentální kožní a plicní fibrózy

GANT-61 inhibitor redukoval dermální tloušťku, počet myofibroblastů, hydroxyprolinový obsah, expresi TGF- β cílových genů Pai-1 a Ctgf a Hh cílových genů Ptch-1, Ptch-2 CyclinD1 a GLI2 ve fibrotické kůži AdTBR1 (TBRact) myšího experimentálního modelu. Individuální modulace Hh signální dráhy pomocí SMO inhibitoru (vismodegib) nebyla dostatečně účinná pro potlačení rozvoje fibrózy. Farmakologický efekt GLI2 selektivního inhibitoru byl rovněž zkoumán na modelu bleomycinem indukované plicní fibrózy. Léčba pomocí GANT-61, ale ne pomocí vismodegibu, zabránila rozvoji fibrózy, tzn. redukce fibrotických oblastí, hydroxyprolinu, počtu myofibroblastů a exprese cílových genů Hh a TGF- β signálních drah. Tato data demonstrují roli GLI2 transkripčního faktoru v rozvoji plicní a kožní fibrózy a účinnost farmakologického selektivního inhibitoru GLI2, ale ne SMO, na potlačení rozvoje fibrózy. GLI2 transkripční faktor je tudíž aktivovaný nejen klasickou Hh kanonickou signální drahou, ale i nekanonickou kaskádou aktivovanou pomocí TGF- β .

4.2 Tribbles homologue 3 přispívá k rozvoji tkáňové fibrózy TBR3 stimuluje TGF- β kanonickou kaskádu a aktivuje fibroblasty

4.2.1 TBR3 stimuluje TGF- β kanonickou kaskádu a aktivuje fibroblasty

Za účelem funkční analýzy TRB3 v SSc fibroblastech byl TRB3 nadměrně exprimován v buněčných kulturách fibroblastů izolovaných z kožních biopsií zdravých dobrovolníků. TRB3 nadměrná exprese aktivovala kanonickou TGF- β /SMAD signální dráhu v lidských dermálních fibroblastech a indukovala expresi TGF- β cílových genů Pai-1, CTGF, Col1a1, Col1a2 a produkci kolagenu.

4.3 Kompozice TWIST1 dimerů reguluje tkáňovou fibrózu

4.3.1 Modulace TWIST1 transkripčního faktoru reguluje aktivaci fibroblastů

Fibroblasty nadměrně exprimující TWIST1 a stimulované pomocí TGF- β kontraktovaly kolagenové gely s vyšší efektivitou než kontrolní fibroblasty. Blokace TWIST1 mRNA pomocí specifické siRNA vedla k nižší kontraktilní schopnosti TGF- β stimulovaných fibroblastů.

4.4 S100A4 amplifikuje TGF- β indukovanou aktivaci fibroblastů

4.4.1 Fibroblasty sekretovaný S100A4 signalizuje autokrinním a parakrinním způsobem

Zvýšená exprese Col1a1 a Col1a2 a následné vylučování kolagenu indukované pomocí rekombinantního TGF- β byly redukovány přidáním protilátky proti S100A4 k buněčným kulturám lidských fibroblastů.

5 DISKUZE

Výsledky této práce popisují přímý efekt modulace TGF- β signální dráhy na expresi GLI2 transkripčního faktoru v SSc. GLI2 je hlavní transkripční faktor Hh signální dráhy aktivující transkripci cílových genů jako jsou např. *Ptch1/2* a *CyclinD1*. Aktivita GLI2 je regulována kanonickou ale i nekanonickou signální

kaskádou. Nekanonická signální kaskáda není závislá na přítomnosti Hh ligandů a aktivaci SMO a PTCH receptorů. Mezi hlavní mediátory zprostředkávající nekanonickou aktivaci GLI2 transkripčního faktoru patří PI3K, MAPK, Wnt, NF- κ B a TGF- β ¹⁹⁻²³. Role těchto mediátorů je popsána jak v rozvoji a progresi nádorových onemocnění, tak i v patogenezi fibrotických onemocněních ²⁵⁻²⁸. TGF- β /SMAD dependentní aktivace GLI2 transkripčního faktoru byla popsána u různých fibrotických onemocněních ²⁹⁻³⁴. U SSc však tato Hh nekanonická signální kaskáda nebyla prozatím zkoumána.

V disertační práci demonstrují zvýšenou expresi GLI2 transkripčního faktoru v pSMAD2/3 pozitivních dermálních fibroblastech pacientů se SSc a v preklinických modelech experimentální fibrózy. TGF- β , hlavní profibrotický faktor, indukoval zvýšenou expresi GLI2 v dermálních fibroblastech *in vitro*. Naopak inhibice TGFBR1 vedla k potlačení zvýšené exprese GLI2 *in vivo*. Rovněž inaktivace SMAD3, hlavního mediátora TGF- β signální dráhy, zabránila zvýšené expresi GLI2 *in vitro* i *in vivo*. Tyto výsledky potvrzují TGF- β /SMAD3 dependentní expresi GLI2 u jedinců se SSc. Závislost profibrotického efektu TGF- β na aktivaci nekanonické hedgehog signální kaskády byla také potvrzena vazbou GLI2 k promotorové oblasti TGF- β a Hh cílových genů jako jsou *CTGF* a *Pai-1*. Genetická delece *GLI2* vedla k prevenci diferenciaci buněčných kultur fibroblastů. Výsledky těchto *in vitro* experimentů byly následně potvrzeny na myších modelech experimentální fibrózy. Konstitutivní aktivace TGF- β signální dráhy společně s genetickou delecí *GLI2* v kožních fibroblastech vedla k redukované expresi TGF- β cílových genů a klasických ukazatelů kožní fibrózy jako jsou tloušťka dermis, přítomnost myofibroblastů a obsah kolagenu.

Hh signální dráha patří mezi morfogenní evolučně konzervované signalizace určující buněčný osud během embryonálního vývoje a tkáňové homeostázy ³⁵. Zvýšená exprese ligandů, funkční mutace receptorů a deregulace transkripčních faktorů Hh signální dráhy však vede k rozvoji a progresi nejen fibrotických, ale i nádorových, a degenerativních onemocněních ³⁵⁻⁴³. Role kanonické Hh signální dráhy byla v SSc popsána již dříve. SHH, nejvíce studovaný Hh ligand ⁴⁴, stimuloval produkci kolagenu dermálními fibroblasty *in vitro* a jeho nadměrná exprese byla dostatečná k rozvoji experimentální kožní fibrózy *in vivo* ⁴⁵. Naopak inhibice Hh kanonické signalizace, inaktivací SMO receptoru, zabránila rozvoji fibrózy v preklinických zvířecích modelech ⁴⁶. Farmakologická inhibice SMO receptoru vede pouze k částečnému potlačení fibrotických efektů, jelikož neovlivňuje aktivaci GLI2 pomocí TGF- β , tzn. pomocí nekanonické Hh signální dráhy. Toto tvrzení je podpořeno výsledky naší studie, kdy GLI2 inhibitor efektivně potlačil rozvoj kožní i plicní experimentální fibrózy, zatímco efekt SMO inhibitoru byl pouze částečný. Za zmínku stojí také fakt, že GLI2 inhibitor byl dobře tolerován bez výskytu vedlejších efektů ⁴⁷. Účinnost většiny inhibitorů Hh signální dráhy především v léčbě onkologických onemocnění je ve stádiu klinického testování ⁴⁸. Vismodegib, inhibitor SMO receptoru, je prozatím jediným farmakem schváleným pro léčbu dospělých jedinců s basocelulárním karcinomem ⁴⁹. Potvrzená deregulace Hh signální dráhy u SSc, existence farmakologických inhibitorů a slibné výsledky klinických studií otevírají nové možnosti cílené terapie SSc.

Role nově objevených profibrotických molekul u SSc se zabývá další část této disertační práce. Tribbles homologue 3 (TRB3) řadíme mezi pseudokinázy modulující široké škály signálních mediátorů ⁵⁰⁻⁵². Mezi tyto mediátory patří např. SMAD3, hlavní transkripční faktor profibrotické TGF- β signální dráhy. TRB3 udržuje SMAD3 v jádře pomocí přímé interakce se SMAD3-MH2 doménou. Dále formuje komplex se Smurf2 (*Smad ubiquitination regulatory factor*), který je následně degradován. Tímto způsobem dochází k potlačení degradace pSMAD3 ⁵⁰. TRB3 byl rovněž popsán jako mediátor AGEs (advanced glycation end products) indukované exprese kolagenu typu I a III ⁵³. Na základě těchto poznatků byla vytvořena hypotéza o možné roli TRB3 u SSc. S využitím *in vitro* a *in vivo* studií byla potvrzena aktivace fibroblastů pomocí TRB3. TGF- β stimuloval zvýšenou expresi TRB3, který následně aktivoval TGF- β /SMAD signální dráhu v SSc fibroblastech. Tato pozitivní zpětná vazba byla narušena inaktivací TRB3 a SMAD3. Stejný efekt inaktivace TRB3 byl pozorován u experimentálních modelů kožní fibrózy. Nadměrná exprese TRB3 stimulovala aktivaci dermálních fibroblastů, tzn. zvýšenou expresi TGF- β cílových genů, pSMAD3 proteinu a produkci kolagenu, s podobnou efektivitou jako samotný TGF- β . Naopak genetická inaktivace TRB3 inhibovala aktivaci TGF- β cílových genů ⁵⁴. Výsledky této práce charakterizují TRB3 jako jednoho z nových mediátorů TGF- β kanonické signální dráhy.

TWIST1 je členem super-rodiny transkripčních faktorů regulujících především buněčnou diferenciaci. Tyto proteiny hrají esenciální roli v mesenchymální tkáňové odpovědi a mohou indukovat epiteliální me-

zenchymální tranzici (EMT) jako následek tkáňového poranění⁵⁵. Za patologických podmínek vede nadměrná aktivace Twist1 transkripčního faktoru k aktivaci nádorové progresi a tkáňové fibrózy⁵⁶⁻⁵⁸. S využitím experimentálních modelů tkáňové fibrózy, která je nezávislá na EMT, bylo cílem této práce studium role TWIST1 v aktivaci rezidentních fibroblastů, charakteristika molekulární regulace a vyhodnocení TWIST1 jako potenciálního terapeutického cíle. Expres TWIST1 byla zvýšená v SMAD3-pozitivních dermálních fibroblastech pacientů se SSc a v experimentálních modelech kožní fibrózy. TGF- β stimuloval zvýšenou expresi TWIST1, který následně aktivoval fibroblasty pomocí p-38 signální kaskády. Tento efekt byl zprostředkován TWIST1 homodimery. Nicméně, stimulační efekt TGF- β není omezen jen na fibroblasty, ale i na nádorové buněčné linie⁵⁹. TGF- β indukoval formaci TWIST1 homodimerů skrze aktivaci exprese inhibitorů DNA-vazných protein, které mají vysokou afinitu pro E12/E47 a soutěží s TWIST1 o jejich vazebné místo⁶⁰. Genetická delece TWIST1 v dermálních fibroblastech vedla k potlačení rozvoje experimentální fibrózy⁶¹. Nejen TGF- β , ale i další faktory jako je např. tkáňová hypoxie mohou vést ke zvýšené expresi TWIST1. Právě tkáňová hypoxie hraje důležitou roli u SSc^{62,63}. Výsledky této práce popisují novou roli TWIST1 transkripčního faktoru u SSc.

S100A4, rovněž známý jako metastasin, patří do rodiny kalcium vázajících S100 proteinů. Tyto proteiny regulují celou řadu buněčných procesů podstatných pro udržení buněčné homeostázy^{64,65}. Intracelulárně se S100A4 protein podílí na cytoskeletální přestavbě. V extracelulárním prostoru pak reguluje uspořádání ECM⁶⁶. Patologické role S100A4 byla popsána v celé řadě nádorových a autoimunitních onemocnění, jako jsou např. revmatoidní artritida a zánětlivé myopatie⁶⁷⁻⁷¹. Cílem této studie bylo popsání role S100A4 proteinu v patogenesi SSc. Expres S100A4 byla zvýšená v kůži pacientů se SSc a u experimentálních myších modelů SSc. Nadměrná expres S100A4 a stimulace pomocí S100A4 rekombinantního proteinu indukovala transformaci fibroblastů na kolagen produkující myofibroblasty. Genetická delece S100A4 redukovala profibrotický efekt TGF- β a snížila produkci kolagenu fibroblastovými kulturami. Dále zabránila rozvoji fibrózy u myších experimentálních modelů SSc. Specifická monoklonální protilátka snížila expresi TGF- β cílových genů a produkci kolagenu dermálními fibroblasty. Stimulační efekt TGF- β na expresi S100A4 není omezen jen na fibroblasty, ale rovněž na různé typy nádorových buněk^{72,73}. Samotná modulace TGF- β signální dráhy probíhá pravděpodobně skrze přímé interakce S100A4 proteinu a SMAD transkripčního faktoru⁷⁴. Expres S100A4 je rovněž indukována tkáňovou hypoxií⁷⁴. Pro terapeutické využití se S100A4 zdá být vhodným cílem, jelikož genetická delece S100A4 nesnížila bazální produkci kolagenu a tento terapeutický přístup tak nemusí ovlivnit tkáňovou homeostázu. Výsledky této studie poukazují na nový potenciální cíl léčby SSc⁷⁵.

Sirtuiny jsou v zájmu vědeckého bádání především díky jejich vlivu na délku života buňky. Tyto proteiny ovlivňují celou řadu buněčných funkcí jako např. rezistence k stresu, metabolismus, cirkadiální buněčný rytmus a záněť^{76,77}. Sirt1, NAD-dependentní deacetyláza, patří mezi nejvíce studovaný protein regulující transkripci genů skrze histon dependentní epigenetickou modifikaci⁷⁸. Sirt1 rovněž interaguje s transkripčními faktory, jako jsou např. SMAD3 a SMAD7 a aktivuje tak jejich proteazomální degradaci^{79,80}. Sirt1 také reguluje endogenní odpověď na oxidativní stres, který hraje klíčovou roli v patogenesi SSc⁸¹. Na základě těchto poznatků byla vytvořena hypotéza o roli Sirt1 v patogenesi SSc. Expres Sirt1 byla snížena v kůži pacientů se SSc i v případech myších experimentálních modelů. Aktivace Sirt1 vedla ke zvýšené aktivitě SMAD reportérového konstruktů, zvýšené transkripci TGF- β cílových genů a produkci kolagenu. Blokace Sirt1 mRNA pomocí specifické siRNA indukovala inhibici TGF- β /SMAD signální dráhy a redukci syntézy kolagenu in vitro a in vivo. I přestože byla expres Sirt1 v tkáni pacientů snížena, Sirt1 není pravděpodobně schopný přerušit excesivní aktivaci TGF- β signální dráhy. Dodatečná inhibice Sirt1 pomocí siRNA však vedla k narušení profibrotických mechanismů TGF- β signální kaskády⁸². Sirt1 negativně reguluje expresi Smad7, endogenního inhibitoru kanonické SMAD signální dráhy a může tudíž přispívat k aktivaci TGF- β /SMAD signální dráhy⁸³. Sirt1 rovněž potlačuje expresi PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gama), významného inhibitora TGF- β /SMAD signální kaskády⁸⁴ a také transkripčního faktoru Nrf2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2), který má antioxidační účinky^{85,86}. Zatímco genetická inaktivace Sirt1 zabránila aktivaci rezidentních fibroblastů⁸⁷, v epiteliálních buňkách ledvin aktivovala EMT⁸⁸. Role Sirt1 je tudíž závislá na buněčném typu a orgánovém systému. Sirt1 má pravděpodobně profibrotický efekt v orgánových systémech, ve kterých je vznik fibrózy závislý na aktivaci

fibroblastů, zatímco v epiteliálních orgánech jako jsou ledviny, zabraňuje Sirt1 EMT epiteliálních buněk a limituje tak fibrózu.

6 ZÁVĚR

Předložená disertační práce demonstruje jako první existenci nekanonické Hh signální dráhy u SSc. Dále popisuje roli nových profibrotických mediátorů (TRB3, TWIST1, S100A4, Sir1) v patogenezi SSc. Výsledky této disertační práce přispěly k charakterizaci nových potenciálních terapeutických cílů SSc.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

- s impakt faktorem (IF)
 1. Liang R*, Sumova B*, Cordazzo C., Palumbo-Zerr K, Mallano T, Chen CW, Zhang Y, Wohlfahrt T, Dees C, Ramming A, Distler O, Schett G, Senolt L, Distler JHW; The transcription factor GLI2 as a downstream mediator of transforming growth factor- β -induced fibroblast activation in SSc. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 756–764. * contributed equally (IF: 12.384)
 2. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Sumova B, Avouac J, Dees C, Distler A, Becvar R, Distler O, Schett G, Senolt L, Distler JHW. Tribbles homologue 3 stimulates canonical TGF- signalling to regulate fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2015; 1–8. (IF: 12.384)
 3. Palumbo-Zerr K, Zerr P, Liebl A, Mancuso R, Tomcik M, Sumova B, Distler A, Gelse K, Distler O, Schett G, Distler JHW; Composition of TWIST1 dimers regulates fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 244–251. (IF: 12.384)
 4. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Sumova B, Distler A, Beyer C, Cerezo LA, Becvar R, Distler O, Grigorian M, Schett G, Senolt L Distler JHW; S100A4 amplifies TGF- β -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2014; 1–8. (IF: 12.384)
 5. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Huang J, Tomcik M, Sumova B, Distler O, Schett G, Distler JHW; Sirt1 regulates canonical TGF- β signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 226–233. (IF: 12.384)

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

- s impakt faktorem (IF)
 1. Senolt L, Sumova B, Jandova R, Hulejova H, Mann H, Pavelka K, Vencovsky J, Filková M. Interleukin 35 Synovial Fluid Levels Are Associated with Disease Activity of Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2015; 10: e0132674. (IF: 3.057)
 2. Andres Cerezo L*, Sumova B*, Prajzlerova K, Veigl D, Damgaard D, Nielsen CH, Pavelka K, Vencovsky J, Senolt L. Calgizzarin (S100A11): a novel inflammatory mediator associated with disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 79. * contributed equally (IF: 3.979)
 3. Senolt L, Cerezo LA, Sumova B, Pecha O, Plestilova L, Forejtova S, Ruzickova O, Husakova M, Zavada J, Pavelka K, Vencovsky J, Mann H.. High levels of metastasis-inducing S100A4 protein and treatment outcome in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort. *Biomarkers Biochem Indic Expo response, susceptibility to Chem* 2015; 20: 47–51. (IF: 2.016)
 4. Šenolt L, Prajzlerová K, Hulejová H, **Sumova B**, Filkova M, Veigl D, Pavelka K, Vencovsky J, Interleukin-20 is triggered by TLR ligands and associates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2017; 97: 187–192. **(IF: 3.488)**

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1809–1815.

2. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: Systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2014; 44: 208–219.
3. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1956–1963.
4. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1359–1362.
5. Allanore Y, Matucci-Cerinic M, Distler O. Treatment of systemic sclerosis: is there any hope for the future? *RMD open* 2016; 2: e000260.
6. Allanore Y, Simms R, Distler O, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Prim* 2015; 1: 15002.
7. Gabrielli A, Avvedimento E V., Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360: 1989–2003.
8. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor β as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 200–206.
9. Lafyatis R. Transforming growth factor β —at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10: 706–719.
10. Mauviel A. Transforming Growth Factor- β Signaling in Skin: Stromal to Epithelial Cross-Talk. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 7–9.
11. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent Developments in Myofibroblast Biology. *Am J Pathol* 2012; 180: 1340–1355.
12. Shi M, Zhu J, Wang R, et al. Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 2011; 474: 343–9.
13. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 2004; 113: 253–264.
14. Zhou F, Drabsch Y, Dekker TJA, et al. Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nat Commun* 2014; 5: 3388.
15. Javelaud D, Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF- β : implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 5742–5750.
16. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685–700.
17. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res* 2009; 19: 128–139.
18. Beyer C, Distler JHW. Morphogen Pathways in Systemic Sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15: 299.
19. Gu D, Xie J. Non-Canonical Hh Signaling in Cancer-Current Understanding and Future Directions. *Cancers (Base)* 2015; 7: 1684–98.
20. Wang Y, Jin G, Li Q, et al. Hedgehog Signaling Non-Canonical Activated by Pro-Inflammatory Cytokines in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Cancer* 2016; 7: 2067–2076.
21. Dennler S, André J, Alexaki I, et al. Induction of Sonic Hedgehog Mediators by Transforming Growth Factor- β : Smad3-Dependent Activation of Gli2 and Gli1 Expression In vitro and In vivo. *Cancer Res*; 67 <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/14/6981> (2007, accessed 7 June 2017).
22. Maitah MY, Ali S, Ahmad A, Gadgeel S, Sarkar FH, Neilson E. Up-Regulation of Sonic Hedgehog Contributes to TGF- β 1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in NSCLC Cells. *PLoS One* 2011; 6: e16068.
23. Fan Q, He M, Sheng T, et al. Requirement of TGFbeta signaling for SMO-mediated carcinogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285: 36570–6.
24. Leask A. Possible strategies for anti-fibrotic drug intervention in scleroderma. *J Cell Commun Signal* 2011; 5: 125–9.
25. Madala SK, Schmidt S, Davidson C, Ikegami M, Wert S, Hardie WD. MEK-ERK pathway modulation ameliorates pulmonary fibrosis associated with epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46: 380–388.
26. Kral JB, Kuttke M, Schrottmaier WC, et al. Sustained PI3K Activation exacerbates BLM-induced Lung Fibrosis via activation of pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways. *Sci Rep* 2016; 6: 23034.

27. Miao C, Yang Y, He X, et al. Wnt signaling in liver fibrosis: Progress, challenges and potential directions. *Biochimie* 2013; 95: 2326–2335.
28. Sunami Y, Leithäuser F, Gul S, et al. Hepatic activation of IKK/NF κ B signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. *Hepatology* 2012; 56: 1117–1128.
29. Moshai EF, Wémeau-Stervinou L, Cigna N, et al. Targeting the Hedgehog-Glioma-Associated Oncogene Homolog Pathway Inhibits Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 51: 11–25.
30. Maitah MY, Ali S, Ahmad A, Gadgeel S, Sarkar FH, Neilson E. Up-Regulation of Sonic Hedgehog Contributes to TGF- β 1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in NSCLC Cells. *PLoS One* 2011; 6: e16068.
31. Javelaud D, Pierrat M-J, Mauviel A. Crosstalk between TGF- β and hedgehog signaling in cancer. *FEBS Lett* 2012; 586: 2016–2025.
32. Javelaud D, Alexaki VI, Dennler S, Mohammad KS, Guise TA, Mauviel A. TGF- β /SMAD/GLI2 Signaling Axis in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Res*; 71<http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/17/5606> (2011, accessed 27 June 2017).
33. Lauth M, Toftgård R. Non-Canonical Activation of GLI Transcription Factors: Implications for Targeted Anti-Cancer Therapy. *Cell Cycle* 2007; 6: 2458–2463.
34. Dennler S, André J, Alexaki I, et al. Induction of Sonic Hedgehog Mediators by Transforming Growth Factor- β : Smad3-Dependent Activation of Gli2 and Gli1 Expression In vitro and In vivo. *Cancer Res*; 67<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/14/6981> (2007, accessed 27 June 2017).
35. Jiang J, Hui C. Hedgehog Signaling in Development and Cancer. *Dev Cell* 2008; 15: 801–812.
36. Hu L, Lin X, Lu H, Chen B, Bai Y. An Overview of Hedgehog Signaling in Fibrosis. *Mol Pharmacol Mol Pharmacol* 2015; 87: 174–182.
37. Bai Y, Bai Y, Dong J, et al. Hedgehog Signaling in Pancreatic Fibrosis and Cancer. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e2996.
38. Neureiter D. New in Hedgehog signaling: A possible role in aging, and chronic degenerative and inflammatory diseases? (Comment on DOI 10.1002/bies.201200049). *BioEssays* 2012; 34: 828–829.
39. Dashti M, Peppelenbosch MP, Rezaee F. Hedgehog signalling as an antagonist of ageing and its associated diseases. *BioEssays* 2012; 34: 849–856.
40. Bolaños A, Milla C, Lira J, et al. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303: L978–L990.
41. Sicklick JK, Li Y-X, Choi SS, et al. Role for Hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability. *Lab Invest* 2005; 85: 1368–1380.
42. Fabian SL, Penchev RR, St-Jacques B, et al. Hedgehog-Gli Pathway Activation during Kidney Fibrosis. *Am J Pathol* 2012; 180: 1441–1453.
43. Kramann R, Fleig S V., Schneider RK, et al. Pharmacological GLI2 inhibition prevents myofibroblast cell-cycle progression and reduces kidney fibrosis. *J Clin Invest* 2015; 125: 2935–2951.
44. Lum L, Beachy PA. The hedgehog response network: Sensors, switches, and routers. *Science* 2004; 304: 1755–1759.
45. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, et al. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2724–2733.
46. Distler A, Lang V, Del Vecchio T, et al. Combined inhibition of morphogen pathways demonstrates additive antifibrotic effects and improved tolerability. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1264–1268.
47. Liang R, Šumová B, Cordazzo C, et al. The transcription factor GLI2 as a downstream mediator of transforming growth factor- β -induced fibroblast activation in SSc. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 756–764.
48. Hanna A, Shevde LA. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Mol Cancer* 2016; 15: 24.
49. Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, et al. Inhibiting the Hedgehog Pathway in Patients with the Basal-Cell Nevus Syndrome. *N Engl J Med* 2012; 366: 2180–2188.
50. Hua F, Mu R, Liu J, et al. TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *J Cell Sci*; 124<http://jcs.biologists.org/content/124/19/3235> (2011, accessed 7 June 2017).

51. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998; 12: 982–95.
52. Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, et al. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science* 2006; 312: 1763–6.
53. Tang M, Zhong M, Shang Y, et al. Differential regulation of collagen types I and III expression in cardiac fibroblasts by AGEs through TRB3/MAPK signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2924–2932.
54. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. Tribbles homologue 3 stimulates canonical TGF- β signalling to regulate fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 609–616.
55. Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2 α . *Oncogene* 2008; 27: 1501–1510.
56. Pozharskaya V, Torres-González E, Rojas M, et al. Twist: A Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Fibrosis. *PLoS One* 2009; 4: e7559.
57. Kida Y, Asahina K, Teraoka H, Gitelman I, Sato T. Twist Relates to Tubular Epithelial-Mesenchymal Transition and Interstitial Fibrogenesis in the Obstructed Kidney. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 661–673.
58. Kang Y, Massagué J, Donaher JL, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277–9.
59. Cho KH, Jeong KJ, Shin SC, Kang J, Park CG, Lee HY. STAT3 mediates TGF- β 1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion. *Cancer Lett* 2013; 336: 167–173.
60. Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 2002; 287: 11–22.
61. Palumbo-Zerr K, Soare A, Zerr P, et al. Composition of TWIST1 dimers regulates fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 244–251.
62. Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2 α . *Oncogene* 2008; 27: 1501–1510.
63. Distler JHW, Jüngel A, Pileckyte M, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 4203–4215.
64. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637–68.
65. Heizmann CW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002; 7: d1356.
66. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1111–1122.
67. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 2006; 281: 677–80.
68. Andres Cerezo L, Kuncova K, Mann H, et al. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology* 2011; 50: 1766–1772.
69. Klingelhöfer J, Šenolt L, Baslund B, et al. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: Putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 779–789.
70. Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, et al. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1645–1648.
71. Andrés Cerezo L, Remáková M, Tomčík M, et al. The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)* 2014; 53: 1520–1526.
72. Xie R, Schlumbrecht MP, Shipley GL, Xie S, Bassett RL, Broaddus RR. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling. *Lab Invest* 2009; 89: 937–947.
73. Kawakita T, Espana EM, Higa K, Kato N, Li W, Tseng SCG. Activation of Smad-mediated TGF- β signaling triggers epithelial-mesenchymal transitions in murine cloned corneal progenitor cells. *J Cell Physiol* 2013; 228: 225–234.

74. Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int* 2010; 30: 669–682.
75. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. S100A4 amplifies TGF- β -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 1748–1755.
76. Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD. Sirtuins – novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 841–853.
77. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 225–38.
78. Pillarisetti S. A review of Sirt1 and Sirt1 modulators in cardiovascular and metabolic diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2008; 3: 156–64.
79. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, et al. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem* 2007; 282: 151–158.
80. Li J, Qu X, Ricardo SD, Bertram JF, Nikolic-Paterson DJ. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: potential role in deacetylation of Smad3. *Am J Pathol* 2010; 177: 1065–71.
81. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 3834–3859.
82. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Huang J, et al. Sirt1 regulates canonical TGF- β signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 226–233.
83. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, et al. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem* 2007; 282: 151–8.
84. Wei J, Bhattacharyya S, Varga J. Peroxisome proliferator-activated receptor γ : innate protection from excessive fibrogenesis and potential therapeutic target in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2010; 22: 671–6.
85. Wei J, Zhu H, Lord G, et al. Nrf2 exerts cell-autonomous antifibrotic effects: compromised function in systemic sclerosis and therapeutic rescue with a novel heterocyclic chalcone derivative. *Transl Res* 2017; 183: 71–86.e1.
86. Huang K, Huang J, Xie X, et al. Sirt1 resists advanced glycation end products-induced expressions of fibronectin and TGF- β 1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 528–540.
87. Huang X-Z, Wen D, Zhang M, et al. Sirt1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad3 pathway. *J Cell Biochem* 2014; 115: 996–1005.
88. Simic P, Williams E, Bell E, Gong J, Bonkowski M, Guarente L. SIRT1 Suppresses the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis and Organ Fibrosis. *Cell Rep* 2013; 3: 1175–1186.



Summary of Ph.D. Thesis

Study of extracellular placental specific microRNAs in maternal circulation and their utilization in clinical diagnostics of pregnancy-related complications

Mgr. Kateřina Kotlabová

*Department of Molecular Biology and Cell Pathology
Third Faculty of Medicine and Institute for the Care of the Mother and Child, Prague*

Supervisor: Prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

ABSTRACT

Objectives: We investigated the possible utilization of extracellular microRNAs as novel non-invasive biomarkers for diagnostics of pregnancy-related complications such as gestational hypertension (GH), preeclampsia (PE) and fetal growth restriction (FGR). First, we identified appropriate pregnancy-associated (placenta specific) microRNAs in maternal circulation in pregnancies with normal course of gestation. Then, we quantified selected extracellular C19MC microRNAs in maternal circulation overtime in normally progressing pregnancies. Subsequently, we compared C19MC microRNA expression profiles in maternal circulation between pregnancies with clinically established pregnancy-related complications (PE, FGR, GH) and gestational-age-matched controls. Finally, monitoring of selected placenta specific C19MC microRNAs in maternal circulation within the first trimester of gestation was performed with the aim to identify extracellular C19MC microRNAs able to differentiate between normal pregnancies and those at risk of subsequent development of pregnancy-related complications.

Methods: The levels and expression profiles of extracellular placental specific microRNAs in circulation of non-pregnant individuals and pregnant women were performed using real-time RT-PCR. The selection of appropriate pregnancy associated microRNAs with the diagnostical potential was based on following criteria: (1) detection rate of 100 % in term placentas, (2) detection rate of ≥ 67 % in maternal plasma throughout gestation and (3) detection rate of 0 % in whole peripheral blood and plasma samples of non-pregnant individuals.

Results: We finally identified 7 extracellular C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, and miR-526a) that were simultaneously negative in peripheral blood samples derived from healthy non-pregnant women and were strongly positive in maternal circulation throughout the whole period of gestation. Increased plasmatic levels and gene expression of 5/7 C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517*, miR-520a*, miR-525, and miR-526a) were observed in women with established preeclampsia, whereas neither plasmatic levels nor gene expression of these C19MC microRNAs differed between control cohort and patients with FGR and GH. First trimester screening approach based on the combination of two placental specific C19MC microRNAs (miR-520h and miR-518b) was able to identify women at risk of subsequent development of GH with a PPV of 82.6% at a specificity of 92.9%. The miR-517-5p biomarker alone had a predictive performance for preeclampsia with a sensitivity of 42.9%, a specificity of 86.2%, a PPV of 52.9%, and a NPV of 80.6%.

Conclusion: Extracellular C19MC microRNA biomarkers were identified that could confirm the diagnosis of preeclampsia or predict later occurrence of GH and preeclampsia. Early diagnosis may afford benefits such as to start early treatment or even to start early prevention of later development of pregnancy-related disorders.

INTRODUCTION

MicroRNAs and their function in gene expression regulation

Previous decades unveiled a number of important cellular roles for diverse subset of non-coding RNA (ncRNA) molecules, among them short RNAs called microRNAs, that are not translated into a protein product, but function as critical structural molecules or regulators of various cellular processes. MicroRNAs as molecules with regulatory function were described, for the first time, in nematode worm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Works by Chalfie et al. (1981) and Ambros (1989) revealed a gene *lin-4* that is important for normal larval development of *C. elegans*, since it is responsible for the progressive repression of the *lin-14* protein levels in first larval stage. Mutant *C. elegans* worms deficient in *lin-4* function had persistently high levels of *lin-14* and displayed developmental timing defects, however, the mechanism for control of *lin-14* expression remained unknown.

Later, in 1993, Lee and colleagues found that *lin-4* does not encode a regulatory protein, but it gives rise to transcripts, which are complementary to sequences in the 3' untranslated region (3'UTR) of the messenger RNA encoding the *lin-14* protein and can regulate *lin-14* mRNA translation via antisense RNA:mRNA interaction. Since research in the field of short regulatory RNAs rapidly progressed, nowadays more than 2588 mature microRNAs were identified.

Human microRNAs are located in all chromosomes except Y chromosome and are non-randomly distributed in the human genome. The genomic distribution of microRNA genes is characterized by the presence of families of several identical or closely related mature microRNAs, encoded within the same genomic cluster. Up to 60% of known human microRNA genes are found in clusters carrying from two to as many as 46 microRNAs. MicroRNAs encoded by genomic cluster frequently contain high sequence homology, particularly within the seed sequence, shared common regulatory regions and are transcribed as polycistronic primary transcripts (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al. 2001).

Depending on their genomic origin microRNAs can be categorized into four sub-types such as intergenic, intronic, exonic, and others (Ying et al., 2010; Chien et al., 2011). The last three categories can be commonly termed as intragenic microRNAs.

Intergenic microRNAs are transcribed from intergenic regions or gene deserts (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Saini et al., 2008; Corcoran et al., 2009) between two consecutive protein coding genes and they have their own promoters like the coding genes and the same transcription factors (Lee et al., 2004; Aguda et al., 2008; Pichiorri et al., 2010; Wang et al., 2010).

Intragenic microRNAs can be located within introns or exons (Erdmann et al. 2000; Rodriguez et al., 2004; Saini et al., 2008; Corcoran et al., 2009). Intragenic microRNA precursors located within introns, exons or untranslated regions (UTRs) of protein-coding transcripts are preferentially in the same orientation as the host gene, therefore these microRNAs share common promoters with their host genes and are expressed simultaneously (Beskerville et al., 2005; Rodriguez et al., 2004; Wang et al., 2009; Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al. 2003, Lai et al. 2003, Lim et al. 2003).

Human microRNA biogenesis is a two-step process, taking place in both, nuclear and cytoplasmic compartments, performed by two RNase III endonucleases, Drosha and Dicer (Denli et al., 2004; Du and Zamore, 2005; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Hutvagner et al., 2004; Lee et al., 2002; Lee et al., 2003). The microRNA gene is transcribed to produce primary microRNA (pri-microRNA) transcript containing stem-loop structured precursor microRNA (pre-microRNA) that is subsequently processed to form microRNA duplex (microRNA:microRNA* duplex; passenger strand is designated with asterisk) which finally delivers mature microRNA (Bartel and Chen, 2004). The single strand mature microRNA is incorporated into the final effector protein complex RISC (RNA induced silencing complex) (Bartel, 2004). This complex binds microRNA specifically, through Watson-Crick base-pairing, to 3'UTR (untranslated region) of the target mRNA and negatively regulate its expression (Wightman et al., 1993; Lee and Ambros,

1993). A single microRNA guide can regulate several mRNA targets and conversely multiple microRNAs can cooperatively regulate a single mRNA target (Bartel, 2004).

Extracellular microRNAs

For the first time, extracellular microRNAs were described in serum and plasma by Lawrie et al., who detected microRNAs in serum of patients with lymphomas (Lawrie et al., 2008) and Mitchell et al. (2008), who demonstrated the presence of stable microRNAs in the human plasma of healthy subjects and prostate cancer patients. MicroRNAs were subsequently detected in other body fluids and biological samples including saliva (Park et al., 2009), sperm (Li et al., 2012), urine (Hanke et al., 2010) and milk (Pigati et al., 2010).

Further research confirmed the high stability of microRNAs in bodily fluids (Turchinovich et al., 2011; Park et al., 2009; Chen et al., 2008). These observations indicate that microRNAs are protected in the extracellular environment against the effects of RNases and degradation.

Extracellular microRNAs were detected in exosomes (Valadi et al., 2007), microvesicles and apoptotic bodies in peripheral blood samples (Hunter et al., 2008). It was shown later that most extracellular microRNAs are located outside the membrane vesicles in the complex with the Ago2 or NPM1 proteins (Arroyo et al., 2011). A small fraction of extracellular microRNAs was also detected in human plasma in complex with HDL particles (Vickers et al., 2011).

Extracellular microRNAs, which are bound only to protein complexes, are apparently released to extracellular environment passively during cell death (Turchinovich et al., 2012), however active export of microRNA-protein complexes was also described (Wang et al., 2010). MicroRNAs are further secreted into the extracellular environment through microvesicles and apoptotic bodies. It was found that the microRNA spectrum in vesicles not always have correlate with the microRNA profile in the original cells because selective secretion of specific microRNAs is applied (Wang et al., 2010).

microRNAs in normal pregnancy

During pregnancy, development of the highly specialized vital fetal organ – placenta, in maternal body is crucial to support normal growth and development of the fetus (Gude et al., 2004).

Numerous studies have shown that a large number of microRNAs is expressed in trophoblast cells and human placental tissue.

Placenta expresses a large number of ubiquitous as well as specific microRNAs, such as the members of chromosome 19 microRNA cluster (C19MC), chromosome 14 microRNA cluster (C14MC) and miR-371-3 cluster that are almost exclusively or preferentially expressed in the placenta (Morales-Prieto et al., 2012; Donker et al., 2012).

MicroRNAs regulate trophoblast cell proliferation and apoptosis during placental development. While several microRNAs were reported to enhance trophoblast cell proliferation and/or survival (Luo et al., 2012; Pineles et al., 2007; Morales-Prieto et al., 2011; Segura et al., 2009), other microRNAs act in the opposite way (Li et al., 2013; Dai et al., 2012; Gao et al., 2012; Keniry et al., 2012). Migration and invasion of extravillous trophoblasts (EVTs) to the decidua and myometrium, the critical events during placentation (Chelbi et al., 2008), are influenced by microRNAs, that can exert positive effect (miR-195, miR-376c, and miR-378a-5p)(Fu et al., 2013; Luo et al., 2012) as well as negative effect (miR-210, miR-34a, and miR-29b) (Zhang et al., 2012; Umemura et al., 2013; Pang et al., 2010; Li et al., 2013) on trophoblast cell migration and invasion by modulating the activity of signalling pathways, enzymes, and adhesion molecules.

In 2009, Luo et al. demonstrated that microRNAs produced by human trophoblast cells can be secreted into maternal plasma or serum through an exosome-mediated pathway (Luo et al., 2009). Further studies confirmed that trophoblast-specific and nonspecific microRNAs are released to the extracellular fluid and are detectable in maternal circulation during pregnancy. For example, Chim et al. (2008) confirmed that 4 miRNAs from tested set with the highest expression in placenta (miR-141, miR-149, miR-299-5p, and miR-135b) were also detected in maternal plasma, with the highest expression rates in late pregnancy (near before the delivery), and with significantly reduced detection rates in postdelivery plasma (Chim et al., 2008). Gilad et al. (2008) reported that serum levels of three placental microRNAs (miR-526a, miR-527, and miR-520d-5p) allowed accurate differentiation between pregnant and non pregnant women (Gilad et

al., 2008). Miura et al. (2010) revealed significant increase in plasma concentration of C19MC microRNAs (miR-515-3p, miR-517a, miR-517c, miR-518b, miR-526b) with advancing pregnancy.

Pregnancy-related complications

Hypertensive disorders of pregnancy (HDP) are among the main medical problems encountered during pregnancy (Jim et al., 2010), occurred in about 20.7 million of women in 2013 (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2015). It is estimated that about 10% of pregnancies are complicated by hypertensive disorders worldwide with rates increasing in developing world (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee, 2011; Lo et al., 2013).

Gestational hypertension

– is characterized as new-onset elevation of blood pressure after 20 weeks of gestation, without the presence of proteinuria or other signs of preeclampsia, however approximately 50% of women diagnosed with gestational hypertension between 24 and 35 weeks' gestation ultimately develop preeclampsia (Barton et al., 2001). The failure of blood pressure to normalize postpartum requires changing the diagnosis to chronic hypertension.

Preeclampsia (PE)

– complicates 3-8% of pregnancies worldwide (Kanasaki et al., 2009; Uzan et al., 2011; Sibai, 2005), however geographic, social, economic, and racial differences are thought to be responsible for incidence rates up to 3 times higher in some populations (Sibai 2005). Preeclampsia is one of the leading causes of maternal, as well as perinatal morbidity and mortality, especially in developing countries (Chelbi and Vaiman, 2008; Berg et al., 2009; MacKay et al., 2001), probably accounts for 50,000 - 76,000 maternal and 500,000 infant deaths worldwide every year (Duley, 2005; Ghulmiyyah and Sibai, 2012; Whitworth, 2003).

The sequence of events that leads to the development of PE may be explained by two stages: first (placental) stage, which occurs early in pregnancy, is characterized by defective trophoblastic invasion causing inadequate remodelling of maternal spiral arteries resulting in a deficient maternal blood supply to the placenta, that causes placental ischemia and hypoxia with local oxidative stress reaction. Following second (peripheral) stage results in a systemic inflammatory response and endothelial dysfunction (Sargent et al., 2006), and leads to the onset of the clinical symptoms of PE (Ness and Roberts, 1996; Sargent et al., 2006).

Fetal growth restriction

Fetal growth restriction (FGR) is a common pregnancy-related complication characterized as failure of a fetus to reach its growth potential, which occurs in 3–10% of all pregnancies, representing one of the leading causes of perinatal morbidity and mortality (Bernstein et al., 2000).

Small for gestational age (SGA) and FGR refers to the fetus who does not achieve the expected in utero growth potential due to multiple factors, involving genetic or environmental factors. SGA and FGR are defined as an estimated fetal weight below 10th percentile.

Dysregulation of microRNA expression in pregnancy-related complications

Recognizing the importance of microRNA expression for the development of pregnancy-related complications is a relatively recent phenomenon, dating to 2007, when the first study on altered placental microRNA expression in PE pregnancies was published (Pineles et al., 2007). Subsequent studies have reported aberrant expression of both, abundant and placenta-specific microRNAs in placental tissues in various pregnancy-related complications such as PE and FGR/IUGR.

Women with preeclampsia exhibit, for example increased placenta expression levels of **miR-210** typically induced by HIF-1 α (Zhang et al., 2012; Pineles et al., 2007; Muralimanoharan et al., 2012; Ishibashi et al., 2012; Enquobahrie et al., 2011; Xu et al., 2014; Zhu et al., 2009). Elevated levels of placental miR-210 may contribute to the pathogenesis of preeclampsia (Anton et al., 2013; Muralimanoharan et al., 2012; Colleoni et al., 2013; Myatt et al., 2014; Kopriva et al., 2013).

A link between up-regulation of **miR-155** in preeclamptic placentas (Pineles et al., 2007; Zhang et al., 2010), and the innate immune response has been suggested.

The expression of **miR-141** is elevated in FGR placental tissues, suggesting that this microRNA may play important roles in pathogenesis of the disease by suppressing several target genes such as E2F transcription factor 3 (*E2F3*) and pleomorphic adenoma gene 1 (*PLAG1*).

In FGR placentas, hypoxia significantly increases levels of **miR-424**, which results in reduction of both mRNA and protein levels of mitogen-activated protein kinase 1 (MEK1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1). Since FGFR1 mediates functions of VEGF, it is possible that increased levels of miR-424 contribute to FGR by affecting normal vascularity in placenta (Huang et al., 2013).

AIMS OF THE THESIS

The primary objective of this work was to investigate the possible utilization of recently discovered small non-coding RNA molecules, called microRNAs, as novel non-invasive biomarkers for diagnostics of severe pregnancy-related complications associated with placental insufficiency (preeclampsia and/or fetal growth restriction). Since early and correct diagnosis may afford benefits such as to start early treatment or even prevention of placental-insufficiency related disorders, the discovery of new biomarkers with high sensitivity and specificity remains the desired golden grail in the field of non-invasive prenatal diagnosis (NIPD). To try to achieve this goal, we have performed the following studies:

- Identification of appropriate pregnancy-associated (placenta specific) microRNAs in maternal circulation in pregnancies with normal course of gestation
- Quantification of selected extracellular C19MC microRNAs in maternal circulation overtime in normally progressing pregnancies
- Comparison of C19MC microRNA expression profiles in maternal circulation between pregnancies with clinically established pregnancy-related complications (PE, FGR, GH) and gestational-age-matched controls
- Monitoring of selected placenta specific C19MC microRNAs in maternal circulation within the first trimester of gestation and subsequent identification of extracellular C19MC microRNAs able to differentiate between normal pregnancies and those at risk of subsequent development of pregnancy-related complications

MATERIALS AND METHODS

Materials and methods are entirely described in full-text version of Ph.D. thesis and in related manuscripts. We can summarize them as follows:

- Collection of peripheral blood and placenta samples
- total RNA was extracted from 1 ml of maternal plasma and placenta samples and highly enriched for small RNAs
- detection of pregnancy-associated microRNAs using two-step quantitative real-time RT-PCR
- both, absolute and relative quantification approaches were used for data evaluation
- receivers operating characteristic (ROC) curves were constructed
- function and functional relationship analysis of predicted targets of extracellular C19MC microRNAs was performed

RESULTS

Identification of appropriate pregnancy-associated (placenta specific) microRNAs in maternal circulation in pregnancies with normal course of gestation

The selection of appropriate pregnancy associated microRNAs with the diagnostical potential was based on following criteria:

- (1) detection rate of 100 % in full-term placentas,
- (2) detection rate of ≥ 67 % in maternal plasma throughout gestation (at least 4 positive wells out of 6 tested wells), and
- (3) detection rate of 0 % in whole peripheral blood and plasma samples of non-pregnant individuals.

From 20 selected microRNAs, all were reliably detectable in the fetal part of the placenta; however, microRNAs with late amplification in the placenta (miR-136 and miR-519a) were undetectable in maternal plasma. On the base of our selection criteria, microRNAs that were detected in blood cells of healthy non-pregnant women (miR-34, miR-224, miR-512-5p, miR-515-5p, miR-518f*, miR-519d, and miR-519e) as well as microRNAs with negative and/or inconsistent results in maternal circulation throughout gestation (miR-34c, miR-136, miR-372, miR-518f*, miR-519e, miR-524-5p, miR-519a, and miR-526b) were excluded from further analysis.

We finally identified seven extracellular C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, and miR-526a) that were simultaneously negative in the whole peripheral blood and plasma samples derived from healthy non-pregnant women (10 negative wells out of 10 tested wells) and were strongly positive in maternal circulation throughout the whole period of gestation.

These seven extracellular C19MC microRNAs (**miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, and miR-526a**) were identified to be pregnancy associated microRNAs with diagnostic potential.

Quantification of selected extracellular C19MC microRNAs in maternal circulation overtime in normally progressing pregnancies

Using both absolute and relative quantification approaches, we explored extracellular C19MC microRNA levels in maternal plasma samples harvested during the first, second and third trimesters from normally progressing pregnancies. Increasing levels of all examined C19MC microRNAs were observed throughout gestation in normal pregnancies (accompanying progression of gestation from the first to the third trimester), which may be linked to the growing mass of the placenta. In accordance with that highest concentrations and expression of circulating placental specific C19MC microRNAs were observed during the third trimester of gestation.

Unfortunately, absolute and relative quantification approaches of C19MC microRNAs in maternal plasma samples derived from normal pregnancies and those with onset of pregnancy-related complications showed no statistically significant difference between the cohorts.

Subsequently, plasma samples derived at various gestational stages from pregnancies that later developed placental insufficiency related complications (1 IUGR, 5 PE, 1 PE and IUGR) revealed significant elevation of extracellular microRNA levels and expression in maternal circulation during early gestation in all cases (between 12th and 16th weeks of gestation). During late gestation (from the 20th week until term) the levels of extracellular microRNAs decreased significantly until they finally reached the corresponding levels of gestational-age-matched normal pregnancies.

The data obtained in this pilot study suggests the potential of extracellular C19MC microRNAs to differentiate, at the beginning of gestation, between patients at risk of later development of placental insufficiency related complications and normal pregnancies.

Comparison of C19MC microRNA expression profiles in maternal circulation between pregnancies with clinically established pregnancy-related complications (PE, FGR, GH) and gestational-age-matched controls

The follow-up study on C19MC microRNA plasmatic levels and gene expression profiles performed on large cohort of patients that can be subdivided into various most specific subgroups showed significant results. Increased plasmatic levels and gene expression of 5 out of 7 C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-

517*, miR-520a*, miR-525, and miR-526a) were observed in women with pregnancy-related complications compared to normal pregnancies.

Detailed analysis revealed increased levels and gene expression of miR-516-5p, miR-517*, miR-520a*, miR-525, and miR-526a in the group of patients with established preeclampsia, whereas neither plasmatic levels nor gene expression of these C19MC microRNAs differed between control cohort and patients with FGR and GH. Plasmatic concentrations and/or expression profiles of C19MC microRNAs did not show any association with the severity of the disease with respect to clinical signs and requirements for the delivery. Similarly, association between C19MC microRNA plasmatic levels and/or gene expression and the occurrence of previous hypertension in the cohort of patients with preeclampsia was not determined. While our data may be partially supported by Mouillet et al. (2010), who have recently observed no significant difference in relative placental specific microRNA levels (miR-518b) in FGR plasma samples, they are inconsistent with the study of Yang et al. (2011), who observed up-regulation of extracellular miR-520h in four patients with preeclampsia.

There was no difference in microRNA plasmatic levels and/or gene expression between pregnancies with abnormal and normal blood flow velocity waveforms with the exception of miR-526a, which was up-regulated in the group of patients with abnormal blood flow velocity waveforms in the umbilical artery. Consecutive correlation analysis revealed that the pulsatility index (PI) in the umbilical artery did not correlate with microRNA plasmatic concentrations and/or gene expression. However, a weak negative correlation between the PI in the middle cerebral artery and C19MC microRNA plasmatic concentrations or gene expression (miR-516-5p, miR-517*, miR-520a*, miR-525, and miR-526) was observed. Furthermore, a weak negative correlation between cerebroplacental ratio and C19MC microRNA plasmatic concentrations and gene expression (miR-520a*, and miR-526a) was found.

Overall, results of the study indicated that the up-regulation of miR-516-5p, miR-517*, miR-520a*, miR-525 and miR-526a is a characteristic phenomenon of established preeclampsia.

The function and functional relationship analysis of predicted targets of the five elevated extracellular C19MC microRNAs in patients with established preeclampsia indicated that a large group of genes was connected to the regulation of the immune system and inflammatory response.

Monitoring of selected placenta specific C19MC microRNAs in maternal circulation within the first trimester of gestation and subsequent identification of extracellular C19MC microRNAs able to differentiate between normal pregnancies and those at risk of subsequent development of pregnancy-related complications

Study performed on the samples collected during the first trimester screening, revealed increased plasmatic levels of miR-516-5p, miR-517*, miR-520h, and miR-518b in those women who subsequently developed gestational hypertension when compared to normal pregnancies. Increased levels (miR-517-5p, miR-518b, and miR-520h) or a trend towards increased plasma levels (miR-520a-5p, and miR-525-5p) of C19MC microRNAs were observed during the first trimester of gestation also in maternal plasma samples derived from women who developed preeclampsia compared to women with normal pregnancies. No difference in plasma levels of C19MC microRNAs between the control group and the group of patients destined to develop IUGR was found.

The predictive accuracy of single first trimester plasmatic microRNA biomarkers was assessed. In patients with gestational hypertension the best positive predictive value (84.6%) and specificity (92.9%) was observed for miR-520h. Although, miR-516-5p had significantly higher AUC than miR-518b, finally miR-518b showed better PPV (73.3%) and specificity (85.7) than miR-516-5p. MiR-516-5p predicted the subsequent occurrence of gestational hypertension with a sensitivity of 80.0%, a specificity of 82.1% and a PPV of 70.6%. In patients, who develop preeclampsia later in pregnancy, miR-517-5p biomarker alone had a predictive performance for preeclampsia with a sensitivity of 42.9%, a specificity of 86.2%, a PPV of 52.9%, and a NPV of 80.6%. There was no additive effect of using the combination of all examined circulating C19MC microRNAs to predict preeclampsia (sensitivity 20.6%, specificity 90.8%, a PPV of 44.8%, and a NPV of 76.0 %). Unfortunately, no extracellular C19MC microRNA predictive biomarkers for later occurrence of IUGR have been identified.

Individual maternal plasma/serum markers have not usually performed well as screening tests for preeclampsia and fetal growth restriction, because the predictive value of each biomarker is low; therefore, combined screening tests to assess the risk of preeclampsia and fetal growth restriction are currently used in practice (Poon et al., 2014; Scuzzocchi et al. 2016; Crovetto et al., 2016). In a proposed new approach to prenatal care, screening using a combination of maternal risk factors, mean arterial pressure, uterine artery Doppler, and maternal serum biomarkers (pregnancy-associated plasma protein-A and placental growth factor) can identify up to 95% of cases with early onset of preeclampsia for a false-positive rate of 10% (Poon et al., 2014; Scuzzocchi et al., 2016). Another model including maternal characteristics, mean arterial pressure, uterine artery Doppler, placental growth factor, and soluble Fms-like tyrosine kinase-1 achieved an overall detection rate of 71.4% for fetal growth restriction, with a 10% false positive rate (Crovetto et al., 2016).

Our first trimester screening approach for gestational hypertension based on the combination of two placental specific C19MC microRNAs (miR-520h and miR-518b) was able to identify women at risk of subsequent development of GH with a PPV of 82.6% at a specificity of 92.9%. Other C19MC microRNA combinations (miR-516-5p and miR-520h or miR-516-5p and miR-518b) showed lower PPV than the miR-520h biomarker alone or in combination with miR-518b. However, there was no additive effect of using the combination of all examined circulating C19MC microRNAs to predict preeclampsia (sensitivity 20.6%, specificity 90.8%, a PPV of 44.8%, and a NPV of 76.0 %).

Function and functional relationship analysis of predicted targets of up-regulated extracellular C19MC microRNAs indicated an extensive group of pregnancy-related genes (miR-516-5p: 53 out of 349; miR-517: 21 out of 179; miR-518b: 4 out of 42; miR-520h: 65 out of 509).

Several target genes were previously described as aberrantly expressed in various biological samples derived from patients with clinical symptoms of pregnancy-related complications such as gestational hypertension, preeclampsia (with or without intrauterine growth restriction), HELLP syndrome, fetal growth restriction and/or small for gestational age, gestational diabetes mellitus, spontaneous abortions, miscarriages, recurrent pregnancy loss and ectopic pregnancy. Some of predicted targets such as PAPPA, SP1 (PSG2, PSG3, PSG5, PSG6, PSG9, PSG11), LHCGR, FLT1, ANGPT1 have been shown to be potential non-invasive early biomarkers for pregnancy-related complications such as gestational hypertension, preeclampsia, small for gestational age, miscarriage, preterm delivery, stillbirth and aneuploid fetuses.

GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The goal of our study was to shed, at least partially, some light on complex processes leading to the onset of pregnancy-related complications involving life-threatening conditions for both, the mother and the fetus, with special focus on extracellular placental specific microRNAs, mainly C19MC microRNAs. Special attention was paid to the investigation of appropriate novel biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis that could contribute to early and accurate identification of patients at high risk of later development of gestational hypertension, preeclampsia and/or fetal growth restriction.

After discovery of short non-coding RNAs, and mainly microRNAs that significantly affect gene expression, several questions have raised in the field of gynecology and obstetrics. For example, whether placenta specific microRNAs are also released into maternal circulation during normal gestation and if so, could be exploited for non-invasive prenatal diagnosis, at least of chromosomal aneuploidies and pregnancy-related complications. This question was soon partially answered by Chim et al. (2008), who demonstrated that four microRNAs highly expressed in placenta (miR-141, miR-149, miR-299-5p and miR-135b) were abundant in plasma of pregnant women and rapidly cleared from maternal circulation after delivery. Shortly thereafter, Luo et al. observed that placental specific microRNAs are likely constituents of chorionic villous trophoblasts and are released extracellularly into maternal circulation during pregnancy via exosomes (Luo et al., 2009).

In our study we examined, first of all, whether 20 selected microRNAs (miR-518b, miR-34c, miR-372, miR-135b, miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516-5p, miR-517*, miR-518f*, miR-519a, miR-519d, miR-519e, miR-520a*, miR-520h, miR-524-5p, miR-525, miR-526a and miR-526b), including C19MC microRNAs, are really

highly expressed in placental tissues and should be therefore called “placental specific”. As expected all 20 selected microRNAs were detectable in the fetal side of placenta. This was also confirmed later when the expression of C19MC microRNAs has been observed in placental tissue (Donker et al., 2012; Wang et al., 2012), trophoblast cell lines (Morales-Prieto et al., 2012) and placenta-derived stromal cells (Flor et al., 2012).

Based on our pre-defined criteria for selection we excluded from the consecutive study those microRNAs that were either detected in whole peripheral blood of non-pregnant healthy individuals or were undetectable/inadequately detectable in maternal plasma samples during pregnancy. For example, like Chim et al. (2008), we demonstrated the absence of miR-135b in non-pregnant women and its presence in maternal circulation, but only during late gestation, and therefore we decided to exclude miR-135b from other testing.

Finally, 7 placenta specific C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525 and miR-526a) that were reliably detected in maternal circulation throughout the whole period of gestation were identified. These C19MC microRNAs also fulfilled our predefined criteria on potential NIPD biomarkers.

Previously published studies showed increasing levels of circulating nucleic acids (DNA and mRNA) with advancing gestation, which reflects the growth of the placenta (Lo et al., 1998; Ng et al., 2003; Sedlackova et al., 2011a, b). Our data obtained from both absolute and relative quantification approaches revealed progressively increasing levels of selected placenta specific C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, and miR-526a) in maternal circulation during normally ongoing pregnancies, which may be linked to the rising mass of the placenta. The highest concentrations and expression levels of circulating C19MC microRNAs were observed during the third trimester of gestation.

Contrarily to our expectancies, as well as to the fact that the onset of preeclampsia and/or IUGR was accompanied by excessive placental trophoblast apoptosis associated with increased extracellular DNA levels in maternal circulation (Farina et al., 2004; Zhong et al., 2007; Tsui et al., 2007; Hromadnikova et al., 2010; Sekizawa et al., 2003), levels of selected placenta specific C19MC microRNAs in maternal plasma showed in our pilot study no statistical difference between normal pregnancies and those with clinically established pregnancy-related complications (preeclampsia and/or IUGR). Our findings may be partially supported by the study of Mouillet et al. who also observed no significant difference in placental specific C19MC microRNA levels (miR-517a and miR-518b) in maternal plasma samples when normal and fetal growth restriction pregnancies were compared (2010).

Within the framework of our pilot study, we surprisingly revealed that levels of examined placental specific C19MC microRNAs exceeded, within 12th to 16th weeks of gestation, in patients who later developed pregnancy-related complications, the explicitly defined cut-offs (mean plus two standard deviations) of the control cohort at the appropriate gestational age. We assume that increased expression of placental C19MC microRNAs might reflect aberrant placentation that leads to inadequate uteroplacental blood perfusion and ischemia followed by an increased apoptosis of placental trophoblasts (Khong et al., 1967).

In consequence to our pilot study, we performed next study on the sufficiently expanded cohort of novel patients with pregnancy-related complications to achieve adequate power of the study. Using both, absolute and relative quantification approaches, an upregulation of circulating C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517-5p, miR-520a-5p, miR-525 and miR-526a) in patients with clinically established preeclampsia w or w/o fetal growth restriction was demonstrated. Unfortunately, no difference in extracellular C19MC levels was observed between patients with FGR and normal pregnancies.

Furthermore, the dependence between the levels of extracellular C19MC microRNAs in maternal circulation and the pulsatility index in the middle cerebral artery (miR-516-5p, miR-517-5p, miR-520a-5p, miR-525, and miR-526a) and the cerebroplacental ratio (miR-520a-5p, and miR-526a) was observed in patients with preeclampsia and/or FGR. Unfortunately, limited data comparing extracellular C19MC microRNA levels between the groups of normal and complicated pregnancies are available. Our data are inconsistent with Yang et al. (2011), who observed up-regulation of extracellular miR-520h in four patients with preeclampsia. On the other hand, our findings may be supported by Mouillet et al. (2010), who also demonstrated no significant difference in extracellular placental specific microRNA levels, inclusive of miR-518b, in plasma samples between patients with normally progressing pregnancies and those with fetal growth restriction.

Our last two studies were focused on risk assessment for pregnancy-related complications based on maternal plasma concentrations of placental specific C19MC microRNAs in early pregnancy in an unselected population.

Our results demonstrated that up-regulation of circulating C19MC microRNAs (miR-516-5p, miR-517-5p, miR-518b, and miR-520h) is a characteristic phenomenon of early pregnancy destined to develop not only placenta-insufficiency related complications (Hromadnikova et al., 2012), but also gestational hypertension. Similarly, our current study revealed up-regulation of circulating C19MC microRNAs (miR-517-5p, miR-518b, and miR-520h) in early pregnancy in women who later developed preeclampsia. First trimester higher plasmatic levels of miR-520h, miR-518b, miR-516-5p and miR-517-5p certainly appears to be predictive of subsequent gestational hypertension, respectively. Effective screening for the later onset of gestational hypertension and preeclampsia can be achieved during the first-trimester of pregnancy by monitoring of a single extracellular C19MC placental specific microRNA biomarker (miR-517-5p for the prediction of preeclampsia and miR-520h for the prediction of gestational hypertension). Alternatively, the combination of 2 placental specific C19MC microRNA biomarkers (miR-520h and miR-518b) may be used to predict the occurrence of gestational hypertension. Unfortunately, first trimester screening of women had no clinical utility relative to the development of IUGR using extracellular C19MC microRNA biomarkers.

Other studies evaluated the ability of extracellular microRNA profiles to identify patients at higher risk of later development of pregnancy-related complications a priori (during the first trimester of gestation) in unselected population, however majority of studies focused on microRNAs not encoded by C19MC microRNA cluster, therefore we can not discuss our results adequately.

Our study has provided new promising biomarkers for screening approaches for severe pregnancy-related complications. However, other consecutive large scale studies are needed before implementation of extracellular C19MC microRNA biomarkers into routine praxis in the field of gynecology and obstetrics.

LIST OF PUBLICATIONS

1. Publications in extenso which are part of the Ph.D. thesis:

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Ivankova K, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. PLoS One. 2017 Feb 9;12(2):e0171756. (IF₂₀₁₆ = **2.806**)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Hympanova L, Doucha J, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs can predict subsequent onset of gestational hypertension. PLoS One 9(12):e113735, 2014. (IF₂₀₁₄ = **3.234**)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Ondrackova M, Kestlerova A, Novotna V, Hympanova L, Doucha J, Krofta L. Circulating C19MC microRNAs in preeclampsia, gestational hypertension, and fetal growth restriction. Mediators Inflamm 2013:186041, 2013. (IF₂₀₁₃ = **2.417**)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. Absolute and relative quantification of placenta-specific micromnas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. J Mol Diagn 14(2):160–7, 2012. (IF₂₀₁₂ = **3.952**)

Kotlabova K, Doucha J, Hromadnikova I. Placental-specific microRNA in maternal circulation - identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. J Reprod Immunol 89(2): 185–91, 2011. (IF₂₀₁₁ = **2.966**)

2. Publications in extenso without direct connection to Ph.D. thesis:

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Krofta L, Hron F. Follow-up of gestational trophoblastic disease/neoplasia via quantification of circulating nucleic acids of placental origin using C19MC microRNAs, hypermethylated

RASSF1A, and SRY sequences. *Tumour Biol.* 2017;39(4):1010428317697548. (IF₂₀₁₆ = 3.650)

Hromadnikova I, Dvorakova L, **Kotlabova K**, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction. *Indian J Med Res* 144(2):229–237, 2016. (IF₂₀₁₆ = 1.446)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Hympanova L, Krofta L. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thromb Res.* 2016;137:126–40. (IF₂₀₁₆ = 2.650)

Hromadnikova I, Li S, **Kotlabova K**, Dickinson AM. Influence of In Vitro IL-2 or IL-15 Alone or in Combination with Hsp 70 Derived 14-Mer Peptide (TKD) on the Expression of NK Cell Activatory and Inhibitory Receptors on Peripheral Blood T Cells, B Cells and NKT Cells. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151535. (IF₂₀₁₆ = 2.806)

Hromadnikova I, Dvorakova L, **Kotlabova K**, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels. *Mol Biol Rep* 42(3):625–37, 2015. (IF₂₀₁₅ = 1.698)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Ondrackova M, Pirkova P, Kestlerova A, Novotna V, Hympanova L, Krofta L. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. *DNA Cell Biol* 34(6):437–57, 2015. (IF₂₀₁₅ = 2.574)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Hympanova L, Krofta L. Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Associated microRNAs Are Dysregulated in Placental Tissues Affected with Gestational Hypertension, Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138383. (IF₂₀₁₅ = 3.057)

Hromadnikova I, **Kotlabova K**, Pirkova P, Libalova P, Vernerova Z, Svoboda B, Kucera E. The occurrence of fetal microchimeric cells in endometrial tissues is a very common phenomenon in benign uterine disorders, and the lower prevalence of fetal microchimerism is associated with better uterine cancer prognoses. *DNA Cell Biol* 33(1):40–8, 2014. (IF₂₀₁₄ = 2.055)

Kotlabova K, Doucha J, Chudoba D, Calda P, Dlouha K, Hromadnikova I. Extracellular chromosome 21-derived microRNAs in euploid & aneuploid pregnancies. *Indian J Med Res* 138(6):935–43, 2013. (IF₂₀₁₃ = 1.661)

Zejskova L, Jancuskova T, **Kotlabova K**, Doucha J, Hromadnikova I. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma--next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics. *Exp Mol Pathol* 89(3):241–7, 2010. (IF₂₀₁₀ = 2.986)

Hromadnikova I, Zejskova L, **Kotlabova K**, Jancuskova T, Doucha J, Dlouha K, Krofta L, Jirasek JE, Vlk R. Quantification of extracellular DNA using hypermethylated RASSF1A, SRY, and GLO sequences--evaluation of diagnostic possibilities for predicting placental insufficiency. *DNA Cell Biol* 29(6):295–301, 2010. (IF₂₀₁₀ = 2.159)

Hromadníková I, **Kotlabová K**, Doucha J, Chudoba D, Calda P, Dlouhá K. Chromozom 21 - specifické mikroRNA v mateřské cirkulaci: zhodnocení jejich významu pro screening Downova syndromu u plodu. *Česká Gynekologie* 77(5):395–402, 2012.

Hromadníková I, **Kotlabová K**. Placentárně specifické mikroRNA přítomné v mateřské cirkulaci a jejich potenciální význam pro diagnostiku a predikci těhotenských komplikací souvisejících s placentární insuficiencí. *Aktuální gynekologie a porodnictví* 2(červen):3–4, 2011.

Hromadníková I, **Kotlabová K**, Jirásek JE, Doucha J. Detekce placentárně specifických mikroRNA v mateřské cirkulaci. *Česká Gynekologie* 75(3):252–6, 2010.

REFERENCES

- Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB. MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(50):19678–83.
- Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. Elegans*. *Cell* 1989;57(1):49–57.
- Anton L, Olarerin-George AO, Schwartz N, Srinivas S, Bastek J, Hogenesch JB, Elovitz MA. miR-210 inhibits trophoblast invasion and is a serum biomarker for preeclampsia. *Am J Pathol* 2013;183(5):1437–45.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 2003;5(2):337–50.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(12):5003–8.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
- Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 2004;5(5):396–400.
- Barton JR, O'Brien JM, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(5):979–83.
- Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 2005;11(3):241–7.
- Berg CJ, Mackay AP, Qin C, Callaghan WM. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993–1997 and 2001–2005. *Obstet Gynecol* 2009;113(5):1075–81.
- Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(1 Pt1):198–206.
- Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. Elegans*. *Cell* 1981;24(1): 59–69.
- Chelbi ST, Vaiman D. Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282(1-2):120–129.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18(10):997–1006.
- Chien CH, Sun YM, Chang WC, Chiang-Hsieh PY, Lee TY, Tsai WC, Horng JT, Tsou AP, Huang HD. Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39(21):9345–56.
- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54(3):482–90.
- Colleoni F, Padmanabhan N, Yung HW, Watson ED, Cetin I, Tissot van Patot MC, Burton GJ, Murray AJ. Suppression of mitochondrial electron transport chain function in the hypoxic human placenta: a role for miRNA-210 and protein synthesis inhibition. *PLoS One* 2013;8(1):e55194.
- Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, et al. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* 2009;4(4):e5279.
- Crovetto F, Triunfo S, Crispi F, Rodriguez-Sureda V, Roma E, Dominguez C, Gratacos E, Figueras F. First-trimester screening with specific algorithms for early- and late-onset fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;48(3):340–8.

- Dai Y, Qiu Z, Diao Z, Shen L, Xue P, Sun H, Hu Y. MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1. *Placenta* 2012;33(10):824–29.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432(7014):231–35.
- Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, Morelli AE, Sadovsky Y. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol Hum Reprod* 2012;18(8):417–24.
- Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005;132(21):4645–52.
- Duley L. Pre-eclampsia and hypertension. *Clin Evid* 2005;(14):1776–90.
- Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204(2):178.e12–21.
- Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, Groot N, Barciszewski J. Non-coding, mRNA-like RNAs database Y2K. *Nucleic Acids Res* 2000;28(1):197–200.
- Farina A, Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Jimbo M, Saito H, Okai T. Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable for preeclampsia. A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low-risk nonsymptomatic patients. *Prenat Diagn* 2004;24(2):83–86.
- Fu G, Ye G, Nadeem L, Ji L, Manchanda T, Wang Y, Zhao Y, Qiao J, Wang YL, Lye S, Yang BB, Peng C. MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension* 2013;61(4):864–72.
- Gao WL, Liu M, Yang Y, Yang H, Liao Q, Bai Y, Li YX, Li D, Peng C, Wang YL. The imprinted H19 gene regulates human placental trophoblast cell proliferation via encoding miR-675 that targets Nodal Modulator 1 (NOMO1). *RNA Biol* 2012;9(7):1002–10.
- GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators. Healthcare Access and Quality Index based on mortality from causes amenable to personal health care in 195 countries and territories, 1990-2015: a novel analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2017; S0140-6736(17)30818-8.
- Ghulmiyyah L, Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol* 2012;36(1):56–59.
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3(9):e3148.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432(7014):235–240.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004;114(5-6):397–407.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;18(24):3016–3027.
- Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010;28(6):655–61.
- Hromadnikova I, Zejskova L, Kotlabova K, Jancuskova T, Doucha J, Dlouha K, Krofta L, Jirasek JE, Vlk R. Quantification of extracellular DNA using hypermethylated RASSF1A, SRY, and GLO sequences—evaluation of diagnostic possibilities for predicting placental insufficiency. *DNA Cell Biol* 2010;29(6):295–301.
- Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. Absolute and relative quantification of placenta-specific micromRNAs in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *J Mol Diagn* 2012;14(2):160–7.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3(11):e3694.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293(5531):834–8.

- Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M, Ishikawa G, Yoneyama K, Asakura H, Izumi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T. Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 2012;59(2):265-73.
- Jim B, Sharma S, Kebede T, Acharya A. Hypertension in pregnancy: a comprehensive update. *Cardiol Rev* 2010;18(4):178-89.
- Kanasaki K, Kalluri R. The biology of preeclampsia. *Kidney Int* 2009;76(8):831-7.
- Keniry A, Oxley D, Monnier P, Kyba M, Dandolo L, Smits G, Reik W. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol* 2012;14(7):659-665.
- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93(10):1049-59.
- Kopriva SE, Chiasson VL, Mitchell BM, Chatterjee P. TLR3-induced placental miR-210 down-regulates the STAT6/interleukin-4 pathway. *PLoS One* 2013;8(7):e67760.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294(5543):853-8.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003;9(2):175-9.
- Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol* 2003;4(7):R42.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):858-62.
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141(5):672-5.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415-9.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):862-4.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-854.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002;21(17):4663-70.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-4060.
- Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013;2013:970265.
- Li H, Huang S, Guo C, Guan H, Xiong C. Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms. *PLoS One* 2012;7(4):e34566.
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 2003;17(8):991-1008.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339(24):1734-8.
- Luo L, Ye G, Nadeem L, Fu G, Yang BB, Honarparvar E, Dunk C, Lye S, Peng C. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *J Cell Sci* 2012;125:3124-3132.
- Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigihara T, Goto T, Izumi A, Ohkuchi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 2009;81(4):717-729.
- MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97(4):533-8.

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(30):10513–8.
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1767–71.
- Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, Markert UR. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 2012;33(9):725–734.
- Morales-Prieto DM, Schleussner E, Markert UR. Reduction in miR-141 is induced by leukemia inhibitory factor and inhibits proliferation in choriocarcinoma cell line JEG-3. *Am J Reprod Immunol* 2011;66 Suppl 1:57–62.
- Mouillet JF, Chu T, Nelson DM, Mishima T, Sadovsky Y. MiR-205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts. *FASEB J* 2010;24(6):2030–2039.
- Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta*. 2012;33(10):816–23.
- Myatt L, Muralimanoharan S, Maloyan A. Effect of preeclampsia on placental function: influence of sexual dimorphism, microRNA's and mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 2014;814:133–46.
- Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(5):1365–70.
- Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4748–53.
- Pang RT, Leung CO, Ye TM, Liu W, Chiu PC, Lam KK, Lee KF, Yeung WS. MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2010;31(6):1037–1044.
- Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5473–7.
- Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM Jr, Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 2010;18(4):367–81.
- Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 2010;5(10):e13515.
- Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P, Hassan SS, Kim CJ. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2007;196(3):261.e1–261.e6.
- Poon LC, Nicolaides KH. First-trimester maternal factors and biomarker screening for preeclampsia. *Prenat Diagn* 2014 Jul;34(7):618–27.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14:1902–1910.
- Saini HK, Enright AJ, Griffiths-Jones S. Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics* 2008;9:564.
- Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy—an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006;27(9):399–404.
- Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2006;13(5):680–6.
- Scazzocchio E, Crovetto F, Triunfo S, Gratacós E, Figueras F. Validation of a first-trimester screening model for pre-eclampsia in an unselected population. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;49(2):169.
- Sedlackova L, Spacek M, Holler E, Imryskova Z, Hromadnikova I. Heat-shock protein expression in leukemia. *Tumour Biol* 2011a;32: 33–44.
- Sedlackova L, Sosna A, Vavrincova P, Frýdl J, Guerriero V, Raynes DA, Hromadnikova I. Heat shock protein gene expression profile may differentiate between rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and healthy controls. *Scand J Rheumatol* 2011b;40: 354–357.

- Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, Zakrzewski J, Blochin E, Rose A, Bogunovic D, Polsky D, Wei J, Lee P, Belitskaya-Levy I, Bhardwaj N, Osman I, Hernando E. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(6):1814–1819.
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, Farina A. Cell-free fetal DNA in plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 188:480–484
- Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? *Hypertension* 2005;46(6):1252–3.
- Tsui DW, Chan KC, Chim SS, Chan LW, Leung TY, Lau TK, Lo YM, Chiu RW. Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 2007;27:1212–1218
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;39(16):7223–33.
- Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 2012;37(11):460–5.
- Umemura K, Ishioka S, Endo T, Ezaka Y, Takahashi M, Saito T. Roles of microRNA-34a in the pathogenesis of placenta accreta. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39(1):67–74.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 2011;7:467–74.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654–9.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13(4):423–433.
- Wang D, Lu M, Miao J, Li T, Wang E, Cui Q. Cepred: predicting the co-expression patterns of the human intronic microRNAs with their host genes. *PLoS ONE* 2009;4:e4421.
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010;38(20):7248–7259.
- Whitworth JA; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003 Nov;21(11):1983–92.
- World Health Organization, Dept. of Reproductive Health and Research, Dept. of Maternal, Newborn, Child and Adolescent Health, Dept. of Nutrition for Health and Development. WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Pre-eclampsia and Eclampsia. Switzerland: World Health Organization, 2011.
- Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li YX, Zhu X, Yao Y, Wang H, Qiao J, Ji L, Wang YL. Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension* 2014;63(6):1276–84.
- Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, Liu Y, Huang JD, Song E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 2011;10:117.
- Ying SY, Chang CP, Lin SL. Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. *Methods Mol Biol* 2010;629:205–37.
- Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, Xin H, Sun S. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: New insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med* 2012;16(2): 249–259.
- Zhong XY, Volgmann T, Hahn S, Holzgreve W. Large scale analysis of circulatory fetal DNA concentrations in pregnancies which subsequently develop preeclampsia using two Y chromosome specific real-time PCR assays. *JTTGA* 2007;8:135–139
- Zhu XM, Han T, Sargent IL, Yin GW, Yao YQ. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200(6):661.e1–661.e7.



Vývoj metod k určení proteinového profilu maligních i nemaligních krevních buněk

Mgr. Daniela Kužílková

CLIP – Klinika dětské hematologie a onkologie

2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD.

ABSTRAKT

Akutní leukemie patří mezi nejčastější typ nádorového onemocnění u dětí. Přestože se prognóza dětských pacientů výrazně zlepšila, stále existují pacienti, jejichž leukemické buňky jsou vůči léčbě rezistentní nebo se jim onemocnění opakovaně vrací. Z tohoto důvodu je nutné rozšiřovat znalosti o patogenezi leukemických buněk pomocí nejnovějších technologií. Častým přístupem k této problematice je expresní profilování nebo celogenomové sekvenování za účelem hledání mutací na úrovni DNA. Vzhledem k tomu, že ne vždy mutace DNA nebo hladina mRNA koreluje s přítomností nebo funkcí proteinu, je nutné tyto techniky doplnit inovativními nástroji proteomiky. V předkládané dizertační práci jsme porovnali separaci mononukleárních buněk periferní krve zdravých dárců ($n=7$) pomocí námi navržené CD81+ imunoafinitní chromatografie (tzv. CD81+ T-Catch™) se standardně používanou separací přes hustotní gradient Ficoll-Paque™ pro hmotnostní cytometrii. Pomocí 21 protilátek konjugovaných s těžkými kovy jsme definovali 17 cílových lymfocytárních subpopulací, 2 kontaminující subpopulace (červené krvinky a krevní destičky) a 6 dalších (necílových) subpopulací buněk periferní krve. Zjistili jsme, že oběma postupy získáme srovnatelné zastoupení všech cílových lymfocytárních populací, pomocí CD81+ T-Catch™ získáme produkt s nižší výtěžností a také dochází k nežádoucí depleci NK buněk a buněk vrozené imunity. Naproti tomu získáme produkt s nižší kontaminací krevních destiček (volných i vázaných) a tím se výrazně zkrátí doba strávená vlastním nahráváním pomocí hmotnostního cytometru.

Ve druhé části této práce jsme pomocí inovativní bead-based protilátkové array Size-Exclusion Chromatography – Microsphere-based Affinity Proteomics (SEC-MAP) profilovali leukemické buňky. Metoda SEC-MAP je schopna detekovat stovky proteinů v jednom vzorku společně s rozlišením proteinů podle velikosti. Nejprve jsme optimalizovali laboratorní a vyvinuli semi-automatizované analyzační postupy na leukemických buněčných liniích. Poté jsme ověřili, že SEC-MAP je schopna identifikovat již popsané diferenciatně exprimované proteinové entity po cílené léčbě leukemických buněk imatinib mesylátem a dále jsme našli kvantitativní korelaci u 18/31 měřených imunofenotypových znaků mezi SEC-MAP a polychromatickou průtokovou cytometrií. Takto jsme validovali metodu SEC-MAP pro použití na leukemických buňkách. Nakonec jsme se zaměřili na proteomické profilování buněk dětské akutní leukemie. Na kohortě pacientů ($n=51$) jsme našli a následně validovali 47 diferenciatně exprimovaných antigenů mezi jednotlivými podtypy dětské akutní leukemie. Vzhledem k tomu, že ke zpracování kostní dřeně pacientů často probíhá 24h po její aspiraci, hledali jsme znaky, které by identifikovali probíhající *ex vivo* apoptózu. Pomocí SEC-MAP jsme našli 27 proteinových entit, které byly diferenciatně exprimované mezi degradovanými a nedegradovanými vzorky pacientů s B-prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií. Zjistili jsme, že štěpení kinas ABL1 a AKT1 slouží jako spolehlivý ukazatel probíhající apoptózy, zatímco beta-aktin štěpený není.

V rámci předkládané dizertační práce byly zavedeny dvě nové techniky proteomiky –(i) izolace mononukleárních buněk periferní krve pomocí CD81+ T-Catch™, což se ukázalo být vhodnou izolační metodou pro hmotnostní cytometrii a (ii) ukázali jsme, že metoda SEC-MAP je schopna detekovat stovky proteinů

v buňkách pacientů s dětskou akutní leukemií, identifikovat proteiny změněné léčbou a nalézt diferenciálně exprimované proteiny mezi jednotlivými skupinami dětské akutní leukemie.

1 ÚVOD

1.1. Dětské leukemie

Leukemie patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u dětí, v České Republice každý rok onemocní 90-100 dětí. Leukemie čítají kolem 30% všech nádorových onemocnění dětského věku. ¹ Jedná se o onemocnění způsobené klonální proliferací maligně transformovaných hematopoetických buněk. ² Leukemie je poměrně heterogenní skupina onemocnění, které se v základu dělí podle průběhu onemocnění na akutní a chronickou a také podle původu buněk, u kterých došlo k malignímu zvratu, na lymfoblastickou (vycházející jak z B-, tak z T-lymfocytů) a myeloidní. V dětském věku se nejčastěji vyskytují akutní lymfoblastická leukemie (ALL), čítající kolem 80% všech případů, dále akutní myeloidní leukemie (AML), která postihuje cca 15% dětských pacientů, a nakonec chronická myeloidní leukemie (CML), postihující cca 3% dětských pacientů. Chronická lymfocytární leukemie děti nepostihuje. Všechny uvedené typy leukemií se dále dělí na další podtypy, které mají často své specifické léčebné protokoly. Velká část dětských pacientů s leukemií vykazuje genetické aberace, které mohou být jak numerické, tak strukturální, některé z nich mají přímý vliv na prognózu pacienta. U většiny pacientů s dětskou leukemií je přesná příčina jejich onemocnění neznámá, přestože pro některé genetické aberace bylo prokázáno, že způsobují leukemii. ^{3,4} Česká Republika používá léčebný protokol mezinárodní skupiny iBFM, pojmenované podle zakladatelských měst Berlin, Frankfurt a Munster, která vytváří léčebné protokoly pro léčbu dětských leukemií. Akutní leukemie jsou klasifikovány pomocí morfologie, která se řídí Francouzsko-Americko-Britským (FAB) systémem na tři (v případě ALL) popř. osm (v případě AML) podtypy. ^{5,6} Druhým klasifikačním systémem je imunofenotypová analýza, která se řídí pravidly udávanými klasifikací Evropskou skupinou pro imunologickou charakterizaci leukemií (EGIL). ⁷ V léčebných protokolech jsou pacienti nejprve rozděleni do tří skupin podle rizika na základě věku, počtu bílých krvinek, časné odpovědi na léčbu a nepříznivých genetických aberací. Jednotlivé rizikové skupiny následně podstupují léčbu podle protokolu. V léčebném protokolu ALL IC-BFM 2002, podle kterého byli čeští pacienti s ALL do nedávna léčeni, dosáhlo procento celkového přežití všech pacientů 82%. AML má lehce horší prognózu než ALL - s aktuálními možnostmi léčby v rozvinutých zemích dosahuje procento přežití u dětských pacientů s AML 70-75%. ^{8,9} Dalšími možnostmi léčby je cílená léčba, patřící mezi nové terapeutické přístupy. Jednou z nejčastějších forem je léčba tyrosin-kinasovými inhibitory, které slaví úspěch převážně u pacientů, jejichž blasty vykazují vysoce aktivovaný stav a kontinuálně dostávají signál k dělení. Jedná se jak o pacienty, jejichž leukemické buňky nesou fúzní gen BCR/ABL1, u nichž dochází ke konstitutivní aktivaci signalizační kaskády pod kinasou ABL1. Dále se jedná o tzv. BCR/ABL1-like skupinu pacientů, jejichž leukemické blasty vykazují podobně aktivovaný stav této signalizační kaskády, avšak nenesou fúzní gen BCR/ABL1. K této hyperaktivaci dochází často kvůli genomickým přestavbám genu CRLF2, fúznímu genu ETV6/ABL1 nebo EBF1/PDGFRB. ¹⁰ Tito pacienti měli původně špatnou prognózu ^{11,12}, avšak díky stratifikaci rizika a cílené léčbě tyrosin-kinasovými inhibitory mají v současné době stejnou prognózu jako ostatní pacienti. ¹⁰ Tato skupina pacientů byla objevena jen na základě expresního profilování, kdy hierarchické klastrování je přiřadilo ke skupině BCR/ABL+ pacientů.

1.2. Nové přístupy k diagnostice, klasifikaci a léčbě dětských akutních leukemií

Vzhledem k neustále se rozvíjejícím se technickým možnostem se v posledních letech pozměnil přístup k diagnostice, klasifikaci a léčbě dětských AL. Díky zlepšující se prognóze těchto pacientů se výzkum soustředí na skupiny pacientů s vysokým rizikem a také se využívá cílená léčba. Aby byla cílená léčba dostatečně účinná, je nutné znát kompletní profil leukemických buněk. Velmi rozšířeným typem profilování maligních i nemaligních buněk je expresní profilování, kdy jsou stanoveny hladiny mRNA jednotlivých genů. Dále je dostupné sekvenování nové generace, kdy je možné stanovit kompletní exom, transkriptom, amplikon nebo methylom. Přestože jsou leukemie (a obzvláště leukemie dětského věku) důkladně zkoumány již více než 60 let a existuje dobře zavedený klasifikační systém, neustále se objevují nové podskupiny pacientů, kterým se „sije terapie na míru“. Jedním z takových příkladů je výše zmíněná BCR/ABL-like

skupina¹⁰ objevená právě díky expresnímu profilování. Ukazuje se tedy, že současný klasifikační systém sice pokrývá většinu dětských pacientů s akutní leukémií (AL), avšak stále se nacházejí pacienti, kteří by mohli profitovat z reklasifikace do jiné léčebné skupiny na základě profilování jejich leukemických buněk. Cílená léčba ovšem cílí na proteiny a mnohdy je korelace mezi hladinami mRNA a proteinem slabá.¹³⁻¹⁵ Naopak v některých případech indikuje exprese (popř. absence) proteinu genotyp AL^{16,17} nebo předpovídá prognózu pacientů.¹⁸

Při cílené terapii proti povrchovým znakům mnohdy dojde ke snížení až ztrátě exprese těchto znaků na povrchu leukemických buněk.^{19,20} Přesto je ovšem nutné dále monitorovat hladiny leukemických blastů a jakýkoliv další znak specifický pro určitý podtyp leukemických buněk je pro hodnotícího pracovníka nesmírně přínosný. Proto je důležité profilovat leukemické buňky i na úrovni proteinů.

K určení proteinového profilu je možné použít buď metodiky založené na rozlišení na úrovni jednotlivých buněk (tzv. single-cell), kdy je možné detekovat pouze limitované množství proteinů. Mezi tyto metodiky patří polychromatická průtoková cytometrie (pFC) a hmotnostní cytometrie. Druhým směrem proteomiky jsou metodiky založené na sledování velkého množství proteinů, které jde na úkor rozlišení úrovně jednotlivých buněk, mezi které patří protilátkové arrays.

V této dizertační práci byly použity oba typy metodik.

V laboratoři dr. Lund-Johansena ve spolupráci s laboratoří CLIP vyvinuli inovativní protilátkovou array, která je v současné době schopna rozlišit až 1728 vybraných antigenů. Tuto protilátkovou array nazvali Size-Exclusion Chromatography – Microsphere-based Affinity Proteomics (SEC-MAP) Jednotlivé šarže SEC-MAP se sestávají z 576 populací mikročastic, nesoucí různé hladiny 4 fluorochromů. Některé šarže se ještě od sebe vzájemně liší hladinou pátého fluorochromu, tudíž je možné je vzájemně kombinovat a lze tedy dosáhnout až rozlišení 1728 (3x576) populací mikročastic.^{21,22} Kromě většího množství měřitelných parametrů tato metoda zahrnuje i rozdělení buněčného lyzátu podle hydrodynamického poloměru (který přibližně odpovídá velikosti) na size-exclusion chromatografii (SEC). Buňky jsou nejprve lyzovány pomocí detergentů (Tween 20, Lauryl Maltosid,...), proteiny jsou následně biotinylovány pomocí amin-reaktivního biotin-PEG4 a následně rozděleny pomocí SEC. Díky získanému elučnímu profilu lze lépe ověřit specifitu dané protilátky, podobně jako je tomu u Western blotu (WB).²¹ Vlastní detekce vazby protilátky na antigen dochází na průtokovém cytometru pomocí fluorescenčně značeného streptavidinu.²³ Kvůli vyššímu počtu detekčních protilátek roste i signál z pozadí.²⁴ Získaná data z protilátkových arrays jsou tedy normalizovaná podobně jako data z expresního profilování.²⁵ V mnoha studiích se zabývali vlivem opožděného zpracování primárních vzorků pacientů (periferní krve) na kvalitu získaného materiálu. Zjistili, že odložení izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) z 8 na 24h po odběru vede ke snížení viability buněk a také výtěžnosti.²⁶ Navíc leukemické buňky určitého genotypu (např. hyperdiploidie) mají vyšší sklon k apoptóze než buňky jiného genotypu.²⁷

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této dizertační práce je pomocí nových metod určit proteinový profil maligních i nemaligních mononukleárních buněk a jejich ovlivnění po léčbě. K dosažení těchto cílů byla nutná optimalizace laboratorních i analyzačních postupů (cíle 2.1., 2.2. a 2.3.), validace metody SEC-MAP *per se* na již popsaném modelu (cíl 2.4.) a ověření schopnosti SEC-MAP detekovat povrchové znaky běžně používané k imunofenotypizaci dětských AL (cíl 2.5.). Hlavním cílem této práce je nalézt nové znaky odlišující tři základní skupiny dětských leukémií (cíl 2.6.) a určit vhodné znaky ukazující preanalytickou degradaci primárních diagnostických vzorků (cíl 2.7.), umožňující kontrolu kvality zpracovaného materiálu.

2.1 Porovnání dvou postupů získání PBMC pro hmotnostní cytometrii s ohledem na čistotu vzorku a rychlost přípravy

2.2. Porovnání tří postupů izolace buněčného proteomu pro SEC-MAP za použití různých detergentů

2.3. Vytvoření postupů analýzy dat ze SEC-MAP

2.4. Validace SEC-MAP na leukemických buněčných liniích po inhibici imatinib mesylátem

2.5. Korelace data ze SEC-MAP s pFC na leukemických buněčných liniích a PBMC zdravých dárců

2.6. Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů u jednotlivých podtypů dětské AL a ověření jejich exprese jinou metodou

2.7. Nalezení vhodných znaků ukazujících preanalytickou degradaci primárních diagnostických vzorků

3 MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

Pro tuto dizertační práci byly použity leukemické buněčné linie (n=11), primární diagnostické vzorky pacientů s dětskou AL (n=57), purifikované B-lymfocyty, T-lymfocyty a monocyty z periferní krve zdravých dárců a PBMC zdravých dárců (n=7).

3.2. Metody

Stěžejní metodikou této dizertační práce je bead-based protilátková array SEC-MAP, která je detailně popsána v publikaci Wu et al.²¹. Pro potvrzení diferenciální exprese 21 proteinů mezi třemi subtypy AL jsme použili WB. Imunofenotypová analýza pomocí pFC byla použita ke stanovení hladiny exprese tří intracelulární a dvaceti-osmi povrchových znaků běžně používaných k imunofenotypizaci leukemií²⁸, dále pro potvrzení diferenciální exprese 13-ti proteinů mezi třemi subtypy AL a pro identifikaci kontaminujících subpopulací (erythrocyty, krevní destičky) a výtěžků získaných pomocí námi navržené CD81+ T-CatchTM (pro porovnání byly použity produkty získané izolací přes hustotní gradient Ficoll-PaqueTM). Pro identifikaci leukocytárních subpopulací získaných pomocí CD81+ T-CatchTM a Ficoll-PaqueTM byla použita hmotnostní cytometrie. Průběh apoptózy po inhibici imatinib mesylátem byl stanoven pomocí fluorescenčně značeného Annexinu V a propidium jodidu (PI). Pro validaci diferenciální exprese proteinu STAT5A byla použita qRT-PCR. Blíže jsou metody popsány v příložených publikacích a dizertační práci.

4 VÝSLEDKY

4.1. Porovnání dvou postupů získání PBMC pro hmotnostní cytometrii s ohledem na čistotu vzorku a rychlost přípravy

Pelák O., Kužílková D., Thurner D., Kiene ML., Stanar K., Stuchlý J., Vášková M., Starý J., Hrušák O., Stadler H., Kalina T. Lymphocyte enrichment using CD81-targeted immunoaffinity matrix, *Cytometry A*, 2017, Jan, 91(1): 62–72

Kvůli nízké rychlosti nahrávání vzorku do hmotnostního cytometru je vhodné mít co nejčistší suspenzi buněk, které chceme analyzovat. Z tohoto důvodu jsme srovnali dva postupy izolace PBMC zdravých dárců (n=7) – 1) izolaci přes hustotní gradient pomocí Ficoll-PaqueTM, což je metodika hojně používaná a lze ji označit za „zlatý standard“, s 2) námi navrženou CD81+ afinitní chromatografií. Sadou 19-ti komerčně dostupných protilátek konjugovaných s isotopy kovů řídkých zemin (a dvou konjugovaných v naší laboratoři) jsme v jedné zkumavce identifikovali všechny základní subpopulace mononukleárních buněk včetně kontaminujících subpopulací (erythrocyty, volné i vázané krevní destičky). Následně jsme porovnali jejich zastoupení v konečných produktech získaných oběma postupy.

Zjistili jsme, že pomocí obou postupů jsme získali srovnatelné zastoupení CD81+ buněk ze všech hematopoetických (CD45+) buněk. Pomocí CD81+ T-Catch™ jsme získali produkt s výrazně nižší kontaminací nejaderných elementů. Naproti tomu izolace pomocí hustotního gradientu přes Ficoll-Paque™ měla výrazně vyšší výtěžky.

Před vlastním měřením jsme vzorky získané oběma postupy naředili na stejnou koncentraci. Nahrávání vzorků získané izolací přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™ trvalo v průměru 2,4x déle. Nahráli jsme 3,5x více celkových událostí, ale Ir191+ událostí (jaderných buněk) bylo o trochu méně než u vzorků získané pomocí CD81+ T-Catch™. Nahrání 10⁵ Ir191+ událostí získané pomocí CD81+ T-Catch™ trvalo v průměru 15,6min (12,9-23,5) zatímco nahrání stejného získané pomocí hustotního gradientu přes Ficoll-Paque™ trvalo 55,9min (22,1-120,3). Dále jsme porovnali zastoupení jednotlivých leukocytárních populací v produktech získaných oběma postupy. Všechny lymfocyty (T-, B- a NK buňky a jejich subpopulace) byly procentuálně podobně zastoupeny, CD3+ T-lymfocyty byly signifikantně více zastoupeny v produktech získaných pomocí CD81+ T-Catch™. Naproti tomu NK buňky byly touto metodou depletovány. Také buňky vrozené imunity: neklasické a klasické monocyty, neutrofilní granulocyty, basofily i myeloidní a plasmacytoidní dendritické buňky, byly lehce až výrazně sníženy v produktech získané pomocí CD81+ T-Catch™. Největším rozdílem v produktech získaných oběma postupy se ukázaly být volné krevní destičky - v průměru 93,1% ze všech elementů v produktech získaných přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™ versus 22,3% v produktech získaných pomocí CD81+ T-Catch™.

Ukázalo se tedy, že v porovnání se „zlatým standardem“ separace PBMC přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™ jsme pomocí naší navržené metody separace přes CD81+ T-Catch™ získali čistší produkt z hlediska kontaminujících krevních destiček a tím se výrazně snížil čas strávený vlastním nahráváním do hmotnostního cytometru. Naproti tomu pomocí této metody dochází kvantitativně větším ztrátám hematopoetických buněk a dochází k depleci NK buněk a buněk vrozené imunity.

4.2. Porovnání tří postupů izolace buněčného proteomu pro SEC-MAP za použití různých detergentů

V rámci své diplomové práce (Validace metody nové multiplexní sady protilátek a její využití pro stanovení prognostických znaků dětských akutních leukemií, Bc. Daniela Černá, studijní program Biochemie, Praha, 2011) jsem porovнала tři postupy izolace buněčného proteomu pro SEC-MAP, detailní výsledky jsou uvedeny v diplomové práci. Zde bych ráda jen krátce shrnula závěry, protože pro tuto dizertační práci byly klíčové.

Na leukemických buněčných liniích (n=8) jsme testovali tyto tři postupy izolace buněčného proteomu: a) příprava celkového buněčného lyzátu, b) rozdělení buněčného lyzátu na 2 subcelulární frakce (hydrofilní frakce obsahující rozpustné proteiny z cytosolu, organel a jádra a v detergentech rozpustná frakce obsahující DNA-vazebné proteiny a proteiny membrán c) rozdělení buněčného lyzátu na 4 subcelulární frakce (E1 frakce obsahující proteiny z cytosolu, E2 frakce obsahující proteiny z cytosolu a organel, NP frakce obsahující proteiny vnitřních membrán a LM frakce obsahující proteiny vnějších membrán a DNA-vazebné proteiny)

V celkových buněčných lyzátech jsou signály nejednoznačné, dochází k překrytí dvou signálů, případně ke snížení intenzity signálu. Rozdělení proteomu na dvě subcelulární frakce zlepšilo kvalitu signálu, snížilo nespecifické interakce a umožnilo kvantifikovat jednotlivé formy proteinů. Při rozdělení buněčného proteomu na 4 subcelulární frakce nedocházelo k přesnému oddělení jednotlivých kompartmentů podle očekávání (detekovali jsme proteiny charakteristické pro určité kompartmenty v jiných než očekávaných frakcích). Na základě těchto výsledků jsme tedy pro další experimenty používali výhradně rozdělení buněčného proteomu na dvě subcelulární frakce.

4.3. Vytvoření postupů analýzy dat ze SEC-MAP

Stuchlý J., Kanderová V., Fišer K., Černá D., Holm A., Wu W., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. An automated analysis of highly complex flow cytometry-based proteomic data, Cytometry A, 2012, Feb, 81A: 120–129

Kanderová V. **, Kužílková D. **, Stuchlý J. **, Vášková M., Brdička T., Fišer K., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. High-resolution antibody array analysis of childhood acute leukemia cells, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, Apr, 15: 1246–1261

** VK, DK and JS contributed equally.

V prostředí R-projekt jsme vytvořili algoritmus, který automaticky identifikuje jednotlivé populace fluorescenčně značených kuliček a dále počítá mediány intenzity fluorescence (MedFI) ze streptavidinu-PE (vyjadřující kvantitu daného antigenu ve frakci). Algoritmus dále umožňuje uživateli manuálně opravit zvolené oblasti, protože populace kuliček některých šarží souboru SEC-MAP nebyly optimálně fluorescenčně rozlišeny a byly tedy nutné drobné korekce. Výstupem tohoto algoritmu je tabulka s uvedenými MedFI ze streptavidinu-PE pro každý antigen v každé SEC frakci. Dále je možné vytvořit čárové grafy, které dají uživateli přehled o expresi všech antigenů. Dalším důležitým krokem je normalizace dat, která umožní opravu šumu pozadí a vyrovná rozdíly v celkovém množství nanesených proteinů. Každý soubor SEC-MAP obsahuje populace kuliček, které na sobě nemají navázané žádné protilátky a slouží jen k tomu, aby bylo možné odečíst signál vyvolaný nespecifickou vazbou na kuličky. Ke kvantifikaci signálu jednotlivých protilátek slouží automatická detekce signálu jednotlivých proteinových entit vyskytujících se v buňce, opět s možností manuální korekce, která je součástí uvedeného algoritmu. Následně dojde k výpočtu kvantity daného proteinu v každém vzorku, zjednodušeně řečeno se jedná o výpočet plochy pod křivkou pro každý vzorek. Tento krok umožňuje srovnání množství daného proteinu mezi jednotlivými vzorky.

4.4. Validace SEC-MAP na leukemických buněčných liniích po inhibici imatinib mesylátem

Stuchlý J., Kanderová V., Fišer K., Černá D., Holm A., Wu W., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. An automated analysis of highly complex flow cytometry-based proteomic data, *Cytometry A*, 2012, Feb, 81A: 120-129

Abychom ověřili, že postup přípravy vzorku i vlastní analýza dat respektuje naše potřeby (identifikaci rozdílně exprimovaných proteinových entit mezi více vzorky), použili jsme model stimulace BCR/ABL1+ leukemických buněčných linií specifickým inhibitorem – imatinib mesylátem. Tento model byl již mnohokrát studován pomocí standardních technik proteomiky a v literatuře je velmi dobře popsán. K tomuto účelu jsme stimulovali 4 BCR/ABL1+ leukemické buněčné linie: TOM-1, SUB-B15 (obě B-prekurzorová ALL, BCP-ALL), K562 a BV-173 (obě CML v blastické krizi) po dobu 24h a poté jsme pomocí SEC-MAP hodnotili změny v proteomu oproti nestimulovaným protějškům. U buněčné linie TOM-1 byla popsána částečná rezistence na imatinib mesylát²⁹, což jsme potvrdili pomocí značení Annexin V/PI. Tato linie sloužila jako kontrola, že zvýšená popř. snížená exprese konkrétních proteinů přímo nesouvisí s probíhající apoptózou.

Pomocí sady 1152 populací kuliček SEC-MAP jsme identifikovali 401 proteinových entit. Expese 13 proteinů byla, po inhibici imatinib mesylátem, výrazně změněna (zvýšena nebo snížena) v alespoň dvou buněčných liniích alespoň dvojnásobně. Jednalo se jako o celkovou změnu fosforylace proteinů (zjištěnou pomocí protilátky proti celkovému fosfo-tyrosinu) a dále o změnu exprese proteinů mitochondriální dráhy apoptózy a poškození DNA (např. zvýšení štěpeného PARP1), snížení exprese adhezních molekul (např. CD18), snížení exprese a zároveň defosforylace proteinů asociovaných s BCR/ABL1 nebo B-buněčným receptorem (RASA1, LCP2) a nakonec došlo ke zvýšení exprese inhibitorů buněčného cyklu (např. p21). K popsáným změnám v proteomu došlo i u buněčné linie TOM-1, sloužící jako kontrola.

Potvrdili jsme, že pomocí SEC-MAP jsme schopni identifikovat diferencielně exprimované proteiny mezi jednotlivými skupinami vzorků a pomocí výše popsaných analytických postupů jsem schopni tyto změny detekovat.

4.5. Korelace data ze SEC-MAP s pFC na leukemických buněčných liniích a PBMC zdravých dárců

Kanderová V. **, Kužílková D. **, Stuchlý J. **, Vášková M., Brdička T., Fišer K., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. High-resolution antibody array analysis of childhood acute leukemia cells, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, Apr, 15: 1246–1261 – příloha 7.3.

** VK, DK and JS contributed equally.

K ověření principu SEC-MAP jsme porovnali data získaná ze SEC-MAP u 11-ti leukemických buněčných linií a izolovaných B-, T-lymfocytů a monocytů z periferní krve zdravých dárců s daty získanými pFC. Pomocí lineární regrese jsme srovnali kvantitu 31 znaků, které se používají k imunofenotypizaci dětských leukemií. U SEC-MAP jsme počítali sumu signálu jednotlivých entit, u pFC jsme hodnotili průměrnou intenzitu fluorescence. Ke kvantitativní shodě ($p < 0,05$) došlo u 18-ti znaků (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD13, CD15, CD22, CD33, CD44, CD45, CD58, CD72, CD74, intra CD79a, HLA-DR a intra MPO). Pro metodu SEC-MAP jsme testovali více klonů proti stejnému antigenu, pokud to bylo možné. Pro vlastní porovnání jsme vybrali klon, který vykazoval nejnižší tendenci k nespecifické vazbě a zároveň si zachoval schopnost specificky vázat antigen. Přesto jsme u dalších znaků kvantitativní shodu nenašli, převážně proto, že signál příslušné protilátky u SEC-MAP byl příliš slabý (CD19, CD20, CD34 a CD117) nebo dokonce žádný (CD24, CD27, CD56). Zda-li dojde ke shodě v detekci u obou metod se zdá být nezávislé na použití stejného klonu protilátky.

Protože SEC-MAP je metoda založená na imunoprecipitaci protilátky s antigenem, je klíčovým krokem výběr správného klonu protilátky, který bude fungovat v nativním prostředí SEC-MAP. I přes pečlivý výběr použitých protilátek je dále nutné ověřit získané informace jinou, validovanou metodou, protože v nastavení SEC-MAP často dochází k nespecifickým vazbám, ke snížení nebo dokonce ztrátě afinity protilátky. I přes to jsme našli kvantitativní shodu u 58% testovaných znaků, které se běžně používají k imunofenotypizaci dětských AL.

4.6. Identifikace diferencially exprimovaných proteinů u jednotlivých podtypů dětské AL a ověření jejich exprese jinou metodou

Kanderová V. **, Kužílková D. **, Stuchlý J. **, Vášková M., Brdička T., Fišer K., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. High-resolution antibody array analysis of childhood acute leukemia cells, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, Apr, 15: 1246–1261 – příloha 7.3.

** VK, DK and JS contributed equally.

V prospektivní studii v letech 2010-2013 jsme pomocí SEC-MAP vyšetřili 501 antigenů u 57 primárních vzorků v době diagnózy dětské AL. K tomu jsme použili kuličky se 632 různými protilátkami. Pomocí výše popsaného algoritmu (výsledky 3) jsme definovali entity v hydrofilní frakci (celkem 980 entit) i v detergent-rozpustné frakci proteomu (celkem 779 entit). Pomocí SEC-MAP jsme hledali diferencially exprimované proteiny u třech podtypů dětské AL –BCP-ALL (n=35), T-ALL (n=9) a AML (n=13). Celkem jsme našli 51 proteinových entit, které přísluší k 46 antigenům, jež se lišily ve své expresi mezi alespoň dvěma podtypy dětské AL. Jednalo se převážně o CD znaky, adaptorové proteiny a transkripční faktory. Mnohé z nich byly již dříve popsány, protože se jedná o proteiny, které definují liniovou příslušnost (např. PAX5, CD19 a CD22 u BCP-ALL; LAT, CD3 a CD8 u T-ALL nebo CEBPA a HCK u AML). Další znaky ovšem u jednotlivých podtypů dětské AL popsány nebyly. Pomocí různých metod jsme validovali všech 46 diferencially exprimovaných antigenů.

Dále jsme hledali diferencially exprimované znaky mezi jednotlivými podtypy BCP-ALL. Vzhledem k malé kohortě jsme identifikovali pouze jeden protein diferencially exprimovaný mezi ETV6/RUNX1+ (n=6) a ETV6/RUNX1- BCP-ALL (n=29), asice OPAL1. Specifitu tohoto rozdílu jsme validovali pomocí leukemických buněčných linií.

Pomocí SEC-MAP jsme identifikovali 47 diferencially exprimovaných antigenů mezi jednotlivými podtypy dětských AL a následně jsme validovali specifitu jejich detekce.

4.7. Nalezení vhodných znaků ukazujících preanalytickou degradaci primárních diagnostických vzorků

Kanderová V. **, Kužílková D. **, Stuchlý J. **, Vášková M., Brdička T., Fišer K., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. High-resolution antibody array analysis of childhood acute leukemia cells, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, Apr, 15: 1246–1261 – příloha 7.3.

** VK, DK and JS contributed equally.

Vzhledem k tomu, že laboratoř CLIP je centrální laboratoř diagnostiky dětských AL, dostávají se k nám vzorky i z mimo-pražských pracovišť. U některých vzorků (7/51) ALL jsme si všimli, že došlo k posunu sig-

nálu kinasy ABL1 a AKT1 směrem k frakcím s menší molekulovou hmotností. Naproti tomu signál beta-aktinu, který se často používá jako kontrola množství naneseného vzorku, zůstal stále v původní SEC frakci. Naše hypotéza byla, že u těchto vzorků došlo k počátečním fázím degradace z důvodu jeho pozdějšího zpracování, která byla podpořena zvýšenou expresí proteinu BAD v degradovaných vzorcích BCP-ALL

Abychom potvrdili tuto hypotézu, napodobili jsme tento proces – ponechali jsme vzorek buffy coatu při pokojové teplotě a po 24h jsme izolovali PBMC. U vzorků starých 24h došlo, v porovnání s čerstvými vzorky, ke zvýšenému výskytu časně-apoptotických ($31,9\% \pm 0,29\%$ versus $6,7\% \pm 0,91\%$) a mrtvých ($0,4\% \pm 0,08\%$ vs. $7,2\% \pm 0,87\%$) buněk. Pomocí WB a SEC-MAP jsme ověřili degradaci kinasy ABL1 a AKT1 (výskytem proužků resp. signálu ve frakcích s menší molekulovou hmotností), zatímco beta-aktin degradován nebyl.

Pomocí algoritmu vyhledávající proteinové entity jsme našli 27 entit, které se vyskytovaly pouze v degradovaných vzorcích ALL. Často se jednalo o signalizační proteiny (STAT2, STAT6, PRKCD) a jaderné proteiny (transkripční faktor E2A, replikační faktor MCM7).

Beta-aktin, který se často používá u WB jako kontrola množství naneseného vzorku, se ukázal být velmi nespolehlivým ukazatelem viability buněk při zpracování a je tedy nevhodný při použití primárních diagnostických vzorků. Z tohoto hlediska se zdá být vhodné použít kinasy ABL1 popř. AKT1 a to jak pro WB, tak pro SEC-MAP.

5 DISKUZE A ZÁVĚR

V současné době je trend ve výzkumu nádorů spojování informací o genech, mRNA i proteinech. Studie molekulární genetiky identifikovali některé geny hrající roli v leukemogenezi (např. IKZF1, PAX5 nebo BLNK).^{30,31,32} Vzhledem k tomu, že ne vždy koreluje hladina mRNA s expresí proteinu, nemusí se jednat o přímé ovlivnění patogeneze onemocnění.¹⁴ Proto by proteomika měla doplňovat molekulární genetiku ve smyslu stanovení exprese a aktivace proteinů spojovaných s nádory. V rámci této dizertační práce jsme porovnali izolaci PBMC zdravých dárců pomocí standardně používané izolace přes hustotní gradient Ficoll-Paque™ s námi navrženou CD81+ imunoafinitní chromatografií (tzv. CD81+ T-Catch™ metodou) pro hmotnostní cytometrii. Ukázalo se, že při izolaci pomocí CD81+ Catch™ dochází kvantitativně k větším ztrátám cílových buněk, avšak finální produkt obsahuje výrazně nižší procento kontaminujících subpopulací. K tomuto faktu zřejmě dochází díky afinitní izolaci přes matici, kdy volné destičky snadno prostoupí maticí ještě před centrifugací vzorku a nedojde tedy k navázání destiček na mononukleární buňky. Tím se značně zkrátí doba vlastního nahrávání pomocí cytometru CyTOF2, dochází k úspoře argonu (nosného plynu) a nedochází ke zbytečnému zatížení detektoru. Díky nastavení, ve kterém CD81+ T-Catch™ probíhá, může snadno dojít k automatizaci a tím je ušetřen čas kvalifikovaného pracovníka. Nevýhodou CD81+ T-Catch™ metody jsou mírně větší ztráty cílových buněk, vlastní protokol bude dále optimalizován tak, aby se tyto ztráty snížily. Dále není jasné, zda-li separace buněk pomocí imunoafinitní chromatografie neaktivuje cílové buňky, což by ovlivnilo např. funkční testování izolovaných buněk. Druhou možností proteomiky jsou metody, které postrádají single-cell rozlišení (hmotnostní spektrometrie a protilátkové arrays). Vzhledem k tomu, že mnohdy souvisí patogeneze alterovaných proteinů s jejich subcelulární lokalizací³³, je rozdělení buněčného lyzátu na různé subcelulární frakce nespornou výhodou. Toto je možné u techniky SEC-MAP array, která byla v roce 2009 publikovaná Wu et al. SEC-MAP umožňuje detekovat proteiny pomocí protilátek bez nutnosti použití sandwichového uspořádání (jak je to u bead-based protilátkových arrays obvyklé).²¹ Specifita je u této techniky zajištěna rozdělením proteinového lyzátu pomocí SEC. V této dizertační práci se zaměřuji na optimalizaci a validaci SEC-MAP za účelem profilování buněk dětské AL. Touto technikou jsme schopni změřit až 1728 antigenů v jednom vzorku.²² Spolu s rozdělením proteomu na jednotlivé subcelulární a hmotnostní frakce lze o každém vzorku získat značné množství informací. Díky tomu vyžaduje metoda SEC-MAP nejen pečlivou optimalizaci laboratorních postupů (viz výsledky 2), ale i semi-automatizované analytické procesy umožňující zpětnou kontrolu analýz (viz výsledky 3). Mezi odběrem kostní dřeně pacienta a vlastním zpracováním materiálu uběhne mnohdy více než 24h. Některé genotypy AL (např. hyperdiploidie) jsou náchylnější k proteolytické degradaci než jiné genotypy.²⁷ Navíc odložení izolace buněk může snížit viabilitu izolovaných buněk.²⁶ Kvůli tomu je nutná kontrola kvality zpracovaného materiálu z hlediska proteolýzy v důsledku probíhající apoptózy. V tomto případě se nevhodným kandidátem ukázal být beta-aktin, který je ovšem jeden z nejčastěji používaných kontrolních proteinů při WB. Naproti tomu

štěpení kinas ABL1 a AKT1 jasně odráželo probíhající apoptózu. Pomocí SEC-MAP jsme identifikovali 46 diferenciatně exprimovaných proteinů mezi třemi základními skupinami dětských AL, které jsme následně validovali pomocí klasických metod (pFC, WB, qPCR). I přes pečlivý výběr protilátek použitých k přípravě SEC-MAP jsme nenalezli vhodné imunoprecipitující klon protilátek proti některým (z hlediska diagnostiky dětských AL) klíčovým povrchovým znakům (např. CD19, CD27, CD34 nebo CD117). Přesto jsme u 18/31 měřených imunofenotypových znaků našli kvantitativní shodu v detekci mezi SEC-MAP a pFC. Jako základní diagnostický nástroj se ovšem použití SEC-MAP zdá být zcela nevhodné, protože postrádá single-cell rozlišení (které je pro diagnostiku leukemií klíčové) a také celý proces SEC-MAP trvá 3 dny. Význam SEC-MAP tedy bude především ve výzkumu při hledání diferenciatně exprimovaných či aktivovaných proteinů např. u buněk rezistentních na určité léčivo, u buněk s umlčeným genem nebo buněk stresovaných.

V rámci této dizertační práce byly zavedeny nové metody k určení proteinového profilu maligních i nemaligních lymfo- a monocytů. Výsledky těchto metod byly porovnány s výsledky získanými standardními metodami a izolačními postupy proteomiky. Bylo zde ukázáno, že izolace PBMC pomocí CD81+ T-Catch™ vede k získání finálního produktu o vyšší čistotě, avšak dochází ke kvantitativně větším ztrátám oproti standardní izolaci buněk přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™. Pomocí metody SEC-MAP jsme našli a validovali 47 diferenciatně exprimovaných antigenů mezi podskupinami dětských AL. Jako spolehlivým ukazatelem probíhající apoptózy buněk po aspiraci kostní dřeně se ukázalo štěpení kinas ABL1 a AKT1, zatímco signál beta-aktinu změněn nebyl. SEC-MAP je tedy schopna reflektovat imunofenotyp leukemických buněk, jejich odpověď na cílenou léčbu a také stres buněk nacházejících se v nefyziologickém prostředí (ve zkumavce).

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Miller, R. W., Young, J. L. & Novakovic, B. Childhood Cancer. *Cancer* **75**, 395–405 (1995).
2. Ma, S. K., Wan, T. S. K. & Chan, L. C. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematol. Oncol.* **17**, 91–105 (1999).
3. Brown, D. *et al.* A PMLRARA α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2551–2556 (1997).
4. Corral, J. *et al.* An Mll – AF9 Fusion Gene Made by Homologous Recombination Causes Acute Leukemia in Chimeric Mice : A Method to Create Fusion Oncogenes. *Cell* **85**, 853–861 (1996).
5. Bennett, M. *et al.* The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia : Concordance among Observers and Clinical Correlations. *Br. J. Haematol.* **47**, 553–561 (1981).
6. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *Br. J. Haematol.* **33**, 451–458 (1976).
7. Bene, M. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* **9**, 1783–1786 (1995).
8. Kaspers, G. J. L. *et al.* Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: Results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the international BFM study group. *J. Clin. Oncol.* **31**, 599–607 (2013).
9. Creutzig, U. *et al.* Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia : results from Study. *Blood* **122**, 37–44 (2013).
10. Roberts, K. G. *et al.* Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1005–1015 (2014).
11. Mullighan, C. G. *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 470–480 (2009).
12. Boer, M. L. Den *et al.* A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* **10**, 125–134 (2009).
13. Varambally, S. *et al.* Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* **8**, 393–406 (2005).
14. Tian, Q. *et al.* Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 960–969 (2004).
15. Nishizuka, S. *et al.* Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 14229–14234 (2003).

16. Vaskova, M. *et al.* Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **19**, 876–8 (2005).
17. Vaskova, M. *et al.* High expression of cytoskeletal protein drebrin in TEL/AML1pos B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia identified by a novel monoclonal antibody. *Leuk. Res.* **35**, 1111–3 (2011).
18. Mejstříková, E., Kalina, T., Trka, J., Starý, J. & Hrusák, O. Correlation of CD33 with poorer prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy. *Leukemia* **19**, 1092–4 (2005).
19. Beum, P. V. *et al.* Loss of CD20 and Bound CD20 Antibody from Opsonized B Cells Occurs More Rapidly Because of Trogocytosis Mediated by Fc Receptor-Expressing Effector Cells Than Direct Internalization by the B Cells. *J. Immunol.* **187**, 3438–3447 (2011).
20. Rossi, E. *et al.* Trogocytosis of multiple B-cell surface markers by CD22 targeting with epratuzumab. *Blood* **122**, 3020–9 (2013).
21. Wu, W. *et al.* Antibody array analysis with label-based detection and resolution of protein size. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 245–57 (2009).
22. Slaastad, H. *et al.* Multiplexed immuno-precipitation with 1725 commercially available antibodies to cellular proteins. *Proteomics* **11**, 4578–82 (2011).
23. Holm, A., Wu, W. & Lund-Johansen, F. Antibody array analysis of labelled proteomes: How should we control specificity? *N. Biotechnol.* **29**, 578–585 (2012).
24. Hsu, H., Joos, T. O. & Koga, H. Multiplex microsphere-based flow cytometric platforms for protein analysis and their application in clinical proteomics – from assays to results. *Electrophoresis* **30**, 4008–4019 (2009).
25. Do, J. H. & Choi, D.-K. Normalization of microarray data: single-labeled and dual-labeled arrays. *Mol. Cells* **22**, 254–61 (2006).
26. Bull, M. *et al.* Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J. Immunol. Methods* **322**, 57–69 (2007).
27. Zhang, Y., Lu, J., van den Berghe, J. & Lee, S. H. Increased incidence of spontaneous apoptosis in the bone marrow of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **30**, 333–339 (2002).
28. van Dongen, J. J. M. *et al.* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* **26**, 1908–75 (2012).
29. Montiel-Duarte, C. *et al.* Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leuk. Res.* **32**, 709–16 (2008).
30. Boer, M. L. Den *et al.* A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* **10**, 125–134 (2009).
31. Mullighan, C. G. *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110–4 (2008).
32. Tijchon, E., Havinga, J., van Leeuwen, F. N. & Scheijen, B. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. *Leukemia* **27**, 541–52 (2013).
33. Uckun, F. M. *et al.* Serine phosphorylation by SYK is critical for nuclear localization and transcription factor function of Ikaros. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18072–7 (2012).

SEZNAM PUBLIKACÍ

Stuchlý J., Kanderová V., Fišer K., Černá D., Holm A., Wu W., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. An automated analysis of highly complex flow cytometry-based proteomic data, *Cytometry A*, 2012, Feb, 81A: 120-129, **IF₂₀₁₅ = 3,181**

Kanderová V. **, Kužílková D. **, Stuchlý J. **, Vášková M., Brdička T., Fišer K., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. High-resolution antibody array analysis of childhood acute leukemia cells, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, Apr, 15: 1246-1261, **IF₂₀₁₅ = 5,912**

** VK, DK and JS contributed equally.

Pelák O., Kužílková D., Thurner D., Kiene ML., Stanar K., Stuchlý J., Vášková M., Starý J., Hrušák O., Stadler H., Kalina T. Lymphocyte enrichment using CD81-targeted immunoaffinity matrix, *Cytometry A*, 2017, Jan, 91(1): 62-72, **IF₂₀₁₅ = 3,181**

Dytrych P., Król P., Kotrová M., Kužílková D., Hubáček P., Król L., Katra R., Hrušák O., Kabelka Z., Doležalová P., Kalina T., Fronková E. Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome, *Molecular Immunology*, 2015, May, 65: 123-147, **IF₂₀₁₅ = 3,375**

Boublíková L, Bakardjieva-Mihaylova V., Škvárová Kramaržová K, Kužílková D., Dobiášová A., Fišer K., Stuchlý J., Kotrová M. Buchler T., Dušek P., Grega M., Rosova B., Vernerová Z., Klezl P., Pesl M., Zachoval R., Krolupper M., Kubecová M., Stahalová V., Abrahamová J., Bajbuk M., Kodet R., Trka J. Wilms tumor gene 1 (WT1), TP53, RAS/BRAF and KIT aberrations in testicular germ cell tumors, *Cancer Letters*, 2016, Jul 1, 376(2): 367-76, **IF₂₀₁₅ = 5,992**

Zimmermannová O., Doktorová E., Stuchlý J., Kanderová V., Kužílková D., Strnad H., Starková J., Alberich-Jorda M., Falkenburg JHF, Trka J., Petrák J., Zuna J., Žaliová M. An activating mutation of GNB1 is associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in ETV6-ABL1-positive leukemia, *Oncogene*, 2017, Jun 26, **IF₂₀₁₅ = 7,932**



Terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk v myším experimentálním modelu

Mgr. Michaela Hájková

Laboratoř imunoregulací, Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Školitelka: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

ABSTRAKT

Díky svému imunomodulačnímu a regenerativnímu potenciálu představují mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSCs) slibný terapeutický prostředek pro buněčnou terapii, transplantace orgánů a tkáňové inženýrství. V posledních letech bylo testováno mnoho metod pro zlepšení klinické použitelnosti MSCs, ale přesný mechanismus pozorovaných efektů ještě nebyl popsán.

V předkládané práci jsme se zaměřili na studium několika faktorů, které mohou terapeutickou úspěšnost MSCs významně ovlivnit. Nejprve jsme na myším modelu transplantace alogenní kůže analyzovali terapeutický efekt MSCs aplikovaných lokálně na nanovlákných nosičích s inkorporovaným cyklosporinem A (CsA). Naše výsledky ukázaly, že aplikace MSCs a CsA směřuje M1/M2 polarizaci makrofágů směrem k regulačnímu fenotypu. Tato změna fenotypu je doprovázena sníženou produkcí oxidu dusnatého (NO) a interferonu γ (IFN- γ) a zvýšenou produkcí interleukinu 10 (IL-10) a může vést k potlačení lokální zánětlivé reakce.

Dalším cílem předkládané studie bylo analyzovat efekt podání MSCs v kombinaci s imunosupresivními látkami s různým mechanismem účinku na rovnováhu mezi jednotlivými populacemi T lymfocytů. Ukázali jsme, že MSC snižují nežádoucí účinky imunosupresivních látek a v kombinaci s těmito léky modulují aktivaci a apoptózu buněk. Tento kombinovaný přístup ovlivňuje imunitní rovnováhu potlačením pomocných (T helper, Th) Th1, Th2, Th17 a cytotoxických T lymfocytů a zároveň podporuje protizánětlivou imunitní odpověď spojenou s regulačními T lymfocyty.

Ukázali jsme také, že systémově podané MSCs specificky migrují do oka poraněného hydroxidem a zmírňují časné zánětlivé prostředí. Ze všech testovaných typů MSCs (neovlivněné MSCs, MSCs ovlivněné IFN- γ , faktorem nekrotizujícím nádory- α nebo IL-1) představují MSCs preinkubované s IFN- γ nejúčinnější přístup pro potlačení akutní fáze zánětu, snížení infiltrace myeloidními i lymfoidními buňkami a snížení lokální produkce IL-1 α , IL-6 a NO.

1 SEZNAM ZKRATEK

CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
COX	cyklooxygenase, cyklooxygenáza
CsA	cyclosporin A, cyklosporin A
Dex	dexamethasone, dexamethason
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Foxp3	forkhead box proteins 3
GVHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
IDO	indoleamin 2,3 dioxygenase, indoleamin 2,3 dioxygenáza
IFN	interferon
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxid synthase, inducibilní syntáza oxidu dusnatého

LNCs	lymph node cells, buňky lymfatických uzlin
MMF	mycophenolate mofetil, mykofenolát mofetil
MSCs	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
NO	nitric oxide, oxid dusnatý
NK	natural killers, přirození zabíječi
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězcová reakce
Pred	prednisone, prednison
Rapa	rapamycine, rapamycin
ROR γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
Tc	cytotoxic T (lymphocytes), cytotoxické T (lymfocyty)
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
Th	helper T (lymphocytes), pomocné T (lymfocyty)
TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádory
Treg	regulatory T (lymphocytes), regulační T (lymfocyty)

2 ÚVOD

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) představují stále častěji využívanou unikátní buněčnou terapii. Tuto heterogenní populaci buněk je možné izolovat z různých tkání, jako jsou slezina, kostní dřeň, tuková tkáň nebo pupečnicková krev^{1,2} a po indukci lze MSCs diferencovat v buňky mezodermální, endodermální a ektodermální linie³.

Jednou z klíčových vlastností MSCs je jejich schopnost regulovat imunitní odpověď. MSCs potlačují nebo modulují funkce různých populací imunitních buněk včetně T a B lymfocytů^{4,5}, makrofágů⁶, přirozených zabíječů (natural killer cells, NK cells)⁷, dendritických buněk⁸ nebo granulocytů⁹. Bylo prokázáno, že MSCs inhibují proliferaci lymfocytů, potlačují produkci prozánětlivých cytokinů a ovlivňují rovnováhu mezi prozánětlivými a regulačními populacemi leukocytů¹⁰⁻¹². Další výhodou MSCs jsou jejich cytoprotektivní, antiapoptotické a trofické vlastnosti¹³. Společně se svou nízkou imunogenicitou tak MSCs představují zajímavý terapeutický prostředek pro regenerativní medicínu, léčbu mnoha zánětlivých onemocnění a pro transplantace.

Terapeutický potenciál MSCs byl zdokumentován v mnoha studiích, které demonstrovaly jejich schopnost zmírnit experimentální autoimunitní onemocnění nebo alergické reakce^{14,15}, léčit povrchová poranění oka¹⁶, potlačovat imunitní reakce po transplantaci^{17,18} a reakci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GVHD)^{19,20}. V současné době je registrováno přes 700 klinických studií, které využívají jak autologní, tak alogenní MSCs převážně pro léčbu akutního infarktu myokardu, GVHD, diabetu, Crohnovy choroby, poranění páteře a osteoartritidy (<https://clinicaltrials.gov/>).

Bylo popsáno, že MSCs mají schopnost modulovat imunitní odpověď pomocí solubilních faktorů i membránových molekul²¹. MSCs samotné jsou přitom ovlivňovány mikroprostředím, ve kterém se nacházejí. Pro dosažení požadovaných terapeutických efektů MSCs je nezbytné vybrat vhodného dárce, způsob podání, načasování i množství podaných buněk²²⁻²⁴. Zacílení, přežití a imunomodulační vlastnosti MSCs je navíc možné zvýšit kultivací v hypoxických podmínkách²⁵, preinkubací MSCs s cytokiny nebo ligandy toll-like receptorů^{26,27}, aplikací pomocí různých nosičů²⁸, genetickou manipulací²⁹ nebo aplikací v kombinaci s imunosupresivními látkami^{19,30,31}.

3 HYPOTÉZA A CÍLE

Tato práce poskytuje přehled imunomodulačních vlastností MSCs a současných metod zvyšujících jejich terapeutické schopnosti. Práce je zaměřena především na modulaci vlastností MSCs pomocí imunosupresivních látek nebo cytokinů a studium terapeutického efektu MSCs podaných lokálně v kombinaci s cyklosporinem A (CsA)

3.1 Specifické cíle disertační práce:

Zhodnotit migrační a imunomodulační potenciál MSCs aplikovaných na nanovláknenných nosičích

Analyzovat vliv MSCs podaných na nanovlákných nosičích v kombinaci s CsA na lokální zánětlivou odpověď v kožním allotransplantátu

Testovat vliv imunopresivních látek na fenotyp MSCs

Studovat mechanismus, kterým MSCs ovlivňují působení imunopresivních látek na rovnováhu mezi různými subpopulacemi T lymfocytů

Popsat vliv systémově podaných MSCs ovlivněných různými cytokiny na akutní fázi zánětu v rohovkovém epitelu

4 MATERIÁL A METODY

Experimenty na zvířatech. V této studii jsme využívali dva experimentální myší modely: transplantaci alogenního kožního štěpu a poranění rohovky pomocí hydroxidu. Ve všech experimentech (články 1–3) byly použity 8–12týdenní myši kmene BALB/c obou pohlaví. Jako dárce štěpů byly využívány myši kmene C57BL/6J (B6) (článek 3).

MSCs. V této studii byly použity dva zdroje MSCs: tříselná tuková tkáň z myší kmene BALB/c (články 1 a 2) a kostní dřevina ze stehenní a holenní kosti myší kmene BALB/c. Pro všechny experimenty byly využívány buňky z 3.–5. pasáže. MSCs izolované z kostní dřeviny byly podrobeny imunodepleci kontaminujících CD11b⁺ a CD45⁺ buněk pomocí magnetické separace. MSCs byly aplikovány lokálně pomocí nanovlákných nosičů (článek 1) nebo intravenózně (článek 3) nebo použity pro *in vitro* experimenty (články 1 a 2).

Statistická analýza. Data byla analyzována pomocí softwaru GraphPad 5 s využitím Studentova *t*-testu nebo jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA). Data jsou zobrazena jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka. Statistický rozdíl *p* menší než 0,05 byl považován za významný.

Další metody použité autorkou této práce: měření buněčné smrti a viability pomocí průtokové cytometrie a WST testu, diferenciací MSCs na adipocyty a osteoblasty, příprava kryořezů a fluorescenční mikroskopie, ELISA testy, stanovení produkce NO pomocí Griessova testu, izolace RNA, reverzní transkripce, real-time PCR, gelová elektroforéza, charakterizace povrchových i intracelulárních znaků pomocí průtokové cytometrie, měření proliferace buněk pomocí detekce inkorporovaného ³H-thymidinu.

5 VÝSLEDKY

Disertační práce je založena na následujících třech článcích:

5.1 Lokální aplikace mezenchymálních kmenových buněk a cyklosporinu A snižuje imunitní odpověď prostřednictvím změny fenotypu makrofágů

Michaela Hájková, Eliška Javorková, Alena Zajícová, Peter Trošan, Vladimír Holáň a Magdaléna Krulová
J Tissue Eng Regen Med. 2017: 11, 1456-1465

Imunopresivní účinky systémově podaných MSCs a imunopresivních látek již byly dobře zdokumentované. V této studii jsme na myším modelu alogenní transplantace kůže analyzovali mechanismus podílející se na efektu lokálně podaných MSCs v kombinaci s nespecifickou imunopresí. Nanovlákné nosiče s inkorporovaným CsA a adhezaními MSCs byly aplikovány na povrch kožních allotransplantátů a byla hodnocena a charakterizována lokální imunitní odpověď. Zjistili jsme, že MSCs jsou schopné migrovat do poraněného místa, po šesti dnech byly detekovány v oblasti štěpu a ve spádových lymfatických uzlinách. U příjemců léčených pomocí MSCs a CsA došlo k významnému snížení počtu makrofágů infiltru-

jících do štěpu a produkce NO, tento efekt koreloval s poklesem produkce IFN- γ ve štěpu a ve spádových lymfatických uzlinách. Naopak došlo k nárůstu počtu alternativně aktivovaných makrofágů (F4/80⁺CD206⁺ buňky) a produkce IL-10 makrofágy ve štěpu. Schopnost MSCs měnit fenotyp makrofágů z M1 typu na M2 populaci byla potvrzena v *in vitro* systému. Ukázali jsme, že aplikace MSCs v kombinaci s CsA indukuje změnu makrofágů na alternativně aktivovaný fenotyp produkující zvýšené množství IL-10. Tyto změny ve fenotypu a funkci makrofágů mohou představovat jeden z mechanismů imunosupresivních schopností MSCs aplikovaných v kombinaci s CsA.

5.2 Mezenchymální kmenové buňky zeslabují nežádoucí účinky imunosupresivních látek na různé populace T buněk

Michaela Hájková, Barbora Heřmánková, Eliška Javorková, Pavla Boháčová, Alena Zajícová, Vladimír Holář a Magdaléna Krulová
Stem Cell Rev Rep. 2017: 13, 104–115

Imunosupresivní látky jsou často používány pro léčbu nežádoucích imunitních reakcí, nicméně jejich klinické využití je limitováno škodlivými vedlejšími účinky. Kombinovaná aplikace imunosupresiv s MSCs nabízí slibný alternativní přístup, který umožňuje snížení dávek imunosupresivních látek a současně nemění, nebo dokonce zlepšuje výsledek terapie. Předkládaná studie si klade za cíl určit efekty imunosupresiv na různé subpopulace T buněk a prozkoumat účinnost léčby založené na MSCs v kombinaci s imunosupresivními látkami. Testovali jsme účinek pěti běžně používaných imunosupresiv s rozdílnými mechanismy působení: cyklosporin A, mykofenolát mofetil, rapamycin a dva glukokortikoidy – prednison a dexamethazon v kombinaci s MSCs na viabilitu a aktivaci myších CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů, na proporcii mezi Th17 (ROR γ t⁺), Th1 (T-bet⁺), Th2 (GATA-3⁺) a Treg (Foxp3⁺) buňkami a na produkci cytokinů souvisejících s těmito populacemi (IL-17, IFN- γ , IL-4 a IL-10). Ukázali jsme, že MSCs modulují působení imunosupresiv a že v kombinaci s imunosupresivními látkami vykazují různý vliv na aktivaci buněk a rovnováhu mezi různými subpopulacemi T lymfocytů, potlačují prozánětlivé populace T buněk a současně podporují funkce protizánětlivých Treg lymfocytů. Tyto výsledky naznačují, že terapie založená na MSCs by mohla představovat účinnou strategii pro potlačení negativních vlivů imunosupresivních látek na imunitní systém.

5.3 Modulace časného zánětlivého mikroprostředí v poškozeném oku pomocí systémově podaných mezenchymálních kmenových buněk ovlivněných interferonem γ

Eliška Javorková, Peter Trošan, Alena Zajícová, Magdaléna Krulová, **Michaela Hájková** a Vladimír Holář
Stem Cells Dev. 2014: 23, 2490–2500

Cílem této studie bylo sledovat efekty systémově podaných MSCs izolovaných z kostní dřeně na časnou fázi akutního zánětu v oku poškozeném hydroxidem sodným. Myši s poškozeným okem byly ponechány neléčené, nebo jim 24 hodin po poranění byly intravenózně podány fluorescenčně značené MSCs, které byly nestimulované, nebo ovlivněné IL-1 α , TGF- β , nebo IFN- γ . Po třech dnech od poškození jsme prokázali, že MSCs migrují specificky do poškozeného oka a že počet značených MSCs je 30krát větší v poškozeném než v kontrolním oku. Studium složení populace leukocytů v poškozených očích ukázala, že všechny typy testovaných MSCs mírně snižují počet lymfoidních i myeloidních infiltrujících buněk, ale pouze MSCs preinkubované s IFN- γ významně redukovaly procento buněk infiltrujících do oka, přičemž největší efekt byl pozorován u myeloidních buněk. Tato studie ukázala, že systémově aplikované MSCs migrují specificky do poškozeného oka a že MSCs ovlivněné IFN- γ jsou nejúčinnější ve snižování infiltrace leukocytů do oka, významně snižují produkci NO, IL-1 α a IL-6 a potlačují akutní fázi zánětu.

6 DISKUZE

Bylo prokázáno, že reaktivita a účinky MSCs jsou velice komplexní a uplatňuje se zde řada různých

mechanismů. V současné době se díky novým znalostem otevírají možnosti, jak terapeutický potenciál MSCs zlepšit a tím zvýšit pravděpodobnost účinné klinické aplikace. V předkládané práci jsme se zaměřili na studium vlivu několika faktorů, které mohou terapeutickou úspěšnost MSCs významně ovlivnit.

Nejprve jsme na modelu alogenní transplantace kůže u myši analyzovali terapeutický vliv MSCs aplikovaných lokálně pomocí nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA. Tento způsob lokálního podání umožňuje snížení nežádoucích účinků systémově podávaných imunosupresivních látek³² a zároveň zlepšuje zacílení MSCs do postiženého místa³³. Zjistili jsme, že lokálně podané MSCs migrují do kožního štěpu a spádových lymfatických uzlin. Leukocyty izolované z lymfatických uzlin (lymph node cells, LNCs) z myši, kterým byly aplikovány MSCs nebo MSCs s CsA produkovaly větší množství IL-10 a zároveň méně IFN- γ . Zároveň se významně snížila schopnost LSCs stimulovat produkci NO naivními makrofágy. Pomocí průtokové cytometrie bylo ujištěno, že nejpočetnější populaci leukocytů v kožním štěpu tvoří CD11b⁺ buňky a že aplikace MSCs snižuje jejich zastoupení. Současně s tím byla snížena také produkce NO a IFN- γ buňkami kožního štěpu. Dále jsme se proto zaměřili na detailní analýzu makrofágů infiltrujících do kožního štěpu. Bylo popsáno, že MSCs mají schopnost potlačovat produkci NO prozánětlivou subpopulací M1 makrofágů a zároveň podporovat indukci protizánětlivé M2 subpopulace.⁶ Ukázali jsme, že ko-kultivace makrofágů společně s MSCs vede ke zvýšení exprese CD206 – znaku M2 makrofágů. Následně jsme v *in vivo* modelu prokázali, že aplikace MSCs v kombinaci s CsA vede ke zvýšení exprese CD206 a zvýšené produkci IL-10 makrofágy ve štěpu. Tato změna fenotypu se může podílet na regeneraci a potlačení lokální zánětlivé odovědi.

Naše výsledky i další studie^{31,34} tedy naznačují, že léčba kombinující aplikaci MSCs s imunosupresivními látkami se řadí mezi slibné terapeutické strategie cílící na potlačení zánětlivé imunitní reakce. Nicméně o mechanismech interakce MSCs s imunosupresivními látkami a efektu této kombinované terapie na reakci imunitního systému je zatím známo jen velmi málo. V druhé části projektu jsme se zaměřili na studium interakcí mezi MSCs a různými imunosupresivními látkami (CsA, MMF – mykofenolát mofetil, Rapa – rapamycin, Dex – dexamethazon a Pred – prednizon) *in vitro* a určení vlivu kombinované aplikace na jednotlivé subpopulace T lymfocytů. Bylo prokázáno, že MSCs mají schopnost inhibovat aktivaci T lymfocytů a zároveň podporovat jejich přežívání.³⁵ Zjistili jsme, že přítomnost MSCs v kulturách částečně chrání splenocyty před buněčnou smrtí indukovanou imunosupresivou a zároveň podporuje jejich inhibiční působení tím, že snižuje expresi aktivačního znaku CD25 u CD4⁺ i CD8⁺ buněk. MSCs mají schopnost ovlivňovat i diferenciaci a funkce T lymfocytů¹². Naše výsledky ukázaly, že MSCs a imunosupresivní látky působí synergisticky na snížení procentuálního zastoupení CD4⁺ROR γ t⁺Th17 a zároveň CD4⁺IL-17⁺ lymfocytů v kulturách. Prado et al. (2011) popsali, že glukokortikoidy mohou aktivovat Th17 buňky.³⁶ V souladu s tímto zjištěním jsme pozorovali, že přítomnost Pred a Dex v kultuře zvyšuje zastoupení Th17 buněk. Tento stimulační efekt byl nicméně úplně potlačen pomocí MSCs. Podobně také procento CD4⁺Tbet⁺ Th1 lymfocytů bylo sníženo ve všech kulturách s MSCs. K významnému snížení došlo také u počtu CD4⁺IFN- γ ⁺ a CD8⁺IFN- γ ⁺ buněk. Dále jsme také zjistili, že MSCs potlačují expresi GATA-3 a IL-4 ve všech kulturách s imunosupresivními látkami, což může být výhodné zejména při léčbě onemocnění spojených s nadměrnou aktivitou Th2 lymfocytů, jako jsou alergie nebo systémový lupus erythematoses. Na rozdíl od výše popsaného inhibičního vlivu na Th1, Th2, Th17 a Tc lymfocyty jsme zjistili, že MSCs v kombinaci s imunosupresivou podporují expresi Foxp3 a IL-10, přičemž nejvýznamnější nárůst v zastoupení CD4⁺Foxp3⁺ buněk byl detekován ve vzorcích inkubovaných s MSCs a CsA, Rapa a Dex.

MSCs jsou velice citlivé na své mikroprostředí a jejich imunomodulační vlastnosti tedy mohou být ovlivněny také cytokiny²⁷. V další části projektu jsme proto srovnávali vliv systémově podaných neovlivněných MSCs nebo MSCs preinkubovaných s IL-1 α , IFN- γ a TGF- β na akutní fázi zánětu v oku poškozeném hydroxidem. Prokázali jsme, že MSCs podané intravenózně migrují do poškozeného oka a že všechny druhy testovaných MSCs potlačují počet infiltrujících buněk. Nejvýznamnější snížení procenta myeloidních buněk a exprese IL-1 α , IL-6 a NO v poškozeném oku bylo pozorováno při použití MSCs preinkubovaných s IFN- γ . MSCs ovlivněné IFN- γ také významně zvyšují expresiIDO a iNOS, čímž potlačují zánětlivé prostředí v poškozené rohovce.

V této práci jsme prokázali, že lokální aplikace MSCs na nanovláknenných nosičích, kombinace MSCs s imunosupresivními látkami nebo preinkubace MSCs s cytokiny představují vhodný prostředek pro zlepšení imunomodulačních a terapeutických vlastností MSCs. Naše výsledky také poukázaly na to, že pozorová-

vané terapeutické efekty jsou výsledkem velice komplexních interakcí mezi MSCs, jejich mikroprostředím a imunitním systémem. Pochopení těchto mechanismů je nezbytné pro výběr vhodné léčby a pro dosažení požadovaných terapeutických cílů.

7 ZÁVĚRY

Migrační a imunomodulační potenciál MSCs aplikovaných na nanovláčkových nosičích

Lokálně aplikované MSCs migrují z nanovláčkových nosičů do organismu příjemce. Po šesti dnech od aplikace je možné MSCs detekovat v kožním štěpu a ve spádových lymfatických uzlinách. Po podání MSCs společně s CsA dochází k významnému zvýšení sekrece IL-10 a naopak snížení produkce IFN-g LNCs. Zároveň s tím se snižuje schopnost LNCs stimulovat naivní makrofágy k produkci NO.

Vliv MSCs podaných na nanovláčkových nosičích v kombinaci s CsA na lokální zánětlivou odpověď v kožním allotransplantátu

Až 60 % leukocytů v kožním štěpu tvořily CD11b⁺ buňky. Podrobnou analýzou bylo zjištěno, že po aplikaci MSCs dochází ke snížení sekrece IFN-g buňkami z kožního štěpu a s tím související produkci NO. Ještě významnější byl tento efekt po aplikaci MSCs společně s CsA. Makrofágy infiltrující štěp v této skupině exprimovaly zvýšené hladiny CD206 a zároveň produkovaly IL-10. V *in vitro* i *in vivo* systému dochází vlivem MSCs k indukci M2 fenotypu makrofágů.

Vliv imunosupresivních látek na fenotyp MSCs

Žádná z testovaných imunosupresivních látek použitých v terapeutických dávkách nemění expresi znaků charakteristických pro MSCs. Nejvyšší koncentrace MMF a Rapa snižují viabilitu MSCs.

Mechanismus, kterým MSCs ovlivňují působení imunosupresivních látek na rovnováhu mezi různými subpopulacemi T lymfocytů

MSCs mají schopnost snižovat apoptózu CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocytů indukované imunosupresivou, zároveň však neinterferují se snížením aktivity způsobené těmito léky. Kombinace MSCs společně s imunosupresivními látkami významně snižuje zastoupení a funkce Th1, Th2, Th17 a Tc lymfocytů, a naopak podporuje protizánětlivou odpověď založenou na Treg buňkách. MSCs mají schopnost potlačit nežádoucí aktivaci Th17 buněk, ke které může docházet vlivem některých imunosupresiv.

Působení systémově podaných MSCs ovlivněných různými cytokiny na akutní fázi zánětu v rohovkovém epitelu

Intravenózně aplikované MSCs specificky migrují do poraněného oka. Nejvýznamnějšího efektu bylo dosaženo při použití MSCs preinkubovaných s IFN-g, tyto buňky významně potlačují infiltraci leukocytů a snižují produkci IL-1a, IL-6 a NO v poškozené rohovce

8 REFERENCE

- (1) Hoogduijn, M. J.; Crop, M. J.; Peeters, A. M. A.; van Osch, G. J. V. M.; Balk, A. H. M. M.; Ijzermans, J. N. M.; Weimar, W.; Baan, C. C. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells and Development* 2007, 16 (4), 597–604
- (2) Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Klueter, H.; Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006, 24 (5), 1294–1301
- (3) Zhao, Q.; Ren, H.; Han, Z. 2016. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy* 2016, 2 (1), 3–20.
- (4) Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P. D.; Matteucci, P.; Grisanti, S.; Gianni, A. M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002, 99 (10), 3838–3843
- (5) Corcione, A.; Benvenuto, F.; Ferretti, E.; Giunti, D.; Cappiello, V.; Cazzanti, F.; Risso, M.; Gualandi, F.; Mancardi, G. L.; Pistoia, V. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*

2006, 107 (1), 367–372

- (6) Kim, J.; Hematti, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 2009, 37 (12), 1445–1453
- (7) Spaggiari, G. M.; Capobianco, A.; Abdelrazik, H.; Becchetti, F.; Mingari, M. C.; Moretta, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008, 111 (3), 1327–1333
- (8) Jiang, X. X.; Zhang, Y.; Liu, B.; Zhang, S. X.; Wu, Y.; Yu, X. D.; Mao, N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005, 105 (10), 4120–4126
- (9) Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Bertolotto, M.; Montecucco, F.; Busca, A.; Dallegri, F.; Ottonello, L.; Pistoia, V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: A model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008, 26 (1), 151–162
- (10) Svobodova, E.; Krulova, M.; Zajicova, A.; Pokorna, K.; Prochazkova, J.; Trosan, P.; Holan, V. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells and Development* 2012, 21 (6), 901–910
- (11) Aggarwal, S.; Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005, 105 (4), 1815–1822
- (12) Mohammadzadeh, A.; Pourfathollah, A. A.; Shahrokhi, S.; Hashemi, S. M.; Moradi, S. L. A.; Soleimani, M. Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets. *International Immunopharmacology* 2014, 20 (2), 316–321
- (13) Spees, J. L.; Lee, R. H.; Gregory, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy* 2016, 7. DOI 10.1186/s13287-016-0363-7
- (14) Kavanagh, H.; Mahon, B. P. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy* 2011, 66 (4), 523–531
- (15) Zappia, E.; Casazza, S.; Pedemonte, E.; Benvenuto, F.; Bonanni, I.; Gerdoni, E.; Giunti, D.; Ceravolo, A.; Cazzanti, F.; Frassoni, F. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005, 106 (5), 1755–1761
- (16) Zajicova, A.; Pokorna, K.; Lencova, A.; Krulova, M.; Svobodova, E.; Kubinova, S.; Sykova, E.; Pradny, M.; Michalek, J.; Svobodova, J. et al. Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell Transplantation* 2010, 19 (10), 1281–1290
- (17) Popp, F. C.; Eggenhofer, E.; Renner, P.; Slowik, P.; Lang, S. A.; Kaspar, H.; Geissler, E. K.; Piso, P.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transplantation Immunology* 2008, 20 (1-2), 55–60
- (18) Perico, N.; Casiraghi, F.; Inrona, M.; Gotti, E.; Todeschini, M.; Cavinato, R. A.; Capelli, C.; Rambaldi, A.; Cassis, P.; Rizzo, P. et al. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: A pilot study of safety and clinical feasibility. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2011, 6 (2), 412–422
- (19) Kim, K.-W.; Moon, S.-J.; Park, M.-J.; Kim, B.-M.; Kim, E.-K.; Lee, S.-H.; Lee, E.-J.; Chung, B.-H.; Yang, C.-W.; Cho, M.-L. Optimization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Stem Cell Research & Therapy* 2015, 6. DOI: 10.1186/s13287-015-0197-8
- (20) Peng, Y.; Chen, X.; Liu, Q.; Zhang, X.; Huang, K.; Liu, L.; Li, H.; Zhou, M.; Huang, F.; Fan, Z. et al. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia* 2015, 29 (3), 636–646
- (21) Glenn, J.D.; Whartenby, K.A. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells* 2014, 6 (5), 526–539
- (22) Girdlestone, J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy* 2016, 8 (12), 1405–1416
- (23) Polchert, D.; Sobinsky, J.; Douglas, G. W.; Kidd, M.; Moadsiri, A.; Reina, E.; Genrich, K.; Mehrotra, S.; Setty, S.; Smith, B. et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of

graft versus host disease. *European Journal of Immunology* 2008, 38 (6), 1745–1755

- (24) Isakova, I. A.; Lanclos, C.; Bruhn, J.; Kuroda, M. J.; Baker, K. C.; Krishnappa, V.; Phinney, D. G. Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *Plos One* 2014, 9 (1). DOI: 10.1371/journal.pone.0087238.
- (25) Bader, A. M.; Klose, K.; Bieback, K.; Korinth, D.; Schneider, M.; Seifert, M.; Choi, Y. H.; Kurtz, A.; Falk, V.; Stamm, C. Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *Plos One* 2015, 10 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0138477
- (26) Waterman, R. S.; Tomchuck, S. L.; Henkle, S. L.; Betancourt, A. M. A New mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *Plos One* 2010, 5 (4). DOI: 10.1371/journal.pone.0010088
- (27) Krampera, M. Mesenchymal stromal cell ‘licensing’: a multistep process. *Leukemia* 2011, 25 (9), 1408–1414
- (28) Yuan, T.; Li, K. F.; Guo, L. K.; Fan, H. S.; Zhang, X. D. Modulation of immunological properties of allogeneic mesenchymal stem cells by collagen scaffolds in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2011, 98A (3), 332–341
- (29) Nowakowski, A.; Walczak, P.; Janowski, M.; Lukomska, B. Genetic engineering of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells and Development* 2015, 24 (19), 2219–2242
- (30) Girdlestone, J.; Pido-Lopez, J.; Srivastava, S.; Chai, J. G.; Leaver, N.; Galleu, A.; Lombardi, G.; Navarrete, C. V. Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs. *Cytotherapy* 2015, 17 (9), 1188–1199
- (31) Eggenhofer, E.; Renner, P.; Soeder, Y.; Popp, F. C.; Hoogduijn, M. J.; Geissler, E. K.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transplant Immunology* 2011, 25 (2-3), 141–147
- (32) Dobbels, F.; Moons, P.; Abraham, I.; Larsen, C. P.; Dupont, L.; De Geest, S. Measuring symptom experience of side-effects of immunosuppressive drugs: The modified transplant symptom occurrence and distress scale. *Transplant International* 2008, 21 (8), 764–773
- (33) Lee, D. E.; Ayoub, N.; Agrawal, D. K. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Research & Therapy* 2016, 7. DOI: 10.1186/s13287-016-0303-6
- (34) Cejka, C.; Cejkova, J.; Trosan, P.; Zajicova, A.; Sykova, E.; Holan, V. Transfer of mesenchymal stem cells and cyclosporine A on alkali-injured rabbit cornea using nanofiber scaffolds strongly reduces corneal neovascularization and scar formation. *Histology and Histopathology* 2016, 31 (9), 969–980
- (35) Normanton, M.; Alvarenga, H.; Hamerschlak, N.; Ribeiro, A.; Kondo, A.; Rizzo, L. V.; Marti, L. C. Interleukin 7 plays a role in T lymphocyte apoptosis inhibition driven by mesenchymal stem cell without favoring proliferation and cytokines secretion. *Plos One* 2014, 9 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0106673
- (36) Prado, C.; de Paz, B.; Gomez, J.; Lopez, P.; Rodriguez-Carrio, J.; Suarez, A. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology* 2011, 50 (10), 1794–1801

ostatní zdroje: <https://clinicaltrials.gov/>

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

9.1 Seznam použitých publikací

Hajkova M., Hermankova B., Javorkova E, Bohacova P., Zajicova A., Holan V, Krulova M. (2017); Mesenchymal stem cells attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs on distinct T cell subopula-

tions *Stem Cell Rev Rep* 13: 104-115 IF: 2,967

Hajkova M., Javorkova E., Zajicova A., Trosan P., Holan V., Krulova. (2015); A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017: 11, 1456-1465 IF: 3,989

Javorkova E., Trosan P., Zajicova A., Krulova M., **Hajkova M.**, Holan V. (2014); Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon- γ -treated mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* 23:1490-2500 IF: 3,562

9.2 Seznam ostatních publikací

Trosan P., Javorkova E., Zajicova A., **Hajkova M.**, Hermankova B., Kossl J., Krulova M., Holan V. (2016); The supportive role of insulin-like growth factor-I in the differentiation of murine mesenchymal stem cells into corneal like cells. *Stem Cell Dev* 25: 874–881 IF: 3,562

Holan V., Hermankova B., Bohacova P., Kossl J., Chudickova M., **Hajkova M.**, Krulova M., Zajicova A., Javorkova E. (2016); Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment. *Stem Cell Rev Rep* 12: 654–663 IF: 2,967

Hermankova B., Zajicova A., Javorkova E., Chudickova M., Trosan P., **Hajkova M.**, Krulova M., Holan V. (2015); Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells. *Immunobiology* 141: 577–586 IF: 2,22

Holan V., Zajicova A., Javorkova E., Trosan P., Chudickova M., **Pavlikova M.**, Krulova M. (2014); Distinct cytokines balance the development of regulatory T cells and interleukin-10-producing regulatory B cells. *Immunology* 141:577–586 IF: 3,701

