



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za zdravstvene vede

UPORABA JAVNO DOSTOPNIH  
PODATKOVNIH ZBIRK IN  
BIOINFORMATIČNIH ORODIJ ZA ANALIZO  
GENSKEGA IZRAŽANJA PRI SISTEMSKI  
SKLEROZI

(Magistrsko delo)

Maribor, 2019

Katjuša Mrak Poljšak





Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za zdravstvene vede

UPORABA JAVNO DOSTOPNIH  
PODATKOVNIH ZBIRK IN  
BIOINFORMATIČNIH ORODIJ ZA ANALIZO  
GENSKEGA IZRAŽANJA PRI SISTEMSKI  
SKLEROZI

(Magistrsko delo)

Maribor, 2019

Katjuša Mrak Poljšak



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za zdravstvene vede

Mentor: prof. dr. Uroš Potočnik

Somentorica: doc. dr. Katja Lakota

## **ZAHVALA**

Na tem mestu bi se rada zahvalila mentorju prof. dr. Urošu Potočniku za vse konstruktivne predloge in komentarje. Velika zahvala gre somentorici doc dr. Katji Lakota za vso strokovno pomoč, pogovore in čas, ki si ga je vzela kadarkoli sem jo potrebovala. Posebna zahvala gre vodji laboratorija za imunologijo revmatizma kliničnega oddelka za revmatologijo UKC v Ljubljani, doc. dr Saši Čučnik spec.mol.biokem. za priložnost, spodbudo in motivacijo in najboljšim sodelavkam na svetu za vso pomoč in podporo, hvala Tinki Švec, doc.dr. Snežni Sodin Šemrl, dr. Poloni Žigon, Manci Ogrič, Dragici Petric, Evi Gaberšček, Katarini Kozmos, Miri Oblak, Tini Zavrl, Blažu Burji in Tadeji Kuret. Hvala tudi Tei Janko in Tilnu Žemvi za tehnično podporo in na koncu moji družini za potrpežljivost, ljubezen in ure varstva, hvala Domen, Oskar, oči in Urša.



Fakulteta za zdravstvene vede

## IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE ZAKLJUČNEGA DELA

Ime in priimek študent-a/-ke: Katjuša Mrak Poljšak

Študijski program: Bioinformatika

Naslov zaključnega dela: Uporaba javno dostopnih podatkovnih zbirk in bioinformatičnih orodij za analizo genskega izražanja pri sistemski sklerozi

Mentor: prof.dr. Uroš Potočnik

Somentor: doc.dr. Katja Lakota

Podpisan-i/-a študent/-ka Katjuša Mrak Poljšak

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelal/-a ob pomoči mentor-ja/-ice oz. somentor-ja/-ice;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM.

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: \_\_\_\_\_  
(navedite obliko)

---

**Začasna nedostopnost:**

Zaključno delo zaradi zagotavljanja konkurenčne prednosti, zaščite poslovnih skrivnosti, varnosti ljudi in narave, varstva industrijske lastnine ali tajnosti podatkov naročnika:

\_\_\_\_\_ (naziv in naslov naročnika/institucije) ne sme biti javno dostopno do \_\_\_\_\_ (datum odloga javne objave ne sme biti daljši kot 3 leta od zagovora dela). To se nanaša na tiskano in elektronsko obliko zaključnega dela.

---

**Temporary unavailability:**

To ensure competition priority, protection of trade secrets, safety of people and nature, protection of industrial property or secrecy of customer's information, the thesis

\_\_\_\_\_ (institution/company name and address) must not be accessible to the public till \_\_\_\_\_ (delay date of thesis availability to the public must not exceed the period of 3 years after thesis defense). This applies to printed and electronic thesis forms.

---

Datum in kraj:

Podpis študent-a/-ke:

\_\_\_\_\_

Podpis mentor-ja/-ice: \_\_\_\_\_

(samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)

Ime in priimek ter podpis odgovorne osebe naročnika in žig:

\_\_\_\_\_

(samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)

# UPORABA JAVNO DOSTOPNIH PODATKOVNIH ZBIRK IN BIOINFORMATIČNIH ORODIJ ZA ANALIZO GENskega IZRAŽANJA PRI SISTEMSKI SKLEROZI

## POVZETEK

**Izhodišča:** Sistemska skleroza (SSc) je kronična sistemska avtoimunska bolezen vezivnega tkiva. Patogeneza bolezni še ni popolnoma poznana. Pogost vzrok smrti pri bolnikih s SSc je intersticijska pljučna bolezen. Naš namen je bil z uporabo javno dostopnih podatkovnih baz in bioinformatičnih orodij ugotoviti značilen profil izražanja genov in vpletenost različnih celičnih tipov v razvoju fibroze pri bolnikih s SSc s pridruženo intersticijsko pljučno boleznijo (SSc-ILD).

**Raziskovalne metode:** Za analizo podatkov genskega izražanja fibroblastov, izoliranih iz pljučnega tkiva, in celic celotnega pljučnega tkiva bolnikov smo uporabili program BRB-ArrayTools. V drugem delu smo s pomočjo bioinformatičnih orodij String in Reactome raziskali proteinske interakcije genov s spremenjenim izražanjem in jih analizirali glede na vpletenost v signalne poti.

**Rezultati:** V analizi genskega izražanja pljučnih fibroblastov smo dokazali moteno regulacijo genov, vpletenih v procese fibroze. Z analizo pljučnega tkiva smo dokazali moteno regulacijo genov izvenceličnega matriksa, poti TGF- $\beta$  in znižano izražanje citokinov, kemokinov in njihovih receptorjev. Ugotovili smo možne vplive različnih miRNA in transkripcijskih faktorjev družine NF $\kappa$ B, STAT in JUN na transkriptom fibroblastov ter vpliv PPAR in RAR na transkriptom celic pljučnega tkiva. Ugotovili smo epigenetski vpliv na celično proliferacijo, angiogenezo in izražanje signalne poti TGF- $\beta$  prek hsa-miR-132 miRNA v celicah pljučnega tkiva.

**Diskusija in zaključek:** Dokazali smo pomembno spremenjeno izražanje imunoglobulinov, kar kaže na pomembno vlogo celic B v pljučnem tkivu bolnikov v patogenezi bolezni, in ugotovili, da so geni, pomembno spremenjeni v fibroblastih, predvsem vpleteni v celično proliferacijo, geni drugih celic pljučnega tkiva pa so v veliki meri vključeni v mehanizme imunskega sistema in celične signalizacije, kar ponuja potencialne nove tarče za zdravljenje.

**Ključne besede:** fibroza, fibroblasti, pljučno tkivo, imunski sistem, epigenetika.



# **ANALYSIS OF GENE EXPRESSION USING PUBLIC DATA AND BIOINFORMATIC TOOLS IN SYSTEMIC SCLEROSIS**

## **ABSTRACT**

**Starting points:** Systemic sclerosis (SSc) is chronic, autoimmune connective tissue disease. Its pathogenesis is not completely understood. Major cause for mortality in this disease is interstitial lung disease (ILD). Our aim was to use publicly available databases and bioinformatic tools to discern gene expression and cell type involvement in development of fibrosis in SSc-ILD patients.

**Methods:** We used BRB-Array tools for analysis of gene expression in lung tissue and fibroblasts isolated from lung tissue of SSc patient and control. Furthermore, String and Reactome bioinformatic tools were used to analyze protein interactions between genes with changed expression and analyze pathways involving these genes, to better understand major drivers of disease.

**Results:** In analysis of gene expression we found perturbations in expression of genes leading to fibrosis such as extracellular matrix proteins, TGF- $\beta$  signaling pathway, decreased levels of cytokines, chemokines and their receptors expression. Based on gene expression profile we found possible miRNA and NF $\kappa$ B family STAT and JUN transcription factor involvement to/on transcriptome of fibroblasts and PPAR and RAR transcription factors to/on transcriptome of lung tissue. We found hsa-miR-132 miRNA epigenetic influence/signature on cell proliferation, angiogenesis and TGF- $\beta$  signaling pathway expression in lung tissue without fibroblasts. We found profound changes in immunoglobulin gene expression, which is implying important role of B cells in lung tissue of these patients.

**Discussion and conclusion:** The genes with significantly changed expression in fibroblast were those involved in cell proliferation, while differentially expressed genes of other cell types in lung tissue were those belonging to immune system and cell signalization, which implicates possible new therapeutic approaches.

**Keywords:** fibrosis, fibroblasts, lung tissue, immune system, epigenetics.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>Uvod in opis problema .....</b>	<b>1</b>
1.1	Sistemska skleroza .....	1
1.2	Vpliv prirojene in pridobljene imunosti na patogenezo SSc .....	2
1.3	Sistemska skleroza in avtoimunost .....	5
1.4	Epigenetika in sistemska skleroza.....	6
1.4.1	<i>Metilacija DNA</i> .....	7
1.4.2	<i>miRNA</i> .....	8
1.4.3	<i>Histonska modifikacija</i> .....	9
1.5	Mikromreže in bioinformatična obdelava podatkov .....	9
<b>2</b>	<b>Namen in cilji zaključnega dela .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Raziskovalno vprašanje .....</b>	<b>13</b>
3.1	Hipoteze .....	13
<b>4</b>	<b>Raziskovalna metodologija.....</b>	<b>14</b>
4.1	Potek raziskave in raziskovalne metode.....	14
4.2	Raziskovalni vzorec in etični vidik .....	16
4.3	Predpostavke in omejitve raziskave .....	18
<b>5</b>	<b>Rezultati .....</b>	<b>19</b>
5.1	Gensko izražanje fibroblastov izoliranih iz tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (GSE40839) .....	20
5.1.1	<i>Analiza genskih skupin povezanih s transkripcijskimi faktorji v fibroblastih</i> .....	23
5.1.2	<i>Analiza genskih skupin mikro RNA v fibroblastih</i> .....	25
5.2	Gensko izražanje celic pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (GSE76808) .....	26

5.2.1	<i>Analiza genskih skupin transkripcijskih faktorjev celotnega pljučnega tkiva.....</i>	29
5.2.2	<i>Analiza genskih skupin miRNA celotnega pljučnega tkiva.....</i>	33
5.3	Primerjava analiz genskega izražanja fibroblastov in pljučnega tkiva.....	35
5.3.1	<i>Analize z drugimi bioinformatičnimi orodji.....</i>	42
<b>6</b>	<b>Interpretacija in razprava .....</b>	<b>48</b>
6.1	Analize genskega izražanja fibroblastov - GSE40839.....	48
6.2	Analize genskega izražanja celotnega pljučnega tkiva GSE76808.....	51
6.3	Analize drugih celic pljučnega tkiva.....	55
<b>7</b>	<b>Sklep .....</b>	<b>60</b>
	<b>Literatura.....</b>	<b>63</b>
	<b>Priloge .....</b>	<b>1</b>

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Seznam statistično značilno spremenjenih genskih skupin transkripcijskih faktorjev med SSc-ILD/K.....	24
Tabela 2: Seznam statistično značilno spremenjenih genskih skupin mikro RNA med SSc-ILD/K.....	26
Tabela 3: Seznam statistično značilno spremenjenega izražanja genskih skupin, povezanih s transkripcijskimi faktorji med SSc-ILD/K v celicah pljučnega tkiva.....	30
Tabela 4: Seznam statistično značilno spremenjeno izraženih genskih skupin povezanih z določeno miRNA med SSc-ILD/K v celicah pljučnega tkiva.....	34
Tabela 5: Seznam statistično različno izraženih genskih skupin, povezanih s transkripcijskim faktorjem »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD.....	39
Tabela 6: Tarčni geni za hsa-miR-132-3p mikro RNA.....	41

## KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizmi vpleteni v patogenezo sistemske skleroze.....	5
Slika 2: Epigenetski mehanizmi SSc.....	7
Slika 3: Shematični prikaz nastanka in delovanja miRNA.....	9
Slika 4: Shematski prikaz poteka raziskave.....	14
Slika 5: Kvartilni diagram genskega izražanja fibroblastov.....	20
Slika 6: Grafični prikaz genskega izražanja v fibroblastih bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino.....	20
Slika 7: Kvartilni diagram genskega izražanja pljučnega tkiva.....	27
Slika 8: Grafični prikaz genskega izražanja pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino.....	27

Slika 9: Toplotni grafi znižano izraženih genskih skupin transkripcijskih faktorjev v celicah pljučnega tkiva SSc-ILD .....	31
Slika 10: Toplotni grafi povišano izraženih genskih skupin transkripcijskih faktorjev v celicah pljučnega tkiva SSc-ILD .....	32
Slika 11: Toplotni grafi znižano in povišano izraženih genskih skupin, povezanih z mikro RNAv celicah pljučnega tkiva .....	35
Slika 12: Grafični prikaz »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva.....	36
Slika 13: Povezave med statistično značilno povišano izraženimi geni »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD .....	37
Slika 14: Povezave med statistično značilno znižano izraženimi geni »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD .....	38
Slika 15: Toplotni grafi tarčnih genov genskih skupin, povezanih s transkripcijskimi faktorji v pljučnem tkivu: REL_T00168, NFIC_T00176, ESR1_T00261	40
Slika 16: Shematski prikaz analize genskega izražanja z BRB-ArrayTools.....	41
Slika 17: Povezave med proteini statistično značilno različno izraženih genov genskega profila drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc .....	44
Slika 18: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme povišano izraženih genov v fibroblastih bolnikov s SSC-ILD v primerjavi s kontrolno skupino .....	45
Slika 19: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme znižano izraženih genov v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino .....	46
Slika 20: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme povišano izraženih genov drugih celic pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino .....	47
Slika 21: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme znižano izraženih genov drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc .....	47

## KAZALO KRATIC

SSc	Sistemska skleroza
ISSc	Omejena kožna oblika sistemske skleroze
dSSc	Difuzna kožna oblika sistemske skleroze
IL	Interlevkin
PDGF	Trombocitni rastnim faktor
TGF	Transformirajoči rastni faktor
CTGF	Rastni factor vezivnega tkiva
TLR	Tollu podobni receptor
TNF	Faktor tumorske nekroze
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
RNA	Riboksinukleinska kislina
dsRNA	Dvojno vijačna riboksinukleinska kislina
IFN	Interferon
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
T <sub>H</sub>	Celice T pomagalk
T <sub>C</sub>	Citotoksične celice
GM-CSF	Granulocitne kolonije stimulirajoči factor
Ig	Imunoglobulin
Treg	Regulatorne celice T
ACA	protitelesa proti centromeram
ATA	protitelesa proti topoizomerazi
anti-RNAPolIII	protitelesa proti RNA Polimerazi III
antiU3RNP	Protitelesa proti fibrilarinu

GPCR	G sklopljeni receptorji
GWAS	Študije celotnega genoma
SNP	enojni nukleotidni polimorfizmi
miRNA	mikro ribosinukleinska kislina
siRNA	kratka interferenčna ribosinukleinska kislina
mRNA	Informacijska ribosinukleinska kislina
GWAS	Študije celotnega genoma
miRNA	mikro ribosinukleinska kislina
siRNA	kratka interferenčna ribosinukleinska kislina
mRNA	Informacijska ribosinukleinska kislina
PBMC	mononuklearne celice perifere krvi
SSc-ILD	Sistemska skleroza s pridruženno intersticijsko pljučno boleznijo
IPF	Idiopatska pljučna fibroza

# 1 Uvod in opis problema

## 1.1 Sistemska skleroza

Sistemska skleroza (SSc) je kronična sistemska avtoimunska bolezen vezivnega tkiva s heterogeno klinično sliko. Najpogosteje se pojavlja med 30. in 60. letom starosti, ženske zbolevajo pogosteje kot moški. Incidenca ali stopnja pojavnosti SSc je 3,36 pri ženski populaciji in 0,61 pri moški populaciji bolnikov v Veliki Britaniji na 100.000 oseb letno. Prevalenca ali razširjenost SSc na 100.000 oseb letno se je v zadnjem obdobju povečala z 17,13 (v letu 2000) na 25,38 (v letu 2012) (García Rodríguez, et al., 2018). Pojavlja se sporadično, obstajajo pa tudi primeri družinskega pojavljanja, kar kaže na določen vpliv dednosti pri nastanku bolezni. Ločimo štiri klinične oblike: zgodnjo obliko – presklerodermo, omejeno kožno obliko (ISSc), difuzno kožno obliko (dSSc) in četrto obliko brez prizadetosti kože (sindrom CREST) (Košnik, et al., 2011). Klinično je bolezen v zadnjih letih nekoliko bolj obvladljiva, kar lahko pripišemo zgodnejšemu odkrivanju bolezni in boljšemu zdravljenju zapletov, vendar sta za bolezen še vedno značilni neozdravljivost in visoka stopnja umrljivosti, predvsem zaradi razvoja fibroze pljuč (Herzog, et al., 2014). Intersticijska pljučna bolezen in pljučna hipertenzija sta najpogostejši vzrok smrti pri bolnikih s sistemsko sklerozo (Hsu, et al., 2011). Patogeneza bolezni še ni popolnoma poznana. Aktiviran je imunski odziv, prizadete so žile, predvsem kapilare, odlaga se izvencelični matriks, kar se kaže kot fibrotični proces – brazgotinjenje, ki je usodno predvsem, ker onemogoča funkcijo notranjim organom, kot so pljuča in ledvice (Allanore, et al., 2015; Viswanath, et al., 2013). (Slika 1) Vnetje, delovanje citotoksičnih limfocitov T, protitelesa proti endoteliju ali okužba s citomegalovirusom lahko povzročijo poškodbo žilnega endotelija, kar vodi v apoptozo endotelija in aktivacijo ter proliferacijo gladkomišičnih celic žil. Metabolizem endotelijskih celic se spremeni in posledično funkcijski profil endotelijskih celic žile v prokoagulantnega, provnetnega in vazokonstriktornega (Košnik, et al., 2011). (Slika 1) Miofibroblasti so celice, ki proizvedejo glavno patogeneza izvenceličnega matriksa in v fibroznem tkivu ostajajo stalno aktivirane. V glavnem nastajajo z aktivacijo fibroblastov v profibrotičnem celičnem okolju. Stalno aktivacijo pripisujejo citokinom (interlevkin 6 (IL-6), interlevkin 13 (IL-13)),



rastnim faktorjem (trombocitni (PDGF), transformirajoči (TGF), vezivnega tkiva (CTGF)), endotelinu 1, angiotensinu, sfingosin-1 fosfatu in izvenceličnemu matriksu prek aktivacije Tollu podobnih receptorjev (TLR) (tenaskin, fibronektin), stalna aktivacija pa je posledica tudi povečane rigidnosti okoliškega tkiva, hipoksije in aktivacije s trombinom (Bhattacharyya, et al., 2012; Varga, et al., 2017; Wei, et al., 2011). Transformirajoči rastni faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ki je regulator fiziološkega celjenja ran in patološke fibroze, je prekomerno izražen v fibroznih tkivih in inducira sintezo kolagena v fibroblastnih celičnih kulturah. Sinteza TGF- $\beta$  korelira z napredovanjem fibrotičnih bolezni. Dokazali so tudi, da je aktivnost TGF- $\beta$  odvisna od njegovega celičnega izvora. Bolniki s SSc imajo zmanjšano funkcijo regulatornih celic T (Treg), kar bi lahko prispevalo k nepravilnemu aktiviranju TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  je prav gotovo pomemben pri regulaciji fibroze, vendar poznamo tudi druge sprožilce, ki vplivajo na izražanje profibrotičnih genov (Ho, et al., 2014). Citokini in rastni faktorji imajo pomembno vlogo pri regulaciji imunske aktivacije, žilni prizadetosti in prekomerni proizvodnji zunajceličnega matriksa. Med citokine uvrščamo interleukine, limfokine, faktor tumorske nekroze (TNF) in interferone, ki sprožijo vnetje in odziv na okužbo. Večina citokinov, ki so vpleteni v patogenezo SSc, deluje na celice imunskega sistema ali pa izvirajo iz celic imunskega sistema tako prirojene kot tudi pridobljene imunosti. V patogenezo SSc so vpleteni tudi metabolni produkti arahidonske kisline, kot so npr. levkotrieni, ki so pomembni za ohranjanje vnetnih procesov, neposredno ali posredno aktivirajo fibroblaste in imajo vlogo pri vaskularnih poškodbah (Chwieško-Minarowska, et al., 2012).

## 1.2 Vpliv prirojene in pridobljene imunosti na patogenezo SSc

Prirojena imunost je del imunskega sistema, ki predstavlja prvo linijo zaščite in prepoznavne patogena prek dveh mehanizmov. Koža, sluznica in izločki so fizična pregrada, ki preprečuje vdor patogenov v organizem. Drugi mehanizem zaščite pa so procesi, ki vključujejo nastajanje citokinov, aktivacijo kaskade komplementa, sprožitev vnetja in aktivacijo pridobljene imunosti prek antigenske prepoznavne. Poglavitni tipi celic prirojene imunosti, nevtrofilci, makrofagi in dendritske celice, uničijo patogen v procesu fagocitoze in imajo pomembno vlogo pri antigenski predstavitvi. Sem prištevamo še naravne celice ubijalke, ki sprožijo proces apoptoze

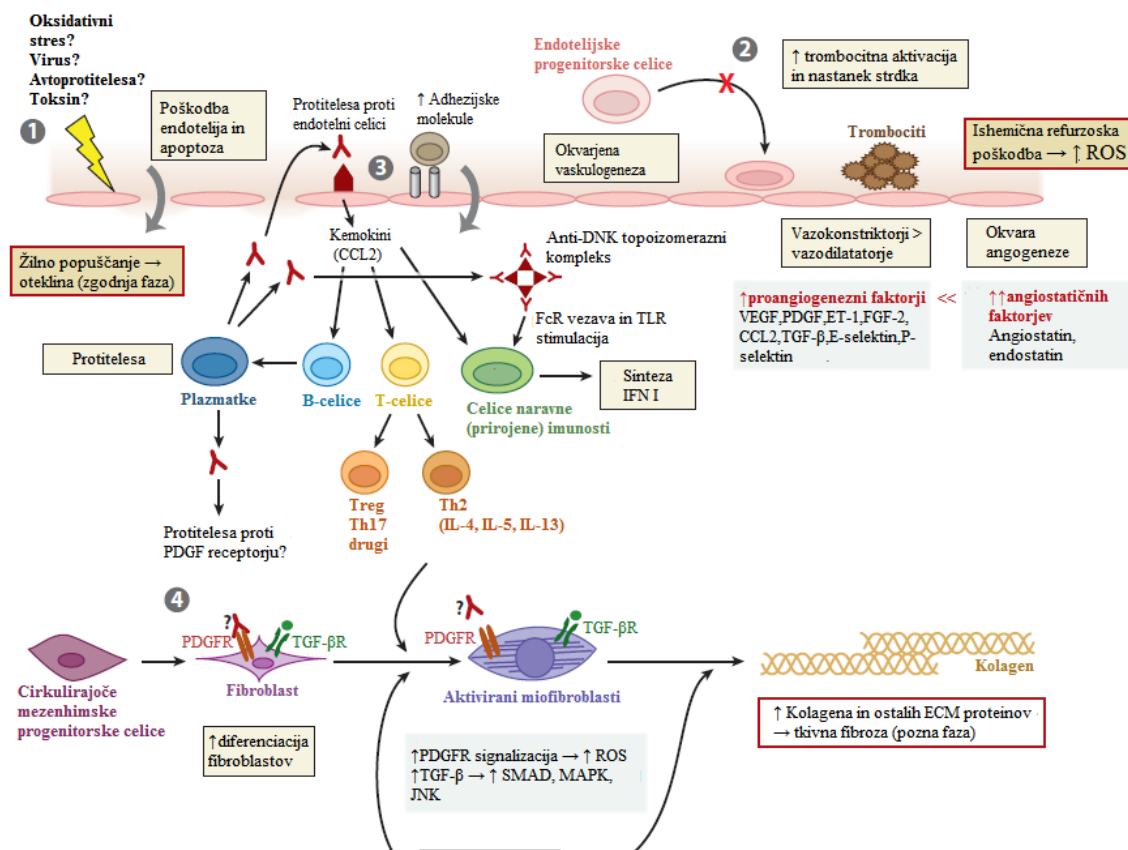
okuženih celic (Raja & Denton, 2015). Pomemben mehanizem prirojene imunosti je antigenska prepoznavna človeškemu organizmu tujih snovi, kot so komponente bakterijske stene, nemetilirane mikrobne DNA in dvojnovijačna RNA (dsRNA), ki poteka preko receptorjev na različnih celicah imunskega sistema in fibroblastih (Kumar, et al., 2011). Prepoznavna poteka prek različnih membranskih proteinov TLR. Pri ljudeh poznamo deset različnih receptorjev. Receptorji TLR 1, 2, 4, 5 in 6 so prisotni na membranah celic, medtem ko so TLR 3, 7, 8, 9 in 10 lokalizirani znotrajcelično na endolizosomu (Wei, et al., 2011). V patogenezi SSc so dokazovali vpletenost TLR 2, TLR 3 in TLR 4 (Bhattacharyya, et al., 2013; Farina, et al., 2010). Znano je tudi, da sta v patogenezo SSc vpletena motena regulacija interferona tipa 1 (IFN-1) in izražanje od IFN odvisnih genov (podpis IFN). Ob aktivaciji TLR se sprožita proizvodnja in izločanje različnih kemokinov in vnetnih citokinov, vključno z IFN-1. IFN-1 je ključni regulator prirojene imunosti, modulator diferenciacije in delitve imunskih celic. Sinteza IFN 1 poteka predvsem v dendritičnih celicah prek aktivacije TLR 3, 4, 7, 8 in TLR 10. Diferenciacija fibroblastov v miofibroblaste poteče po odzivu na transformirajoči rastni faktor beta (TGF- $\beta$ ) iz mastocitov in/ali makrofagov ali z neposrednim aktiviranjem prek odziva TLR. Aktivacija diferenciranih miofibroblastov pa spodbudi proizvodnjo kolagena, kar vodi do fibroze (York, 2011).

Pridobljena imunost je specifična in posredovana prek protiteles ali limfoidnih celic. Med celice pridobljene imunosti spadajo celice B in T. Celice B so del humoralnega imunskega odziva, celice T pa del celičnega imunskega odziva. Obe vrsti celic imata na membranah receptorske molekule za prepoznavo antigena. Celice T prek T-celičnega receptorja prepoznajo antigen, vezan na molekulo poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK, angl. MHC za major histocompatibility complex) (Holtmeier & Kabelitz, 2005). Po vezavi antigena z molekulo PHK na lastni celici se začneta razmnoževanje celice T in diferenciacija v spominske celice T ter različne efektorske celice. Ločimo dve podvrsti efektorskih celic: celice T pomagalke (angl. T<sub>H</sub> za Tcell helper) in citotoksične celice (T<sub>C</sub>). Med seboj se ločijo po membranskih glikoproteinih. T<sub>H</sub> imajo na svoji površini CD4 in imajo vlogo pri sintezi za antigen specifičnih protiteles v celicah B, T<sub>C</sub>, ki na površini izražajo CD8, pa imajo vlogo pri uničenju z virusom okužene celice. Ob vezavi antigena na celico

T CD4<sup>+</sup> se ta aktivira in izloča različne citokine, ki so pomembni za aktivacijo celic B, citotoksičnih celic, makrofagov in različnih drugih celic, ki sodelujejo pri imunskem odzivu. Poznamo več podtipov celic T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup>, in sicer T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>17 in Treg. Med seboj se ločijo po citokinih, ki jih izločajo, in po citokinih, ki povzročijo njihovo diferenciacijo. T<sub>H</sub>1 sintetizirajo IL-2, IFN- $\gamma$  in TGF- $\beta$  ter imajo vlogo pri citotoksičnem imunskem odzivu (virusi). T<sub>H</sub>2 izločajo IL-4, IL-5, IL-6 in IL-10 ter imajo vlogo pri protitelesnem imunskem odzivu. Citokine makrofagov granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (GM-CSF), TNF- $\alpha$  in IL-3 izločata oba podtipa celic. Celice T<sub>H</sub>17 izločajo veliko IL-17 in so povezane z avtoimunskimi in vnetnimi boleznimi ter izvenceličnimi mikrobi, njihovo diferenciacijo pa pospešijo TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-21 in IL-23. Treg so regulatorne celice T, ki so imunosupresivne, pomembne za zagotavljanje imunske tolerance in nastajajo pod vplivom TGF- $\beta$  v kombinaciji z IL-2 (Vozelj, 2000).

Najpomembnejša funkcija celic B, ki nastajajo in dozorevajo v kostnem mozgu, je tvorba antigen specifičnih protiteles. Celice B prepoznajo patogen prek receptorjev oziroma molekule imunoglobulinov na njihovi površini. Vsaka posamezna linija celic B izraža drugo protitelo. Kompleks antigen in protitelo se proteolitično obdelava do peptidov, ki se izrazijo na površini v kompleksu z molekulo PHK, ki privlači ujemajočo celico T pomagalko. Aktivirana celica T izloča limfokine, ki spodbudijo razmnoževanje in diferenciacijo za antigen specifičnih celic B v plazmatke, te pa izločajo kopije protiteles, ki prepoznajo isti antigen. Protitelesa krožijo v krvnem in limfnem obtoku, se vežejo na prepoznani antigen in sprožijo uničenje z aktivacijo komplementa po klasični poti aktivacije ali s sproženjem fagocitoze (Murphy & Weaver, 2016). Imunoglobulini ali protitelesa so glikoproteini, ki nastajajo v belih krvnih celicah, imenovanih celice B, in so del imunskega sistema za prepoznavanje in odstranjevanje telesu tujih snovi (antigenov). Protitelesa so sestavljena iz dveh težkih in dveh lahkih polipeptidnih verig, ki so povezane z disulfidnimi vezmi, njihova struktura pa spominja na obliko črke y. Vsaka veriga ima konstantni in variabilni del. Poznamo pet razredov imunoglobulinov, in sicer IgG, IgM, IgA, IgE in IgD, ki se med seboj razlikujejo v konstantnem delu. Variabilni deli protiteles se med seboj razlikujejo v aminokislinskih ostankih na koncu in so vezavno mesto za antigen.

**Slika 1: Mehanizmi vpleteni v patogenezo sistemske skleroze**



**Legenda:** : 1) Sprožitev/iniciacija bolezni; 2) poškodba endotelija; 3) vpliv prirojene in pridobljene imunosti; 4) aktivacija fibroblastov in nastanek fibroze.

Vir: Katsumoto, et al. (2011)

### 1.3 Sistemska skleroza in avtoimunost

Naloga imunskega sistema je, da zna razlikovati antigene lastnega telesa in tujke ter da tvori odziv samo proti tujim antigenom. Kadar imunski sistem prepozna tudi lastne antigene, pride do avtoimunskega odziva, ki se v SSc kažejo kot: a) spremenjene ravni citokinov v serumu (pretiran odziv Th1 na začetku bolezni, ki preide v pretiran Th2), neravnovesje v prisotnosti in funkciji Treg in Th17 (potencirajo razvoj avtoimunosti) (O'Reilly, et al., 2012) b) tvorijo se avtoprotitelesa, ki so usmerjena proti lastnim antigenom oziroma beljakovinom

Vloga avtoprotiteles pri nastanku SSc še ni popolnoma jasna. Študije kažejo, da naj bi zaradi motenega delovanja regulatorjev B celičnega odziva prišlo do kronične aktivacije celic B in nastanka avtoprotiteles (Košnik, et al., 2011; Mehra, et al., 2013). Več kot 95 odstotkov bolnikov s SSc ima ob postavitvi diagnoze prisotna

avtoprotitelesa v serumu, ki jih lahko povežemo z različnimi podskupinami bolezni in prognozo. Nekatera izmed njih so visoko specifična pri SSc (protitelesa ACA proti centromeram, protitelesa ATA proti topoizomerazi ali Scl-70 in protitelesa proti RNA-polimerazi III) in vzajemno izključujoča (če je prisotno eno, drugega zagotovo ni), druga so lahko prisotna tudi pri drugih avtoimunskih boleznih in drugih vezivnotkivnih boleznih (prekrivajoči se sindrom) ter pogosto v kombinaciji z drugimi avtoprotitelesi (Günther, et al., 2015). Najpogostejša pri SSc so anti-Scl70 (pri 15 do 40 odstotkih bolnikov), ACA (pri 20 do 40 odstotkih bolnikov) in anti-RNAPolIII (pri 5 do 30 odstotkih bolnikov), med manj pogostimi so še protitelesa proti Th/To (RNase MRP), fibrilarinu (U3RNP), U11/12RNP, U1RNP, Ku, PM/Scl, NOR in TRIM21 (Kayser & Fritzler, 2015). Nekatera avtoprotitelesa se rutinsko uporabljajo kot diagnostični in prognostični biološki označevalci; npr. ACA povezujejo z večjo verjetnostjo razvoja pljučne fibroze, boljšo prognozo, medtem ko ATA z intersticijsko pljučno boleznijo in slabšo prognozo bolezni. V novejšem času so pri SSc opisovali in funkcionalno opredelili tudi avtoprotitelesa proti nekaterim receptorjem, kot so npr. PDGF\_R, muskarinski receptor, estrogenski receptor, endotelinski receptor. Funkcionalna avtoprotitelesa so tisti imunoglobulini, ki ne le da prepoznajo antigen kot tuj, ampak neposredno aktivirajo ali zavirajo molekularno pot. Protitelesa proti GPCR, tirozin kinaznim receptorjem in matriks metaloproteinazi so nekatera izmed funkcionalnih protiteles pri SSc, ki vplivajo na patogenezo bolezni. Iskanje in natančna identifikacija funkcionalnih avtoprotiteles in tarčnih antigenov odkriva nove možnosti zdravljenja v začetku bolezni, pred pojavom hudih zapletov in pridruženih obolenj (Günther, et al., 2015).

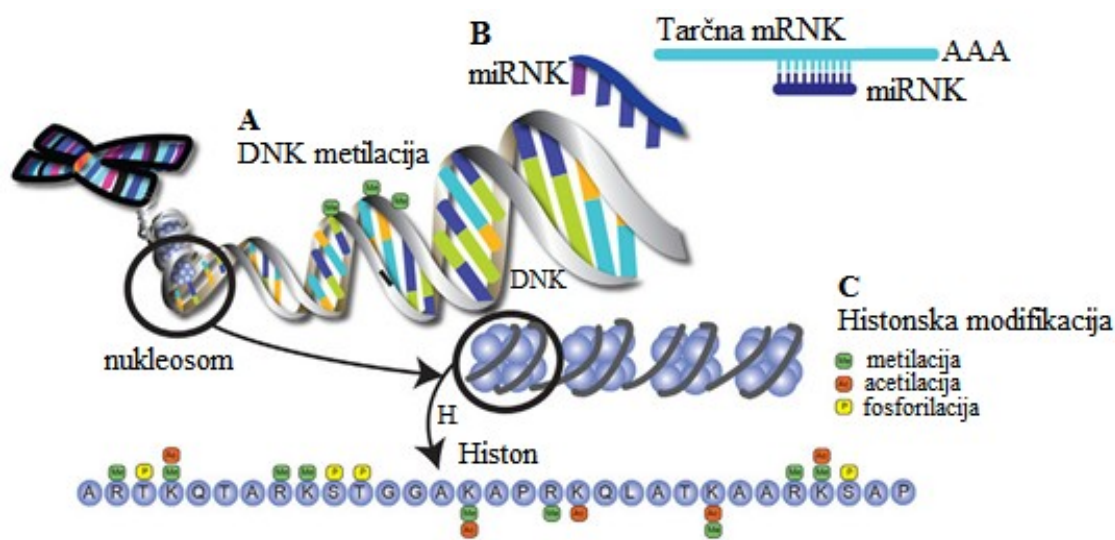
#### 1.4 Epigenetika in sistemska skleroza

Razvoj avtoimunskih bolezni ima nejasno etiologijo. Z njim povezujejo več dejavnikov: spol, raso, hormone, kemikalije, okužbe (mozaik avtoimunosti). Študije celotnega genoma (GWAS) so pokazale polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP) na podobnih genih kot pri drugih avtoimunskih boleznih (*HLA* lokus, *STAT4*). Iz tega razloga bi etiologijo bolezni lahko povezali z epigenetskimi razlogi, ki so trenutno slabše raziskani. Na osnovi raziskav na enojajčnih dvojčkah so ugotovili, da so poleg genetike za razvoj avtoimunskih bolezni potrebni še okoljski dejavniki, kot

so okužba, prehrana, pomanjkanje vitaminov, stres, hormonske spremembe, kajenje, spremembe v mikrobioti, kar tudi nakazuje pomemben vpliv epigenetike v razvoju bolezni.

Epigenetika proučuje spremembe v izražanju genov in funkciji, ki se ne kažejo kot spremembe v zaporedju DNA. Uravnavanje izražanja genov lahko poteka na ravni transkripcije, posttranskripcijskih modifikacij, translacije ali posttranslacijskih modifikacij. Poznamo različne epigenetske spremembe v genih, kot so metilacija DNA, histonska modifikacija in nekodirajoče RNA (miRNA, siRNA), ki vplivajo na gensko izražanje (Slika 2). Vsi epigenetski mehanizmi so pomembni pri celični regulaciji v normalnem fiziološkem stanju organizma, napaka v regulaciji teh mehanizmov pa povzroči spremenjeno izražanje genov, kar lahko vodi v patološke procese (Aslani, et al., 2018).

**Slika 2: Epigenetski mehanizmi SSc**



**Legenda:** A) Metilacija DNA poteka na območjih, ki so bogata s citozinom in gvaninom (otoki CpG) in prepreči prepisovanje gena. B) miRNA so kratke, nekodirajoče molekule RNA, ki se komplementarno vežejo na mRNA, kar vodi k razgradnji mRNA ali zaviranju translacije supresiji. Ena molekula miRNA se lahko veže na več tarčnih mRNA. C) Histonske modifikacije vključujejo metiliranje in acetiliranje ostankov lizina in arginina na histonske repke kot tudi fosforilacijo serinskih in treoninskih ostankov. Te spremembe povzročijo spremembe v strukturi kromatina, kar vpliva na vezavo transkripcijskih faktorjev

Vir: Fonseca, et al. (2018)

### 1.4.1 Metilacija DNA

Proces transkripcije genov poteka prek genskega promotorja, ki je izpostavljen transkripcijskim faktorjem in drugim regulatornim proteinom. Metilacija DNA

poteka na kovalentni vezavi metilne skupine na citozin na verigi DNA, zaradi česar se konfiguracija DNA spremeni in prepreči vezavo transkripcijskih faktorjev na genski promotor (Slika 2A). Reakcijo katalizirajo encimi iz družine metiltransferaz DNA. Znano je, da je metiliranih od 60 do 90 odstotkov mest CpG v človeškem genomu, izjema so otoki CpG v promotorskih delih aktivnih genov (Jin, et al., 2011; Ng & Bird, 1999).

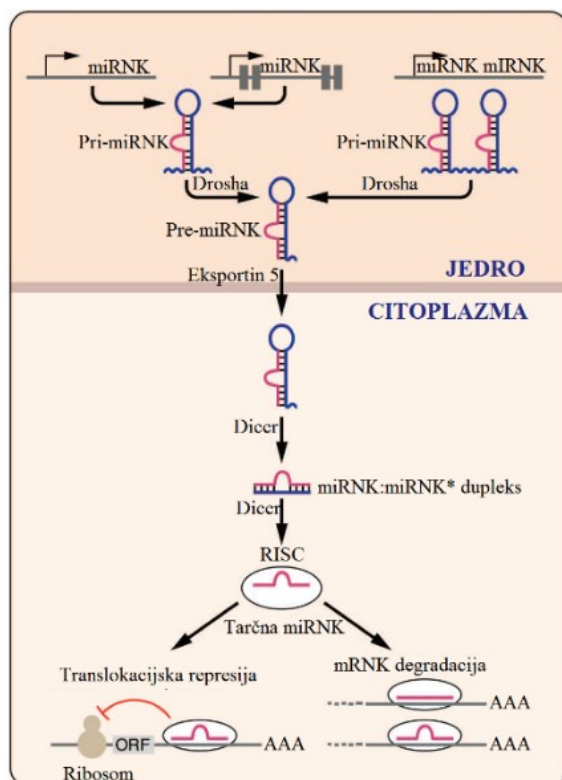
Obstaja več študij, v katerih so raziskovali vpliv metilacije DNA na ekspresijo genov pri bolnikih s SSc v različnih tkivih. Dokazali so metilacijo na genih kromosoma x, na genih *DKK1* in *SFRP1* v mononuklearnih celicah periferne krvi (PBMC), na genih *FLII*, *DKK1* in *SFRP1* v fibroblastih, gena *BMPR2* v mikrovaskularnih celicah, *CD70* in *CD40L* v celicah T, ki so imele učinke zvišanega ali znižanega izražanja genov (Broen, et al., 2014).

#### **1.4.2 miRNA**

Nastanek miRNA se začne v jedru, kjer poteka transkripcija z encimom RNA-polimeraza II. Tako nastalo primarno miRNA (pri-miRNA) cepi encim Drosha v 60 do 70 nukleotidov dolge prekursorske miRNA (pre-miRNA) z značilno strukturo zank. Prek transportnega proteina Exportin-5' se pre-miRNA iz jedra prestavi v citoplazmo, kjer encim dicer odcepi zanko in nastanejo od 18 do 22 nukleotidov dolge dvojnovijačne miRNA. Zrela enovijačna miRNA se veže v kompleks RISC, s katerim pride do interakcije miRNA s komplementarno informacijsko RNA (mRNA) in vpliva na gensko izražanje (Bartel, 2004). Vezava na 3' konec neprevedene regije povzroči razgradnjo ali onemogoči prevajanje mRNA (Slika 2B, Slika 3). Zagotovo bi bilo lahko to področje osnova novih terapevtskih pristopov z moduliranjem genskega izražanja (Chua, et al., 2009), vendar mehanizem uravnavanja izražanja genov prek miRNA lahko poteka tudi prek polimorfizmov miRNA, tarčnih genov ali polimorfizmov drugih komponent epigenetskega mehanizma (Georges, et al., 2007).

Pri bolnikih s SSc so dokazali profile genskega izražanja različnih miRNA v fibroblastih (Honda, et al., 2012, 2013 ) in koži (Li, et al., 2012; Zhu, et al., 2012). Funkcionalne študije so dokazale, da imajo različne miRNA ključno vlogo pri moduliranju genov, povezanih s fibrozo, genov, ki kodirajo kolagene, metalopeptidaze in interleukine (Broen, et al., 2014)

**Slika 3: Shematični prikaz nastanka in delovanja miRNA**



Vir: van Rooij (2011)

### 1.4.3 Histonska modifikacija

Epigenetski mehanizem modifikacije histonov je acetilacija aminokislin v histonskih repih, metilacija lizina in arginina, fosforilacija serina, glikolizacija asparginina, treonina in serina, ubikvitinacija lizina, sumoilacija in biotilacija lizina, karbonilacija, poli ADP-ribozilacija (Marmorstein & Trievel, 2009) (Slika 2C). Pri bolnikih s SSc so dokazali histonske modifikacije na fibroblastih in celicah B ter posledično zvišano izražanje kolagena in *FOSL2* ter znižano izražanje *FLII* v fibroblastih (Wang, et al., 2006).

### 1.5 Mikromreže in bioinformatična obdelava podatkov

Tehnologija mikromrež je bila razvita v devetdesetih letih prejšnjega stoletja. Mikromreža ali biočip je običajno steklena, silikonska ali najlonska ploščica, na kateri so nanešene različne molekule glede na vrsto mikromreže. Ločimo mikromreže DNA, proteinske, peptidne in tkivne mikromreže. Mikromreža DNA so mreža molekul cDNA ali oligonukleotidov, pritrjenih na podlago, na kateri



preverjamo izražanje tisoč genov hkrati. Najpogosteje se mikromreže DNA uporabljajo za ugotavljanje količine izraženih genov ali za določanje nukleotidnih zaporedij in sprememb na ravni genoma – sekvenciranje, za iskanje SNP-ov in mutacij, primerjalno genomsko hibridizacijo (CGH) ali za iskanje regulatornih zaporedij DNA (Juvan & Rozman, 2006). Prva stopnja postopka je izolacija mRNA iz tkiva ali celic, ki jih proučujemo, sledijo prepis mRNA v cDNA, fluorescentno označevanje, hibridizacija na mikromreži DNA, detekcija signala, interpretacija slike in analiza rezultatov. Kontrola kakovosti je pri tehnologiji mikromrež DNA zelo pomembna; upoštevati jo je treba na ravni sond, genov in mikromrež, v nasprotnem primeru nas analize meritev lahko privedejo do napačnih ugotovitev. Na ravni sond upoštevamo prisotnost šuma, ki je lahko posledica neenakomernega nanosa vzorca med hibridizacijo, slabega spiranja, ali prisotnost prašnih delcev. Vsa odstopanja izločimo iz nadaljnje analize. Na ravni genov kontrolo opravimo po normalizaciji podatkov. Vsaka mikromreža ima običajno več sond za posamezne gene, ne upoštevamo njihovih povprečnih vrednosti, ampak obravnavamo vrednosti vsake posamezne ali izberemo najustreznejšo. Na ravni mikromreže kontrolo kakovosti preverimo prek kontrolnih sond (Hovatta, et al., 2005). Ob povečanem zanimanju za tovrstne študije so se začele razvijati tudi metode in različna bioinformatična orodja za prenos podatkov. Danes so na voljo brezplačni javno dostopni programi, ki omogočajo shranjevanje in brezplačni prenos podatkov ter analiz mikromrež, podatkov sekvenciranja druge generacije in drugih podatkov s področja genomike, ki jih predložijo raziskovalne skupine. Javno dostopni so tudi različni programi in aplikacije za obdelavo podatkov, ki jih lahko uporabimo za analizo in primerjavo različnih podatkovnih setov, ki nas zanimajo.

Zaradi kompleksnosti bolezni lahko s pomočjo bioinformatike povežemo različna znanja in pripomoremo k boljšemu razumevanju poteka bolezni ter k iskanju novih inovativnih načinov uporabe zdravil pri zdravljenju zapletov (Sargent & Whitfield, 2011). Bioinformatika združuje biologijo, računalništvo in informacijsko tehnologijo v interdisciplinarno vedo, ki razvija in uporablja računalniške metode za analizo, obdelavo in shranjevanje velikih zbirk bioloških podatkov, za izdelavo novih napovedi in odkrivanje novega znanja. Uporabljene metode vključujejo analitične metode, matematično modeliranje in računalniške simulacije (Kumar & Chordia,

2017). Uporaba bioinformatike v raziskavah je pripomogla k hitremu razvoju na različnih področjih medicine in biotehnologije. V uporabi je veliko različnih bioinformatičnih orodij in programskih oprem za analizo in interpretacijo na različnih področjih biotehnologije (Kumar & Chordia, 2017).

## 2 Namen in cilji zaključnega dela

Namen raziskave je s pomočjo orodij bioinformatike ugotoviti značilen profil izražanja genov in vpletenost različnih celičnih tipov v razvoj fibroze pri bolnikih s SSc. S tem bi pripomogli k boljšemu razumevanju poteka bolezni in k iskanju novih inovativnih rešitev pri terapiji.

Cilji v teoretičnem delu zaključnega dela so:

- pregled ustrezne literature,
- pregled metod in programov, ki se uporabljajo za analizo mikromrež
- pregled različnih orodij bioinformatike za dodatno iskanje novega znanja

Cilji empirične raziskave so s programom za analizo mikromrež:

- analizirati izražanje genov v celični kulturi fibroblastov bolnikov s SSc s pridruženo intersticijsko pljučno boleznijo v primerjavi s fibroblasti kontrolne skupine in ugotoviti kateri geni oziroma signalne poti so spremenjeni v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino;
- analizirati izražanje genov v pljučnem tkivu bolnikov s SSc z intersticijsko pljučno boleznijo v primerjavi s kontrolno skupino in ugotoviti, kateri geni in signalne poti so spremenjeno izraženi v primerjavi s kontrolno skupino;
- primerjati gene oziroma genske skupine v tkivu pljuč in fibroblastih ter s tem opredeliti, katere poti poleg tistih spremenjenih v fibroblastih še prispevajo k razvoju pljučne fibroze in poganjajo neprestano aktivacijo miofibroblastov.

### 3 Raziskovalno vprašanje in hipoteze

Analizirali in primerjali smo prosto dostopne baze podatkov iz študij:

1. s podatki o genski ekspresiji fibroblastov, gojenih iz normalnega in fibrotičnega človeškega pljučnega tkiva (GSE40839) (Lindahl, et al., 2013);
2. s podatki o izražanju mRNA pljučnega tkiva bolnikov s SSc s pridruženo intersticijsko pljučno boleznijo in kontrolne skupine (GSE76808) (Christmann, et al., 2014).

Zanimalo nas je, ali lahko iz dobljenega profila genskega izražanja obeh študij s pomočjo različnih bioinformatičnih orodij za analizo in vizualizacijo ugotovimo vpletenost določenih proteinov v različnih molekularnih povezavah v zvezi s patogenezo sistemske skleroze.

#### 3.1 Hipoteze

1. Analiza študije pljučnih fibroblastov SSc s pridruženo intersticijsko pljučno boleznijo v primerjavi s kontrolno skupino bo pokazala spremembe v regulaciji številnih genov izvenceličnega matriksa in poti TGF- $\beta$ .
2. Analiza študije pljučnega tkiva SSc s pridruženo intersticijsko pljučno boleznijo v primerjavi s kontrolno skupino bo pokazala spremembe v regulaciji številnih genov izvenceličnega matriksa, citokinov, kemokinov, poti TGF- $\beta$ , derivatov arahidonske kisline v tkivu SSc.
3. Razlike med dereguliranimi geni analize 1 in 2 bodo dale informacijo, kako drugi celični tipi v pljučnem tkivu vplivajo na fibroblaste in kako prispevajo k stalni aktivaciji in sintezi izvenceličnega matriksa.

## 4 Raziskovalna metodologija

### 4.1 Raziskovalne metode

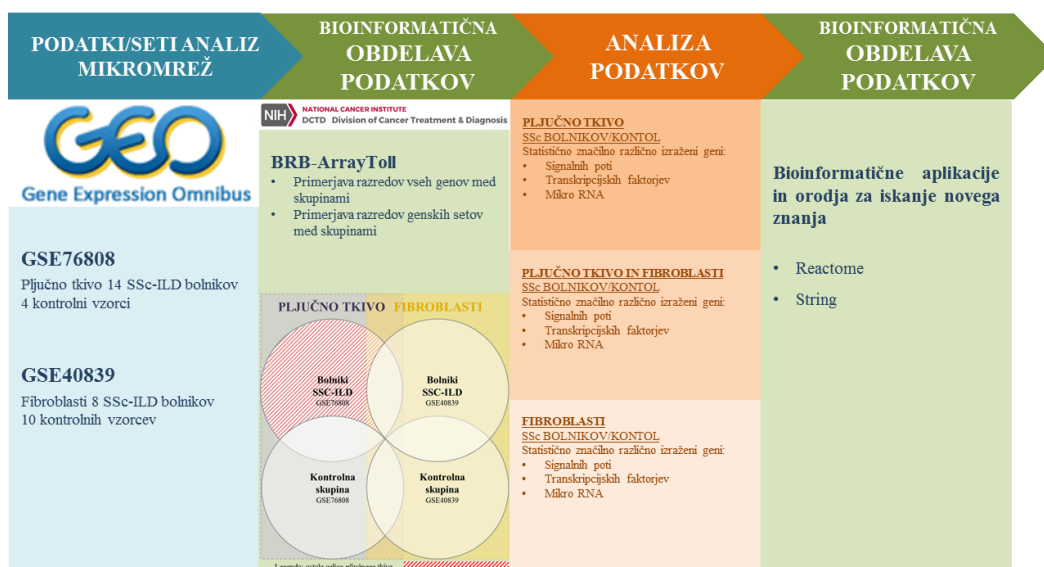
#### Potek raziskave

V prvem delu raziskave smo se osredotočili na pregled literature in iskanje baz podatkov mikromrež. Za analizo podatkov mikromrež smo uporabili prosto dostopen program BRB-ArrayTools (National Cancer Institute [NCI], 2018).

S primerjavami smo zajeli skupne točke in razlike v raziskavah pljučnega tkiva bolnikov s SSc in fibroblastov bolnikov s SSc v primerjavi s kontrolno skupino. Z nadaljnjimi primerjavami razlik med presekom diferencialno izraženih genov oziroma poti smo ugotovili, katere razlike v pljučnem tkivu izvirajo iz fibroblastov in katere iz drugih celic pljučnega tkiva. Vpliv drugih celic pljučnega tkiva bi lahko pripomogel k stalni aktivaciji fibroblastov.

V drugem delu smo se posvetili iskanju novega znanja z analizo podatkov in uporabi različnih orodij bioinformatike, s katerimi smo raziskali proteinske interakcije, povezane z boleznijo (Slika 4).

**Slika 4: Shematski prikaz poteka raziskave**



## **Raziskovalne metode**

Ustrezno literaturo smo iskali v brezplačni zbirki znanstvene literature s področja biomedicine PubMed (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2018), ki jo financira ameriška vlada.

Ustrezne sete podatkov smo iskali z mednarodnim javno dostopnim orodjem GEO Gene expression omnibus (NCBI, 2018), ki omogoča shranjevanje in brezplačni prenos podatkov analiz mikromrež, podatkov sekvenciranja druge generacije in drugih podatkov s področja genomike, ki jih predložijo raziskovalne skupine. Glavni cilji GEA so zagotoviti robustno, vsestransko bazo podatkov, ki omogoča učinkovito shranjevanje podatkov. Poleg tega je cilj ponuditi preproste postopke za predložitev podatkov in uporabniku prijazne postopke, ki omogočajo poizvedovanje, iskanje, pregledovanje in prenos podatkov študij raziskovalnih skupin (NCBI, 2018).

Analizo podatkov smo izvedli s programskim orodjem BRB-ArrayTools (NCI, 2018). BRB-ArrayTools je bioinformatično orodje za vizualizacijo in statistično analizo genskega izražanja. Analitična in vizualna orodja so razvita v sistemu R v programih C in Fortran ter v aplikacijah Java. Sistem vključuje različna zmogljiva orodja za analizo in vizualizacijo, ki so posebej razvita za analizo mikromrež.

## **Uporaba statističnih metod pri analizah mikromrež**

Z uporabo različnih statističnih metod želimo ugotoviti, ali obstajajo razlike med opazovanimi razredi, ali je razlika le slučajna ali je statistično značilna. V praksi je statistično testiranje razdeljeno na več stopenj. Pomembno je pravilno izbrati statistični test, določiti prag p-vrednosti, oblikovati hipoteze, ki jih želimo primerjati, izračunati statistiko, izračunati prostostne stopnje, primerjati testa statistike s tabelo kritičnih vrednosti statistične porazdelitve testa, določiti p-vrednost, ki ustreza statističnemu testu. in pripraviti pravilne zaključke. Pri izbiri statističnega testa je pomembno upoštevati, ali želimo primerjati več kot dve skupini in kakšno porazdelitev vzorcev imamo. V primeru, da primerjamo dve skupini, uporabljamo t-test ali Mann-Whitneyjev U-test. V primeru, da želimo primerjati več skupin, uporabimo analizo variance (ANOVA) ali Kruskal-Wallisov test. V primeru normalne porazdelitve uporabimo parni t-test ali ANOVO za primerjavo več skupin. Neparometrična testa sta Mann-Whitneyjev U-test in Kruskal-Wallisov test. Vendar

je pri neparametričnih testih treba upoštevati, da je dovolj veliko število vzorcev v skupini. Pred analizo določimo prag p-vrednosti, ki nam pove, ali je rezultat statistično značilen ali ne. Najpogosteje se uporablja vrednost  $\alpha = 0,05$ , vendar je treba upoštevati, da pri testiranju velikega števila hipotez (genov) dobimo relativno velik delež lažno pozitivnih rezultatov. S permutacijsko metodo, ki je manj stroga od Bonferronijevega popravka, preprečimo lažno pozitivne vzorce. Pred testiranjem je treba oblikovati hipoteze, navadno izberemo ničelno hipotezo  $H_0$  in alternativno hipotezo  $H$  (Simon, 2016).

#### **Druga bioinformatična orodja:**

- Reactome (Reactome, 2019)  
Brezplačna, odprtokodna baza podatkov signalnih poti. Cilj organizacije, ki je razvila orodje, je zagotoviti bioinformatična orodja za vizualizacijo, interpretacijo in analizo signalnih poti, ki so podpora temeljnim raziskavam, analizam genoma, modeliranju, sistemski biologiji in izobraževanju.
- String (STRING, 2019)  
String je zbirka podatkov o znanih in predvidenih proteinskih interakcijah. Podatki izvirajo iz računalniških napovednih modelov, prenosa znanja med različnimi organizacijami in iz drugih primarnih podatkovnih baz.

#### **4.2 Raziskovalni vzorec in etični vidik**

V naši raziskavi ni bilo neposrednega dela z ljudmi in z njihovim biološkim materialom. Raziskovalni vzorec je vseboval podatke mikromrež iz študij, za katere so avtorji pridobili odobritev odgovorne etične komisije in informirane privolitve vključenih oseb (kot je navedeno v njihovih že objavljenih člankih), poleg tega so bili deponirani podatki anonimni in smo jih pridobili iz prosto dostopne podatkovne baze GEO.

##### **Študija GSE40839 (NCBI, 2018)**

Študija Lindahla, et al. (2013) deponirana pod številko GSE40839 v podatkovni bazi GEO, je vsebovala podatke genskega izražanja pljučnih fibroblastov desetih kontrolnih vzorcev, osmih bolnikov s SSc s pridruženo intersticijsko pljučno boleznijo (SSc-ILD) in treh bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo (IPF). Primarne pljučne fibroblaste odraslih bolnikov s SSc-ILD in IPF so pridobili z biopsijo

pljučnega tkiva. Primarni pljučni fibroblasti kontrolne skupine so bili pridobljeni iz zdravega obrobnega tkiva med operativnim posegom odstranitve tumorja pljuč. Diagnoza je bila potrjena histološko, preparat tkiva kontrolne skupine je bil normalen. Mediana starosti bolnikov s SSc-ILD je bila 48 (od 38 do 69 let), bolnikov z IPF 61 (od 44 do 67 let) in kontrolne skupine 60 (od 52 do 78 let). Bolniki pred biopsijo niso bili na terapiji z imunosupresivi ali kortikosteroidi. Biopsija je bila izvedena pred začetkom terapije. Eksperimenti so bili narejeni na celični kulturi fibroblastov druge do pete pasaže. V študiji so dokazali povečano izražanje TGF- $\beta$  in genov, povezanih s fibrozo. V študiji je bilo ugotovljeno znižano izražanje interferon stimuliranih genov v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Ugotovili so veliko prekrivanje v ekspresijskih profilih SSc-ILD in IPF, razlika med boleznima je bila le v sedmih genih (SSc-ILD/IPF) (Lindahl, et al., 2013).

#### **Študija GSE76808 (NCBI, 2018)**

V študiji Christmanna, et al. (2014) deponirani pod številko GSE76808 v podatkovni bazi GEO, so analizirali gensko izražanje pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino. Vključenih je bilo 14 bolnikov s SSc-ILD in štirje kontrolni vzorci. Tkivo kontrolnih vzorcev je bilo pridobljeno iz zdravega obrobnega tkiva pri operativnem posegu odstranitve tumorja. Obolele s SSc-ILD so bile vse ženskega spola, v kontrolni skupini so bili tri ženske in en moški. Diagnoza je bila potrjena histološko in z visokoločljivostno računalniško tomografijo (HRCT). Izolacija RNA je bila izvedena z microRNeasy Mini Kits, analiza mikromreže je bila narejena na Affymetics GeneChip. V študiji so dokazali tri glavne poti, povezane z boleznijo: aktivacijo makrofagov, interferon (IFN) regulirano izražanje genov in profibrotično TGF- $\beta$  regulirano izražanje genov (Christmann, et al., 2014)

V našo raziskavo smo iz študije GSE40839 vključili podatke genske ekspresije bolnikov s SSc-ILD in kontrolne skupine, skupina bolnikov z IPF nas ni zanimala (Lindahl, et al., 2013). Obe študiji, ki smo ju vključili v raziskavo, sta bili narejeni na Affymetrixovih mikromrežah. Študija pljučnega tkiva GS76808 (Christmann, et al., 2014) je bila narejena z Affymetrix GeneChip 3'IVT Express. Študijo fibroblastov, izoliranih iz pljučnega tkiva GS40839 (Lindahl, et al., 2013), pa so naredili na Affymetrix GeneChip™ Human Genome U133A 2.0 Array.



Glede na to, da smo za analize mikromrež uporabili prosto dostopne podatke že objavljenih študij, smo pri naših analizah upoštevali le kontrolo na ravni genov, druge kontrole so bile opravljene in upoštevane v posamezni študiji, preden so podatke deportirali v NCBI GEO.

### 4.3 Predpostavke in omejitve raziskave

SSc je kompleksna bolezen s številnimi oblikami in mnogimi kliničnimi znaki. Osredotočili smo se predvsem na fibrotične procese v pljučih in skušali pridobiti novo znanje, ki bi pripomoglo k boljšemu opredeljevanju bolnikov in bolj specifičnemu zdravljenju pljučnih zapletov bolezni. Primerjali smo podatke dveh študij različnih raziskovalnih skupin. Zavedamo se omejitev glede števila preiskovanih vzorcev kot tudi glede tehnologije ekspresije genov na mikromrežah. Vsekakor ima novejša tehnologija sekvenciranja nove generacije (RNA-Seq) določene prednosti v primerjavi s tehnologijo mikromrež DNA, vendar uporaba še ni zelo razširjena in je posledično prosto dostopnih podatkov analiz malo, zato tako specifičnih študij zaenkrat še ni mogoče proučevati z deponiranimi podatki tehnologije RNA-Seq.

## 5 Rezultati

V prvem sklopu smo analizirali podatke genskega izražanja fibroblastov iz tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino, v drugem sklopu smo na enak način analizirali gensko izražanje pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. S primerjavo obeh študij smo dobili podatke genskega izražanja fibroblastov in celic pljučnega tkiva kot celote in nato v tretjem sklopu analizirali rezultate, ki so bili statistično značilno različni le v pljučnem tkivu in ne v fibroblastih, iz česar smo razbrali prispevek drugih (nefibroblastnih) celic v razvoj ILD pri SSc. Posebej nas je zanimala vpletenost epigenetskih mehanizmov na proces fibroze v fibroblastih in v drugih celicah pljučnega tkiva..

Analize genskih ekspresij na mikromrežah smo naredili s programom BRB-ArrayTools. Sete podatkov obeh študij smo pridobili iz NCBI GEO. Prenos surovih podatkov (Afyimetrixs CEL) smo izvedli prek platforme GEO in jih uvozili v BRB-ArrayTools. Za označevanje in ureditev podatkov smo uporabili datoteke NCBI GEO GPL, povezane s platformami uporabljenih mikromrež. V postopkih normalizacije smo uporabili metodo RMA (Roboust multiarray average), parametre v postopkih filtriranja genov smo uporabili po privzetih nastavitvah (McCarthy & Smyth, 2009 ; Patterson, et al., 2006). V analize so bili vključeni geni, pri katerih je vsaj 20 odstotkov rezultatov izražanja imelo vsaj 1,5-kratno spremembo izražanja v katerokoli stran od mediane izražanja gena in manj kot 50 odstotkov manjkajočih podatkov po filtriranju.

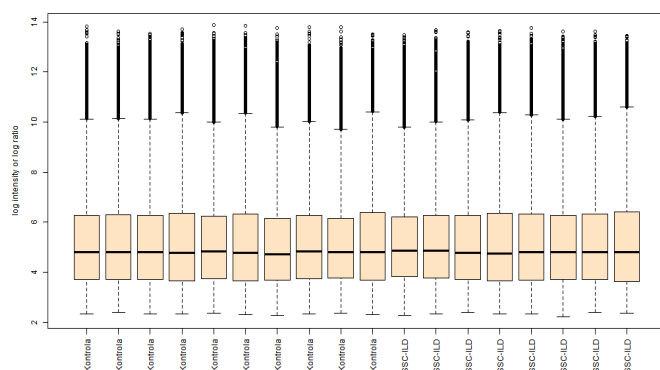
### Statistične metode

Studentov t-test je pogosto uporabljena statistična metoda, ki jo uporabljamo pri malih vzorcih z normalno porazdelitvijo. Studentov test smo uporabili pri analizi primerjav genske ekspresije vseh genov med bolniki SSc-ILD in kontrolno skupino. Zaradi zelo velikega števila genov smo za stopnjo značilnosti izbrali  $\alpha = 0,001$ , ker nismo želeli prevelikega števila lažno pozitivnih rezultatov. Pri nadaljnjih analizah, ko smo ugotavljali razlike v skupinah genov, smo stopnjo značilnosti izbrali pri  $\alpha = 0,05$ , ker nismo želeli izgubiti šibko pozitivnih rezultatov, ki bi jih z  $\alpha = 0,001$  določili kot negativne (Simon, 2016). Statistično pomembnost smo izračunali z

uporabo permutacijskih testov LS/KS in z uporabo Efron-Tibshiranijevega GSA maxmean testa za dokazovanje signifikantnosti. S permutacijskima testoma LS/KS ugotavljamo, ali obstajajo genske skupine, ki imajo več različnih genov izraženih med razredi, kot jih pričakujemo naključno. Statistika maxmean pa predstavlja povprečje absolutno večjega pozitivnega ali negativnega dela ocene genov v skupini genov (Mramor, et al., 2008).

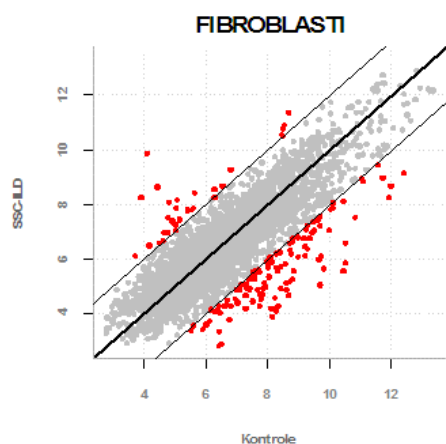
## 5.1 Gensko izražanje fibroblastov izoliranih iz tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (GSE40839)

**Slika 5: Kvartilni diagram genskega izražanja fibroblastov**



**Legenda:** Prikaz genskega izražanja podatkov vzorcev bolnikov in kontrolne skupine iz študije fibroblastov po normalizaciji s programom BRB-ArrayTools

**Slika 6: Grafični prikaz genskega izražanja v fibroblastih bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino**



**Legenda:** Sredinska črta predstavlja premico enakosti (angl. identity line), obe vzporednici pa mejo štirikratnega povežanja v smeri vzorcev na osi. Pike predstavljajo posamezne gene. Rdeče obarvane pike so geni z vsaj štirikratno povečanim oziroma štirikratno znižanim izražanjem med bolniki v primerjavi s kontrolno skupino (oddaljenost od črte pove p-vrednost, skala na osi x in na osi y pa pove, kolikokrat je gen povežan oziroma znižan – bolj oddaljeni geni imajo večjo spremembo).

Po normalizaciji podatkov genskega izražanja je na kvartilnem diagramu vidna normalna porazdelitev (Slika 5). V analizo primerjav razredov (angl. class comparison) med skupinama bolnikov in kontrol (SSc-ILD/K) je bilo vključenih 22.283 genov, po filtraciji podatkov je ostalo 3621 genov. Za izračun signifikantnosti (določili smo  $p < 0,001$ ) izražanja je bil uporabljen t-test. Pri analizi primerjave dveh razredov (SSc-ILD/K) smo dobili 843 statistično značilno ( $p < 0,001$ ) različno izraženih genov med skupinama (Slika 6). Seznam statistično značilno povišano in znižano ( $p < 0,001$ ; več kot štirikratna razlika v izražanju) izraženih genov s podatki geometrijske sredine intenzitete in z relativnimi spremembami je v prilogah 1 in 2. Rezultati ekstremno povišano in znižano izraženih genov so se ujemali z rezultati študije Lindhala in sodelavcev (Lindahl, et al., 2013).

Nadaljevali smo z analizo obogatenih poti. Analizirali smo 184 genskih skupin signalnih poti, ki so vpisane v podatkovno bazo Biocarta Pathway. Vsaka genska skupina predstavlja gene, ki so vključeni v določeno celično signalno pot oziroma celične procese. Med bolniki in kontrolno skupino smo ugotovili statistično pomembno različno izraženost genov v 53 genskih skupinah (Priloga 3). Od 53 genskih skupin smo ugotovili, da je statistično značilno različno gensko izražanje med bolniki in kontrolno skupino v 33 genskih skupinah le v fibroblastih, statistično značilno različno gensko izražanje med bolniki in kontrolno skupino v 20 genskih skupinah pa je skupno fibroblastom in celotnemu pljučnemu tkivu. Uporabljena sta bila permutacijski test LS/KS in Efron-Tibshiranijev GSA maxmean test za dokazovanje signifikantnosti ( $p < 0,05$ ). Statistično značilno razliko med bolniki in kontrolno skupino v genskem izražanju fibroblastov smo ugotovili v:

- apoptotičnih poteh: signalna pot apoptotične signalizacije kot odgovor na poškodbo DNA;
- poteh, ki vplivajo na celični cikel in proliferacijo: signalna pot inhibicije celične proliferacije, na katero vpliva zdravilo gleevec (imatinib), regulacija replikacije DNA z od ciklina odvisnimi kinazami (CDK), z dvojnovijačno RNA inducirano izražanje genov, pot AKAP95 v mitozii in dinamiki kromosomov;
- citokinskih in z rastnimi dejavniki povezanih poteh: signalni poti IFN $\alpha$  in IFN $\gamma$ , IL-10, IL-18, IL-22, signalne poti p38 MAPK, signalna pot TGF- $\beta$ ,

PDGF, MAP kinazna signalna pota, aktivacija Src s PTP $\alpha$ , NRDP1 nadzorovano recikliranje receptorja ErbB3 (EGF receptor);

- nekaterih nespecifičnih poteh, kot so z bioaktivnimi peptidi aktivirane signalne poti, signalna pot antigenske predstavitve, majhni z levcinom bogati proteoglikani (SLRP), prionske poti, stresno regulirana indukcija proteinov vročinskega šoka (Hsp).

Signalne poti, v katerih so bili geni statistično značilno različno izraženi pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino ter so skupne fibroblastom in celotnemu pljučnemu tkivu in so relevantne za oba vzorca, pa so:

- v apoptozo vpletene poti: pot D4-GDI (D4-GDI je negativni regulator Rho družine GTPaz, katerega cepitev s kaspazo 3 inducira apoptozo) in signalna pot kaspazne kaskade v procesu apoptoze;
- signalne poti, vključene v odziv na citokine, rastne dejavnike: signalna pot EGF, signalna pot NF $\kappa$ B, signalna pot IFN- $\beta$ , TNF/s stresom povezano signaliziranje, signalna pot IL 6, signalna pot TNFR2, signalna pot Tollu podobnih receptorjev, signalna pot komplementa, celice in molekule, vpletene v lokalni akutni vnetni odziv, signalna pot CD40L. Seznam vseh statistično značilno različno izraženih signalnih poti v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino je priložen kot Priloga 3.

Vsaka genska skupina vsebuje različno število prob oziroma genov, ki so lahko del skupne signalne poti, zato je tudi za statistično pomembno razliko v posamezni poti število spremenjenih genov različno. Kljub temu smo ugotovili, da je največje število spremenjenih genskih prob, to je 32, prisotnih v kinazni poti MAP in 31 v HIV-1 Nef: v negativnem efektorju Fas in TNF $\alpha$  (vanjo sta vključeni pot MAPK kot geni apoptoze (kaspaze, Fas) in pot NFK $\beta$ ).

Zanimivo pri analizah genskih skupin signalnih poti je, da smo zaradi računalniške uvrstitve spremenjeno izraženih genov kljub definiranemu vzorcu (fibroblastna celična kultura in pljučno tkivo) dobili spremenjeno izražanje genov na nekaterih poteh, ki zagotovo niso pomembne pri naših vzorcih. Primer so zgoraj navedena pot HIV-1 Nef in tudi progesteron aktivirana maturacija oocita, pot TPO (trombopoetinska pot, odgovorna za maturacijo megakariocita), diferenciacija eritrocitov, signalna pot diferenciacije keratinocitov, vpliv transaktivacije receptorja

EGF z G protein sklopljenimi receptorji na srčno hipertrofijo, agrin v postsinaptični diferenciaciji, od 4-1BB-odvisen imunski odziv (kostimulatorna molekula na celicah T, ki vpliva na aktivacijo celic T v Th1 in Th2) in podobno. Če za primer vzamemo zadnjo pot, ki naj bi bila statistično značilno spremenjeno izražena, v njej ni genov, ki bi bili specifični za celice T oziroma antigen predstavitvene celice, ampak so vsi vključeni geni zelo splošni (*NFKBIA*, *MAP3K5*, *MAP4K5*, *JUN*, *IKBKB*). Zato lahko sklenemo, da je potrebna pri taki analizi posebna pozornost pri delanju sklepov.

### **5.1.1 Analiza genskih skupin povezanih s transkripcijskimi faktorji v fibroblastih**

Ob pregledu genov, vključenih v različne spremenjene signalne poti, smo ugotovili, da je kljub 843 spremenjenim genom v spremenjeno izražene poti vključenih le nekaj genov, verjetno so določeni geni mnogo bolje raziskani in vključeni v več poti kot drugi. V več poti so bili vključeni geni za apoptozo (*CAS1*, *BAX*, *BID*, *FAS*), celični cikel (*CDK1*, *DUSP1*) in vnetje (*TNFAIP3*). Najpogosteje so se pojavljali transkripcijski faktorji (ti so vpleteni v mnogo poti); tako smo šest spremenjenih prob za gen *STAT1* našli v 12 poteh, tri probe za gen *JUN* v 14 poteh, dve probi za gen *NFκB1* (*p50*) in njegov inhibitor *NFκBIA* v 13 poteh. Ker program BRB-ArrayTools omogoča tudi analizo eksperimentalno dokazanih tarčnih genov transkripcijskih faktorjev (TF), smo iz razloga, navedenega v prejšnjem odstavku, izvedli posebej tudi analizo TF-ov.

V analizo je bilo vključenih 66 genskih skupin; izražanje genov v vsaki skupini genov je bilo povezano z določenim transkripcijskim faktorjem. Statistično različno izražanje med bolniki in kontrolno skupino smo našli pri 19 genskih skupinah, povezanih s transkripcijskim faktorjem. Pri desetih genskih skupinah smo dokazali statistično značilno različno izražanje tarčnih genov tudi pri analizi celotnega pljučnega tkiva (permutacija LS/permutacija KS;  $p < 0,05$ ). Ugotovili smo statistično značilno znižano izražanje tarčnih genov v sedmih genskih skupinah, povezanih s transkripcijskimi faktorji, in statistično značilno povišano izražanje tarčnih genov pri genski skupini transkripcijskega faktorja *TALI* (Efron-Tibshiranijev GSA test;  $p < 0,05$ ). Rezultati so v Tabeli 1.

**Tabela 1: Seznam statistično značilno spremenjenih genskih skupin transkripcijskih faktorjev med SSc-ILD/K**

	Genske skupine transkripcijskih faktorjev	Štev. genov/prob	Permutacija LS, p-vrednost	Permutacija KS, p-vrednost	Efron-Tibshiranijev GSA test, p-vrednost
1	TP53_T00671	153	0,00002	0,00002	0,05 (-)
2	REL_T00168	20	0,00004	0,00031	0,005 (-)
3	NFKB1_T00591	103	0,00017	0,11596	< 0,005 (-)
4	STAT1_T01492	38	0,00017	0,01315	0,005 (-)
5	ATF2_T00167	23	0,00038	0,23426	0,055 (-)
6	RELA_T00594	46	0,00148	0,17153	< 0,005 (-)
7	CEBPB_T00581	26	0,00208	0,00956	0,07 (-)
8	JUN_T00029	114	0,00595	0,22462	0,015 (-)
9	SMAD4_T04292	22	0,01115	0,02503	0,055 (+)
10	STAT6_T01580	8	0,01134	0,13587	0,02 (-)
11	ATF1_T00968	34	0,0152	0,08625	0,155 (+)
12	TAL1_T00790	6	0,01767	0,35277	< 0,005 (+)
13	CREB1_T00163	66	0,0244	0,00935	0,14 (+)
14	JUNB_T01977	5	0,03756	0,13433	0,07 (-)
15	STAT3_T05694	32	0,05986	0,01989	0,25 (-)
16	MYB_T00137	88	0,10855	0,03134	0,09 (+)
17	E2F-4_T01546	112	0,14264	0,0001	0,135 (+)
18	STAT5A_T05735	19	0,1579	0,01699	0,395 (-)
19	STAT5B_T05736	21	0,16962	0,00816	0,38 (-)

**Legenda:** Rumeno označene genske skupine so statistično značilno različno izražene v fibroblastih bolnikov, modro označene genske skupine so statistično značilno različno izražene v celotnem pljučnem tkivu: (+) pomeni povišano izraženi tarčni gen, medtem ko (-) pomeni znižano izraženi tarčni gen.

Med transkripcijskimi faktorji, ki verjetno regulirajo spremenjeno izražanje v fibroblastih, je družina STAT (STAT5A, STAT5B, STAT6, STAT3), ki jo primarno aktivira vezava citokinov in rastnih dejavnikov, ki znotraj celice najprej aktivirajo Janus kinaze, te pa transkripcijske faktorje STAT. STAT1 je primarno povezan z aktivacijo *IFN*, *EGF* in *PDGF*; STAT3 je povezan z *IL6* in *EGF*; STAT5A z *IL2*, *IL7*, STAT5B z *IL2* in *IL4*; STAT6 z *IL4*. Najvišje med TF sta uvrščena znižana tumor supresor *Tp53* in protoonkogen *REL* iz družine NFkB (družina NFkB, ki je ključna za vnetne procese, je zastopana še z *RelA* (*p65*) in *NFkB*). Od protoonkogenov sta spremenjena še izražanje genov, povezanih z Myb, in gen *E2F*, ki veže tumorske supresorje in tako zavira izražanje genov, ki so vpleteni v proliferacijo. Od transkripcijskih faktorjev, pomembnih za pot TGF- $\beta$ , opazimo samo *Smad4*, ki je med redkimi TF, ki so v fibroblastih povišani. Zanimivo pri tem je, da

sta gena *IDI* (inhibitor diferenciacije 1) in *ID3* najbolj povišano izražena gena v analizi fibroblastov, vendar ju program BRB na osnovi analize izražanja skupin genov, ki so spremenjeni in povezani s TF, ni prepoznal kot pomembno aktivirana in povezana s fibroblasti.

### **5.1.2 Analiza genskih skupin mikro RNA v fibroblastih**

Vemo, da na količino sintetiziranega proteina poleg izražanja gena vplivajo tudi epigenetski mehanizmi, zato nas je v nadaljnjih analizah zanimala vpletenost različnih miRNA na prevajanje gena. BRB-ArrayTools omogoča podobno kot za transkripcijske faktorje analizo genskih skupin eksperimentalno dokazanih tarčnih genov mikroRNA. Genske skupine eksperimentalno določenih tarčnih genov različnih miRNA so bile ustvarjene iz podatkovne baze miRTarBase. Vsi geni, vključeni v posamezno skupino, so tarča iste miRNA. Naredili smo analize, s katerimi smo ugotovili, katere genske skupine za določeno miRNA bolnikov se statistično značilno razlikujejo v izražanju v primerjavi s kontrolno skupino. Program je vključil 114 genskih skupin, povezanih z določeno miRNA. Za izračun je uporabil model naključne variance in univariantni t-test. Za določitev statistične signifikantnosti (mejo smo postavili pri  $p < 0,05$ ) je uporabil permutacijski test LS/KS in Efron-Tibshiranijev GSA maxmean test. 18 genskih skupin, povezanih z miRNA, je bilo statistično značilno različno izraženih pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino. Permutacijski test LS/KS je našel 15 signifikantno različno izraženih genskih skupin miRNA, Efron-Tibshiranijev maxmean test pa devet (ob pogoju 200 permutacij). Ugotovili smo, da je bilo v petih genskih skupinah miRNA statistično značilno povišano izražanje tarčnih genov bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino in v štirih genskih skupinah negativno gensko izražanje tarčnih genov. Od vseh 18 statistično različno izraženih genskih skupin miRNA v fibroblastih smo v treh genskih skupinah miRNA statistično različno izražanje dokazali tudi v celotnem pljučnem tkivu bolnikov. Rezultati so prikazani v Tabeli 2. Ugotovili smo štiri statistično značilno znižano izražene genske skupine miRNA v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino.



**Tabela 2: Seznam statistično značilno spremenjenih genskih skupin mikro RNA med SSc-ILD/K**

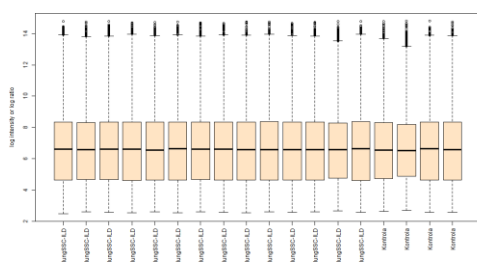
	Genske skupine miRNA	Štev. genov/prob	Permutacija LS p-vrednost	Permutacija KS p-vrednost	Efron-Tibshiranijev GSA test, p-vrednost
1	hsa-miR-24-3p	20	0,00478	0,00437	0,045 (+)
2	hsa-miR-148b-3p	9	0,01178	0,09036	0,075 (-)
3	hsa-miR-145-5p	53	0,01425	0,58417	0,025 (-)
4	hsa-miR-383-5p	5	0,01445	0,19683	0,05 (+)
5	hsa-miR-21-5p	54	0,02189	0,02572	0,025 (-)
6	hsa-miR-25-3p	6	0,02312	0,03418	0,11 (-)
7	hsa-miR-10b-5p	19	0,02488	0,00496	0,095 (+)
8	hsa-miR-107	11	0,02633	0,04956	0,125 (-)
9	hsa-miR-140-5p	9	0,03102	0,06499	0,13 (-)
10	hsa-miR-92a-3p	8	0,03567	0,01182	0,035 (-)
11	hsa-miR-125a-5p	9	0,03666	0,45892	0,16 (-)
12	hsa-miR-148a-3p	7	0,04587	0,15368	0,1 (-)
13	hsa-miR-150-5p	6	0,04947	0,03418	0,025 (+)
14	hsa-miR-146a-5p	15	0,10288	0,03486	0,16 (-)
15	hsa-miR-217	5	0,12341	0,07277	0,04 (+)
16	hsa-miR-19a-3p	15	0,12588	0,28702	0,025 (-)
17	hsa-miR-27a-3p	11	0,13925	0,01305	0,095 (-)
18	hsa-miR-10a-5p	8	0,22509	0,25318	0,045 (+)

**Legenda:** Rumeno označene genske skupine so statistično značilno različno izražene v fibroblastih bolnikov. Modro označene genske skupine so statistično značilno različno izražene pri bolnikih tudi v celotnem pljučnem tkivu. (+) označuje povišano izraženi tarčni gen, medtem ko (-) označuje znižano izraženi tarčni gen. Kontrola (n = 10), SSc-ILD (n = 8),  $p < 0,05$ .

## 5.2 Gensko izražanje celic pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (GSE76808)

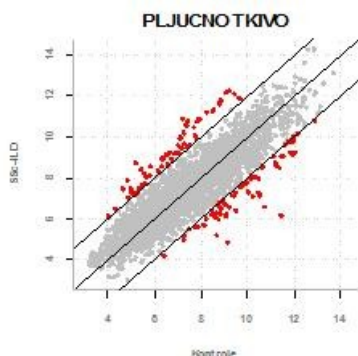
Drugi sklop raziskave je analiza podatkov iz študije, pri čemer smo primerjali gensko izražanje pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD in kontrolne skupine. Analizo smo naredili na enak način kot analizo iz študije fibroblastov, da smo lahko v tretjem sklopu analizirali le tiste genske skupine, ki so bile statistično značilno različno izražene v drugih celicah pljučnega tkiva.

**Slika 7: Kvartilni diagram genskega izražanja pljučnega tkiva**



**Legenda:** Prikaz genskega izražanja podatkov vzorcev bolnikov s SSc-ILD in kontrolne skupine iz študije pljučnega tkiva po normalizaciji s programom BRB-ArrayTools.

**Slika 8: Grafični prikaz genskega izražanja pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino**



**Legenda:** Sredinska črta predstavlja premico enakosti (angl. identity line), obe vzporednici pa mejo štirikratnega povečanja v smeri vzorcev na osi. Pike predstavljajo posamezne gene. Rdeče obarvane pike predstavljajo gene z vsaj štirikratno povešanim oziroma štirikratno znižanim izražanjem med bolniki v primerjavi s kontrolno skupino (oddaljenost od črte pove p-vrednost, skala na osi x in na osi y pa pove, kolikokrat je gen povešan oziroma znižan – bolj oddaljeni geni imajo večjo spremembo).

Iz Slike 7 je razvidno, da se tudi tukaj izraženi geni v vseh vzorcih normalno porazdeljujejo. V analizo primerjave razredov (angl. class comparison) med skupinama bolnikov in kontrol (SSc-ILD/K) je bilo vključenih 22.277 genov, po filtraciji podatkov je ostalo 3533 genov. Za izračun statistične značilnosti (določili smo  $p < 0,001$ ) izražanja je bil uporabljen parni t-test. Rezultati primerjave dveh razredov (SSc-ILD/K) so pokazali 549 statistično značilno ( $p < 0,001$ ) različno izraženih genov v celicah pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino. Grafični prikaz in seznam statistično značilno povešano in znižano ( $p < 0,001$ ; več kot štirikratna razlika v izražanju) izraženih genov s podatki geometrijske sredine intenzitete in z relativnimi spremembami je predstavljen v Sliki 8 in v prilogah 4 ter 5.

Tako kot pri študiji fibroblastov smo tudi pri študiji celotnega pljučnega tkiva nadaljevali z analizo obogatenih poti (Biocarta Pathway). Analiza je vključevala 153 genskih skupin. Ugotovili smo različno izraženost pri 60 genskih skupinah med bolniki in kontrolno skupino (Priloga 6). Uporabljena sta bila permutacijski test LS/KS in Efron-Tibshiranijev GSA maxmean test za dokazovanje signifikantnosti ( $p < 0,05$ ). Podobno kot pri pljučnih fibroblastih smo tudi tukaj ugotovili, da je izpostavljenih več poti, ki niso pomembne v našem vzorcu pljučnega tkiva. Prav tako so nekateri geni zastopani v več poteh, tako so tri probe spremenjeno izraženih genov za *JUN* izražene v 28 poteh. Signalne poti s statistično značilno različno gensko izraženostjo v pljučnem tkivu bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino so:

- apoptotične poti: signalna pot FAS;
- signalne poti proliferacije: s kadmijem izzvana sinteza DNA in proliferacija v makrofagih;
- signalne poti celičnega cikla: nadzorne točke (angl. checkpoint) G2/M;
- citokini, rastni dejavniki, odziv na izvencelične signale: signalna pot AKT, signalna pot TNFR1, pot živčnega rastnega dejavnika (NGF), inzulinska signalna pot, signalna pot IGF-1, od IL12 in Stat4 odvisna signalna pot v razvoju Th1, signalna transdukcija prek IL1R, regulacija MAP-kinaz prek dvojno specifičnih fosfataz, signaliziranje receptorja hepatocitnega rastnega dejavnika (HGF), angiotenzin II povzročena aktivacija JNK poti s Pyk2 odvisnim signaliziranjem;
- poškodbe DNA ali celičnega cikla: signalna pot ATM;
- celično specifične poti: signalna pot T celičnega receptorja, od Pertussis toksina neodvisno signaliziranje CCR5 v makrofagih, vpliv zunajceličnih makrofagnih pasti (MRTS) na diferenciacijo makrofagov;
- delovanje proteaz: mCalpain v celičnem gibanju, uCalpain v razsejanju celic in inhibicija matriks metaloproteinaz.

Spremenjene poti so še: pot izražanja genov z oksidativnim stresom, vloga ERBB2 v transdukciji signala in onkologiji, Rho selektivna izmenjava gvanina, z AKAP13 povzročena formacija stresnih vlaken, regulacija genov prek PPAR $\alpha$ , represija občutenja bolečine z DREAM, pot receptorja cistične fibroze (CFTR) in beta 2 adrenergičnega receptorja, signalna pot G-proteinov, ghrelin – regulacija vnosa hrane

in energetske homeostaze; alternativna aktivacija komplementa, majhni z levcinom bogati proteoglikani (SLRP), endocitična vloga NDK, fosfinov in dinaminov.

Signalne poti, pri katerih smo ugotovili statistično različno gensko izraženost tako v celotnem pljučnem tkivu kot v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino in so pomembne za pljuča in fibroblaste, so v večini vezane na signaliziranje citokinov, inflamacijo in apoptozo. Signalne poti CD40L, IL-6, TNFR2, NF-kB, TLR, EGF, pot procesiranja informacije na ojačevalcu IFN- $\beta$ , TNF, s stresom povezano signaliziranje, signalna pot D4-GDI, indukcija apoptoze prek receptorjev DR3 in DR4/5, celice in molekule, vključene v lokalni vnetni odziv, kaskada kaspaze v apoptozi in pot komplementa. Seznam vseh signalnih poti s statistično značilno različno gensko izraženostjo pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino je v Prilogi 6.

### **5.2.1 Analiza genskih skupin transkripcijskih faktorjev celotnega pljučnega tkiva**

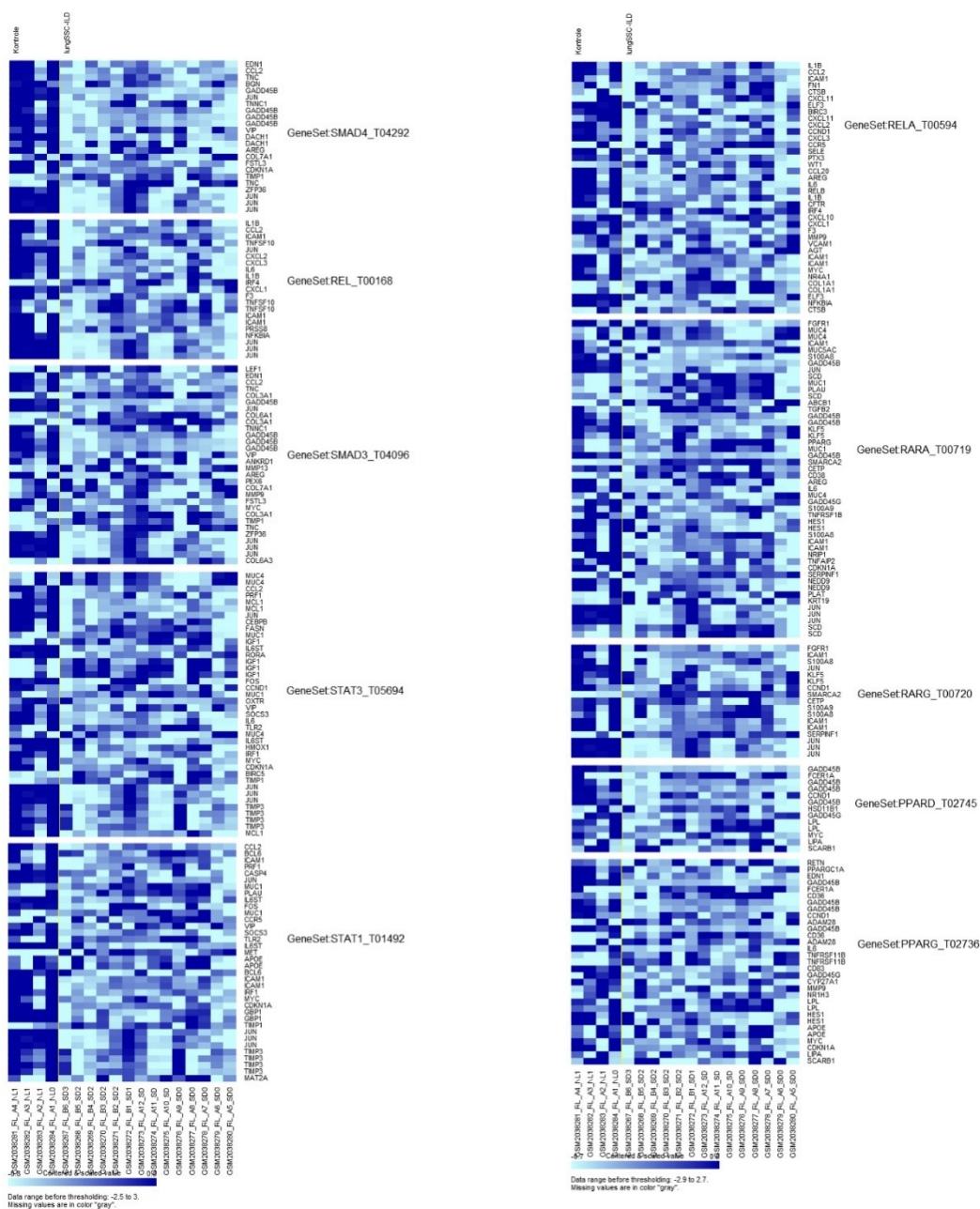
V analizo genskih skupin, povezanih s posameznim transkripcijskim faktorjem, je bilo vključenih 69 genskih skupin različnih genov, katerih gensko izražanje regulira posamezen transkripcijski faktor. Statistično značilno različno izražanje med bolniki in kontrolno skupino smo našli pri 27 genskih skupinah, povezanih z določenim transkripcijskim faktorjem ( $p < 0,05$ ). Od 27 statistično različno izraženih genskih skupin, povezanih s transkripcijskim faktorjem, smo ugotovili deset skupnih v pljučnem tkivu in v fibroblastih ter 17 različno izraženih genskih skupin le v pljučnem tkivu. Statistično značilno znižano izražanje tarčnih genov genskih skupin, vezanih na transkripcijski faktor bolnikov, samo v celicah pljučnega tkiva dokazali v desetih genskih skupinah, vezanih na posamezni transkripcijski faktor, statistično značilno povišano izražanje tarčnih genov pa smo dokazali pri treh transkripcijskih faktorjih. Rezultati so predstavljeni v Tabeli 3. Na toplotnih grafih na Sliki 9 in na Sliki 10 je prikazano gensko izražanje znižano in povišano izraženih tarčnih genov posameznih transkripcijskih faktorjev (vrstice) in kako so se ti izražali v posameznih vzorcih (stolpci), pri čemer so kontrole jasno ločene od bolnikov. Poleg spremenjenih TF, najdenih tudi v fibroblastih, tu opazimo več s signaliziranjem TGF- $\beta$  povezanih TF (Smad4, Smad3, Smad1). V pljučnem tkivu se pojavi cela družina PPAR in TF RAR.

**Tabela 3: Seznam statistično značilno spremenjenega izražanja genskih skupin, povezanih s transkripcijskimi faktorji med SSc-ILD/K v celicah pljučnega tkiva.**

	Genske skupine transkripcijskih faktorjev	Štev. genov/prob	Permutacija LS, p-vrednost	Permutacija KS, p-vrednost	Efron-Tibshiranije v GSA test, p-vrednost
1	SMAD4_T04292	23	0,00001	0,00869	< 0,005 (-)
2	REL_T00168	21	0,00003	0,00019	0,005 (-)
3	SMAD3_T04096	30	0,00003	0,00496	< 0,005 (-)
4	STAT3_T05694	40	0,00005	0,00004	< 0,005 (-)
5	STAT1_T01492	36	0,00027	0,00018	0,015 (-)
6	ESR1_T00261	53	0,00085	0,02315	0,13 (-)
7	RELA_T00594	38	0,00097	0,00126	0,01 (-)
8	RARA_T00719	48	0,00138	0,04552	0,045 (-)
9	BCL6_T02322	7	0,0052	0,03213	0,065 (-)
10	PGR_T0	8	0,00661	0,02025	0,09 (-)
11	RARG_T00720	17	0,01533	0,05806	0,045 (-)
12	ESR2_T04651	14	0,01767	0,06108	0,065 (-)
13	PPARD_T02745	13	0,01802	0,71256	0,005 (-)
14	STAT5A_T05735	17	0,01914	0,00711	0,115 (+)
15	PPARA_T05221	23	0,02044	0,59627	0,06 (-)
16	ATF1_T00968	40	0,03708	0,00702	0,265 (-)
17	SMAD1_T03885	18	0,04314	0,00027	0,005 (+)
18	TP53_T00671	109	0,04614	0,00148	0,03 (+)
19	PPARG_T02736	31	0,05468	0,43932	0,02 (-)
20	c-Myc_T00140	152	0,05902	0,04454	0,03 (+)
21	STAT5B_T05736	19	0,0623	0,04394	0,115 (+)
22	ATF4_T00051	7	0,08183	0,04712	0,13 (-)
23	CREB2_T00051	7	0,08183	0,04712	0,13 (-)
24	MYBL2_T00065	16	0,09143	0,02174	0,055 (+)
25	JUNB_T01977	7	0,18112	0,02194	0,065 (+)
26	JUN_T00029	131	0,28211	0,00273	0,18 (+)
27	HOXA9_T01709	7	0,5081	0,03737	0,275 (-)

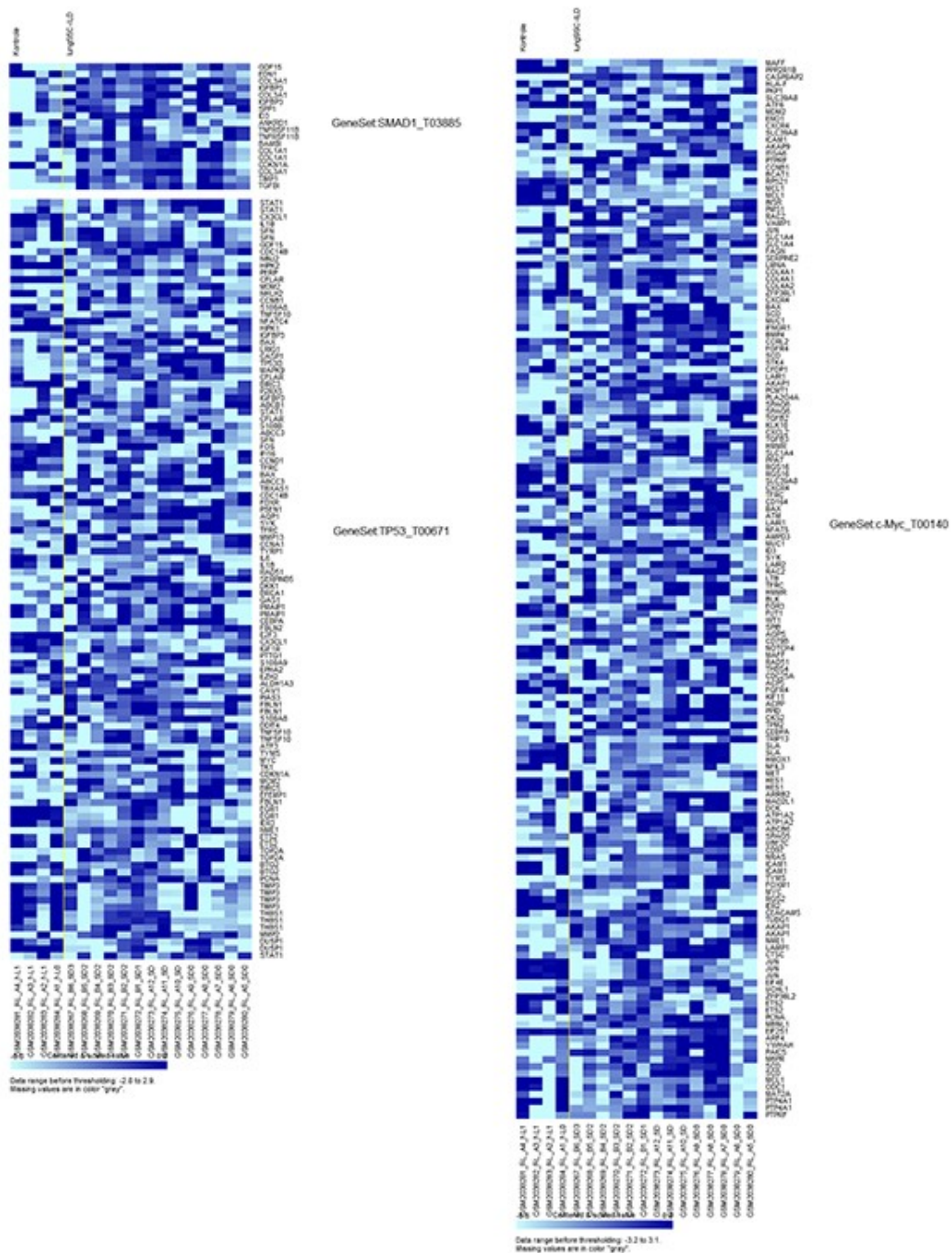
**Legenda:** Oranžno označene genske skupine so statistično značilno različno izražene v pljučnem tkivu bolnikov. Modro označene genske skupine so statistično značilno različno izražene pri bolnikih tudi v fibroblastih, izoliranih iz pljučnega tkiva. (+) pomeni povišano izraženi tarčni gen, medtem ko (-) označuje znižano izraženi tarčni gen. Kontrole (n = 4), lungSSC-ILD (n = 14) p < 0,05.

**Slika 9: Toplotni grafi znižano izraženih genskih skupin transkripcijskih faktorjev v celicah pljučnega tkiva SSc-ILD**



**Legenda:** Prikaz genskega izražanja desetih genskih skupin transkripcijskih faktorjev s statistično značilno znižanim izražanjem tarčnih genov pri bolnikih (14 vzorcev) v primerjavi s kontrolno skupino (štirje vzorci). Intenziteta modre barve predstavlja moč izražanja posameznega gena v posameznem vzorcu.

**Slika 10: Toplotni grafi povišano izraženih genskih skupin transkripcijskih faktorjev v celicah pljučnega tkiva SSc-ILD**



**Legenda:** Prikaz genskega izražanja treh genskih skupin transkripcijskih faktorjev s statistično značilno povišanim izražanjem tarčnih genov pri bolnikih (14 vzorcev) v primerjavi s kontrolno skupino (štirje vzorci). Intenziteta modre barve predstavlja moč izražanja posameznega gena v posameznem vzorcu.

### 5.2.2 Analiza genskih skupin miRNA celotnega pljučnega tkiva

Z analizo genskih skupin, značilno spremenjenih pod vplivom določene miRNA v celicah pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino, smo ugotovili 24 statistično značilno različno izraženih od skupno 95 genskih skupin, povezanih z določeno miRNA. Uporabili smo permutacijski test LS/KS, s katerim smo dokazali 22 statistično značilno različno izraženih genskih skupin, povezanih z določeno miRNA, in Efron-Tibshiranijev GSA maxmean test za dokazovanje signifikantnosti, s katerim smo dokazali 12 statistično značilno različno izraženih genskih skupin, povezanih z določeno miRNA ( $p < 0,05$ ). Od 24 statistično različno izraženih genskih skupin smo ugotovili tri genske skupine, povezane z določeno miRNA, ki so skupne pljučnemu tkivu in fibroblastom. Ena skupnih je hsa-miR-21-5p. Zanj smo ugotovili, da je povezana s kar 42 geni oziroma probami, spremenjeno izraženih v našem vzorcu. Med njimi so pomembni TNF- $\alpha$ , geni, ki so vključeni v kemokinsko in citokinsko signalizacijo, in geni za adhezijske molekule. Druga skupna miRNA, hsa-miR-27a-3p, regulira *IGF1*, tretja skupina, hsa-miR-24-3p, cilja gene, vključene v procese proliferacije in celičnega cikla. Drugih 21 genskih skupin, povezanih z miRNA, je bilo statistično različno izraženih le v pljučnem tkivu bolnikov. Z Efron-Tibshiranijevim GSA testom smo pri osmih genskih skupinah miRNA ugotovili statistično značilno znižano izražanje tarčnih genov bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 11 A) in pri treh genskih skupinah statistično značilno povišano izražanje tarčnih genov bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 11B) ( $p < 0,05$ ). Rezultati so prikazani v Tabeli 4.

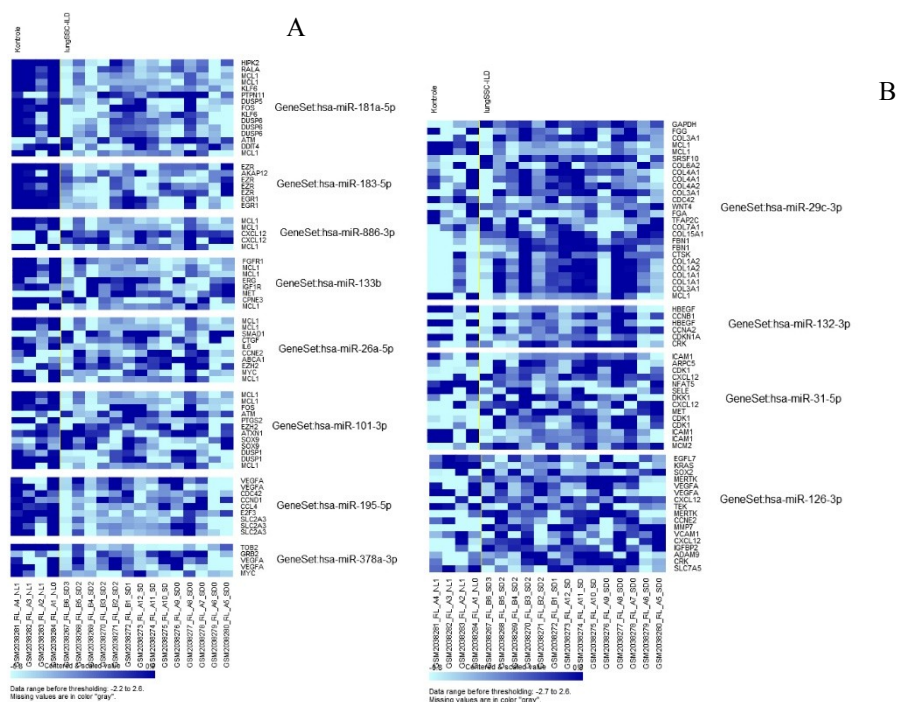


**Tabela 4: Seznam statistično značilno spremenjeno izraženih genskih skupin povezanih z določeno miRNA med SSc-ILD/K v celicah pljučnega tkiva**

	Genske skupine miRNA	Štev. genov/prob	Permutacijska LS, p-vrednost	Permutacijska KS, p-vrednost	Efron-Tibshiranijev GSA test, p-vrednost
1	hsa-miR-181a-5p	15	0,00001	0,00001	0,005 (-)
2	hsa-miR-183-5p	7	0,00161	0,00031	< 0,005 (-)
3	hsa-miR-886-3p	5	0,00191	0,01355	0,045 (-)
4	hsa-miR-125b-5p	14	0,00561	0,07209	0,09 (+)
5	hsa-miR-133b	8	0,00696	0,0493	0,045 (-)
6	hsa-miR-29c-3p	26	0,01008	0,0928	0,025 (+)
7	hsa-miR-26a-5p	10	0,01409	0,12965	0,045 (-)
8	hsa-miR-302a-3p	8	0,01554	0,0831	0,095 (+)
9	hsa-miR-193b-3p	6	0,0181	0,12747	0,065 (-)
10	hsa-miR-21-5p	42	0,01849	0,06377	0,065 (-)
11	hsa-miR-133a-3p	10	0,01861	0,01847	0,115 (-)
12	hsa-miR-181c-5p	7	0,02271	0,03179	0,1 (+)
13	hsa-miR-663a	6	0,023	0,08636	0,215 (+)
14	hsa-miR-132-3p	6	0,025	0,00015	0,02 (+)
15	hsa-miR-101-3p	12	0,02703	0,18842	0,02 (-)
16	hsa-miR-23a-3p	8	0,03101	0,00211	0,265 (-)
17	hsa-miR-29a-3p	23	0,03562	0,55959	0,165 (-)
18	hsa-miR-195-5p	9	0,04321	0,08145	0,05 (-)
19	hsa-miR-27a-3p	6	0,05219	0,00651	0,07 (+)
20	hsa-miR-181b-5p	11	0,06068	0,02207	0,2 (-)
21	hsa-miR-378a-3p	5	0,0828	0,45761	0,04 (-)
22	hsa-miR-31-5p	14	0,09159	0,00001	0,01 (+)
23	hsa-miR-126-3p	17	0,27583	0,06744	0,015 (+)
24	hsa-miR-24-3p	17	0,40754	0,02711	0,1 (+)

**Legenda:** Oranžno označene genske skupine so statistično značilno različno izražene v pljučnem tkivu bolnikov, medtem ko so modro označene genske skupine statistično značilno različno izražene pri bolnikih tudi v fibroblastih, izoliranih iz pljučnega tkiva. (+) pomeni povišano izraženi tarčni gen, (-) pa označuje znižano izraženi tarčni gen. Kontrole (n = 4), lungSSc-ILD (n = 14), p < 0,05.

**Slika 11: Toplotni grafi znižano in povišano izraženih genskih skupin, povezanih z mikro RNAv celicah pljučnega tkiva**



**Legenda:** A) Prikaz genskega izražanja osmih genskih skupin miRNA s statistično značilno znižanim izražanjem pri bolnikih (14 vzorcev) v primerjavi s kontrolno skupino (štirje vzorci). B) Prikaz genskega izražanja štirih genskih skupin miRNA s statistično povišanim izražanjem pri bolnikih (14 vzorcev) v primerjavi s kontrolno skupino (štirje vzorci). Intenziteta modre barve predstavlja moč izražanja posameznega gena v posameznem vzorcu.

### 5.3 Primerjava analiz genskega izražanja fibroblastov in pljučnega tkiva

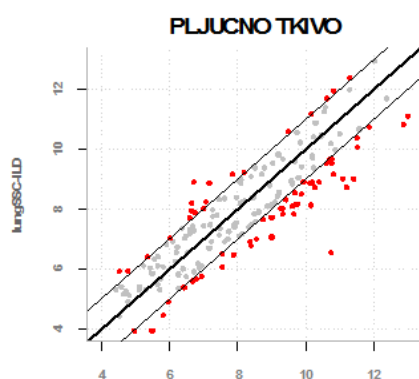
V tretjem sklopu raziskave smo primerjali analize genskega izražanja izoliranih fibroblastov in pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolnima skupinama. Med posameznimi analizami smo sicer zasledovali razlike v genskem izražanju študije fibroblastov in študije celotnega pljučnega tkiva, naš končni cilj pa je bil ugotoviti profil genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva brez fibroblastov in njihov vpliv na razvoj ILD pri bolnikih s SSc. Profil genskega izražanja drugih celic smo pridobili na dva načina. V prvi »funkcionalni« profil smo vključili gene genskih skupin signalnih poti, ki so bile statistično različno izražene le v pljučnem tkivu in ne v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Pri tem smo ugotovili, da so nekateri geni spremenjeno izraženi tudi v fibroblastih, vendar manj kot v celotnem pljučnem tkivu. Tako spremenjeno gensko izražanje lahko vpliva na fibroblaste ali pa so spremenjeno izraženi geni del druge signalne poti, ki v pljučnem tkivu ni bila

dokazano statistično značilna v primerjavi s kontrolno skupino. V drugi profil genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva smo uvrstili vse gene, ki so bili statistično značilno različno izraženi le v drugih celicah pljučnega tkiva. To smo dosegli tako, da smo iz vseh statistično različno izraženih genov celotnega pljučnega tkiva izločili gene, ki so bili statistično značilno različno izraženi tudi v fibroblastih.

»Funkcionalni« profil genskega izražanja smo izvedli z BRB-ArrayTools, tako da smo analizirali podatke genskega izražanja v pljučnem tkivu, ki smo jih dodatno filtrirali. In sicer smo v analize vključili le gene analiz signalnih poti (Biocarta Pathway), ki so bile statistično značilno različno izražene pri bolnikih le v celicah pljučnega tkiva in ne v fibroblastih. S tem smo dobili genski profil izražanja tistih genov, ki so vpleteni v signalne poti, njihova funkcija v celici pa je dobro raziskana. Seznam signalnih poti je v Prilogi 9. Analize smo izvedli na enak način kot v prvih dveh sklopih, le da smo tukaj izvedli dodatno filtriranje.

V analizo izražanja genov pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino je bilo po dodatnem filtriranju vključenih 179 genov. Uporabljen je bil t-test. Ugotovili smo 77 statistično značilno različno izraženih genov bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Od teh je bilo 24 statistično značilno povišano izraženih genov (Priloga 7) in 53 statistično značilno znižano izraženih genov pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino (Priloga 8) ( $p < 0,01$ ). Grafični prikaz statistično značilno povišanih in znižanih genov pljučnega tkiva bolnikov po dodatnem filtriranju je predstavljen na Sliki 12.

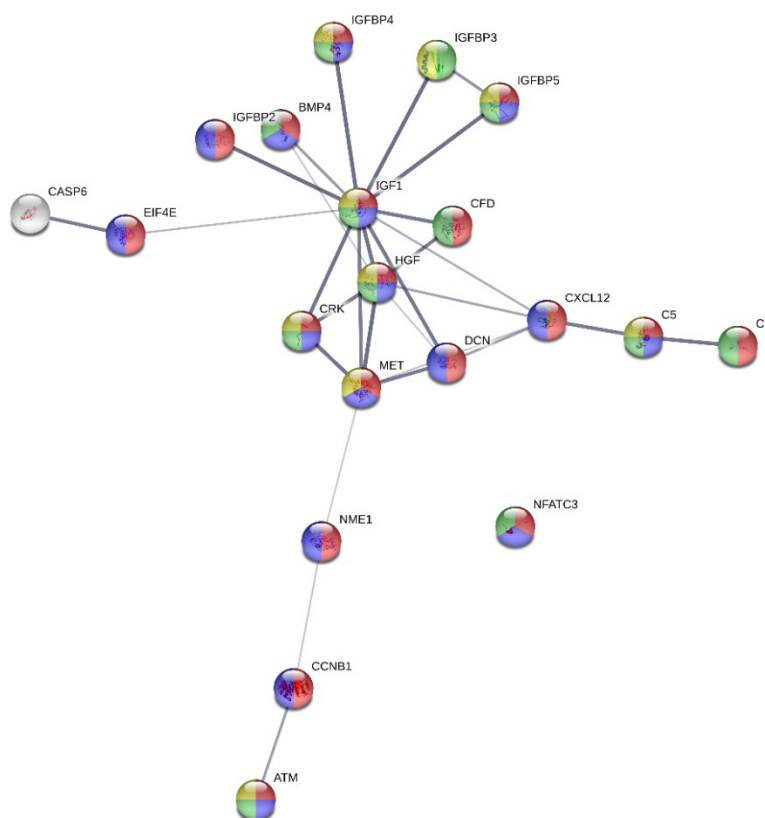
**Slika 12: Grafični prikaz »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva**



**Legenda:** Seznam statistično značilno povišano in znižano izraženih genov, uvrščenih v genske skupine signalnih poti (podatkovna baza Biocharta pathway) v pljučnem tkivu bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino, z upoštevanjem dodatnega filtriranja podatkov, s katerim smo upoštevali le tiste genske skupine, pri katerih smo ugotovili statistično različno izražanje v pljučnem tkivu in ne v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino (rdeče obarvani geni predstavljajo več kot dvakratno znižanje oziroma zvišanje)

Potem ko smo dobili seznam različno izraženih genov »funkcionalnega« profila drugih celic pljučnega tkiva (prilogi 7 in 8), smo naredili analizo genskih povezav tudi z bioinformatičnim orodjem STRING. Ugotovili smo, da med povišano izraženimi geni, ki so pomembnejši v drugih celicah pljučnega tkiva med biološkimi procesi, prevladujejo pozitivne regulacije bioloških procesov, transdukcije signala signalne poti IGF, celičnih procesov in pozitivne regulacije odziva na stimulus. Med signalnimi potmi KEGG pa prevladujejo p53, Rap1, fokalna adhezija in komplement s kaskado koagulacije (Slika 13). Iz Slike 13 je razvidno, da imata osrednjo vlogo IGF in IGF vezajoči protein; ena veja sega proti apoptozi (CASP6), druga proti komplementu (C5, C7) in ena proti poškodbam DNA (ATM; NME1).

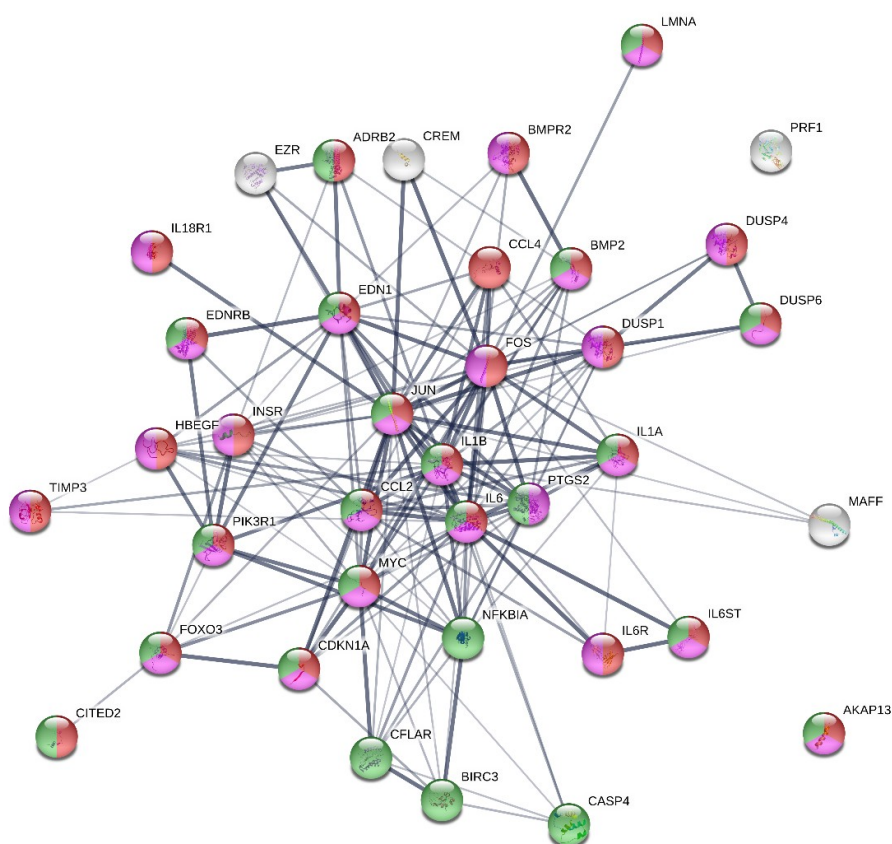
**Slika 13: Povezave med statistično značilno povišano izraženimi geni »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD**



**Legenda:** Rdeče označeni geni so po bioloških procesih KEGG vključeni v pozitivne regulacije bioloških procesov, modro označeni so vključeni v pozitivno regulacijo celičnih procesov, zeleno označeni so del pozitivne regulacije odziva na stimulse in rumeni so del pozitivne regulacije znotrajcelične signalne transdukcije. Debelina črte pove moč povezave v skupni funkciji med proteini (eksperimentalno določene in predvidene).

Z analizo povezav med proteini statistično značilno znižano izraženih genov »funkcionalnega« profila drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino smo ugotovili, da je velik delež genov vključen v biološke procese KEGG celičnega odziva na kemične in organske stimulse (skupaj 52 genskih prob) in v regulacije apoptoze. Če gene uvrstimo v poti KEGG, sta med znižano izraženimi signalna pot TNF (11 genov oziroma prob) in interakcija citokina ter receptorja (deset genov oziroma prob) (Slika 14). V tem primeru osrednje mesto zasedajo geni za citokine (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *CCL2*) in transkripcijski vnetni faktorji (*JUN*, *FOS*), ki se jim pridružuje precej drugih genov za hormone in rastne dejavnike (*INSR*, *HBGEF*, *IL-6R*). En del sega na področje apoptoze (*CASP4*), pomembno vlogo imajo tudi geni *DUSP*. Dvojno specifična fosfataza (*DUSP*) je oblika fosfataze, ki lahko defosforilira tirozin ali serin oziroma treoninske ostanke.

**Slika 14: Povezave med statistično značilno znižano izraženimi geni »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD**



**Legenda:** Rdeče in rožnato obarvani geni so vključeni v biološke poti KEGG celičnega odziva na kemične in organske stimulse, zeleno obarvani geni so vključeni v procese apoptoze. Debelina črte pove moč povezave v skupni funkciji med proteini (eksperimentalno določene in predvidene).

Pri analizah genskih skupin, povezanih z določenim transkripcijskim faktorjem, smo ugotovili statistično različno izražanje »funkcionalnega« genskega profila drugih celic pljučnega tkiva v primerjavi s kontrolno skupino v 18 genskih skupinah od 50 vključenih. S permutacijskima testoma LS/KS smo ugotovili 18 statistično značilno različno izraženih genskih skupin transkripcijskih faktorjev pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino. Z Efron-Tibshiraniyevim GSA testom pa smo dokazali, da so ekspresije v dveh od 18 genskih skupin, povezanih s transkripcijskimi faktorji, statistično značilno znižano izraženi tarčni geni (*REL*, *NFIC*) pri bolnikih, in pri enem od 18 genskih skupin, povezanih s transkripcijskim faktorjem, statistično značilno zvišano izražanje tarčnih genov pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino (*ESR1*) ( $p < 0,05$ ). Rezultati so prikazani v Tabeli 5, toplotni grafi genskega izražanja posameznih tarčnih genov bolnikov v primerjavi s kontrolnimi vzorci za statistično značilno znižano izražene genske skupine transkripcijskih faktorjev pa so prikazani na Sliki 15.

**Tabela 5: Seznam statistično različno izraženih genskih skupin, povezanih s transkripcijskim faktorjem »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD**

	Genske skupine transkripcijskih faktorjev	Štev. genov	Permutacijska LS p-vrednost	Permutacijska KS p-vrednost	Efron-Tibshiraniyev GSA test p-vrednost
1	<b>REL_T00168</b>	9	<b>0,00057</b>	<b>0,0007</b>	<b>&lt; 0,005 (-)</b>
2	<b>PGR_T0</b>	5	<b>0,01937</b>	<b>0,01061</b>	0,125 (-)
3	<b>RARB_T00721</b>	5	<b>0,01937</b>	<b>0,01061</b>	0,125 (-)
4	<b>BCL6_T02322</b>	5	<b>0,02056</b>	<b>0,01428</b>	0,115 (-)
5	<b>CREM_T01803</b>	5	<b>0,02056</b>	<b>0,01428</b>	0,115 (-)
6	<b>STAT3_T05694</b>	21	<b>0,02302</b>	<b>0,00505</b>	0,065 (-)
7	<b>NFIC_T00176</b>	12	<b>0,02694</b>	0,07481	<b>0,03 (-)</b>
8	<b>SMAD4_T04292</b>	9	<b>0,02982</b>	<b>0,04537</b>	0,085 (-)
9	<b>STAT1_T01492</b>	17	<b>0,0361</b>	<b>0,0197</b>	0,175 (-)
10	<b>SMAD3_T04096</b>	9	<b>0,03653</b>	0,09689	0,075 (-)
11	<b>RARA_T00719</b>	8	<b>0,04399</b>	0,35991	0,065 (-)
12	<b>AR_T00040</b>	7	<b>0,04714</b>	0,2602	0,23 (+)
13	<b>EGR1_T00241</b>	14	0,11344	<b>0,03821</b>	0,235 (-)
14	<b>CEBPB_T00581</b>	5	0,13339	<b>0,02</b>	0,085 (-)
15	<b>ESR1_T00261</b>	17	0,16199	<b>0,02296</b>	<b>0,045 (+)</b>
16	<b>JUNB_T01977</b>	6	0,41166	<b>0,04772</b>	0,09 (+)
17	<b>SP1_T00759</b>	32	0,42395	<b>0,02</b>	0,385 (+)
18	<b>JUN_T00029</b>	30	0,54466	<b>0,04753</b>	0,24 (+)



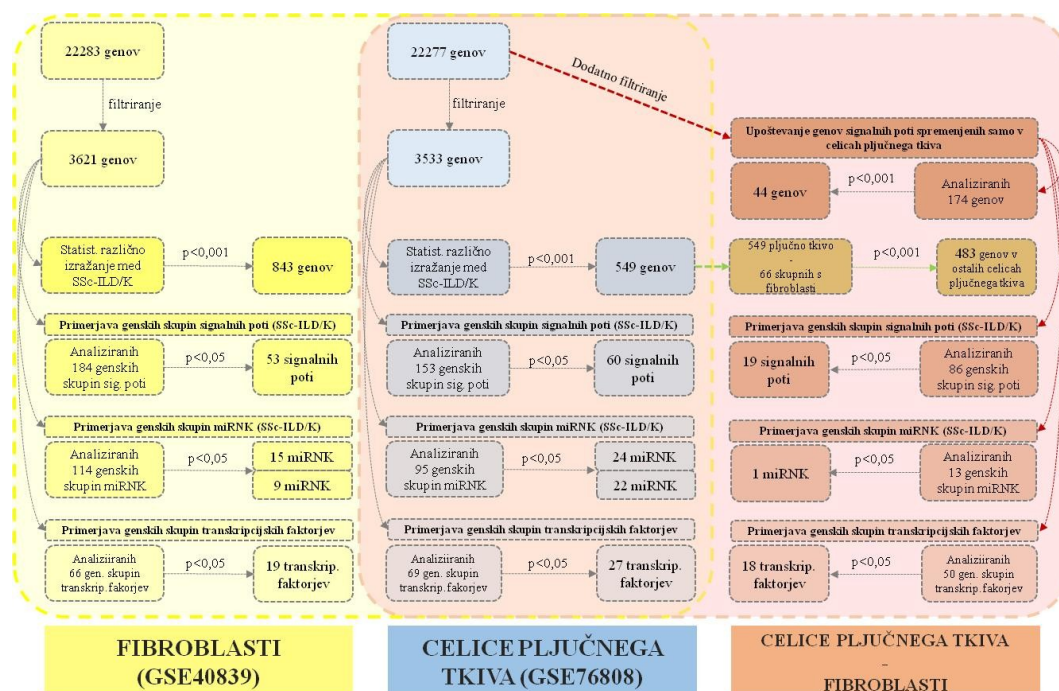
**Tabela 6: Tarčni geni za hsa-miR-132-3p mikro RNA**

	Genska skupina miRNA	Gen/proba	p-vrednost	Geom. sredina intenz. v K	Geom. sredina intenz. v lungSSc-ILD	Razmerje spremembe
1	hsa-miR-132-3p	HBEGF	0,00048	798,02	232,16	3,44
2		CCNB1	0,00067	22,89	60,89	0,38
3		HBEGF	0,00211	854,13	291,86	2,93
4		CDKN1A	0,00334	1777,5	816,28	2,18
5		CRK	0,00709	128,89	257,9	0,5

**Legenda:** Seznam genov genske skupine miRNA, pri kateri smo dokazali statistično značilno izražanje v drugih celicah pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino z upoštevanjem dodatnega filtriranja genov. Kontrole (štirje vzorci), SSc-ILD (14 vzorcev),  $p < 0,05$

Shematični prikaz poteka vseh treh sklopov analiz genskega izražanja podatkov iz študije fibroblastov in študije pljučnega tkiva bolnikov z SSc-ILD v primerjavi s kontrolnima skupinama in strnjeni rezultati analiz, narejenih z BRB-ArrayTools, so na sliki 16.

**Slika 16: Shematski prikaz analize genskega izražanja z BRB-ArrayTools**



Ugotovili smo, da med ekstremno zvišano izraženimi geni v pljučnem tkivu, ki se ne pojavljajo v fibroblastih, velik delež predstavljajo geni imunskega odziva, predvsem imunoglobulini, ki pa jih podatkovna baza Biocharta Pathway ne uvrsti v nobeno



signalno pot, in jih zato v analizi »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic zgrešimo.

Zato smo analize nadaljevali z drugim profilom genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva, ki je vseboval vse statistično značilno različno izražene gene celotnega pljučnega tkiva, iz katerega smo izločili gene, ki so bili skupni s fibroblasti ( $p < 0,001$ ). V fibroblastih bolnikov smo ugotovili 843, v pljučnem tkivu bolnikov pa 549 statistično značilno različno izraženih genov v primerjavi s kontrolno skupino. Skupnih statistično značilno različno izraženih genov tako v fibroblastih kot v pljučnem tkivu je bilo 66, statistično značilno različno izraženih genov, ki smo jih našli le v celicah pljučnega tkiva, je bilo 483. Z dobljenim seznamom različno izraženih genov v fibroblastih ( $n = 843$ ) in različno izraženih genov, ki smo jih dokazali le v drugih celicah pljučnega tkiva ( $n = 483$ ) in ne v fibroblastih, smo nadaljevali z analizami s pomočjo različnih bioinformatičnih orodij.

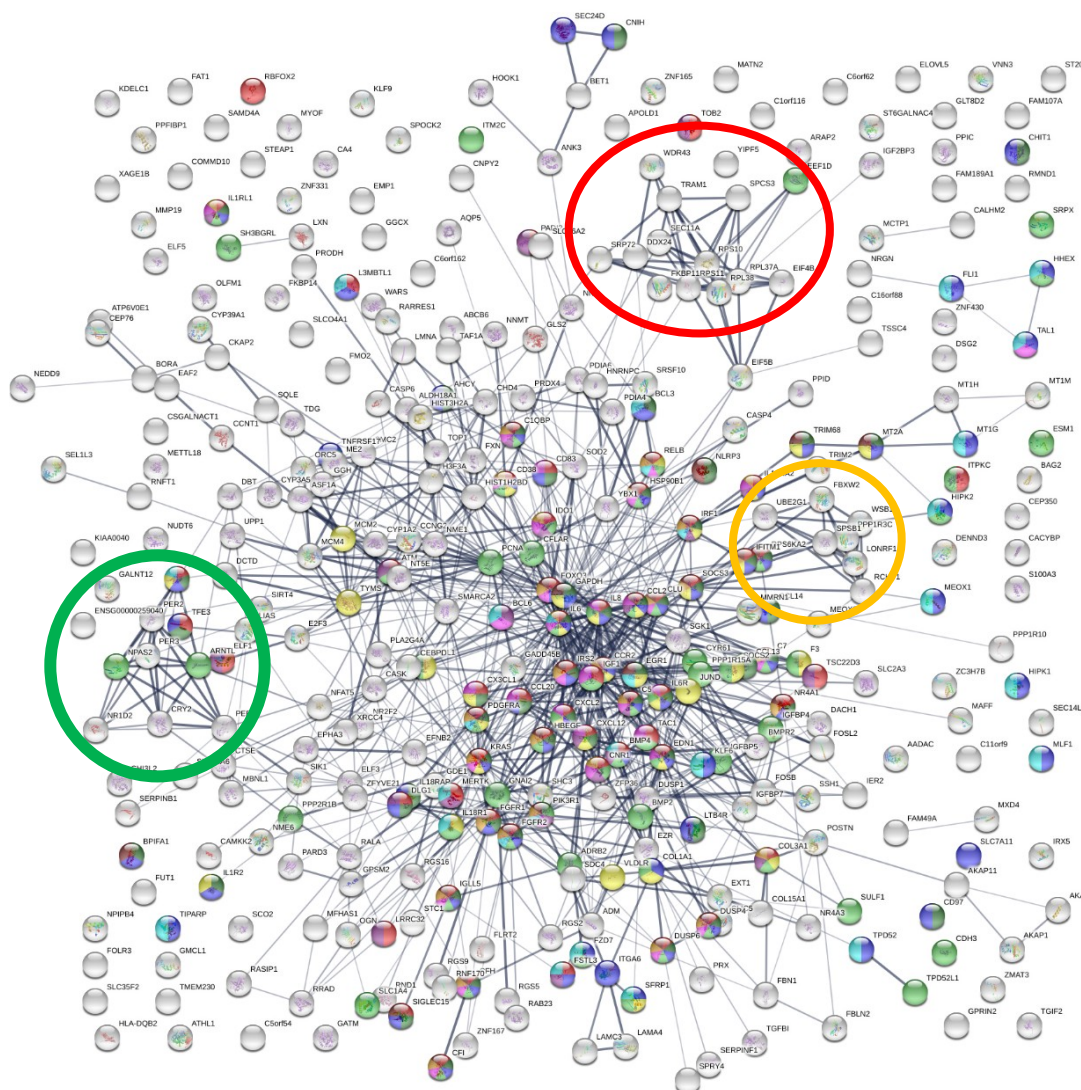
### 5.3.1 Analize z drugimi bioinformatičnimi orodji

#### *Bioinformatično orodje STRING*

Za vizualizacijo povezav med geni smo uporabili bioinformatično orodje STRING, s katerim smo analizirali vse statistično različno izražene gene drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino. Od 483 genov je bilo vključenih 354 genov, razliko predstavljajo geni, ki jih baza podatkov, prek katere deluje bioinformatično orodje STRING, ni prepoznala. Kljub temu da tudi bioinformatično orodje STRING ni prepoznalo velikega deleža povišano izraženih genov imunoglobulinov (42 prob, kot so *IGKV4-1*, *IGKC*, *IGKV1-17*, *IGHV3-23*), smo vseeno ugotovili velik vpliv statistično različno izraženih genov bolnikov s SSc na imunski sistem. Obarvani geni v mreži predstavljajo gene, vključene v različne definirane procese imunskega sistema KEGG, ki so: regulacija imunskega sistema ( $n = 58$ ), imunski odziv ( $n = 56$ ), proces imunskega sistema ( $n = 70$ ), citokinski odziv ( $n = 34$ ), pozitivna regulacija odziva na stimulus ( $n = 63$ ), negativna regulacija imunskega sistema ( $n = 23$ ), pozitivna regulacija imunskega sistema ( $n = 36$ ), regulacija imunskega odziva ( $n = 32$ ), prirojeni imunski odziv ( $n = 34$ ). Ugotovili smo še spremenjene signaliziranje P13K-Akt, signalno pot FOXO, povezavo z receptorjem EMC in proteinske domene PFAM. Dokazano spremenjeno izražanje

signalne poti FOXO1 nam daje nove terapevtske možnosti, saj imajo inhibitorji FOXO1 transkripcijskega faktorja pomembno vlogo v glukoneogenezi, glikogenolizi, signaliziranju inzulina in adipogenezi ter že predstavljajo velike možnosti za razvoj zdravil pri metabolnih boleznih (Pandey, et al., 2016). Obstajajo tudi študije o uporabi specifičnih inhibitorjev signalne poti P13K/Akt za uporabo pri zdravljenju rakavih obolenj (Falasca, 2010). Zanimivo je, da določenih skupin genov oziroma proteinov orodje String ne poveže v signalne poti, čeprav so očitne povezave med njimi. Na mreži lahko opazimo skupino proteinov, ki sodelujejo pri proteasomski degradaciji, vendar je v KEGG deponirana le sestava proteasoma, ne pa tudi proteasomska degradacija. Opazimo lahko tudi skupino, ki jo sestavljajo ribosomalni proteini in proteini, vpleteni v kardialni ritem. Mreža statistično značilno različno izraženih genov genskega profila drugih celic pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino je na Sliki 17.

**Slika 17: Povezave med proteini statistično značilno različno izraženih genov genskega profila drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc**



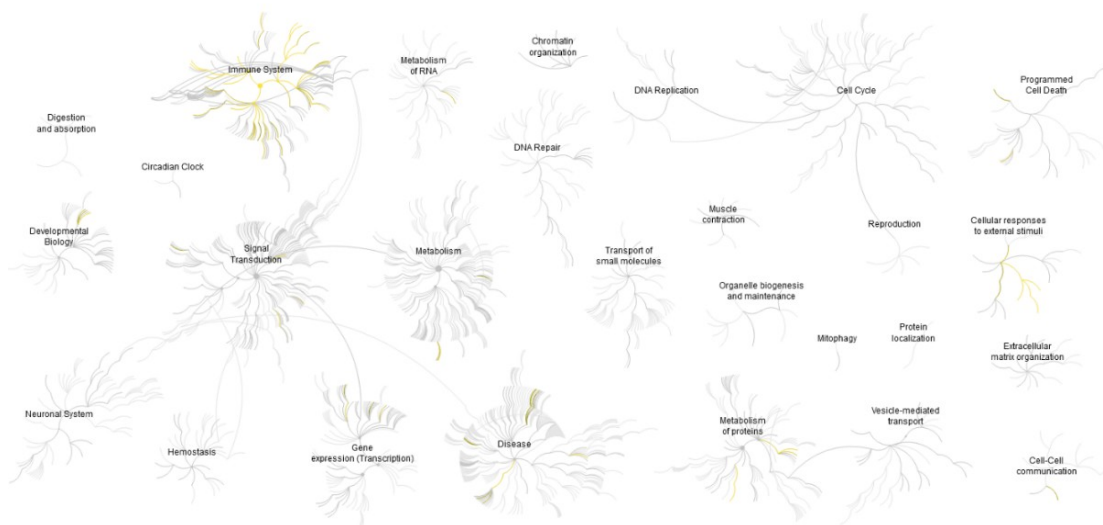
**Legenda:** Obarvani geni v mreži predstavljajo gene, vključene v različne definirane procese imunskega sistema KEGG, rdeče obkroženi predstavljajo skupino ribosomskih proteinov, zeleno obkroženi so geni proteinov kardialnega ritma in rumeno obkroženi geni so skupina genov proteinov proteosomske degradacije.

Vir: STRING (2019)

Analizo smo nadaljevali z bioinformatičnim orodjem Reactome. Reactome je zbirka podatkov signalnih poti in reakcij v človeškem organizmu. Analizirali smo podatke spremenjenega genskega izražanja fibroblastov in drugih celic pljučnega tkiva, da bi lahko ugotovili razlike v funkciji celic obeh vzorcev, da bi sklepali na vključenost drugih celic pljučnega tkiva v patogenezo SSc.



### Slika 19: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme znižano izraženih genov v fibroblastih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino

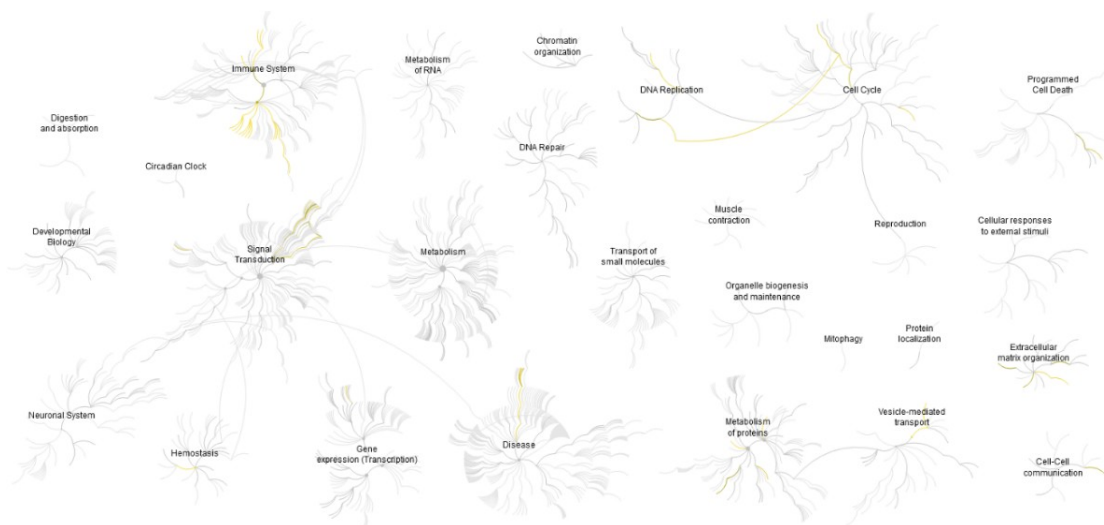


**Legenda:** Podatkovna baza Reactome: rumeno obarvane črte pomenijo signalne poti, v katere so vključeni predloženi geni, sivo obarvane črte pomenijo nezastopane poti.

#### Analiza drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSc:

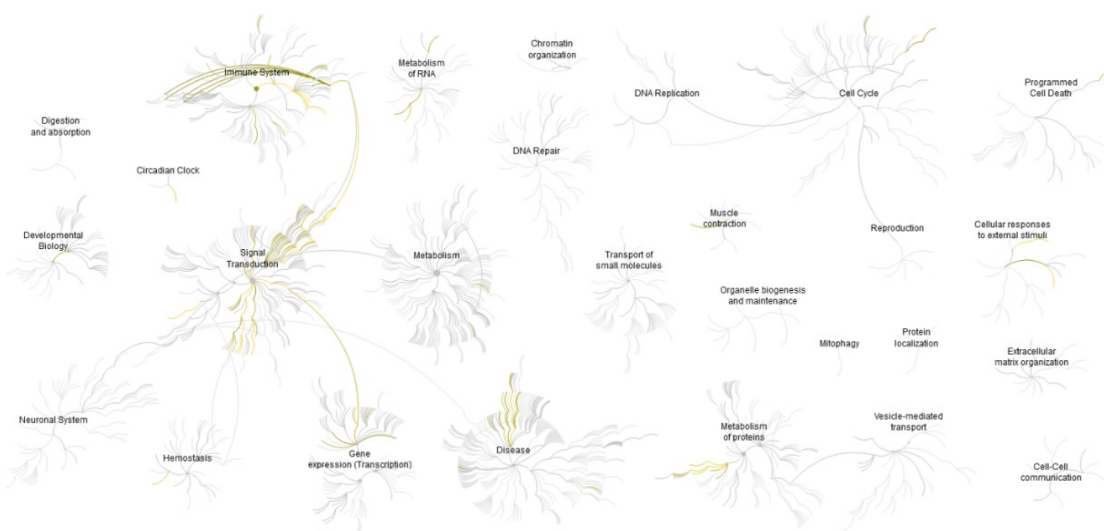
Enako analizo smo naredili tudi z različno izraženimi geni, ki smo jih dokazali le v drugih celicah pljučnega tkiva in ne v fibroblastih. V podatkovni bazi Reactome je bilo najdenih 148 od 238 predloženih povišano izraženih genov. Večina genov, ki jih Reactome ne vsebuje, so bili imunoglobulini, kljub temu pa smo ugotovili, da je večina upoštevanih statistično značilno povišano izraženih genov vključenih v procese imunskega odziva, nekaj pa tudi v replikacijo DNA, celični cikel, organizacijo izvenceličnega matriksa, metabolizem proteinov in v transport z vezikli (Slika 20). Od statistično značilno znižano izraženih genov drugih celic pljučnega tkiva je bilo v podatkovni bazi Reactome najdenih 135 od 224 predloženih genov, ki so bili vključeni v 728 signalnih poti. Ugotovili smo, da je največ znižano izraženih genov del celične signalizacije, transkripcije, metabolizma proteinov in imunskega sistema (Slika 21). Seznam najpomembnejših signalnih poti, v katere so bili glede na bazo podatkov Reactome vključeni ti spremenjeno izraženi geni drugih celic pljučnega tkiva in ne fibroblastov, je v prilogah 12 in 13.

**Slika 20: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme povišano izraženih genov drugih celic pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino**



**Legenda:** Podatkovna baza Reactome: rumeno obarvane črte pomenijo poti, v katere so vključeni predloženi geni, sivo obarvane črte pomenijo nezastopane poti.

**Slika 21: Prikaz vpletenosti v celične mehanizme znižano izraženih genov drugih celic pljučnega tkiva bolnikov s SSC**



**Legenda:** Podatkovna baza Reactome: rumeno obarvane črte pomenijo poti, v katere so vključeni predloženi geni, sivo obarvane črte pomenijo nezastopane poti.

## 6 Interpretacija in razprava

Pljučna fibroza je bolezenski proces, ki je slabo pojasnjen s patofiziološkega vidika. Kljub temu da so miofibroblasti v pljučnem tkivu glavni proizvajalci izvenceličnega matriksa, je vzrok za fibrozo lahko v samih fibroblastih zaradi genetskih sprememb ali v stimulusih, ki prihajajo od drugih celic v tkivu. Z našo raziskavo smo s primerjavo podatkov o genski ekspresiji dveh baz podatkov (fibroblastov pljuč in celotnega pljučnega tkiva) hoteli ugotoviti vpliv drugih celic pljučnega tkiva na bolezenski proces pljučne fibroze bolnikov s sistemsko sklerozo.

### 6.1 Analize genskega izražanja fibroblastov - GSE40839

V analizi genskega izražanja fibroblastov, izoliranih iz pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD, v primerjavi s kontrolno skupino smo ugotovili, da so med 31 več kot štirikrat povišano izraženimi geni v fibroblastih trije iz signalne poti TGF- $\beta$  (*ID1*, *ID3*, *INHBA*), ki je glavna profibrotična pot. Med tremi najbolj povišano izraženimi geni sta transkripcijska faktorja inhibitorja DNA vezavnega proteina (*ID1* in *ID3*), za katera je znano, da sta povišano izražena v fibroblastih in pljučnem tkivu bolnikov s SSc-ILD (Hsu, et al., 2011). Med več kot štirikrat povišanim genskim izražanjem je edini gen za citokin interleukin-11 (*IL-11*), za katerega je prav tako potrjeno, da sodeluje pri razvoju fibroze. Prek IL-11 namreč poteka od ERK odvisna avtokrina zanka sinteze fibrinogenih proteinov, ki je povezana s fibrotično signalizacijo in je potrebna za profibrotično aktivnost TGF $\beta$ 1, PDGF, endotelina 1, angiotenzina in mnogih drugih profibrotičnih faktorjev (Schafer, et al., 2017).

Z analizo smo našli 104 štirikrat ali še več znižano izraženih genov v fibroblastih bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino. Velik delež ekstremno znižano izraženih genov so citokinski geni in geni molekul, povezanih z njimi. Citokini imajo pomembno vlogo pri aktivaciji imunskega sistema, in sicer prek transkripcijskih faktorjev STAT. Spremembe v sintezi in delovanju citokinov so pomembne pri nastanku avtoimunskih obolenj (O'Shea, et al., 2002). Dokazali smo, da so v fibroblastih bolnikov štiri- ali večkrat znižani kemokin C-X-C motiv 10 (*CXCL10* ali *IP-10*), *CXCL11* (ali *I-TAC* interferon inducible T cell chemoattractant), *CCL2* (*MCPI*), *CCL11*, *CXCL1*, *CCL7*, *CCL8* in s citokini kemokini povezane molekule

*IL15RA*, *IL6ST*, *NMI*. Zanimivo je, da je v fibroblastih petkratno povečano izražen *SERPINE1* (*PAI-1*), ki je v pljučnem tkivu sedem- oziroma petkratno znižano izražen. Za *CCL2* in *CXCL1* smo dokazali znižano izražanje tako v pljučnem tkivu kot v fibroblastih bolnikov. Med znižano izraženimi geni v fibroblastih bolnikov opazimo pet prob za *STAT1* in deset interferon odvisnih proteinov (*IFI- IFIT3*, *IFI44L*, *IFIT2*, *IFITM1*, *IFI44*, *IFITM2*, *IFIH1*, *IFI35*, *IFI6*, *IFI16*) ter *IRF7*. *STAT1* je transkripcijski faktor in spada v družino proteinov *STAT*. Vse molekule *STAT* so fosforilirane z receptorsko povezanimi kinazami, kar povzroči aktivacijo in prenos molekule v jedro, kjer delujejo kot transkripcijski faktorji. Aktivacija *STAT1* poteka prek različnih ligandov, kot so *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , epidermalni rastni faktor (*EGF*), trombocitni rastni faktor (*PDGF*) in *IL-6* (Baris, et al., 2016). Interferoni tipa I (*IFN*) so družina citokinov, ki ublažijo škodljive učinke virusnih in bakterijskih okužb, in so del prirojenega imunskega sistema. V zadnjih nekaj letih so se raziskovalna prizadevanja osredotočila na vlogo *IFN* in od *IFN* odvisnih genov tipa I v patogenezi *SSc*. Polimorfizmi interferon regulatornega faktorja (*IRF*)-5, *IRF7* in *IRF8* so povezani s *SSc*. Podobno je bil kot genski faktor tveganja *SSc* ugotovljen polimorfizem signalnega transduktorja in aktivatorja transkripcije (*STAT*)-4. *IRF*-ji in proteini *STAT4* so ključni aktivatorji signalnih poti *IFN* tipa 1. V vzorcih periferne krvi in kožne biopsije bolnikov s *SSc* so opazili podpis *IFN*-ja (povečano izražanje in aktiviranje genov, ki jih uravnavajo *IFN*). Poleg tega se je pokazalo, da plazemski od *IFN* odvisni kemokin korelira z markerji stopnje resnosti bolezni in podtipov avtoprotiteles pri *SSc*. *IFN- $\gamma$* , pluripotentni citokin, ki ga tvorijo aktivirani limfociti T in celice naravne ubijalke, pomaga uravnavati številne biološke procese in ima pomembno vlogo v imunskem odzivu. Uravnava diferenciacijo in proliferacijo celic imunskega sistema in produkcijo citokinov. Študije kažejo, da ima motena regulacija *IFN* tipa 1 in od *IFN* odvisnih genov pomembno vlogo v patofiziologiji avtoimunskih obolenj, tudi v *SSc* (Wu & Assassi, 2013). Z našimi analizami fibroblastov smo dokazali, da je v *SSc* zapleten odziv *IFN*, saj najdemo podpis *IFN* – to je spremenjeno izražanje genov, na katere vpliva *IFN*, vendar izražanje genov *IFN* ni povečano. Potrdili smo rezultate originalne raziskave Lindahla in sodelavcev, kjer je bilo v nasprotju z drugimi študijami (Assassi, et al., 2010; Brkic, et al., 2016) ugotovljeno znižano izražanje podpisa *IFN* v fibroblastih, izoliranih iz pljučnega



tkiva bolnikov s SSc. (Lindahl, et al., 2013) Keane in drugi so dokazali znižano izražanje *CXCL10* v fibroblastih bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo (IPF) (Keane, et al., 1997). Novejša raziskava fibroblastov IPF pa je pokazala, da je vzrok znižanega izražanja *CXCL10* lahko epigenetska deregulacija histonske deacetilacije in hipermetilacije (Coward, et al., 2010). Znano je, da so mišji modeli s ciljno izničeni (angl. knock-out) *IP10* in *STAT1* bolj podvrženi pljučni fibrozi. Na osnovi teh študij znižano izražanje *IFN* stimuliranih genov v fibroblastih bolnikov s SSc lahko omogoča boljše napredovanje pljučne fibroze s povečano proliferacijo fibroblastov, migracijo in odpornost na apoptozo. Zanimivo je tudi, da terapije na osnovi mehanizma *IFN* pri bolnikih z IPF niso pokazale pozitivnih učinkov (Lindahl, et al., 2013).

Glavne signalne poti (Biocarta Pathways), pri katerih smo v fibroblastih dokazali razliko v genskem izražanju med bolniki in kontrolno skupino v genih, so predvsem citokinska signalna pot, celične proliferacije in antigenske predstavitve. Razlike v genskem izražanju v signalnih poteh TLR, EGF, NFkB, komplementa, *IFN* beta, kaspazne kaskade pa smo dokazali tako v fibroblastih kot tudi v pljučnem tkivu bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Glede na to, da so geni za apoptozo (*Casp1*, 6, 4, 8, *Bax*, *Bid*, *Fas*) znižani, medtem ko so povišani geni za celični cikel (*CDK1*, *CDK2*, 7) in geni za replikacijo DNA (*MCM3*, 6, 5, 2, 4), gre sklepati, da fibroblasti bolnikov s SSc ne gredo v procese apoptoze, ampak v procese delitve celice.

Pri analizah genskih skupin, povezanih s transkripcijskimi faktorji, smo ugotovili možno vpletenost v gensko izražanje pri družini NFkB (*REL\_T00168*, *RELA\_T00594*, *NFKB1\_T00591*) in genskih skupinah *STAT1\_T01492*, *JUN\_T00029* ter *STAT6\_T01580*, kjer so bili tarčni geni znižano izraženi pri bolnikih, in *TALI\_T00790*, kjer so bili tarčni geni povišano izraženi v vzorcih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Vsi transkripcijski faktorji, katerih geni se manj izražajo, torej so manj aktivirani pri bolnikih kot kontrolah, sodijo med tiste, ki se aktivirajo v odzivu na stimuluse, kot so citokini, rastni dejavniki in stresorji iz okolja. Hkrati pa smo za nekatere od teh transkripcijskih faktorjev dokazali spremenjeno izražanje (*Jun*, *Fos* v pljučnem tkivu, *STAT1* v fibroblastih), kar je še posebej pomembno, saj lahko že majhne spremembe v izražanju transkripcijskih faktorjev

povzročijo ogromne spremembe v izražanju izhodnih proteinov (transkripcijskih faktorjev je relativno malo, a povzročijo prepis ogromnega števila molekul nekega citokina). Zato je njihovo gensko izražanje običajno trdno regulirano, medtem ko je aktivacija lahko hipna in zelo dinamična (Boss, et al., 2016).

Pri analizi genskega izražanja različnih genskih skupin miRNA smo ugotovili možno vpletenost hsa-miR-24-3p, hsa-miR-383-5p, hsa-miR-150-5p in hsa-miR-217, pri katerih so tarčni geni povišano izraženi, ter hsa-miR-21-5p, hsa-miR-92a-3p in hsa-miR-19a-3p, pri katerih so tarčni geni znižano izraženi. Iz literature je znano znižano izražanje miRNA-150 v *in vivo* in *in vitro* fibroblastih SSc. Transfekcija z inhibitorjem miR-150 je povzročila povečano izražanje integrina  $\beta$ , fosforiliranega SMAD3 in kolagena tipa 1, medtem ko je prekomerno gensko izražanje te miRNA povzročilo nasproten učinek v fibroblastih SSc (Honda, et al., 2013). Znan je tudi profibrotični učinek hse-miR-217 v ledvicah (Kato, et al., 2009) n profibrotični učinek hse-miR-21 v pljučih, srcu in ledvicah. (Liu, et al., 2010; Thum, et al., 2008) in da miRNA hse-miR-19 in hse-miR-18 regulirata faktor rasti vezivnega tkiva (*CTGF*) in *TSP-1* gensko izražanje pri starostnem srčnem popuščanju (van Almen, et al., 2011).

Z analizo študije fibroblastov, izoliranih iz pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD, v primerjavi s kontrolno skupino smo dokazali moteno regulacijo številnih genov, vpletenih v procese fibroze, in možne vplive različnih miRNA in transkripcijskih faktorjev na gensko izražanje in posledično biološke procese v celicah bolnikov s SSc-ILD. Ugotovili smo, da so fibroblasti za razliko od drugih celic pljučnega tkiva pri bolnikih s SSc-ILD mnogo bolj vpleteni v mehanizme celične proliferacije. Zanimiv je citokinski profil naše analize, ki kaže v nasprotju z drugimi študijami znižano izražanje ključnih od *IFN* odvisnih proteinov, *IL-6* in transkripcijskih faktorjev družine *STAT*.

## 6.2 Analize genskega izražanja celotnega pljučnega tkiva GSE76808

Z našo analizo genskega izražanja pljučnega tkiva bolnikov s SSc v primerjavi s kontrolno skupino smo ugotovili, da je med 52 geni, ki so več kot štirikratno povišani v pljučnem tkivu, 32 takih, ki pripadajo imunoglobulinski družini. Zato lahko trdimo, da izhajajo iz celic B. Z analizo pljučnega tkiva bolnikov smo ugotovili povišano izražanje imunoglobulinskih genov (*IGH*, *IGK* in *IGL*). Imunoglobulini so

na genomu zapisani na relativno majhnem številu genov, zato se je skozi evolucijo razvilo več genskih mehanizmov, ki omogočajo sintezo velikega števila različnih protiteles.

Znano je, da je človeško telo sposobno sintetizirati okoli deset milijard različnih protiteles. Eden od genskih mehanizmov, ki omogoča raznolikost protiteles, so tako imenovane genske rekombinacije V-D-J. Somatska hipermutacija (SHM), ki poteka v zrelih celicah B, je drugi mehanizem, ki omogoča raznolikost protiteles. Ko celica B prepozna antigen, se aktivira in začne hitro deliti. Pri delitvah prihaja na delih DNA, ki nosijo genski zapis za lahke in težke verige protiteles, do velikega števila somatskih mutacij. Posledica so spremembe aminokislinskih ostankov na polipeptidnih verigah, kar vpliva na vezavno moč protitelesa z antigenom (Alberts, et al., 2002). Čeprav vloga avtoprotiteles pri nastanku SScni popolnoma jasna, se rutinsko določajo kot diagnostični markerji in deloma napovedujejo prognozo bolezni. Najnovejše študije kažejo veliko zanimanje za raziskovanje vpliva imunskih celic pri SSc. Ugotovili so številne nepravilnosti celic imunskega odziva, vključno s celicami B, celicami T in makrofagi, pri bolnikih s SSc. Celice B imajo ključno vlogo pri SSc, in sicer prek produkcije citokinov, limfoidne organogeneze in vpliva na druge aktivacije imunskih celic in nastanka protiteles. Dokazali so povišano izražanje CD19, ki je ključni regulator aktivacije v celicah B pri bolnikih s SSc. To povzroči stalno hiperaktivnost spominskih celic B in tvorbo specifičnih protiteles, kar povzroči fibrozo v več organih (Yoshizaki, 2018). Ugotovljeno je bilo tudi večje število celic B z manj CD21 pri bolniki s SSc-ILD (Vowell, et al., 2018). Znano je tudi, da je v krvi bolnikov s SSc večji delež neaktivnih celic B in manjši delež spominskih celic B. Dejstvo je, da so v zadnjem času različne študije dokazale pomembno vpletenost celic B v patogenezo SSc (Kraaij & van Laar, 2008). Kljub temu, da je bilo opravljenih nekaj študij z biološkim zdravilom proti celicam B (anti-CD20 rituximab) in da so dokazovali, da izboljša pljučno funkcijo, se zdravilo ne uporablja pogosto (Daoussis, et al., 2010).

Zanimivo je, da Biocharta Pathway in druge uporabljene bioinformatične podatkovne baze (String, KEGG) večino imunoglobulinskih genov ne uvrščajo v nobeno signalno pot, zato jih pri analizi obogatene poti nismo našli med spremenjenimi signalnimi potmi. Z gotovostjo pa trdimo, kar smo dokazali z visoko povišanim

genskim izražanjem v celicah pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino, da imajo pomembno vlogo pri patogenezi bolezni. Prav gotovo je to ena izmed pomembnih ugotovitev naše raziskave.

Po pričakovanju smo med več kot štirikratno povišano izraženimi geni v pljučih našli tudi več proteinov izvenceličnega matriksa: kolagene (*coll1a1*, *col3a1*, *coll5a1* in *periostin* (*POSTN*)) in dve celični adhezijski molekuli (dve probi za *VCAN*) in kadherin 3 (*CDH3*). Glavni profibrotični faktor *TGF-β* je bil dvakratno povišano izražen. Med 52 znižanimi geni v pljučnem tkivu najdemo kar deset citokinov, kemokinov in njihovih receptorjev (*IL1RL1*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL20* (*MIP3a*), *CCL2* (*MCPI*), *CXCL3* (*GROgamma*), *IL1R2*, *CXCL1* (*GROalfa*, *LIF*)), močno je znižan fibrinolitični *SERPINE1* (*PAI-1*). Dokazali so, da je pomanjkanje PAI-1 povezano z od starosti odvisno spontano srčno fibrozo, za katero so značilni vnetja, povišana raven *TGF-β*, konstitutivno aktivirani Smad in Erk1/MAPK, povečana proliferacija fibroblastom podobnih celic in prekomerno kopičenje kolagena v perikardialnih, perivaskularnih in intersticijskih območjih (Ghosh, et al., 2012).

Dokazali smo znižano izražanje Th2 kemokina (*CCL2,4,20*) znano je, da neravnovesje med Th1/Th2/Th17 podtipov CD4<sup>+</sup> celic povzroči vnetje v zgodnjih fazah bolezni (predvsem Th1 in Th17) in fibrozo v poznih fazah skleroderme (pretežno Th2) (Kurzinski & Torok, 2011). Med znižano izraženimi geni velja omeniti še aktivatorje in inhibitorje vnetne poti NF-κB (*NFKBIA*, *TNFAIP3*) in sistema zadolženega za metabolizem ksenobiotikov (citokrom *CYP3A5* in *FMO2*).

Z analizami signalnih poti (Biocatha Pathways) v pljučnem tkivu bolnikov smo pri 34 genskih skupinah dokazali statistično značilno razliko izražanja med bolniki in kontrolno skupino samo v celicah pljučnega tkiva in ne v fibroblastih in so bile uporabljene kot dodatno filtriranje v drugem sklopu analiziranja podatkov (Priloga 9). 26 genskih skupin signalnih poti je skupnih s fibroblasti. Ugotovili smo, da so pomembnejše signalne poti v katere so vključene celice pljučnega tkiva bolnikov s SSc del apoptotične poti, signalne poti proliferacije, signalne poti celičnega cikla, signalne poti, ki vključujejo citokine, rastne dejavnike, odziv na zunajcelične signale, DNA poškodbe in celični cikel, celično specifične poti in poti, ki vključujejo delovanje proteaz.

Z analizami genskih skupin transkripcijskih faktorjev smo dokazali možen vpliv na genetsko izražanje pri naslednjih skupinah genov, povezanih s transkripcijskimi faktorji, kjer so glede na tarčne gene znižano aktivirani: *SMAD3\_T04096*, *STAT3\_T05694*, *RARA\_T00719*, *RARG\_T00720*, *PPARD\_T02745* in *PPARG\_T02736*. V genskih skupinah transkripcijskih faktorjev, dokazanih v pljučnem tkivu, z zvišano izraženimi tarčnimi geni pa sta: *SMAD1\_T03885* in *c-Myc\_T00140*. Zanimivo je, da sta trenutno terapevtsko ciljana kar dva od transkripcijskih faktorjev v SSc, družini PPAR in RAR. Transkripcijski faktorji družine PPAR so močno vpleteni v patogenezo SSc. Znano je, da modulirajo procese fibroze. Trenutno poteka klinična študija z agonistom PPAR (Ruzehaji, et al., 2016). Ugotovili so, da je fenofibrat, ki je aktivator PPAR $\alpha$ , preprečil pljučno fibrozo, medtem ko je GW0742, ki je agonist PPAR $\delta$ , zmanjšal z bleomicinom povzročeno vnetje. Znano je, da agonisti PPAR $\gamma$ , vključno z rosiglitazonom in pioglitazonom, zmanjšajo fibrozo kože in pljuč. Zanimanje za tarčno zdravljenje fibroze prek PPAR-jev temelji na njihovi sposobnosti moduliranja izražanja genov in zaviranja vnetja. Glede na protifibrotične in protivnetne učinke PPAR-jev se pričakuje, da bo uporaba agonistov za vse tri PPAR-je povzročila izboljšanje učinkovitosti v primerjavi s ciljno usmerjenostjo na eno izoformo PPAR. (Ruzehaji, et al., 2016)

Receptor retinojske kisline (RAR) spada med nuklearne transkripcijske faktorje. Iz literature je znano, da retinojska kislina prek aktivacije AMPK zavre glikolizo in senzibilizira celice za apoptozo, povzročeno z inhibitorji tirozin kinaz, vrsto zdravil, ki se uporablja tudi za zdravljenje bolnikov s SSc. Zdravljenje z retinojsko kislino je bilo nedavno predlagano za kožne manifestacije SSc (Thomas, et al., 2017). V različnih študijah poročajo, da zdravljenje z retinojsko kislino vpliva na procese, ki so vpleteni v nastanek in napredovanje fibroze, vendar so terapevtski učinki zelo različni. Nekaj študij dokazuje, da retinojska kislina zavre napredovanje fibroze in zmanjša kopičenje zunajceličnega matriksa, medtem ko druge študije kažejo nasprotno. Razlogi za to bi bili lahko v celičnem tipu, metabolizmu retinoidov in v razlikah v signalnih poteh (Zhou, et al., 2013).

Pri analizah genskih skupin miRNA smo ugotovili pri hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-101-3p in hsa-miR-378a-3p znižano izražanje tarčnih genov, pri hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-132-3p,

hsa-miR-31-5p in hsa-miR-126-3p pa povišano izražanje tarčnih genov. miR-101 zmanjša pljučno fibrozo z zaviranjem proliferacije fibroblastov in diferenciacijo prek poti WNT5a / NFATc2 in TGF- $\beta$  / Smad2 / 3 (Huang, et al., 2017) miR-181a sodeluje v več genskih regulatornih procesih, kot so razvoj, diferenciacija, hematopoeza in imunska modulacija. Dokazali so, da je prekomerno izražanje miR-181a zvišal raven fibronektina in kolagena I (Chen, et al., 2018). Znan je tudi vpliv miR-183 in surfaktantnega proteina A (*SP-A2*) v procesu fibroze, TGF- $\beta$ 1 zavira izražanje miR-183 in spodbuja gensko izražanje *SP-A2* (Li, et al., 2018). Dokazali so tudi vpliv miR-886-3p na regulacijo izražanja *IL-8* v pljučnih celicah bolnikov s cistično fibrozo (Tsuchiya, et al., 2013). Potrjen je tudi protifibrotični vpliv miR-133 in miR-30 na CTGF in TGF- $\beta$ , ki sta pomembni molekuli v procesu fibroze (Vettori, et al., 2012). Manjšo regulacijo miR-26a so opazili pri bolnikih z IPF in pri miših s PLM inducirano pljučno fibrozo (Liang, et al., 2014). Poročali so tudi, da pomanjkanje miR-378a prispeva k srčni fibrozi prek od TGF- $\beta$ 1 odvisnega mehanizma (Yu, et al., 2016). miR-RNA-29 je ključni regulator izražanja kolagena v sistemski sklerozi (Maurer, et al., 2010). TGF- $\beta$ , ki je pomemben transkripcijski stimulator mnogih genov zunajceličnega matriksa, je lahko pomemben dejavnik, ki znižuje miR-29 v fibrotičnih pogojih (Kriegel, et al., 2012). Znan je tudi protifibrotični učinek miR-132, dokazali so povečano angiogenezo in zmanjšano diferenciacijo miofibroblastov v srcu in jetrih. (Mann, et al., 2010; Katare, et al., 2011) miR-31 je negativni regulator fibrogeneze in pljučne fibroze (Yang, et al., 2012). Znižano izražen miR-126 so dokazali v pljučih bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo (IPF) (Rajasekaran, et al., 2015).

Z analizo študije pljučnega tkiva SSc-ILD/K smo dokazali deregulacijo številnih genov izvenceličnega matriksa, citokinov, kemokinov, poti TGF- $\beta$ , možnega vpliva miRNA in transkripcijskih faktorjev na mehanizme patogeneze sistemske skleroze.

### 6.3 Analize drugih celic pljučnega tkiva

V tretjem delu naše raziskave smo ugotavljali vpliv genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva na različne procese v zapletenem mehanizmu patogeneze sistemske skleroze. Pljuča so zgrajena iz bronhialnega vejevja, žilja in veziva. Alveolarna stena je zgrajena iz kapilarnega endotelija, bazalne membrane in intersticijskega tkiva,

alveolarnega epitelija, alveolarnih makrofagov in plasti surfaktanta (Kobzik & Schoen, 1994).

V BRB-ArrayTools smo z dodatnim filtriranjem genskih skupin signalnih poti s statistično značilnim različnim genskim izražanjem le v pljučnem tkivu ustvarili »funkcionalni« profil genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva, vendar smo ugotovili, da nekateri statistično značilno različno izraženi geni niso vključeni v nobeno signalno pot (Biocarta Pathway), zato niso bili upoštevani v nadaljnjih analizah v programu BRB-ArrayTools. Pri analizi povišano izraženih genov v pljučnem tkivu bolnikov v primerjavi z zdravimi kontrolami smo ugotovili, da je med prvimi 30 geni z najbolj povišanim izražanjem med bolniki in kontrolno skupino 22 genov za imunoglobuline, ki jih podatkovna baza Biocarta Pathway ni prepoznala. Kljub temu smo statistično značilno različno izražene gene »funkcionalnega« profila izražanja drugih celic pljučnega tkiva analizirali tudi z bioinformatičnim orodjem String, s katerim smo vizualizirali gene v genske mreže in določili proteinske interakcije med njimi (Slika 12, 13). Ugotovili smo, da osrednje mesto zavzemajo citokini in njihove negativno usmerjene signalne molekule (*IL-6*, *IL-1*, *CCL2*, *Jun*, *FOS*, *NFkBIA*), negativna regulacija signaliziranja *MAPK* in geni za apoptozo (Slika 13). Med statistično značilno povišano izraženimi geni drugih celic pljučnega tkiva je precej povezanih na *IGF*, pomembni so še pot komplementa, apoptoza in geni, povezani s celičnim ciklom (Slika 12). Tako citokini kot *IGF* se izločajo iz celic in vplivajo na druge celice v tkivu, zato imajo močan vpliv na fibroblaste. Zanimivo je, da je *IL-6* drugi najbolj znižano izražen gen v pljučih bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino, vendar trenutno poteka klinična študija, v kateri ugotavljajo pozitivne učinke anti-*IL-6* (tocilizumaba) na kožne in pljučne manifestacije v SSc. (Sakkas, 2016). *IL-6* je protein, ki ga uvrščamo v skupino citokinov. Proizvajajo ga različne celice v stanju celičnega stresa, kot so vnetje, okužbe, rakava obolenja. Takrat se raven *IL-6* lahko poveča tudi do 1000-krat in pomaga uskladiti odziv na moteno regulacijo tkivne homeostaze. *IL-6* deluje prek membranskega receptorja *IL-6* (*mIL-6R*), ki skupaj z drugim receptorjem, glikoproteinom 130 (*gp130*), aktivira znotrajcelično signalizacijo (klasična signalizacija). Glede na to, da je *IL-6R* izražen na samo nekaterih celičnih tipih (hepatociti, levkociti), čeprav vse celice izražajo *gp130*, je neposredna stimulacija z

IL-6 omejena le na celice, ki izražajo mIL-6R. Poznamo pa tudi transsignalizacijo IL-6, ki poteka prek nevezanega, topnega IL-6R, ki po vezavi z IL-6 stimulira vse celice, ki izražajo gp-130. Medtem ko naj bi bilo klasično signaliziranje IL-6 regenerativno in pomembno za protivnetne učinke citokina, je transsignaliziranje provnetno. Transsignalizacijo IL-6 lahko blokiramo brez vpliva na klasično signalizacijo. IL-6 ima pomembne učinke tako na prirojeni in pridobljeni imunski sistem in vnetni proces. Spodbuja razvoj Th17 celice T in zorenje celic B. IL-6 je vpleten v patogenezo fibrotičnih bolezni, prek transsignalizacije IL-6 stimulira proliferacijo fibroblastov in sproščanje prokolagena in fibronektina (Choy & Rose-John, 2017). Pri bolnikih z zgodnjo difuzno kožno obliko SSc (dcSSc), zlasti tistih s pljučno fibrozo, zaznamo povišane vrednosti serumskega IL-6. Raven serumskega IL-6 je močno povezana z obsegom fibroze kože in napoveduje zgodnjo funkcionalno prizadetost pljuč ter smrtnost pri SSc, povezani z intersticijsko pljučno boleznijo. Znano je še, da je gensko izražanje IL-6 povečano pri s fitohemaglutinin stimuliranih mononuklearnih celicah periferne krvi in v celicah T pri bolnikih s SSc (Sakkas, 2016). V študiji Pedroza in drugih pa so na celični kulturi mišjih dermalnih fibroblastov pokazali znižano izražanje IL-6 pri stimulaciji s TGF- $\beta$  in povišano z IL-6 transsignalizacijo prek *STAT3*. Ugotovili so, da *STAT3* ne samo modulira IL-6 stimulirano izražanje fibrotičnih genov, ampak tudi regulira TGF- $\beta$  stimulirano izražanje fibrotičnih genov v dermalnih fibroblastih (Pedroza, et al., 2016).

Podobno kot IL-6 tudi IGF1 izločajo mnoge celice, vendar so makrofagi eni najboljših virov. Pri tem so makrofagi v pljučih dvojnega izvora: rezidentni oziroma stalni alveolarni makrofagi in makrofagi, ki so diferencirani iz monocitov. Pred kratkim so dokazali, da k razvoju fibroze prispevajo le diferencirani (Misharin, et al., 2017). Iz literature je znano, da je IGF vpleten v celično proliferacijo in da stimulira diferenciacijo fibroblastov v miofibroblaste ter vpliva na  $\alpha$ SMA v pljučnih fibroblastih miši (Hung, et al., 2013). Študije kažejo, da blokada poti IGF poveča fibroblastno apoptozo in poznejšo resolucijo pljučne fibroze (Choi, et al., 2009). Dokazali so korelacijo med IGF-1 in celicami CD68+, kar kaže na to, da so makrofagi potencialni vir proteina IGF v pljučih. Znana je tudi korelacija IGF s povišanimi vrednostmi col1, col3 in proliferacijo celičnega nuklearnega antigena imunoreaktivnosti, kar kaže, da ima IGF-1 pomembno vlogo pri odlaganju



beljakovin zunajceličnega matriksa in celične proliferacije v pljučih (Krein, et al., 2003).

IGF vezajoči proteini (angl. IGF binding proteins) inhibirajo učinke IGF1 in IGFBP. V naši raziskavi smo ugotovili povišano izražanje *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5* le v pljučnem tkivu bolnikov s SSc, v fibroblastih bolnikov povišanega izražanja nismo zaznali. IGFBP2 je tudi marker končno diferenciranih alveolarnih (AT1) pnevmocitov. Pljučne alveole namreč sestavljata dva tipa epiteljskih celic: tip 1, ki prekriva večino površine pljučne alveole in je odgovoren za izmenjavo plinov, in tip 2, ki izloča surfaktant. IGFBP2 v veliki meri izločajo terminalno diferencirani AT1 (Wang, et al., 2018). *IGFBP1* in *IGFBP2* sta povišana tudi pri pljučni fibrozi (Guiot, et al., 2016).

Z analizami »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva v BRB-ArrayTools smo iz genskega izražanja ugotovili možne spremembe aktivacije transkripcijskih faktorjev *REL\_T00168*, *NFIC\_T00176*, *ESR1\_T00261*. Znano je, da TGF- $\beta$  potencialno regulira transkripcijo prek *NFIC* (Plasari, et al., 2009) in *ESR1* (Smith, et al., 2017).

Pri analizi genskih skupin miRNA v drugih celicah pljučnega tkiva smo dokazali statistično značilno različno izraženost pri hsa-miR-132, za katero je znan vpliv na celično proliferacijo, angiogenezo, oksidativni stres, ter znižano izražanje *TGF $\beta$ 1* (Liu, et al., 2018).

Nekaterih različno izraženih genov, predvsem imunoglobulinskih genov, pri katerih smo dokazali ekstremno povišano izražanje v celotnem pljučnem tkivu, Biocarta Pathway ne uvršča v nobeno signalno pot. Iz tega razloga smo naredili še en profil genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva, v katerega smo uvrstili vse statistično različno izražene gene pljučnega tkiva in izločili tiste, ki so bili skupni fibroblastom. Z dobljenim seznamom genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva smo za analize uporabili bioinformatični orodji String in Reactome. Z bioinformatičnim orodjem String smo ugotovili veliko vpletenost v procese imunskega sistema in signalni poti *FOXO1* ter *P13K/Akt*, ki sta potencialni novi terapevtski možnosti. Očitna je tudi vpletenost ribosomalnih proteinov, proteinov, ki sodelujejo pri proteasomski degradaciji, in proteinov, vpletenih v kardialni ritem, ki

pa jih podatkovna baza KEGG ne vključi v nobeno signalno pot (Slika 17). Z drugim bioinformatičnim orodjem Reactome pa smo dokazali, v kako zelo različne celične procese so vključeni geni drugih celic pljučnega tkiva in fibroblastov (slike 18, 19, 20 in 21). Z našo študijo smo ugotovili, da imajo v pljučnem tkivu bolnikov s SSc-ILD pomembno vlogo celice imunskega sistema. Z analizami povezav smo dokazali funkcijske razlike genskega profila izražanja genov drugih celic pljučnega tkiva in fibroblastov bolnikov s SSc-ILD v primerjavi s kontrolno skupino. Ugotovili smo, da so statistično značilno povišano izraženi geni drugih celic pljučnega tkiva v veliki meri vključeni v mehanizme imunskega sistema in celične signalizacije, povišano izraženi geni fibroblastov pa so vpleteni predvsem v celično proliferacijo.

V naši raziskavi smo ugotovili nekatere pomanjkljivosti posameznih uporabljenih orodij (odsotnost nekaterih signalnih poti, ki zato niso prepoznane kot spremenjene; neprepoznavanje nekaterih genov, v nobeni od podatkovnih baz ni bilo možno grafično prikazati hierarhije znižanih oziroma zvišanih genov hkrati: pot je pomembno inhibirana oziroma aktivirana, ugotovili pa smo, da lahko ob kombinaciji aktivacije nadrejenega in inhibiciji podrejenega gena dobimo okrepljen učinek (več substrata, več izvenceličnega proteina), kljub temu da je neto zvišanje oziroma znižanje ekspresije enako nič).

Kljub temu da podatkovne baze v nobenem od uporabljenih bioinformatičnih orodij imunoglobulinskih genov niso prepoznale in uvrstile v spremenjene poti, je ugotovitev ekstremno povišano izraženih imunoglobulinskih genov v genski analizi pljučnega tkiva SSc-ILD bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino in fibroblasti bolnikov ena pomembnejših ugotovitev naše analize. Poleg tega so močno povišane pot IGF, pot apoptoze, dva transkripcijska faktorja (NIFIC, ESR1) in miRNA-132, ki so že deloma raziskani za terapijo fibroze in povsem novi mehanizmi, povezani s cirkadialnim ritmom proteasomske degradacije, ribosomi in zvijanje proteinov, ki potencialno lahko vodijo v povsem nove terapevtske pristope pri zdravljenju teh bolnikov.

## 7 Sklep

Sistemska skleroza je kronična sistemska avtoimunska bolezen z zapleteno patogenezo. Pogost vzrok smrti pri bolnikih je intersticijska pljučna bolezen. V naši raziskavi smo z uporabo javno dostopnih podatkovnih baz in bioinformatičnih orodij analizirali gensko izražanje fibroblastov, izoliranih iz pljučnega tkiva bolnikov SSc-ILD in iz celic celotnega pljučnega tkiva bolnikov s SSc-ILD, in ga primerjali s kontrolno skupino. Iz dobljenega profila genskega izražanja različnih celičnih tipov pljučnega tkiva smo ugotovili vpletenost v različne celične mehanizme in možne epigenetske vplive v patogenezi sistemske skleroze.

1. Z analizo študije pljučnih fibroblastov SSc-ILD/K smo dokazali več kot štirikratno povišano izražanje genov *IDI*, *ID3*, *IL-11* in dvakratno povišano izražanje *TGF-β*, ki imajo pomembno vlogo v procesu fibroze. Citokinski profil naše analize je pokazal znižano izražanje ključnih od IFN odvisnih proteinov, IL-6 in transkripcijskih faktorjev družine *STAT*. Pri analizah genskih skupin, povezanih s transkripcijskimi faktorji, smo ugotovili možno vpletenost v gensko izražanje pri *STAT1*, *JUN*, *STAT6*, družini *NFκB*, kjer so bili tarčni geni znižano izraženi pri bolnikih, in *TALI*, kjer so bili tarčni geni povišano izraženi v vzorcih bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Z analizami genskih skupin miRNA smo dokazali možne epigenetske vplive na gensko izražanje in posledično biološke procese v celicah bolnikov s SSc-ILD preko hsa-miR-24-3p, hsa-miR-383-5p, hsa-miR-150-5p in hsa-miR-217, katerih tarčni geni so povišano izraženi, ter hsa-miR-21-5p, hsa-miR-92a-3p in hsa-miR-19a-3p, katerih tarčni geni so znižano izraženi.
2. Z analizo študije pljučnega tkiva SSc-ILD/K smo ugotovili velik vpliv celic B na patogenezo bolezni. Dokazali smo namreč, da med ekstremno povišano izraženimi geni pljučnega tkiva prevladujejo imunoglobulinski geni, osemkrat povišano izražanje smo dokazali tudi za TNFRSF17, ki je receptor na celicah B in ima pomembno vlogo v razvoju celic B in v avtoimunskem odzivu. Ugotovili smo, da je med povišano izraženimi geni več proteinov izvenceličnega matriksa – kolageni (*coll1a1*, *col3a1*, *coll5a1*) in *periostin*. Glavni profibrotični faktor *TGF-β* je bil tako kot v analizi fibroblastov dvakratno povišano izražen.

Zanimivo znižano gensko izražanje smo dokazali za večino citokinov, kemokinov in njihovih receptorjev. Ugotovili smo, da so apoptotične poti, signalne poti proliferacije, signalne poti celičnega cikla, signalne poti, ki vključujejo citokine, rastne dejavnike, odziv na zunajcelične signale, poškodbe DNA in celični cikel, celično specifične poti in poti, ki vključujejo delovanje proteaz, pomembnejše signalne poti, v katere so vključeni statistično značilno različno izraženi geni celic pljučnega tkiva bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino.

3. Dokazali smo možno vpletenost različnih transkripcijskih faktorjev družine *SMAD*, *STAT*, *PPAR* in *RAR* za katere je znan vpliv na patogenezo bolezni. Pri analizah genskih skupin miRNA smo ugotovili pri hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-101-3p in hsa-miR-378a-3p znižano izražanje tarčnih genov, pri hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-31-5p in hsa-miR-126-3p pa povišano izražanje tarčnih genov.
4. S primerjavo genskega izražanja fibroblastov in celotnega pljučnega tkiva smo ugotovili profil genskega izražanja različnih celičnih tipov pljučnega tkiva (profil izražanja genov v fibroblastih in v drugih celicah pljučnega tkiva). Z analizami genskih skupin transkripcijskih faktorjev »funkcionalnega« profila genskega izražanja drugih celic pljučnega tkiva smo ugotovili možen vpliv transkripcijskih faktorjev *REL*, *NFIC*, *ESR1* na izražanje genov, vpletenih v profibrotično signalno pot TGF- $\beta$ . Našli smo možen epigenetski vpliv na celično proliferacijo, angiogenezo in izražanje *TGF- $\beta$*  prek hsa-miR-132 miRNA. Z bioinformatičnim orodjem String smo ugotovili veliko vpletenost v procese imunskega sistema in signalno pot *FOXO1* in signalno pot *PI3K/Akt*, ki sta potencialni novi terapevtski možnosti. Z bioinformatičnim orodjem Reactome smo ugotovili, da je večina povišano izraženih genov fibroblastov vpletena v celično proliferacijo, medtem ko so povišano izraženi geni drugih celic pljučnega tkiva v veliki meri vključeni v mehanizme imunskega sistema in celične signalizacije. S tem smo dokazali pomembno vlogo celic imunskega sistema v patogenezo SSc.

5. Omeniti je treba pomanjkljivosti v podatkovnih bazah signalnih poti, saj nekaterih poti ni, zato nekaterih skupin genov ne povežemo v skupne procese oziroma so v nekaterih signalnih poteh spremenjeni samo zelo splošni geni. Zato so pri bioinformatičnem analiziranju in interpretaciji rezultatov ključnega pomena tudi predznanje s področja, ki ga raziskujemo, razumevanje celičnih mehanizmov in kritičen pregled vseh rezultatov. Z našo raziskavo smo dokazali, da s prosto dostopnimi podatkovnimi bazami in različnimi orodji bioinformatike lahko pridobimo novo znanje, pomembno za nadaljnje raziskave, ki potencialno lahko vodijo v povsem nove terapevtske pristope zdravljenja.

## Literatura

Alberts, B. et al., 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science.

Allanore, Y. et al., 2015. Systemic sclerosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1, p.15002.

Aslani, S. et al., 2018. Epigenetics and pathogenesis of systemic sclerosis; the ins and outs. *Human Immunology*, 79(3), pp. 178-187.

Assassi, S. et al., 2010. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis and Rheumatism*, 62(2), pp. 589-598.

Baris, S. et al., 2016. Severe early-onset combined immunodeficiency due to heterozygous gain-of-function mutations in STAT1. *Journal of Clinical Immunology*, 36(7), pp. 641-648.

Bartel, D. P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp. 281-297.

Bhattacharyya, S. et al., 2013. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor- $\beta$  responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *The American Journal of Pathology*, 182(1), pp. 192-205.

Bhattacharyya, S., Wei, J. & Varga, J., 2012. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nature reviews. Rheumatology*, 8(1), pp. 42-54.

Boss, A. et al., 2016. Human intervention study to assess the effects of supplementation with olive leaf extract on peripheral blood mononuclear cell gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), p. E2019.

Brkic, Z. et al., 2016. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(8), pp. 1567-1573.

Broen, J., Radstake, T. & Rossato, M., 2014. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nature reviews. Rheumatology*, 10(11), pp. 671-681.

Chen, P. et al., 2018. The role of MicroRNA-181a in myocardial fibrosis following myocardial infarction in a rat model. *Medical Science Monitor*, 24, pp. 4121-4127.

Choi, J. E. et al., 2009. Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(3), pp. 212-219.

Choy, E. & Rose-John, S., 2017. Interleukin-6 as a multifunctional regulator: inflammation, immune response, and fibrosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, 2(2), pp. 1-5.

Christmann, R. B. et al., 2014. Association of Interferon- and transforming growth factor  $\beta$ -regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. *Arthritis & Rheumatology*, 66(3), pp. 714-725.

Chua, J. H., Armugam, A. & Jeyaseelan, K., 2009. MicroRNAs: biogenesis, function and applications.. *Current Opinion Molecular Therapeutics*, 11(2), pp. 189-199.

Chwieśko-Minarowska, S., Kowal, K., Bielecki, M. & Kowal-Bielecka, O., 2012. The role of leukotrienes in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(2), pp. 180-185.

Coward, W. et al., 2010. Repression of IP-10 by interactions between histone deacetylation and hypermethylation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12), pp. 2874-2886.

Daoussis, D. et al., 2010. Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study. *Rheumatology*, 49(2), pp. 271-280.

Falasca, M., 2010. PI3K/Akt signalling pathway specific inhibitors: a novel strategy to sensitize cancer cells to anti-cancer drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 16(12), pp. 1410-1416.

Farina, G. et al., 2010. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGF $\beta$ -mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(11), pp. 2583-2593.

Fonseca, W., Lukacs, N. W. & Ptaschinski, C., 2018. Factors affecting the immunity to respiratory syncytial virus: from epigenetics to microbiome. *Frontiers in Immunology*, 9, p. 226.

García Rodríguez, L. A., González-Pérez, A., Miche, A. & Sáez, M. E., 2018. Contemporary epidemiology of systemic sclerosis: a population-based cohort study in the United Kingdom. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. Advanced online publication. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2018.11.002>.

Georges, M., Coppieters, W. & Charlier, C., 2007. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17(3), pp. 166-176.

Ghosh, A., Murphy, S., Kishore, R. & Vaughan, D., 2012. Global gene expression profiling in PAI-1 knockout murine heart and kidney: molecular basis of cardiac-selective fibrosis. *PLoS ONE*, 8(5), p. 63825.

Guiot, J. et al., 2016. Raised serum levels of IGFBP-1 and IGFBP-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 16, p. 86.

Günther, J. et al., 2015. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 37(5), pp. 529-542.

Herzog, E. et al., 2014. Review: interstitial lung disease associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis: how similar and distinct? *Arthritis & Rheumatology*, 66(8), pp. 1967-1978.

Holtmeier, W. & Kabelitz, D., 2005. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical Immunology and Allergy*, 86, pp. 151-183.

Honda, N. et al., 2012. TGF- $\beta$ -mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma, a dermal fibroblasts. *The Journal of Pathology*, 188(7), pp. 3323-3331.

Honda, N. et al., 2013. miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin  $\beta$ 3. *The American Journal of Pathology*, 182(1), pp. 206-216.

Hovatta, I. et al., 2005. *DNA microarray data analysis*. 2nd ed. Helsinki: CSA-Scientific Computing.

Ho, Y., Lagares, D., Tager, A. & Kapoor, M., 2014. Fibrosis-a lethal component of systemic sclerosis. *Nature reviews. Rheumatology*, 10(7), pp. 390-402.

Hsu, E. et al., 2011. Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Arthritis and Rheumatism*, 63(3), pp. 783-794.

Huang, C. et al., 2017. MicroRNA-101 attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(40), pp. 16420-16439.

Hung, C. et al., 2013. Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respiratory Research*, 14, p. 102.



Jin, B., Li, Y. & Robertson, K., 2011. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes and Cancer*, 2(6), pp. 607–617.

Juvan, P. & Rozman, D., 2006. Tehnologija DNA mikromrež in njena uporaba v medicini. *Informatica Medica Slovenica*, 11(1), pp. 2-5.

Katare, R. et al., 2011. Transplantation of human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an angiogenic program involving micro-RNA-132. *Circulation Research*, 109(8), pp. 894-906.

Kato, M. et al., 2009. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nature Cell Biology*, 11(7), pp. 881-889.

Katsumoto, T., Whitfield, M. & Connolly, M., 2011. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annual Review of Pathology*, 6, pp. 509-537.

Kayser, C. & Fritzler, M., 2015. Autoantibodies in systemic sclerosis: unanswered questions.. *Frontiers in Immunology*, 6, p. 167.

Keane, M. P. et al., 1997. The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Immunology*, 159(3), pp. 1437-1443.

Kobzik, L. & Schoen, F., 1994. *The lung*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders.

Košnik, M. et al. eds., 2011. *Interna medicina*. 4th ed. Ljubljana: Littera Picta.

Kraaij, M. D. & van Laar, J. M., 2008. The role of B cells in systemic sclerosis. *Biologics*, 2(3), pp. 389-395.

Krein, P. M. et al., 2003. Localization of insulin-like growth factor-I in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(1), pp. 83-90.

Kriegel, A. J. et al., 2012. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological Genomics*, 44(4), pp. 237-244.

Kumar, A. & Chordia, N., 2017. Role of bioinformatics in biotechnology. *Research & Reviews of Biosciences*, 12(1), p. 116.

Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S., 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), pp. 16-34.

- Kurzinski, K. & Torok, K., 2011. Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. *Cytokine.*, 55(2), pp. 157-164.
- Li, H. et al., 2012. MicroRNA array analysis of microRNAs related to systemic scleroderma. *Rheumatology International*, 32(2), pp. 307-313.
- Li, J. et al., 2018. miR-183 modulates renal fibrosis via targeting SFTPA2 genes. *International Journal of Clinical Experimental Medicine*, 11(5), pp. 4614-4622.
- Liang, H. et al., 2014. Integrated analyses identify the involvement of microRNA-26a in epithelial–mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Death & Disease*, 5(5), p. e1238.
- Lindahl, G. et al., 2013. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respiratory Research*, 14, p. 80.
- Liu, G. et al., 2010. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), pp. 1589-1597.
- Liu, X. et al., 2018. The Role of miRNA-132 against apoptosis and oxidative stress in heart failure. *BioMed Research International*, 2018(3452748), p. 1-8.
- Mann, J. et al., 2010. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*, 138(2), pp. 705-714.
- Marmorstein, R. & Trievel, R., 2009. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789(1), pp. 58-68.
- Maurer, B. et al., 2010. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(6), pp. 1733-1743.
- McCarthy, D. J. & Smyth, G. K., 2009. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, pp. 765-71.
- Mehra, S., Walker, J., Patterson, K. & Fritzler, M., 2013. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 12(3), pp. 340-354.
- Misharin, A. V. et al., 2017. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), pp. 2387-2404.

Mramor, M., Toplak, M., Curk, T. & Zupan, B., 2008. Uporaba skupin genov pri analizi podatkov o izraženosti genov pri raku. *Informatika Medica Slovenica*, 13(2), pp. 1-10.

Murphy, K. & Weaver, C., 2016. The Humoral Immune Response. *In: Janeways immunobiology*. 9th ed. London: Garland Science, pp. 399-444.

National Cancer Institute, 2018. *BRP biometric research program*. [Online] Available at: <https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/> [Accessed 25. 09. 2018].

National Center for Biotechnology Information, 2018. *Gene expression omnibus*. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> [Accessed 15. 09. 2018].

National Center for Biotechnology Information, 2019. *PumMed*. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> [Accessed 1. 04. 2019].

Ng, H. H. & Bird, A., 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Current Opinion Genetics & Development*, 9(2), pp. 158-163.

O'Reilly, S., Hügle, T. & van Laar, J., 2012. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology (Oxford)*, 51(9), pp. 1540-1549.

O'Shea, J. J., Ma, A. & Lipsky, P., 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews. Immunology*, 2(1), pp. 37-45.

Pandey, A. et al., 2016. FoxO1 inhibitors: the future medicine for metabolic disorders? *Current Diabetes Reviews*, 12(3), pp. 223-230.

Patterson, T. A. et al., 2006. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nature Biotechnology*, 24(9), pp. 1140-1150.

Pedroza, M. et al., 2016. STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation. *FASEB Journal*, 30(1), pp. 129-140.

Plasari, G. et al., 2009. Nuclear factor I-C links platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta1 signaling to skin wound healing progression. *Molecular and Cell Biology*, 29(22), pp. 6006-6017.

Raja, J. & Denton, C. P., 2015. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 7(5), pp. 543-557.

Rajasekaran, S., Rajaguru, P. & Sudhakar Gandhi, P., 2015. MicroRNAs as potential targets for progressive pulmonary fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 6, p. 254.

Reactome, 2019. *Reactome pathway database*. [Online] Available at: <https://reactome.org/> [Accessed 6.11. 2018].

Ruzehaji, N. et al., 2016. Pan PPAR agonist IVA337 is effective in prevention and treatment of experimental skin fibrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(12), pp. 2175-2183.

Sakkas, L. I., 2016. Spotlight on tocilizumab and its potential in the treatment of systemic sclerosis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 2723-2728.

Sargent, J. L. & Whitfield, M. L., 2011. Capturing the heterogeneity in systemic sclerosis with genome-wide expression profiling. *Expert Review of Clinical Immunology*, 7(4), pp. 463-473.

Schafer, S. et al., 2017 . IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*, 552(7683), pp. 110-115.

Simon, R., 2016. *BRB-ArrayTools, version 4.5: user's manual*. [Online] Available at: <https://linus.nci.nih.gov/pilot/Manual.doc> [Accessed 5. 10. 2018].

Smith, L. C., Moreno, S. & Sabo-Attwood, T., 2017. Pro-fibrogenic and estrogen receptor signaling pathways converge in lung epithelial cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195, p. A6356.

STRING, 2019. *STRING: functional protein association networks*. [Online] Available at: <https://string-db.org/> [Accessed 10.11. 2018].

Thomas, R. M., Worswick, S. & Aleshin, M., 2017. Retinoic acid for treatment of systemic sclerosis and morphea: a literature review. *Dermatologic Therapy*, 30(2), pp. 1-7.

Thum, T. et al., 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456(7224), pp. 980-984.

Tsuchiya, M. et al., 2013. Differential regulation of inflammation by inflammatory mediators in cystic fibrosis lung epithelial cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(3), pp. 121-129.

van Almen, G. G. et al., 2011. MicroRNA-18 and microRNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure. *Ageing Cell*, 10(5), pp. 769-779.

- van Rooij, E., 2011. The art of microRNA research. *Circulation Research*, 108(2), pp. 219-234.
- Varga, J., Trojanowska, M. & Kuwana, M., 2017. Pathogenesis of systemic sclerosis: recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, 2(3), pp. 137-152.
- Vettori, S., Gay, S. & Distler, O., 2012. Role of MicroRNAs in fibrosis. *The Open Rheumatology Journal*, 6, pp. 130-139.
- Viswanath, V., Phiske, M. M. & Gopalani, V. V., 2013. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian Journal of Dermatology*, 58(4), pp. 255–268.
- Vowell, K. N., Wilfong, E. M., Crofford, L. J. & Kendall, P. L., 2018. Autoreactive-prone CD21lo B cells increased in scleroderma patients with interstitial lung disease. *The Journal of Immunology*, 200(1), pp. 45-48.
- Vozelj, M., 2000. *Temelji imunologije*. Ljubljana: DZS.
- Wang, Y., Fan, P. S. & Kahaleh, B., 2006. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLII gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism*, 54(7), pp. 2271-2279.
- Wang, Y. et al., 2018. Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), pp. 2407-2412.
- Wei, J., Bhattacharyya, S., Tourtellotte, W. G. & Varga, J., 2011. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmunity Reviews*, 10(5), pp. 267-275.
- Wu, M. & Assassi, S., 2013. The role of type 1 interferon in systemic sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 4, p. 266.
- Yang, S. et al., 2012. miR-31 is a negative regulator of fibrogenesis and pulmonary fibrosis. *FASEB Journal*, 26(9), pp. 3790-3799.
- York, M. R., 2011. Novel insights on the role of the innate immune system in systemic sclerosis. *Expert Review of Clinical Immunology*, 7(4), pp. 481-489.
- Yoshizaki, A., 2018. Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis. *Immunology Letters*, 195, pp. 76-82.

Yu, F. et al., 2016. The epigenetically-regulated microRNA-378a targets TGF- $\beta$ 2 in TGF- $\beta$ 1-treated hepatic stellate cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(1-2), pp. 183-194.

Zhou, T. B, Drummen, G. P. & Qin, Y. H., 2013. The controversial role of retinoic acid in fibrotic diseases: analysis of involved signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), pp. 226-243.

Zhu, H. et al., 2012. MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. *Journal of Clinical Immunology*, 32(3), pp. 514-522.

## Priloge

Priloga 1: Seznam signifikantno povišano izraženih genov v fibroblastih izoliranih iz pljučnega tkiva SSc/K (>4 kratno povišano izražanje)

Geom sredina intenz. kontrol	Geom sredina intenz. SSc-ILD	Razmerje spremembe	Ime gena
17.1	939.3	0.018	<i>ID1</i>
15	307.3	0.049	<i>IL11</i>
21.6	393.1	0.055	<i>ID3</i>
28	272.5	0.1	<i>AMIGO2</i>
33	284.1	0.12	<i>TSPAN13</i>
32.2	236.3	0.14	<i>XYLT1</i>
49.5	346	0.14	<i>ELN</i>
27.1	186.1	0.15	<i>SPDL1</i>
412	2623	0.16	<i>CTGF</i>
30.2	169.4	0.18	<i>NT5DC2</i>
41.7	227.5	0.18	<i>BHLHE40</i>
112	626.4	0.18	<i>INHBA</i>
41.7	220.4	0.19	<i>PRPS1</i>
13.1	69.83	0.19	<i>NOX4</i>
368	1933	0.19	<i>SERPINE1</i>
17.9	89.45	0.2	<i>GREM2</i>
25.1	126.2	0.2	<i>TPM1</i>
47.9	235.6	0.2	<i>CTPS1</i>
31.1	158.1	0.2	<i>PENK</i>
34.7	171.2	0.2	<i>ACTC1</i>
362	1745	0.21	<i>SERPINE1</i>
76	370.3	0.21	<i>LRRC15</i>
27.2	126.4	0.22	<i>CCNB1</i>
93.3	412	0.23	<i>SLC7A5</i>
22.4	95.84	0.23	<i>FABP5</i>
24.4	100.9	0.24	<i>CCNA2</i>
24.2	101.2	0.24	<i>DACT1</i>
350	1489	0.24	<i>TPM1</i>
75.2	297.3	0.25	<i>RHOB</i>
76	308.2	0.25	<i>MICAL2</i>
32.7	132.2	0.25	<i>PRC1</i>

Priloga 2: Seznam signifikantno znižano izraženih genov v fibroblastih izoliranih iz pljučnega tkiva SSc/K (>4 kratno znižano izražanje)

Geom sredina intenz. kontrol	Geom sredina intenz. SSc-ILD	Razmerje spremembe	Ime gena
1469.4	57.72	25.46	<i>MX1</i>
823.2	32.65	25.22	<i>CXCL10</i>
280.94	14.98	18.76	<i>RSAD2</i>
895.22	49.25	18.18	<i>IFIT3</i>
308.1	17.01	18.12	<i>IFI44L</i>
323.45	19.12	16.92	<i>VCAM1</i>
410.89	25.53	16.09	<i>IFIT2</i>
277.46	18.13	15.31	<i>OAS1</i>
1478.3	97.03	15.24	<i>PTX3</i>
383.55	29.71	12.91	<i>ADH1B</i>
804.56	62.9	12.79	<i>CFB</i>
90	7.25	12.41	<i>CXCL11</i>
296.52	24.03	12.34	<i>HERC6</i>
3810	308.97	12.33	<i>IFITM1</i>
844	70.21	12.02	<i>IFI27</i>
84.63	7.09	11.93	<i>CXCL11</i>
422.59	35.99	11.74	<i>MX2</i>
441.6	37.99	11.63	<i>OAS1</i>
341.2	30.3	11.26	<i>BST2</i>
386.55	35.24	10.97	<i>CCL11</i>
209.7	19.23	10.9	<i>SLC39A8</i>
1807.9	183.32	9.86	<i>LOC100129518 /// SOD2</i>
455.72	46.49	9.8	<i>IFI44</i>
4035.6	414.57	9.73	<i>ISG15</i>
218.47	23.06	9.47	<i>RTP4</i>
5386.2	571.1	9.43	<i>IFITM1 /// IFITM2</i>
222.59	26.09	8.53	<i>IFIH1</i>
590.34	70.01	8.43	<i>IFI35</i>
179.95	21.82	8.25	<i>DDX58</i>
212.46	26.04	8.16	<i>OAS2</i>
107.67	13.63	7.9	<i>HERC5</i>
243.24	31.28	7.78	<i>LOC100129518 /// SOD2</i>
1026.9	133.42	7.7	<i>LOC100129518 /// SOD2</i>
242.75	31.58	7.69	<i>SLC39A8</i>
624.62	81.56	7.66	<i>CXCL1</i>
229.61	30.2	7.6	<i>RARRES3</i>
503.51	66.59	7.56	<i>IFI6</i>
503.19	67.07	7.5	<i>CEMIP</i>
316.85	46.94	6.75	<i>CASP1</i>
199.59	29.71	6.72	<i>CASP1</i>
3354.7	499.78	6.71	<i>CCL2</i>
233.37	34.82	6.7	<i>OASL</i>
580.42	86.9	6.68	<i>PLSCR1</i>
379.43	56.95	6.66	<i>GAS1</i>
261.11	40.86	6.39	<i>PSMB9</i>
129.84	21.14	6.14	<i>CCL7</i>
651.18	106.89	6.09	<i>TRIM22</i>
154.46	25.52	6.05	<i>CXCL2</i>
304.64	51.18	5.95	<i>OAS3</i>
424.9	72.61	5.85	<i>CASP1</i>
172.19	29.79	5.78	<i>TMEM140</i>
111.07	19.25	5.77	<i>CASP1</i>
59.1	10.75	5.5	<i>TNFSF10</i>



817.56	149.93	5.45	<i>UBE2L6</i>
679.26	125.06	5.43	<i>PPAP2B</i>
86.86	16.03	5.42	<i>ISG20</i>
726.01	134.61	5.39	<i>LAP3</i>
577.01	108.47	5.32	<i>CLEC2B</i>
121.69	23.15	5.26	<i>DDX60</i>
159.48	30.4	5.25	<i>TRIM14</i>
68.8	13.13	5.24	<i>GCH1</i>
415.34	80.35	5.17	<i>HSD11B1</i>
100.31	19.43	5.16	<i>IRF7</i>
1407.3	277.57	5.07	<i>PPAP2B</i>
99.22	19.91	4.98	<i>PDGFD</i>
186.74	38.29	4.88	<i>PARP12</i>
253.07	52.08	4.86	<i>OASL</i>
94.06	19.6	4.8	<i>PLSCR1</i>
2159.3	460.74	4.69	<i>ADM</i>
1100	234.61	4.69	<i>TNFRSF11B</i>
277.15	59.52	4.66	<i>GBP2</i>
135.05	28.96	4.66	<i>ISG20</i>
211.81	45.84	4.62	<i>TNFAIP2</i>
791.77	171.77	4.61	<i>LY6E</i>
103.14	22.44	4.6	<i>C10orf10</i>
1029.3	224.17	4.59	<i>DRAM1</i>
156.33	34.42	4.54	<i>SP110</i>
186.06	41.44	4.49	<i>MAP3K5</i>
268.58	60.11	4.47	<i>SP110</i>
599.72	134.84	4.45	<i>WTAP</i>
439.5	99	4.44	<i>STAT1</i>
3061.3	690.39	4.43	<i>PPAP2B</i>
498.65	112.61	4.43	<i>HLA-E</i>
45.52	10.29	4.43	<i>ASPA</i>
422.79	95.57	4.42	<i>STAT1</i>
168.7	38.17	4.42	<i>IL15RA</i>
86.19	19.61	4.39	<i>CCL8</i>
329.57	75.18	4.38	<i>TNFAIP3</i>
2136.3	488.33	4.37	<i>STAT1</i>
697.54	161.5	4.32	<i>C3</i>
125.09	29.06	4.3	<i>RCAN2</i>
141.67	33.3	4.25	<i>TNFRSF11B</i>
619.98	147.44	4.21	<i>STAT1</i>
247.89	59.25	4.18	<i>EIF2AK2</i>
205.54	49.18	4.18	<i>NMI</i>
1103.3	264.59	4.17	<i>STAT1</i>
302.62	72.88	4.15	<i>SERPING1</i>
193.31	46.72	4.14	<i>XAF1</i>
305.51	74.38	4.11	<i>IL6ST</i>
1089.5	267.8	4.07	<i>IFI16</i>
440.74	108.93	4.05	<i>IL6ST</i>
272.07	67.29	4.04	<i>IFI16</i>
182.81	45.25	4.04	<i>PTGIS</i>
70.23	17.46	4.02	<i>KCNJ2</i>

Priloga 3: Seznam statistično značilno spremenjenih genskih skupin signalnih poti (Biocarta Pathway) v fibroblastih bolnikov

	Genske skupine signalnih poti (Biocarta Pathway)	Opis	Število genov	LS permutacijska p-vrednost	KS permutacijska p-vrednost	Efron-Tibshirani's GSA test p-vrednost
1	<b>h_chemicalPathway</b>	Apoptotic Signaling in Response to DNA Damage	16	0.00001	0.16516	0.01 (-)
2	<b>h_gleevecpathway</b>	Inhibition of Cellular Proliferation by Gleevec	13	0.00001	0.10056	< 0.005 (-)
3	<b>h_ifnaPathway</b>	IFN alpha signaling pathway	9	0.00001	0.02472	< 0.005 (-)
4	<b>h_ifngPathway</b>	IFN gamma signaling pathway	9	0.00001	0.02854	< 0.005 (-)
5	<b>h_il10Pathway</b>	IL-10 Anti-inflammatory Signaling Pathway	15	0.00001	0.04137	0.035 (-)
6	<b>h_il18Pathway</b>	IL 18 Signaling Pathway	5	0.00001	0.00001	0.01 (-)
7	<b>h_p38mapkPathway</b>	p38 MAPK Signaling Pathway	16	0.00001	0.1877	< 0.005 (-)
8	<b>h_il22bppathway</b>	IL22 Soluble Receptor Signaling Pathway	11	0.00001	0.11976	0.02 (-)
9	<b>h_mhcPathway</b>	Antigen Processing and Presentation	9	0.00007	0.02505	0.045 (-)
10	<b>h_d4gdiPathway</b>	D4-GDI Signaling Pathway	10	0.00008	0.00432	0.005 (-)
11	<b>h_biopeptidesPathway</b>	Bioactive Peptide Induced Signaling Pathway	17	0.00034	0.2073	0.1 (-)
12	<b>h_ctlPathway</b>	CTL mediated immune response against target cells	10	0.00037	0.00058	0.05 (-)
13	<b>h_tollPathway</b>	Toll-Like Receptor Pathway	11	0.00042	0.01292	0.055 (-)
14	<b>h_TPOPathway</b>	TPO Signaling Pathway	20	0.0005	0.07974	0.01 (-)
15	<b>h_egfPathway</b>	EGF Signaling Pathway	23	0.00052	0.11693	0.02 (-)
16	<b>h_nfkbPathway</b>	NF-kB Signaling Pathway	9	0.00057	0.03601	0.055 (-)
17	<b>h_pdgfPathway</b>	PDGF Signaling Pathway	23	0.00064	0.11693	0.015 (-)
18	<b>h_ranklPathway</b>	Bone Remodelling	5	0.00079	0.19635	0.04 (-)
19	<b>h_compPathway</b>	Complement Pathway	5	0.00097	0.01821	0.035 (-)
20	<b>h_pcafpathway</b>	The information-processing pathway at the IFN-beta enhancer	8	0.00111	0.00004	0.085 (-)
21	<b>h_mapkPathway</b>	MAPKinase Signaling Pathway	32	0.00163	0.2397	0.005 (-)
22	<b>h_caspasePathway</b>	Caspase Cascade in Apoptosis	12	0.00164	0.0474	0.02 (-)
23	<b>h_ErbB3Pathway</b>	Neuroregulin receptor degradation protein-1 Controls ErbB3 receptor recycling	6	0.00168	0.00025	0.02 (+)
24	<b>h_cd40Pathway</b>	CD40L Signaling Pathway	7	0.00274	0.00647	0.075 (-)
25	<b>h_agrPathway</b>	Agurin in Postsynaptic Differentiation	18	0.00326	0.00156	0.165 (+)
26	<b>h_LairPathway</b>	Cells and Molecules	6	0.00334	0.00303	0.04 (-)

		involved in local acute inflammatory response				
27	<b>h_rnaPathway</b>	Double Stranded RNA Induced Gene Expression	7	<b>0.00429</b>	0.16135	<b>0.035 (-)</b>
28	<b>h_tnfr2Pathway</b>	TNFR2 Signaling Pathway	8	<b>0.00467</b>	<b>0.01149</b>	0.075 (-)
29	<b>h_tgfbPathway</b>	TGF beta signaling pathway	12	<b>0.01666</b>	0.0856	0.13 (+)
30	<b>h_slrpPathway</b>	Small Leucine-rich Proteoglycan (SLRP) molecules	9	<b>0.01676</b>	<b>0.02762</b>	0.195 (-)
31	<b>h_nkcellsPathway</b>	Ras-Independent pathway in NK cell-mediated cytotoxicity	6	<b>0.02606</b>	0.47338	0.085 (-)
32	<b>h_keratinocytePathway</b>	Keratinocyte Differentiation	18	<b>0.0374</b>	<b>0.01375</b>	0.12 (-)
33	<b>h_nthiPathway</b>	NFkB activation by Nontypeable Hemophilus influenzae	19	<b>0.03914</b>	<b>0.01815</b>	0.13 (-)
34	<b>h_hifPathway</b>	Hypoxia-Inducible Factor in the Cardiovascular System	10	<b>0.04091</b>	<b>0.04373</b>	<b>0.03 (+)</b>
35	<b>h_41bbPathway</b>	The 4-1BB-dependent immune response	10	<b>0.0463</b>	0.13	0.07 (-)
36	<b>h_stemPathway</b>	Regulation of hematopoiesis by cytokines	6	<b>0.04658</b>	0.06796	0.065 (+)
37	<b>h_pmlPathway</b>	Regulation of transcriptional activity by PML	11	0.06421	<b>0.02885</b>	0.16 (-)
38	<b>h_mPRPathway</b>	How Progesterone Initiates the Oocyte Maturation	9	0.08112	0.17823	<b>0.025 (+)</b>
39	<b>h_deathPathway</b>	Induction of apoptosis through DR3 and DR4/5 Death Receptors	16	0.08882	<b>0.01248</b>	0.2 (-)
40	<b>h_erythPathway</b>	Erythrocyte Differentiation Pathway	9	0.09708	<b>0.02759</b>	0.075 (+)
41	<b>h_stressPathway</b>	TNF/Stress Related Signaling	8	0.11503	<b>0.03599</b>	0.13 (-)
42	<b>h_akap95Pathway</b>	AKAP95 role in mitosis and chromosome dynamics	6	0.11984	<b>0.01089</b>	0.055 (+)
43	<b>h_cardiacegfPathway</b>	Role of EGF Receptor Transactivation by GPCRs in Cardiac Hypertrophy	11	0.12826	<b>0.00425</b>	0.395 (+)
44	<b>h_il6Pathway</b>	IL 6 signaling pathway	16	0.14063	<b>0.0331</b>	0.145 (-)
45	<b>h_ranMSpathway</b>	Role of Ran in mitotic spindle regulation	10	0.15359	<b>0.01425</b>	0.065 (+)
46	<b>h_integrinPathway</b>	Integrin Signaling Pathway	18	0.16389	<b>0.01261</b>	0.155 (+)
47	<b>h_akapCentrosomePathway</b>	Protein Kinase A at the Centrosome	5	0.18059	<b>0.02802</b>	0.07 (+)
48	<b>h_HivnefPathway</b>	HIV-I Nef: negative effector of Fas and TNF	31	0.1904	<b>0.00178</b>	0.235 (-)
49	<b>h_srcRTPPathway</b>	Activation of Src by Protein-tyrosine	7	0.21856	0.05721	<b>0.045 (+)</b>

		phosphatase alpha			
50	<b>h_prionPathway</b>	Prion Pathway	5	0.2519	0.03164
51	<b>h_hsp27Pathway</b>	Stress Induction of HSP Regulation	5	0.32253	0.02286
52	<b>h_EfpPathway</b>	Estrogen-responsive protein Efp controls cell cycle and breast tumors growth	10	0.35317	0.04111
53	<b>h_mcmPathway</b>	CDK Regulation of DNA Replication	15	0.84132	0.01818

**Legenda:** Rumeno označene genske skupine so statistično značilno različno izražene samo v fibroblastih bolnikov, modro označene genske skupine so statistično značilno različno izražene tudi v vzorcih pljučnega tkiva. Vzorci: SSc-ILD (n=8)/K(n=10)  $p < 0,05$ .

Priloga 4: Seznam signifikantno povišano izraženih genov v pljučnem tkivu SSc/K (>4 kratno povišano izražanje)

Geom sredina intenzitete kontrol	Geom sredina intenzitete SSc ILD	Razmerje spremembe	Ime
146.38	1875.35	0.078	<i>abParts /// IGKC /// IGKV4-1 /// IGKV4-1</i>
177.19	1712.4	0.1	<i>IGK /// IGKC</i>
166.38	1482.77	0.11	<i>IGKV1-17 /// IGKV1-17</i>
28.11	230.44	0.12	<i>IGHA1 /// IGHG1 /// IGHM /// IGHV3-23 /// IGHV4-31</i>
591.56	4884.24	0.12	<i>IGK /// IGKC</i>
552.15	4504.96	0.12	<i>IGK /// IGKC</i>
247.49	1866.2	0.13	<i>IGKC /// IGKV2-28 /// IGKV2-28 /// IGKV2D-28 /// IGKV2D-28</i>
306.29	2340.01	0.13	<i>IGK /// IGKC</i>
42.76	335.86	0.13	<i>TNFRSF17</i>
464.56	3491.45	0.13	<i>IGKV1-37 /// IGKV1-37 /// IGKV1D-37 /// IGKV1D-37</i>
24.94	172.04	0.14	<i>IL13RA2</i>
134.66	956.96	0.14	<i>IGLJ3 /// IGLV3-19 /// IGLV3-19</i>
139.5	1000.75	0.14	<i>IGLJ3</i>
441.91	3075.3	0.14	<i>IGLC1 /// IGLJ3 /// IGLV2-14 /// IGLV@</i>
233.84	1677.69	0.14	<i>IGKV1OR2-108 /// IGKV1OR2-108</i>
56.96	375.15	0.15	<i>IGHD</i>
208.76	1409.24	0.15	<i>IGLL5</i>
366.86	2404.03	0.15	<i>CKAP2 /// IGLC1 /// IGLJ2 /// IGLJ2 /// IGLJ3 /// IGLJ3 /// IGLJ3 /// IGLJ3 /// IGLV1-44 /// IGLV2-14 /// IGLV@</i>
368.95	2481.01	0.15	<i>IGKC</i>
46.83	296.25	0.16	<i>IGHM</i>
83.4	511.21	0.16	<i>IGLV1-44</i>
79.19	478.34	0.17	<i>IGH /// IGH A1 /// IGH A2 /// IGH D /// IGH G1 /// IGH G3 /// IGH G4 /// IGH M /// IGH V3-23 /// IGH V4-31</i>
93.27	560.66	0.17	<i>IGLJ3</i>
128.29	758.92	0.17	<i>IGLV1-44</i>
100.16	601.46	0.17	<i>IGK /// IGKC</i>
31.41	175.28	0.18	<i>IGH /// IGH A1 /// IGH A2 /// IGH D /// IGH G1 /// IGH G2 /// IGH G3 /// IGH M /// IGH V4-31</i>
49.18	259.55	0.19	<i>COL1A1</i>
212	1096.75	0.19	<i>IGLC1 /// IGLV3-10 /// IGLV3-10</i>
55.26	276.85	0.2	<i>CKAP2 /// IGLJ3 /// IGLV3-19 /// IGLV3-19</i>
799.7	3740.92	0.21	<i>COL3A1</i>
118.53	577.74	0.21	<i>RARRES1</i>
219.07	1041.15	0.21	<i>AC128677.4 /// CH17-132F21.1 /// IGKV1OR-1 /// IGKV1OR-1 /// IGKV1OR10-1 /// IGKV1OR10-1 /// IGKV1OR2-2</i>
105.13	484.23	0.22	<i>IGF1</i>
20.02	89.75	0.22	<i>EPHA3</i>
40.22	180.71	0.22	<i>VCAN</i>
80.91	373.5	0.22	<i>IGH /// IGH A1 /// IGH A2 /// IGH G1 /// IGH G2 /// IGH G3 /// IGH M /// IGH V4-31 /// LOC102725526</i>
40.1	179.12	0.22	<i>MEOX2</i>

32.75	150.9	0.22	<i>IGK /// IGKC</i>
106.15	484.98	0.22	<i>CDH3</i>
29.42	130.05	0.23	<i>MEOXI</i>
131.87	573.47	0.23	<i>IGLC1 /// IGLV3-25 /// IGLV3-25</i>
71.28	312.89	0.23	<i>IGHM</i>
222.46	953.61	0.23	<i>COL15A1</i>
48.85	211.18	0.23	<i>IGH /// IGHA1 /// IGHA2 /// IGHD /// IGHG1 /// IGHG3 /// IGHG4 /// IGHM /// IGHV4-31</i>
168.15	718.64	0.23	<i>IGHA1 /// IGHA2 /// IGHG1 /// IGHG3 /// IGHM /// IGHV3-23 /// IGHV4-31</i>
46.82	206.45	0.23	<i>SFRP1</i>
830.69	3676.06	0.23	<i>POSTN</i>
73.27	304.28	0.24	<i>MCTP1</i>
94.18	393.1	0.24	<i>TYMS</i>
36.64	147.62	0.25	<i>VCAN</i>

Priloga 5: Seznam signifikantno znižano izraženih genov v pljučnem tkivu SSc/K (>4 kratno znižano izražanje)

Geom sredina intenzitete kontrol	Geom sredina intenzitete SSc ILD	Razmerje spremembe	Ime
570.92	28.46	20.06	<i>IL1RL1</i>
1724.92	95.51	18.06	<i>IL6</i>
399.76	36.42	10.98	<i>BPIFA1</i>
1460.35	136.4	10.71	<i>CXCL8</i>
1429.69	152.04	9.4	<i>CCL20</i>
1191.21	133.01	8.96	<i>MT1M</i>
727.05	82.3	8.83	<i>CA4</i>
543.89	69.32	7.85	<i>RND1</i>
544.83	72.4	7.53	<i>SERPINE1</i>
2651.64	355.8	7.45	<i>EGR1</i>
4255.76	602.59	7.06	<i>CXCL2</i>
3951.46	562.09	7.03	<i>GADD45B</i>
423.66	63.02	6.72	<i>CYP3A5</i>
1060.43	158.65	6.68	<i>FAM107A</i>
590.15	95.32	6.19	<i>CHIT1</i>
2380.44	389	6.12	<i>GADD45B</i>
3658.04	604.06	6.06	<i>C10orf10</i>
457.77	76.9	5.95	<i>ITPKC</i>
1415.17	242.08	5.85	<i>ATF3</i>
449.9	78.83	5.71	<i>STC1</i>
387.28	69.49	5.57	<i>CXCL3</i>
2926.67	525.6	5.57	<i>TNFAIP3</i>
278.8	51.34	5.43	<i>CYP3A5</i>
2746.2	518.74	5.29	<i>MAFF</i>
1317.47	249.45	5.28	<i>APOLD1</i>
406.17	77.85	5.22	<i>SLCO4A1</i>
463.27	89.45	5.18	<i>SERPINE1</i>
521.44	104.3	5	<i>NR4A3</i>
678.39	137.96	4.92	<i>TNFAIP3</i>
458.75	95.33	4.81	<i>SOCS3</i>
353.94	74.04	4.78	<i>CA4</i>
150.83	31.55	4.78	<i>STC1</i>
295.96	62.52	4.73	<i>GADD45B</i>
4054.77	865.29	4.69	<i>ZFP36</i>
699.43	150.16	4.66	<i>FAM107A</i>
715.4	153.55	4.66	<i>RGS16</i>
846.73	185.67	4.56	<i>WSB1</i>
907.16	200.38	4.53	<i>ELF3</i>
976.48	219.15	4.46	<i>RRAD</i>
156.76	35.21	4.45	<i>IL1R2</i>
1595.73	359.44	4.44	<i>FMO2</i>
212.32	48.23	4.4	<i>CYP3A5</i>
1142.28	264.89	4.31	<i>CX3CL1</i>
425	98.62	4.31	<i>PPFIBP1</i>
7575.94	1780.6	4.25	<i>NFKBIA</i>
2195.12	522.51	4.2	<i>CCL2</i>
353.95	84.22	4.2	<i>LIF</i>
4048.88	989.03	4.09	<i>EGR1</i>
488.08	119.66	4.08	<i>JUNB</i>
444.29	109.58	4.05	<i>MMP19</i>
180.5	45.05	4.01	<i>MCL1</i>

Priloga 6: Seznam statistično značilno spremenjenih genskih skupin signalnih poti (Biocarta Pathway) v pljučnem tkivu bolnikov

	Genske skupine signalnih poti (Biocarta Pathway)	Opis	Število genov	LS permutacijska p-vrednost	KS permutacijska p-vrednost	Efron-Tibshirani's GSA test p-vrednost
1	h_cd40Pathway	CD40L Signaling Pathway	5	0.00002	0.01034	< 0.005 (-)
2	h_il6Pathway	IL 6 signaling pathway	12	0.00008	0.00205	0.005 (-)
3	h_akap13Pathway	Rho-Selective Guanine Exchange Factor AKAP13 Mediates Stress Fiber Formation	5	0.0001	0.09294	0.025 (-)
4	h_41bbPathway	The 4-1BB-dependent immune response	6	0.0001	0.00052	< 0.005 (-)
5	h_fasPathway	FAS signaling pathway ( CD95 )	12	0.00019	0.00838	0.04 (-)
6	h_nfkbPathway	NF-kB Signaling Pathway	6	0.00032	0.28911	0.005 (-)
7	h_atmPathway	ATM Signaling Pathway	10	0.00048	0.00732	0.005 (-)
8	h_cdMacPathway	Cadmium induces DNA synthesis and proliferation in macrophages	8	0.00055	0.01071	0.045 (-)
9	h_pcafpathway	The information-processing pathway at the IFN-beta enhancer	6	0.00058	0.00018	0.06 (-)
10	h_tollPathway	Toll-Like Receptor Pathway	8	0.00066	0.01619	0.04 (-)
11	h_stressPathway	TNF/Stress Related Signaling	7	0.00083	0.07245	0.04 (-)
12	h_tnfr2Pathway	TNFR2 Signaling Pathway	8	0.00102	0.05228	0.005 (-)
13	h_aktPathway	AKT Signaling Pathway	5	0.00203	0.1483	0.02 (-)
14	h_tcrPathway	T Cell Receptor Signaling Pathway	13	0.00238	0.02597	0.12 (-)
15	h_tnfr1Pathway	TNFR1 Signaling Pathway	6	0.00264	0.05789	0.035 (-)
16	h_ngfPathway	Nerve growth factor pathway (NGF)	7	0.00317	0.03213	0.065 (-)
17	h_arenrf2Pathway	Oxidative Stress Induced Gene Expression Via Nrf2	10	0.00388	0.03944	0.06 (-)
18	h_insulinPathway	Insulin Signaling Pathway	9	0.00392	0.0176	0.075 (-)
19	h_igf1Pathway	IGF-1 Signaling Pathway	13	0.00494	0.00247	0.08 (+)
20	h_keratinocytePathway	Keratinocyte Differentiation	13	0.00509	0.01155	0.08 (-)
21	h_IL12Pathway	IL12 and Stat4 Dependent Signaling Pathway in Th1 Development	7	0.00536	0.02673	0.095 (-)
22	h_il1rPathway	Signal transduction through IL1R	15	0.00565	0.24531	0.075 (-)



23	h_nthiPathway	NFkB activation by Nontypeable Hemophilus influenzae	7	0.00565	0.04661	0.03 (-)
24	h_her2Pathway	Role of ERBB2 in Signal Transduction and Oncology	8	0.0059	0.16987	0.07 (-)
25	h_dspPathway	Regulation of MAP Kinase Pathways Through Dual Specificity Phosphatases	7	0.00662	0.00138	0.045 (-)
26	h_metPathway	Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor	13	0.0069	0.01091	0.05 (+)
27	h_epoPathway	EPO Signaling Pathway	6	0.00714	0.06324	0.1 (-)
28	h_pparaPathway	Mechanism of Gene Regulation by Peroxisome Proliferators via PPARa(alpha)	20	0.00717	0.07951	0.06 (-)
29	h_agrPathway	Agtrin in Postsynaptic Differentiation	12	0.00817	0.00263	0.06 (+)
30	h_dreampathway	Repression of Pain Sensation by the Transcriptional Regulator DREAM	8	0.00863	0.04539	0.055 (-)
31	h_hifPathway	Hypoxia-Inducible Factor in the Cardiovascular System	8	0.00883	0.08355	0.075 (-)
32	h_pyk2Pathway	Links between Pyk2 and Map Kinases	6	0.00894	0.07184	0.11 (-)
33	h_HivnefPathway	HIV-1 Nef: negative effector of Fas and TNF	16	0.00982	0.05571	0.21 (+)
34	h_cfrPathway	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and beta 2 adrenergic receptor (b2AR) pathway	8	0.0115	0.03661	0.115 (-)
35	h_d4gdiPathway	D4-GDI Signaling Pathway	7	0.01297	0.02895	0.065 (-)
36	h_mCalpainPathway	mCalpain and friends in Cell motility	5	0.01299	0.09546	0.09 (-)
37	h_Ccr5Pathway	Pertussis toxin-insensitive CCR5 in Macrophage	14	0.01343	0.00614	0.195 (-)
38	h_cardiacegfPathway	Role of EGF Receptor Transactivation by GPCRs in Cardiac Hypertrophy	14	0.01448	0.00196	0.125 (-)
39	h_etsPathway	METS affect on Macrophage Differentiation	8	0.01616	0.03117	0.125 (-)
40	h_deathPathway	Induction of	13	0.01978	0.67696	0.385 (-)

		apoptosis through DR3 and DR4/5 Death Receptors				
41	h_LairPathway	Cells and Molecules involved in local acute inflammatory response	11	0.02496	0.09272	0.155 (-)
42	h_gpcrPathway	Signaling Pathway from G-Protein Families	10	0.02756	0.03892	0.155 (-)
43	h_longevityPathway	The IGF-1 Receptor and Longevity	9	0.03116	0.00246	0.04 (+)
44	h_caspasePathway	Caspase Cascade in Apoptosis	8	0.03238	0.10412	0.33 (-)
45	h_ucalpainPathway	uCalpain and friends in Cell spread	6	0.03998	0.29223	0.2 (-)
46	h_gleevecpathway	Inhibition of Cellular Proliferation by Gleevec	12	0.04017	0.20836	0.15 (-)
47	h_At1rPathway	Angiotensin II mediated activation of JNK Pathway via Pyk2 dependent signaling	8	0.04043	0.33593	0.205 (-)
48	h_egfPathway	EGF Signaling Pathway	11	0.0445	0.27285	0.165 (-)
49	h_TPOPathway	TPO Signaling Pathway	11	0.0445	0.27285	0.165 (-)
50	h_igf1mtorpathway	Skeletal muscle hypertrophy is regulated via AKT/mTOR pathway	8	0.06325	0.00429	0.06 (+)
51	h_ghrelinPathway	Ghrelin: Regulation of Food Intake and Energy Homeostasis	13	0.06437	0.00123	0.04 (+)
52	h_hdacPathway	Control of skeletal myogenesis by HDAC & calcium/calmodulin-dependent kinase (CaMK)	9	0.08063	0.00246	0.045 (+)
53	h_nfataPathway	NFAT and Hypertrophy of the heart (Transcription in the broken heart)	14	0.08248	0.02688	0.07 (+)
54	h_alkPathway	ALK in cardiac myocytes	12	0.12465	0.02673	0.21 (+)
55	h_alternativePathway	Alternative Complement Pathway	6	0.16703	0.27932	0.03 (+)
56	h_slrpPathway	Small Leucine-rich Proteoglycan (SLRP) molecules	5	0.1816	0.03064	0.08 (+)
57	h_g2Pathway	Cell Cycle: G2/M Checkpoint	10	0.25302	0.00971	0.05 (+)
58	h_ndkDynaminPathway	Endocytotic role of NDK, Phosphins and Dynamin	5	0.40691	0.36735	0.04 (+)
59	h_compPathway	Complement Pathway	9	0.43052	0.56419	0.035 (+)
60	h_reckPathway	Inhibition of Matrix	9	0.59938	0.00703	0.445 (-)

#### Metalloproteinases

**Legenda:** Rumeno označene genske skupine so statistično značilno različno izražene samo v pljučnem tkivu bolnikov, modro označene genske skupine so statistično značilno različno izražene tudi v fibroblastih. Vzorci: SSc-ILD (n=14)/K(n=4)  $p < 0,05$ .

Priloga 7: Seznam signifikantno povišano izraženih genov v pljučnem tkivu SSc/K z upoštevanjem le tistih genskih skupin (Biocarta Pathway), ki so bila signifikantno različno izražena le v celicah pljučnega tkiva in ne v fibroblastih.

	<b>Geom sredina intenz. kontrol</b>	<b>Geom sredina intenz. SSc-ILD</b>	<b>Razmerje spremembe</b>	<i>Ime gena</i>
1	105.13	484.23	0.22	<i>IGF1</i>
2	144.25	468.99	0.31	<i>IGF1</i>
3	100.42	296.06	0.34	<i>BMP4</i>
4	22.89	60.89	0.38	<i>CCNB1</i>
5	231.63	575.84	0.4	<i>IGFBP2</i>
6	101.12	246.95	0.41	<i>IGFBP5</i>
7	135.24	301.2	0.45	<i>IGFBP3</i>
8	108.15	233.29	0.46	<i>CASP6</i>
9	721.49	1557.9	0.46	<i>CXCL12</i>
10	1814.65	3931.77	0.46	<i>DCN</i>
11	96.77	207.07	0.47	<i>C5</i>
12	2511.36	5310.86	0.47	<i>DCN</i>
13	1569.58	3292.73	0.48	<i>C7</i>
14	128.89	257.9	0.5	<i>CRK</i>
15	357.09	686.63	0.52	<i>NME1</i>
16	4173.74	7728.18	0.54	<i>DCN</i>
17	21.65	40.22	0.54	<i>HGF</i>
18	277.88	508.3	0.55	<i>IGFBP4</i>
19	176.28	318.22	0.55	<i>EIF4E</i>
20	1550.66	2723.49	0.57	<i>CFD</i>
21	866.96	1487.43	0.58	<i>MET</i>
22	47.33	81.36	0.58	<i>NFATC3</i>
23	50.04	84.56	0.59	<i>ATM</i>
24	154.69	252.7	0.61	<i>HGF</i>

Priloga 8: Seznam signifikantno znižano izraženih genov v pljučnem tkivu SSc/K z upoštevanjem le tistih genskih skupin (Biocarta Pathway), ki so bila signifikantno različno izražena le v celicah pljučnega tkiva in ne v fibroblastih.

	<b>Geom sredina intenz. kontrol</b>	<b>Geom sredina intenz. SSc-ILD</b>	<b>Razmerje spremembe</b>	<b>Ime gena</b>
1	1724.92	95.51	18.06	<i>IL6</i>
2	2362.1	417.66	5.66	<i>FOS</i>
3	2746.2	518.74	5.29	<i>MAFF</i>
4	7575.94	1780.6	4.25	<i>NFKBIA</i>
5	2195.12	522.51	4.2	<i>CCL2</i>
6	1149.69	282.93	4.06	<i>PTGS2</i>
7	512.21	134.13	3.82	<i>MAFF</i>
8	8292.52	2203.77	3.76	<i>DUSP1</i>
9	798.02	232.16	3.44	<i>HBEGF</i>
10	1785.27	574.78	3.11	<i>JUN</i>
11	333.31	110.37	3.02	<i>IL1B</i>
12	855.94	287.94	2.97	<i>EDNI</i>
13	1236.13	421.29	2.93	<i>LMNA</i>
14	854.13	291.86	2.93	<i>HBEGF</i>
15	373.4	128.01	2.92	<i>IL18R1</i>
16	44.99	15.59	2.89	<i>IL1A</i>
17	782.45	273.08	2.87	<i>CCL4</i>
18	1330.76	473.29	2.81	<i>AKAP13</i>
19	190.41	67.74	2.81	<i>JUN</i>
20	638.86	230.74	2.77	<i>JUN</i>
21	332.74	121.68	2.73	<i>DUSP4</i>
22	2929.12	1091.58	2.68	<i>DUSP6</i>
23	949.04	360.95	2.63	<i>BMP2</i>
24	56.26	22.03	2.55	<i>CFLAR</i>
25	509.06	210.59	2.42	<i>ADRB2</i>
26	1165.55	482.08	2.42	<i>EDNRB</i>
27	1119.87	465.34	2.41	<i>AKAP13</i>
28	615.93	259.07	2.38	<i>EZR</i>
29	1748.42	735.16	2.38	<i>TIMP3</i>
30	124.07	53.83	2.31	<i>IL6ST</i>
31	3791.02	1708.98	2.22	<i>DUSP6</i>
32	2929.7	1327.88	2.21	<i>JUN</i>
33	824.06	372.8	2.21	<i>MYC</i>
34	1777.5	816.28	2.18	<i>CDKN1A</i>
35	1558.27	729.49	2.14	<i>DUSP6</i>
36	109.21	51.33	2.13	<i>AKAP13</i>
37	62.94	29.74	2.12	<i>PIK3R1</i>
38	427.99	201.66	2.12	<i>BIRC3</i>
39	988	478.93	2.06	<i>EDNRB</i>
40	188.35	91.96	2.05	<i>AKAP13</i>
41	1668.79	820.38	2.03	<i>FOXO3</i>
42	85.29	42.33	2.01	<i>BMP2</i>
43	321.33	168.51	1.91	<i>EZR</i>
44	3054.51	1607.36	1.9	<i>EZR</i>
45	337.04	178.55	1.89	<i>CASP4</i>
46	261.9	139.41	1.88	<i>IL6R</i>
47	548.04	300.84	1.82	<i>CREM</i>
48	105.59	59.36	1.78	<i>IL6ST</i>
49	1190.04	669.44	1.78	<i>INSR</i>
50	473.65	273.81	1.73	<i>PRF1</i>

51	90.08	53.35	1.69	<i>CITED2</i>
52	900.47	534.78	1.68	<i>EZR</i>
53	766.85	492.36	1.56	<i>CFLAR</i>

Priloga 9: Signalne poti z različno gensko izraženostjo v pljučnem tkivu bolnikov.

<b>Genske skupine signalnih poti (Biocarta Pathway)</b>
AKT Signaling Pathway
ALK in cardiac myocytes
Alternative Complement Pathway
Angiotensin II mediated activation of JNK Pathway via Pyk2 dependent signaling
ATM Signaling Pathway
Cadmium induces DNA synthesis and proliferation in macrophages
Cell Cycle: G2/M Checkpoint
Control of skeletal myogenesis by HDAC & calcium/calmodulin-dependent kinase (CaMK)
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and beta 2 adrenergic receptor (b2AR) pathway
Endocytotic role of NDK, Phosphins and Dynamin);
EPO Signaling Pathway
FAS signaling pathway ( CD95 )
Ghrelin: Regulation of Food Intake and Energy Homeostasis
IGF-1 Signaling Pathway
IL12 and Stat4 Dependent Signaling Pathway in Th1 Development
Inhibition of Cellular Proliferation by Gleevec
Inhibition of Matrix Metalloproteinases
Insulin Signaling Pathway
Links between Pyk2 and Map Kinases
mCalpain and friends in Cell motility
Mechanism of Gene Regulation by Peroxisome Proliferators via PPARa(alpha)
METS affect on Macrophage Differentiation
Nerve growth factor pathway (NGF)
NFAT and Hypertrophy of the heart (Transcription in the broken heart)
Oxidative Stress Induced Gene Expression Via Nrf2
Pertussis toxin-insensitive CCR5 Signaling in Macrophage

---

Regulation of MAP Kinase Pathways Through Dual Specificity Phosphatases

---

Repression of Pain Sensation by the Transcriptional Regulator DREAM

---

Rho-Selective Guanine Exchange Factor AKAP13 Mediates Stress Fiber Formation

---

Role of EGF Receptor Transactivation by GPCRs in Cardiac Hypertrophy

---

Role of ERBB2 in Signal Transduction and Oncology

---

Signal transduction through IL1R

---

Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor

---

Signaling Pathway from G-Protein Families

---

Skeletal muscle hypertrophy is regulated via AKT/mTOR pathway

---

Small Leucine-rich Proteoglycan (SLRP) molecules

---

T Cell Receptor Signaling Pathway

---

The IGF-1 Receptor and Longevity

---

TNFR1 Signaling Pathway

---

uCalpain and friends in Cell spread

**Legenda:** Seznam genskih skupin (Biocarta Pathway), pri katerih smo dokazali statistično značilno razliko izražanja med bolniki in kontrolno skupino samo v celicah pljučnega tkiva in ne v fibroblastih in so bile uporabljene kot dodatno filtriranje v drugem sklopu analiziranja podatkov.



Priloga 10: Seznam bioloških poti v katere so vključeni statistično značilno zvišano izraženi fibroblasti pljučnega tkiva bolnikov s SSc

Pathway name	Entities				Reactions	
	found	ratio	p-value	FDR*	found	ratio
Mitotic Prometaphase	36 / 207	0.015	1.11e-16	1.57e-14	13 / 15	0.001
Resolution of Sister Chromatid Cohesion	31 / 134	0.01	1.11e-16	1.57e-14	6 / 8	6.79e-04
Mitotic Metaphase and Anaphase	35 / 211	0.015	1.11e-16	1.57e-14	9 / 12	0.001
Mitotic Anaphase	35 / 208	0.015	1.11e-16	1.57e-14	8 / 11	9.33e-04
Cell Cycle, Mitotic	60 / 570	0.041	1.11e-16	1.57e-14	185 / 322	0.027
Cell Cycle	63 / 682	0.049	1.11e-16	1.57e-14	214 / 411	0.035
RHO GTPases Activate Formins	31 / 149	0.011	1.11e-16	1.57e-14	12 / 27	0.002
Separation of Sister Chromatids	33 / 194	0.014	3.33e-16	4.10e-14	5 / 8	6.79e-04
M Phase	44 / 390	0.028	7.33e-15	7.99e-13	47 / 66	0.006
G2/M Transition	30 / 212	0.015	7.46e-13	7.31e-11	64 / 78	0.007
Mitotic G2-G2/M phases	30 / 214	0.015	9.40e-13	8.37e-11	66 / 80	0.007
RHO GTPase Effectors	36 / 316	0.023	1.82e-12	1.49e-10	43 / 107	0.009
Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	14 / 37	0.003	5.20e-12	3.95e-10	6 / 6	5.09e-04
Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC	13 / 30	0.002	5.73e-12	4.01e-10	2 / 2	1.70e-04
The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint	18 / 83	0.006	4.34e-11	2.82e-09	10 / 10	8.48e-04
Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane	11 / 22	0.002	5.53e-11	3.38e-09	1 / 2	1.70e-04
Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	12 / 29	0.002	6.32e-11	3.66e-09	2 / 2	1.70e-04
Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes	19 / 97	0.007	6.83e-11	3.69e-09	2 / 2	1.70e-04
Mitotic Spindle Checkpoint	20 / 110	0.008	7.80e-11	4.06e-09	7 / 7	5.94e-04
Transport of connexons to the plasma membrane	11 / 23	0.002	8.80e-11	4.31e-09	1 / 3	2.54e-04
Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAD2 inhibitory signal	18 / 94	0.007	3.10e-10	1.36e-08	4 / 4	3.39e-04
Amplification of signal from the kinetochores	18 / 94	0.007	3.10e-10	1.36e-08	4 / 4	3.39e-04
COPI-mediated anterograde transport	19 / 107	0.008	3.43e-10	1.41e-08	11 / 12	0.001
Golgi-to-ER retrograde transport	22 / 148	0.011	3.73e-10	1.45e-08	12 / 18	0.002

Priloga 11: Seznam bioloških poti v katere so vključeni statistično značilno znižano izraženi fibroblasti pljučnega tkiva bolnikov s SSc

Pathway name	Entities				Reactions	
	found	ratio	p-value	FDR*	found	ratio
Endosomal/Vacuolar pathway	75 / 82	0.006	1.11e-16	8.10e-15	4 / 4	3.39e-04
Interferon gamma signaling	124 / 250	0.018	1.11e-16	8.10e-15	15 / 15	0.001
Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC	78 / 102	0.007	1.11e-16	8.10e-15	15 / 16	0.001
ER-Phagosome pathway	83 / 164	0.012	1.11e-16	8.10e-15	9 / 10	8.48e-04
Interferon Signaling	171 / 392	0.028	1.11e-16	8.10e-15	52 / 66	0.006
Class I MHC mediated antigen processing & presentation	95 / 464	0.033	1.11e-16	8.10e-15	37 / 48	0.004
Antigen processing-Cross presentation	84 / 186	0.013	1.11e-16	8.10e-15	14 / 23	0.002
Interferon alpha/beta signaling	139 / 184	0.013	1.11e-16	8.10e-15	12 / 20	0.002
Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	80 / 316	0.023	1.11e-16	8.10e-15	17 / 43	0.004
Immune System	273 / 2,641	0.189	1.11e-16	8.10e-15	577 / 1,493	0.127
Cytokine Signaling in Immune system	217 / 1,055	0.075	1.11e-16	8.10e-15	246 / 639	0.054
Adaptive Immune System	115 / 997	0.071	1.11e-16	8.10e-15	84 / 261	0.022
Attenuation phase	13 / 47	0.003	4.62e-08	3.10e-06	3 / 5	4.24e-04
HSF1-dependent transactivation	13 / 59	0.004	5.92e-07	3.73e-05	4 / 8	6.79e-04
Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes	16 / 94	0.007	9.09e-07	5.27e-05	25 / 31	0.003
HSF1 activation	11 / 43	0.003	1.05e-06	5.79e-05	1 / 7	5.94e-04
Signaling by Interleukins	50 / 640	0.046	1.31e-06	6.69e-05	174 / 491	0.042
Interleukin-10 signaling	15 / 86	0.006	1.48e-06	7.24e-05	8 / 15	0.001
ISG15 antiviral mechanism	12 / 83	0.006	9.63e-05	0.004	16 / 16	0.001
OAS antiviral response	5 / 15	0.001	2.94e-04	0.013	9 / 15	0.001
Regulation of HSF1-mediated heat shock response	13 / 111	0.008	3.81e-04	0.016	7 / 14	0.001
Innate Immune System	73 / 1,302	0.093	4.24e-04	0.017	266 / 651	0.055
Negative regulators of DDX58/IFIH1 signaling	7 / 36	0.003	5.00e-04	0.019	11 / 13	0.001
Interleukin-6 signaling	5 / 17	0.001	5.18e-04	0.019	17 / 19	0.002
Butyrophilin (BTN) family interactions	4 / 12	8.58e-04	0.001	0.041	2 / 8	6.79e-04

\* False Discovery Rate

Priloga 12: Seznam bioloških poti v katere so vključeni statistično značilno povišano izraženi v drugih celicah pljučnega tkiva bolnikov s SSc

Pathway name	Entities				Reactions	
	found	ratio	p-value	FDR*	found	ratio
Regulation of Complement cascade	30 / 139	0.01	1.11e-16	3.26e-14	27 / 42	0.004
Complement cascade	30 / 156	0.011	1.11e-16	3.26e-14	37 / 71	0.006
Classical antibody-mediated complement activation	21 / 97	0.007	2.00e-15	3.92e-13	2 / 2	1.70e-04
FCGR activation	21 / 103	0.007	6.33e-15	9.30e-13	6 / 6	5.09e-04
Creation of C4 and C2 activators	21 / 111	0.008	2.62e-14	3.07e-12	2 / 8	6.79e-04
Initial triggering of complement	21 / 120	0.009	1.15e-13	1.13e-11	4 / 21	0.002
Role of phospholipids in phagocytosis	21 / 129	0.009	4.47e-13	3.75e-11	5 / 12	0.001
Scavenging of heme from plasma	19 / 106	0.008	1.16e-12	8.46e-11	1 / 12	0.001
CD22 mediated BCR regulation	16 / 72	0.005	3.16e-12	2.05e-10	3 / 4	3.39e-04
Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	22 / 167	0.012	7.29e-12	4.23e-10	4 / 33	0.003
Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation	21 / 158	0.011	1.88e-11	9.99e-10	6 / 24	0.002
Role of LAT2/NTAL/LAB on calcium mobilization	17 / 107	0.008	1.14e-10	5.60e-09	2 / 7	5.94e-04
Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers	16 / 103	0.007	5.59e-10	2.52e-08	10 / 25	0.002
Fc gamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis	21 / 193	0.014	6.75e-10	2.83e-08	17 / 42	0.004
FCERI mediated MAPK activation	17 / 123	0.009	9.18e-10	3.58e-08	2 / 20	0.002
FCERI mediated Ca <sup>2+</sup> mobilization	17 / 129	0.009	1.85e-09	6.67e-08	2 / 11	9.33e-04
Cell surface interactions at the vascular wall	23 / 256	0.018	3.78e-09	1.27e-07	5 / 64	0.005
FCERI mediated NF- $\kappa$ B activation	17 / 175	0.013	1.46e-07	4.66e-06	1 / 19	0.002
Signaling by the B Cell Receptor (BCR)	16 / 190	0.014	2.13e-06	6.40e-05	13 / 43	0.004
Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	21 / 316	0.023	2.36e-06	6.84e-05	5 / 43	0.004
Fc epsilon receptor (FCERI) signaling	17 / 234	0.017	7.10e-06	1.99e-04	12 / 63	0.005
Signaling by FGFR2 IIIa TM	5 / 24	0.002	1.42e-04	0.004	2 / 2	1.70e-04
FGFR2 mutant receptor activation	6 / 48	0.003	4.75e-04	0.012	17 / 18	0.002
Terminal pathway of complement	3 / 8	5.72e-04	6.08e-04	0.015	5 / 5	4.24e-04
ER to Golgi Anterograde Transport	23 / 164	0.012	4.47e-10	1.61e-08	29 / 39	0.003

\* False Discovery Rate

Priloga 13: Seznam bioloških poti v katere so vključeni statistično značilno znižano izraženi v drugih celicah pljučnega tkiva bolnikov s SSc

Pathway name	Entities				Reactions	
	found	ratio	p-value	FDR*	found	ratio
Signaling by Interleukins	38 / 640	0.046	1.92e-09	1.55e-06	50 / 491	0.042
Circadian Clock	14 / 101	0.007	2.20e-08	8.87e-06	30 / 59	0.005
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	18 / 211	0.015	3.14e-07	8.41e-05	5 / 46	0.004
Cytokine Signaling in Immune system	45 / 1,055	0.075	9.17e-07	1.61e-04	67 / 639	0.054
Metallothioneins bind metals	6 / 16	0.001	1.00e-06	1.61e-04	14 / 27	0.002
Response to metal ions	6 / 21	0.002	4.72e-06	6.32e-04	14 / 31	0.003
RAF-independent MAPK1/3 activation	6 / 28	0.002	2.36e-05	0.003	4 / 12	0.001
Signaling by NTRK1 (TRKA)	9 / 90	0.006	9.14e-05	0.009	12 / 58	0.005
Signaling by TGF-beta family members	10 / 114	0.008	1.09e-04	0.01	22 / 107	0.009
Negative regulation of MAPK pathway	6 / 45	0.003	3.08e-04	0.025	7 / 12	0.001
Interleukin-10 signaling	8 / 86	0.006	3.60e-04	0.026	2 / 15	0.001
Interleukin-6 signaling	4 / 17	0.001	3.97e-04	0.027	16 / 19	0.002
Signaling by NTRKs	9 / 115	0.008	5.43e-04	0.034	19 / 120	0.01
Signaling by FGFR1 in disease	6 / 53	0.004	7.22e-04	0.041	27 / 35	0.003
SOS-mediated signalling	3 / 9	6.44e-04	8.11e-04	0.041	2 / 2	1.70e-04
Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK	4 / 23	0.002	0.001	0.044	6 / 9	7.63e-04
Downstream signaling of activated FGFR1	5 / 41	0.003	0.001	0.044	24 / 24	0.002
Signaling by TGF-beta Receptor Complex	7 / 85	0.006	0.002	0.044	12 / 82	0.007
EGFR Transactivation by Gastrin	3 / 12	8.58e-04	0.002	0.044	4 / 6	5.09e-04
MAPK1 (ERK2) activation	3 / 12	8.58e-04	0.002	0.044	1 / 3	2.54e-04
IRS-mediated signalling	6 / 64	0.005	0.002	0.044	4 / 9	7.63e-04
ERK/MAPK targets	4 / 26	0.002	0.002	0.044	3 / 7	5.94e-04
Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)	7 / 89	0.006	0.002	0.045	12 / 22	0.002
MAPK3 (ERK1) activation	3 / 13	9.30e-04	0.002	0.045	1 / 4	3.39e-04
IRS-related events triggered by IGF1R	6 / 68	0.005	0.003	0.045	5 / 11	9.33e-04

\* False Discovery Rate