

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Imunologie



MUDr. Lenka Pleštilová

**Molekulární aspekty muskuloskeletálních onemocnění
a význam malých regulačních RNA**

Molecular aspects of musculoskeletal diseases
and the role of small regulatory RNAs

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Vencovský, DrSc.

Konzultant: Astrid Jüngel, PhD, PD

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 14. 10. 2015

Lenka Pleštilová

.....

Identifikační záznam:

PLEŠTILOVÁ, Lenka. *Molekulární aspekty muskuloskeletálních onemocnění a význam malých regulačních RNA. [Molecular aspects of musculoskeletal diseases and the role of small regulatory RNAs]*. Praha, 2015. 131s., Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika revmatologie / Revmatologický Ústav. Vedoucí práce Vencovský, Jiří

Poděkování

Děkuji svému školiteli Prof. Jiřímu Vencovskému z Revmatologického ústavu za skvělé vedení, užitečné rady a pravidelné diskuze, moc si Vás pane profesore vážím. Děkuji Prof. Ladislavu Šenoltovi, který mě přivedl k revmatologii a do Revmatologického ústavu a následně mi umožnil navštívit Centrum experimentální revmatologie v Zurichu. Velké díky patří i vedoucím obou institucí Prof. Karlu Pavelkovi, Prof. Steffanu Gayovi a Prof. Renate Gay za jejich podporu. Moc děkuji i Dr. Astrid Jüngel, PD a Prof. Michelu Neidhartovi z Centra experimentální revmatologie v Zurichu, kteří mě uvedli do světa epigenetiky.

Jsem vděčná všem kolegům a přátelům z obou laboratoří. Marku, Olinko, Martine, Lucko, Martino, Markéto, Mário, Michale, Mojco, Anno, Borbolo, Fang Fang, Clare, Emmanueli, Caroline, Kerstin a Beo, byla radost s Vámi pracovat a učit se od Vás.

Poslední a největší poděkování patří mé rodině. Mamko, tat'ko, Andulko moc moc moc děkuju za všechno a mám vás moc ráda. Guigui, merci pour tout et je t'aime.

Lenka

ABSTRAKT

Revmatologická onemocnění bývají chronická, bolestivá a do určité míry invalidizující. Porozumění mechanismům jejich patogeneze je zatím velmi neúplné. Hyper-reaktivní imunitní systém a porucha autotolerance jsou zřejmě doplněny lokálními faktory, které způsobí, že některé klouby/svaly bývají postižené více a jiné méně. Vše je výsledkem složité sítě interakcí mezi imunitními buňkami, kloubními fibroblasty, chondrocyty, osteocyty, myocyty a dalšími buňkami.

V předložené dizertační práci jsem se zaměřila na tři molekulární aspekty patogeneze revmatologických onemocnění: regulační RNA, S100 proteiny a autoprotilátky. V teoretické části jsem shrnula, co je známo o vzniku, funkci a významu těchto molekul v revmatologii. Ve výzkumné části předkládám šest originálních publikací a jedno review o roli těchto molekul při vývoji revmatoidní artritidy (RA) a idiopatické zánětlivé myopatie (IZM).

Mezi hlavní výsledky práce patří studie popisující expresi PIWI-interagujících RNA (piRNA) v synoviálních fibroblastech pacientů s RA. piRNA jsou malé regulační RNA, které v komplexu s PIWI proteiny regulují genovou expresi a tlumí transpozomy. Expresie piRNA molekul byla dlouho považována za výhradní vlastnost zárodečných a nádorových buněk. My jsme detekovali 268 piRNA molekul v RA synoviálních fibroblastech (SF), a popsali jejich deregulaci v porovnání se SF od pacientů s osteoartrózou. Dále popisujeme přítomnost PIWI4 proteinu v jádře synoviálních fibroblastů a jeho regulaci prozánětlivými cytokiny a TLR-ligandy. V dalších studiích jsme zkoumali možné využití cirkulujících miRNA jako biomarkerů u IZM a S100A8/9 jako biomarkeru u časně RA. Při výzkumu role S100A4 proteinu zvaného metastazín se nabízela souvislost s malignitou u pacientů s IZM (tzv. cancer associated myositis). Tuto jsme však nepotvrdili, popsali jsme ale překvapivou korelaci sérových hladin S100A4 s aktivitou základního onemocnění. Výsledky stanovení autoprotilátek metodou radioimunoprecipitace byly využity pro popisnou studii o autoprotilátkových asociacích a klinické podobě artritidy jako symptomu IZM a dále pro zprávu o stoupající incidenci imunitně podmíněné nekrotizující myopatie.

Výsledky této práce by měly přispět k lepšímu pochopení patogeneze muskuloskeletálních onemocnění a zlepšení jejich léčby.

Klíčová slova:

Revmatoidní artritida, myozitida, miRNA, piRNA, S100 proteiny, autoprotilátky

ABSTRACT

Rheumatic diseases are common, usually chronic, painful and to some extent invalidating medical conditions. Understanding of the disease pathogenesis is still very fragmentary. Hyperreactivity of the immune system and defect of autotolerance are probably contributed by local factors, which helps to explain, why some joints/muscles are more affected than others. All this results from a complex net of interactions between immune cells, synovial fibroblasts, chondrocytes, osteocytes, myocytes and other cells.

In the submitted PhD thesis I have focused on three groups of molecules: regulatory RNAs, S100 proteins and autoantibodies. In the theoretical part, I sum up the current knowledge on their biogenesis, function and the role in rheumatology. In the investigative part, I present six original publications and one review on the role of those molecules in development of rheumatoid arthritis (RA) and idiopathic inflammatory myositis (IIM).

One of the main studies was focused on expression of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in RA synovial fibroblasts (SF). piRNAs are small regulatory RNAs which in complex with PIWIL proteins regulate gene expression and silence transposons. piRNA expression was considered to be limited to germline and cancer cells. We have found 267 PIWI-interacting RNAs to be expressed in RA synovial fibroblasts and described their deregulation when compared to osteoarthritis SF. We have also described the presence of PIWIL4 protein in the nuclei of synovial fibroblasts and its regulation by proinflammatory cytokines and TLT-ligands. We have also studied a possible use of microRNAs as biomarkers in IIM and use of S100A8/9 as biomarker in early RA. When investigating the function of S100A4, a protein also known as metastasin, a possible link with malignancy in cancer associated myositis was considered. We were not able to confirm this association, but somewhat surprisingly, we observed a correlation of the S100A4 serum levels with clinical activity in myositis. Autoantibody results detected by the radioimmunoprecipitation method were used for a descriptive study on autoantibodies associations and clinical form of arthritis in IIM and for a report on the increasing incidence of the immune mediated necrotizing myopathy.

Results of this PhD. thesis aim to improve our understanding of pathogenesis of musculoskeletal diseases and their treatment.

Key words:

Rheumatoid arthritis, myositis, microRNA, piRNA, S100 proteins, autoantibodies

OBSAH

1. Předmluva	3
2. Úvod	4
2.1. Revmatoidní artritida (RA)	4
2.1.1. Klinický obraz RA	4
2.1.2. Genetická predispozice u RA	5
2.1.3. Vlivy prostředí zvyšující riziko vývoje RA	6
2.1.4. Patogeneze RA	6
2.1.5. Současná léčba RA	12
2.2. Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM)	13
2.2.1. Klinický obraz IZM	13
2.2.2. Genetická predispozice u IZM	14
2.2.3. Vlivy prostředí zvyšující riziko vývoje IZM	14
2.2.4. Patogeneze IZM	15
2.2.5. Současná léčba IZM	17
2.3. Další revmatologická (muskuloskeletální) onemocnění	18
2.4. Molekulární aspekty patogeneze muskuloskeletálních onemocnění	20
2.4.1. Malé regulační RNA	20
2.4.1.1. Malé regulační RNA u RA	23
2.4.1.2. Malé regulační RNA u IZM	24
2.4.1.3. Malé regulační RNA u dalších revmatologických onemocnění	24
2.4.2. S100 proteiny	26
2.4.2.1. S100 proteiny u RA	27
2.4.2.2. S100 protein u IZM	27
2.4.2.3. S100 proteiny u dalších revmatologických onemocnění	27
2.4.3. Autoprotilátky	29
2.4.3.1. Autoprotilátky u RA	31
2.4.3.2. Autoprotilátky u IZM	32
2.4.3.3. Autoprotilátky u dalších revmatologických onemocnění	35

3. Cíle doktorské práce	36
4. Výsledky a diskuze	37
4.1. Regulační RNA	38
4.1.1. PIWI/piRNA systém u revmatoidní artritidy	38
4.1.2. Cirkulující miRNA jsou asociovány s aktivitou myozitidy	66
4.2. S100 Proteiny	75
4.2.1. Zvýšení sérových hladin S100A4 proteinu při vysoké klinické aktivitě myozitidy, nikoli při přítomnosti malignity	75
4.2.2. Normalizace hladin S100A8/9 po zahájení léčby u pacientů s časnou RA	85
4.3. Autoprotilátky	95
4.3.1. Přehledový článek o anti-PM-Scl autoprotilátkách	95
4.3.2. Autoprotilátky ovlivňují incidenci artritidy při idiopatické myozitidě	101
4.3.3. Stoupající incidence imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie	110
5. Závěr	116
6. Použitá literatura	118
7. Seznam zkratk	128
8. Seznam publikací	130

1. Předmluva

Hlavní motivací mého doktorského studia byla snaha nahlédnout do výzkumné laboratoře, naučit se základní laboratorní techniky, a získat tak představu, co stojí za přehledně sepsanými fakty v učebnicích, za léky v barevných krabičkách. Nevím, jestli jsem svým nahlížením nějak přispěla pochopení patogeneze revmatologických onemocnění, ale snažila jsem se o to. Měla jsem to štěstí, že jsem mohla pracovat na různých projektech a v různých týmech, to mi rozšířilo nejenom vědecký obzor, i když snad na úkor jednodlosti doktorské práce.

Následující text shrnuje moje výsledky, kdy jsem se s pomocí mnoha lidí dívala ze třech různých úhlů (regulační RNA, S100 proteiny a autoprotilátky) na dvě revmatologická onemocnění (revmatoidní artritidu a idiopatické zánětlivé myopatie).

Průběh doktorského studia

Doktorské studium jsem zahájila v říjnu 2010 v Revmatologickém ústavu (RÚ) v Praze.

Pod laskavým vedením prof. Vencovského jsem se zabývala autoprotilátkami u idiopatických zánětlivých myopatií. Zaváděla jsem metodu radioimunoprecipitace, učila se vyšetřovat pacienty s myozitidou a zadávala klinická data do výzkumné databáze Euromyositis. Byla jsem u vzniku tohoto klinického registru a spolupracovala s informatikem na jeho zdokonalování. Prof. Vencovský mě také uvedl do velmi vstřícné mezinárodní komunity vědců zkoumajících myozitidu, učil mě prezentaci vědeckých výsledků a nechal mě nahlédnout do zákulisí organizace mezinárodního vědeckého kongresu EWRR 2013.

O rok později jsem začala částečně pracovat v laboratoři prof. Šenolta v RÚ. Zde jsem se učila pracovat s buněčnými kulturami primárních synoviálních fibroblastů, provádět stimulační experimenty a základní techniky molekulární biologie. Pod příkladným vedením prof. Šenolta jsem pracovala na projektech zkoumajících S100 proteiny a pomáhala s projekty týkajícími se adipocytokinů (resistin, visfatin).

Po třech skvělých letech v RÚ jsem dostala možnost odjet na tříletou výzkumnou stáž v Center of Experimental Rheumatology v Zürichu. Druhou polovinu doktorského studia jsem tedy strávila v srdci Švýcarska ve velmi mezinárodní výzkumné skupině prof. Steffena Gaye a snažila se porozumět významu epigenetiky u revmatologických onemocnění. Vedena svojí školitelkou-konzultantkou Dr. Astrid Jüngel jsem pracovala na projektu zkoumajícím PIWI-interagující RNA u revmatoidní artritidy.

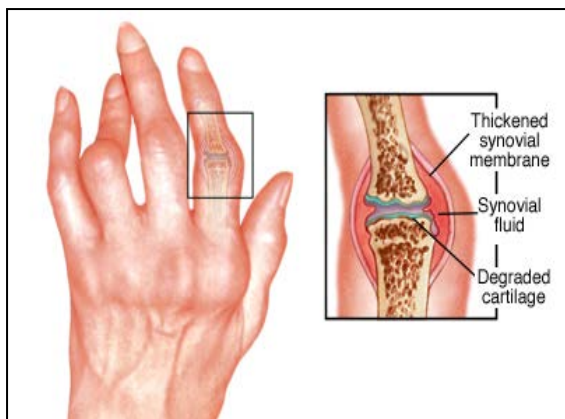
2. Úvod

2.1. Revmatoidní artritida (RA)

Revmatoidní artritida je chronické systémové autoimunitní onemocnění, které ve vyspělých zemích postihuje 0,5-1% obyvatel. Postiženy jsou častěji ženy než muži, a onemocnění začíná většinou po 40. roce věku, i když dřívější začátek není neobvyklý [1, 2].

2.1.1. Klinický obraz RA

RA se klinicky projevuje symetrickou polyartritidou, nejdříve bývají postiženy drobné klouby ruky. Příznaky artritidy jsou otok, bolest a ranní ztuhlost, klouby bývají teplejší a s omezenou pohyblivostí. Následkem chronického zánětu synoviální výstelky kloubů postupně vznikají kloubní deformity. Část pacientů navíc trpí systémovými příznaky (zvýšená teplota, únava) a jinými mimokloubními příznaky (revmatoidní uzly, tenosynovitida, vaskulitida, pleuritida a perikarditida, suchá keratokonjunktivitida a anémie) [3]. Mortalita pacientů s RA je i přes pokroky v léčbě přibližně 1,5-krát zvýšená oproti zdravé populaci, přispívají k ní zejména kardiovaskulární komplikace [4, 5], dále pak infekční onemocnění a postižení plic nebo ledvin [6].



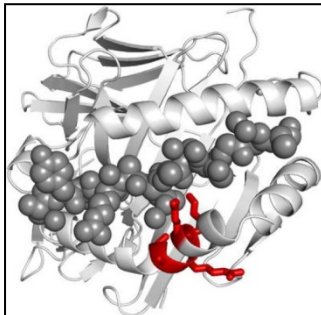
Obrázek 1 Postižení ruky při RA [7]

Artritida proximálních interfalangeálních kloubů a metakarpofalangeálních kloubů s otokem a pozdějším vývojem deformit typu labutí šíše (prsteníček). Na řezu kloubem charakteristické ztlustění synoviální membrány, zmmnožení synoviální tekutiny a degradace chrupavky.

2.1.2. Genetická predispozice u RA

Studie dvojčat diskordantních pro RA ukazují, že více jak 50% rizika vzniku RA lze přičíst genetickým faktorům [8, 9].

Nejdéle známý je vztah polymorfismu v genu HLA-DRB1 ke zvýšenému riziku RA [10]. HLA-DRB1 kóduje β -řetězec HLA-DR molekuly, která patří mezi MHC glykoproteiny II. třídy. Tyto molekuly jsou exprimovány na membráně antigen prezentujících buněk (APC) – nejčastěji dendritických buněk a makrofágů, které na ně váží peptidové fragmenty pohlcených proteinů a za součinnosti kostimulačních molekul stimulují specifické T lymfocyty [11]. Náchylné alely HLA-DRB1*01 a *04 mají shodnou sekvenci aminokyselin (QKRAA, QRRAA, nebo RRRAA) v pozicích 70-74 na třetím hypervariabilním regionu DR β 1 řetězce, tento fenomén se nazývá „sdílený epitop“ [12]. Vazebné místo HLA-DR je složeno z β -listu tvořícího dno, které je ohraničeno stěnami ze dvou α -helixů [13]. Sdílený epitop se nachází na α -helixu ve stěně vazebného místa (Obrázek 2), ovlivňuje tedy výběr peptidů a jejich vazbu na APC i následnou prezentaci T buňkám [14]. Homozygoti pro sdílený epitop mají větší riziko vzniku RA než heterozygoti, nejnižší riziko mají jedinci bez tohoto epitopu [15].



Obrázek 2 HLA-DR molekula se sdíleným epitopem [12]

Krystalografická struktura komplexu HLA-DRB1*04:01 /DRA1*01:01 s peptidovým zbytkem kolagenu II typu (tmavě šedý) znázorňuje vazebné místo tvořené α -helixy HLA-DR α - a β -řetězce se sdíleným epitopem na straně vazebného žlábků (vyznačen čtvercě).

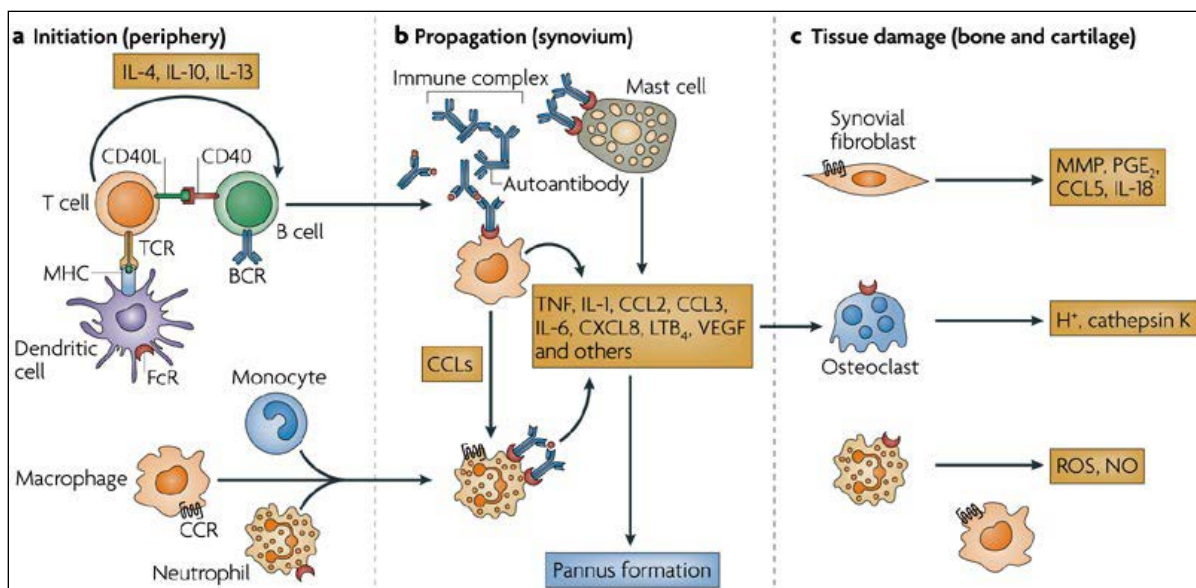
Dalším potvrzeným rizikovým faktorem pro vznik RA je polymorfismus protein tyrosin fosfatázy PTPN22, která má mimo jiné roli v signalizační kaskádě TCR receptoru [16]. Záměna tryptofanu za arginin na pozici aminokyseliny 620 způsobuje nerovnovážnou diferenciaci T buněk s relativním nedostatkem T_{REG} a přebytkem efektorových (autoreaktivních) T buněk. PTPN22 také reguluje odpověď myeloidních buněk (DC a makrofágů) na stimulaci pattern recognition receptors (PRR) [17]. Výše uvedené polymorfismy HLA-DRB1 a PTPN22 spolu s dalšími (TRAF1, STAT4) zvyšují riziko pouze pro RA s pozitivitou anti-CCP protilátek. U anti-CCP negativních pacientů s RA pravděpodobně hrají roli jiné genetické predispozice (polymorfismus PADI4, CLEC7 a s HLA-DRB1*03) [2].

2.1.3. Vlivy prostředí zvyšující riziko vývoje RA

Hlavním rizikovým faktorem prostředí pro vznik RA je kouření [18]. U geneticky predisponovaných jedinců (se sdíleným epitopem na HLA-DRB1) kouření prokazatelně zvyšuje riziko vývoje RA s pozitivitou anti-CCP protilátek [19]. Vdechování křemičitého prachu, minerálních olejů a jiných škodlivin nebo snad i znečištění ovzduší obecně má podobný efekt [20-22]. Inhalované škodliviny způsobí chronický zánět v plicích, z apoptických a zejména nekrotických buněk je uvolňován enzym peptidylarginindeamináza (PAD), ten v proteinech deaminuje arginin a tím jej přeměňuje na citrulin. Citrulinace je zřejmě nespecifický jev doprovázející chronický zánět, probíhá i při paradentóze [23] nebo při synovitidě v kloubech [24]. Již zmíněný sdílený epitop na rizikových alelách HLA-DRB1 velmi dobře prezentuje citrulinované peptidy, takže APC mohou přes tyto specifické MHC gp II. třídy vázat citrulinované peptidy a silně stimulovat specifické T a B lymfocyty. Specifické plazmatické buňky pak tvoří protilátky proti citrulinovaným peptidům (například rutinně vyšetřované anti-CCP, protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu), které zřejmě přispívají k vývoji artritidy při RA [25, 26].

2.1.4. Patogeneze RA

Vznik revmatoidní artritidy je pravděpodobně několikastupňový proces, kdy u geneticky predisponovaného jedince určité faktory prostředí spustí imunitní reakci zahrnující mimo jiné tvorbu protilátek. Tato “iniciační fáze RA” probíhá pravděpodobně vně kloubu. Čas může vlivem úrazu nebo infekce dojít k nasměrování této imunitní reakce proti kloubní tkáni [1]. Děje této “propagační fáze” se odehrávají převážně v synoviu. Synoviální membrána je ve zdravém kloubu tvořena jednou až dvěma vrstvami synoviálních fibroblastů (SF) a makrofágů, které kryjí vnitřní stranu vazivového kloubního pouzdra. Při RA získávají SF agresivní aktivovaný fenotyp, synoviální makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny, zbytněná synoviální tkáň je infiltrována imunitními buňkami a tvoří nadbytek synoviální tekutiny, výsledkem je otok a bolest kloubu [2]. V závěrečné “fázi poškození tkáně” aktivované SF invadují a pomocí metaloproteináz (MMP) narušují chrupavku. Vlivem cytokinového prostředí dochází i k aktivaci osteoklastů a k nezvratnému poškození kosti, tím vznikají pro RA charakteristické deformity. Patogeneze RA je velmi komplexní a zatím jen částečně pochopený děj, v dalším textu se pokusím shrnout příspěvek jednotlivých buněk.



Obrázek 3 Patogeneze RA [27]

Vznik RA je několikastupňový proces:

- Během iniciační fáze DC prezentují autoantigeny autoreaktivním T lymfocytům, které dále aktivují autoreaktivní B lymfocyty. Řetězec vzájemných aktivací se odehrává za účasti cytokinů a kostimulačních molekul pravděpodobně v lymfatických uzlinách, po migraci imunitních buněk do kloubní dutiny však může antigenní prezentace probíhat i v synoviu. Výsledkem stimulace B buněk je tvorba autoprotilátek, které se ve formě imunokomplexů ukládají v kloubní dutině.
- Během propagační fáze imunokomplexy vazbou na Fc receptory aktivují makrofágy, neutrofilů a žírné buňky. To vede k uvolnění prozánětlivých cytokinů a chemokinů, které zvyšují migraci imunitních buněk do kloubu, aktivaci synoviálních fibroblastů a následnému zbytnění synovie (vzniku tzv. pannusu).
- V závěrečné "fázi poškození tkání" jsou vysokými hladinami cytokinů aktivovány SF, osteoklasty, makrofágy a neutrofilů, které uvolňují velké množství proteáz a reaktivních kyslíkových a dusíkatých radikálů. Aktivované SF invadují a pomocí metaloproteináz (MMP) narušují chrupavku. Aktivované osteoklasty svými kyselými enzymy rozrušují mineralizovanou tkáň kosti a proteázami/peptidázami její bílkovinnou složku. Tím dochází k nezvratnému poškození kosti a vznikají pro RA charakteristické deformity.

2.1.4.1. Imunitní buňky u RA

Vlastní synovitida vzniká infiltrací leukocytů do synoviální tkáně, jedná se přitom spíše o migraci než o lokální proliferaci. Migrace leukocytů je usnadněna aktivací endotelových buněk synoviálních kapilár, které tvoří chemokiny a exprimují ve zvýšené míře adhezivní molekuly (integriny, selektiny a další). Lokální hypoxie v zaníceném kloubu navíc přispívá k neoangiogenezi a většímu lokálnímu prokrvení, což dále usnadňuje migraci leukocytů [28].

2.1.4.1.1. Buňky nespecifické imunity u RA

Zanícená synoviální membrána je bohatě infiltrována makrofágy, žírnými buňkami a NK-buňkami, synoviální tekutina navíc obsahuje mnoho neutrofilů a dendritických buněk.

Makrofágy kromě schopnosti apoptózy a následné prezentace antigenu specifickým lymfocytům uvolňují řadu cytokinů (TNF- α , IL-1, -6, -12, -15, -18, -23), hydrolytických enzymů, kyslíkových radikálů a oxid dusnatý [28]. Tyto látky za normálních okolností slouží k usmrcení fagocytovaných mikrobů, v prostředí chronického zánětu se však uvolňují do okolní tkáně a poškozují ji [11]. Klinicky úspěšná léčba RA snižuje počet makrofágů v synoviální membráně, což nepřímo potvrzuje jejich význam v patogenezi RA [29].

Pro aktivaci lymfocytů jsou důležité i dendritické buňky (DC) [30]. V synoviální tekutině pacientů s RA se nachází zvýšená koncentrace myeloidních i plasmocytoidních DC [31]. Myeloidní DC produkují IL-12, a tím směřují vývoj T buněk k Th1 subtypu [32], nebo IL-23, čímž směřují diferenciaci T buněk k Th17 subtypu [33]. Plasmocytoidní DC přispívají tvorbou IFN- α , IFN- β , IL-18 a IL-23 ke vzniku lokálního zánětu, zároveň produkcí B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) podporují přežití a diferenciaci autoreaktivních B buněk [33]. Některé studie naopak přikládají plasmocytoidním DC protektivní úlohu u RA [34].

Neutrofilly přispívají k synovitidě tvorbou prostaglandinů, proteáz a kyslíkových radikálů. Mohou prezentovat antigen na MHC gp II. třídy a aktivovat tak další imunitní buňky. Novou hypotézou je příspěvek neutrofilů k vývoji RA mechanismem NETózy [35]. Při akutním zánětu aktivované neutrofilly uvolňují do okolí chromatin a baktericidní enzymy granzymů, které společně tvoří Neutrophil Extracellular Traps (NET) schopné zachytit a zabít mikroby [36, 37]. Při RA by se NET obsahující citrulinované histony mohly stát snadným zdrojem autoantigenu pro rozvoj protilátkové reakce [38].

Žírné buňky zřejmě mohou být aktivovány IgE frakcí anticitrulinových protilátek, které přemostí vysokoafinitní IgE receptor FcεRI. To vede k aktivaci a degranulaci mastocytů, uvolnění mediátorů histaminu a heparinu následovanému tvorbou metabolitů kyseliny arachidonové (prostaglandiny, leukotrieny a tromboxany) [39].

2.1.4.1.2. Lymfocyty u RA

Synoviální membrána je při RA infiltrována aktivovanými T [40] i B buňkami [41], u 50% pacientů se v synovii tvoří lymfoidní folikuly, někdy i s germinálními centry [42].

Deplece T buněk nevede ke klinickému zlepšení RA [43], blok kostimulace T lymfocytů biologickým lékem abatacept je však v léčbě RA úspěšný [44]. Zdá se, že u RA více než celkový nadbytek T buněk vadí nerovnováha mezi efektorovými, pomocnými a regulačními podtypy. Tradičně je zdůrazňován význam Th1 buněk, nedávno byla potvrzena přítomnost autoreaktivních Th1 buněk namířených proti citrulinovaným peptidům v krvi pacientů s RA [45]. Zvýšená je zřejmě i aktivita Th17-lymfocytů, které tvoří IL-17, -21, -22 a TNF-α [46]. Interleukin-17 spolu s TNF-α aktivuje synoviální fibroblasty a chondrocyty, což postupně vede k destrukci chrupavky. Cytokiny, které zvyšují diferenciaci Th17 buněk (TGF-β, TNF-α, IL-1β, -6, -21 a -22 tvořené makrofágy a DC) zároveň tlumí diferenciaci Treg. Výsledkem je nerovnovážený, prozánětlivý stav [47]. Cytotoxické CD8+ T buňky snad přispívají k tvorbě ektopických germinálních center v synoviální membráně, ale jejich role v patogenezi RA není příliš zřejmá [48].

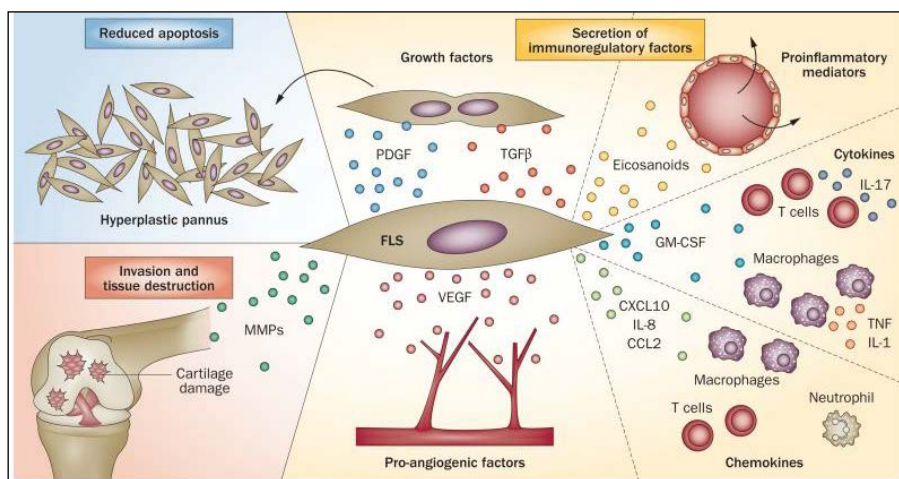
Příspěvek B buněk k patogenezi RA zřejmě nespočívá “pouze” v tvorbě specifických protilátek (RF, anti-CCP a další). Rituximab, monoklonární protilátka proti CD20 znaku, je v léčbě RA klinicky účinná, přestože necílí na plasmatické buňky [49]. Pozdní stádía B buněk (plasmatické buňky), totiž ztrácejí expresi CD20 znaku. Další role B buněk může spočívat v antigenní prezentaci a tvorbě prozánětlivých cytokinů (IL-6, TNF-α) [28].

2.1.4.2. Synoviální fibroblasty u RA

Synoviální fibroblasty (SF; také nazývané fibroblastům podobné synoviocyty) byly dlouho považovány za pasivní účastníky kloubního zánětu při RA, za buňky, které svojí tvorbou cytokinů a metaloproteináz pouze odpovídají na prozánětlivé signály z okolí [50].

Aktivní účast SF na patogenezi RA dokázal experiment publikovaný skupinou profesora S.Gaye roku 1996. Při něm byly lidské RASF implantovány spolu s lidskou chrupavkou do SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) myši. Po 60 dnech, bez jakékoliv účasti imunitních buněk, byla prokázána invaze RASF do zdravé chrupavky. OASF se takto agresivně nechovaly [51]. Pozdější experimenty na SCID myších ukázaly možné šíření RA do dalších kloubů metastazujícími fibroblasty [52].

RASF jsou velmi autonomní buňky – ztrácí kontaktní inhibici, jsou relativně rezistentní k apoptóze a oproti normálním SF snad i rychleji proliferují, čímž se jednovrstevná synoviální membrána přeměňuje v hyperplastický pannus. RASF exprimují TLR-receptory i MHC gp II. třídy, mohou tedy aktivovat specifickou i nespecifickou imunitní odpověď. Tvoří prozánětlivé cytokiny, růstové faktory i chemokiny, kterými podporují migraci imunitních buněk do kloubu. RASF také tvoří tkáňové metaloproteinázy (MMP-1,-3,-8,-13,-14 a -16), kterými destrukují chrupavku. Zejména MMP-14 ničí kolagen II. typu, tím mění architekturu chrupavky a její biomechanické vlastnosti. SF produkují i inhibitory MMP (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), při RA ale tento mechanismus nestačí zvrátit poškození chrupavky [50] (Obrázek 4).



Obrázek 4 Synoviální fibroblasty u RA [50]

RASF méně podléhají apoptóze, čímž vzniká hyperplastický pannus; RASF tvoří MMP, kterými degradují extracelulární matrix; RASF produkují řadu prozánětlivých molekul, růstových faktorů a chemokinů, kterými regulují imunitní odpověď a zvyšují angiogenezi.

Aktivovaný fenotyp je RASF zřejmě vštěpen (anglická literatura popisuje „intrinsic activation” a „imprinted aggressor“ [50]). Na tomto ději se podílí řada epigenetických modifikací, které v důsledku ovlivňují genovou transkripci. Methylace DNA a kovalentní modifikace (methylace, acetylace) histonů mění přístupnost promotoru pro transkripční faktory a tím míru transkripce. Jednotlivé epigenetické modifikace jsou na DNA zapisovány k tomu určenými „writers” proteiny, odstraňovány „erasers” proteiny a rozpoznávány vazbou „readers” proteinů [53]. DNA RASF je průměrně méně methylovaná než DNA OASF, což vede k větší genové transkripci [54]. Totéž bylo zjištěno v PBMC (periferiální mononukleární buňky) pacientů s RA v porovnání s OA pacienty [55]. Změněná methylace byla popsána i na promotorech jednotlivých cytokinů (př. IL-6 [56] a IL-10 [57]). Další zmíněné mechanismy epigenetických modifikací se zřejmě také účastní patogeneze RA. Vlivem TNF- α stimulace stoupá u RASF exprese a aktivita HDAC1 (histon deacetyláza 1) [58], naopak podávání inhibitorů HDAC léčí RA v experimentu [59]. Role miRNA u RA bude shrnuta v kapitole 2.4.1.1.

2.1.4.3. Buňky chrupavky a kosti u RA

Chondrocyty za fyziologických okolností regulují vznik a přestavbu chrupavky, vlivem cytokinů (IL-1 a IL-17) a NO radikálů však podléhají apoptóze. Chrupavka s malým množstvím živých chondrocytů má omezenou schopnost regenerace, matrix degradující enzymy (MMP a další) chrupavku dále ničí, což se na RTG projevuje charakteristickým zúžením kloubní štěrbiny [28].

Kostní eroze jsou způsobeny aktivovanými osteoklasty, které svými kyselými enzymy rozrušují mineralizovanou tkáň kosti a proteázami/peptidázami její bílkovinnou složku. Diferenciace a invaze osteoklastů je stimulována MCSF (macrophage colony stimulating factor) a RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand); prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1, -6 a -17) osteoklasty dále aktivují [60]. Při zlomu kortilální kosti je zánětlivý pannus v kontaktu s kostní dřeví, která je postupně infiltrována B a T buňkami, čímž vzniká na MR viditelná osteitida [61]. Biologická léčba blokující TNF- α , IL-6 nebo RANKL zmenšuje vznik erozí u RA, což potvrzuje význam těchto molekul pro aktivaci osteoklastů [62].

2.1.5. Současná léčba RA

Léčba RA je zaměřena na rychlé snížení zánětu, tím se snažíme předcházet vzniku kloubních deformit a již zmíněných kardiovaskulárních komplikací [63]. Současná léčba se řídí doporučeními odborných společností EULAR (the European League Against Rheumatism) [64], případně ACR (American College of Rheumatology) [65]. Strategie časného aktivního přístupu směřujícího k dosažení předem definovaného terapeutického cíle (“Treat To Target”, TTT) nahrazuje dřívější konzervativní “step-up” přístup [66, 67]. Obvyklým terapeutickým cílem je dosažení remise onemocnění [68].

Hlavním pilířem současné farmakoterapie RA jsou choroby modifikující léky RA (Disease Modifying AntiRheumatic Drugs, DMARD) mezi něž patří nejčastěji používané methotrexát, lefunomid a sulfasalazin [69]. Glukokortikoidy bývají podávány krátkodobě v počátku léčby RA k překlenutí doby nástupu účinku hlavního DMARD. Účinné jsou i intraartikulární aplikace glukokortikoidů, dlouhodobému systémovému podávání glukokortikoidů se pro jejich nežádoucí účinky vyhýbáme [70-72]. Spíše symptomaticky působí při RA nesteroidní antirevmatika či novější coxiby [73]. Biologická léčba je indikována u pacientů s vysokou aktivitou RA neodpovídající na konvenční léčbu DMARD. Nejčastěji jsou používány inhibitory TNF, obvykle v kombinaci s methotrexátem, který zlepšuje efekt biologik a brání tvorbě protilátek namířeným proti těmto terapeutickým protilátkám [74-76]. Dosažení dlouhodobé remise s postupným vysazením farmakoterapie, je, zdá se, u malé skupiny pacientů možné [77, 78].

Další výzkum patogeneze RA přispěje k vývoji lépe molekulárně zacílené terapie. Výzkum biomarkerů umožní výraznější individualizaci léčby u jednotlivých pacientů.

2.2. Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM)

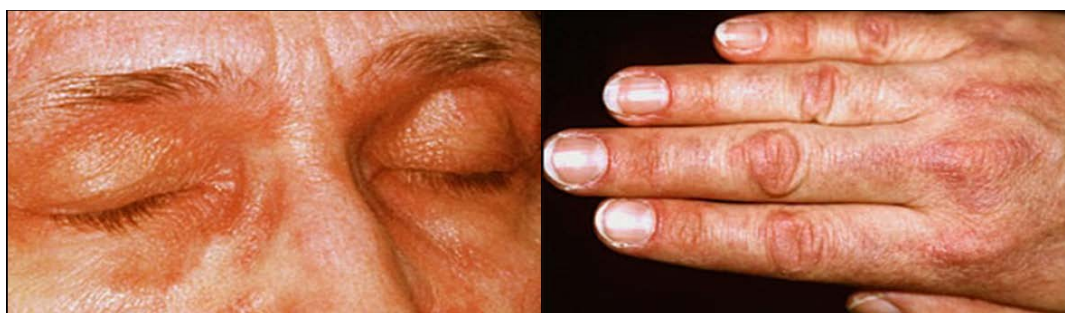
Idiopatické zánětlivé myopatie jsou heterogenní skupinou získaných zánětlivých onemocnění příčně pruhovaného svalstva s častými systémovými příznaky. IZM jsou vzácné nemoci s prevalencí okolo 20/100 000 [79].

2.2.1. Klinický obraz IZM

Ve skupině IZM u dospělých pacientů jsou rozlišovány základní jednotky 1) dermatomyozitida (DM), 2) polymyozitida (PM), 3) imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie (IZNM), 4) myozitida s inkluzními tělísky (inclusion body myositis, IBM) a 5) myozitida v rámci překryvného syndromu s jiným systémovým onemocněním pojiva. Odlišení různorodých IZM od metabolických a neurogenních myopatií může být klinicky obtížné [80].

Vedoucím příznakem IZM bývá nebolestivá proximální svalová slabost. Typické známky v biopsii svalu spolu se zvýšenými hladinami svalových enzymů (kreatinkináza, myoglobin) a patologickým EMG potvrdí svalové poškození. Postiženy mohou být i svaly v horní části jícnu, což vede k dysfagii, nebo dýchací svaly, což může způsobit ventilační insuficienci. Existuje však i amyopatická nebo hypomyopatická myozitida projevující se spíše mimosvalovými příznaky.

Nejzávažnější orgánovou manifestací IZM je intersticiální plicní fibróza, která postihuje až 40% pacientů [81]. Plicní postižení se vyskytuje často v širším kontextu antisynthetázového syndromu, který bude popsán v kapitole 2.3.3.2. Pro DM je charakteristické kožní postižení zahrnující periorbitální exantém, erytém v oblasti výstřihu (V-znamení), na zádech a ramenou (šálový příznak), tzv. Gottronovy papuly nad drobnými klouby ruky a obraz rukou mechanika s rozpraskanými stranami prstů. (Obrázek 6) Zejména u pacientů s DM je v prvních letech po diagnóze IZM zvýšené riziko výskytu onkologického onemocnění [80].



Obrázek 6 Kožní postižení při DM: periorbitální exantém a ruce mechanika [82]

Od diagnózy PM se poslední dobou ustupuje, stává se tzv diagnosis per exclusionem, po vyloučení jiných typů myozitidy, se kterými byla dřív zaměňována [83]. IZNM začíná obvykle rychleji než ostatní IZM a mívá celkově prudší průběh s vysokými hladinami svalových enzymů. Velké množství myoglobinu uvolněného z nekrotických svalů může vést až k selhání ledvin. IBM postihuje obvykle starší muže, rozvíjí se pomalu, postihuje i distální svaly, které záhy atrofují [79].

2.2.2. Genetická predispozice u IZM

Větší riziko vzniku IZM mají lidé s určitými HLA polymorfismy. Jednotlivé polymorfismy jsou navíc asociovány s přítomností určitých protilátek. Například HLA-DRB1*03:01 až 15-krát zvyšuje pravděpodobnost positivity anti-Jo-1 autoprotilátek [84], HLA-DRB1*11:01 je asociován s anti-HMGCR protilátkami [85], asociované HLA-polymorfismy jsou známy i u anti-SRP a dalších autoprotilátek [86].

Pro vznik juvenilní dermatomyositidy predisponují určité varianty promotoru TNF genu, zatímco jiné polymorfismy mají protektivní efekt [87].

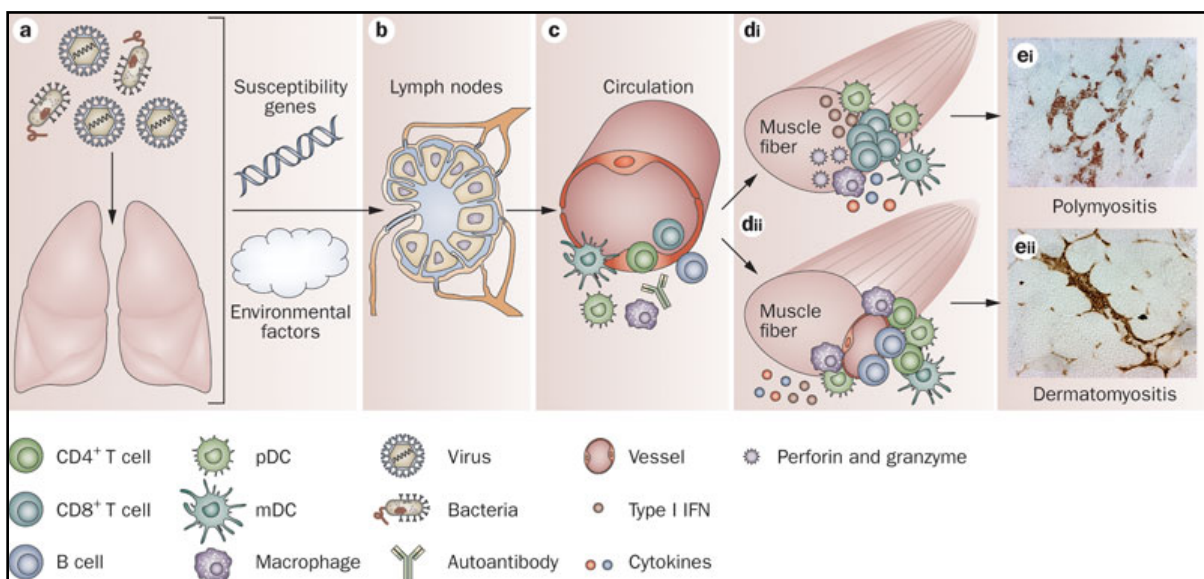
Riziko vzniku IBM zvyšuje přítomnost tzv. ancestrálního haplotypu HLA A1-B8-DR3-DQ2 [88]. Ten je relativně častý zejména v odlehlých oblastech severní Evropy (Skotsko, Island) a predisponuje k řadě autoimunitních onemocnění včetně systémového lupus erythematoses (SLE), celiakie, diabetu nebo autoimunitní hepatitidy [89].

2.2.3. Vlivy prostředí zvyšující riziko vývoje IZM

Silný myopatický efekt má řada léků. Statiny mohou indukovat IZNM [90], zatímco chlorochin, D-penicilamin, ale i kortikoidy vyvolají myopatii, která se zlepší po vysazení léku [91]. IZM vznikají někdy jako paraneoplastická onemocnění, kdy imunitní odpověď se snaží potlačit nádorový proces, ale zřejmě dojde k přesmyku reakce proti vlastním svalovým vláknům [92]. Vznik IZM může být nejspíše vyprovokován virovou infekcí, např. Coxackie viry nebo retroviry, které indukují tvorbu interferonu typu I [79]. Lze se také domnívat, že UV záření přispívá ke vzniku DM. Jednak je vyrážka při DM fotosenzitivní, za druhé se DM vyskytuje častěji v jižních zemích než na severu [93].

2.2.4. Patogeneze IZM

Příčina vzniku IZM není známá (viz jméno idiopatické zánětlivé myopatie), podle různých indicií se však jedná o autoimunitní onemocnění. U IZM je obvyklá přítomnost autoprotilátek v séru pacientů a jejich úzká asociace s klinickými syndromy. Ve svalových biopsiích je nacházena infiltrace buňkami specifické i nespecifické imunity. HLA haplotyp geneticky predisponuje ke vzniku IZM a konečně IZM obvykle dobře reaguje na imunosupresivní léčbu [94]. Podíl neimunitních mechanismů jako reakce na hypoxii, stres endoplasmatického retikula nebo depozita amyloidu, je zřejmě také velmi výrazný [95].



Obrázek 7 Patogeneze IZM [95]

a) Aktivace imunitního systému např. při virové respirační infekci zřejmě může u geneticky predisponovaného jedince spolu s dalšími faktory prostředí vést k rozvoji myozitidy.

b) V lymfatických uzlinách dochází k aktivaci buněk vrozené i získané imunity, klonální proliferaci specifických B i T buněk a tvorbě autoprotilátek plasmatickými buňkami.

c) aktivované imunitní buňky vstupují do cirkulace a dostávají se do svalů

d.i) Při PM CD8⁺ T buňky exprimující perforin a granzym invadují nenekrotická svalová vlákna, protože ta zřejmě vlivem plasmacytoidních DC tvořících IFN I hyperexprimují MHC gp I. Myeloidní DC a makrofágy dále přispívají k aktivaci a proliferaci T buněk.

d.ii) Při DM imunitní buňky infiltrují perimysium, kde směs CD4⁺ T buněk, B buněk, DC a makrofágů může tvořit struktury podobné zárodečným centrům v uzlinách.

e.i) Imunohistochemický průkaz CD8⁺ T buněk v endomysiu při PM.

e.ii) Imunohistochemický průkaz CD4⁺ T buněk perivaskulárně u DM.

2.2.4.1. Imunitní buňky u IZM

Ve svalových biopsiích od pacientů s IZM bývají nalézány bohaté infiltráty buňkami specifické i nespecifické imunity, což spolu s častou přítomností autoprotilátek ukazuje na zásadní význam imunitních buňek v patogenezi IZM [95].

2.2.4.1.1. Nespecifická imunita u IZM

DC a makrofágy jsou přítomny ve svalových infiltrátech, tyto buňky zřejmě prezentují antigen přítomným lymfocytům [96]. Plasmocytoidní DC, které jsou hlavním zdrojem IFN I, jsou také nacházeny ve svalových infiltrátech, při DM infiltrují tyto buňky i postiženou kůži [97]. Makrofágy produkují řadu cytokinů a chemokinů podstatných pro rozvoj IZM [98].

2.2.4.1.2. Lymfocyty u IZM

V krvi pacientů s DM i PM bývá detekován velký počet B buněk a vysoká koncentrace autoprotilátek. B buňky jsou nalézány i ve svalových biopsiích těchto pacientů, kde někdy formují germinální centra [95]. Pacienti s IZM mívají vysoké hladiny BAFF, který často koreluje s klinickou aktivitou onemocnění [99]. Léčba rituximabem (anti-CD20 protilátkou) je účinná u většiny pacientů s IZM [100].

Pro tvorbu autoprotilátek je nutná stimulace B buněk specifickými CD4+ T buňkami. Význam Th buněk také podporuje asociace IZM s přítomností určitých haplotypů HLA-DRB, protože právě přes MHC gp II. třídy jsou Th buňkám prezentovány antigeny. CD8+ T buňky jsou často nalézány u PM, tyto buňky invadují i nenekrotická svalová vlákna a díky enzymům perforinu a granzymu na ně mají myotoxický efekt [101]. Mnoho Th i Tc buněk, které infiltrují svaly při IZM, neexprimuje kostimulační molekulu CD28. Tyto buňky nepotřebují ke svojí aktivaci signál přes CD80 nebo CD86 a jsou do jisté míry autonomní. CD28- T buňky jsou cytotoxické, prozánětlivé a rezistentní k apoptóze [95, 102]. Dalším pravděpodobně důležitým subtypem T buněk jsou Th17 buňky, které tvoří IL-17. IL-17 spolu s IL-1 zvyšuje expresi MHC gp I. na myoblastech, které se pak stávají snadnějším terčem CD8+ T buněk [95, 103]. Naopak počet Treg buněk je při IZM snížený (a negativně koreluje s aktivitou nemoci). Treg regulují imunitu a tlumí autoreaktivní reakce, jejich dysfunkce je častá u autoimunitních onemocnění [104].

2.2.4.2. Svalové buňky u IZM

Zejména při PM se myocyty aktivně účastní zánětlivého procesu, kdy pod vlivem prozánětlivých cytokinů (IL-1, -17) a IFN I exprimují ve zvýšené míře MHC molekuly I. třídy a tím se stávají snadným cílem Tc buněk. Za normálních okolností je exprese MHC gp I na svalových vláknech minimální [105].

Při IBM dochází k rychlé degeneraci svalových vláken a ukládání amyloidu ve formě inkluzních tělísek. Na vině mohou být právě imunitně indukované degenerační mechanismy probíhající v myocytech. Například nedostatečná proteolýza a autofagie, nebo nadměrnou tvorbou MHC gp i vyčerpané endoplazmatické retikulum [106].

2.2.4.3. Endotelové buňky u IZM

Imunitní buňky pronikají do svalu mechanismem diapedeze přes kapilární stěnu, která je tvořena endotelovými buňkami. Ty exprimují vlivem prozánětlivých cytokinů více adhezivních molekul a usnadňují tak průchod a snad i “homing” lymfocytů a dalších buněk [107]. Při DM probíhá hlavní část imunitní reakce ve stěně kapilár, kde se ukládají autoprotilátky (a snad i imunokomplexy) a aktivují komplement, což vede ke vzniku membrane attack complex (MAC). Výsledné snížení počtu kapilár vede k ischemizaci svalu a vzniku pro DM typické perifascikulární atrofie [79].

2.2.5. Současná léčba IZM

Tradičně se v léčbě IZM používají vysoké dávky glukokortikoidů (GK), které se při efektu pomalu snižují až k malé udržovací dávce (5-10 mg prednisonu/den). Při úplném vysazení GK obvykle dochází k relapsu. Kvůli nežádoucím účinkům této léčby se dnes přidává methotrexát, azathioprin, nebo jiné imunosupresivum, které umožní snížit dávku GK. Při plicním postižení je indikován cyklosporin A nebo cyklofosfamid, při malém účinku výměna nebo kombinace imunosupresiv [79]. Experimentálně je prokázán efekt deplece B buněk rituximabem (anti-CD20) [108]. Klinickou jednotkou s nedostatkem farmakoterapeutických možností je IBM, kde je indikována vlastně jen fyzikální terapie.

Pro jednotlivé autoprotilátky je charakteristický určitý (méně nebo více závažný, s plicním postižením nebo bez) průběh onemocnění, jejich stanovení tedy pomáhá při výběru vhodné léčby [109].

2.3. Další revmatologická (muskuloskeletální) onemocnění

Onemocnění pohybového systému (Musculoskeletal Diseases, MSD) zahrnují přes 150 nemocí a syndromů, které jsou abvykle progresivní a bývají asociovány s bolestí. MSD jsou častou příčinou nemocnosti a invalidity, vedou k pracovní neschopnosti a jsou významným zdrojem výdajů ve zdravotnictví. [110] V ČR byly MSD v prvním pololetí letošního roku (2015) druhou nejčastější příčinou pracovní neschopnosti (143 045 ukončených pracovních neschopností trvajících průměrně 70 dnů) [111].

Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN) rozlišuje základní kategorie muskuloskeletálních onemocnění: 1) Artropatie, 2) Systémová onemocnění pojivové tkáně, 3) Dorzopatie, 4) Onemocnění měkké tkáně a 5) Osteopatie a chondropatie [112].

Během svého doktorského studia jsem se věnovala výzkumu revmatoidní artritidy a idiopatických zánětlivých myopatií. Patologické procesy probíhající u jednotlivých zánětlivých revmatologických onemocnění se však do určité míry překrývají, proto bych zde chtěla alespoň krátce zmínit pár vybraných zástupců skupiny zánětlivých revmatologických onemocnění: spondyloartritidy, systémový lupus erythematoses, vaskulitidy a sklerodermii. Současné poznatky o roli jednotlivých molekulárních mechanismů v patogenezi těchto nemocí shrnu vždy v příslušné kapitole úvodu.

2.3.1. Spondyloartritidy (SpA)

Souhrnný název pro skupinu zánětlivých revmatologických onemocnění, kterým je společný častý výskyt antigenu HLA-B27 a tendence ke vzniku sakroileitidy nebo spondylitidy. Odhadovaná prevalence v ČR je 0,5-1%. Podle převažující kloubní manifestace je rozlišována axiální a periferní forma SpA. Časté jsou i mimokloubní příznaky – postižení očí, úponů šlach, kůže nebo nespecifické střevní záněty. Onemocnění se manifestuje obvykle u mladých mužů, typickým projevem je přítomnost zánětlivé bolesti zad. Tato bolest vzniká plíživě, nejhorší je v noci a časně zrána a zlepšuje se rozzcvičením (nikoli klidem) a dobře odpovídá na podání nesteroidních antirevmatik (NSA). Klinicky se SpA dále dělí na ankylozující spondyloartritidu, non-radiografickou axiální spondyloartritidu, psoriatickou artritidu, reaktivní artritidu, enteropatickou artritidu, juvenilní artritidu a nediferencovanou artritidu [113].

2.3.2. Systémový lupus erythematoses (SLE)

SLE je autoimunitní zánětlivé onemocnění postihující zejména ženy v reprodukčním věku, prevalence je zhruba 1/4000. Typické je střídání remisí a exacerbací. Akutní vzplanutí se projevuje systémovými příznaky (horečka, únava, hubnutí) i kombinací orgánových manifestací (typické postižení kůže, artritida, postižení kardiovaskulárního systému, ledvin, plic, nervového systému nebo krvetvorby). Pro SLE je typická vysoká aktivita B buňek s tvorbou orgánově nespecifických autoprotilátek (ANA, anti-dsDNA, anti-Sm), které se ukládají ve formě imunokomplexů do stěny kapilár a vedou k zánětlivému orgánovému postižení [114].

2.3.3. Vaskulitidy

Vaskulitidy jsou zánětlivá onemocnění cév, při nichž dochází k destrukci cévní stěny, následné proliferaci a uzávěru cévy. Výsledná ischemie tkáně vede k rozvoji klinických příznaků, jejichž charakter závisí na místě cévního uzávěru. Časté je postižení kůže, plic nebo ledvin. Dále se objevují nespecifické projevy systémového zánětu jako únava, horečka, hubnutí. Podle etiologie jsou rozlišovány primární a sekundární vaskulitidy, které doprovázejí jiné revmatologické, infekční nebo nádorové onemocnění. Primární vaskulitidy jsou klasifikovány podle velikosti postižených cév na vaskulitidy velkých cév (obrovskobuňěčná arteritida, Takayasuova arteritida), vaskulitidy středních cév (polyarteritis nodosa, Kawasakiho nemoc), vaskulitidy středních až malých cév (př. Wegenerova granulomatóza) a vaskulitidy malých cév (př. Henoch-Schoenleinova purpura). Některé vaskulitidy jsou asociovány s přítomností autoprotilátek proti neutrofilům (ANCA) [115].

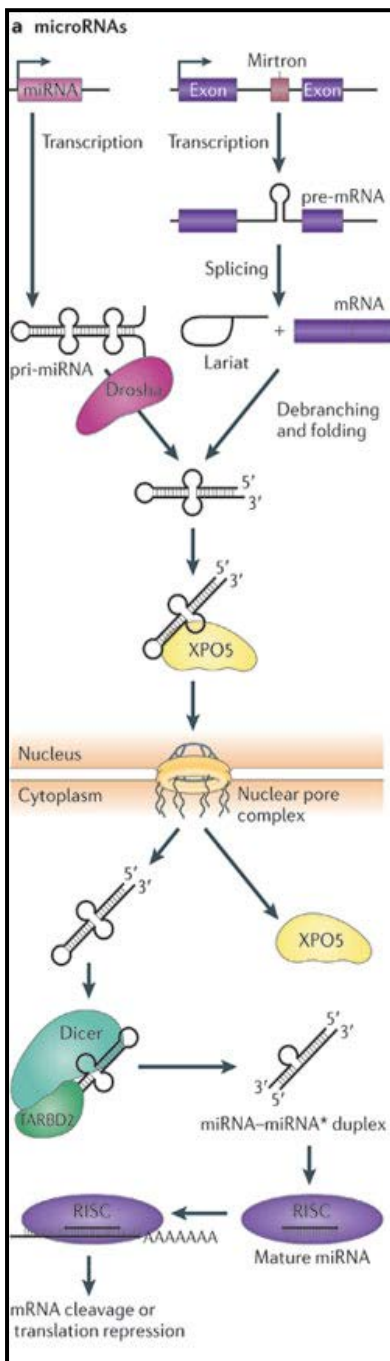
2.3.4. Systémová sklerodermie (SSc)

SSc je vzácná systémová nemoc pojiva s prevalencí 150-300/1 000 000. [116] SSc postihuje zpravidla ženy ve středním věku. Dochází k postupné fibrotizaci a sklerotizaci cévní stěny a pojivových tkání, což se klinicky projevuje Raynaudovým fenoménem (zbělení a následné zčervenání prstů způsobené poruchami mikrocirkulace), tuhnutím kůže a postižením trávicího traktu, plic, srdce a ledvin [117].

2.4. Molekulární aspekty patogeneze muskuloskeretálních onemocnění

2.4.1. Malé regulační RNA

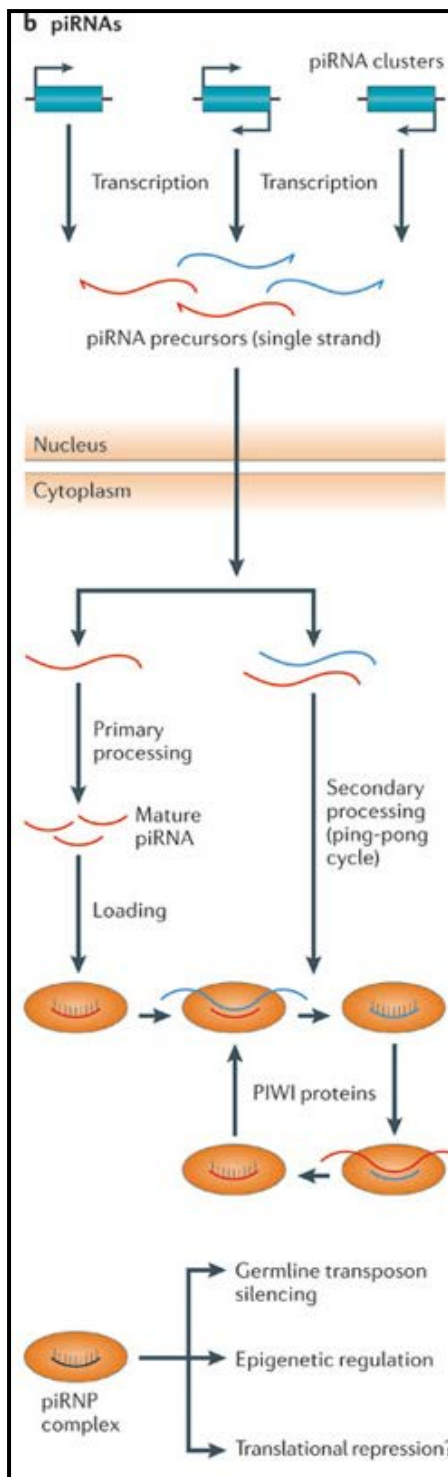
Většina lidského genomu je přepsána do molekuly RNA aniž by byla později přeložena do proteinu, takto vzniká velká skupina molekul non-coding RNA (ncRNA). ncRNA jsou dle velikosti dále rozděleny do tří skupin: malé ncRNA (<35nt); středně dlouhé ncRNA a dlouhé ncRNA (>200nt) [118]. V dalším textu se budu věnovat dvěma třídám malých RNA.



Obrázek 8 Biogeneze miRNA [118]

mikroRNA (miRNA) jsou přibližně 19-24nt dlouhé ncRNA, které regulují expresi až 60% protein kódujících genů. Tím kontrolují většinu buňčných funkcí včetně proliferace, diferenciace a apoptózy. U člověka je známo >1424 miRNA sekvencí [118].

Biogeneze miRNA bude popsána podle Obrázku 8. miRNA jsou transkribovány jednotlivě jako pri-miRNA, nebo spolu s hostitelským genem v tzv. mirtronech. Enzymový komplex s Drossha RNAsou odštěpí 3'- a 5'-konec primárního transkriptu, čímž vzniká pre-miRNA. V komplexu s exportinem (XPO5) je pre-miRNA přenesena jaderným pórem do cytoplazmy, kde nukleáza Dicer odštěpí smyčku RNA a vytvoří tak miRNA-miRNA* duplex. miRNA* označuje méně stabilní vlákno ("passenger strand"), které bývá následně degradováno. Stabilnější vedoucí vlákno ("guide strand") tvoří zralou miRNA. Ta naváže Ago protein a další proteinové složky RISC komplexu (RNA-induced silencing complex). miRNA navádí RISC komplex ke komplementární sekvenci mRNA, která se obvykle nachází v 3'UTR oblasti regulovaného genu. Ago protein, člen rodiny Argonaut proteinů, má endonukleázovou aktivitu. Při dobré komplementaritě miRNA-mRNA je cílová mRNA Ago proteinem rozštěpena, při neúplné shodě zřejmě dojde k zastavení translace. Další možností je deadenylace mRNA, která vede k její destabilizaci a degradaci [118].



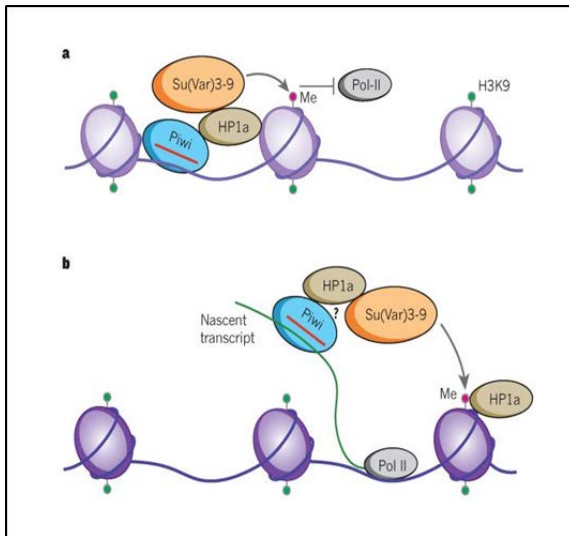
Obrázek 9 Biogeneze piRNA [118]

PIWI-interagující RNA (piRNA) jsou přibližně 24-32nt dlouhé ncRNA, které v komplexu s PIWI proteiny regulují expresi retrotranspozonů¹ a zřejmě i některých protein kódujících genů. U člověka je známo 23 439 piRNA sekvencí, které jsou dostupné v databázi piRNA Bank [119]. piRNA byly objeveny v roce 2006 [120], ale pozdější sekvenování ukázalo, že zahrnují dříve popsanou skupinu rasiRNA (repeat associated RNA) [121].

Biogenezi piRNA znázorňuje obrázek 9: piRNA jsou exprimovány ze shluků (“piRNA clusters”) jako jednovláknové RNA. Přenos piRNA z buněčného jádra do cytoplazmy je zajištěn dosud neznámým mechanismem, potom piRNA vytvoří komplex s PIWI proteinem. V zárodečných buňkách byla prokázána další amplifikace (“sekundární biogeneze”) piRNA v tzv. ping-pongovém cyklu. V tomto cyklu piRNA naváže komplementární RNA transkript např. retrotranspozonu a na piRNA navázaný PIWI protein odštěpí z transkriptu tzv. sekundární piRNA. Sekundární piRNA je tedy komplementární k primární piRNA, naváže se na jiný PIWI protein, nasedne na komplementární transkript (dlouhý primární piRNA transkript v cytoplazmě) a PIWI protein odštěpí tentokrát primární piRNA. V tomto cyklu zřejmě vznikají nové piRNA sestřiháním retrotranspozónových transkriptů.

¹ Retrotranspozony jsou transpozibilní sekvence DNA s vlastním promotorem, které se šíří mechanismem copy and paste: transkript kóduje endonukleázu a reversní transkriptázu, s jejichž pomocí vloží svoji kopii zpátky do buněčné DNA. Při opakovaném vkládání retrotranspozonů do DNA dochází často k chybám, takže nově vzniklé kopie jsou většinou inaktivovány delekcemi nebo bodovými mutacemi. Retrotranspozice však může narušit i buněčný genom, např. změnou čtecího rámce protein kódujících genů. Retrotranspozony tvoří asi 45% naší DNA a sám nejhojnější element LINE1 (long interspersed nuclear element 1) tvoří asi 17% genomu. [122]

piRNA brání šíření transpozonů i dalšími, epigenetickými mechanismy, usnadňují metylaci DNA a modifikace (methylace, acetylace) histonů. V zárodečných buňkách myši byla objevena piRNA navigovaná DNA methylace, jejímž cílem jsou obvykle transpozonové sekvence [122]. U *Drosophila melanogaster* piRNA navigují metylaci histonů, konkrétně vznik represivního znaku methylace histonu 3 lysinu 9 (H3K9), který znesnadňuje transkripci daného genu Polymerázou III [123](Obrázek 10).



Obrázek 10. PIWI/piRNA zprostředkovávají vznik methylace histonů[123]

V heterochromatinu (a) *D. melanogaster*, piRNA (červeně) navede PIWI protein ke komplementární sekvenci na genomické DNA. Po navázání na gDNA PIWI/piRNA komplex aktivuje histon methyltransferázu Su(var)3-9, která methyluje nejbližší histon 3 lysin 9 (H3K9). H3K9 je represivní znak chromatinu, který znesnadňuje transkripci daného genu Polymerázou III.

V euchromatinu (b) se PIWI/piRNA komplex pravděpodobně váže na vznikající RNA transkript, výsledkem je opět aktivace histon methyltransferázy Su(var)3-9 a vznik represivního znaku H3K9.

Protože mutace PIWI proteinů způsobuje neplodnost a samotné piRNA byly objeveny roku 2006 v zárodečných buňkách [120], byl celý PIWI/piRNA systém zkoumán zprvu pouze v kontextu kmenových buněk [122, 124]. Mutace PIWI vedou k neplodnosti, sám název PIWI je zkratkou “P-element Induced Wimpy testis” fenotypu [125]. Později byla popsána deregulace PIWI proteinů a piRNA u nádorových buněk [126] a konečně roku 2012 vyšla první publikace o expresi piRNA v somatických buňkách [127]. Podobně exprese PIWI proteinů (PIWI-like 1-4) byla považována za výhradní vlastnost zárodečných a nádorových buněk a až novější studie popisují, že minimálně PIWIL4 je exprimován ve většině tkání [128].

Zda vysoká exprese PIWI proteinů v nádorových buňkách odráží jejich onkogenní působení, nebo je naopak reakcí na větší aktivitu transpozomů a PIWI je vlastně tumor supresorový gen, není zatím zřejmé. Je prokázáno, že velmi vysoká exprese PIWI proteinů je negativním prognostickým markerem u kolorektálního a hepatocelulárního karcinomu, karcinomu žaludku, a karcinomu močového měchýře [129-132]. Podobně zvýšená exprese některých piRNA (např. piR-651, -823 a -4987) doprovází/spolupůsobí tumorigenezi [126, 133, 134].

Naopak globální exprese miRNA je v maligních tumorech snižena [118], což je zřejmě způsobeno častými mutacemi genů zapojených do biogeneze miRNA (DICER, exportin a jiné) [135, 136]. Jiným mechanismem regulace exprese miRNA maligními tumory je hypermetylace promotorových CpG ostrůvků (“CpG islands”). Takto je snížena například exprese miR-200 při vzniku kolorektálního karcinomu, respektive při fázi epiteliálně-mesenchymální přeměny[137].²

2.4.1.1. Malé regulační RNA u RA

V roce 2008 byly objeveny první deregulované miRNA v RA synoviálních fibroblastech, byly to miR-146a a miR-155 [138]. Význam miR-155 pro vznik artritidy byl ověřen i in vivo: miR-155^{-/-} myši nevyvinuly kolagenem indukovanou artritidu a při použití druhého modelu artritidy, indukce artritidy transferem séra z K/BxN myší, došlo k nízké tvorbě prozánětlivých cytokinů a zejména k poklesu osteoklastogeneze a tím k omezení vzniku kostních erozí [139]. Tento a další experimenty ukázaly, že miRNA jsou slibným terčem cílené léčby RA.

V posledních letech bylo popsáno mnoho dalších deregulovaných miRNA při RA [140](viz Tabulka 1). Protože hladiny miRNA jsou při RA změněny nejenom lokálně v postižených kloubech, ale i systémově v krvi, séru nebo krevních buňkách, a některé miRNA korelují s aktivitou RA [141], mohly by miRNA být slibným biomarkerem pro predikce odpovědi na léčbu RA [142].

O významu piRNA v patogenezi RA (nebo jiné autoimunitní nemoci) dosud nebylo nic publikováno.

	↑ exprese miRNA	↓ exprese miRNA
Plná krev	-99, -100, -125b, -146a, -155	
Sérum/plazma	-16, -21, -24, -26a, -125a-5p, -125b, -126-3p, -223, -451	-125a-3p, -126-3p, -132, -146a, -155
PBMC	16, -26a, -132, -146a, -146b, -150, -155	-21
Synoviální tkáň	-146a, -146b, -150, -155, -223	-22, -23b, -30a
Synoviální fibroblasty	-133, -142, -146a, -155, -203, -221, -222, -223, -323	-34a, -124a
Synoviální makrofágy	-146a, -155	
Synoviální tekutina	-16, -146a, -155, -223	

Tabulka 1 Rozdílně exprimované miRNA při RA [143]

² Za normálních okolností miR-200 blokuje translaci transkripčních represorů ZEB1 a ZEB2, které pak nemohou tlumit expresi E-cadherinu. Zdravá epitelová buňka tedy exprimuje E-cadherin a zůstává součástí epitelu. Při nižší expresi miR-200 dochází ke zvýšení hladin ZEB genů, které pak snižují expresi E-cadherinu, tím epitelová buňka ztrácí své adhezivní vlastnosti, může snáze migrovat přes bazální membránu a dále proliferovat.

2.4.1.2. Malé regulační RNA u IZM

Deregulace miRNA u idiopatických zánětlivých myopatií (IZM) byla popsána roku 2007, tedy o rok dříve než u RA. Eisenberg et al. tehdy analyzovali metodou miRNA array 88 svalových biopsií od pacientů s 11 nemocemi svalů (různé svalové dystrofie a základní IZM: PM, DM a IBM) a popsali při PM ↑ exprese 37 miRNA, ↓ 1 miRNA; podobně při DM ↑ exprese 35 miRNA, ↓ 2 miRNA a při IBM ↑ exprese 20 miRNA, ↓ 1 miRNA. Mnoho miRNA deregulací je společných všem nebo většině zkoumaných svalových patologií. Část deregulovaných miRNA se překrývá s miRNA zjištěnými u RA nebo dalších autoimunitních nemocí (např. miR-146a a miR-155) [144].

Velmi zajímavá studie od Georgantas et al. ukazuje, že miRNA mohou přímo propojovat probíhající zánět s následnou svalovou degenerací u IZM. Tito autoři nejdříve zjistili, že snížená exprese miR-1, -133a, -133b a -206 inverzně koreluje s expresí prozánětlivého cytokinu TNF- α . In vitro pak prokázali, že TNF- α stimulace v myoblastech tlumí expresi studovaných miRNA a zároveň brání diferenciaci myoblastů v myocyty/myofibrily. Transfekce pre-miR-1, -133 nebo -206 umožnila myoblastům diferenciaci i přes trvající TNF- α stimulaci [145].

2.4.1.3. Malé regulační RNA u dalších revmatologických onemocnění

Malé regulační RNA byly u **spondyloartritid (SpA)** zkoumány zatím velmi málo, studie Lai et al. popisuje zvýšenou expresi miR-16, -221 a leT 7i v T buňkách pacientů s SpA, miR-221 a leT 7i přitom korelovaly s rentgenovou progresí onemocnění [146]. Další dvě studie zjistily zvýšenou expresi miR-21 v plné krvi a miR-29a v PBMC u SpA, tyto miRNA však nekorelovaly s klinickou aktivitou onemocnění [147, 148].

V imunitních buňkách pacientů se **systémovým lupus erythematoses (SLE)** je deregulována exprese řady miRNA, např. miR-125a a -142, -146a jsou exprimovány méně a miR-21, -29b, -126, 148a, -155 jsou exprimovány naopak více než u zdravých kontrol. Exprese miR-21 koreluje s klinickou aktivitou SLE, in vitro experimenty s pre- a anti-miR-21 ukázaly že díky této miRNA mají T buňky pacientů se SLE aktivovaný fenotyp s vysokou schopností proliferovat, tvorbou IL-10 a kostimulační molekuly CD40L [149]. Při SLE vysoce exprimované miR-21, -29b, -126 a -148a navíc inhibují translaci DNA methyltransferázy 1 (DNMT1), to vede k celkovému poklesu methylace DNA a další deregulaci genové exprese [150].

V patogenezi **systemové sklerózy (SSc)** mají zřejmě určitý význam zvýšeně exprimovaná profibrotická miR-21 a málo exprimovaná antifibrotická miR-29. Profibrotická miR-21 podporuje TGF- β zprostředkovanou fibrotizaci kůže a dalších tkání tím, že blokuje SMAD7 gen, který tlumí expresi TGF- β . Při vysoké expresi miR-21 je tedy tvorba TGF- β “odbržděna”, TGF- β navíc tlumí expresi miR-21 a tím pozitivní zpětnou vazbou zvyšuje svoji expresi. Naopak antifibrotická miR-29 blokuje přímo expresi TGF- β , zároveň TGF- β blokuje tvorbu této miRNA. Deregulace mnohých dalších miRNA byly objeveny v kůži/kožních fibroblastech pacientů s SSc, některé miRNA (miR-30a, -92a, 150, let 7a) jsou deregulovány i v krvi pacientů, tyto jsou slibnými biomarkery [151].

Deregulované miRNA byly objeveny i některých **vaskulitid**, např. v biotických vzorcích zanícené a. temporalis při obrovskobuněčné arteritidě byla naměřena zvýšená exprese miR-21, -146a, -146B 5p, 150, -155 a -299-5p. Tyto miRNA byly zvýšeny jen lokálně a jen v případě probíhajícího zánětu arteriální stěny, při remisích nebo v periferní krvi byla exprese miRNA srovnatelná se zdravými kontrolami [152]. Deregulované miRNA jsou popsány i při ANCA+ vaskulitidách, Kawasakiho nemoci nebo Behcetově nemoci [150, 153, 154].

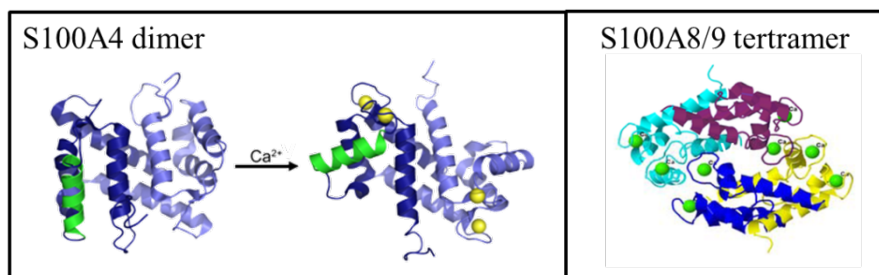
2.4.2. S100 proteiny

Rodina S100 proteinů zahrnuje 21 malých (≈ 10 kDa) kalcium vázajících proteinů, které se účastní regulace mnoha buněčných dějů. Pojmenování S100 odkazuje na rozpustnost ve 100% nasyceném roztoku síranu amonového. S100 proteiny se vyskytují pouze u obratlovců, jsou však vysoce konzervované s minimem známých polymorfismů [155].

Vazba kalcia mění terciální strukturu S100 proteinů, tím odhaluje vazebná místa pro další partnery S100 proteinů. Intercelulárně tedy S100 proteiny mají funkci jakýchsi Ca^{2+} senzorů, které fluktuující hladinu Ca^{2+} přemění v buněčnou odpověď. Afinita S100 proteinů k Ca^{2+} je přitom relativně nízká, ale zřejmě v buňce existuje dynamická rovnováha mezi S100 proteiny s a bez navázaného Ca^{2+} , která se mění podle intracelulární koncentrace kalcia. Extracelulárně mohou S100 proteiny interagovat s řadou receptorů včetně TLR4, IL-10 receptoru a receptorů spřažených s G-proteiny. S100 proteiny tvoří typicky homodimery, výjimkou je heterodimer S100A8/9 [155].

Deregulace exprese S100 proteinů je častým jevem u maligních nádorů, jednotlivé typy nádorů snad mají svůj charakteristický S100 profil (“S100 protein signature”). Exprese S100 proteinů je při malignitách obvykle zvýšená a různé S100 proteiny pomáhají nádoru s růstem, metastazováním a angiogenezí. Významná role S100 proteinů u maligních tumorů byla prokázána mnoha experimenty *in vitro* i *in vivo*, první inhibitory S100 proteinů (inhibitor S100B u maligního melanomu a inhibitor S100A9 u karcinomu prostaty) jsou nyní testovány v klinických studiích [155].

Vysoká exprese S100 proteinů byla však objevena i u autoimunitních onemocnění. Některé S100 proteiny (S100A8/9, S100A12) snad fungují jako “alarminy”, jakási endogenní paralela PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Alarminy definoval M. Bianchi jako endogenní molekuly, které signalizují poškození tkáně. Uvolňují se při nekróze, nebo jsou aktivně tvořeny imunitními buňkami při zánětu. Tuto teorii podporuje schopnost S100 proteinů interagovat s TLR4 a RAGE (receptor of advanced glycation end-products) receptory [156]. V dalším textu se zaměřím na S100A4 a S100A8/9 proteiny, jejichž roli u revmatologických onemocnění jsem se zabývala.



Obrázek 11
S100A4 a S100A8/9
[157, 158]

S100A4 protein (metastazin)

Monomery S100A4 spontánně dimerizují, vazba čtyř iontů Ca^{2+} uzavřenou strukturu S100A4 homodimeru otevře a umožní tak vazebné interakce s dalšími proteiny [159].

S100A4 protein bývá nazýván metastazin pro svůj význam při metastazování nádorů. S100A4 není sám o sobě tumorgenní, ale při preexistujícím nádoru zvýšení hladin S100A4 usnadňuje několika mechanismy šíření tohoto nádoru. Intracelulární S100A4 se v pseudopodiích migrující nádorové buňky váže na molekuly cytoskeletu (např. Myosin IIA) a podporuje jejich pohyblivost. S100A4 také zvyšuje tvorbu a uvolňování matrix degradujících enzymů (MMP) a tím prostup migrujících buněk mezibuněčnou tkání. S100A4 zatím vcelku neznámými mechanismy reguluje i proliferaci a apoptózu nádorových buněk [155]. U řady nádorů byla popsána inverzní korelace S100A4 exprese s prognózou pacienta [160, 161]. S100A4 je všek zvýšeně exprimován i při řadě nenádorových onemocnění, zejména při autoimunitních poruchách [162].

S100A8/9 protein (kalprotektin)

S100A8 a S100A9 tvoří nejčastěji heterodimer, dva S100A8/9 heterodimery spolu dále dimerizují a vzniká tetramer – kalprotektin, který váže 8 iontů Ca^{2+} . Tetramer S100A8/9 případně dále oligomerizuje a je nalézán ve formě amyloidu v prostatě starších mužů [158]. Hlavním zdrojem kalprotektinu jsou myeloidní buňky, zejména neutrofilů, kde prozánětlivý tetramer S100A8/9 tvoří až 40% cytosolické bílkoviny. Z neutrofilů je kalprotektin uvolňován při nekrotickém rozpadu buňky, zřejmě také dosud neznámým mechanismem aktivního transportu a jako antifungální bílkovina uvolňovaná při NETóze, smrti neutrofilu spojené s vytvořením antimikrobní chromatinové sítě [163]. S100A8/9 heterodimer vzniká obvykle v důsledku zánětu a funguje jako alarmin [156]. S100A8 a S100A9 jsou také proonkogenní, podporují růst nádoru, jeho metastazování – tím, že připravují tumoru příznivé prostředí v cílových orgánech a pomáhají nádoru vyvinout rezistenci k chemoterapii [155]. Kalprotektin se zřejmě účastní patogeneze aterosklerózy, kardiomyopatie, neurodegenerativních nemocí a autoimunit [158]. Vyšetření kalprotektinu ve stolici je citlivým screeningem na přítomnost nespecifického střevního zánětu [164].

2.4.2.1. S100 proteiny u RA

Zvýšená exprese mnohých S100 proteinů (S100A4, S100A8/9, S100A12) byla při RA zjištěna v synoviální tkáni postižených kloubů, v synoviální tekutině i systémově v cirkulaci [165-167]. Hladiny S100A4 a S100A8/9 navíc pozitivně korelují s klinickou aktivitou RA [168, 169]. Při úspěšné farmakoterapii RA lokální i systémové exprese S100A8/9 klesá [170], vzestup S100A8/9 hladiny předchází klinický relaps onemocnění [171]. S100 proteiny zřejmě nejsou jen pasivním markerem probíhajícího zánětu, protože samy regulují expresi matrix degradujících enzymů, apoptotických molekul a cytokinů, které se účastní patogeneze RA [172, 173].

2.4.2.2. S100 proteiny u IZM

Imunohistochemická analýza prokázala přítomnost S100A4 a S100A8/9 proteinů ve svalových bipsiích pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi [174, 175]. Tyto S100 proteiny jsou exprimovány převážně imunitními buňkami, které infiltrují svalovou tkáň při aktivní IZM. S100A4 protein byl prokázán také v regenerujících svalových vláknech [174]. *In vitro* stimulace myofibril multimery S100A8/9 izolovanými z neutrofilů bránila proliferaci a diferenciaci myofibril a vedla k jejich apoptóze [175].

2.4.2.3. S100 proteiny u dalších revmatologických onemocnění

U pacientů se **spondyloartritidou** byla zjištěna vyšší sérová hladina S100A8/9, ta ale nekorelovala s žádným parametrem klinické aktivity onemocnění ani s rentgenovou progresí [176]. Pacienti se **systémovým lupus erythematoses** mají asi třikrát zvýšenou sérovou hladinu S100A8/9 v porovnání se zdravými kontrolami, S100A8/9 přitom dobře koreluje s klinickou aktivitou onemocnění a je vyšší u pacientů s pozitivitou anti-dsDNA protilátek a u pacientů s artritidou [177]. Vysoká hladina S100A8/9 ukazuje na riziko nebezpečné lupusové glomerulonefritidy [178]. S100B protein byl navrhován jako biomarker neurologického postižení při SLE, výsledky studií jsou ale zatím rozporuplné [179, 180] S100A4 protein je zřejmě zásadní v patogenezi **systémové sklerózy**: *In vitro* zvýšení exprese S100A4 v kožních fibroblastech aktivuje TGF- β signalizaci a tak zvyšuje tvorbu kolagenu a naopak blok S100A4 snižuje tvorbu kolagenu při stimulaci TGF- β . S100A4^{-/-} myši jsou rezistentní k rozvoji bleomycin indukované fibrózy. A, pochopitelně, exprese S100A4 proteinu i mRNA je vyšší v kožních fibroblastech pacientů s SSc než u zdravých kontrol [181].

2.4.3. Autoprotilátky

Autoprotilátky jsou imunoglobuliny namířené proti antigenům vlastních tkání. V nízkém titru se autoprotilátky vyskytují i u části zdravých lidí, jejich pozitivita může doprovázet maligní nebo infekční onemocnění, infarkt myokardu, kardiomyopatie a další. Typicky je však přítomnost autoprotilátek asociována s autoimunitním onemocněním [182].

Vznik autoprotilátek je důsledkem porušení pravidla tolerance k vlastním tkáním, podle kterého dochází k apoptóze nezralých autoreaktivních T buněk v thymu a B buněk v kostní dřeni (centrální tolerance). Pokud se autoreaktivní T lymfocyt vyhnul apoptóze v thymu, měl by být utlumen absencí druhého signálu nebo účinkem Treg na periférii, nějaký podobný mechanismus zřejmě tlumí i autoreaktivní B buňky, které se dostaly k dalšímu vyzrávání do sleziny (periferní tolerance). Obecně je však selekce autoreaktivních B buněk méně přísná v porovnání s T buňkami, protože k přeměně B buňky na plasmatickou buňku a tvorbě protilátek je obvykle nutná aktivace Th-buňkou, která prošla pečlivou selekcí [11].

V současnosti existuje několik teorií vzniku autoprotilátek:

Proti nespecifické polyklonární stimulaci lymfocytů svědčí malá pestrost autoprotilátek u jednoho pacienta, zato častá přítomnost protilátek proti několika epitopům jednoho autoantigenu [183].

Dispozice k tvorbě určitých autoprotilátek bývá dědičná. Určité HLA alely prezentují typické (modifikované) autoantigeny. Příklad: HLA-DRB1*01 a *04 velmi dobře váží citrulinované peptidy, APC je pak mohou prezentovat specifickým T a B lymfocytům [19].

Aktivace B buněk může v přítomnosti TLR-ligandů probíhat nezávisle na T buňkách. Takže pokud je určitý antigen zároveň ligandem TLR, může aktivovat specifickou B buňku bez druhého signálu od Th buňky. Tato na T buňkách nezávislá aktivace B buněk je podpořena cytokinem BAFF [184].

K tvorbě autoprotilátek také mohou přispívat epigenetické modifikace B buněk [185].

Autoantigen (nejčastěji protein, ale i nukleová kyselina nebo lipidová částice) se může nalézat uvnitř buňky, na cytoplasmatické membráně nebo být součástí mezibuněčné hmoty. Většina autoprotilátek popsaných při systémových onemocněních pojiva je namířena proti intracelulárním antigenům, pro klonální expanzi B buněk je přitom nutná vazba (auto)antigenu na BCR, tj. děj odehrávající se v extracelulárním prostoru. Intracelulární antigeny proniknou do extracelulárního prostoru při smrti buňky [184].

Tělu vlastní molekuly by díky mechanismům imunitní tolerance neměly být antigenní. Antigenní vlastnosti však mohou získat modifikací vlastních molekul – př. citrulinací proteinů extracelulární matrix. Ke změně antigenní struktury molekul dochází také při buněčné smrti (proteolýzou, hyperfosforylací, ubiquitinací, citrulinací...) což může vést k odhalení dosud skrytých struktur budoucích autoantigenů. Jiným mechanismem je přesmyk protilátkové reakce proti cizímu antigenu, který je ale podobný vlastním strukturám. Při afinitní maturaci pak může somatickými hypermutacemi vzniknout B buňka tvořící autoprottilátky [183].

Současná **“multiple-hit theory”** popisuje, že po počátečním průlomem autoimunity manifestovaném tvorbou autoprottilátek (u geneticky disponovaného jedince v kombinaci s určitými vlivy prostředí) je nutný ještě další stimulus ke vzniku onemocnění. Podle exprese autoantigenů vznikne orgánově specifické nebo systémové autoimunitní onemocnění [184].

Mechanismus patogenního působení autoprottilátek je často nejasný. Autoprottilátky by snad mohly být pouze průvodním jevem aktivace a deregulace imunitního systému při zánětu, i když přítomnost specifických autoprottilátek (které prošly afinitní maturací a izotypovým přesmykem) o léta předcházející první klinické příznaky autoimunitního onemocnění tomu nenasvědčuje [184].

Některé autoprottilátky proti receptorům na cytoplazmatické membráně tyto receptory aktivují nebo naopak blokují vazbu ligandu. Podobně mohou autoprottilátky neutralizovat různé extracelulární proteiny a znemožňovat jejich funkci. Vazba autoprottilátek na buněčný povrch může vést k lýze buňky aktivací komplementu/NK-buňkami nebo usnadněním apoptózy fagocyty. Tkáně jsou poškozovány i ukládáním komplementu. Zkřížená reakce autoprottilátek proti dalším antigenům způsobuje např. kongenitální AV-blok při přítomnosti anti-Ro nebo anti-La prottilátek v krvi těhotné ženy [183].

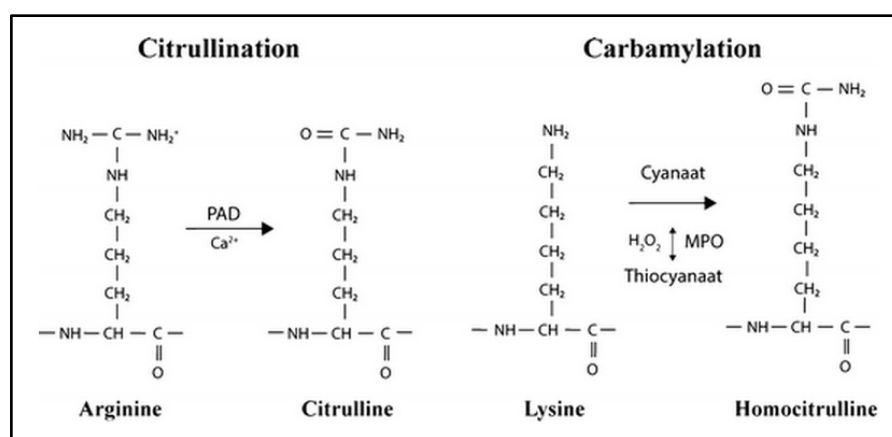
V klinické praxi je detekce autoprottilátek a sledování jejich titerů zásadní pro diagnostickou rozvahu, odhad prognózy, výběr nejvhodnější léčby a průběžné sledování odpovědi na léčbu/aktivity autoimunitních onemocnění [186].

2.4.3.1. Autoprotilátky u RA

Přítomnost autoprotilátek může o léta předcházet rozvoj prvních klinických příznaků revmatoidní artritidy (RA) a je pro RA natolik charakteristická, že byla zařazena do ACR/EULAR klasifikačních kritérií pro RA [187].

Revmatoidní faktor (RF) byl v roce 1957 první objevenou autoprotilátkou [188]. RF je tvořen nejčastěji ve třídě IgM, vyskytuje se u 80% pacientů s RA, ale může být pozitivní i při jiných systémových nebo orgánových onemocněních, malignitách nebo infekcích. Specificita RF je tedy nízká. Autoantigenem pro RF je Fc fragment IgG protilátek. RF tedy může tvořit velké imunitní komplexy, které se ukládají (nejenom) v kloubech a mechanismem aktivace komplementu vedou k jejich poškození. Molekula RF třídy IgG je protilátkou a zároveň svým vlastním antigenem, tyto molekuly se tedy mohou řetězit a ještě snadněji aktivovat komplement [3].

Protilátky proti citrulinovaným peptidům (ACPA) jsou nalézány u 70-80% pacientů s RA a jejich nález je narušil od RF vysoce specifický pro RA. Podle jejich přítomnosti je rozlišována ACPA-pozitivní a ACPA-negativní RA, přičemž tyto dvě jednotky mají zřejmě odlišnou patogenezi i prognózu. ACPA-pozitivní RA má obvykle závažnější průběh s časnějším rozvojem erozí než ACPA-negativní RA. Pouze ACPA-pozitivní RA je asociována s HLA-DRB1 a kouřením. Vysvětlením je zřejmě kouřením indukovaná citrulinace proteinů v plicích (Obrázek 12) a díky HLA-DRB1 na APC dobrá prezentace "sdíleného epitopu" citrulinovaných peptidů imunitním buňkám [3]. Možné patogenní působení ACPA autoprotilátek zahrnuje aktivaci makrofágů a osteoklastů a indukci NETózy v neutrofilech. Určité ACPA snad mohou mít i protektivní efekt a bránit rozvoji RA. Při vhodné glykosylaci nebo jiných modifikacích, kdy autoprotilátka váže cílový protein aniž by spouštěla kaskádu dalších reakcí, vlastně blokuje místo nasednutí efektorové – a škodlivé – autoprotilátky [189].



Obrázek 12 Citrulinace a karbamylace proteinů [190]

Nedávno byl prokázán nový druh autoprotilátek u RA, anti-carP protilátky. Jsou namířeny proti karbamylovaným peptidům. Karbamylace je chemické přeměna lysinu na homocitrulin a k jejímu vzniku také přispívá kouření (Obrázek 12). Anti-carP autoprotilátky jsou nalézány až u 45% pacientů s RA, částečně i u pacientů ACPA-negativních a RF-negativních [190].

U části RA pacientů se také nalézají anti-PAD4 autoprotilátky, které jsou namířené proti enzymu peptidylarginindeimináze (PAD), tj. enzymu citrulinujícímu proteiny (Obrázek 12). Část anti-PAD4 autoprotilátek zřejmě může PAD aktivovat a zvyšovat tak tvorbu autoantigenů pro ACPA [190]. Celkově je problematika autoprotilátek u RA velmi zajímavá, v klinické praxi pomáhá stanovení autoprotilátek individualizaci léčby a ve výzkumu díky znalosti serologie pacientů můžeme tvořit homogenější kohorty pacientů.

2.4.3.2. Autoprotilátky u IZM

Autoprotilátky se vyskytují u více než 80% pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi (IZM) a jejich stanovení velmi pomáhá při diagnóze IZM a dalším vedení léčby. IZM jsou velmi heterogenní skupinou onemocnění a právě přítomnost jednotlivých autoprotilátek bývá asociována s charakteristickými klinickými příznaky a průběhem onemocnění. Autoantigeny jsou při IZM intracelulární molekuly, většinou zásadní enzymy účastníci se regulace genové exprese.

Základní rozdělení autoprotilátek při IZM rozlišuje autoprotilátky specifické pro myozitidu (MSA = myositic specific autoantibodies) a autoprotilátky asociované s myozitidou (MAA = myositis associated autoantibodies) [191].

MSA jsou vysoce specifické pro IZM, vyskytují se zhruba u 45% pacientů a u nemocného je přítomna obvykle jen jedna MSA [186]. Známé MSA, jejich autoantigeny a klinické asociace jsou shrnuty v tabulce 2.

Nejčastějším zástupcem MSA jsou anti-syntetázové autoprotilátky. Aminoacyl-tRNA-syntetáz existuje celkem dvacet, protilátky byly dosud objeveny proti osmi z nich [191]. Přítomnost těchto autoprotilátek je asociována s tzv. antisyntetázovým syndromem, projevujícím se myozitidou, intersticiální plicní nemocí (ILD), artritidou, Raynaudovým fenoménem a rukami mechanika [79].

Některé MSA byly objeveny teprve nedávno, např. anti-TIF1- γ autoprotilátky vyskytující se u 20-30% pacientů s DM a zejména u starších pacientů často asociované s malignitou. Autoantigen TIF1- γ je transkripční faktor, často vysoce exprimovaný nádorovými buňkami.

Vznik autoprotilátek může být důsledkem přesmyku imunitní reakce, které byla původně namířena na odstranění nádoru [191].

Dalším nedávno objeveným typem MSA jsou anti-HGMCR protilátky proti 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktáze, klíčovému enzymu pro tvorbu cholesterolu. Tento enzym je cílem statinů, a právě léčba statiny může vyprovokovat tvorbu anti-HGMCR protilátek a vznik s nimi asociované imunitně podmíněné nekrotizující myopatie (IZNM) [192].

Autoprotilátka	Autoantigen	Funkce autoantigenu	Klinické asociace
Anti-syntetázové (Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS, Ha, Zo)	tRNA syntetáza	Vazba aminokyselin na tRNA	PM Anti-syntetázový syndrom
Anti-Mi-2	NuRD (nucleosome remodeling-deacetylase complex)	Regulace transkripce	Typické kožní postižení, dobrá odpověď na léčbu
Anti-TIF1- γ	Transcriptional intermediary factor 1 γ	Regulace transkripce	Těžká DM často asociovaná s malignitou
Anti-NXP2	Nuclear matrix protein 2	Regulace transkripce	Těžká DM často asociovaná s malignitou
Anti-MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5	Innate antiviral response	Amyopatická DM ILD
Anti-SAE	SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier 1) activating enzyme	Protein sumoylation Gene transcription	DM
Anti-SRP	Signal recognition particle	Transkolace proteinů do endoplasmazického retikula	Nekrotizující myopatie
Anti-HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Tvorba cholesterolu	Nekrotizující myopatie, často postatinová

Tabulka 2 Autoprotilátky specifické pro myositidu a jejich autoantigeny
Modifikováno podle [191]

Protilátky asociované s myozitidou (MAA) se vyskytují zhruba u poloviny pacientů s IZM a nejsou diagnosticky specifické pro myozitidu. Výskyt MAA často doprovází překryvný syndrom IZM s dalším systémovým onemocněním pojiva.

Nejčastějšími MAA jsou autoprotilátky proti ribonukleoproteinům Ro (SSA), Ro52 a La (SSB). Pozitivita anti-Ro52 bývá často asociována s přítomností antisyntetázových autoprotilátek.

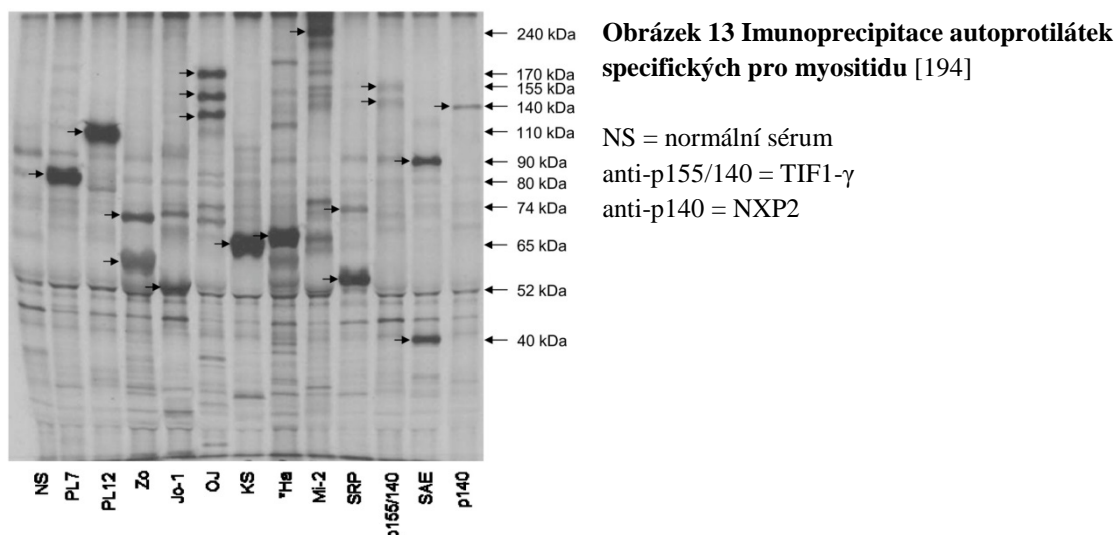
Anti-PM/Scl autoprotilátky se váží na proteiny exozomu. Exozom se podílí na zpracování RNA v jádru a na degradaci mRNA v cytoplasmě. Anti-PM/Scl se vyskytují typicky u pacientů s překryvným syndromem IZM se systémovou sklerózou.

Při PM/Scl překryvném syndromu je častý i výskyt anti-Ku autoprotilátek. Ku autoantigen je proteinový komplex, který se účastní reparace DNA [191].

Detekce autoprotilátek je vícestupňový proces. První metodou screeningu je nepřímá fluorescence antinukleárních protilátek ANA (AntiNuclear Antibodies), při které lze popsat typ fluorescence (homogenní, nukleolární, centromerová nebo cytoplasmická) a titr ředění séra, při kterém vidíme signál. Při pozitivním ANA testu, tedy prokázané přítomnosti autoprotilátek, je dále vyšetřována jejich specifita. V současnosti se rutinně používá řada metod s různou specificitou, senzitivitou a různými limitacemi. Mezi základní metody patří protisměrná elektroforéza, imunoanalýza se značenými protilátkami (ELISA), imunoblotting nebo komerčně dostupné LINE-Blot eseje, kdy jsou antigeny přímo nanášeny na proužky nitrocelulózy ke kterým stačí přidat sérum pacienta [186].

Radioimunoprecipitace (RIP) je vyšetření s nejlepší senzitivitou a specificitou z dostupných metod detekce autoprotilátek. Její nevýhodou je časová náročnost a nutnost práce s radioizotopem ^{35}S [186]. Obrázek 13 ukazuje obvyklý výstup této metody.

Nejprve je třeba připravit radioaktivně značený K356 buněčný extrakt. Po předchozí depleci methioninu se ke K356 buňkám přidá ^{35}S -methionin, který buňky inkorporují do nově tvořených proteinů. Homogenizací K356 buněk je pak získán ^{35}S -značený buněčný extrakt. V dalším kroku jsou autoprotilátky z vyšetřovaných sér navázány na sacharózové kuličky potažené proteinem A a jimi jsou imunoprecipitovány ^{35}S -značené antigeny. Metodou SDS-PAGE jsou imunoprecipitované ^{35}S -antigeny rozděleny v 10% gelu, který je následně vysušen. Posledním krokem je přibližně 14-denní expozice fotocitlivého papíru a jeho vyvolání. Odečítání výsledků RIP vyžaduje jistou zkušenost, do několika prvních jamek gelu jsou vždy nanášeny antigeny známých specificit, které usnadňují odhad molekulární velikosti proteinů zastoupených jednotlivými proužky [193].



2.4.3.3. Autoprotilátky u dalších revmatologických onemocnění

U **systémového lupus erythematoses (SLE)** bylo identifikováno přes 100 různých autoantigenů a 90-100% pacientů je ANA pozitivních. Rozlišují se nespecifické a specifické autoprotilátky a pozitivita autoprotilátek často předchází vznik klinických příznaků onemocnění. Nejčastější pro SLE specifické autoprotilátky jsou namířeny proti DNA (anti-ssDNA, anti-dsDNA). Jejich koncentrace koreluje s aktivitou lupusové nefritidy a usazování imunokomplexů v bazální membráně glomerulů a častá zkřížená reaktivita těchto protilátek se strukturami glomerulů byla experimentálně prokázána [195]. Často jsou nalézány i protilátky proti dalším intracelulárním antigenům – anti-nukleozomové a anti-histonové autoprotilátky a protilátky proti ribonukleoproteinům (anti-Ro and anti-La). Autoprotilátky proti membránovým antigenům způsobují krevní a zřejmě i neuropsychické postižení u SLE. Lymfocytární, erytrocytární a trombocytární autoprotilátky způsobují aktivaci komplementu nebo ADCC reakcí (Autoantibody Dependent Cellulat Cytotoxicity) autoimunitní cytopenie. U SLE bývají nalézány i antifosfolipidové a mnohé další protilátky [186].

Systémová sklerodermie (SSc) je asociována s pozitivitou ANA u 95% pacientů, jednotlivé autoprotilátky se objevují před prvními klinickými projevy a jsou spojeny s charakteristickou klinickou manifestací onemocnění. Mezi autoprotilátky specifické pro SSc patří anti-centromerové protilátky, protilátky proti topoizomeráze I. a proti RNA polymeráze [186].

Pro **vaskulitidy** je typický průkaz autoprotilátek proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA). Cytoplasmatická fluorescence (c-ANCA) při vyšetření nepřímou imunofluorescencí na neutrofilem ukazuje protilátek proti proteináze 3 (anti-PR3), které jsou charakteristické pro granulomatózu s polyangiitidou. Obraz perinukleární fluorescence (p-ANCA) je způsoben přítomností protilátek proti myeloperoxidáze (anti-MPO) typických pro mikroskopickou polyangiitidu. Jinými častým cílem autoprotilátek při vaskulitidách je bazální membrána glomerulů. Tyto anti-GBM autoprotilátky bývají spojeny s těžkým postižením ledvin a plic [186].

Spondyloartritidy nejsou tradičně spojovány s přítomností autoprotilátek, analýzou sér pacientů technikou protein array byla v roce 2014 popsána vysoká prevalence dvou autoprotilátek: anti-CD74 [196] a anti-PPM1A (protein phosphatase magnesium-dependent 1A) [197]. Jejich význam pro klinickou praxi a role v patogenezi onemocnění zatím nejsou známy.

3. Cíle doktorské práce

Cílem mé doktorské práce bylo přispět k porozumění mechanismům vzniku a vývoje revmatoidní artritidy (RA) a idopatických zánětlivých myopatií (IZM). Studovala jsem tři molekulární aspekty jejich patogeneze: regulační RNA, S100 proteiny a autoprottilátky.

1) Vliv malých regulačních RNA

- Jsou PIWI proteiny a PIWI-interagující RNA exprimovány v synoviálních fibroblastech?
Pokud ano, liší se jejich exprese u RA a osteoartrózy?
Jak jsou PIWI proteiny a piRNA regulovány? Jakou mají funkci?
- Které miRNA jsou asociovány s aktivitou IZM?
Mohly by tyto miRNA být používány jako biomarkery?

2) Role S100 proteinů

- Jsou u IZM zvýšené sérové hladiny S100A4?
Korelují sérové hladiny S100A4 s klinickou aktivitou IZM?
Jakou roli hraje S100A4 (metastazin) u myositidy asociované s malignitou?
- Jaké jsou sérové hladiny S100A8/9 u pacientů s velmi časnou RA?
Korelují sérové hladiny S100A8/9 s klinickou aktivitou velmi časně RA?
Jaký vliv má na sérové hladiny S100A8/9 léčba?

3) Význam autoprottilátek

- Jaký vliv mají jednotlivé autoprottilátky na vznik artritidy při IZM?
Jaké je obecná charakteristika artritidy při IZM?
(prevalence, distribuce, rozsah, genetické asociace...)
- Jaký význam mají jednotlivé autoprottilátky při imunitně podmíněné nekrotizující myopatii (IZNM)?
Jaký vztah mají autoprottilátky k předchozí léčbě statiny?
Stoupá incidence IMNM v posledních deseti letech?

4. Výsledky a diskuze

Tato dizertační práce je založena na šesti publikacích v mezinárodních časopisech s IF a jednom review. Jednotlivé publikace jsou prezentovány v originální podobě, předchází jim vždy krátký úvod, diskuze výsledků a upřesnění mého podílu na dané studii.

Regulační RNA

Pleštilová L, Neidhart M, Russo G, Frank-Bertoncelj M, Ospelt C, Ciurea A, Kolling C, Gay RE, Michel BA, Vencovský J, Gay S, Jünger A. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in rheumatoid arthritis Manuscript submitted to Annals of Rheumatic Diseases, IF 10,377

Misunova M, Salinas-Riester G, Luthin S, Pommerenke C, Fojtikova M, Zavada J, Klein M, **Pleštilová L**, Svítalková T, Cepek P, Novota P, Vencovský J. Microarray analysis of circulating miRNAs in the serum of patients with polymyositis and dermatomyositis reveals a distinct disease expression profile and is associated with disease activity, Clin Exp. Rheumatology, Manuscript Number: CER 8302 15 IF 2,9

S100 proteiny

Pleštilová L, Mann H, Andrés Cerezo L, Pecha O, Vencovský J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 levels associate with disease activity rather than cancer development in patients with idiopathic inflammatory myopathies. Arthritis Res Ther. 2014 Oct 31;16(5):468. IF 4,12

Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, **Pleštilová L**, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent onset rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2011 Jul 26;13(4):R122. IF 4,45

Protilátky

Pleštilová L, Vencovský J. Anti-PM-Scl autoantilátky u myozitid. Čes. Revmatol. 2009; 17(4): 200-204.

Klein M, Mann H, **Pleštilová L**, Betteridge Z, McHugh N, Remáková M, Novota P, Vencovský J. Arthritis in idiopathic inflammatory myopathy: clinical features and autoantibody associations. J Rheumatol. 2014 Jun;41(6):1133-9. IF 3,2

Klein M, Mann H, **Pleštilová L**, Zámečník J, Betteridge Z, McHugh N, Vencovský J. Increasing incidence of immune-mediated necrotizing myopathy: single-centre experience. Rheumatology (Oxford). 2015 Jun 24. pii: kev229. IF 4,47

4.1. Regulační RNA

4.1.1. PIWI/piRNA systém u revmatoidní artritidy

Expres PIWI-interagujících RNA (piRNA) byla zprvu považována za výhradní vlastnost zárodečných buněk [120], později byly tyto malé regulační RNA objeveny i v nádorových buňkách [198]. Mechanismus, jakým piRNA regulují genovou expresi je popsán v kapitole 2.4.1. Základní funkcí piRNA je ochrana genomu před transpozomy [199].

Ke studiu exprese piRNA v synoviálních fibroblastech (SF) nás přivedly první publikace popisující výskyt piRNA v somatických buňkách [127] spolu se skutečností, že u RASF byla prokázána porucha regulace transpozómu LINE1 [200]. Do skupiny malých regulačních RNA patří spolu s piRNA i o něco kratší miRNA, jejichž význam při vzniku a vývoji RA byl již dříve prokázán [142](viz kapitola 2.4.1.1).

Nejprve jsme zjišťovali, zda SF exprimují některý ze čtyř lidských PIWI proteinů (PIWIL1-4). Prokázali jsme expresi genů PIWIL2 a PIWIL4 v synoviální tkáni a v izolovaných synoviálních fibroblastech od pacientů s RA a osteoartrózou (OA). Pomocí Western blotu jsme detekovali slabou expresi PIWIL2 a silnou expresi PIWIL4 proteinu v jádře SF. Expresi PIWIL4 proteinu v SF jsme potvrdili metodami imunohistochemie a imunofluorescence.

Následně jsme sekvenovali malé RNA z 9 RASF a 9 OASF a analyzovali expresi piRNA porovnáním našich dat s 19260 piRNA sekvencemi publikovanými v databázi piRNA Bank [119]. Prokázali jsme přítomnost více než 200 piRNA ve všech SF. Žádná piRNA nebyla významně rozdílně exprimována v RASF oproti OASF.

Dále jsme korelovali expresi jednotlivých piRNA navzájem mezi sebou 1) u 9 RASF a 2) u 9 OASF. Zjistili jsme, že exprese jednotlivých piRNA mají tendenci spolu navzájem pozitivně korelovat a tato korelace je u RASF méně výrazná než u OASF. Expres jednotlivých piRNA nekorelovala s expresí dvou "housekeeping genes" RNU6-6P a SNORA7-4A, což ukazuje, že naše data zřejmě nejsou zkreslena různou kvalitou RNA u jednotlivých pacientů. Z těchto výsledků usuzujeme na společnou regulaci exprese piRNA a možnou poruchu této regulace u RA, tato hypotéza však nebyla dále experimentálně ověřena.

Expres piRNA se zdá být stabilní napříč různými druhy buněk. Změřili jsme expresi pěti piRNA v SF a periferních monocytech pacientů s RA a OA a zároveň v pěti nádorových buněčných liniích a zjistili, že pořadí jednotlivých piRNA podle míry exprese všech druhů buněk stejné.

Při experimentech na buněčných kulturách primárních synoviálních fibroblastů jsme objevili, že stimulace prozánětlivými cytokiny TNF- α a IL-1 β stejně jako TLR-ligandy LPS nebo

Poly(I:C) zvyšuje expresi PIWIL4 genu na úrovni mRNA i proteinu. Expese pěti měřených piRNA nebyla vlivem jmenovaných stimulací signifikantně změněna.

Funkce PIWI/piRNA systému v synoviálních fibroblastech jsme studovali po transfekci siRNA proti genům PIWIL2 a PIWIL4. Expese jednotlivých piRNA nebyla po umlčení PIWIL2 a PIWIL4 změněna, samotné piRNA bez PIWI-proteinů by ale neměli mít na buněčné funkce žádný efekt. Umlčení PIWIL4 signifikantně snížilo expresi mRNA pro histon deacetylázu HDAC1, zároveň se zvýšila expese HDAC9 mRNA. Na úrovni proteinu se expese HDAC nezměnila. Toto je důležité, protože vysoká hladina HDAC1 v RASF výrazně přispívá ke kloubní destrukci u RA [201].

Blok PIWIL2 a 4 neovlivnil proliferaci či migraci RASF, pozorovali jsme však zvýšení apoptózy u těch SF, u nichž došlo ke zvýšení apoptózy po stimulaci vysokou dávkou TNF- α . Methylace ani expese retrotranspozónu LINE1 se po bloku PIWIL2 a 4 nezměnila, což si vysvětlujeme redundancí mechanismů regulace LINE1 v RASF.

Tato je první studie popisující expresi PIWIL2, PIWIL4 a piRNA v SF a zvýšení expese PIWI proteinů vlivem TNF- α a IL-1 β ukazující na jejich možnou účast v procesu zánětu. Zároveň popisujeme mírnou deregulaci piRNA v RASF, nicméně jsme neobjevili žádnou piRNA, která by byla signifikantně odlišně exprimovaná v RASF oproti OASF a nabízela se tedy jako jednoduchý biomarker nebo terapeutický terč.

Tento článek je výsledkem mé 3-leté stáže v laboratoři experimentální revmatologie v Zurichu. PIWI/piRNA projekt jsem převzala na jeho samém začátku od prof. Michela Neidharta, navrhla jsem a provedla většinu experimentů, analýzu dat a napsala manuskript.

PIWI-proteins and PIWI-interacting RNAs in rheumatoid arthritis

Journal:	<i>Annals of the Rheumatic Diseases</i>
Manuscript ID	2015-208763
Article Type:	Extended report
Date Submitted by the Author:	13-Oct-2015
Complete List of Authors:	Plestilova, Lenka; University Hospital Zürich, Center of experimental rheumatology Neidhart, Michel; University Hospital Zurich, Rheumatology Russo, Giancarlo; Functional genomic centre Zurich Frank Bertonecelj, Mojca; University Hospital Zurich, Center of Experimental Rheumatology Ospelt, Caroline; Center of Experimental Rheumatology Ciurea, Adrian; University Hospital Zurich, Rheumatology Kolling, Christoph; Schulthess Clinic, Gay, Renate; University Hospital Zurich, Center of Experimental Rheumatology Michel, Beat; University Zurich, Rheumatology Vencovsky, Jiri; Institute of Rheumatology, Gay, Steffen; Center Exp Rheum, Dept Rheum Univ Hosp Juengel, Astrid; University Hospital Zurich/Zurich Center of Integrative Human Physiology (ZIHP), Center of Experimental Rheumatology
Keywords:	Rheumatoid Arthritis, Fibroblasts, Synovitis

SCHOLARONE™
 Manuscripts

Manuscript for Annals of Rheumatic Diseases

Title: PIWIL-proteins and PIWI-interacting RNAs in rheumatoid arthritis

Lenka Pleštilová¹, Michel Neidhart¹, Giancarlo Russo², Mojca Frank-Bertoncelj¹, Caroline Ospelt¹, Adrian Ciurea³, Christoph Kolling⁴, Renate E. Gay¹, Beat A. Michel³, Jiří Vencovský⁵, Steffen Gay¹, Astrid Jüngel¹

¹Center of Experimental Rheumatology, University Hospital Zürich, Zürich, Switzerland,

²Functional Genomic Centre Zürich, Zürich, Switzerland, ³Department of Rheumatology,

University Hospital Zürich, Zürich, Switzerland, ⁴Schulthess Clinic, Zürich, Switzerland,

⁵Institute of Rheumatology and Clinic of Rheumatology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Corresponding author details

Astrid Jüngel, PhD, PD

Center of Experimental Rheumatology

University Hospital Zurich

Bio-Technopark Schlieren

Wagistrasse 14/3.0G, CH 8952 Schlieren, ZH, Switzerland

Phone: +41(0)44 5563172 FAX: +41(0)44 5563444

Abstract

Introduction

PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are small non-coding RNAs, which silence gene expression of transposons. Rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblasts (SF) have an activated phenotype, possibly due to the transposon deregulation. In the present study we explored the role of PIWIL proteins and piRNAs in RASF.

Methods

The expression of PIWIL genes in RA and osteoarthritis (OA) synovial tissues and SF was analyzed by Real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry. Expression of all human piRNAs was analysed by small RNA sequencing. Induction of PIWIL/piRNAs with proinflammatory stimulators as well as cell proliferation, apoptosis and regulation of LINE-1 retrotransposon after silencing of PIWIL genes were studied.

Results

In RA and OA synovial tissues and SF PIWIL2/4 genes were expressed. The sequencing analysis identified 200-300 piRNAs in SF. The regulation but not the expression levels of piR-823, -4153 and -16659 was different in RASF compared to OASF. Stimulation with TNF α /IL1 β / TLR-ligands further increased the nuclear expression of PIWIL4, but not of piRNAs. Co-expression of piRNAs became deregulated after stimulation with TNF α /IL1 β or Poly(I:C). Transient silencing of PIWIL2 and 4 did not change LINE1 methylation and expression. Nevertheless, silencing of PIWIL genes downregulated mRNA for HDAC1 and increased TNF α - induced apoptosis in RASF.

Conclusion

piRNAs are a new class of small regulatory RNAs in RA and OA synovial fibroblasts. In RASF, PIWIL proteins regulate transcription levels of HDAC1 and particularly TNF α -induced apoptosis. Our results suggest that the PIWIL/piRNA system is active in RASF and may contribute to the pathogenesis of RA.

Key words: rheumatoid arthritis, fibroblasts, synovitis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease causing joint destruction as well as systemic inflammation.[1] Synovial fibroblasts (SF) are key effector cells in the pathogenesis of RA.[2, 3] They produce inflammatory cytokines, chemokines and matrix degrading enzymes attracting inflammatory cells to the joints and destroying the cartilage. RASF show an “activated” phenotype possibly due to epigenetic modifications such as DNA hypomethylation and derepression of transposons (e.g. LINE1).[4, 5]

Non-coding RNAs (ncRNA) make up the majority of the human genome. Recent studies have shown that over 90% of our genome is possibly transcribed and only about 2% is translated into proteins.[6] Besides ribosomal RNAs (rRNA) and transport RNAs (tRNA), ncRNAs include also long non-coding RNAs (lncRNA) and various small regulatory RNAs.[7] The small regulatory RNAs are defined by their length (20-32nt) and their interaction with Argonaute family proteins and can be further classified into small interfering RNAs, microRNAs and PIWI-interacting RNAs (piRNA).[8]

piRNAs (24-32nt) build complexes with PIWIL (P-element induced wimpy testis like) proteins, members of the Argonaute family.[9] There are four PIWIL proteins in humans (PIWIL1-4), which bind approximately 23.439 known piRNAs.[10] The PIWIL/piRNA ribonucleoprotein complex regulates gene expression through specific recognition of the target gene by the base complementarity with the piRNA followed by target RNA degradation or the recruitment of chromatin modifying enzymes by the PIWIL protein.[9, 11] PIWIL/piRNA complexes have a specific function in maintaining genome stability through silencing of transposons.[12] They are known to be highly expressed in germline and cancer cells and the correlations of PIWIL and piRNA expression levels with patient prognosis was described in different cancer types.[13-17] Experimental manipulation of PIWIL/piRNA expression both *in vitro* and *in vivo* influences growth, invasion and migration of the cancer cells.[18-21] In addition, recent studies have shown a possible role of piRNAs in somatic cells, including the regulation of protein coding genes.[9, 22, 23] piRNAs can act in this context similarly to microRNAs by binding to the 3'UTR of messenger RNA and inducing its degradation.[24]

microRNAs (e.g. miR-124a, -146a, -155 and -203) are known to be deregulated in RASF and to contribute to their above mentioned activated phenotype.[25] piRNA expression has not been studied in SF so far.

The aim of our study was to describe the role of the PIWIL/piRNA pathway in RA by 1) evaluating the expression of PIWIL1-4 proteins; 2) assessing the expression of piRNAs; 3) studying the regulation of the PIWIL/piRNA system and 4) exploring its possible function in RASF.

Methods

Synovial tissues and synovial fibroblasts

Synovial tissues were obtained from patients with RA diagnosed according to the 1987 American College of Rheumatology criteria for classification of RA,[26] who underwent joint replacement surgery. Synovial tissues from patients with osteoarthritis (OA, degenerative disease) served as controls. All patients provided informed consent and the study was approved by the local ethics committee.

SF cultures were established by dispase digestion of synovial tissue as described elsewhere.[27] Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. SF of passages 4-8 were used for all experiments.

RASF and OASF (n=5-16) were stimulated or not for 24 hours with Poly(I:C) (10ug/ml; Invivogen), LPS (100ng/ml; List Biological Laboratories) or TNF α (10 or 100ng/ml; R&D) alone or in combination with IL1 β (1ng/ml; R&D).

piRNA analysis by small RNA sequencing

Total RNA from RASF and OASF (n=9 each) was isolated with the miRNeasy Mini kit and treated with RNase-free DNase (Qiagen). The RNA quality was assured using the Agilent RNA 6000 Nano kit with Agilent 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies). RNA with RIN \geq 9.5 was considered acceptable for the study.

Small RNA library preparations and sequencing using HiSeq2500 (Illumina Inc., CA) were performed at the Functional Genomic Center Zurich according to the Illumina TruSeq® Small RNA protocol. After removal of the adaptor sequences the small RNA-seq reads were mapped to the human genome by Bowtie[28] and aligned to the piRNABank – database of 23.439 known human piRNA sequences.[10] Reads Per Kilobase per

Million mapped reads (RPKM) of piRNAs identified in RA were compared to RPKM in OA using the SARTools pipeline based on edgeR package.[29] piRNAs were considered differentially expressed when the adjusted p-value was ≤ 0.05 .

Analysis of piRNAs by RT-PCR

The cDNAs were generated with TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit and a Custom designed piRNA-specific primers, followed by Real-time PCR with Custom designed piRNA TaqMan® probes and TaqMan Universal PCR Master Mix as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems). We have measured expression of piR-651, piR-823, piR_1312, piR_4271 and piR-4987 [piRNA Bank[10]: hsa_piR-000651, hsa_piR_000823, hsa_piR-001312, hsa_piR_004271 and hsa_piR_004987]. RNU6B and RNU44 were employed as housekeeping genes for the measurements of basal piRNA expression. Under the stimulation, we normalised the piRNAs to the cel-39 spike in control.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 software. Data were analyzed by parametric (paired 2-tailed t-test) or nonparametric (Wilcoxon's matched pairs signed rank test) statistical tests as appropriate. Values are presented as mean \pm SEM. P values less than 0.05 were considered significant.

Further details on the methods used (transfections, RT-PCR, Western blotting, immunochemistry, apoptosis and proliferation assays and LINE-1 methylation measurement) are provided online as **supplementary material**.

Results

Characteristics of RA and OA patients are shown in Table 1.

PIWIL2 and PIWIL4 genes are transcribed in synovial fibroblasts

To investigate whether the PIWIL/piRNA system is active in the synovial cells, we first measured the expression of the PIWIL1-4 mRNA in RA and OA synovial tissues. We found mRNA for PIWIL2 and PIWIL4 to be expressed similarly in RA and OA synovial tissues (mean PIWIL2 dCt \pm SEM in RA 5.3 \pm 0.7 and in OA 5.5 \pm 0.3; mean PIWIL4 dCt \pm SEM

in RA 3.6 ± 0.5 and in OA 2.9 ± 0.3), while mRNA for PIWIL1 and PIWIL3 were not detectable.

Synovial tissue is composed by multiple cell types (SF, inflammatory infiltrates, endothelial cells and others), and SF themselves are recognized as a key players in RA pathogenesis.[30] Therefore we measured the expression of PIWIL1-4 mRNA in cultured SF and could detect similar high expression of PIWIL2 and PIWIL4 mRNA in cells from both RA and OA patients (mean PIWIL2 $dCt\pm SEM$ in RA 2.2 ± 0.8 and in OA 1.3 ± 0.6 ; mean PIWIL4 $dCt\pm SEM$ in RA 1.3 ± 0.3 and in OA 1.2 ± 0.4). (Figure 1A)

PIWIL4 protein is expressed in cell nuclei

At the protein level, we detected strong expression of PIWIL4 in nuclear extracts from RASF and OASF on Western blots, while the bands of PIWIL2 were weak in both RASF and OASF. There was neither PIWIL2 nor PIWIL4 protein found in the cytoplasmic extract. (Figure 1B) For the following analysis, we focused on PIWIL4 and performed immunohistochemistry in RA synovial tissues, where we could see a strong signal in the nucleus and cytoplasm. (Figure 1C) Immunofluorescence analysis of RASF showed PIWIL4 protein expression in the cell nuclei as well as in the perinuclear region (Figure 1D).

PIWI-interacting RNAs are expressed in synovial cells

After having detected high expression of PIWIL4 protein in RA and OASF, we sequenced 9 RASF and 9 OASF small RNA libraries using the Illumina platform. Reads length distribution peaks at 22 nt and 29 nt, confirming the presence of both miRNAs and piRNAs. (Figure 2A1) 200-300 piRNAs were found to be expressed in all 9 RASF and OASF. The most expressed piRNA, piR-16735, covered 20% of all piRNA reads, while next 3 piRNAs (piR-18570, -17724 and -20388) each covered about 5% of all piRNA reads.

The analysis of RNA seq count data did not show any significantly differentially expressed piRNAs in RASF compared to OASF. Unsupervised clustering of piRNA could not distinguish between the groups of RASF and OASF. (Figure 2A2)

Deregulation of piRNAs in RA synovial fibroblasts

The RNA sequencing data (RPKM) suggested that the piRNAs are likely regulated by some common factor as a whole group, rather than being regulated independently by

own factors. To investigate this issue, we correlated RPKMs of single piRNAs in the 9 RASF and 9 OASF between each other and created correlation matrixes showing the Pearson's correlation coefficients R for each pair of piRNAs. All coefficients are positive, as shown in the Figure 2B1, suggesting some mechanism of co-expression or co-regulation of piRNAs in SF. Only piRNAs with mean RPKM ≥ 500 (n=38) were included in this analysis. Furthermore, we have calculated the $\Delta R = R(\text{RASf}) - R(\text{OASF})$ for the single piRNAs and then summed all ΔR for each piRNA. According to this analysis, piRNAs are less tightly regulated in RASF than in OASF (ΔR are mostly negative) and the 3 most deregulated piRNAs in RASF are piR-823, -4153 and -16659 (Figure 2B2).

TLR-ligands and proinflammatory cytokines increase expression of PIWIL4

To understand, whether PIWIL4 is regulated by the inflammation process in the RA joint, we measured PIWIL4 expression in RASF and OASF stimulated with TLR-ligands LPS and Poly(I:C) or with proinflammatory cytokine IL1 β in combination with TNF α . Levels of PIWIL4 mRNA were enhanced by Poly(I:C) in both RASF and OASF 2.9-fold (p=0.003)/3.4-fold (p=0.013); LPS 2.1-fold (p=0.026)/2.6-fold (p=0.025) and TNF α in combination with IL1 β 1.9-fold (p=0.003)/1.7-fold (p=0.007). (Figure 3A) At the protein level by Western blot we detected similar induction of PIWIL4 expression in the nuclear extract, while in the cytoplasmic extract PIWIL4 protein was not detectable. (Figure 3B)

piRNAs are deregulated after stimulation TNF α /IL1 β or P(I:C)

To study the regulation of piRNAs in SF, we chose 5 piRNAs (piR-651, -823, -1312, -4271 and -4987), which we found to have different expression levels in cancer cell lines. (Figure 4A1) We confirmed, that the expression levels are also comparable in RA and HC PBMC (Figure 4A2) and RA and OASF (Figure 4A3). The most expressed piRNA across the cell types was piR-651, followed by piR-1312, piR-823, piR-4987 and the least expressed piR-4271. Expression of those 5 piRNAs in RASF was not significantly changed 24 hours after stimulation with TNF α + IL1 β , LPS or Poly(I:C) (Figure 4B), but their co-expression became deregulated after TNF α /IL1 β or P(I:C) in contrast to the stimulation with LPS. (Figure 4C).

siPIWIL4 does not affect the levels of piRNAs but decreases the expression of HDAC1

To study the function of the PIWIL/piRNA in SF, we have silenced the PIWIL4 gene. PIWIL4 silencing efficiency was around 50% at the mRNA level and 30% at the protein level. (Figure 5A) We have not observed any changes in levels of piR-651, -823 or -4987 after silencing of PIWIL4. (Figure 5B)

PIWIL/piRNA-complexes recruit epigenetic modifiers on the target place [9]. We questioned whether PIWIL4 silencing has any impact on expression of HDAC 1-11 in RASF. At 48 hours after siPIWIL4, we have observed decreased mRNA expression of HDAC1 (to 0.6-fold, $p=0.0003$) and increased expression of HDAC9 (to 1.3-fold, $p=0.025$), while levels of other HDAC remained unchanged. (Figure 5C) However, there was no change in HDAC1 protein level measured 72 hours after silencing PIWIL4. (data not shown)

As HDAC1 is involved in the regulation of cell cycle inhibitors [31] and silencing of PIWIL4 is blocking the expression of HDAC1, we have measured the levels of p16, p21 and p53 after silencing of PIWIL4. We observed small decrease of p16 and p21 on the mRNA level (to 0.8- and 0.9-fold, $p=0.022$ and $p=0.040$), p53 remained unchanged. However, there was no change in the levels of p16 and p21 protein levels. The Real time measurements of the cell proliferation with the X-Celligence system or BrdU did not show any difference in the proliferation of RASF after silencing PIWIL2 and 4 genes (data not shown).

PIWIL/piRNA system is involved in regulation of RASF apoptosis

In cancer, overexpression of PIWIL4 decreases apoptosis.[32] Reduced apoptosis susceptibility contributes also to synovial hyperplasia in RA.[30] We evaluated the cell apoptosis in RASF and OASF (n=5) silenced for PIWIL2 and 4 genes after high dose of TNF α (100ng/ml). In 3 RASF and 3 OASF the apoptosis increased 24 hours after the TNF α stimulation (RASF: 3.1-fold, $p=0.008$; OASF: 4.4-fold, $p=0.082$), whereas the remaining 2 fibroblast samples did not react to the stimulation. In RASF, silencing of PIWIL genes combined with TNF α stimulation further increased the apoptosis compared to TNF α stimulation with siCtrl (RASF: 1.5-fold, $p=0.050$; OASF: 1.2-fold, $p=0.639$). (Figure 5D).

PIWIL4 does not regulate methylation or expression of LINE-1

piRNAs help to maintain the integrity of the genome by silencing the transposons.[33] To investigate whether this mechanism might play role in RA, we have determined LINE-1 methylation and expression in RASF after silencing of PIWIL2 and 4. As a positive control we have used RASF treated for 1 week with the demethylation drug 5-azacytidine (5-AZA). While LINE-1 methylation decreased after 5-AZA treatment as expected, it did not change after transient silencing of PIWIL2 and 4. We have obtained similar results when measuring RNA expression of LINE-1 fragments, which was increased after 5-AZA and did not change after transient siPIWIL2 and 4.(Figure 5E).

Discussion

In this study we demonstrate: 1) Presence of PIWIL4 protein in RA and OA synovial tissues and fibroblasts. 2) Expression of 200-300 piRNAs in SF without significant differences. However, the regulation but not the expression levels of piRNA-823, -4153 and -16659 were different in RASF compared to OASF. 3) Upregulation of PIWIL4 and deregulation of piRNAs by the TLR-ligands and proinflammatory. 4) No effect of transient silencing of PIWIL4 on proliferation or migration of SF and no change in the LINE1-methylation or expression in RASF. However silencing of PIWIL4 downregulated HDAC1 mRNA and increased TNF α -induced apoptosis in RASF.

Our findings that PIWIL2 and PIWIL4 mRNA and PIWIL4 protein are expressed in SF are in agreement with a previous study by Sugimoto et al., who reported PIWIL4 expression in various somatic tissues.[32] Similarly, the number of piRNAs which we detected in RASF (200-300) is comparable with 273 piRNAs detected in somatic tissues by Matrinez et al.[34] Similarly to this study, we also observed the same expression pattern with very high and very low levels of single piRNAs across the cell types.

RNA seq analysis with edgeR package did not find any significantly differentially expressed piRNAs in RASF compared to OASF. The only other piRNA study conducted so far in autoimmune diseases is by Alexandrova et al., who found only 6 differentially expressed piRNAs in bronchial smooth muscle cells from asthmatic patients.[35] We have shown that piRNAs in SF are most likely co-regulated by some common mechanism, as their expression levels do correlate positively with each other.

This regulation is weaker in RASF than in OASF, and particularly piR-4153, piR-16659 and piR-823 seem to be deregulated in RASF. Common regulation of piRNAs could be partially explained by their transcription in clusters.[36] We were interested if piR-4153, -16659 and -823 are coded by the same cluster and learnt, that they are on different chromosomes. Also the 5 piRNAs which we measured after stimulations of RASF are encoded by different regions. Further studies are needed to clarify, whether the piRNA deregulation is more involved in the activation of RASF or if it is a bystander effect.

We also describe an additional regulatory mechanism of the PIWIL/piRNA system by proinflammatory cytokines and TLR-ligands next to the hormonal regulation.[37, 38] It might be interesting to investigate whether the PIWIL/piRNA system is regulated by glucocorticoids, as these steroids are chemically related to sexual hormones and often used in the treatment of patients with arthritis.

To understand the role of the PIWIL/piRNA system in SF, we studied various cell functions after silencing the PIWIL4 protein. As PIWIL4 might be involved in the biogenesis of piRNAs,[39] we initially expected to observe a decrease in piRNA levels after silencing of PIWIL4. Nevertheless, deregulation of the piRNA levels in both directions has been described[40] and in our study, the levels of the 3 piRNAs measured remained unchanged. However, after silencing of PIWIL4, the most prominent PIWIL protein expressed in human SF, piRNAs should not be able to execute their functions regardless their expression level.

Silencing of PIWIL4 gene decreases the expression of mRNA for HDAC1, which is in agreement with previous reports.[41] HDAC1 protein plays a crucial role in the destruction of RA joints [42], however in our transient silencing experiments only the mRNA but not the protein was downregulated. HDAC9, whose mRNA was increased after silencing PIWIL4, is a repressor of immune system so far mostly studied in inflammatory bowel diseases.[43]

In cervical cancer cells, upregulation of PIWIL4 promotes cell proliferation and decreases apoptosis.[18] We did not observe any changes in the proliferation of RASF after silencing PIWIL4; a possible reason is that the proliferation rate of SF is low in comparison to that of cancer cells. In OASF the TNF α -induced apoptosis was higher than in RASF, and silencing of PIWIL2 and 4 significantly increased TNF α -induced apoptosis in RASF but not in OASF. This difference is probably based on the activated phenotype of RASF, which are less likely to undergo apoptosis than OASF.[44]

In our study, the transient silencing of PIWIL2 and 4 did not change LINE1 methylation and expression in RASF. LINE1 is known to be deregulated in RASF[4] and the PIWIL/piRNA system is believed to have a main function in silencing of transposable elements.[12, 45, 46] However there is another system to control LINE-1 expression (i.e. TREX-1) which has been found to be deficient in RASF,[47] suggesting redundancy in LINE-1 silencing mechanisms with most likely no importance of the PIWIL/piRNA system in synovial fibroblasts.

Conclusion

We detected a new class of regulatory RNAs and their binding partners in RA and OA synovial fibroblasts. Over 200 PIWI-interacting RNA, which build complexes with PIWIL proteins, are transcribed in SF. In RASF, the PIWIL proteins regulate the transcription levels of HDAC1 and particularly TNF α -induced apoptosis. Transient silencing of PIWIL2 and 4 did not change LINE1 methylation and expression in RASF. Our results suggest that the PIWIL/piRNA pathway is active in RASF and may contribute to the pathogenesis of RA.

Acknowledgments

The authors acknowledge Maria Comazzi and Peter Künzler for their excellent technical assistance. We also thank Anna Bratus and Guillaume Chazarain for their bioinformatical support. This work was supported by FP7 OSTEOIMMUNE 289150, OPO Stiftung, EU-funded IMI BTCure, Institute Arthritis Research (IAR), EU-funded EuroTEAM and project of MHCR for conceptual development of research organization 023728.

Contributors

LP designed, performed and analysed most of the experiments, wrote the manuscript. MFB and CO did the small RNA sequencing experiment, GR analysed the piRNA expression based on the sequencing data, AC and CK provided clinical samples. AJ, MN, SG, RG, JV and BAM supervised the project and wrote the manuscript.

Nr.	Diagnosis	Joint	Sex	Age	CRP	VAS	RA duration (yrs)	RF	Anti-CCP	DAS 28
SHK 303	OA	knee	f	72	6.4	0				
SHK 335	OA	knee	m	65	0.2	NA				
SHK 356	OA	knee	f	61	21.2	5				
SHK 350	OA	shoulder	f	89	2.5	NA				
SHK 384	OA	shoulder	f	68	1.2	9				
SHK 385	OA	shoulder	f	78	2.2	9				
SHK 345	OA	thumb	f	55	<8	NA				
SHK 400	OA	thumb	f	61	<5	NA				
SHK 343	OA	thumb	m	68	NA	NA				
SHK 196	RA	knee	f	54	46.7	1	16	positive	positive	NA
SHK 280	RA	knee	f	71	17.4	5.6	51	positive	positive	2
SHK 368	RA	knee	f	64	1.7	5	7	positive	positive	1.9
SHK 341	RA	shoulder	f	73	1.6	4	27	positive	NA	1.3
SHK 352	RA	shoulder	f	69	8	5	39	positive	NA	1.8
SHK 377	RA	shoulder	f	79	16.3	10	33	positive	NA	3.9
SHK 316	RA	finger	f	52	NA	1	21	positive	positive	NA
SHK 318	RA	finger	f	69	NA	0	50	NA	NA	NA
SHK 379	RA	finger	f	78	26	0	23	positive	positive	NA

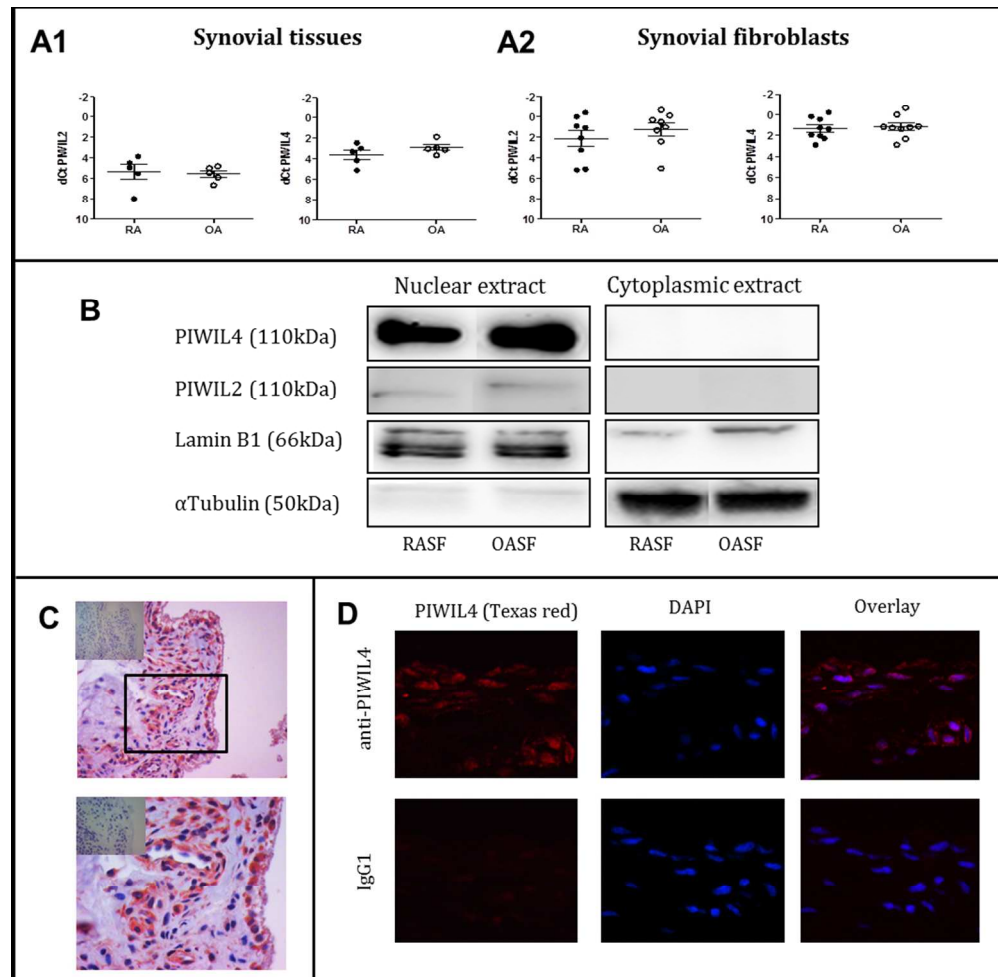
Table 1 Clinical data of patients – Small RNA sequencing in SF

VAS=Visual analogue scale for pain, 0-10cm

References

1. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* (London, England). 2009 Feb 21; 373(9664):659-672.
2. Lefevre S, Meier FM, Neumann E, Muller-Ladner U. Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Current pharmaceutical design*. 2015; 21(2):130-141.
3. Filer A, Pitzalis C, Buckley CD. Targeting the stromal microenvironment in chronic inflammation. *Current opinion in pharmacology*. 2006 Aug; 6(4):393-400.
4. Neidhart M, Rethage J, Kuchen S, Kunzler P, Crowl RM, Billingham ME, et al. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis and rheumatism*. 2000 Dec; 43(12):2634-2647.
5. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2009 Dec; 60(12):3613-3622.
6. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS. The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* (New York, NY). 2008 Mar 28; 319(5871):1787-1789.
7. Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nature reviews Genetics*. 2014 Jun; 15(6):423-437.
8. Suzuki R, Honda S, Kirino Y. PIWIL Expression and Function in Cancer. *Frontiers in genetics*. 2012; 3:204.
9. Ross RJ, Weiner MM, Lin H. PIWIL proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. 2014 Jan 16; 505(7483):353-359.
10. Sai Lakshmi S, Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered PIWI-interacting RNAs. *Nucleic acids research*. 2008 Jan; 36(Database issue):D173-177.
11. Luteijn MJ, Ketting RF. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nature reviews Genetics*. 2013 Aug; 14(8):523-534.
12. Bamezai S, Rawat VP, Buske C. Concise review: The PIWIL-piRNA axis: pivotal beyond transposon silencing. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2012 Dec; 30(12):2603-2611.
13. Greither T, Koser F, Kappler M, Bache M, Lautenschlager C, Gobel S, et al. Expression of human PIWIL-like genes is associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. *BMC cancer*. 2012; 12:272.
14. Chen C, Liu J, Xu G. Overexpression of PIWIL proteins in human stage III epithelial ovarian cancer with lymph node metastasis. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2013; 13(5):315-321.
15. Cui L, Lou Y, Zhang X, Zhou H, Deng H, Song H, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers. *Clinical biochemistry*. 2011 Sep; 44(13):1050-1057.
16. Huang G, Hu H, Xue X, Shen S, Gao E, Guo G, et al. Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2013 Jul; 15(7):563-568.
17. Mei Y, Clark D, Mao L. Novel dimensions of piRNAs in cancer. *Cancer letters*. 2013 Aug 9; 336(1):46-52.
18. Su C, Ren ZJ, Wang F, Liu M, Li X, Tang H. PIWIL4 regulates cervical cancer cell line growth and is involved in down-regulating the expression of p14ARF and p53. *FEBS letters*. 2012 May 7; 586(9):1356-1362.
19. Cheng J, Guo JM, Xiao BX, Miao Y, Jiang Z, Zhou H, et al. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011 Aug 17; 412(17-18):1621-1625.
20. Cheng J, Deng H, Xiao B, Zhou H, Zhou F, Shen Z, et al. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer letters*. 2012 Feb 1; 315(1):12-17.
21. He X, Chen X, Zhang X, Duan X, Pan T, Hu Q, et al. An Lnc RNA (GAS5)/SnoRNA-derived piRNA induces activation of TRAIL gene by site-specifically recruiting MLL/COMPASS-like complexes. *Nucleic acids research*. 2015 Apr 20; 43(7):3712-3725.
22. Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, et al. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*. 2012 Apr 27; 149(3):693-707.
23. Zhong F, Zhou N, Wu K, Guo Y, Tan W, Zhang H, et al. A SnoRNA-derived piRNA interacts with human interleukin-4 pre-mRNA and induces its decay in nuclear exosomes. *Nucleic acids research*. 2015 Sep 23.

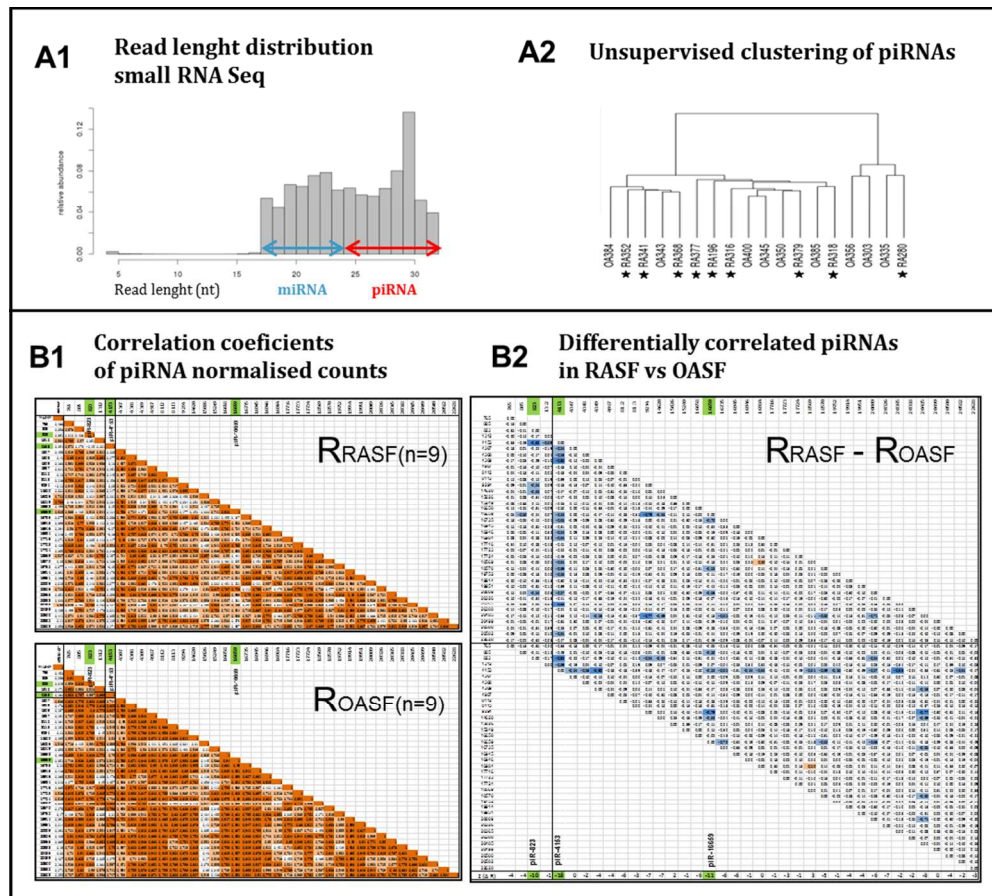
24. Peng L, Song L, Liu C, Lv X, Li X, Jie J, et al. piR-55490 inhibits the growth of lung carcinoma by suppressing mTOR signaling. *Tumour Biol*. 2015 Sep 25.
25. Filkova M, Jungel A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2012 Jun 1; 26(3):131-141.
26. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988 Mar; 31(3):315-324.
27. Aradi B, Kato M, Filkova M, Karouzakis E, Klein K, Scharl M, et al. Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 2 (PTPN2), an Important Regulator of IL-6 Production in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015 Jul 2.
28. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*. 2009; 10(3):R25.
29. Varet H, Coppée J-Y, Dillies M-A. SARTools: a DESeq2- and edgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data, 2015.
30. Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, Gay S, Muller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med*. 2010 Oct; 16(10):458-468.
31. Huber LC, Distler JH, Moritz F, Hemmatazad H, Hauser T, Michel BA, et al. Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis and rheumatism*. 2007 Aug; 56(8):2755-2764.
32. Sugimoto K, Kage H, Aki N, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, et al. The induction of H3K9 methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a locus. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007 Aug 3; 359(3):497-502.
33. De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*. 2011 Dec 8; 480(7376):259-263.
34. Martinez VD, Vucic EA, Thu KL, Hubaux R, Enfield KS, Pikor LA, et al. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Scientific reports*. 2015; 5:10423.
35. Alexandrova E, Miglino N, Hashim A, Nassa G, Stellato C, Tamm M, et al. Small RNA profiling reveals deregulated phosphatase and tensin homolog (PTEN)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in bronchial smooth muscle cells from asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015 Jul 3.
36. Le Thomas A, Toth KF, Aravin AA. To be or not to be a piRNA: genomic origin and processing of piRNAs. *Genome biology*. 2014; 15(1):204.
37. Kang HJ, Moon MJ, Lee HY, Han SW. Testosterone alters testis function through regulation of piRNA expression in rats. *Molecular biology reports*. 2014 Oct; 41(10):6729-6735.
38. Pan Y, Hu M, Liang H, Wang JJ, Tang LJ. The expression of the PIWIL family members miwi and mili in mice testis is negatively affected by estrogen. *Cell and tissue research*. 2012 Oct; 350(1):177-181.
39. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Feb; 10(2):126-139.
40. Bamezai S. Characterizing the functional role of argonaute protein PIWIL4 in acute myeloid leukemia: University of Ulm; 2015.
41. Bamezai S MM, Zhou F, Rohde C, Muller-Tidow C, Dohner K, Dohner H, Buske MF, Buske C, Rawat VPS. Knockdown Of The PIWIL - Like Protein 4 (PIWIL4) Delays Leukemic Growth and Is Associated With Gross Changes In The Global Histone Methylation Marks In Human MLL -Rearranged AML 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA 2013.
42. Hawtree S, Muthana M, Wilkinson JM, Akil M, Wilson AG. Histone deacetylase 1 regulates tissue destruction in rheumatoid arthritis. *Human molecular genetics*. 2015 Jul 7.
43. Parra M. Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology. *The FEBS journal*. 2015 May; 282(9):1736-1744.
44. Korb A, Pavenstadt H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*. 2009 Apr; 14(4):447-454.
45. Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, et al. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Developmental cell*. 2009 Dec; 17(6):775-787.
46. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The PIWIL-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science (New York, NY)*. 2007 Nov 2; 318(5851):761-764.
47. Neidhart M, Karouzakis E, Schumann GG, Gay RE, Gay S. Trex-1 deficiency in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2010 Sep; 62(9):2673-2679.



Expression of PIWIL genes

A1. PIWIL2 and PIWIL4 are expressed in synovial tissues (ST) from RA and OA patients. Mean dCt PIWIL2 in RA ST 5.3 and in OA ST 5.5; mean dCt PIWIL4 in RA ST 3.6 and in OA ST 2.9. PIWIL1 and PIWIL3 were not expressed. A2. Isolated synovial fibroblasts (SF) from RA and OA express of PIWIL2 and PIWIL4. Mean dCt PIWIL2 in in RASf 2.2 and in OASf 1.3; mean dCt PIWIL4 in in RASf 1.3 and in OASf 1.2. PIWIL1 and PIWIL3 were not expressed. B. PIWIL4 protein was detected by Western blot in both RASf and OASf in the nucleus, but not in the cytoplasm. PIWIL2 expression was weak. C. In synovial tissues from patients with RA staining for PIWIL4 could be detected in synovial fibroblasts as well as around the blood vessels (Immunohistochemistry, RA patient, AEC red signal signal, original magnification: 200x and 400x, in the corner is the isotype control) D. Immunofluorescence has shown presence of PIWIL4 protein predominantly in the cell nucleus and in the perinuclear regions.

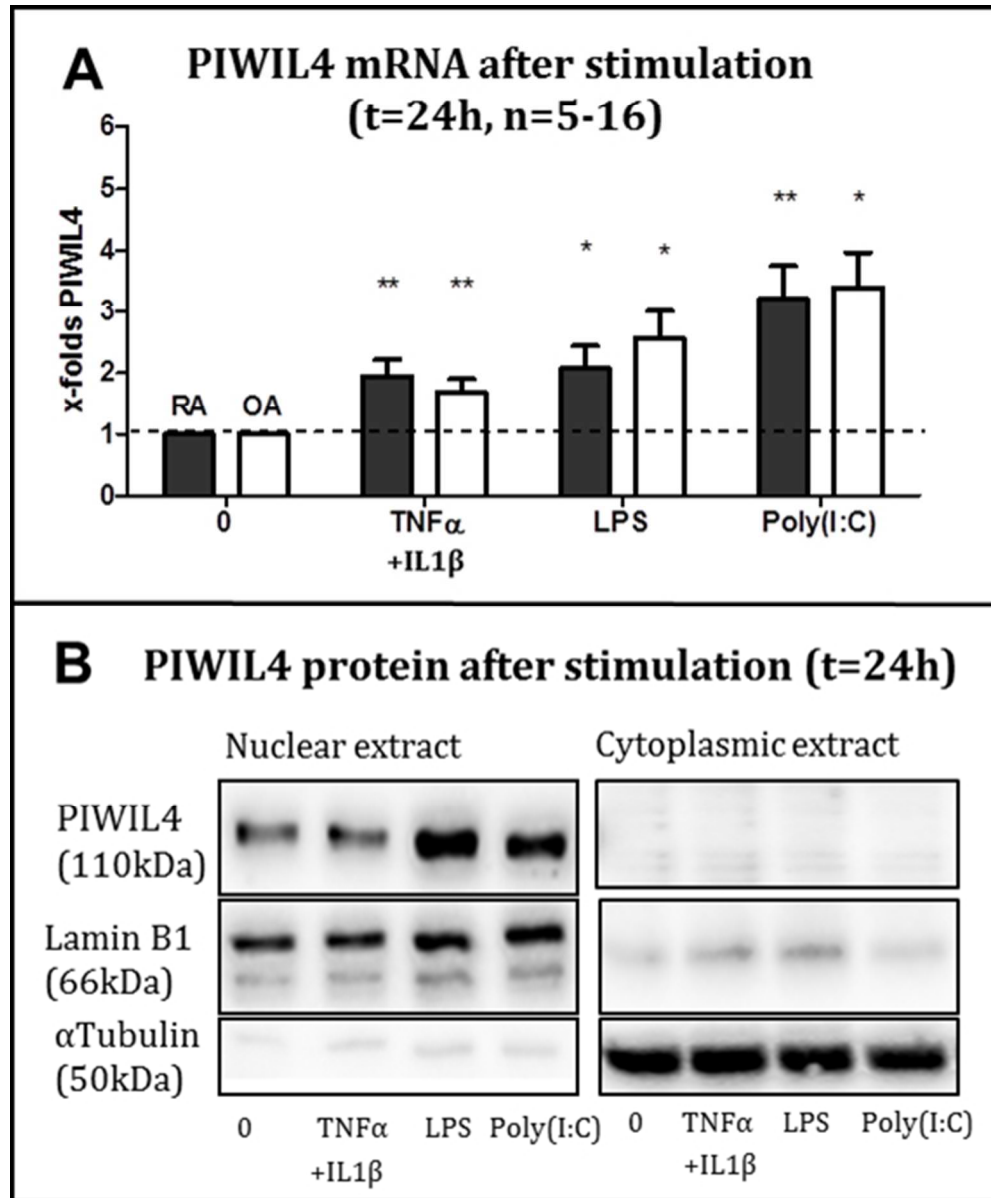
181x176mm (150 x 150 DPI)



Expression of PIWI-interacting RNAs

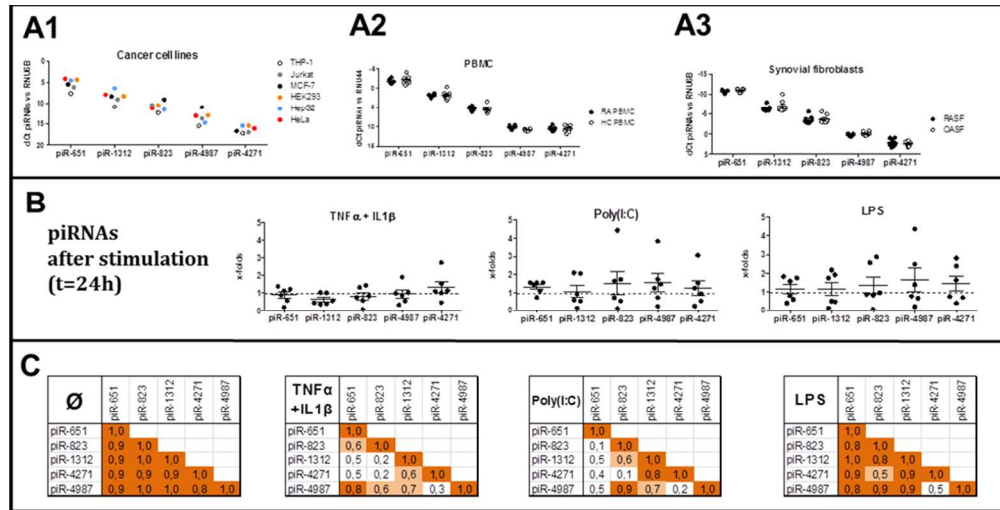
A1. Small RNA Illumina sequencing – read length distribution in all SF. A2. Heat map as a result of unsupervised clustering of piRNAs in 9 RASF and 9 OASF. piRNAs do not cluster between the two groups. B. piRNAs correlate positively with each other, suggesting common regulation of the piRNA pathway in the SF.

In RASF is this regulation of piRNA co-expression is disturbed. B1. Correlation matrix off piRNAs and endogenous control (RNU6-6P) in 9 RASF and 9 OASF. RPKM of single piRNAs are were correlated with each other and with the endogenous controls and the correlation coefficient R for each pair is shown. Only piRNAs with mean RPKM ≥ 500 ($n=38$) are included in the analysis. Strong positive correlations ($0.75 \leq R$) are highlighted with dark orange; weak positive correlations ($0.5 \leq R < 0.75$) are light orange and no correlation ($-0.5 \leq R < 0.5$) are white. piRNAs mostly do not correlate with the RNU-6B showing, that the positive correlation is not a result of unequal read counts between the samples. B2. Analysis of differentially regulated piRNAs in 9 RASF versus 9 OASF. In the correlation matrix are shown $\Delta R = R_{RASF} - R_{OASF}$ are show for each piRNA. With blue are highlighted piRNA correlations, which are weaker in RASF compared to OASF ($\Delta R \leq -0,5$). In the last line is the $\Sigma \Delta R$ for each piRNA given, the three most deregulated piRNAs in (piR-4153, -16659 and -823) are highlighted in red.



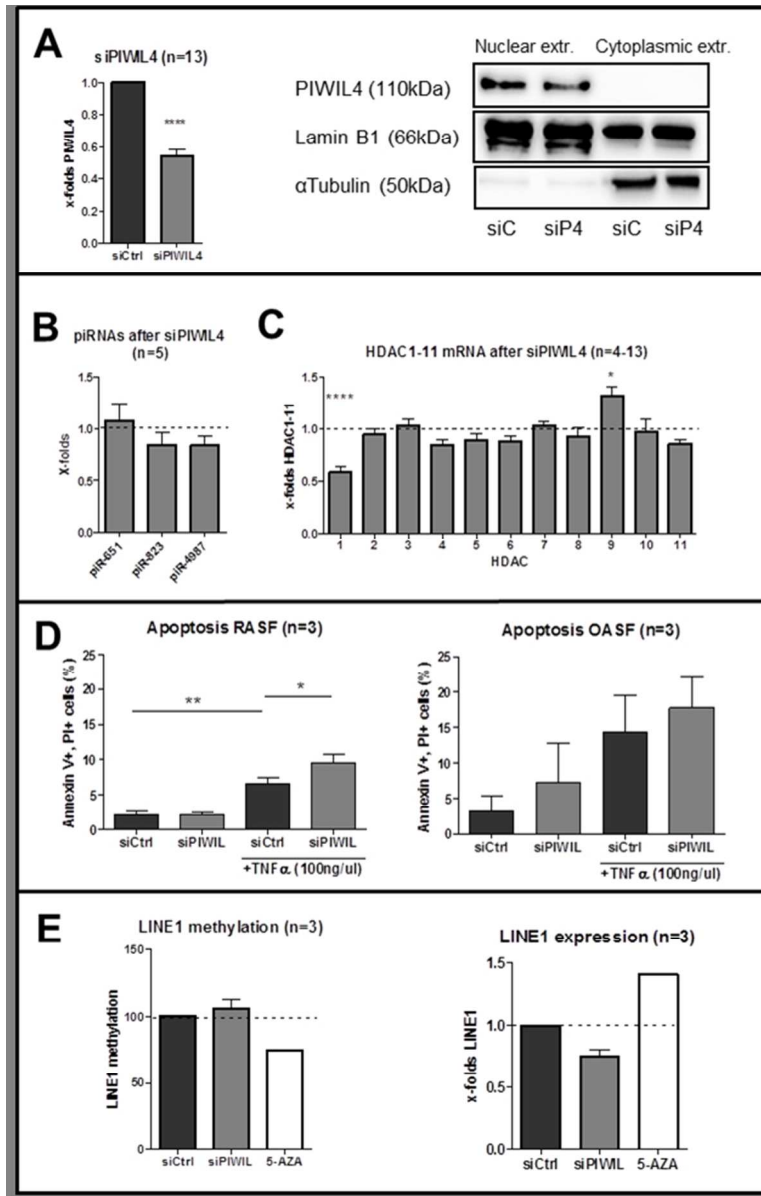
Regulation of PIWIL4

A. Levels of PIWIL4 mRNA were enhanced by stimulations with proinflammatory cytokines and TLR ligands in both RASF/OASF. TNF α in combination with IL1 β induced PIWIL4 mRNA 1.9-fold ($p=0.003$)/1.7-fold ($p=0.007$); LPS 2.1-fold ($p=0.026$)/2.6-fold ($p=0.025$) and Poly(I:C) 2.9-fold ($p=0.003$)/3.4-fold ($p=0.013$) in RASF/OASF. B. On the protein level we confirmed upregulation of PIWIL4 after stimulation with TLR-ligands in nuclear extract of RASF, there was no PIWIL4 detectable in the cytoplasmic extract.



Regulation of piRNAs

A1. To study the regulation of piRNAs in SF, we chose 5 piRNAs which had different expression levels in cancer cell lines (THP-1, Jurkat, MCF-7, HEK293, HepG2 and HeLa). piR-651 was highly expressed, followed by piR-1312, piR-823, piR-4987 and piR-4271. A2. In 8 RA PBMC and 8 HC PBMC, the 5 piRNAs were expressed in the same order (mean dCt versus RNU44 RA / HC): piR-651 (-1.8/-2.2), piR-1312 (1.8/1.7), piR-823 (5.3/5.5), piR-4987 (10.1/10.8), piR-4271 (10.6/10.6) A3. In 9 RASF and 9 OASF, piRNAs were expressed as follows (mean dCt versus RNU6B RA / OA): piR-651 (-10.7/-11.0), piR-1312 (-6.3/-6.9), piR-823 (-3.5/-3.7), piR-4987 (0.3/-0.1), piR-4271 (2.2/2.4) B. Expression of piRNAs in 6 RASF 24 hours after stimulation with TNFα + IL1β, LPS or Poly(I:C) did not change. C. Coexpression of piRNAs became deregulated after stimulation with TNFα/IL1β or P(I:C), but not after LPS. Correlation coefficients of piRNA x-folds are graphed in a heat map. Strong positive correlations (0.75 ≤ R) are highlighted with dark orange; weak positive correlations (0.5 ≤ R < 0.75) are light orange and no correlations (-0.5 ≤ R < 0.5) are white.



Function of PIWIL/piRNAs

A1. PIWIL4 silencing efficiency on the mRNA level was 50% and on the protein level 30%. B. piRNA expression measured in 3 RASF 48 hours after silencing of PIWIL4. C. PIWIL4 silencing specifically decreased expression of HDAC1 mRNA (n=13, mean x-folds 0.59, $p < 0.0001$) and increased expression of HDAC9 mRNA (n=4, mean x-folds 1.32, $p = 0.025$). Other HDACs remained unchanged. However, on the protein level 72 hours after transfection, we have not seen any decrease in HDAC1. D. Apoptosis rate in 3 RASF and 3 OASF silenced for PIWIL genes, both basal and 24 hours after high dose TNF α (100ng/ml). Percentages of the Annexin V positive PI double positive late apoptotic cells are graphed. Mean apoptosis rates (%) in RASF/OASF: siCtrl 2.10/3.21; siPIWIL 2.17/7.32; siCtrl+TNF α 6.59/14.31; siPIWIL + TNF α 9.60/17.76. E. PIWIL2 and PIWIL4 silencing did not change expression or methylation of the LINE1 retrotransposon (n=3; mean LINE1 methylation 106%, mean mRNA expression 0.74-fold). RASF treated for 1 week with DNA demethylation drug 5-azacytidine (5-AZA) were used as a positive control.

Supplementary methods

RNA isolation, reverse transcription, and Real-time polymerase chain reaction (PCR)

Cells were lysed in QIAzol lysis reagent, and total RNA was isolated using a miRNeasy Mini kit, including a DNA digestion step using RNase-free DNase (Qiagen). Total RNA was reverse transcribed using random hexamers and MultiScribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). Non-reverse-transcribed (NRT) samples served as negative controls. Real-time PCR was performed using SYBR Green Master Mix or TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers (Supplementary table 1). Constitutively expressed human Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) was measured for internal standard sample normalization.

PCR was performed using the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative expression of messenger RNA (mRNA) was calculated by the comparative threshold cycle method, where $dCt = Ct(\text{RNA of interest}) - Ct(\text{housekeeping gene})$ and therefore higher dCt values represent lower expression.

Supplementary table 1 **List of Real-time PCR primers**

HPRT 1	F: ATGGACAGGACTGAACGTCTTG; R: GGCTACAATGTGATGGCCTC
PIWIL 1	Assay ID: Hs01041737_m1 (Applied Biosystems)
PIWIL 2	F: AATGCTTCCATCAGGTAGAGGC; R: TGCTCTGCGTACCAGATTAGC
PIWIL 3	F: AGACACATTTAACAAATCAGATGGC; R: TTCTTTATGTTGCTGCCTGTAGTAG
PIWIL 4	F: ACACGTCTCAGTCCTTCAGG; R: AGCGAGCATTGGTATTCTCTCTG
HDAC 1	Assay ID: Hs00606262_g1 (Applied Biosystems)
HDAC 2	Assay ID: Hs00187320_m1 (Applied Biosystems)
HDAC 3	Assay ID: Hs00187320_m1 (Applied Biosystems)
HDAC 4	F: TGTACGACGCCAAAGATGAC; R: CGGTTCAGAAGCTGTTTTCC
HDAC 5	F: CAGCAGGCGTTCTACAATGA; R: CGATGCAGAGAGATGTAGAGCA
HDAC 6	F: GAAAGTCACCTCGGCATCAT; R: TAGTCTGGCCTGGAGTGGAC
HDAC 7	F: ATGGGGGATCCTGAGTACCT; R: GATGGGCATCAGACTATCC
HDAC 8	Assay ID: Hs00218503_m1 (Applied Biosystems)
HDAC 9	F: CTGGAGCCCATCTCACCTT; R: TCATCATCCTGAGGTCTGTCC
HDAC 10	F: GCCGGATATCACATTGG-TC; R: GACGTTCTCTGTTGGATGA
HDAC 11	F: GGTCAGGAAGGGGTACAGGT; R: ATGAGGGGGAAGTCCAGAT
LINE1 ORF1	F: CAAAGGAAAGCCCATCAGAC; R: GTAGGGTTTCTGCCGAGAGAT
RNU6B	Assay ID: 001093 (Applied Biosystems)
RNU44	Assay ID: 001094 (Applied Biosystems)
piRNAs	Custom designed TaqMan® probes (Applied Biosystems)

Silencing of PIWIL4

RASFs were transfected with combination of 3 small interfering RNAs (siRNA) targeting PIWIL4 (Hs_PIWIL4_2, Hs_PIWIL4_6 and Hs_PIWIL4_8, 100 nM; Qiagen) or with Negative control siRNA (AllStars Negative Control siRNA, 100 nM; Qiagen) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For functional assays (LINE1 methylation and expression, apoptosis), we additionally cotransfected siRNA targeting PIWIL2 (Hs_PIWIL2_5, Qiagen) to ensure, that this may not overtake the function of silenced PIWIL4. Twenty-four hours after transfection, the medium was replaced and 48 hours after transfection, cells were harvested for total RNA isolation and functional tests. Cell lysates for Western blot were prepared 72 hours after transfections. Knockdown of PIWIL4 was verified by Real-time PCR and Western blot.

Western blotting

RASF were trypsinized and nuclear and cytoplasmic extracts prepared with NC-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) according to the manufacturers protocol. Protein concentration was measured with Pierce™ BCA Protein assay Kit (Thermo Scientific), samples were diluted to the concentration 1ng/ml and mixed with 4xLaemmli Sample Buffer (Bio-Rad). After incubation for 5 minutes at 95°C, samples were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and electroblotted on polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Amersham Hybond™ P; GE Healthcare) as described elsewhere¹. Membranes were blocked for 1 hour in 5% nonfat milk in TBS-T (20 mM Tris base, 137 mM sodium chloride, 0.1% Tween 20, pH 7.6). After blocking, the membranes were probed with rabbit anti-human PIWIL4 (3 µg/ml; PA5-31448; Thermo Scientific), rabbit anti-human PIWIL2 (5 µg/ml; sc-67303; Santa Cruz), rabbit anti-human Lamin B1 (1 µg/ml; ab16048; Abcam) and mouse anti-human α-tubulin (1 µg/ml; ab7291; Abcam) antibodies. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Membranes were washed in Tris buffered saline/0.05% Tween 20 and incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG (1:10 000 Jackson ImmunoResearch) for 1 hour at room temperature. Signals were detected using enhanced chemiluminescence Western Bright™ ECL (Advansta) and the Fusion FX imager (Vilber Lourmat). The Alpha Imager software system (Alpha Innotech) was used to analyze the results.

Immunohistochemistry

After deparaffinization, tissue sections obtained from RA and OA patients were pretreated with citrate buffer (10 mM sodium citrate, pH 6.0). Endogenous peroxidase activity was disrupted with 3% H₂O₂. Nonspecific protein binding was blocked for 40 minutes with 1% BSA/5% goat serum. Rabbit anti-human PIWIL4 (Thermo Scientific) and rabbit IgG1 (isotype control, Dako) were applied (both 5 µg/ml) overnight at 4°C. Slides were washed in PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS) and incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibodies (1:1000; Jackson ImmunoResearch). The signal was amplified with ABC reagent and detected with 3,3'-diaminobenzidine (both from Vector).

Immunofluorescence

Paraffin-embedded synovial sections were incubated with monoclonal mouse antihuman PIWIL4 (5ug/ml, MA5-17151, Thermo Scientific) antibodies or normal mouse IgG1 (5ug/ml, Dako) followed by addition of Alexa Fluor 555-conjugated goat antimouse IgG (Invitrogen). Slides were placed in ProLong Gold antifade reagent mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen). Images were collected using a confocal microscope (Imager.21; Zeiss). The background fluorescence level was set with the negative controls, and images were analysed using AxioVision Rel. 4.8. image analysis software (Zeiss).

LINE1 methylation assay

To determine the LINE-1 methylation we used the Global Methylation LINE-1 Kit (Active Motif) according to manufacturer's instructions. Briefly, 48 hours after silencing of PIWIL2 and 4 we isolated DNA from the RASF with the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen). DNA concentration was measured using the fluorescence based quantification with Qubit (Life Technologies). 1ug genomic DNA was digested with MseI enzyme overnight at 37°C followed by heat-inactivation of MseI with 20 minutes incubation at 65°C. DNA concentration was remeasured on Qubit and diluted to 2ng/ul. Samples and standards were hybridize with LINE-1 probe in thermal cycler (98°C for 10minutes; 68°C for 1 hour; 25°C). Samples hybridized to the LINE-1 probe were bound to Streptavidin coated 96-well plate, all washing and incubation steps performed according to protocol, primary 5-methylcytosine antibody was used and HRP-conjugated

secondary antibody. Assay was stopped 15 minutes after adding the developing solution and measured on GloMax®-Multi+ Multimode Detection System (Promega) at 450nm with the reference wavelength 600nm. RASF treated for 1 week with 5-azacytosine (1 μ M; Sigma) served as a positive control.

Analysis of cell death

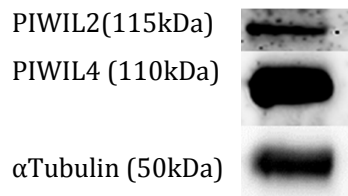
Apoptosis was induced with a high dosis of TNF α (100ng/ul) 24 hours after silencing PIWIL genes. 24 hours after TNF α treatment, SF were detached with accutase, washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and resuspended in annexin V binding buffer (BD Biosciences) with 10⁶ cells/ml. Next, cells were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark with fluorescein isothiocyanate (FITC)-annexin V (BD Biosciences) and propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) according to manufacturers instructions. Fluorescence intensities were measured on a FACSCalibur flow cytometer. Data were analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences).

Proliferation analysis

Proliferation of SF after silencing PIWIL2 and 4 was analysed with the xCELLigence system (ACEA Biosciences), which enables the real-time analysis of cell adhesion and proliferation by measurements of electric impedance ². RASF and OASF (n=3) were transfected with siPIWIL2 and siPIWIL4 or siCtrl in 6-wells, after 24 hours harvested with trypsin and plated in special E-plates in triplicates (2500 cells/200ul DMEM with 10%FCS). The impedance was monitored each 30 minutes for the duration of 96 hours and expressed as cell index (CI) value. Normalized CI was counted by dividing CI with the CI (24 hours). Data were analysed using the RTCA Software 2.0 (ACEA Biosciences).

Supplemetnary data

Westernblot for PIWIL2 and PIWIL4 in Jurkat cells



References

1. Maciejewska-Rodrigues H, Karouzakis E, Strietholt S, et al. Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. *Journal of autoimmunity* 2010;**35**(1):15-22.
2. Witzel F, Fritsche-Guenther R, Lehmann N, et al. Analysis of impedance-based cellular growth assays. *Bioinformatics* 2015.

4.1.2. Cirkulující miRNA jsou asociovány s aktivitou myozitidy

MiRNA (miRNA) jsou malé RNA molekuly regulující mechanismem genové interference translaci zhruba poloviny protein-kódujících genů [202]. Cirkulující miRNA (c-miRNA) představují slibný biomarker pro mnoho autoimunitních onemocnění [203].

Tato studie měla za cíl popsat expresi c-miRNA u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi (krátce myozitidy) a přispět tak k nalezení biomarkerů specifických pro tuto skupinu onemocnění.

Metodou microarray jsme stanovili hladinu 2 549 c-miRNA v séru 28 pacientů s myozitidou a 16 zdravých kontrol. Expresi šesti c-miRNA byla odlišná u pacientů s myozitidou oproti zdravým kontrolám. U dalších tří c-miRNA jsme naměřili vyšší hladiny v séru pacientů s vysokou aktivitou myozitidy v porovnání se séry pacientů jejichž onemocnění bylo méně aktivní.

Některé z těchto deregulovaných c-miRNA možná přispívají k patogenezi myozitidy a mohly by sloužit jako biomarker při diagnostice nebo sledování aktivity tohoto onemocnění.

Při této studii jsem pomáhala se sběrem klinických dat. Vyšetřovala jsem některé pacienty s myozitidou a zadávala klinické údaje do databáze EUROMYOSITIS (www.euromyositis.eu), z této databáze jsem pak potřebná data stahovala a zpracovávala pro potřeby studie.

Microarray analysis of circulating micro RNAs in the serum of patients with polymyositis and dermatomyositis reveals a distinct disease expression profile and is associated with disease activity

M. Misunova¹, G. Salinas-Riester², S. Luthin², C. Pommerenke², M. Fojtikova¹, J. Zavada¹, M. Klein¹, L. Plestilova¹, T. Svitalkova¹, P. Cepek¹, P. Novota¹, J. Vencovsky¹

¹Department of Experimental and Clinical Rheumatology, Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic; ²Department of Developmental Biochemistry, University Medical Centre, Göttingen, Göttingen, Germany.

Abstract Objective

The aim of this study was a large scale investigation of myositis-associated circulating miRNA molecules and also determination of expression of these candidate molecules in relation to clinical activity of myositis.

Methods

RNA, containing also miRNAs, was isolated from sera of 28 patients suffering from idiopathic inflammatory myopathies (IIM) and 16 healthy controls. Expression of miRNAs was determined using a miRNA microarray method. Statistical analysis of miRNA expression was carried out using Arraystar software.

Results

Our results showed 23 significantly differentially expressed miRNAs. Six miRNAs were differentially expressed in IIM compared to healthy controls. In dermatomyositis (DM) we found 3 and in polymyositis (PM) 6 differentially expressed miRNAs compared to controls. Three miRNAs were up-regulated in patients with highly active disease compared to patients with low disease activity. Furthermore, we found 26 significantly differentially expressed miRNAs in SLE patients compared to IIM, DM and PM patients.

Conclusion

This is the first study that comprehensively describes expression levels of circulating miRNAs in serum of patients suffering from IIM. It can be expected that some of these deregulated miRNA molecules are involved in aetiology of IIM and may potentially serve as molecular markers for IIM development or for monitoring of disease activity.

Key words

circulating microRNA, Idiopathic inflammatory myopathies, serum

Martina Misunova,
G. Salinas-Riester,
S. Luthin,
Claudia Pommerenke,
Marketa Fojtikova,
Jakub Zavada,
Martin Klein,
Lenka Plestilova,
T. Svitalkova,
P. Cepek,
Peter Novota,
Jiri Vencovsky,

Please address correspondence to:

Martina Misunova,
Department of Experimental
and Clinical Rheumatology,
Institute of Rheumatology,
Na Slupi 4,
12850 Prague, Czech Republic.
E-mail: remakova@revma.cz

Received on January 19, 2015; accepted
in revised form on April 17, 2015.

© Copyright CLINICAL AND
EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2015.

Introduction

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) belong to a group of autoimmune diseases characterised by chronic muscle inflammation that can lead to a dysfunction and/or destruction of muscle cells. The aetiology of these diseases is unknown and recent findings suggest that both, immune and non-immune mechanisms are involved in the pathogenesis of myositis (1, 2). Moreover, in different subsets of myositis, different molecular pathways might predominate (3). Differential diagnosis may be complicated in IIM; diagnostic errors, late detection of the disease and prolonged treatment initiation can significantly worsen the prognosis and result in irreversible tissue damage (4). Current data suggest that the presence of MHC haplotype A1-B8-Cw7-DRB1*0301/DQA1*0501 is a strong genetic risk factor for IIM development in a large subset of white patients (5, 6). Besides known genetic risks located within the MHC complex, also epigenetic regulations including changes in miRNAs expression profiles have been implicated recently in the pathogenesis of autoimmune diseases (7-9).

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding, evolutionarily conserved RNA molecules posttranscriptionally regulating gene expression. Epigenetic mechanism of RNA interference (RNAi) influences the stability and translational efficiency of the target mRNA. MiRNAs can be found in most organisms and they form about 1–2% of eukaryotic genomes. They have the ability to control the expression of approximately half of the protein-coding genes (10). MicroRNA expression profiles are typically tissue- and cell- specific and are strictly controlled (11). Aberrant expression patterns are included in the pathogenesis of a wide range of diseases including systemic autoimmune diseases (12). A specific group of miRNAs biomarkers represent extracellular circulating miRNAs (c-miRNAs) which may provide a new insight also into the pathogenesis of autoimmune diseases (13). Growing evidence indicates that c-miRNAs may serve as biomarkers to assess pathophysiological status (14). Indeed, in muscular dystrophies significantly

changed c-miRNAs levels have been described as well as in patients with chronic obstructive pulmonary disease, who often exhibit reduced muscle fibre size (15). It was recently suggested that c-miRNA may move into other organs or muscle itself and may regulate their functions (16). Several studies investigated expression of miRNAs in the muscle tissue (13, 17-19) and few also looked at serum levels of miRNAs (20-22). A single miRNAs were selected for each of these studies and, so far, no report analysed comprehensive status of miRNAs in patients with polymyositis and dermatomyositis (8, 23-25). Therefore in the current study we aimed to investigate myositis associated circulating miRNA molecules on a large scale and also to determine the relation of expression of these candidate molecules to clinical course of myositis.

Methods

Group of patients

Twenty-eight patients suffering from idiopathic inflammatory myopathies (IIM), who fulfilled Bohan and Peter criteria for the diagnosis of polymyositis (PM) or dermatomyositis (DM) were investigated in this study. Basic characteristics of patients with myositis are shown in Table I. A group of healthy individuals (7 females, 9 males; mean age 41.3±11.3 years) and a group of patients with systemic lupus erythematosus (16 females, mean age 44.1±15.1) served as controls.

Disease activity was assessed using visual analogue scale (Physician's Global Assessment [PGA]) (range 0–100 mm). For the purpose of this study the cut-off for disease activity was selected at 40. Patients below this cut-off were considered to have low activity; patients above the cut-off were assigned as having a highly active disease. Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by local ethics committee.

Collection of biologic material and RNA extraction

Peripheral blood samples were collected into vacuum plastic tubes containing spray-coated silica. Samples were handled according standardised laboratory

Funding: this work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health in the Czech Republic [MZČR NT 12452-4].

Competing interests: none declared.

Table I. Demographic and basic clinical data of patients with idiopathic inflammatory myopathies.

Clinical data of patients with idiopathic inflammatory myopathies	
	IIM
Sex (female/male)	20/8
Age (yrs)	
Mean \pm SD	54.5 \pm 15.0
Diagnosis	
DM (n)	14
PM (n)	14
Disease duration	
Mean \pm SD	8.2 \pm 4.0
Physician's Global Disease Assessment ^a	35.2 \pm 25.4
- high global disease activity >40mm ^b	n=18; 51.9 \pm 13.8
- low global disease activity <40mm ^b	n=10; 5.1 \pm 3.0
HAQ	1.2 \pm 0.9
CK	24.6 \pm 42.7
LDH	7.3 \pm 5.5
CRP	15.2 \pm 31.8
Disease activity ^a	
Constitutional	11.5 \pm 16.4
Cutaneous	9.7 \pm 16.8
Skeletal	4.8 \pm 10.6
Gastrointestinal	10.5 \pm 17.4
Pulmonary	15.9 \pm 21.2
Cardiovascular	3.6 \pm 9.8
Extramuscular	21.6 \pm 21.8
Muscle	36.7 \pm 30.2

^aShown as mean \pm SD (in mm on visual analogue scales). IIM: idiopathic inflammatory myopathy; ^bnumber of patients, mean \pm SD; PM: polymyositis; DM: dermatomyositis. Upper normal limits: CK 2.85 μ kat/l; LDH 4.13 μ kat/l; CRP 5 mg/l.

procedures and were processed within 4 hours after blood withdrawal.

Isolation of RNA from sera, containing also miRNAs, was performed according to Filkova *et al.*, 2013 (26). In brief, 500 μ l of individual serum sample was homogenised with 500 μ l of Trizol[®] LS reagent (Life Technologies, USA) and incubated for 5 minutes at room temperature. The samples were cleared by centrifugation at 12,000 \times g for 10 minutes at 4°C. The supernatant containing RNA was then processed 3 times by acid phenol-chloroform (Life Technologies, USA) extraction and aqueous phase was separated by centrifugation at 12,000 \times g for 5 minutes at 4°C. RNA was precipitated by adding of 100 μ g of RNase-free glycogen (Roche Diagnostics, Germany) and 100% isopropanol, incubated for 10 minutes at room tem-

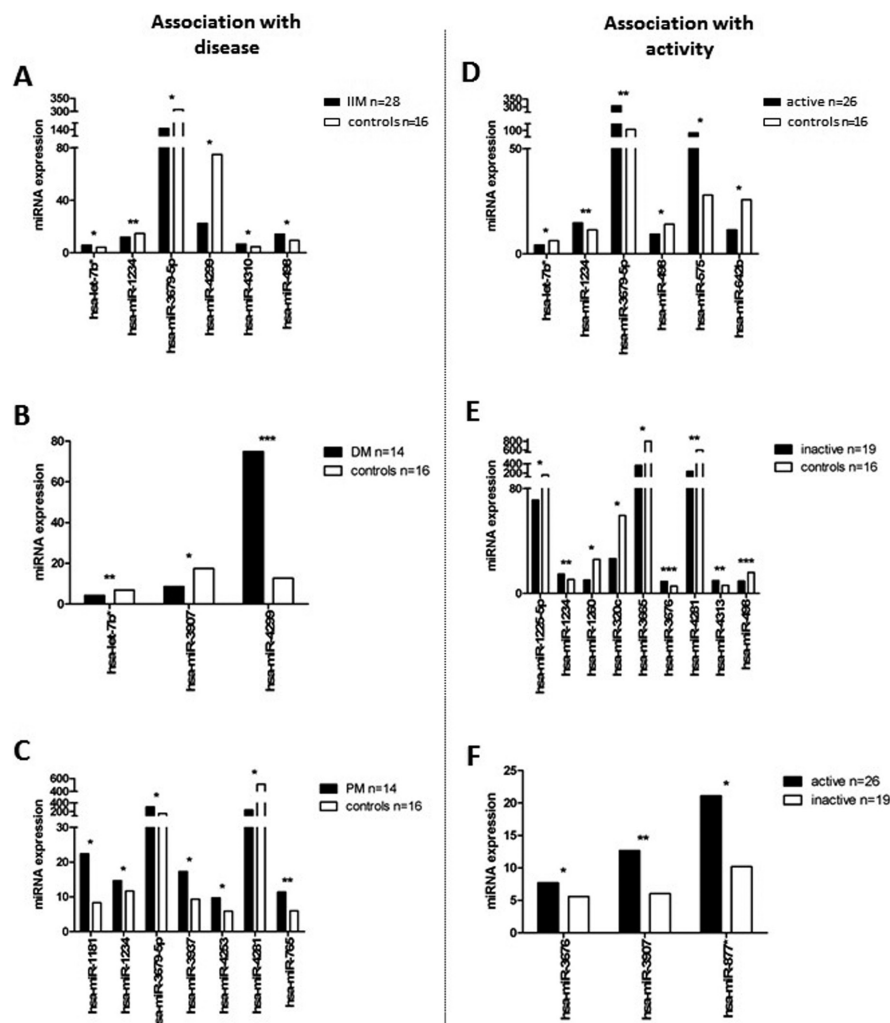


Fig. 1. Association of microRNA expression pattern with IIM diagnoses and with disease activity. Six microRNAs are significantly differentially expressed in patients with myositis compared to healthy controls.

A. After we divided the patients according to their diagnosis into two groups (DM and PM), we found in total 3 differentially expressed miRNAs in DM patients compared to controls.

B. and 7 microRNAs differentially expressed in PM patients compared to controls.

C. The analysis of microRNA expression pattern and relation to the disease activity revealed additional molecular associations. Six miRNAs were differentially expressed in patients with active stage of the disease when compared to healthy controls.

D. and 9 miRNAs were differentially expressed in patients with inactive stage of the disease when compared to controls.

E. Furthermore, comparison of microRNA expression profile between patients with active and inactive stage of the disease showed 3 miRNAs that are significantly differentially expressed.

F. The disease activity was assessed using Physician's Global Disease Assessment scale. For the purpose of this study the cut-off for disease activity was selected at 40. Patients below this cut-off were considered to have lower or no activity, patients above the cut-off were assigned as having active disease. Expression levels are displayed as average expression values from all patients within one group. *P*-values were corrected using FDR (Benjamini Hochberg) method. **p*<0.05; ***p*<0.001; ****p*<0.0001.

perature with subsequent centrifugation at 12,000 \times g for 10 minutes at 4°C. RNA pellet was then washed with 75% ethanol, spin at 7,500 \times g for 5 minutes at 4°C and air dried. The extracted RNA was dissolved in RNase-free water. The quality and quantity of extracted RNA samples were controlled using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific,

USA) and Bioanalyzer 2100 with the Small RNA Kit (Agilent Technologies, USA).

Determination of disease specific miRNA expression signature using the microarray technology

Expression of miRNAs was determined using a single-channel platform

Table II. Differentially expressed miRNAs in patients with IIM compared to healthy controls.

SystematicName	Myositis	Controls	Fold change	p-value
hsa-miR-1234	11,822	14,659	-1.24	0,0078
hsa-miR-498	14,159	9,328	1,517	0,0113
hsa-miR-3679-5p	141,668	307,403	-2,169	0,0152
hsa-miR-4299	22,444	74,922	-3,338	0,0255
hsa-let-7b*	5,874	4,251	1,381	0,0412
hsa-miR-4310	6,542	4,537	1,442	0,0451

Relative expression data of patients (myositis) and controls, fold change and p-values are shown here. $p < 0.05$ was considered as significant. P-values were corrected using FDR (Benjamini Hochberg) method.

of 8x60K high density human miRNA microarray method (Agilent Technologies, USA). Three hundred nanograms of total RNA were used as a starting material to prepare cDNA. Total RNA samples were dephosphorylated, 3' end- labeled with Cy3-pCp, purified on Micro Bio-Spin columns, dried, and hybridised to the microarrays. The hybridisation was performed for 20 hours at 55°C. After washing, Cy3 was detected by one-color scanning using a DNA microarray scanner type G2505B (Agilent, USA) at 5 micron resolution. Scanned image files were visually inspected for artefacts. The data were extracted from the scanned images using Feature Extraction software (Agilent Technologies, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis of miRNA expression was carried out using Arraystar software (Lasergene, USA). The signal intensities of the samples were transformed into \log^2 -ratio data. The array data were normalised by the averaging summarisation of global medians across all arrays. The Student's *t*-test was used to identify differentially expressed miRNA molecules. A miRNA was defined as being differentially expressed if $p < 0.05$ was observed between two data sets. *P*-values of the entire analysis were corrected using FDR (Benjamini Hochberg) method.

Results

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) have a distinct miRNA expression signature in serum

The miRNA microarray used in this study could analyse 1,673 human microRNA molecules. Six miRNAs (let-7b*, miR-1234, miR-3679-5p, miR-

4299, miR-4310, miR-498) had significantly different expression levels in serum of IIM patients in comparison with healthy controls ($p < 0.05$). The expression of miR-1234, miR-3679-5p, and miR-4299 was significantly down-regulated and the expression of let-7b*, miR-4310, and miR-498 was up-regulated in the serum of patients in comparison with control samples (Fig. 1A) (Table II).

The analysis of serum miRNA content in patients with DM revealed a differential expression of 3 miRNAs; one (miR-4299) was down-regulated and two (let-7b*, miR-3907) were up-regulated in DM compared to healthy controls ($p < 0.05$) (Fig. 1B). Similarly, when we compared PM patients with healthy controls we found that 6 miRNAs (miR-1181, miR-1234, miR-3679-5p, miR-3937, miR-4253, miR-765) were significantly down-regulated and one miRNA (miR-4281) was up-regulated in PM patients ($p < 0.05$) (Fig. 1C). No difference was found in serum miRNA expression when PM and DM patients were compared.

After combining both, $p < 0.05$ and fold-change > 1.5 , we found three differentially expressed miRNAs (hsa-miR-498, hsa-miR-3679-5p and hsa-miR-4299) in all IIM patients compared to controls; 6 miRNAs (hsa-miR-1181, hsa-miR-3679-5p, hsa-miR-3937, hsa-miR-4253, hsa-miR-4281 and hsa-miR-765) in PM and 3 miRNAs (hsa-let-7b*, hsa-miR-3907 and hsa-miR-4299) in DM were differentially expressed when compared to healthy controls.

Differential expression of several miRNAs is associated with disease activity

Three miRNAs (miR-3676, miR-3907,

miR-877*) were significantly up-regulated in patients with highly active disease (defined as physician's global activity > 40 mm) compared to patients with low disease activity ($p < 0.05$) (Fig. 1F). When compared with healthy controls, 6 miRNAs were differentially expressed in patients with highly active disease; three miRNAs (miR-1234, miR-3679-5p, miR-575) were down-regulated and 3 miRNAs (let-7b*, miR-498, miR-642b) were up-regulated in patients ($p < 0.05$) (Fig. 1D). In patients with low or inactive disease 3 miRNAs (miR-1234, miR-3676, miR-4313) were down-regulated and 6 miRNAs (miR-1225-5p, miR-1260a, miR-320c, miR-3665, miR-4281, miR-498) up-regulated when compared to healthy controls ($p < 0.05$) (Fig. 1E).

Furthermore, we made a comparison of DM and PM in active and inactive patients. Three miRNAs (hsa-let-7b*, hsa-miR-548d-5p and hsa-miR-4299) were found to be differentially expressed in active DM compared to active PM patients ($p < 0.05$). One miRNA (hsa-miR-3648) was found to be up-regulated in inactive DM compared to inactive PM patients ($p < 0.05$).

The overview of expression data of all analysed miRNA molecules is shown in Table III.

Furthermore, after taking into consideration both, $p < 0.05$ and fold-change > 1.5 , two miRNAs (hsa-miR-3907 and hsa-miR-877*) were found to be differentially expressed in patients with highly active disease compared to patients with low disease activity. When compared with healthy controls, four miRNAs (hsa-miR-3679-5p, hsa-miR-498, hsa-miR-575 and hsa-miR-642b) were differentially expressed in patients with highly active disease and 8 miRNAs (hsa-miR-3676, hsa-miR-498, hsa-miR-4313, hsa-miR-4281, hsa-miR-3665, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-320c and hsa-miR-1260) were differentially expressed in patients with low or inactive disease.

Association of biological pathways regulated by detected miRNAs

An analysis of the associated biological pathways regulated by the detected miRNAs revealed that among all 23

Table III. Overview of microRNA expression in different analyses.

miRNA	patients vs. controls	PM vs. DM	PM vs. controls	DM vs. controls	active vs. inactive	active vs. controls	inactive vs. controls	DM_act vs. PM_act	DM_inact vs. PM_inact
hsa-let-7b*	↑			↑		↑		↑	
hsa-miR-1181			↓						
hsa-miR-1225-5p							↑		
hsa-miR-1234	↓		↓			↓	↓		
hsa-miR-1260							↑		
hsa-miR-320c							↑		
hsa-miR-3648									↑
hsa-miR-3665							↑		
hsa-miR-3676					↑		↓		
hsa-miR-3679-5p	↓		↓			↓			
hsa-miR-3907				↑	↑				
hsa-miR-3937			↓						
hsa-miR-4253			↓						
hsa-miR-4281			↑				↑		
hsa-miR-4299	↓			↓				↓	
hsa-miR-4310	↑								
hsa-miR-4313							↓		
hsa-miR-498	↑					↑	↑		
hsa-miR-548d-5p								↓	
hsa-miR-575						↓			
hsa-miR-642b						↑			
hsa-miR-765			↓						
hsa-miR-877*					↑				

miRNAs found to be significantly differentially expressed, 11 (48%) (miR-1260, miR-320c, miR-498, miR-575, miR-765, miR-3665, miR-3679-5p, miR-3907, miR-4253, miR-4281, let-7b*) are predicted to regulate immune response; 4 (17%) miRNAs (let-7b*, miR-1225-5p, miR-498, miR-765) are related to pathways of actin and myosin; and 2 (9%) miRNAs (miR-1225-5p, miR-3937) are known to play a role in autoimmune diseases. Stat3 protein is probably regulated by miR-1234 (27). MiR-1181 plays a vital role in inhibiting cancer stem cell-like phenotype in pancreatic cancer (28) and miR-642b was among the three serum markers identified with high diagnostic accuracy for early stage of pancreatic cancer (29).

MiRNA genes are distributed across chromosomes either individually, or in clusters. A miRNA cluster is a group of miRNA genes located within a short distance on a chromosome. Based on the miRBase database (<http://www.mirbase.org>) definition, clustered miRNAs are a group of miRNA genes located within 10 Kb of distance on the same chromosome. We examined the genomic location of all of the 21 miR-

NA molecules that were differentially expressed in patients with IIM. We have found that 4 of the differentially expressed miRNAs were located in the known miRNA clusters and 16 miRNAs were individually distributed. We did not find any 2 or more miRNAs that would locate into the same cluster.

MicroRNA expression pattern found in IIM is different from serum miRNAs in SLE

In order to see whether the significantly differentially expressed miRNA molecules found in IIM patients are disease specific, we have performed a similar analysis in SLE patients (Table IV). The microarray expression analysis showed that the expression of 19 miRNA molecules was significantly changed in SLE patients compared to healthy controls ($p < 0.05$). Of them, 6 miRNAs (miR-1281, miR-1825, miR-3679-5p, miR-3907, miR-4313, miR-575) were down-regulated and 13 miRNAs (miR-22, miR-24, miR-33b*, miR-3610, miR-3663-3p, miR-3937, miR-4257, miR-4271, miR-4298, miR-584, miR-642b, miR-671-5p, miR-4306) were up-regulated in SLE patients compared to controls. One miRNA (miR-3679-

5p) was down-regulated in SLE patients similarly as in sera of patients with IIM compared to controls. The remaining 18 molecules differentially expressed in SLE were not differentially expressed in IIMs, when both compared to healthy controls.

Of the 19 differentially expressed miRNAs in SLE, 15 molecules (hsa-miR-3679-5p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-4271, hsa-miR-575, hsa-miR-584, hsa-miR-4298, hsa-miR-642b, hsa-miR-22, hsa-miR-3937, hsa-miR-3663-3p, hsa-miR-4257, hsa-miR-3907, hsa-miR-3610, hsa-miR-24 and hsa-miR-4306) have reached fold-change > 1.5 .

Further analysis determining the expression of miRNA molecules in SLE compared to IIM, DM and PM patients was performed. Nineteen miRNAs were significantly differentially expressed in SLE patients compared to IIM patients ($p < 0.05$) (Fig. 2; Table V). Only two of them (miR-1234 and miR-3679-5p) were similarly regulated when considering the results obtained from SLE vs IIM and IIM vs controls comparisons. Ten miRNAs were found to be differentially expressed in SLE patients compared to DM patients and 20 miRNAs were found to be differentially expressed in SLE patients compared to PM patients.

The overview of expression data of all analysed miRNAs is shown in Table 5. After combining both, $p < 0.05$ and fold-change > 1.5 , we found 16 miRNAs (hsa-miR-584, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-4271, hsa-miR-3937, hsa-miR-4257, hsa-miR-3907, hsa-miR-320b, hsa-miR-3679-5p, hsa-miR-1290, hsa-miR-4298, hsa-miR-575, hsa-miR-1275, hsa-miR-939, hsa-miR-197, hsa-miR-3620 and hsa-miR-3610) to be differentially expressed in SLE patients compared to IIM patients.

Discussion

Idiopathic inflammatory myopathies are autoimmune diseases characterised by chronic muscle inflammation that can lead to a dysfunction and/or destruction of muscle cells. It is known that some microRNAs play role in muscle differentiation and thus also epigenetic regulations may be implicated in

Table IV. Differentially expressed miRNAs in patients with SLE compared to healthy controls.

SystematicName	SLE	Controls	Fold change	p-value
hsa-miR-3679-5p	61,674	307,403	4,984 down	7,23E-06
hsa-miR-671-5p	52,557	16,085	3,267 up	0,00011
hsa-miR-4271	56,48	23,365	2,417 up	0,00048
hsa-miR-1281	8,179	11,299	1,381 down	0,00061
hsa-miR-575	14,369	81,02	5,638 down	0,00155
hsa-miR-584	41,569	9,63	4,316 up	0,00196
hsa-miR-4298	39,395	14,402	2,735 up	0,00213
hsa-miR-642b	32,972	11,337	2,908 up	0,00301
hsa-miR-22	47,177	16,362	2,883 up	0,00488
hsa-miR-3937	39,641	17,316	2,289 up	0,00722
hsa-miR-3663-3p	112,625	33,638	3,348 up	0,00821
hsa-miR-1825	7,677	9,422	1,227 down	0,0115
hsa-miR-4313	8,09	9,701	1,199 down	0,0159
hsa-miR-4257	18,579	10,438	1,780 up	0,0179
hsa-miR-3907	3,944	8,643	2,191 down	0,0218
hsa-miR-3610	42,85	16,43	2,608 up	0,0225
hsa-miR-33b*	6,498	5,339	1,217 up	0,0399
hsa-miR-24	18,46	8,65	2,133 up	0,0481
hsa-miR-4306	12,427	5,173	2,402 up	0,0492

Relative expression data of patients (SLE) and controls, fold change and p-values are shown here. p<0.05 was considered as significant. p-values were corrected using FDR (Benjamini Hochberg) method.

Table V. Differentially expressed miRNAs in patients with SLE compared to IIM, DM and PM.

miRNA	SLE vs. IIM	SLE vs. DM	SLE vs. PM
hsa-miR-1224-5p		↓	
hsa-miR-1234	↓		↑
hsa-miR-1275	↑	↓	
hsa-miR-1280			↓
hsa-miR-1281	↑		↓
hsa-miR-1290	↓	↑	
hsa-miR-1825	↑		↓
hsa-miR-197	↑		
hsa-miR-2276			↑
hsa-miR-320b	↑	↓	
hsa-miR-320d		↓	↑
hsa-miR-3610	↓		↑
hsa-miR-3620	↓		↑
hsa-miR-3663-3p			↑
hsa-miR-3679-5p	↑		↓
hsa-miR-3907	↑	↓	↓
hsa-miR-3937	↓		↑
hsa-miR-4253			↑
hsa-miR-4257	↓	↑	↑
hsa-miR-4271	↓	↑	↑
hsa-miR-4298	↓		↑
hsa-miR-575	↑		↓
hsa-miR-584	↓	↑	↑
hsa-miR-601			↓
hsa-miR-671-5p	↓	↑	↑
hsa-miR-939	↑		

Relative expression data of significantly differentially expressed miRNAs of patients with SLE and IIM, fold change and p-values are shown here. p<0.05 was considered as significant.

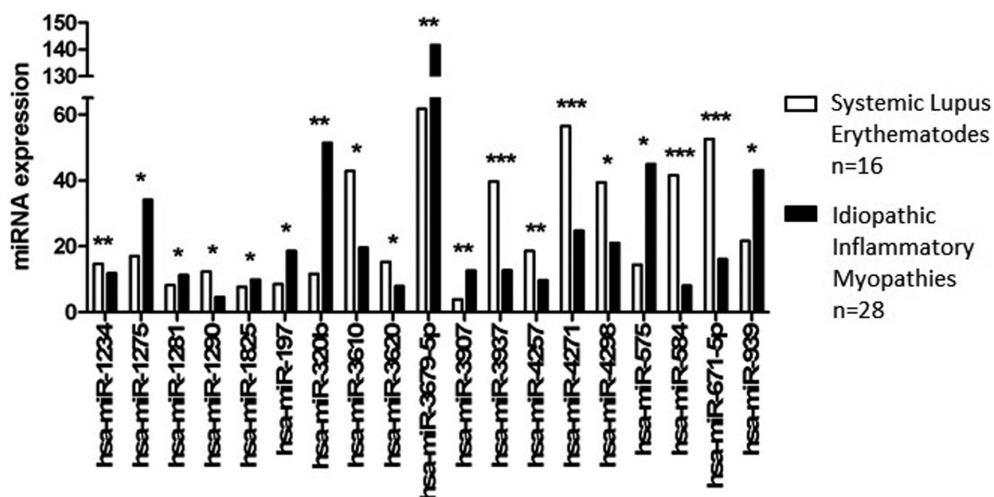
pathogenesis of this disease. Recently, growing evidence has shown that some miRNAs persist in circulation. In 2007, Valadi *et al.* demonstrated that miRNAs can be taken up into intracellular vesicles and afterwards released into circulation. Many studies have shown

the existence of circulating miRNAs (c-miRNAs) in various human body fluids (serum, plasma, breast milk, urine, saliva, etc.) (11). A significant relation between changed expression of circulating microRNAs and many autoimmune diseases has been described (30).

In our study, we have found in total 21 miRNA molecules that were significantly differentially expressed in patients when compared to control cohorts. Most of these miRNAs (miR-1234, miR-4299, miR-1181, miR-4281, miR-765, miR-575, miR-642b, miR-1225-5p, miR-1260, miR-320c, miR-3665, miR-877, miR-498) were studied in diseases and medical conditions including cancer, cardiovascular complications, or infections. So far, none of these miRNAs were found to be differentially expressed in autoimmune diseases.

To date, there are only few studies that describe the relationships between miRNAs and IIM, mostly in DM. Shimada *et al.* (25) hypothesised that if the miR-21 expression in the muscle tissues is significantly elevated in DM patients then serum miR-21 levels might be a potential biomarker for diagnosis and monitoring of disease activity in DM patients. Their results showed that serum levels of miR-21 were up-regulated in DM patients and related to the disease activity. This indicated that serum miR-21 might be involved in the pathogenesis of this disease. Oshikawa *et al.* (23) analysed miR-7 levels in serum of patient suffering from IIM. They have demonstrated that serum levels of miR-7 are specifically down-regulated in DM patients as well as in PM patients or CADM patients. However, levels of miR-7 were not decreased in patients with other autoimmune diseases such as SSc. Thus they indicate that serum miR-7 levels could possibly be used as a diagnostic marker for PM/DM. Results of our study could not support these findings, since both miR-21 and miR-7 were not differentially present in the serum of patients and controls or were present in different quantities in patients with active or inactive disease. Different miRNA molecules were found in analyses of patients with SLE. Wang *et al.* (31) investigated the levels of miR-146a and miR-155 in the serum of SLE patients. This was the first description of circulating miRNAs as biomarkers. They revealed that serum levels of miR-146a and miR-155 were decreased in SLE, and miR-146a was inversely associated with proteinuria

Fig. 2. Expression of microRNAs in different analyses using high density human miRNA microarray. In total, nineteen microRNA molecules have been found to be significantly differentially expressed in patients with myositis when compared to patients suffering from SLE. Expression levels are displayed as average expression values from all patients within one group. *P*-values were corrected using FDR (Benjamini Hochberg) method. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001.



and SLE Disease Activity Index (SLE-DAI). These findings indicated that serum miR-146a and miR-155 may participate in the pathophysiology of SLE. The same group later conducted a pilot study in order to find a specific miRNA signature of SLE. They found that the serum levels of 6 miRNAs (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429, miR-205 and miR-192) were decreased in SLE patients compared to HCs (32). In 2012, Wang *et al.* (21) identified circulating miRNAs that were altered specifically in patients with SLE compared with RA and HCs. Based on these results 8 miRNAs were selected for continued clinical study. These molecules may be important regulators of immune cell development, playing vital roles in the inflammatory response and as key players in the pathogenesis of SLE (33). Carlsen *et al.* (34) found 7 miRNAs that were significantly differentially expressed in patients with SLE compared to patients with RA and healthy controls. MiR-142-3p and miR-181a were increased; miR-106a, miR-17, miR-20a, miR-203 and miR-92a were decreased in patients suffering from SLE.

None of these miRNAs were revealed as significantly regulated in our study. The comparison of sera from patients with SLE to healthy controls showed 19 miRNA molecules (miR-1281, miR-1825, miR-3679-5p, miR-3907, miR-4313, miR-575, miR-22, miR-24, miR-33b*, miR-3610, miR-3663-3p, miR-3937, miR-4257, miR-4271, miR-4298, miR-584, miR-642b, miR-671-5p,

miR-4306) with significantly changed expression. Molecules found to be significant for IIM patients differed from molecules found to be deregulated in SLE patients except one (miR-3679-5p). This means that the expression of circulating miRNAs in the serum is largely different in the two diseases, perhaps forming a specific pattern for the respective disease. MiR-3679-5p was found down-regulated in the serum of patients with IIM, particularly in PM and active disease, as well as it was significantly lower in the serum from patients with SLE. There is not yet published information available on the role of miR-3679-5p in human organism; a number of predicted targets were identified for this miRNA with a putative role of targeted genes in immune system and in different molecular and structural reactions.

We have analysed also the expression of miRNA according to the disease severity. Disease activity was measured in every patient, cut-offs were set and patients with high and low or no activity were compared. Three miRNAs were found to be significantly differentially expressed (miR-3676, miR-3907, miR-877*) between patients with high and low activity. It remains to be determined for the future whether the levels of these miRNAs fluctuate longitudinally with the changes of disease activity and if so, whether they can be used as biomarkers for the disease. There were also a number of miRNAs differentially expressed in patients with active or inactive disease in comparison with

healthy controls. It will be interesting to find out any relations with other disease parameters, particularly disease damage, where we do have a very limited spectrum of tools for muscle damage evaluation.

In summary, we provide here the first analysis of circulating serum miRNA gene expression profile in patients suffering from IIM. The results of this study indicate that the miRNA expression profile in serum of patients suffering from IIM is disease specific and creates a disease specific signature. It is expectable that some of these deregulated miRNA molecules are involved in aetiology of IIM. Additionally, we have shown that the detection of miRNA molecules in human serum is fast and easy approach in laboratory medicine. Therefore deregulated microRNA molecules shown in this work can potentially serve as molecular markers for IIM development or for monitoring of disease activity.

References

1. LI CK, KNOPP P, MONCRIEFFE H *et al.*: Overexpression of MHC class I heavy chain protein in young skeletal muscle leads to severe myositis: implications for juvenile myositis. *Am J Pathol* 2009; 175: 1030-40.
2. NAGARAJU K, CASCIOLA-ROSEN L, LUNDBERG I *et al.*: Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1824-35.
3. ZONG M, LUNDBERG IE: Pathogenesis, classification and treatment of inflammatory myopathies. *Nat Rev Rheum* 2011; 7: 297-306.
4. BAER AN: Differential diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8: 178-87.

5. LOVE LA, LEFF RL, FRASER DD *et al.*: A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine* 1991; 70: 360-74.
6. ARNETT FC, TARGOFF IN, MIMORI T, GOLDSTEIN R, WARNER NB, REVELLE JD: Inter-relationship of major histocompatibility complex class II alleles and autoantibodies in four ethnic groups with various forms of myositis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1507-18.
7. CHUANG JC, JONES PA: Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr Res* 2007; 61: 24R-29R.
8. GEORGANTAS RW, STREICHER K, GREENBERG SA *et al.*: Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 2014; 66: 1022-33.
9. ZHU W, STREICHER K, SHEN N *et al.*: Genomic signatures characterize leukocyte infiltration in myositis muscles. *BMC Med Genomics* 2012; 5: 53.
10. KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W: The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 597-610.
11. LIANG Y, RIDZON D, WONG L, CHEN C: Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics* 2007; 8: 166.
12. ZHU S, PAN W, QIAN Y: MicroRNA in immunity and autoimmunity. *J Mol Med* 2013; 91: 1039-50.
13. EISENBERG I, ERAN A, NISHINO I *et al.*: Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17016-21.
14. ZENG L, CUI J, WU H, LU Q: The emerging role of circulating microRNAs as biomarkers in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2014; 47: 419-29.
15. DONALDSON A, NATANEK SA, LEWIS A *et al.*: Increased skeletal muscle-specific microRNA in the blood of patients with COPD. *Thorax* 2013; 68: 1140-9.
16. AOI W, SAKUMA K: Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Front Physiol* 2014; 5: 39.
17. CHEN JF, MANDEL EM, THOMSON JM *et al.*: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006; 38: 228-33.
18. EISENBERG I, ALEXANDER MS, KUNKEL LM: miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2-11.
19. GOLJANEK-WHYSALL K, SWEETMAN D, MÜNSTERBERG AE: microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123: 611-25.
20. TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, BURWINKEL B: Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 7223-33.
21. WANG H, PENG W, OUYANG X, LI W, DAI Y: Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res* 2012; 160: 198-206.
22. FURER V, GREENBERG JD, ATTUR M, ABRAMSON SB, PILLINGER MH: The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2010; 136: 1-15.
23. OSHIKAWA Y, JINNIN M, MAKINO T *et al.*: Decreased miR-7 expression in the skin and sera of patients with dermatomyositis. *Acta Derm Venereol* 2013; 93: 273-6.
24. TANG X, TIAN X, ZHANG Y *et al.*: Correlation between the frequency of Th17 cell and the expression of microRNA-206 in patients with dermatomyositis. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 345-7.
25. SHIMADA S, JINNIN M, OGATA A *et al.*: Serum miR-21 levels in patients with dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: 161-2.
26. FILKOVA M, ARADI B, SENOLT L *et al.*: Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1898-904.
27. HÖGFELDT T, JOHNSSON P, GRANDÉR D *et al.*: Expression of microRNA-1234 related signal transducer and activator of transcription 3 in patients with diffuse large B-cell lymphoma of activated B-cell like type from high and low infectious disease areas. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 1158-65.
28. JIANG J, LI Z, YU C, CHEN M, TIAN S, SUN C: MiR-1181 inhibits stem cell-like phenotypes and suppresses SOX2 and STAT3 in human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2015; 356: 962-7.
29. GANEPOLA GA, RUTLEDGE JR, SUMAN P, YIENGRUKSAWAN A, CHANG DH: Novel blood-based microRNA biomarker panel for early diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2014; 6: 22-33.
30. QU Z, LI W, FU B: MicroRNAs in autoimmune diseases. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 527895.
31. WANG G, TAM LS, LI EK *et al.*: Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010; 37: 2516-22.
32. WANG G, TAM LS, LI EK *et al.*: Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20: 493-500.
33. REID G, KIRSCHNER MB, VAN ZANDWIJK N: Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 80: 193-208.
34. CARLSEN AL, SCHETTER AJ, NIELSEN CT *et al.*: Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1324-34.

4.2. S100 Proteiny

4.2.1. Zvýšení sérových hladin S100A4 proteinu při vysoké klinické aktivitě myozitidy, nikoli při přítomnosti malignity

Myozitida je získané zánětlivé onemocnění příčně pruhovaného svalstva s častými systémovými příznaky. Přibližně 24% případů dermatomyozitidy (DM) a 10% případů polymyozitidy (PM) je asociováno s malignitou [204]. V této práci jsme se zaměřili na výzkum role S100A4 proteinu u myozitidy. S100A4 protein bývá pro svůj význam v tumorigenezi nazýván metastazin [161]. Exprese S100A4 koreluje s prognózou onkologicky nemocných [160], zvýšená hladina S100A4 byla prokázána u vícero autoimunitních onemocnění včetně revmatoidní artritidy [168].

Cílem této studie bylo změřit sérové hladiny S100A4 u pacientů s myozitidou a zhodnotit možné využití stanovení hladiny tohoto proteinu jako biomarkeru pro hodnocení aktivity onemocnění a riziko rozvoje malignity.

Sérové hladiny S100A4 proteinu jsme změřili metodou ELISA v kohortě 104 pacientů s myozitidou a 77 zdravých kontrol. U pacientů s myozitidou jsme naměřili významně zvýšené hladiny S100A4 proteinu v porovnání se zdravými kontrolami, nejvyšší hladiny S100A4 měli pacienti s PM. Patogeneze DM je odlišná od PM a náš výsledek ukazuje, že S100A4 protein se zřejmě více účastní na rozvoji PM.

Dvacet dva pacientů s myozitidou asociovanou s malignitou překvapivě nemělo zvýšené hladiny S100A4 oproti zdravým kontrolám. Sedmnáct pacientů s pozitivitou anti-TIF1- γ protilátek, které jsou asociovány s malignitou u myozitidy, mělo dokonce hladiny S100A4 proteinu oproti zdravým kontrolám významně snížené. To si vysvětlujeme pravděpodobným spotřebováním S100A4 proteinu v nádorové tkáni. Jinou možností je, že S100A4 tvoří při malignitě více multimerních komplexů než obvykle a tyto komplexy by nebyly použitou ELISA metodou detekovány.

Zvýšené hladiny S100A4 proteinu jsme zjistili i v podskupině pacientů s anti-Jo1 protilátkami a anti-PM-Scl protilátkami. Přítomnost těchto protilátek je asociována s vyšším výskytem artritidy při myozitidě, porovnali jsme tedy S100A4 hladiny u pacientů s a bez artritidy nehledě na autoprotiátkovou pozitivitu, zde jsmě však nenašli rozdíl. U pacientů s revmatoidní artritidou přitom sérová hladiny S100A4 koreluje s aktivitou artritidy. Patogeneze artritidy při myozitidě je však zřejmě odlišná od revmatoidní artritidy.

Poslední analýzou byla korelace hladiny S100A4 s klinickou aktivitou onemocnění. Hladina S100A4 pozitivně korelovala s mnohými klinickými i laboratorními parametry, zejména s mimosvalovými komponenty MYOACT skóre. Na druhou stranu hladina S100A4 nekorelovala se svalovou aktivitou onemocnění, výsledkem svalového testu nebo svalové biopsie. Z toho jsme usoudili, že S100A4 pravděpodobně reflektuje celkovou aktivitu onemocnění a systémově přítomný zánět, spíše než aktivitu místního svalového postižení. Zvýšená hladina S100A4 proteinu tedy pravděpodobně nesouvisí s přítomností malignity, ale s mimosvalovým, například plicním, postižením při onemocnění myozitidou.

Tento článek jsem vypracovala pod vedením prof. Ladislava Šenolta a prof. Jiřího Vencovského v Revmatologickém ústavu v Praze. Vytvořila jsem kohorty pacientů, zpracovala klinická data, zjišťovala přítomnost autoprotilátek metodou radioimunoprecipitace a měřila hladiny S100A4 proteinu metodou ELISA, s podporou biostatistika jsem provedla analýzu dat a nakonec napsala manuskript.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The metastasis promoting protein S100A4 levels associate with disease activity rather than cancer development in patients with idiopathic inflammatory myopathies

Lenka Pleštilová^{1,2}, Heřman Mann^{1,2}, Lucie Andrés Cerezo¹, Ondřej Pecha³, Jiří Vencovský^{1,2} and Ladislav Šenolt^{1,2*}

Abstract

Introduction: The aim was to evaluate S100A4 protein as a biomarker of disease activity and potential cancer development in patients with myositis.

Methods: Serum levels of S100A4 were determined in 43 dermatomyositis (DM), 39 polymyositis (PM) and 22 cancer associated myositis (CAM) patients as well as in 77 healthy controls. The associations between S100A4 levels, inflammation, disease activity, muscle strength and cancer development were evaluated.

Results: All myositis patients had significantly higher serum levels of S100A4 protein compared to healthy controls (median (IQR): 31.5 (17.4 to 59.5) versus 23.8 (14.5 to 33.7) ng/ml, $P < 0.05$). In patients with PM, serum levels of S100A4 protein were significantly higher than in healthy controls (41.6 (24.2 to 123.1) versus 23.8 (14.5 to 33.7) ng/ml; $P < 0.001$) as well as in patients with DM (26.7 (11.3 to 47.5) ng/ml; $P < 0.05$). The levels of S100A4 were comparable between myositis with and without cancer. In all myositis patients, serum S100A4 levels correlated with MYOsis disease ACTivity assessment (MYOACT) score ($r = 0.34$; $P = 0.001$), constitutional ($r = 0.30$; $P = 0.003$), pulmonary ($r = 0.43$; $P = 0.0001$) and extramuscular disease activity ($r = 0.36$; $P = 0.0001$), as well as with creatine phosphokinase ($r = 0.27$; $P = 0.015$) and lactate dehydrogenase ($r = 0.37$; $P = 0.002$) or c-reactive protein (CRP) levels ($r = 0.24$; $P = 0.038$). Multiple regression analysis showed significant association between S100A4 serum levels and extramuscular disease activity ($\beta = 0.552$; $P = 0.002$) in PM patients and with MYOACT ($\beta = 0.557$; $P = 0.003$) and CRP levels ($\beta = 0.391$; $P = 0.029$) in DM patients.

Conclusions: Circulating levels of S100A4 are elevated in patients with myositis and associate with several disease activity parameters, particularly with extramuscular components. No relation between S100A4 levels and presence of cancer associated myositis was found.

Introduction

Idiopathic inflammatory myopathy is a heterogeneous group of chronic muscle disorders with main subtypes including polymyositis (PM), dermatomyositis (DM), inclusion body myositis and necrotizing myopathy [1]. The diagnosis of myositis is based on the combination of symmetrical muscle weakness accompanied by elevation of circulating muscle enzymes, characteristic electromyography (EMG) and muscle biopsy findings. Extramuscular

manifestations of myositis are common and include interstitial lung disease, dysphagia or arthritis, and the presence of distinctive skin rash in patients with DM [2]. An association of idiopathic inflammatory myopathy with malignancy has been documented in a number of studies [3-5]. However, the molecular link explaining the increased risk of cancer in myositis patients is still poorly understood [6,7].

S100A4 protein represents an important member of the S100 family of small calcium-binding proteins [8,9]. Interacting with several target proteins, S100A4 affects a number of activities, accelerating tumorigenesis and invasion of human cancers. At the molecular and cellular level, the cancer-promoting properties of S100A4 are

* Correspondence: senolt@revma.cz

¹Institute of Rheumatology, 12850 Prague, Czech Republic

²Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

caused by regulating cell motility, proliferation, apoptosis, and by stimulation of angiogenesis and remodelling of the extracellular matrix [10-14]. The expression of S100A4 protein correlates with the patient's prognosis in breast cancer [15], colorectal cancer [16] and variety of other tumors [10,11]. We and others have recently demonstrated increased expression of S100A4 at local sites of inflammation in several chronic inflammatory and autoimmune diseases [17-21], including muscle tissue from patients with idiopathic inflammatory myopathies [22]. Our results showed, that in inflamed muscle, the S100A4 protein is produced mainly by mononuclear cells present in the inflammatory infiltrates, by endothelial cells and by regenerating muscle fibres [22]. Moreover, we have previously found increased circulating levels of S100A4 in patients with rheumatoid arthritis (RA) in comparison with control individuals and demonstrated a positive correlation between S100A4 and disease activity in RA [23].

Based on these findings we have conducted a study in order to determine the S100A4 serum levels in myositis patients, to evaluate the association between circulating S100A4 and myositis disease activity and to assess a potential role of S100A4 in cancer-associated myositis (CAM).

Methods

Patients and disease activity assessment

A total of 104 patients with myositis (43 with DM, 39 with PM and 22 with CAM) and 77 healthy controls were enrolled in the study. Longitudinal serum samples were available for 11 patients. The interval between the two blood withdrawals was 9 ± 6 months. Myositis patients were recruited from a single centre of the inpatient and outpatient departments of the Institute of Rheumatology in Prague. The diagnosis of DM and PM was based on the Bohan and Peter criteria [24,25]. CAM was defined as cancer occurring within 3 years of the diagnosis of myositis. All individuals gave informed consent to participate and the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Rheumatology in Prague.

Clinical disease activity was evaluated by the disease activity core set measures proposed by International Myositis Assessment & Clinical Studies Group (IMACS): myositis disease activity assessment (MYOACT) and physician global activity using visual analogue scales (VAS), manual muscle testing (MMT) and the health assessment questionnaire (HAQ) [26]. Muscle biopsies performed within one month from the blood withdrawal were available for 13 patients with PM.

Laboratory measurements

Blood samples were collected from all patients and control individuals and stored at -80°C until analysis. Serum

S100A4 concentrations were measured by an ELISA kit according to the manufacturer's protocol (CycLex Co, Ltd, Ina, Nagano, Japan) as demonstrated elsewhere [23]. The analysis was performed using the ELISA reader SUNRISE (Tecan, Salzburg, Austria) at a wavelength of 450 nm.

Serum levels of the muscle-associated enzymes creatine phosphokinase (CK) and lactate dehydrogenase (LD), as well as C-reactive protein (CRP) were measured by routine laboratory techniques. Myositis specific and associated autoantibodies were detected by immunoprecipitation as described elsewhere [27].

Statistical analyses

The data were described as median (IQR) if variables were not normally distributed and as mean (SD) if normally distributed. The Kruskal-Wallis test and corresponding post-hoc analysis and Mann-Whitney test were conducted for comparison between groups. Before analysis of associations among variables, the data were first transformed toward normality. Logarithmic transformation was used because all variables were positively skewed. Pearson's product-moment correlation coefficients were calculated to quantify relationships between disease activity, laboratory markers and S100A4 levels. All correlations were adjusted for age, body mass index, and disease duration using the partial correlation technique. Multiple linear regression analysis was performed to establish whether specific factors were simultaneously associated with the S100A4 as a dependent variable. Covariates included age, sex and disease duration, as well as laboratory markers (CRP, CK and LD) and disease activity measures (MYOACT and its components, extramuscular and muscle disease activity, physician global disease assessment, HAQ and MMT8) were considered as independent variables. The appropriate predictors were chosen using a backward stepwise elimination method. Missing data were excluded using pairwise deletion. *P*-values <0.05 were considered statistically significant. A correlation coefficient of 0.1 to 0.3 was considered weak, 0.3 to 0.5 was considered moderate and 0.5 to 1.0 was considered strong correlation. The analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and the graphs were prepared using GraphPad Prism (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA USA, [28]).

Results

Characteristics of patients

The characteristics of myositis patients and healthy controls are summarized in Table 1, and types of cancer in patients with CAM are given in Table 2. A majority of patients with CAM had DM ($n = 18$). Disease duration ranged from 0 to 18 months from diagnosis. Some patients were treated for specific overlap syndromes,

Table 1 Characteristics and demographic data of patients with idiopathic inflammatory myopathies and healthy controls

	Dermatomyositis (DM)	Polymyositis (PM)	Cancer-associated myositis (CAM)	Healthy controls (HC)
Number	43	39	22	77
Gender, female/male	35/8	25/14	20/2	58/19
Age, years	58 (41 to 63)	55 (36 to 60)	64 (59 to 70)	45 (31 to 54)
S100A4, ng/ml	26.7 (11.3 to 47.5)	41.6 (24.2 to 123.1)	28.8 (12.6 to 45.4)	23.8 (14.5 to 33.7)
S100A4, ng/ml in females	26.7 (9.0 to 54.7)	54.2 (25.4 to 115.6)	28.8 (13.0 to 47.5)	22.2 (13.6 to 32.1)
S100A4, ng/ml in males	30.3 (19.5 to 44.8)	41.3 (23.9 to 157.9)	20.3 (5.5 to 35.0)	32.3 (19.9 to 64.6)*
Disease duration, years	2.4 (0.4 to 8.3)	0.9 (0.5 to 3.2)	0.6 (0.2 to 3.6)	NA
Biochemical markers				
CRP, mg/L	3.3 (1.3 to 9.0)	4.7 (2.2 to 26.1)	8.0 (3.2 to 26.6)	NA
CK, ukat/L	2.6 (1.2 to 9.9)	11.6 (2.0 to 29.3)	10.9 (1.5 to 37.1)	NA
LD, ukat/L	4.4 (3.5 to 6.4)	7.1 (4.2 to 10.9)	5.2 (2.9 to 6.0)	NA
Autoantibodies				
	6*Mi-2	12*Jo-1;	11*TIF1	NA
	4*TIF1, 1*TIF1 + U1RNP	1* Jo-1 + U1RNP;	4*Mi-2	
	2*NXP2	1*Jo-1 + RNAPI + RNAPII	2*Jo-1, 1*Jo-1 + Ro	
	3*PM-Scl	2*PM-Scl	1*SAE	
	3*Jo-1	1*PL7	3*without known aAbs	
	19*without known aAbs	1*Ku		
		1*SRP		
		1*TIF1 + AMA		
		15*without known aAbs		
Clinical features, number				
Muscle weakness	43	39	22	NA
Rash	42	1	16	NA
Mechanic's hands	18	10	8	NA
Raynaud's phenomenon	9	10	3	NA
Arthritis	14	14	4	NA
Interstitial lung disease	15	22	5	NA
Cardiac involvement	10	6	3	NA
Dysphagia	21	15	10	NA
Disease activity				
MYOACT	0.6 (0.15 to 1.5)	0.7 (0.2 to 1.3)	0.8 (0.5 to 1.8)	NA
Constitutional DA, VAS	6 (0 to 18)	8 (0 to 24)	0 (0 to 28.5)	NA
Cutaneous DA, VAS	15 (0 to 30)	0 (0 to 6)	28.5 (0 to 52.8)	NA
Skeletal DA, VAS	0 (0 to 0)	0 (0 to 7)	0 (0 to 2)	NA
Gastrointestinal DA, VAS	0 (0 to 4)	0 (0 to 3)	0 (0 to 25.5)	NA
Pulmonary DA, VAS	0 (0 to 7)	6.5 (0 to 24.7)	0 (0 to 13)	NA
Cardiac DA, VAS	0 (0 to 0)	0 (0 to 0)	0 (0 to 0)	NA
Extramuscular DA, VAS	15 (4 to 34)	17 (3.5 to 32.5)	20 (11.5 to 54.5)	NA
Muscle DA, VAS	10 (3 to 44)	32 (14 to 53)	37 (5.5 to 68.3)	NA

Table 1 Characteristics and demographic data of patients with idiopathic inflammatory myopathies and healthy controls (Continued)

Physician's global disease Assessment, VAS	19.5 (4.5 to 43.7)	30.5 (22.5 to 49.3)	42.5 (13.5 to 52)	NA
HAQ	1.0 (0.3 to 1.9)	0.9 (0.5 to 1.3)	1.0 (0.5 to 2.6)	NA
MMT8	62 (52 to 74)	71 (63 to 74.5)	56 (50.5 to 69.0)	NA
Treatment				
Treatment duration, months	13.6 (0.9 to 83.6)	2.0 (0.3 to 72.1)	1.4 (0.0 to 20.6)	NA
Daily glucocorticoid dosage, mg prednisone equivalent	10.0 (2.5 to 40.0)	25.0 (3.8 to 50.0)	6.3 (0.0 to 42.5)	NA
Immunosuppressive drugs	11*MTX, 3*Plaquenil, 2* AZA, 2*CyA, 23*no immunosuppressive drugs at the time of blood withdrawal, 2*before start of the immunosuppressive treatment	10*MTX, 1*MTX + AZA, 1*MTX + SAS, 4*CyA, 2*Plaquenil, 1*AZA, 15*no immunosuppressive drugs at the time of blood withdrawal, 5*before start of the immunosuppressive treatment	4*MTX, 11*no immunosuppressive drugs at the time of blood withdrawal, 7*before start of the immunosuppressive treatment	NA

Data are presented as number or median (IQR). *S100A4 serum levels in males versus females, $P = 0.025$. NA, not applicable; CRP, C-reactive protein; CK, creatinine phosphokinase; LD, lactate dehydrogenase; aAbs, autoantibodies; MYOACT, myositis disease activity assessment; DA, disease activity; VAS, visual analogue scale; HAQ, health assessment questionnaire; MMT, manual muscle testing; MTX, methotrexate; AZA, azathioprine; CyA, cyclosporine A; SAS, sulfasalazine.

including myositis overlap with systemic lupus erythematosus ($n = 3$) and systemic sclerosis ($n = 3$). Two patients with immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) were included in the PM subgroup, as they fulfilled the Bohan and Peter classification criteria [24,25]. All patients had proximal muscle weakness. Rash was present in 57%, mechanics hands in 35% and Raynaud's phenomenon in 21% of patients. Arthritis was diagnosed in 31% and dysphagia in 44% of patients. Myositis-associated interstitial lung disease and cardiac involvement was present in 40% and 18% of patients, respectively. The anti-TIF1 autoantibodies, known to be associated with malignancy, were detected in 17 myositis patients

Table 2 Types of cancer in patients with cancer-associated myositis

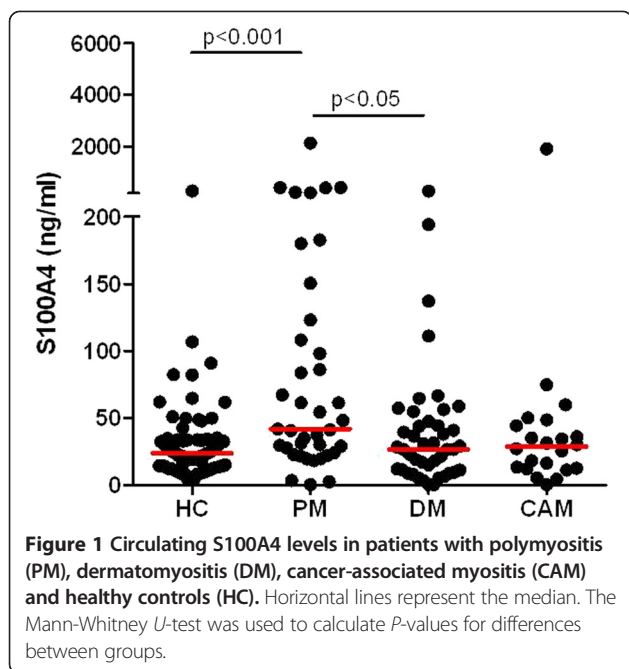
Type of cancer	Number of patients
Breast cancer	8
Breast cancer + uterine cancer	1
Ovarian cancer	3
Tonsillar cancer	2
Uterine cancer	1
Prostate cancer	1
Hepatic cancer	1
Colorectal cancer	1
Sarcoma on the neck	1
Invasive thymoma	1
Metastatic cancer of unknown origin	1
Information missing	1

(5 with DM, 1 with PM and 11 with CAM) [29]. Fifteen patients were treatment-naïve at the time of assessment. In the 84 patients treated with glucocorticoids at the time of blood withdrawal, the median dose was 15 mg of prednisone or its equivalent per day ranging from 2.5 to 100 mg per day. Twenty-seven patients received methotrexate in addition to glucocorticoids, six patients were treated with cyclosporine A, three with azathioprine and two with hydroxychloroquine (one in monotherapy). Four patients were not treated at the time of blood sample collection, but were on immunosuppressive drugs previously.

Circulating S100A4 is elevated in myositis patients

The levels of serum S100A4 were higher in all myositis patients than in healthy controls (31.5 (17.4 to 59.5) versus 23.8 (14.5 to 33.7) ng/ml, $P < 0.05$). Patients with PM had higher serum levels of S100A4 compared to healthy controls (41.6 (24.2 to 123.1) versus 23.8 (14.5 to 33.7) ng/ml, $P < 0.001$) or to patients with DM (to 26.7 (11.3 to 47.5) ng/ml, $P < 0.05$). There was not a significant difference between patients with DM or CAM and healthy controls (26.7 (11.3 to 47.5) or 28.8 (12.6 to 45.4) versus 23.8 (14.5 to 33.7) ng/ml, both $P < 0.05$) (Figure 1).

The levels of serum S100A4 were higher in healthy male compared to female subjects, but there were no significant sex-related differences in S100A4 levels in myositis patients (Table 1). A weak inverse correlation between S100A4 levels and disease duration was observed in all myositis patients ($r = -0.27$; $P = 0.006$). In this context, patients who were treated for longer than 6 months ($n = 50$) compared with those who were treated for a shorter period of time ($n = 54$) had lower



levels of S100A4 (22.0 (9.6 to 43.4) versus 38.7 (27.2 to 65.2) ng/ml, $P = 0.002$). However, serum levels of S100A4 did not correlate with daily dose of prednisone and were not affected by age. In addition, in longitudinal serum samples S100A4 levels decreased during the treatment; however, due to the limited number of samples for investigation ($n = 11$), this change was not statistically significant (86.4 (40.0 to 218.4) versus 45.2 (28.9 to 139.9) ng/ml, $P = 0.195$).

Association between S100A4 levels and myositis-specific and associated autoantibodies

Serum levels of S100A4 were compared between patients positive or negative for the myositis-specific and associated autoantibodies directed against Jo-1, Mi-2, PM-Scl and TIF1 antigens (Figure 2). Other autoantibodies were rare and did not allow statistical comparisons. Anti-PM-Scl-positive patients ($n = 5$) had significantly higher levels of S100A4 compared to anti-PM-Scl-negative patients ($n = 99$) (98.1 (60.7 to 206.3) versus 30.3 (16.4 to 56.3) ng/ml, $P = 0.008$), and similarly, albeit with a smaller difference, anti-Jo-1-positive patients ($n = 25$) had higher S100A4 levels than anti-Jo-1-negative patients ($n = 79$) (38.0 (29.1 to 120.6) versus 28.5 (12.1 to 57.2) ng/ml, $P = 0.038$). No difference was observed between anti-Mi-2-positive ($n = 10$) and -negative ($n = 94$) patients (32.4 (8.5 to 48.9) versus 31.5 (18.4 to 61.3) ng/ml, $p = 0.440$). Surprisingly, anti-TIF1-positive myositis patients ($n = 17$), who are more likely to develop cancer, had lower levels of S100A4 than anti-TIF1-negative ones ($n = 87$) (17.1 (11.3 to 25.1) versus 36.6 (21.8 to 66.7) ng/ml, $P = 0.001$).

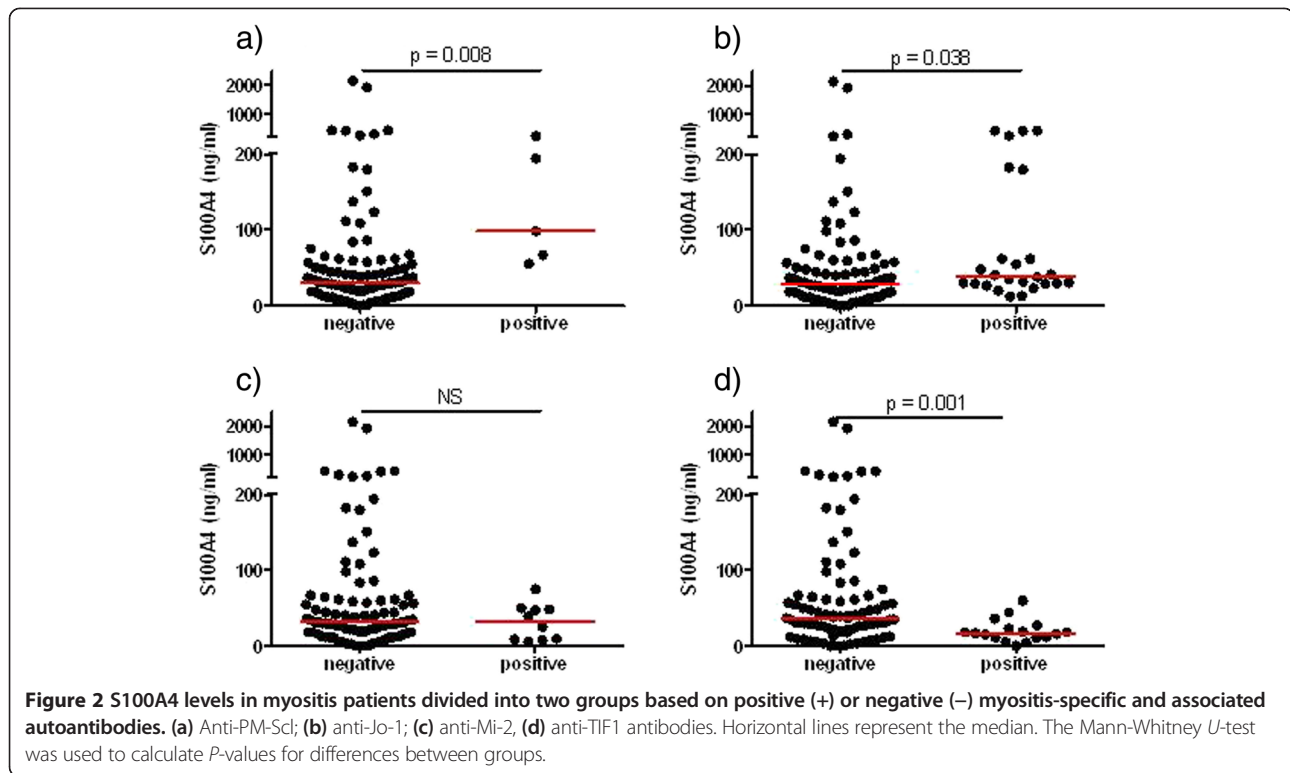
Association between S100A4 levels and myositis disease activity

Increased serum levels of S100A4 were associated with several measures of disease activity in myositis patients overall (Figure 3). Specifically, we found a moderate correlation of S100A4 serum levels with the MYOACT score ($r = 0.34$; $P = 0.001$), constitutional ($r = 0.30$; $P = 0.003$), extramuscular ($r = 0.36$; $P = 0.0001$) and pulmonary disease activity ($r = 0.43$; $P = 0.0001$), but not with skeletal disease activity ($r = 0.13$; $P = 0.208$). In addition, there was a weak correlation of S100A4 with CRP ($r = 0.24$; $P = 0.038$) as well as with CK ($r = 0.27$; $P = 0.015$) and moderate correlation with LD ($r = 0.37$; $P = 0.002$) serum levels. On the other side, there was no difference in S100A4 levels between myositis patients with ($n = 32$) and without ($n = 72$) arthritis (32.3 (17 to 65) versus 31.5 (17 to 58) ng/ml, $P = 0.890$).

In patients with PM, S100A4 serum levels moderately correlated with MYOACT ($r = 0.43$; $P = 0.010$) and with constitutional ($r = 0.43$; $P = 0.011$), pulmonary ($r = 0.44$; $P = 0.008$), and extramuscular disease activity ($r = 0.50$; $P = 0.003$). Additional multiple correlations are given online in Additional file 1: Table S1. There was no correlation of S100A4 serum levels with the degree of endomysial inflammatory infiltrate and/or MHC-I overexpression in the muscle biopsies from patients with PM (data not shown). No association was demonstrated between S100A4 and CK ($r = 0.33$; $P = 0.064$), LD ($r = 0.36$; $P = 0.061$), and CRP ($r = 0.26$; $P = 0.169$) serum levels in PM patients.

In patients with DM, S100A4 serum levels correlated moderately with MYOACT ($r = 0.46$; $P = 0.004$) and pulmonary disease activity ($r = 0.41$; $P = 0.011$). Significant correlations were found between S100A4 and CRP levels ($r = 0.38$; $P = 0.041$), but not CK ($r = 0.09$; $P = 0.631$) or LD ($r = 0.19$; $P = 0.365$) serum levels. In addition, we have not observed any significant correlations between S100A4 serum levels and myositis disease activity or laboratory markers in patients with cancer-associated myositis (data not shown).

Multiple regression analysis revealed significant association between S100A4 serum levels, pulmonary disease activity ($\beta = 0.369$; $P = 0.002$), LD ($\beta = 0.345$; $P = 0.005$) and severity of dysphagia ($\beta = -0.250$; $P = 0.033$) in the whole myositis patient group. When analysing the group of PM patients, S100A4 levels were associated only with extramuscular global assessment ($\beta = 0.552$; $P = 0.002$), while in the group of DM patients, S100A4 levels correlated with MYOACT ($\beta = 0.557$; $P = 0.003$) and CRP ($\beta = 0.391$; $P = 0.029$). The group of patients with cancer-associated myositis was too small to perform multiple linear regression analysis. Furthermore, there were no significant bivariate correlations within this group.



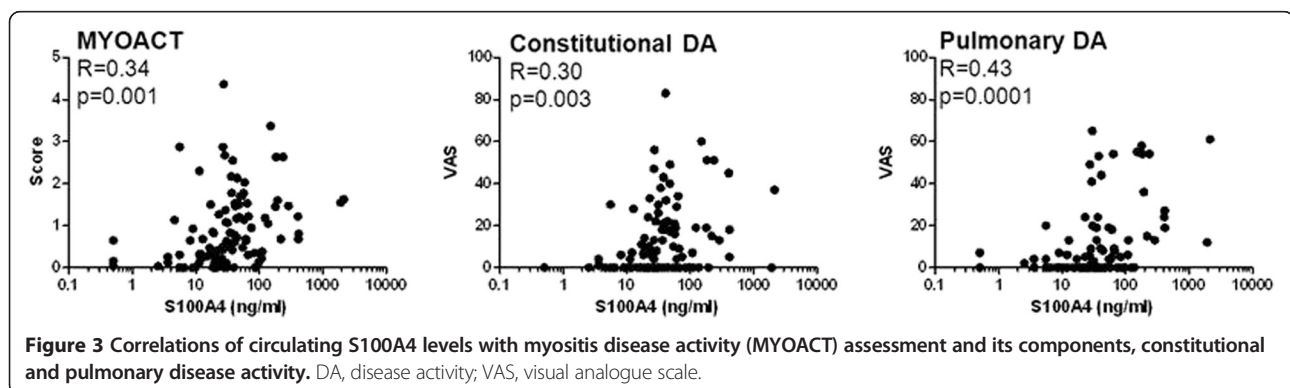
Discussion

In this study we demonstrated 1) no relationship between S100A4 and cancer-associated myositis; 2) increased S100A4 serum levels in myositis patients; 3) a relationship between S100A4 and some myositis-specific and myositis-associated autoantibodies; and 4) association between S100A4 levels and several features of myositis disease activity, particularly with extramuscular symptoms.

There is a body of evidence that S100A4 protein is associated with the development of several cancers and particularly with their ability to metastasize [11,12,14]. Given the association of myositis, and dermatomyositis in particular, with increased risk of cancer development [6,7], it may be surprising that we have not observed

higher serum levels of S100A4 in patients with cancer-associated myositis and that S100A4 levels were even lower in those with anti-TIF1 autoantibodies, a biomarker that identifies a large proportion of myositis patients with concomitant cancer [30]. We can speculate that either there was S100A4 consumption in cancer tissue or inability to detect enhanced formation of S100A4 multimeric forms that occur during malignancy [18,31].

Although S100A4 protein was initially studied in malignancy [10], there are several reports demonstrating increased amounts of S100A4 in patients with various inflammatory and autoimmune diseases [17,19-21,32]. In addition, we have previously demonstrated that S100A4 is expressed mainly by infiltrating mononuclear cells,



few regenerating muscle fibres and endothelial cells in myositis [22]. In this study, we found increased S100A4 serum levels in all myositis patients and particularly in PM patients compared to those with DM and healthy individuals. Thus, we suggest that S100A4 may either reflect diverse pathological processes that occur in different myositis subtypes and/or that it plays a more important role in PM than in DM.

Furthermore, there was a relationship between circulating S100A4 and the presence of several autoantibodies. We found that the levels of S100A4 are elevated in myositis patients positive for PM-Scl and anti-Jo-1, but not Mi-2 antibodies. Both arthralgia and non-erosive arthritis are common in myositis patients, especially in patients with anti-synthetase autoantibodies such as anti-Jo-1 [33]. As disease activity in patients with RA correlated with S100A4 levels [18,23] and anti-Jo-1-positive patients had increased S100A4 serum levels, we expected that presence of arthritis would contribute to the elevation of S100A4 in myositis patients. However, S100A4 levels were comparable between myositis patients with and without arthritis, which may point to a different pathogenesis of joint involvement in myositis patients compared to those with RA. Thus, it can be hypothesised that in myositis, S100A4 may be associated with systemic activation of the immune system rather than with mechanisms driving arthritis during this debilitating disease.

In our present study, we demonstrated weak to moderate correlation between S100A4 serum levels and various myositis disease-activity measures; on the other side, we found no association between serum S100A4 protein levels and muscle strength or changes in the muscle biopsy. These results may be consistent with the findings showing that muscle fibres do not significantly contribute to S100A4 production and myocytes do not respond to stimulation with S100A4 protein by production of pro-inflammatory cytokines [22,34]. Thus, we can speculate that circulating S100A4 protein may reflect the global disease activity, including extramuscular organ involvement, rather than functional muscle impairment in inflammatory myopathy. In this context, association between S100A4 levels and pulmonary disease activity may be of clinical significance. However, these results should be confirmed in further targeted studies.

Conclusion

In summary, we have demonstrated that circulating S100A4 levels are elevated in myositis patients, especially in those with polymyositis, and correlate with several features of myositis disease activity, particularly with extramuscular involvement, but not with the presence of cancer. Further studies evaluating the role of S100A4 in myositis are needed.

Additional file

Additional file 1: Multiple correlations.

Abbreviations

aAbs: autoantibodies; AZA: azathioprine; CAM: cancer-associated myositis; CK: creatine phosphokinase; CRP: C-reactive protein; CyA: cyclosporine A; DA: disease activity; DM: dermatomyositis; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EMG: electromyography; EQUIV: equivalent; HAQ: health assessment questionnaire; IMACS: International Myositis Assessment & Clinical Studies Group; IQR: interquartile range; LD: lactate dehydrogenase; MMT: manual muscle testing; MTX: methotrexate; MYOACT: Myositis disease activity assessment; NA: not applicable; PM: polymyositis; RA: rheumatoid arthritis; SAS: sulfasalazine; VAS: visual analogue scales.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content and all approved the final version to be published. LP and LAC performed the laboratory measurements; HM and JV enrolled patients in the study and provided clinical data for the patients; OP participated in study design, statistical analysis and interpretation of data; LP, LŠ and JV designed the study, analysed data and wrote the manuscript.

Acknowledgements

We thank Associate Professor Josef Zámecník from the Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Medical Faculty and University Hospital Motol, Charles University in Prague, Czech Republic for assessing muscle biopsies. We thank Dr Zoe E Betteridge and Professor Neil J McHugh from Royal National Hospital for Rheumatic Diseases, NHS Foundation Trust, Upper Borough Walls, Bath, for detecting myositis-specific and myositis-associated autoantibodies in patients' sera by radioimmunoprecipitation. This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (MHCR) for conceptual development of a research organization (023728), IGA MHCR (NT 13698-4), IML project BTCure (115142-2) and Research Project SW (260 031).

Author details

¹Institute of Rheumatology, 12850 Prague, Czech Republic. ²Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ³Technology Centre of the Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.

Received: 17 April 2014 Accepted: 14 October 2014

Published online: 31 October 2014

References

1. Dalakas MC, Hohlfeld R: Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003, **362**:971–982.
2. Spiera R, Kagen L: Extramuscular manifestations in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1998, **10**:556–561.
3. Hill CL, Zhang Y, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Mellemkjaer L, Aitiro A, Evans SR, Felson DT: Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population-based study. *Lancet* 2001, **357**:96–100.
4. Buchbinder R, Forbes A, Hall S, Dennett X, Giles G: Incidence of malignant disease in biopsy-proven inflammatory myopathy. A population-based cohort study. *Ann Intern Med* 2001, **134**:1087–1095.
5. Chen YJ, Wu CY, Huang YL, Wang CB, Shen JL, Chang YT: Cancer risks of dermatomyositis and polymyositis: a nationwide cohort study in Taiwan. *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R70.
6. Zampieri S, Valente M, Adami N, Biral D, Ghirardello A, Rampudda ME, Vecchiato M, Sarzo G, Corbianco S, Kern H, Carraro U, Bassetto F, Merigliano S, Doria A: Polymyositis, dermatomyositis and malignancy: a further intriguing link. *Autoimmun Rev* 2010, **9**:449–453.
7. Zahr ZA, Baer AN: Malignancy in myositis. *Curr Rheumatol Rep* 2011, **13**:208–215.
8. Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E: Isolation and characterization of a gene specifically

- expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev* 1989, **3**:1086–1093.
9. Donato R: **S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles.** *Int J Biochem Cell Biol* 2001, **33**:637–668.
 10. Boye K, Maelandsmo GM: **S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles.** *Am J Pathol* 2010, **176**:528–535.
 11. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M: **The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis.** *Br J Cancer* 2005, **92**:1955–1958.
 12. Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, Beck MK, Knudsen RS, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N: **Anti-S100A4 antibody suppresses metastasis formation by blocking stroma cell invasion.** *Neoplasia* 2012, **14**:1260–1268.
 13. Lukanidin E, Sleeman JP: **Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth.** *Semin Cancer Biol* 2012, **22**:216–225.
 14. Wang L, Wang X, Liang Y, Diao X, Chen Q: **S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13.** *Acta Biochim Pol* 2012, **59**:593–598.
 15. Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barracough R: **Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer.** *Cancer Res* 2000, **60**:1595–1603.
 16. Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H: **Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas.** *Clin Cancer Res* 1997, **3**:2309–2316.
 17. Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E: **Metastasis-inducing S100A4 protein: implication in non-malignant human pathologies.** *Curr Mol Med* 2008, **8**:492–496.
 18. Klingelhofer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshøj I, Pavelka K, Neidhart M, Gay S, Ambartsumian N, Hansen BS, Petersen J, Lukanidin E, Grigorian M: **Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**:779–789.
 19. Zibert JR, Skov L, Thyssen JP, Jacobsen GK, Grigorian M: **Significance of the S100A4 protein in psoriasis.** *J Invest Dermatol* 2010, **130**:150–160.
 20. Boomershine CS, Chamberlain A, Kendall P, Afshar-Sharif AR, Huang H, Washington MK, Lawson WE, Thomas JW, Blackwell TS, Bhowmick NA: **Autoimmune pancreatitis results from loss of TGFbeta signalling in S100A4-positive dendritic cells.** *Gut* 2009, **58**:1267–1274.
 21. Cunningham MF, Docherty NG, Burke JP, O'Connell PR: **S100A4 expression is increased in stricture fibroblasts from patients with fibrostenosing Crohn's disease and promotes intestinal fibroblast migration.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, **299**:G457–G466.
 22. Cerezo LA, Kuncová K, Mann H, Tomčík M, Zámečník J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L: **The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies.** *Rheumatology (Oxford)* 2011, **50**:1766–1772.
 23. Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhofer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchy D, Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhofer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchy D, Senolt L: **Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2009, **48**:1590–1594.
 24. Bohan A, Peter JB: **Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts).** *N Engl J Med* 1975, **292**:344–347.
 25. Bohan A, Peter JB: **Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts).** *N Engl J Med* 1975, **292**:403–407.
 26. Isenberg DA, Allen E, Farewell V, Ehrenstein MR, Hanna MG, Lundberg IE, Oddis C, Pilkington C, Plotz P, Scott D, Vencovsky J, Cooper R, Rider L, Miller F, International Myositis and Clinical Studies Group (IMACS): **International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease.** *Rheumatology (Oxford)* 2004, **43**:49–54.
 27. Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J, McHugh N: **Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia.** *Rheumatology (Oxford)* 2007, **46**:1005–1008.
 28. GraphPad Software [http://www.graphpad.com]
 29. Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ: **Novel autoantibodies and clinical phenotypes in adult and juvenile myositis.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:209.
 30. Chinoy H, Fertig N, Oddis CV, Ollier WE, Cooper RG: **The diagnostic utility of myositis autoantibody testing for predicting the risk of cancer-associated myositis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1345–1349.
 31. Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E, Lukanidin E: **Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons.** *J Biol Chem* 2000, **275**:41278–41286.
 32. Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Simmen B, Michel BA, Pavelka K, Gay RE, Gay S, Neidhart M: **S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**:1645–1648.
 33. Katzap E, Barilla-LaBarca ML, Marder G: **Antisynthetase syndrome.** *Curr Rheumatol Rep* 2011, **13**:175–181.
 34. Cerezo LA, Remakova M, Tomčík M, Gay S, Neidhart M, Lukanidin E, Pavelka K, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L: **The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2014, **53**:1520–1526.

doi:10.1186/s13075-014-0468-2

Cite this article as: Pleštilová *et al.*: The metastasis promoting protein S100A4 levels associate with disease activity rather than cancer development in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Research & Therapy* 2014 **16**:468.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.2.2. Normalizace hladin S100 proteinů po zahájení konvenční léčby u pacientů s časnou revmatoidní artritidou

V časně fázi revmatoidní artritidy (RA) by brzká intervence nejspíše mohla zabránit vzniku kloubního poškození. K časnému nasazení individualizované léčby je nutná znalost vhodných biomarkerů. Nadějnými kandidáty jsou proteiny S100A8/9 (kalprotektin) a S100A12 (kalgranulin), známé jako “alarminy” – endogenní látky signalizující počínající poškození tkání. Jejich hladiny jsou u pacientů s RA zvýšené jak lokálně v kloubní dutině, tak systémově v cirkulaci. Množství těchto S100 proteinů se snižuje při léčbě a koreluje s klinickou i laboratorní aktivitou artritidy.

Protože všechny dosavadní studie byly provedeny u pacientů s déletrvající RA, cílem této práce bylo vyšetřit hladiny S100 proteinů u pacientů s časnou RA před léčbou, zjistit, jak se změní po započetí konvenční terapie, zhodnotit míru korelace s klinickou aktivitou RA a možnost použití jako biomarkery.

Sérové hladiny S100A8/9 a S100A12 jsme změřili metodou ELISA v kohortě 43 pacientů s časnou RA a 32 zdravých kontrol. Zjistili jsme, že hladiny S100A8/9 a S100A12 spolu signifikantně korelují před i během léčby, což ukazuje na možnou společnou regulaci obou alarminů. Před začátkem léčby byly hladiny obou proteinů výrazně zvýšené a po třech měsících konvenční terapie se normalizovaly. S100A8/9 významně korelovalo s CRP, počtem oteklých kloubů a hodnotou klinického skóre DAS28, korelace S100A12 s těmito parametry byla méně významná. Zajímavé je, že ani jeden S100 protein nekoreloval s hladinami protilátek anti-CCP nebo RF. Vstupní vysoké hladiny S100A8/9 byly obecně prediktorem zlepšení klinických parametrů RA a změna hladin S100A8/9 pozitivně korelovala se změnou klinických parametrů. Toto zjištění lze částečně vysvětlit vysokou hladinou S100A8/9 u pacientů s vysoce aktivní RA, tedy s vysokým CRP, počtem oteklých kloubů apod., které umožňují výraznější zlepšení při léčbě.

Úzká korelace hladin S100 proteinů s počtem oteklých kloubů nepřímo potvrzuje tvorbu S100 proteinů přímo v synoviální membráně postižených kloubů a jejich průnik do cirkulace. Zejména S100A8/9 je nadějný biomarker u RA poskytující doplňující informace o rozsahukloubního zánětu.

Na této práci jsem se podílela měřením hladin S100 proteinu metodou ELISA a pomocí s následným zpracováním dat.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis

Lucie Andrés Cerezo¹, Heřman Mann¹, Ondřej Pecha², Lenka Pleštilová¹, Karel Pavelka¹, Jiří Vencovský¹ and Ladislav Šenolt^{1*}

Abstract

Introduction: The aim of this study was to examine the serum levels of S100 proteins and to evaluate their role in patients with recent-onset rheumatoid arthritis (RA).

Methods: Serum levels of S100A8/9 and S100A12 were analysed in 43 patients with recent-onset RA, both before and three months after the initiation of conventional treatment, as well as in 32 healthy individuals. Disease activity was assessed based on serum levels of C-reactive protein (CRP), the Disease Activity Score for 28 joints (DAS28) and the total number of swollen joints count for 66 joints (SJC).

Results: The levels of serum S100A8/9 and S100A12 were significantly higher in patients with recent-onset RA compared to the levels in healthy individuals ($P < 0.0001$) and normalised after three months of treatment. Using age- and sex-adjusted analysis, S100A8/9 levels were correlated with CRP ($r = 0.439$, $P < 0.01$), DAS28 ($r = 0.501$, $P = 0.002$) and SJC ($r = 0.443$, $P = 0.007$), while S100A12 was less significantly correlated with these parameters. Higher levels of S100A8/9 at baseline predicted improvement in the levels of CRP and SJC over time. Moreover, decreases in serum S100A8/9 were associated with decreased serum levels of CRP ($r = 0.459$, $P = 0.005$) and improvements in SJC ($r = 0.459$, $P = 0.005$). In multiple linear regression analyses, decreases in S100A8/9 but not CRP were significant predictors for improvements in SJC ($P = 0.001$).

Conclusions: This study is the first to show normalisation of elevated S100 proteins in patients with recent-onset RA after the initiation of conventional treatment. Therefore, S100A8/9 might potentially be a predictive marker for improvement in the total number of swollen joints in patients in the early phase of RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, S100 proteins, disease activity, relapse

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterised by synovitis and joint destruction in which the infiltration of inflammatory cells, the activation of synovial fibroblasts and the production of a wide range of inflammatory mediators play significant roles [1,2]. However, the exact pathological processes involved in the initiation of RA remain

incompletely understood. Very early RA is suggested to represent an immunopathologically distinct phase of the disease in which a “window of opportunity” for early drug intervention with the potential to prevent joint damage may exist [3]. Recent studies have shown that the development of established RA in patients in the early stages of the disease can be predicted by using clinical and serological measures [4-6]. Therefore, a better understanding of the pathological mechanisms and biomarkers during this early phase would be an important way to determine possible new therapeutic targets

* Correspondence: seno@revma.cz

¹Institute of Rheumatology, First Medical Faculty, Charles University, Na Šlupí 4, 128 50 Prague 2, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

and to tailor therapy to ensure optimal treatment for individual patients.

S100 calcium-binding proteins are multifunctional proteins that are implicated in the regulation of a variety of cellular activities [7]. The most familiar S100 proteins, myeloid-related proteins S100A8/9 (calprotectin) and S100A12 (calgranulin C), have recently been proposed as “alarmins,” which are the endogenous molecules that signal the early phase of tissue and cell damage [8]. The S100 proteins are expressed predominantly by neutrophils, monocytes and activated macrophages, and increased S100 levels have been demonstrated in several inflammatory diseases [9]. S100A8/9 and S100A12 are increased locally at sites of inflammation as well as in the circulation of patients with RA [10-13]. Moreover, a tight correlation between S100 proteins and laboratory and clinical markers of disease activity has been demonstrated in patients with different arthritides [13-16]. In addition, S100A8/9 and S100A12 were shown to be decreased locally in synovial tissue as well as in the blood in response to different anti-inflammatory therapies, including TNF α inhibitors, and they were upregulated weeks before relapse became clinically apparent in patients with previously well-controlled disease [16-19]. S100A8/9 was associated with measures of joint damage in one cross-sectional study [20]. More importantly, longitudinal data demonstrated that S100A8/9 was a good prognostic biomarker for long-term radiographic joint progression in patients with established RA [21].

However, S100 proteins have not yet been studied in treatment-naïve RA patients. Therefore, we explored the following: (1) the levels of S100 proteins in patients with recent-onset RA, (2) the effect of conventional treatment on the levels of serum S100 proteins, (3) the association between S100 proteins and disease activity and (4) a potential role of S100 proteins as surrogate predictive markers in a short-term longitudinal study.

Materials and methods

Patients and clinical examination

A total of 43 patients with recent-onset RA were included in this study. Inclusion criteria were as follows: (1) age > 18 years, (2) fulfilment of the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 classification criteria for RA at baseline [22] and (3) symptom duration of less than six months. None of the patients had been receiving disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) or glucocorticoids (GCs) at baseline. After the initiation of conventional treatment, patients were prospectively followed for three months. Disease activity was assessed based on the Disease Activity Score for 28 joints (DAS28) using the number of swollen and tender joints, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and the patient's

global assessment of activity on a visual analogue scale (VAS) [23]. Swollen joints count for 66 joints (SJC) was also evaluated. The clinical response was defined by the EULAR response criteria [24]. Patients were characterised as follows: good responders had a DAS28 \leq 3.2 plus a > 1.2 decrease in DAS28, and moderate responders were defined as having (1) DAS28 \leq 3.2 plus a > 0.6 and \leq 1.2 decrease in DAS28, (2) DAS28 \leq 5.1 > 3.2 plus a > 0.6 decrease in DAS28 or (3) DAS28 > 5.1 plus a > 1.2 decrease in DAS28. Nonresponders were defined as having a < 0.6 decrease in DAS28 or a DAS28 > 5.1 plus a \leq 1.2 decrease in DAS28. The control group consisted of 32 healthy individuals. The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from all patients prior to initiation of the protocol.

ELISA

Blood samples were collected from all patients at baseline (before therapy) and three months after the start of therapy. Serum samples were immediately centrifuged and stored at -80°C until analysis. The levels of serum S100A8/9 (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland) and S100A12 (CycLex Co., Ltd., Nagano, Japan) were measured by using commercially available ELISA kits according to the manufacturers' protocols. Absorbance was detected using the Sunrise ELISA reader (Tecan Group Ltd., Salzburg, Austria) with 450 nm as the primary wavelength. Interassay and intraassay reliability of the S100A8/9 assays were 5.3% and 6.2%, respectively. Interassay and intraassay reliability of the S100A12 assays were 3.3% and 3.4%, respectively. The detection limits were 3 ng/mL for the S100A8/9 assay and 56 pg/mL for the S100A12 assay. C-reactive protein (CRP) was measured using nephelometry. Analyses of serum anticyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP) and immunoglobulin M rheumatoid factor (IgM-RF) were carried out using standard ELISA kits (Test Line s.r.o., Brno, Czech Republic).

Statistical analyses

The concentrations of S100 proteins are expressed as means \pm SEM. A Kolmogorov-Smirnov test of normality was performed for all variables and their difference scores. Pearson's product-moment correlation coefficients and Spearman's rank correlation coefficients were used in cases of normal and non-normal variables, respectively. When comparing patients and controls, the independent samples *t*-test was used for normal variables and the Mann-Whitney *U* test was used as a non-parametric alternative. Two-way analysis of variance with repeated measures (time \times groups) was conducted to determine the differences between groups of patients sorted on the basis of the level of disease activity. In

addition, multiple linear regression analysis was performed for differences in scores on the DAS28 and total SJC, and appropriate predictors were chosen using a backward stepwise elimination method. For all statistical evaluations, *P* values below 0.05 were considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 17 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Table 1 shows the baseline characteristics of the patients and healthy controls. Overall, three patients with recent-onset RA had erosions at baseline. Prior to treatment, 22 patients had highly active disease (mean DAS28 > 5.1), 19 patients had moderate disease activity (mean 3.2 < DAS28 ≤ 5.1) and 2 patients had low disease activity (mean 2.6 ≤ DAS28 < 3.2). Initially, DMARD treatment was started in 42 patients. Thirty-five patients received methotrexate (mean dose at month 3: 14.86 mg/week; range: 7.5 to 20 mg/week), six received sulphasalazine, one received leflunomide and thirty-eight received GCs (prednisone or equivalent; initial mean daily dose: 8.9 mg/day; range: 2.5 to 20 mg/day). After three months of treatment, a significant reduction in disease activity was observed (mean DAS28: 5.3 ± 1.5 to 2.8 ± 1.3; mean SJC: 10.0 ± 9.2 to 1.7 ± 3.6; mean CRP: 16.2 ± 19.8 to 4.2 ± 5.8; *P* < 0.0001 for all comparisons). Thirty-nine patients (90.7%) achieved good or moderate improvement, and eighteen (41.9%) reached remission according to the EULAR response criteria [24].

S100 proteins and disease activity at baseline

The levels of serum S100A8/9 correlated significantly with S100A12 at baseline (*r* = 0.845, *P* < 0.0001), an association that became even stronger when adjusted for

age and sex (*r* = 0.901, *P* < 0.0001). This positive correlation remained significant three months after the start of the treatment. The levels of S100 proteins were not affected by age or gender (data not shown).

In univariate analysis, the serum levels of S100A8/9 correlated positively with the levels of CRP (*r* = 0.553, *P* < 0.0001), DAS28 (*r* = 0.469, *P* < 0.01) and SJC (*r* = 0.363, *P* < 0.05) at baseline (Figures 1A through 1C). When adjusted for age and sex, these correlations remained significant for CRP (*r* = 0.439, *P* < 0.01) and became stronger for DAS28 (*r* = 0.501, *P* = 0.002) and SJC (*r* = 0.443, *P* = 0.007). Similarly, the levels of S100A12 correlated positively with the levels of CRP (*r* = 0.350, *P* < 0.05) and DAS28 (*r* = 0.313, *P* < 0.05), although there was only a trend for the correlation between the levels of S100A12 and SJC (*r* = 0.292, *P* = 0.057) at baseline (Figures 1D through 1F). When adjusted for age and sex, these correlations were lost for CRP (*r* = 0.288, *P* = 0.083) but remained significant for DAS28 (*r* = 0.354, *P* = 0.034) and became significant for SJC (*r* = 0.345, *P* = 0.039). Furthermore, neither S100A8/9 nor S100A12 was associated with IgM-RF (*r* = -0.056, *P* = 0.727, and *r* = 0.170, *P* = 0.289, respectively) or anti-CCP levels (*r* = -0.195, *P* = 0.210, and *r* = -0.044, *P* = 0.778, respectively).

Effect of conventional treatment on the levels of S100 proteins

The levels of serum S100A8/9 (mean 5.99 ± 0.88 µg/mL vs. 1.92 ± 1.16 µg/mL; *P* < 0.0001) and S100A12 (mean 0.30 ± 0.04 µg/mL vs. 0.13 ± 0.11 µg/mL; *P* < 0.0001) were significantly higher in patients with recent-onset RA compared with healthy controls, and these levels essentially normalised after three months of treatment (mean S100A8/9: 5.99 ± 0.88 µg/mL to 2.49 ± 0.21 µg/mL; *P* < 0.0001; mean S100A12: 0.30 ± 0.04 µg/mL to 0.13 ± 0.01 µg/mL; *P* < 0.0001) (Figure 2). Importantly, after three months, the levels of S100A8/9 but not S100A12 were significantly lower in patients who had achieved remission compared with those who showed moderate or high disease activity (mean S100A8/9: 2.15 ± 1.11 µg/mL vs. 3.37 ± 1.34 µg/mL; *P* = 0.043). We found significantly higher levels of baseline S100A8/9 and S100A12 concentrations in patients with active disease compared with those with moderate disease activity (mean S100A8/9: 7.96 ± 1.52 µg/mL vs. 4.20 ± 0.63 µg/mL, *P* = 0.004, and mean S100A12: 0.37 ± 0.07 µg/mL vs. 0.24 ± 0.04 µg/mL, *P* = 0.035, respectively). S100A8/9 and S100A12 serum levels significantly decreased over time, particularly in patients with active disease (mean S100A8/9: 7.96 ± 1.52 µg/mL to 2.81 ± 0.31 µg/mL and mean S100A12: 0.37 ± 0.07 µg/mL to 0.14 ± 0.02 µg/mL; *P* < 0.0001 for both comparisons). However, in patients with moderate disease activity, a modest

Table 1 Baseline characteristics of patients with recent-onset RA and healthy controls^a

Characteristics	Recent-onset RA (n = 43)	Healthy controls (n = 32)
Gender, F/M	30/13	11/21
Mean age, years (±SD)	50.90 ± 16.40	43.97 ± 15.4
Mean CRP, mg/L (±SD)	16.20 ± 20	
Mean ESR, mm/1 st hour (±SD)	34.20 ± 23.72	
Mean SJC out of 66 (±SD)	10.00 ± 9.28	
Mean DAS28 score (±SD)	5.31 ± 1.51	
RF positivity, n (%)	32 (74.4%)	
Anti-CCP positivity, n (%)	22 (51.2%)	
DMARDs/GCs, number of patients	42/35	

^aAnti-CCP, anticyclic citrullinated peptide antibody; CRP, C-reactive protein; DAS28, Disease Activity Score for 28 joints; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; RA, rheumatoid arthritis; ESR, erythrocyte sedimentation rate; F, female; GCs, glucocorticoids; M, male; RF, rheumatoid factor.

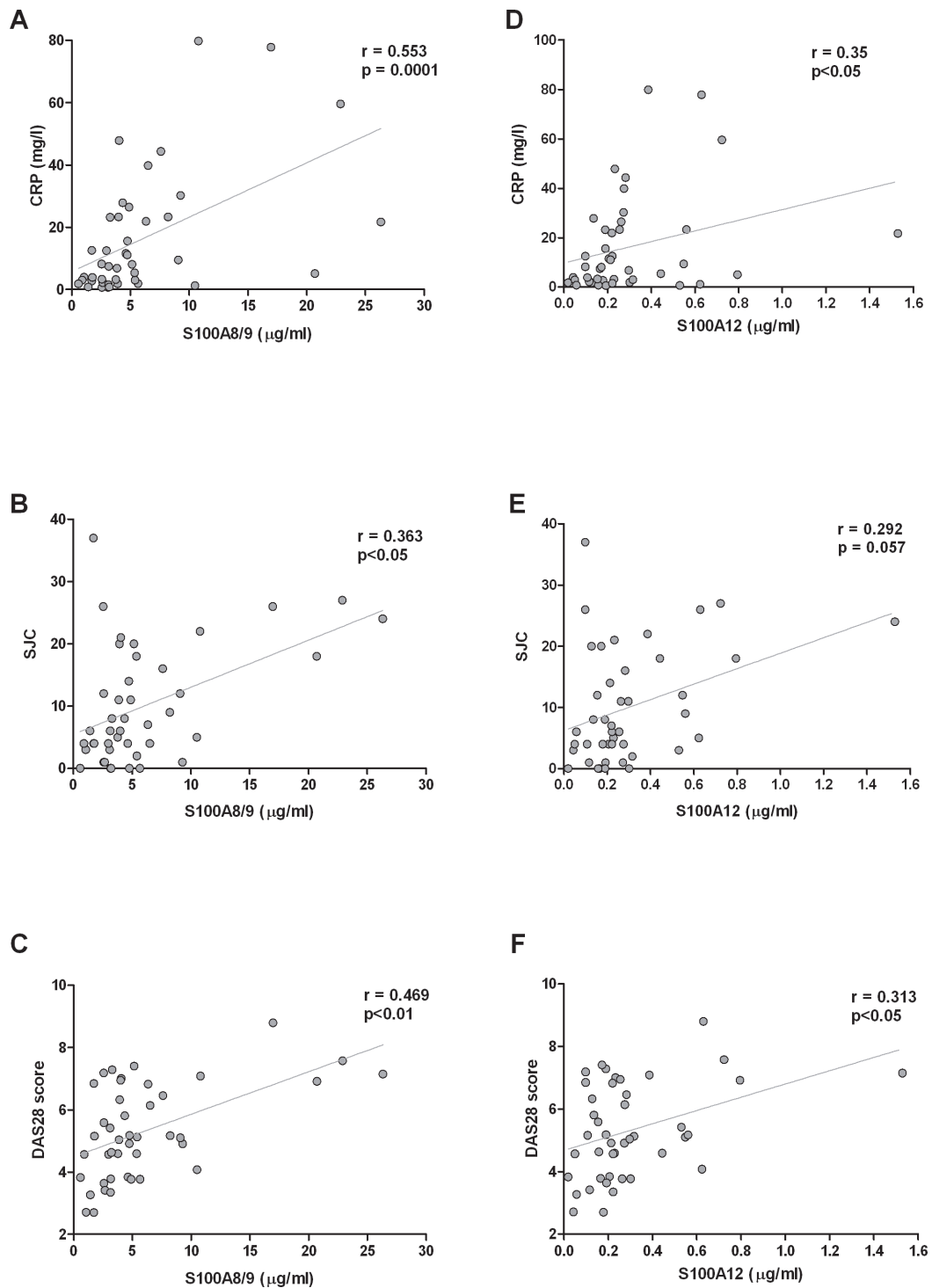
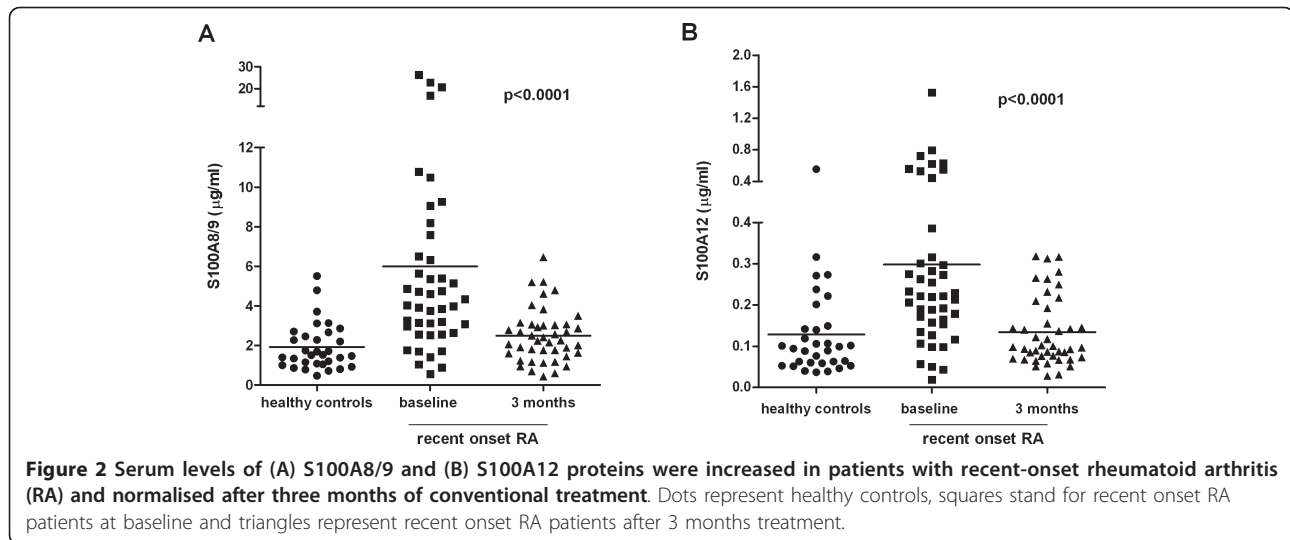


Figure 1 Scatterplots showing correlations between serum levels of (A) through (C) S100A8/9 and (D) through (F) S100A12 and disease activity measures in patients with recent-onset rheumatoid arthritis (RA). CRP, C-reactive protein; DAS28, Disease Activity Score for 28 joints; SJC, swollen joint count for 66 joints.



decrease in S100A12 (mean $0.24 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ to $0.13 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$; $P = 0.046$) and a statistically insignificant decrease in S100A8/9 (mean $4.20 \pm 0.63 \mu\text{g/mL}$ to $2.29 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$; $P = 0.112$) was observed. The levels of S100 proteins were not affected by different dosages of GCs and/or methotrexate.

Predictive role of S100 proteins

Higher levels of S100A8/9 at baseline predicted an improvement in the level of CRP ($r = -0.397$, $P = 0.01$) and in SJC ($r = -0.369$, $P < 0.05$), but not in DAS28 ($r = -0.279$, $P = 0.07$). When adjusted for age and sex, the correlations of S100A8/9 with changes in the levels of CRP ($r = -0.423$, $P = 0.01$) and changes in SJC ($r = -0.423$, $P = 0.01$) became stronger. The levels of S100A12 at baseline were predictive of the change in SJC ($r = -0.376$, $P < 0.05$), but not in the level of CRP ($r = -0.212$, $P = 0.184$) or in DAS28 ($r = -0.282$, $P = 0.07$), which remained significant when adjusted for age and sex for baseline S100A12 and changes in SJC ($r = -0.360$, $P = 0.031$).

Furthermore, we found that changes in serum S100A8/9 positively correlated with changes in serum levels of CRP ($r = 0.476$, $P = 0.002$), changes in DAS28 ($r = 0.390$, $P = 0.01$) and changes in SJC ($r = 0.539$, $P < 0.001$) (Figures 3A through 3C). When adjusted for age and sex, the correlations remained significant for changes in CRP ($r = 0.459$, $P = 0.005$) and changes in SJC ($r = 0.459$, $P = 0.005$), but not for changes in DAS28 ($r = 0.258$, $P = 0.129$). However, changes in serum S100A12 correlated with changes in SJC ($r = 0.379$, $P < 0.05$), but not with changes in serum CRP ($r = 0.257$, $P = 0.105$) or changes in DAS28 ($r = 0.271$, $P = 0.079$) (Figures 3D through 3F). Age and sex-adjusted

changes in serum S100A12 also correlated only with changes in SJC ($r = 0.343$, $P = 0.04$).

Multiple linear regression analysis showed that baseline DAS28 and changes in DAS28 were easier to predict using CRP and S100A8/9 than baseline SJC and changes in SJC (Tables 2 and 3). The levels of CRP were more important predictors of DAS28 at baseline than the levels of S100A8/9, which were only marginally acceptable as predictors of baseline DAS28 ($P = 0.052$) (Table 2). The levels of both CRP and S100A8/9 at baseline were only weak predictors of the baseline SJC ($P = 0.045$ and $P = 0.051$, respectively). Interestingly, the change in S100A8/9 levels was significantly associated with the change in SJC over time ($P = 0.001$) (Table 3). It can thus be suggested that decreases in serum S100A8/9 over time predict improvements in the number of affected joints.

Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first to show elevated serum levels of S100 proteins in patients with recent-onset DMARD/GC-naïve RA, the association between S100 proteins and disease activity and normalisation of S100A8/9 in patients who achieve remission after conventional treatment. Furthermore, we have demonstrated that decreases in S100A8/9 levels are associated with clinical improvement in the number of affected joints.

S100 proteins were previously found to be upregulated in the inflamed synovial tissue, synovial fluid and blood of patients with established RA [10-13]. However, in this study, we have shown for the first time significantly increased serum levels of both S100A8/9 and S100A12 proteins in patients with recent-onset RA who had not

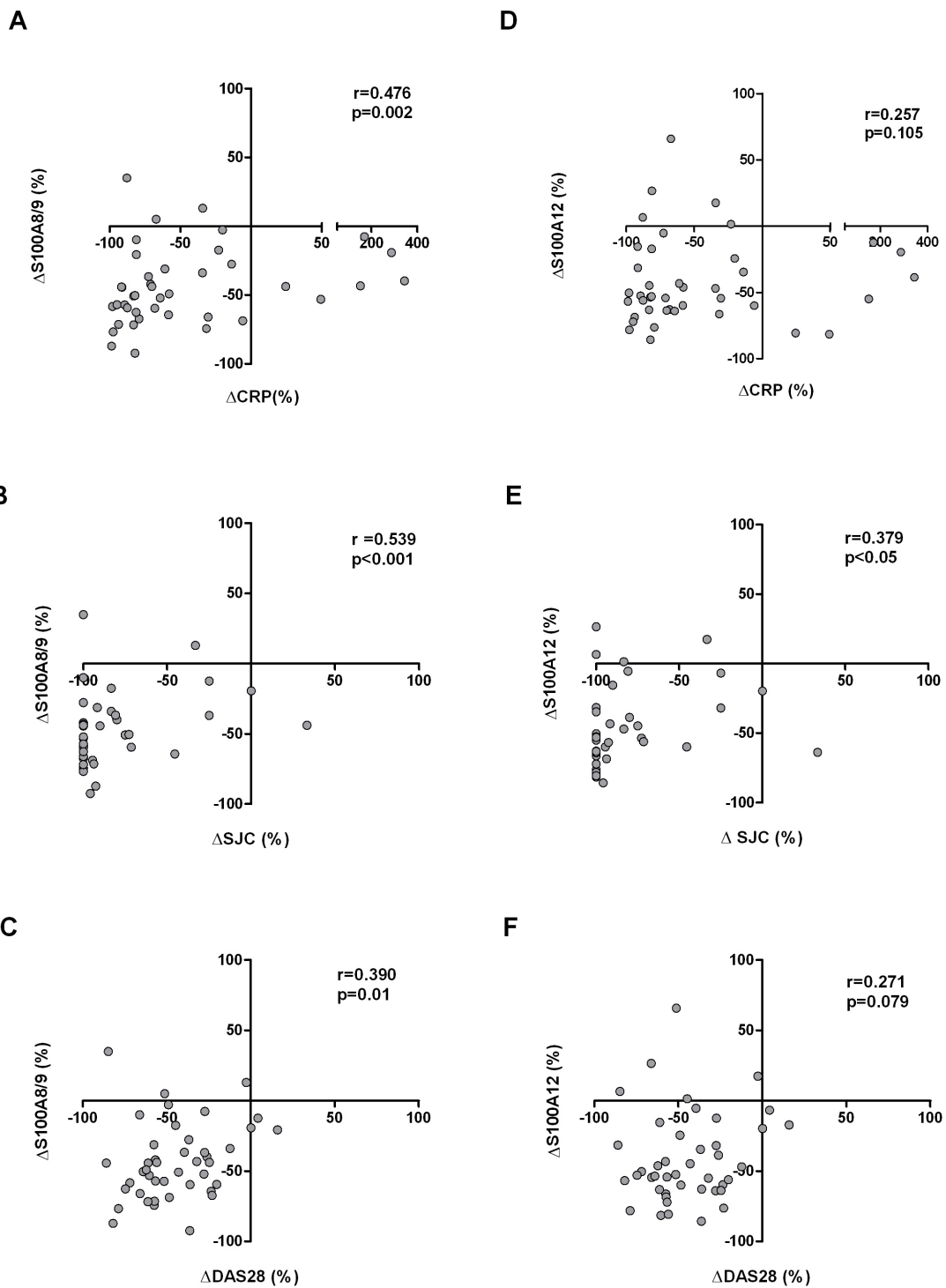


Figure 3 Scatterplots showing correlations of changes in (A) through (C) S100A8/9 and (D) through (F) S100A12 levels during treatment with changes in disease activity measures in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. CRP, C-reactive protein; DAS28, Disease Activity Score for 28 joints; SJC, swollen joint count out of 66.

Table 2 Multiple linear regression models for initial DAS28 and changes in DAS28^a

Initial DAS28 (n = 43; r ² = 0.422; F = 16.355; P < 0.000) ^b					ΔDAS28 (n = 41; r ² = 0.349; F = 11.727; P < 0.000) ^c				
Variables	Parameter estimate	SEM	t-value	P value	Variable	Parameter estimate	SEM	t-value	P value
Intercept	4.351	0.246	17.662	0.000	Intercept	-2.117	0.277	-7.649	0.000
Initial CRP	0.037	0.010	3.619	0.001	Initial CRP	0.080	0.038	2.124	0.040
Initial S100A8/9	0.000	0.000	2.007	0.052	ΔCRP	0.136	0.042	3.248	0.002

^aDAS28, Disease Activity Score for 28 joints; SEM, standard error of the mean; CRP, C-reactive protein. r² values are adjusted. ^bExcluded predictors are age and initial S100A12. ^cExcluded predictors are age, initial S100A12, initial S100A8/9, ΔS100A12 and ΔS100A8/9.

yet been exposed to conventional treatment. This is consistent with previous reports showing elevated circulating S100 proteins in patients with previously established disease [10-13]. However, compared to previous studies [19,25], the levels of S100A8/9 measured in our study were higher, which can be explained by the use of various antibodies to detect different epitopes in different ELISAs. In our commercial assay, an antibody detecting an epitope which is dependent on S100A8/S100A9 heterocomplex formation and calcium binding was used. Nevertheless, this did not affect the comparative study in general. It has previously been demonstrated that the S100A8/9 and S100A12 proteins show decreased levels in the peripheral circulation in response to different anti-inflammatory therapies [16,17]. Consistent with such findings, we have shown in the present study that the conventional treatment of patients with DMARD/GC-naïve early-stage RA reduces serum levels of S100 proteins to the normal levels found in healthy individuals. As expected, patients with very active disease at baseline had higher levels of S100A8/9 and S100A12 proteins that decreased more significantly as the disease improved than did patients with moderate disease activity. Furthermore, an association between both serum S100 proteins in patients with recent-onset RA is in agreement with previous reports on established RA [26,27], which have indicated that S100A8/9 and S100A12 proteins may be coregulated early in the disease process.

In agreement with previous reports on established RA [10-13,15,20,21], we found an association of both S100A8/9 and S100A12 proteins with laboratory and clinical markers of disease activity in patients with recent-onset RA. Interestingly, this association was more pronounced for S100A8/9 than for S100A12. Higher

baseline levels of S100A8/9 predicted decreased CRP levels and improvements in the total number of swollen joints over time. Moreover, decreases in S100A8/9 levels were directly related to clinical and laboratory improvements over time. Multivariate regression analysis revealed that baseline S100A8/9 values were not more predictive of disease activity than traditional biomarkers such as CRP and that they were only marginally acceptable as predictors of baseline disease activity. However, both CRP and S100A8/9 levels were found to be weak predictors for the baseline number of swollen joints. Interestingly, however, changes in the levels of S100A8/9, but not CRP, were associated with changes in the total number of swollen joints over time. It is evident that S100 proteins are extensively produced by activated immune cells of the synovial membrane and synovial fluid in affected joints and pass into the blood circulation [12,13]. Our data support the hypothesis that S100A8/9 protein represents a suitable marker that provides important information about the extent of local inflammation in affected joints, as shown by the strong associations between the decrease in S100A8/9 levels and improvements in swollen joint counts. Although researchers in some studies have found an association between S100 proteins and autoantibodies in patients with RA [15,20,25], we have not confirmed these data, which may be explained by a stronger association with disease activity than with the autoimmune response in the early phase of recent-onset RA. S100A8/9 protein has recently been demonstrated to predict 10-year radiographic progression in patients with established RA [21]. Although our study was not sufficiently long to assess the effect of changes in S100A8/9 levels on the radiographic progression of early RA, it can be suggested that a decrease in serum levels of S100A8/9 over

Table 3 Multiple linear regression models for initial total SJCs and change in SJCs^a

Initial SJCs (n = 43, r ² = 0.260, F = 8.360; P = 0.001) ^b					ΔSJCs (n = 41, r ² = 0.245, F = 13.974; P = 0.001) ^c				
Variables	Parameter estimate	SEM	t-value	P value	Variable	Parameter estimate	SEM	t-value	P value
Intercept	5.093	1.712	2.975	0.005	Intercept	-5.192	1.148	-3.500	0.001
Initial CRP	0.147	0.071	2.067	0.045	ΔS100A8/9	0.001	0.000	3.738	0.001
Initial S100A8/9	0.001	0.000	2.010	0.051	-	-	-	-	-

^aSJCs, swollen joint counts; SEM, standard error of the mean; CRP, C-reactive protein. r² values are adjusted. ^bExcluded predictors are age and initial S100A12. ^cExcluded predictors are age, initial S100A12, initial S100A8/9, initial CRP, ΔS100A12 and ΔCRP.

time, which is associated with improvement in the number of affected joints, might be associated with inhibition of further structural joint damage. This remains to be determined in future studies.

Conclusions

In summary, our data show elevated serum levels of S100 proteins at the onset of RA and a normalisation of S100A8/9 levels in patients who achieved remission shortly after the initiation of conventional treatment. Furthermore, decreases in S100A8/9 rather than CRP levels were associated with improvements in the total number of swollen joints over time. Further studies are needed to determine whether S100A8/9 levels may have a predictive value for further structural damage in patients with recent-onset RA.

Abbreviations

Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibody; CRP: C-reactive protein; DAS28: Disease Activity Score for 28 joints; DMARDs: disease-modifying antirheumatic drugs; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ESR: erythrocyte sedimentation rate; EULAR: European League Against Rheumatism; F: female; GC: glucocorticoid; IgM-RF: IgM rheumatoid factor; M: male; MTX: methotrexate; RA: rheumatoid arthritis; SEM: standard error of the mean; SD: standard deviation; SJC: swollen joints count for 66 joints; TNF: tumour necrosis factor; VAS: visual analogue scale.

Acknowledgements

This study was supported by grant NR 10065-4 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and by Research Project 00023728 of the Ministry of Health of the Czech Republic.

Author details

¹Institute of Rheumatology, First Medical Faculty, Charles University, Na Slupi 4, 128 50 Prague 2, Czech Republic. ²Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University, Salmovská 478/1, 120 00 Prague 2, Czech Republic.

Authors' contributions

LŠ and HM were responsible for the study concept and design. LAC and LP carried out the ELISAs and analysed the data. OP carried out the statistical analysis. LAC, LŠ and OP were responsible for data interpretation and manuscript preparation. JV, LŠ, HM and KP were involved in revising the manuscript and gave their final approval of the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 12 April 2011 Revised: 28 June 2011 Accepted: 26 July 2011
Published: 26 July 2011

References

- Andersson AK, Li C, Brennan FM: **Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:204.
- Huber LC, Distler O, Tarnier I, Gay RE, Gay S, Pap T: **Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2006, **45**:669-675.
- Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS: **Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2004, **43**:906-914.
- Raza K, Breesse M, Nightingale P, Kumar K, Potter T, Carruthers DM, Situnayake D, Gordon C, Buckley CD, Salmon M, Kitas GD: **Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis.** *J Rheumatol* 2005, **32**:231-238.
- Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G: **Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:1731-1736.
- Smolen JS, Aletaha D, Grisar J, Redlich K, Steiner G, Wagner O: **The need for prognosticators in rheumatoid arthritis: biological and clinical markers: where are we now?** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:208.
- Donato R: **Intracellular and extracellular roles of S100 proteins.** *Microsc Res Tech* 2003, **60**:540-551.
- Bianchi ME: **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**:1-5.
- Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J: **S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**:28-37.
- Brun JG, Haga HJ, Bøe E, Kallay I, Lekven C, Berntzen HB, Fagerhol MK: **Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity.** *J Rheumatol* 1992, **19**:859-862.
- Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, Bresnihan B: **Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane.** *J Rheumatol* 1999, **26**:2523-2528.
- Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, Chazin WJ, Nakatani Y, Yui S, Makino H: **The S100A8/9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor κB and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R69.
- Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, Fitzgerald O, Roth J: **Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42**:1383-1389.
- Wulffraat NM, Haas PJ, Frosch M, De Kleer IM, Vogl T, Brinkman DM, Quartier P, Roth J, Kuis W: **Myeloid related protein 8 and 14 secretion reflects phagocyte activation and correlates with disease activity in juvenile idiopathic arthritis treated with autologous stem cell transplantation.** *Ann Rheum Dis* 2003, **62**:236-241.
- Hammer HB, Haavardsholm EA, Kvien TK: **Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol* 2008, **37**:179-182.
- Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, Wulffraat N, Schmeling H, Frosch M, Horneff G, Kuis W, Sorg C, Roth J: **Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:1286-1295.
- Wittkowski H, Foell D, af Klint E, De Rycke L, De Keyser F, Frosch M, Ulfgrén AK, Roth J: **Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1020-1025.
- De Rycke L, Baeten D, Foell D, Kruithof E, Veys EM, Roth J, De Keyser F: **Differential expression and response to anti-TNFα treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis.** *J Pathol* 2005, **206**:17-27.
- Foell D, Wulffraat N, Wedderburn LR, Wittkowski H, Frosch M, Gerss J, Stanevicha V, Mihaylova D, Ferriani V, Tsakalidou FK, Foeldvari I, Cuttica R, Gonzalez B, Ravelli A, Khubchandani R, Oliveira S, Armbrust W, Garay S, Vojinovic J, Norambuena X, Gamir ML, García-Consuegra J, Lepore L, Susic G, Corona F, Dolezalova P, Pistorio A, Martini A, Ruperto N, Roth J, Paediatric Rheumatology International Trials Organization (PRINTO): **Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial.** *JAMA* 2010, **303**:1266-1273.
- Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK: **Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1093-1097.
- Hammer HB, Ødegård S, Syversen SW, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK: **Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:150-154.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K,

- Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, *et al*: **2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:1580-1588.
23. Prevoost ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL: **Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**:44-48.
24. van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL: **Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:1845-1850.
25. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R: **Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:R39.
26. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, Marée R, Meuwis MA, Lutteri L, Chapelle JP, Wehenkel L, Louis E, Merville MP, Malaise M: **Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis.** *Clin Chem* 2008, **54**:1066-1075.
27. Bovin LF, Rieneck K, Workman C, Nielsen H, Sørensen SF, Skjødt H, Florescu A, Brunak S, Bendtzen K: **Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis: discriminative genes and effect of rheumatoid factor.** *Immunol Lett* 2004, **93**:217-226.

doi:10.1186/ar3426

Cite this article as: Andrés Cerezo *et al.*: Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2011 **13**:R122.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.3. Autoprotilátky

4.3.1. Přehledový článek o anti-PM-Scl autoprotilátkách u myozitid

Anti-PM-Scl protilátky patří do skupiny autoprotilátek asociovaných s myozitidou, jejich pozitivita je charakteristická pro překryvný syndrom myozitidy se systémovou sklerózou. Průkaz těchto protilátek je dobrým prognostickým markerem, anti-PM-Scl pozitivní pacienti mají dobrou prognózu onemocnění, které obvykle reaguje na léčbu nízkými až středními dávkami glukokortikoidů.

V tomto přehledovém článku jsme popsali strukturu a funkci PM-Scl antigenu (“exozomu”), metody detekce anti-PM-Scl protilátek a výskyt těchto protilátek u různých systémových onemocnění pojiva.

Tento souborný článek jsem napsala na začátku mého doktorského studia pod vedením mého školitele prof. Jiřího Vencovského.

Později jsem měřila hladiny anti-PM-Scl protilátek u pacientů s myozitidou, protilátkové hladiny korelovaly s aktivitou onemocnění a také s hladinami B Cell activating factor (BAFF). Tyto výsledky jsme prezentovali formou posterů na mezinárodních konferencích a připravujeme je k publikaci.

EULAR 2013, Madrid, Červen 2013

Pleštilová L, Kryštůfková O, Mann H, Hulejová H, Chinoy H, New P, Cooper RG, Charles P, Betteridge ZE, Vencovský J [SAT0197] **B cell activating factor (BAFF) correlates with disease activity and antibody levels in anti-PM-Scl positive patients with idiopathic inflammatory myopathies** Ann Rheum Dis 2013

EULAR 2012, Berlín, Červen 2012

Pleštilova L, Gheorghe K, Lundberg IE, Vincze M, Dankó K, Charles P, Betteridge ZE, McHugh N, Vencovský J. [THU0253] **Anti-PM-Scl autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis.** Ann Rheum Dis 2012;71(Suppl3):240

Anti-PM-Scl protilátky u myositid

Pleštilová L.^{1, 2}, Vencovský J.¹

¹Revmatologický ústav, Praha, ²6. ročník, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Souhrn

Anti-PM-Scl protilátky se nejčastěji vyskytují u pacientů s překryvným syndromem polymyositidy a systémové sklerózy (31%), vzácněji při samotné myositidě (8–11%), nebo systémové skleróze (2%). Jejich průkaz bývá spojen s lepší prognózou onemocnění, které obvykle dobře reaguje na léčbu nízkými až středními dávkami glukokortikoidů. PM-Scl autoantigenem je "lidský exozóm", makromolekulární komplex 11–16 polypeptidů, který se v buněčném jadérku účastní štěpení prekurzorové rRNA a v cytoplasmě pomáhá degradovat zralou mRNA. Primární protilátková reakce proti PM-Scl komplexu je namířena proti PM-Scl-100 proteinu, jehož hlavním epitopem je PM1- α peptid.

Klíčová slova: myositida, systémová skleróza, exozóm, anti-PM-Scl, PM1- α

Summary

Pleštilová L., Vencovský J.: Anti-PM-Scl antibodies in myositis

Anti-PM-Scl antibodies are most frequently found in patients with overlap syndrome of polymyositis and systemic sclerosis (31%), less frequently in myositis alone (8–11%), or systemic sclerosis (2%). Detection of these antibodies is associated with better outcome of the disease, which usually responds well to the treatment with low- to medium-dose glucocorticoids. The "human exosome" is a PM-Scl autoantigen, a macromolecular complex of 11–16 polypeptides, which is involved in the degradation of precursor rRNA in the nucleolus and in the degradation of mature mRNA in the cytoplasm. Antibody response against the PM-Scl complex is primarily targeted against the PM-Scl-100 protein, the main epitope of which is PM1- α peptide.

Key words: myositis, systemic sclerosis, exosome, anti-PM-Scl, PM1- α

Čes. Revmatol., 17, 2009, No. 4, p. 200–204.

ÚVOD

Myositidy jsou získaná zánětlivá onemocnění příčně pruhovaných svalů. Projevují se svalovou slabostí, zvýšenou hladinou svalových enzymů a charakteristickými elektromyografickými změnami. V biopsii svalové tkáně je obvykle zjištěn mononukleární zánětlivý infiltrát (1). Základní klinická klasifikace rozlišuje dermatomyositidu (DM), polymyositidu (PM), myositidu s inkluzními tělísky (IBM), juvenilní dermatomyositidu a PM/DM asociovanou s malignitou nebo s jinou chorobou pojivové tkáně (2).

Nejčastější je asociace PM/DM se systémovou sklerózou (Scl). Anglický termín „overlap syndrome“ popisuje podle některých autorů prostou asociaci PM/DM s další nemocí pojivové tkáně, podle jiných jde o sdílení některých klinických znaků (sklerotické ztluštění dermis, hypomotilita jícnu, mikroangiopatie) možné pouze mezi DM a Scl (3).

Imunopatogeneze myositid

Dermatomyositida je převážně protilátkově zprostředkované onemocnění, předpokládá se existence humorální imunity namířené proti endotelu endomysialních kapilár, které aktivují komplement. Útočné složky komplementu (membránu atakující komplex – MAC) se poté ukládají ve svalových kapilárách. Zbývající kapiláry se kompen-

zatorně dilatují, přesto dochází k perifascikulární atrofii svalových vláken. Aktivace komplementu vede zároveň k uvolnění cytokinů zvyšujících expresi adhezivních molekul (VCAM-1, ICAM-1) endotelovými buňkami. Do perimysia a endomysia pak mohou vstoupit CD4+ T buňky a makrofágy (2, 3).

Polymyositida je převážně buněčně zprostředkovaná, v endomysiu se nacházejí klonálně expandované CD8+ T buňky pronikající do non-nekrotických svalových vláken. T lymfocyty se na myocyty váží přes četné MHC molekuly I. třídy, které jinak zdravý sval exprimuje zcela minimálně (3).

V infiltrátu u myositidy s inkluzními tělísky také převládají CD8+ T buňky, ale vzhledem k existenci inkluzních tělísek, chybějící reakci na léčbu glukokortikoidy a k vyššímu věku nemocných se předpokládá degenerativní etiologie se sekundární imunitní reakcí (2).

Autoprotilátky u myositid

Dle citlivosti použitých metod lze autoprottilátky prokázat u 56 % až 80 % pacientů s idiopatickou zánětlivou myopatií (1, 4). K autoprottilátkám specifickým pro myositidu patří anti-Jo-1 (15–25 %) a jiné antisyntetázové protilátky (např. anti-PL-7, anti-PL-12, anti-KS, anti-OJ) (3–5 %), anti-Mi-2 (6–14 %) a anti-SRP (2–5 %) (1, 4).

Jo-1 autoantigen je histidyl-tRNA syntetáza, Mi-2 autoantigen se účastní remodelace chroma-

tinu a tím spolureguluje transkripci a SRP (signal recognition particle) způsobuje kotranslační translokaci proteinů na membránu ER (1).

Autoprotilátky asociované s myositidou se vyskytují i u dalších revmatických nemocí bez systémových známek myositidy. Jsou to anti-Ro52 (25–30%), anti-Ro60 (4–11 %), anti-La (5–14 %), anti-U1 RNP (6–15 %), anti-Mas (2 %), anti-PM-Scl a další (1,4).

Autoantigen Ro52 (SSA) je zřejmě E3 ubiquitinová ligáza zapojená do transkripce RNA a tvorby IL-2 (5). Autoantigeny Ro60 a La jsou součástí Ro-ribonukleoproteinového komplexu (RNP), který se účastní transkripce RNA. Přesná funkce tohoto komplexu zůstává nejasná, uvažuje se o úloze chaperonu pro RNA, kontrole kvality transkriptů a ochraně transkriptů před 3'-exonukleolytickou degradací (6). Autoantigen U1 RNP se nachází v buněčném jádře a je zapojen do štěpení pre-mRNA. Mas je protein vázající t-RNA (1) a autoantigen PM-Scl bude podrobněji probrán v dalším textu.

K některým autoprotilátkám se váží určité klinické příznaky, například anti-Jo-1 bývají častěji spojené s intersticiální plicní fibrózou. Pomocí autoprotilátek lze také předvídat odpověď na léčbu. Anti-Ro pozitivní pacienti dobře odpovídají na samotný prednison, zatímco u anti-Jo1 pozitivních pacientů bývá většinou nutné podávat další imunosupresiva (např. azathioprin, methotrexat) (4,7).

Anti-PM-Scl protilátky

Anti-PM/Scl protilátky se vyskytují u 31 % pacientů s překryvným syndromem polymyositidy a systémové sklerózy. U pacientů se samotnou polymyositidou jsou anti-PM-Scl protilátky přítomné v 8%, u pacientů s dermatomyositidou v 11 % a u pacientů se systémovou sklerózou ve 2 %. Výjimečně byly anti-PM-Scl protilátky zachyceny u pacientů s myositidou s inkluzními tělísky, Sjögrenovým syndromem, SLE a se získanou hemofilii (8).

Nejčastější symptomy asociované s anti-PM-Scl protilátkami jsou myositida, Raynaudův fenomén a artritida (tab. 1). Pacienti s anti-PM-Scl protilátkami obvykle dobře reagují na léčbu nízkými až středními dávkami glukokortikoidů (8, 10).

Anti-PM/Scl protilátky častěji vznikají u lidí s určitými alelami MHC (HLA-DRB1*0301, HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*02), zatímco jiné MHC alely působí proti jejich vzniku protektivně (HLA-DRB1*15/*16, HLA-DQA1*0101). Je možné, že HLA polymorfismus způsobuje různost imunitní odpovědi subjektů na podněty z okolí, snad se liší i mechanismus vzniku protilátek u jednotlivých HLA haplotypů (11). K této domněnce přispívá i pozorování u 275 japonských pacientů se systémovou sklerózou, u kterých nebyly anti-PM-Scl

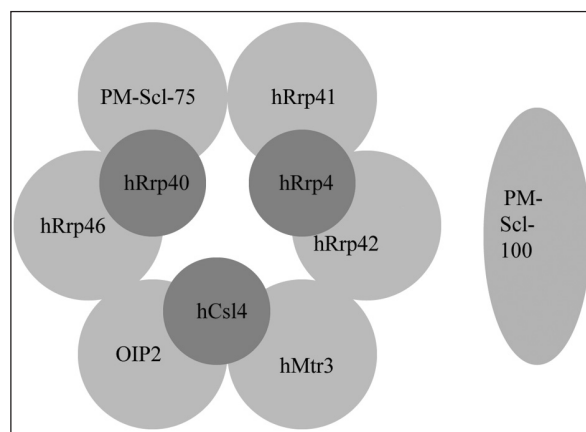
protilátky nalezeny vůbec (8). V Japonsku je naopak nejčastější protilátkou při překryvném syndromu mezi PM a Scl protilátka anti-Ku (12).

PM-Scl autoantigen

PM-Scl autoantigen je makromolekulární komplex 11 až 16 polypeptidů s molekulárními hmotnostmi v rozmezí 20 až 110 kDa (obr. 1) (13). Analogické komplexy byly nalezeny u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a u *E. coli* a pojmenovány „exozóm“ (14).

Jádrový komplex exozómu je tvořen devíti proteiny. Vypadá jako prsten ze šesti proteinů s RNázovou aktivitou (PM-Scl-75, hRrp42, hRrp46, hRrp41, hMtr3, OIP2), na kterých leží tři proteiny schopné vázat RNA (hRrp4, hCsl4, hRrp40) (obr. 1).

Při určitých buněčných dějích nebo v určité lokalizaci se k jádrovému komplexu exozómu váže ještě několik dalších proteinů, například PM-Scl-100 v buněčném jádru (8).



Obr. 1. PM-Scl komplex (lidský exozóm) je tvořen prstencem ze šesti proteinů s RNázovou aktivitou (PM-Scl-75, hRrp42, hRrp46, hRrp41, hMtr3, OIP2), na kterých leží tři proteiny schopné vázat RNA (hRrp4, hCsl4, hRrp40). K jádrovému komplexu exozómu se mohou připojovat další proteiny, např. PM-Scl100 (upraveno dle (8)).

Funkce lidského exozómu

Zdá se, že existují dva různé typy exozómů s odlišnou strukturou, umístěním v buňce a funkcí.

První typ se nachází v buněčném jádru, méně již v jádře, a jednou z jeho složek je PM-Scl-100. V jádru se formují ribozómy z jednotlivých rRNA (5S, 5,8S, 18S, 25S) a proteinů. Tři z těchto rRNA jsou transkribovány jako 35S prekurzorová rRNA, kterou exozóm pomáhá rozštěpit na jednotlivé dílky. Přes úpravu malé jaderné RNA (small nuclear RNA – snRNA) pomáhá jaderný exozóm štěpit i prekurzorovou mRNA.

Druhý typ exozómu se nachází v cytoplazmě, je vzácnější a chybí mu PM-Scl-100 protein. Účastní se degradace zralé cytoplazmatické mRNA (14).

Antigenicita jednotlivých složek exozómu

Jednotlivé proteiny lidského exozómu jsou různě silným terčem protilátkové odpovědi. Proti PM-Scl-100 proteinu tvoří protilátky téměř všichni anti-PM-Scl pozitivní pacienti. Na PM-Scl-75 protein reaguje 50–60 % anti-PM-Scl pozitivních pacientů, ale jeho nová izoforma PM/Scl-75c je antigenitou srovnatelná s PM-Scl-100. Proti ostatním složkám exozómu je reaktivita nižší, pacienti, kteří na ně reagují, reagují vždy i na PM-Scl-100 nebo na PM-Scl-75 (tab. 2) (13).

Jedno z možných vysvětlení nabízí teorie šíření epitopů („epitope spreading“), kdy by PM-Scl-100 byl prvotním autoantigenem a imunitní odpověď by se postupně rozšiřovala na další součásti exozómu (15). To je ostatně poměrně častý jev a projevuje se podobně v případě anti-nRNP/Sm a anti Ro/La protilátek, protože peptidy jsou umístěny na společné struktuře. Autoantigenem se PM-Scl-100 stane nejspíše modifikací (fosforylace, defosforylace, štěpení kaspázami) v umírající buňce. Modifikovaný antigen může být translokován na buněčný povrch, uniknout do intersticia nebo je se zbytky mrtvých buněk fagocytován antigen prezentujícími buňkami, které jej přes MHC II vystaví T buňkám (16).

Tab. 1. Nejčastější klinické projevy překryvného syndromu spojené s přítomností anti-PM-Scl protilátek (9).

Klinický projev	% pacientů
Raynaudův fenomén	100
Artritida/artralgie	97
Myozitida	88
Plicní fibróza	78
Sklerodaktylie	97
Sjögrenův syndrom	34
Dermatomyozitická vyrážka	38
Dysfagie	78
Kalcinóza	47

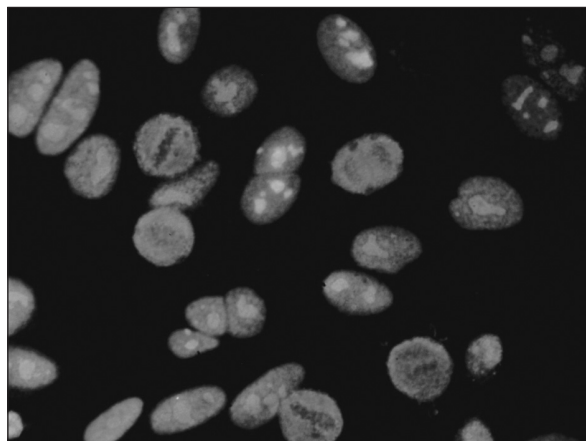
Tab. 2. Antigenicita jednotlivých proteinů lidského exozómu (data převzata z (8)).

Proteiny exozómu	Antigenicita *
PM-Scl-100 (101 kD)	70-80%
PM-Scl-75 (47 kD)	46-80%
hRrp4 (33 kD)	50%
hRrp42 (32 kD)	21%
hRrp46 (25 kD)	18%
hCsl4 (21 kD)	14%
hRrp41 (26 kD)	10%
hRrp40 (29 kD)	7%

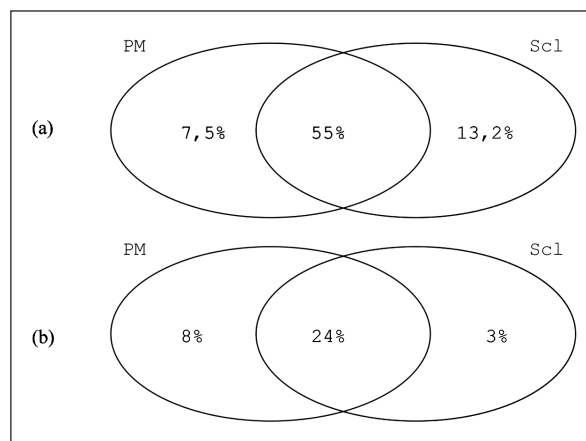
*Antigenicita = procento pacientů reagujících proti jednotlivým proteinům PM-Scl komplexu

Metody užívané k průkazu anti-PM-Scl protilátek

Pro průkaz anti-PM-Scl protilátek byly použity různé metody: nepřímá imunofluorescence



Obr. 2. Anti-Pm-Scl produkují homogenní jadérovou fluorescenci na Hep-2 buňkách při nepřímé imunofluorescenci. Mírnou jemně granulární fluorescenci vykazují také jádra. V dělicích se buňkách jsou v metafázi chromozomy negativní a nebarví se ani NOR (nucleolar organising region), na rozdíl chomáčkovitě nebo skvrnitě nukleolární fluorescence způsobené protilátkami proti fibrilarinu či RNA polymeráze, kde bývají další doprovodné změny v dělicích se buňkách.



Obr. 3. Reaktivita na PM1-α (a) a na PM-Scl-100 (b) u pacientů s polymyozitidou (PM), systémovou sklerózou (Scl) a s překryvným syndromem PM/Scl (data převzata z (6, 17)).

na Hep-2 buňkách (obr. 2), imunodifuze s extraktem z telecích brzlíků, imunoblot s extrahovatelnými jadernými antigeny (detekce anti-PM-Scl Ig touto metodou je obtížná pro slabou reaktivitu) a imunoprecipitace z extraktu radioaktivně značených buněk.

Dnes se pro diagnostiku anti-PM-Scl protilátek nejčastěji používají metody ELISA s rekombinantním PM-Scl proteinem exprimovaným E. coli nebo buňkami hmyzu, enzymový line-blot assay, případně další assaye (imunodot, ALBIA, proteinový čip) (8, 10).

Obecně se soudí, že pro ELISu je ideálním antigenem krátký syntetický peptid – nejlépe hlavní epitop, který je možno syntetizovat nezávisle na biologických systémech a jehož kvalita proto nekolísa. Krátký peptid snižuje pravděpodobnost ne-

specifických interakcí mezi složkami séra a proteinem, v dlouhém proteinu se epitop může někdy „schovat“. Při malé velikosti jamek používaných při metodě ELISA může být podstatná i vysoká koncentrace epitopů na plochu, jíž lze s krátkými peptidy dosáhnout (10, 14).

PM1- α epitop

Snahou tedy bylo nalézt hlavní epitop u nejčastějšího antigenního terče lidského exozómu - PM-Scl-100 proteinu.

Testování odpovědí anti-PM-Scl pozitivních sér na fragmenty rekombinantního PM-Scl-100 proteinu určilo polohu hlavního epitopu v N-terminální třetině PM-Scl-100 proteinu (AK 231-245). Mutační analýza poté odhalila aminokyseliny 234, 237, 240 a 241 jako nejdůležitější vazebná místa protilátek. Hlavní epitop byl pojmenován "PM1- α " podle sekundární struktury α -helixu, kterou zaujímá. Sekvence aminokyselin PM1- α peptidu je LDVPPALADFIHQQR (13, 17, 18).

Anti-PM1- α protilátky

Protilátky proti epitopu PM1-a byly metodou ELISA prokázány u 7,5 % pacientů s polymyositidou, 13,2 % pacientů se systémovou sklerózou, u 55 % pacientů s PM/Scl překryvným syndromem a u 1,7 % kontrol (obr. 3a) (10).

Reaktivita na PM1- α je tedy vyšší než na PM-Scl-100, kdy odpovídá 8 % pacientů s myositidou, 3 % pacientů se systémovou sklerózou a 24 % pacientů s překryvným syndromem PM/Scl (obr. 3b) (17).

Zajímavý je nerovnoměrný nárůst odpovědi mezi jednotlivými skupinami pacientů při použití PM-Scl-100 proteinu a PM1- α peptidu. Zatímco pacienti s PM-Scl překryvným syndromem reagují na PM1- α přibližně dvakrát častěji než na PM-Scl-100 (24 % \rightarrow 55 %) a pacienti se systémovou sklerózou dokonce čtyřikrát častěji (3 % \rightarrow 13,2 %), u pacientů s polymyositidou vidíme mírný pokles odpovědi (8% \rightarrow 7,5 %) (obr. 3). Zdá se, že anti-PM-1- α protilátky se vyskytují častěji u nemocných, kteří mají nějaké známky sklerodermie.

Michal Mahler et al. testovali 81 vzorků (pacienti s PM, DM, Scl, PM/Scl, melanomem a kontroly) na přítomnost protilátek proti rekombinantním PM-Scl proteinům a proti PM1- α peptidu. Všechna séra reagující s PM-Scl-100 nebo s PM-Scl-75 reagovala i s PM1- α . Ve skupině pacientů s překryvným syndromem PM/Scl (n = 32) reagovalo 27,8 % vzorků s PM1- α peptidem, aniž by byla prokázána reakce s jakýmkoliv z rekombinantních proteinů. V několika případech byla zjištěna přítomnost anti-PM1- α protilátek u pacientů s HCV, SLE nebo s maligním melanomem (13).

Je PM-Scl-75 hlavním antigenem u Scl?

Zcela nově se objevil názor, že u pacientů se systémovou sklerózou je hlavním autoantigenem protein PM-Scl-75. Hanke et al. testovali 280 sér pacientů se systémovou sklerózou plus různé kontroly na přítomnost anti-PM-Scl-100 a anti-PM-Scl-75 protilátek metodou LIA (line immunoblot assay) a v jejich souboru tvořilo anti-PM-Scl-75 protilátky 10,4 % pacientů se systémovou sklerózou, zatímco anti-PM-Scl-100 protilátky pouze 7,1 % pacientů.

Prevalence jednotlivých protilátek se navíc lišila podle druhu nemoci. Pacienti s difúzní sklerodermií tvořili v 19,8 % anti-PM-Scl protilátky, a to převážně proti PM-Scl-75 proteinu. U pacientů s překryvným syndromem byl výskyt anti-PM-Scl protilátek zaznamenán v 17,6 %, a to proti PM-Scl-100 i PM-Scl-75 proteinu. U pacientů s limitovanou systémovou sklerózou byly anti-PM-Scl protilátky nalezeny pouze ve 3,5 %.

Hanke et al. tedy soudí, že při testování pouze na přítomnost anti-PM-Scl-100 protilátek by velká část pacientů se systémovou sklerózou zůstala nepoznána (19). Mahler však poukazuje na metodické nepřesnosti studie, například na nevhodně zvolené parametry svalového postižení (CK a svalová atrofie namísto EMG a biopsie) a na nedostatečný popis použitého rekombinantního PM-Scl-100 antigenu (20).

ZÁVĚR

Anti-PM-Scl protilátky jsou charakteristickým sérologickým znakem pacientů s PM/Scl překryvným syndromem.

Anti-PM-Scl pozitivní pacienti mají oproti dalším pacientům s myositidou nebo se systémovou sklerózou lepší prognózu a obvykle dobře reagují na léčbu nízkými až středními dávkami kortikosteroidů.

Primární protilátková reakce proti lidskému exozómu je namířena proti PM-Scl-100 antigenu, jehož hlavním epitopem je PM1- α . Zdá se, že ELISA s tímto peptidem je zatím nejcitlivější metodou pro stanovení anti-PM-Scl protilátek. Toto vyšetření je užitečné při diagnostice myositid, může pomoci při výběru vhodné léčby a při odhadu prognózy. Úloha anti-PM-Scl protilátek v imunopatogenezi myositid však zatím zůstává neznámá.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry Ministerstva zdravotnictví ČR č. 00000023728.

LITERATURA

1. Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A, et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:116-23.

2. Vencovský J. Diferenciální diagnostika a léčba idiopatických zánětlivých myopatií. *Interní medicína pro praxi* 2005;11:480-483
3. Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003;362(9388):971-82.
4. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Senécal JL. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R78.
5. Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:415-21.
6. Belisova A, Semrad K, Mayer O, Kocian G, Waigmann E, Schroeder R, et al. RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs. *RNA* 2005;11:1084-94.31.
7. Seiberlich B, Hunzelmann N, Roers A, Weber M, Schulze-Lohoff E. Das Jo-1-Syndrom und seine klinischen Manifestationen. *Medizinische Klinik* 2005;100:137-142
8. Mahler M, Raijmakers R. Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev* 2007;6:432-7.
9. Marguerie C, Bunn CC, Copier J, Bernstein RM, Gilroy JM, Black CM, et al. The clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to the nucleolar antigen PM-Scl. *Medicine (Baltimore)* 1992;71:327-36.
10. Mahler M, Fritzler MJ. PM1-Alpha ELISA: the assay of choice for the detection of anti-PM/Scl autoantibodies? *Autoimmun Rev* 2009;8:373-8.
11. O'Hanlon TP, Carrick DM, Targoff IN, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, et al. Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQA1 allelic profiles distinguish European American patients with different myositis autoantibodies. *Medicine (Baltimore)* 2006;85:111-27.
12. Jury EC, D'Cruz D, Morrow WJ. Autoantibodies and overlap syndromes in autoimmune rheumatic disease. *J Clin Pathol* 2001;54:340-7.
13. Mahler M, Raijmakers R, Dähnrich C, Blüthner M, Fritzler MJ. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R704-13.
14. Brouwer R, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma. *Arthritis Res* 2001;3:102-6.
15. Brouwer R, Vree Egberts WT, Hengstman GJ, Raijmakers R, van Engelen BG, Seelig HP, et al. Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome. *Arthritis Res* 2002;4:134-8.
16. Rodenburg RJ, Raats JM, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays* 2000;22(7):627-36.
17. Mahler M, Blüthner M, Pollard KM. Advances in B-cell epitope analysis of autoantigens in connective tissue diseases. *Clin Immunol* 2003;107(2):65-79.
18. Blüthner M, Mahler M, Müller DB, Dünzl H, Bautz FA. Identification of an alpha-helical epitope region on the PM/Scl-100 autoantigen with structural homology to a region on the heterochromatin p25beta autoantigen using immobilized overlapping synthetic peptides. *J Mol Med* 2000;78(1):47-54.
19. Hanke K, Brückner CS, Dähnrich C, Huscher D, Komorowski L, Meyer W, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2009;11(1):R22.
20. Mahler M, Fritzler MJ. The changing landscape of the clinical value of the PM/Scl autoantibody system. *Arthritis Res Ther* 2009;11(2):106.

*Prof. MUDr. J. Vencovský
Rheumatologický ústav
Na Slupi 4
128 50 Praha 2*

4.3.2. Autoprotilátky ovlivňují incidenci artritidy při idiopatické myozitidě

Artritida je častým doprovodným příznakem myozitidy [205], tato studie měla doplnit chybějící komplexní data o výskytu artritidy u neselektované kohorty pacientů s myozitidou. Celkem bylo na přítomnost artritidy vyšetřeno 106 pacientů s myozitidou. U 29% pacientů byla artritida přítomná v okamžiku vyšetření (cross-sectional), 53% pacientů mělo artritidu někdy v průběhu onemocnění a u 22% pacientů se příznaky artritidy objevily před prvními známkami myozitidy. Nejčastěji se jednalo o symetrickou neerozivní polyartitidu postihující zápěstí a drobné klouby na ruce, což zejména při zprvu chybějícím svalovém postižení může vést k chybné diagnóze revmatoidní artritidy. Naše studie potvrdila známou asociaci artritidy s přítomností antisynthetázových protilátek anti-Jo-1, žádné jiné významné protilátkové asociace jsme nenašli. Všech devět pacientů s pozitivitou revmatoidního faktoru a dva pacienti s ACPA protilátkami měli příznaky artritidy, diagnostická kritéria revmatoidní artritidy splňoval však pouze jeden pacient.

Tato studie popisuje artritidu jako častý, obvykle však ne příliš závažný příznak myozitidy, na který je třeba v klinické praxi pamatovat, protože může předcházet svalové postižení a ztěžovat tak správnou diagnózu myozitidy.

Na této práci jsem se podílela detekcí autoprotilátek v séru pacientů metodou radioimunoprecipitace, zpracovávala jsem také výsledky dalších metod (nepřímá imunofluorescence, line immunoassay a Western blot) pro potřeby studie.

Arthritis in Idiopathic Inflammatory Myopathy: Clinical Features and Autoantibody Associations

Martin Klein, Herman Mann, Lenka Plestilová, Zoe Betteridge, Neil McHugh, Martina Remáková, Peter Novota and Jirí Vencovský

J Rheumatol 2014;41;1133-1139
<http://www.jrheum.org/content/41/6/1133>

1. Sign up for our monthly e-table of contents
<http://www.jrheum.org/cgi/alerts/etoc>
2. Information on Subscriptions
<http://jrheum.com/subscribe.html>
3. Have us contact your library about access options
Refer_your_library@jrheum.com
4. Information on permissions/orders of reprints
<http://jrheum.com/reprints.html>

The Journal of Rheumatology is a monthly international serial edited by Earl D. Silverman featuring research articles on clinical subjects from scientists working in rheumatology and related fields.

Arthritis in Idiopathic Inflammatory Myopathy: Clinical Features and Autoantibody Associations

Martin Klein, Heřman Mann, Lenka Pleštilová, Zoe Betteridge, Neil McHugh, Martina Remáková, Peter Novota, and Jiří Vencovský

ABSTRACT. Objective. To determine the prevalence, distribution, and clinical manifestations of arthritis in a cohort of patients with idiopathic inflammatory myopathies (IIM). Associations with autoantibody status and HLA genetic background were also explored.

Methods. Consecutive patients with IIM treated in a single center were included in this cross-sectional study (n = 106). History of arthritis, 68-joint and 66-joint tender and swollen joint index, clinical features of IIM, and autoantibody profiles were obtained by clinical examination, personal interview, and review of patient records. High-resolution genotyping in HLA-DRB1 and HLA-DQB1 loci was performed in 71 and 73 patients, respectively.

Results. A combination of patients' medical history and cross-sectional physical examination revealed that arthritis at any time during the disease course had occurred in 56 patients (53%). It was present at the beginning of the disease in 39 patients (37%) including 23 cases (22%) with arthritis preceding the onset of muscle weakness. On physical examination, 29% of patients had at least 1 swollen joint. The most frequently affected areas were wrists, and metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints. Twenty-seven out of the 29 anti-Jo1-positive patients had arthritis at any time during the course of their illness; this prevalence was significantly higher compared to patients without the anti-Jo1 autoantibody (p < 0.0001). No association of arthritis with individual HLA alleles was found.

Conclusion. Our data suggest that arthritis is a common feature of myositis. It is frequently present at the onset of disease and it may even precede muscular manifestations of IIM. The most common presentation is a symmetrical, nonerosive polyarthritis affecting particularly the wrists, shoulders, and small joints of the hands. We have confirmed a strong association of arthritis with the presence of the anti-Jo1 antibody. (First Release May 1 2014; J Rheumatol 2014;41:1133–9; doi:10.3899/jrheum.131223)

Key Indexing Terms:

IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES

ARTHRITIS

AUTOANTIBODIES

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) represent a group of systemic autoimmune disorders characterized by a nonsuppurative inflammation of skeletal muscles as the major manifestation. Distinct subgroups of IIM with variable clinical and laboratory manifestations are recognized, such as polymyositis (PM), dermatomyositis (DM), juvenile dermatomyositis, cancer-associated myositis,

immune-mediated necrotizing myopathy, and inclusion body myositis (IBM).

Arthritis is commonly seen in patients with IIM; however, comprehensive data on its presentation and on manifestations in individual myositis subgroups are scarce¹. Arthritis is particularly frequent in patients with autoantibodies directed against tRNA synthetases as part of the antisynthetase syndrome^{2,3,4,5,6}, but it is not limited to this subgroup^{7,8}. Arthritis and/or arthralgias were reported in 33% of patients with IIM in a large multicenter Japanese cohort used for a formulation of new classification criteria, in which arthritis was included⁹. Other available information originates from case reports^{10,11,12,13} or small cohorts selectively defined by the presence of a specific autoantibody or antisynthetase syndrome^{5,14,15,16}. Arthritis in patients with IIM is considered less severe and less destructive when compared to the joint involvement in rheumatoid arthritis (RA), but the few available reports provide conflicting results on this aspect^{5,9,10,11,12,13,14,15,16}. The degree of reported joint involvement in myositis varies from nonerosive arthritis¹² and subluxing arthropathy⁵ to erosive and destructive arthritis^{10,13,14}.

From the Institute of Rheumatology, and the Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; and the Royal National Hospital for Rheumatic Diseases, Bath, UK.

Supported by the Project for Conceptual Development of Research organization (Ministry of Health, Czech Republic), grant 00023728.

M. Klein, MD; H. Mann, MD; L. Pleštilová, MD, Institute of Rheumatology, and the Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; Z. Betteridge, PhD; N. McHugh, MD, Professor, Royal National Hospital for Rheumatic Diseases; M. Remáková, MSc, Institute of Rheumatology, and the Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; P. Novota, Dr, Institute of Rheumatology; J. Vencovský, MD, Professor, Institute of Rheumatology, and the Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

Address correspondence to Dr. J. Vencovský, Institute of Rheumatology, Na Šlupí 4, 12850 Prague 2, Czech Republic. E-mail: vencovsky@revma.cz

Accepted for publication February 27, 2014.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2014. All rights reserved.

The aim of our study was to provide comprehensive data regarding joint involvement in unselected patients with IIM from a single center. Specifically, we determined the prevalence of arthritis in patients with IIM, its relation to the course of the muscle disease, characteristics of arthritis such as distribution and extent, as well as its association with autoantibody profiles and HLA allelic polymorphisms.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls. All patients with IIM fulfilling diagnostic criteria seen both at the outpatient and inpatient departments of the Institute of Rheumatology between January and September 2012 were recruited into the study. The diagnosis of PM and DM was based on the criteria of Bohan and Peter^{17,18}, necrotizing myopathy and amyopathic DM were diagnosed using the European Neuromuscular Centre Workshop (ENMC) criteria¹⁹, and the diagnosis of IBM was established using the Griggs criteria²⁰. All patients had a muscle biopsy performed during the course of their disease; however, the full description of the findings required for classification according to the ENMC criteria was available only for the 76 biopsies performed after 2004. The control group for the genetic substudy consisted of 179 healthy subjects. The study was approved by the ethics committee at the Institute of Rheumatology and all patients gave informed consent.

Clinical data. Basic demographic and clinical data including the history of IIM onset, disease course, smoking history, and presence of lung involvement (defined as a presence of active alveolitis or fibrotic changes on radiograph or high-resolution computed tomography scan, and/or DLCO < 70%) were obtained from all patients. Information regarding presence or absence of arthritis in the past and/or at the current time with respect to the onset, localization, and symmetry as well as other features of joint involvement such as presence of joint deformities ("floppy thumb") was obtained during personal interviews with patients and/or from medical records. Activity of arthritis and the degree of joint involvement were assessed by both patients and physicians using visual analog scales (VAS). A semiquantitative scale was used to evaluate the severity of joint involvement as a proportion of total morbidity. History of arthritis was established if the patient during personal interview reported having at least 1 painful and swollen joint in the past or if the presence of inflammatory arthritis detected by an experienced rheumatologist was recorded in the medical records. Current arthritis was defined as a presence of at least 1 swollen joint on physical examination using the 68/66-joint count. Radiographs of the joints of hands and/or feet were available from 47 patients.

Autoantibodies. Autoantibody profiles of patients with IIM were determined during routine diagnostic examination using indirect immunofluorescence to screen for antinuclear antibodies (ANA) and anti-dsDNA (Immuno Concepts), line immunoassay (Imtec Human), and Western blot-myositis (Euroimmun) for detection of individual autoantibodies directed against Jo-1, Mi-2, Ku, PM-Scl, PM-Scl75, PM-Scl100, PL-7, PL-12, EJ, OJ, SRP, Ro, Ro52, La, Scl-70, and U1-RNP antigens. In-house-made 35S radioimmuno-precipitation²¹ was used to confirm the results and to detect autoantibodies not identified using commercial assays [against: transcriptional intermediary factor 1- γ (TIF1- γ), MDA5, NXP2, Zo, EIF, RNAP I (RNA polymerase antibodies), RNAP II, and RNAP III]. Rheumatoid factors (RF) were detected using a particle-agglutination assay (Fujirebio Inc.), and an ELISA test for anticyclic citrullinated peptide (anti-CCP; TestLine Clinical Diagnostics) was used to detect anticitrullinated protein antibodies (ACPA).

HLA typing. Allelic polymorphism of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes was analyzed by DNA-based typing using commercial sets (OneLambda) according to manufacturer's instructions.

Statistics. Demographics, clinical characteristics, and results are presented as descriptive statistics. The continuous not-normally distributed variables

were analyzed by Mann-Whitney test; categorical data were analyzed by Fisher's exact test having p values estimated by Monte Carlo simulations (n = 10,000), and Kaplan-Meier estimator was used for calculation of survival analysis of arthritis. The significance of differences in allele and gene frequencies was evaluated by Fisher's exact test. We used GraphPad Prism 5 (GraphPad Software), QuickCalcs online calculator (graph-pad.com), and R (r-project.org) for statistical analyses. P values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Demographic and clinical data of patients. In total, 106 patients with IIM were included in the study. Basic demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1.

Prevalence and characteristics of joint involvement. Combining patients' medical history and cross-sectional physical examination revealed that arthritis at any time during the disease course had occurred in 56 patients (52.8%; Table 2). Thirty-nine patients (36.8%) had arthritis at disease onset.

Thirty-one patients (29.2%) presented with at least 1 swollen joint at the time of cross-sectional evaluation. Nine additional patients had only joint tenderness, with no swelling. We did not find any difference in the prevalence of arthritis among individual IIM subgroups.

Table 1. Demographic and basic clinical data.

Patients, n	106
Sex; male/female	32/74
Age, yrs	
Mean \pm SD	55.6 \pm 14.1
Median (95% CI)	59 (52.8–58.3)
Diagnosis ^a	PM = 46 [†] (43.4%)
	Definite/probable/possible 26/11/9
	DM = 40 ^{§‡} (37.7%)
	Definite/probable/possible 35/3/2
	CAM = 8 (7.5%)
	IMNM = 11 (7.5%)
	IBM = 1 (0.9%)
Disease duration, yrs ^b	
Whole group	6.1 \pm 6.3 (4.4, 4.9–7.3)
Arthritis patients	6.8 \pm 5.7 (5.0, 5.3–8.3)*
Nonarthritis patients	5.3 \pm 6.8 (3.0, 3.3–7.2)*
Lung involvement	37 (34.9%)
Ever smokers	40 (37.7%)

^a Muscle biopsy evaluable according to the ENMC criteria was available in 76 patients: 25 patients satisfied biopsy criteria for PM, 28 for DM, 11 for IMNM, 1 for IBM; 9 biopsies did not have typical changes, and 2 were nonclassifiable, with significant pathologies, but not consistent with a single diagnostic category¹⁹. [†] Including 5 patients with overlap syndromes: 3 systemic sclerosis (SSc), 1 Sjögren syndrome (SS), and 1 rheumatoid arthritis. [§] Including 1 patient with clinically amyopathic dermatomyositis. [‡] Including 3 patients with overlap syndromes: 2 SSc and 1 SS. ^b Shown as mean \pm SD (median, 95% CI). * A significant difference was found between disease duration in arthritis and nonarthritis patients (p = 0.04). ENMC: European Neuromuscular Centre Workshop; PM: polymyositis; DM: dermatomyositis; CAM: cancer-associated myositis; IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy; IBM: inclusion body myositis.

Table 2. Arthritis in myositis subtypes. Data are n (%).

Diagnosis	Arthritis at Any Time*	Arthritis at Disease Onset**	Current Arthritis# (≥ 1 swollen joint)
PM (46)	27 (59)	19 (41)	17 (40)
DM (40)	22 (55)	15 (38)	11 (28)
CAM (8)	2 (25)	1 (13)	0 (0)
IMNM (11)	4 (36)	1 (13)	2 (18)
IBM (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Total (106)	56 (53)	39 (37)	31 (29)

*Combination of patient history and clinical examination; ** Based on patient history; # Arthritis present at the time of evaluation. PM: polymyositis; DM: dermatomyositis; CAM: cancer associated myositis; IMNM: immune mediated necrotizing myopathy; IBM: inclusion body myositis.

Probability of arthritis development. Patients with arthritis had significantly longer disease duration than those without arthritis ($p = 0.04$; Table 1). Patients who did not have arthritis at disease onset have a 65.6% (95% CI 57.1–75.2) overall probability of its future development and this probability gradually decreases to 33.9% (95% CI 23.6–48.7) after 10 arthritis-free years (Figure 1). Thus, the probability of having arthritis increases with the disease duration up to 66.1% (95% CI 51.3–76.4) after 10 years.

Arthritis at disease onset. Out of the 39 patients who had arthritis at the onset of IIM, joint symptoms preceded muscle weakness in 23 patients (59%) and occurred simultaneously in 16 (41%). Arthritis most commonly manifested

as symmetrical polyarthritis in 33 cases (84.6%); oligoarthritis (involvement of 2–4 joints) and monoarthritis occurred in 5 (12.8%) and in 1 (2.6%) patient, respectively. **Current arthritis at the time of evaluation.** Out of the 31 patients (29.2%) presenting with at least 1 swollen joint at the cross-sectional evaluation, 5, 14, and 12 patients had 1, 2–4, and more than 4 swollen joints, respectively. One patient had a newly diagnosed swollen joint at this examination for the first time.

Mean affected/tender/swollen joint counts in patients with arthritis were 8.3 ± 9.1 , 8.4 ± 9.4 , and 5.3 ± 5.4 , respectively. Metacarpophalangeal (MCP) and proximal interphalangeal joints of the fingers and thumbs, wrists, and shoulders were the most frequently involved joints (Table 3).

Other forms of joint involvement. Deforming arthropathy was present in 15 patients (14.2%). Extreme lateral instability of the first interphalangeal joint (“floppy thumb”) occurred in 5 patients (4.7%); 4 of them had anti-Jo1-positive PM, and 1 had anti-Mi-2-positive DM. Deformity in the first MCP was present in 3 patients (2.8%). All other deformities affected separate individual joints. Five patients (4.7%) had more than 1 joint deformity.

Radiographic characteristics of joint involvement. Radiographs of peripheral joints were available in 47 patients. Forty-six and 37 patients had radiographs of the hands and feet, respectively. Out of the 15 patients with clinically apparent deforming arthropathy, radiographs were available in 9 (60%). Joint erosions were present in 2 patients:

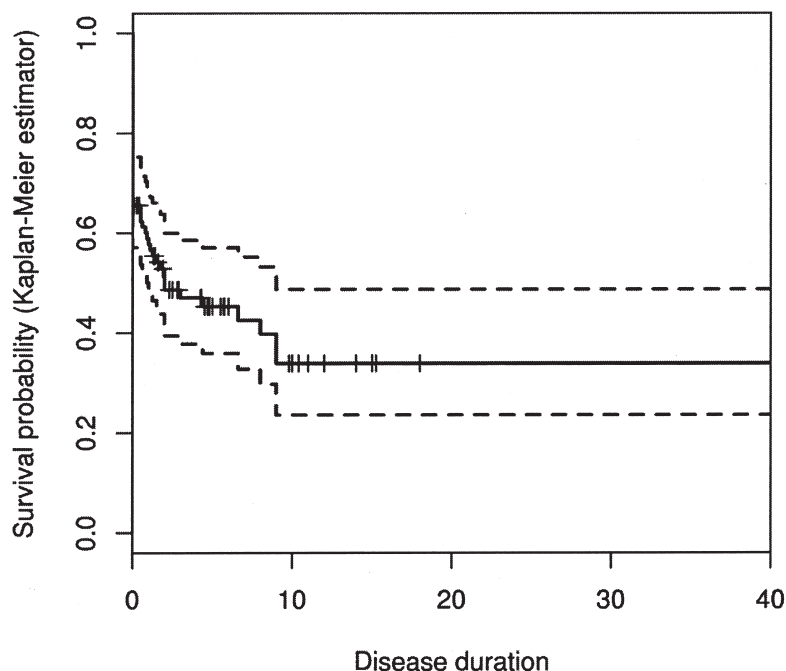


Figure 1. Probability of survival without arthritis. Probability of future development of arthritis in patients with arthritis-free survival (solid line) with 95% CI (dashed lines). Crosses (+) indicate censoring.

Table 3. Distribution of arthritis at the time of examination.

Joint	No. Patients with Affected Joints (%)		
	Tender	Swollen	Tender and/or Swollen
Temporomandibular	7 (6.6)	1 (0.9)	7 (6.6)
Sternoclavicular	7 (6.6)	2 (1.9)	7 (6.6)
Acromioclavicular	13 (12.3)	0	13 (12.3)
Shoulder	22 (20.8)	0	22 (20.8)
Elbow	14 (13.2)	5 (4.7)	14 (13.2)
Wrist	20 (18.9)	11 (10.4)	23 (21.7)
Metacarpophalangeal I-V	18 (16.9)	12 (11.3)	22 (20.8)
Proximal interphalangeal I-V	20 (18.9)	20 (18.9)	22 (20.8)
Distal interphalangeal II-V	6 (5.7)	5 (4.7)	7 (6.6)
Hip	4 (3.8)	—	4 (3.8)
Knee	9 (8.5)	3 (2.8)	10 (9.4)
Ankle	12 (11.3)	6 (5.7)	13 (12.3)
Tarsal joint	11 (10.4)	3 (2.8)	13 (12.3)
Metatarsophalangeal I-V	11 (10.4)	1 (0.9)	11 (10.4)
Interphalangeal I-V	2 (1.9)	0	2 (1.9)
Patients with at least 1 joint affected	45 (42.5)	31 (29.2)	52 (49)

destructive arthritis of carpal joints in a patient with an overlap of PM with RA with a positivity of RF and anti-CCP autoantibodies; and destructive arthritis of the second and third metatarsophalangeal joints in 1 patient who was anti-Jo1-positive for DM.

Clinical aspects of IIM with arthritis. Myositis relapsed in 31 patients (29.2%) at any time during the course of the illness. Arthritis was a feature of the relapse in 15 patients (48.4%) and occurred most frequently concurrently with the myositis flare (8 cases; 53.3%) or shortly before or after the relapse of other myositis symptoms in 4 and 2 patients, respectively; temporal pattern was not specified in 1 patient. The most common manifestation of arthritis during IIM relapses was polyarthritis or oligoarthritis in 7 and 6 patients, respectively (46.7 and 40%); detailed data on the number of affected joints were not available in 2 individuals.

Arthritis was present at disease onset in 13 out of 31 patients (41.9%) who later relapsed and in 29 out of 75 (38.7%) who did not. Thus, the presence of arthritis at the early phase of the disease is not predictive of future myositis relapses ($p = 0.8$). Similarly, the presence of arthritis at disease onset does not predict whether the relapse will be associated with arthritis ($p = 0.16$).

Clinical relevance of arthritis. Arthritis activity and joint damage was assessed using a VAS by both the patient and the evaluating physician. The mean arthritis activity and joint damage scores were relatively low in the whole group owing to a significant proportion of unaffected individuals. However, in patients with joint involvement, both mean activity of arthritis and joint damage were considered to be moderate (Table 4). Joint disease activity was rated higher by patients than by physicians ($p = 0.01$). When joint disease was considered as a proportion of total morbidity on

Table 4. Arthritis activity and damage. Data shown as mean \pm SD (n).

	All Patients	Patients with VAS > 0
MD activity	7.5 \pm 15.8	19.4 \pm 20.5 (41)
MD damage	6.2 \pm 15.6	21.2 \pm 22.8 (31)
Pt activity	14.0 \pm 21.5	26.5 \pm 23.4 (56)

MD/Pt: Physician's/patient's assessment of activity/damage on visual analog scale (VAS; 100 mm).

a semiquantitative scale, 66 patients (62.3%) felt that arthritis did not play any role in the disease burden. Contribution of arthritis to the overall morbidity was reported to be small by 24 patients (22.6%), medium by 9 (8.5%), and large by 7 (6.6%).

Autoantibodies. Myositis-specific and myositis-associated autoantibodies were tested in all patients and most patients were also evaluated for the presence of additional autoantibodies associated with other rheumatic diseases with frequent joint involvement (i.e., RA, systemic lupus erythematosus, Sjögren syndrome, and systemic sclerosis). Autoantibodies were found in 87 patients (82.1%). Not surprisingly, a strong association of anti-Jo1 antibodies with arthritis was confirmed, with 27 out of 29 anti-Jo1-positive patients (93%) having arthritis at some point during the course of IIM. The incidence of arthritis among anti-Jo1-positive patients was significantly higher compared to the anti-Jo1-negative subjects ($p < 0.0001$). No significant association between arthritis and autoantibody positivity could be found for ANA (positive in 42.6% of tested patients), RF (10.2%), anti-Ro52 (32.7%), anti-Ro (11.5%), anti-PM-Scl (12.3%), anti-Mi-2 (6.7%), and anti-TIF-1 γ (8.2%). Other autoantibodies were found in very low frequencies and could not be statistically evaluated. Seven

of 9 RF-positive patients and both patients with ACPA had arthritis. ACPA were positive at relatively high levels (patient No. 2: 239 U/l, patient No. 99: 114 U/l). Only patient No. 2 fulfilled the 1987 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for RA and was classified with an overlap syndrome.

Arthritis and HLA status. Allelic polymorphism of HLA-DRB1 and -DQB1 genes was analyzed in 71 and 73 patients and 179 and 175 healthy controls, respectively. Patients had higher frequencies of HLA-DRB1*03 (56%) and HLA-DQB1*02 (70%) alleles in comparison with the control group (25% and 42%; $p < 0.0001$), but no evidence of an association between arthritis and these or any other HLA-DRB1 or -DQB1 alleles was observed (from $p = 0.2205$ to $p = 1.0000$).

DISCUSSION

We present patient history as well as cross-sectional data regarding joint involvement in a cohort of 106 consecutive patients with IIM seen between January and September 2012 in a single center. To our knowledge, our study represents the largest comprehensive overview of arthritis in an unselected cohort of such patients. The results show that arthritis is a common feature of myositis, affecting more than half of patients overall. Individual subtype of IIM most likely does not play a role in prevalence of arthritis. In the majority of patients with arthritis it manifests already at the onset of IIM, preceding symptoms of muscle weakness in half and appearing simultaneously in another one-third. Survival analysis shows that the highest probability of future development of arthritis is at the beginning of the muscle disease, gradually decreasing for up to 10 years of disease duration, with a significant residual risk even after that time (Figure 1). This is supported by the fact that patients with arthritis had longer mean disease durations. We may hypothesize that joint tenderness, without swelling, found in 9 patients at cross-sectional examination might represent the first sign of newly developing arthritis in these patients.

Arthritis is also a common feature of disease relapses, being present in about half of relapsing patients, most frequently occurring at the same time as the muscle symptoms. However, arthritis at the myositis onset is not predictive of the presence of arthritis during myositis relapses or of any future relapses of IIM.

The most frequently involved joints are the shoulders and small joints of the hands — wrists, metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints (each affecting about one-fifth of the patients), followed by elbows, ankles, and tarsal and acromioclavicular joints. The involvement of hand joints mimicking the distribution of involvement in RA together with the fact that arthritis often precedes the onset of muscle weakness may contribute to an occasional misdiagnosis of IIM as RA²².

We have combined data obtained both in retrospective and cross-sectional fashion; therefore we were not able to use a uniform definition of inflammatory arthritis. For the purpose of retrospective analysis, arthritis was defined as either an inflammatory arthritis diagnosed by a rheumatologist in the past and documented in the medical records or as a presence of both joint swelling and pain reported by the patient during the interview. Every attempt was made to confirm the inflammatory nature of the joint involvement and to rule out symptoms that could have been caused by osteoarthritis. For this reason a more stringent definition of arthritis requiring a simultaneous presence of both joint swelling and pain was applied. We are aware that, despite our efforts, retrospectively collected data might have caused arthritis overestimation. However, relying on medical records only would miss many arthritis cases, because especially mild and transitory forms of arthritis could have gone unreported.

Almost 30% of patients with IIM in our cohort had clinically apparent arthritis, defined as a presence of at least 1 swollen joint, at the time of cross-sectional evaluation. Polyarthritis was the most frequent manifestation with a mean of 5 affected joints. This suggests that, when specifically looked for, arthritis is a frequent manifestation of IIM.

In our cohort, a strong association of arthritis with the presence of the anti-Jo1 autoantibody was confirmed. The prevalence of arthritis among anti-Jo1-positive patients was over 93%, which is more than was reported in some other studies^{14,23}. The distribution of affected joints in our anti-Jo1-positive patients was similar to previous reports and confirms a close relationship of joint disease with anti-Jo1 antibodies. We could not demonstrate an association of arthritis with the presence of any other autoantibody, presumably because of the low numbers of patients in other autoantibody subgroups. Indeed, an association of arthritis with 2 other antisynthetase antibodies, anti-PL-7¹⁶ and anti-PL-12²⁴, has been recently described. In those studies, unlike in our cohort, patients were included on the basis of autoantibody positivity rather than the diagnosis of IIM, therefore introducing a selection bias. Seven of 9 RF-positive patients and both patients with ACPA had arthritis. Only 1 of those patients fulfilled the 1987 ACR classification criteria for RA. These findings are in contrast with reports^{25,26} describing a relatively frequent overlap of IIM with RA, but are consistent with the original study of Bohan, *et al*, who observed this combination more rarely in 2.3% of patients²⁷, and also with other reports²⁸. It may be clinically difficult to distinguish between arthritis as a manifestation of myositis and as a main clinical feature in RA, but the rare presence of typical deformities and radiographic erosions in those with available radiographs argues against the frequent existence of the overlap syndrome.

Association of HLA-DRB1 or HLA-DQB1 polymorphism with arthritis was not found. As expected, we

observed a higher frequency of HLA-DRB1*03 in our cohort. This allele has been associated with anti-Jo1 antibodies²⁹, but it may be present also in patients with some other autoantibodies or without them. The absence of the association of HLA-DRB1*03 and arthritis in our patients suggests that the presence of anti-Jo1 rather than HLA-DRB1*03 is the contributing factor.

Arthritis and joint involvement do not seem to significantly contribute to the overall disease burden in most patients with IIM. The activity of arthritis was generally considered to be low to moderate by both patients and physicians. Most patients assessed the contribution of arthritis to the overall morbidity to be none or only mild. It gives an impression that many patients perceive arthritis as less bothersome than other manifestations of myositis. However, in some patients arthritis contributes significantly to the overall morbidity. Seven patients judged the contribution of arthritis to be of large significance and in 2 of them the total morbidity was driven mostly by joint involvement. Moreover, nearly half of the IIM relapses were associated with arthritis. Therefore, in some patients arthritis may be the main complaint and the choice of drug therapy should reflect this. However, because it is not known what treatment is best for arthritis in myositis, the same drugs used to treat other IIM manifestations are usually prescribed.

Arthritis in IIM is rarely deforming or erosive. In our cohort, deforming arthropathy was present in 15% of patients and radiographic erosions were detected in only 2 patients (1 overlap syndrome with RA and 1 with anti-Jo1-positive DM); both patients had clinically apparent deformities. These findings may be limited because not all of our patients had radiographs performed. However, because the radiographs were indicated based on the presence and severity of joint involvement, it is likely that most, if not all, patients with radiographic changes were identified. Five of our patients had so-called floppy thumb deformity³⁰; 4 of them (80%) were positive for anti-Jo1 autoantibody, thus confirming a previous report on this type of subluxing arthropathy¹⁴.

We have documented that arthritis is a common, although usually not severe, feature of IIM. It is often present at the beginning of the disease, even preceding the onset of muscle weakness in a substantial proportion of patients. Distribution of the most frequently involved joints is similar to that seen in RA. In our group, arthritis was mostly not deforming, although we found some previously described characteristic deformities in some patients.

REFERENCES

1. Citera G, Goni MA, Maldonado Cocco JA, Scheines EJ. Joint involvement in polymyositis/dermatomyositis. *Clin Rheumatol* 1994;13:70-4.
2. Targoff IN. Immune manifestations of inflammatory muscle disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:857-80.

3. Queiro-Silva R, Banegil I, de Dios-Jimenez de Aberasturi JR, Belzunegui-Otano J, Gonzalez-Beneitez C, Figueroa-Pedrosa M. Periarticular calcinosis associated with anti-Jo-1 antibodies sine myositis. Expanding the clinical spectrum of the antisynthetase syndrome. *J Rheumatol* 2001;28:1401-4.
4. Ozturk MA, Unverdi S, Goker B, Haznedaroglu S, Tunc L. A patient with antisynthetase syndrome associated with deforming arthritis and periarticular calcinosis sine myositis. *Scand J Rheumatol* 2007;36:239-41.
5. Meyer O, Charlanne H, Cherin P, Allanore Y, Coquerelle P, Grardel B, et al. Subluxing arthropathy: an unusual manifestation of the antisynthetase syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;68:152-3.
6. Katzap E, Barilla-LaBarca ML, Marder G. Antisynthetase syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2011;13:175-81.
7. Vandergeheynst F, Ocmant A, Sordet C, Humbel RL, Goetz J, Roufosse F, et al. Anti-pm/scl antibodies in connective tissue disease: Clinical and biological assessment of 14 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:129-33.
8. Vancsa A, Gergely L, Ponyi A, Lakos G, Nemeth J, Szodoray P, et al. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary dermatomyositis: relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. *Joint Bone Spine* 2010;77:125-30.
9. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, Mori S, Ueki H, Nishitani H, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol* 1995;22:668-74.
10. Wasko MC, Carlson GW, Tomaino MM, Oddis CV. Dermatomyositis with erosive arthropathy: association with the anti-PL-7 antibody. *J Rheumatol* 1999;26:2693-4.
11. Handa R, Wali JP. Polymyositis with arthritis. *J Assoc Physicians India* 2003;51:192.
12. Schedel J, Butz B, Volk M, Feuerbach S, Scholmerich J, Muller-Ladner U, et al. Nonerosive metacarpophalangeal arthritides in a patient with dermatomyositis. *J Rheumatol* 2004;31:1457-8.
13. Nagashima T, Sato H, Minota S. Destructive arthropathy associated with dermatomyositis sine myositis positive for anti-Jo-1 and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *J Rheumatol* 2009;36:2133-4.
14. Oddis CV, Medsger TA Jr., Cooperstein LA. A subluxing arthropathy associated with the anti-Jo-1 antibody in polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1640-5.
15. Schmidt WA, Wetzel W, Friedlander R, Lange R, Sorensen HF, Lichey HJ, et al. Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies—an evolving spectrum of disease manifestations. *Clin Rheumatol* 2000;19:371-7.
16. Labirua-Iturburu A, Selva-O'Callaghan A, Vincze M, Danko K, Vencovsky J, Fisher B, et al. Anti-PL-7 (anti-threonyl-tRNA synthetase) antisynthetase syndrome: clinical manifestations in a series of patients from a European multicenter study (EUMYONET) and review of the literature. *Medicine* 2012; 91:206-11.
17. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344-7.
18. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-7.
19. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2004;14:337-45.
20. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, et al. Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 1995;38:705-13.
21. Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J, McHugh N. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl

- transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. *Rheumatology* 2007;46:1005-8.
22. Mumm GE, McKown KM, Bell CL. Antisynthetase syndrome presenting as rheumatoid-like polyarthritis. *J Clin Rheumatol* 2010;16:307-12.
 23. Mielnik P, Wiesik-Szewczyk E, Olesinska M, Chwalinska-Sadowska H, Zabek J. Clinical features and prognosis of patients with idiopathic inflammatory myopathies and anti-Jo-1 antibodies. *Autoimmunity* 2006;39:243-7.
 24. Kalluri M, Sahn SA, Oddis CV, Gharib SL, Christopher-Stine L, Danoff SK, et al. Clinical profile of anti-PL-12 autoantibody. Cohort study and review of the literature. *Chest* 2009;135:1550-6.
 25. Nakajima A, Yoshino K, Soejima M, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, et al. High frequencies and co-existing of myositis-specific autoantibodies in patients with idiopathic inflammatory myopathies overlapped to rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012;32:2057-61.
 26. Martinez-Cordero E, Leon DE, Ortega LA. Association of polymyositis with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001; 20:119-23.
 27. Bohan A, Peter JB, Bowman RL, Pearson CM. Computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine* 1977;56:255-86.
 28. Brunasso AM, Massone C. Is dermatomyositis in patients with rheumatoid arthritis induced by anti-TNF-alpha therapy? *Clin Rheumatol* 2011;30:439-40.
 29. Chinoy H, Payne D, Poulton KV, Fertig N, Betteridge Z, Gunawardena H, et al. HLA-DPB1 associations differ between DRB1*03 positive anti-Jo-1 and anti-PM-Scl antibody positive idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatology* 2009;48:1213-7.
 30. Bunch TW, O'Duffy JD, McLeod RA. Deforming arthritis of the hands in polymyositis. *Arthritis Rheum* 1976;19:243-8.

4.3.3. Stoupající incidence imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie

Zdalo se nám, že poslední dobou stále častěji diagnostikujeme imunitně zprostředkovanou nekrotizující myopatii (IZNM). Touto studií jsme se rozhodli ověřit náš klinický dojem, a to pomocí retrospektivního zhodnocení popisů svalových biopsií provedených u pacientů podezřením na myozitidu v letech 2004-2014. Sérií laboratorních metod včetně radioimunoprecipitace byly stanoveny autoprotilátky přítomné v séru pacientů, dále byla specificky testována přítomnost anti-HMGCR protilátky, která je asociována s nekrotizující myozitidou.

Celkem 11% biopsií od pacientů s myozitidou ukazovalo obraz charakteristický pro IZNM - tj. nekrotická svalová vlákna bez přítomnosti zánětlivého infiltrátu. V séru většiny pacientů bylo možné detekovat autoprotilátky, nejčastěji anti-HMGCR, následované anti-SRP. Významě vzrůstající výskyt nekrotizující myopatie byl naší studií potvrzen. Všichni pacienti s pozitivitou anti-HMGCR protilátek užívali v minulosti statiny, z anti-HMGCR negativních pacientů užívalo statiny 10%. Tato studie ukazuje na úzkou souvislost mezi užíváním statinů, tvorbou anti-HMGCR protilátek a obrazem nekrotizující myozitidy. Zdá se tedy, že zvýšení incidence nekrotizující myopatie v posledních letech je způsobeno nárůstem v užívání statinů.

Na této práci jsem se podílela detekcí autoprotilátek v séru pacientů metodou radioimunoprecipitace. Zpracovávala jsem také výsledky dalších metod detekce autoprotilátek (nepřímá imunofluorescence, line immunoassay a Western blot) pro potřeby studie.

Concise report

doi:10.1093/rheumatology/kev229

Increasing incidence of immune-mediated necrotizing myopathy: single-centre experience

Martin Klein^{1,2,*}, Heřman Mann^{1,2,*}, Lenka Pleštilová^{1,2}, Josef Zámečník³, Zoe Betteridge⁴, Neil McHugh^{4,5} and Jiří Vencovsky^{1,2}

Abstract

Objectives. Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is characterized by the predominant presence of necrotic muscle fibres in muscle biopsy and variable response to immunosuppressive treatment. The aims of this study were to analyse the temporal trend of IMNM incidence in our centre over the past 10 years and to explore the role of statins as possible causative agents.

Methods. A retrospective evaluation of muscle biopsy results, clinical and laboratory data, including antibody associations of all patients with idiopathic inflammatory myopathy newly diagnosed between 2004 and June 2014, was performed. Available sera were tested for the presence of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (anti-HMGCR) autoantibodies.

Results. Of 357 biopsied patients, 233 fulfilled criteria for inflammatory/immune-mediated myopathy, including 27 (11.6%) classified as IMNM. There were no patients with IMNM diagnosed between 2004 and 2007; subsequently, two to three cases of IMNM per year were seen during the period 2008–11, with a substantial increase to 18 cases (66.6% of all IMNM biopsies) in 2012–14. Thirteen of 27 patients (48%) had a history of statin use, 11 (85%) of whom had positive anti-HMGCR antibodies. There was no IMNM patient without a history of statin use who was anti-HMGCR antibody positive.

Conclusion. Our data show an increasing incidence of IMNM, which is mainly accounted for by anti-HMGCR-positive IMNM associated with the use of statins.

Key words: myositis, necrotizing myopathy, muscle biopsy, anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase autoantibodies.

Rheumatology key messages

- A significant increase in necrotizing myopathy incidence has been observed in a single centre in recent years.
- Statin-induced necrotizing myopathies are mainly responsible for increased incidence of immune-mediated necrotizing myopathy.

¹Clinical Department, Institute of Rheumatology, ²Department of Rheumatology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, ³Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, ⁴Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath and ⁵Rheumatology, Royal National Hospital for Rheumatic Diseases, Bath, UK

Submitted 24 October 2014; revised version accepted 19 May 2015

Correspondence to: Jiří Vencovsky, Institute of Rheumatology, Na Slupi 4, 128 50 Prague 2, Czech Republic.
E-mail: vencovsky@revma.cz

*Martin Klein and Heřman Mann contributed equally to this study.

Introduction

Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is a relatively newly recognized category of idiopathic inflammatory myopathy (IIM). It is characterized by the predominant presence of necrotic muscle fibres with minimal or no inflammatory infiltrates in muscle biopsy and a variable degree of response to immunosuppressive treatment [1–3]. IMNM itself is a heterogeneous group; it is often associated with the presence of autoantibodies, for example, anti-SRP or anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl

coenzyme A reductase (anti-HMGCR), each representing about 3–6% of IIMs [3, 4]. The diagnosis of IMNM seems to be becoming more frequent in our centre; therefore, we decided to carry out a retrospective analysis of the annual incidence of IMNM since 2004 and to compare it with the incidence of other forms of myositis. We have also investigated a possible contribution of statins as causative agent.

Patients and methods

Muscle biopsies, as well as clinical and laboratory data, of all patients who were evaluated at the Institute of Rheumatology between January 2004 and June 2014 for suspicion of IIM were retrospectively reviewed. This time period was selected because since 2004 all muscle biopsies have been performed in the same hospital and were read by a single expert pathologist (J.Z.) [5]. Patients who fulfilled Bohan and Peter myositis criteria [6, 7] or European Neuromuscular Centre (ENMC) [1] criteria for necrotizing myopathy or Griggs criteria for IBM [8] were included in the analysis as cases of inflammatory/immune-mediated myopathy. All patients signed an informed consent form, and the study was approved by the local ethics committee (Ethics committee of the Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic).

Muscle samples were obtained by open biopsy from the quadriceps muscle (mostly lateral vastus muscle) under local anaesthesia. Isopentane-frozen samples were examined using haematoxylin and eosin staining, a spectrum of histochemical and immunohistochemistry reactions and by electron microscopy [9]. Biopsy results were subcategorized, blinded to the clinical diagnosis, according to the report of the 119th ENMC workshop [1] as: IMNM, PM, DM, non-specific myositis and IBM. Biopsies with significant pathologies but not consistent with a single diagnostic category, were labelled as non-classifiable. Biopsies with no pathological changes or with mild non-specific abnormalities were classified as normal. Only good-quality muscle biopsies that provided a sufficient amount of tissue were considered for the study. Personal history, clinical data, laboratory results and data regarding environmental exposure were obtained from the patient database and/or hospital records.

Anti-HMGCR autoantibodies were measured by ELISA in 218 patients and in 62 healthy controls. Sera were tested without knowledge of clinical details. Briefly, 96-well plates were coated with 1.0 µl/ml HMGCR antigen (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in PBS overnight at 4°C prior to being blocked in PBS–0.1% BSA–0.1% Tween at room temperature for 2 h. Serum samples were diluted 1/200 in PBS–0.1% Tween and were added to the plate in duplicate for 2 h at 4°C. Plates were washed three times in PBS–0.1% Tween prior to the addition of 1:30 000 goat anti-human IgG (Sigma-Aldrich) at 4°C for 30 min. Plates were washed three times in PBS–0.1% Tween and incubated in TMB Substrate Solution (Sigma-Aldrich) at 4°C for 10 min. Reactions were stopped with 1 M H₂SO₄, and plates were read at 450 nm. Negative cut-offs were calculated from the mean optical density + 3

s.d. of healthy controls. All positive samples were confirmed on at least two repeated ELISAs.

Autoantibody profiles of IIM patients were determined during routine diagnostic work-up using IIF to screen for ANA and anti-dsDNA (Immuno Concepts, Sacramento, CA, USA), line immuno-assay (Imtec Human, Wiesbaden, Germany) and myositis-westernblot (Euroimmun, Lübeck, Germany) for detection of individual autoantibodies directed against Jo-1, Mi-2, Ku, PM-Scl, PM-Scl75, PM-Scl100, PL-7, PL-12, EJ, OJ, SRP, Ro, Ro52, La, Scl-70 and U1-RNP antigens. In-house-made ³⁵S radioimmunoprecipitation [10] was used to confirm the results and to detect autoantibodies not captured using commercial assays (antibodies to TIF-1γ, MDA5, NXP2, Zo, EIF3, RNAP I, RNAP II and RNAP III). RFs were detected using a particle-agglutination assay (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan), and an ELISA test for anti-CCP (Test-Line Clinical Diagnostics, Brno, Czech Republic) was used to detect antibodies against ACPA. Data on country-wide statin use were obtained from publicly available information at the Czech State Institute for Drug Control Web page [11, 12].

Demographics, clinical characteristics and results are presented as descriptive statistics. Categorical data were analysed by χ^2 test and Fisher's exact test. We used GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) for statistical analysis.

Results

Of the 357 patients who had muscle biopsy performed during the period 2004–14, 233 patients [171 (73.4%) females; mean age 55.45 (13.66) years] were diagnosed with inflammatory/immune-mediated myopathy. Muscle biopsy results evaluated according to the 119th ENMC workshop report [1] were classified as PM in 65 (27.9%), DM in 90 (38.6%), IMNM in 27 (11.6%), non-specific myositis in 5 (2.1%) and IBM in 6 (2.6%) cases. Five (2.1%) biopsies were non-classifiable and 35 (15.0%) were normal based on the above-mentioned criteria.

Eight patients had overlap syndromes: five with SLE, and three with SSc. Two patients fulfilled criteria for MCTD [13]. Twenty-seven patients were diagnosed with cancer-associated myositis, defined as occurrence of cancer within 3 years of IIM diagnosis, with breast and ovarian cancer being the most frequent tumours in seven (26%) and five cases (18%), respectively. Based on the clinical and histology ENMC criteria, IMNM was diagnosed in 27 patients, of whom one had an overlap with RA and one had skin melanoma.

Biopsy results, autoantibody profiles and selected clinical and environmental characteristics of the patients with necrotic biopsies are shown in Table 1. Apart from anti-HMGCR autoantibodies and previous use of statins, we have not found an association with any of the demographic, clinical, laboratory or environmental factors that have been analysed.

Incidence

Overall, 27 (11.6%) cases were histologically classified as necrotizing myopathy and diagnosed with IMNM based

TABLE 1 Characteristics of patients with necrotizing myopathy in the muscle biopsy

Gender/age, years	Biopsy date, month/year	Autoantibodies to	Statin use	Statin type	Duration of statin use, years	Muscle strength, % ^a	Myalgia	Maximal serum CK level, $\mu\text{kat/l}^b$	Systemic and organ involvement
M/24	8/2008	SRP	N	—	—	62.5	N	37	—
M/61	9/2008	Ro, La	N	—	—	74.3	Y	75	Fever
M/31	11/2009	Jo-1	N	—	—	97.5	N	111	Fever, arthritis
F/62	11/2009	ANA	N	—	—	73.8	N	16	—
F/55	1/2010	Ro52	Y	S	3	56.3	Y	0.4	—
F/54 ^c	5/2010	ANA	N	—	—	88.6	N	38	—
M/19	12/2010	Jo-1	N	—	—	88.8	Y	279	Fever, arthritis
M/55	4/2011	HMGCR	Y	A	UN	76.3	Y	211	—
F/67	10/2011	HMGCR	Y	S/A	3.75	73.8	N	172	—
F/64	2/2012	HMGCR	Y	A/R	6.5	66.3	Y	229	—
F/76	2/2012	HMGCR	Y	S/A	2	67.5	N	158	—
M/70	3/2012	HMGCR	Y	A	3	67.5	Y	157	—
F/43 ^d	3/2012	CCP, ANA	N	—	—	67.5	N	138	Arthritis
F/67	7/2012	SRP	N	—	—	60	N	366	—
F/56	9/2012	SRP	N	—	—	67.5	N	103	—
F/67	10/2012	HMGCR	Y	A	3	91.3	N	112	—
F/57	10/2012	N	N	—	—	83.8	N	15	—
F/65	11/2012	HMGCR, CCP	Y	F	0.5	70	N	68	—
F/19	12/2012	N	N	—	—	56.3	Y	200	—
M/73	1/2013	HMGCR	Y	A	UN	63.8	N	80	-
F/72	2/2013	HMGCR	Y	A	1 year	62.5	N	24	-
F/77	7/2013	ANA	Y	A	UN	UN	N	82	-
F/67	9/2013	HMGCR	Y	A	4	UN	N	94	-
M/66	1/2014	HMGCR	Y	A	0.2	UN	Y	27	-
M/49	4/2014	ANA, Ro60, La	N	—	—	97.5	Y	128	Arthritis, RP
M/65	6/2014	SRP	N	—	—	70	N	139	-
M/28 ^e	6/2014	ANA, Ku	N	—	—	85	N	70	-

^aMuscle strength is shown as a percentage of maximal strength derived from the eight-muscle Manual Muscle Test [14].

^bNormal range in our laboratory is 0.05–2.42 $\mu\text{kat/l}$. ^cSkin melanoma. ^dOverlap syndrome with RA. ^eOverlap syndrome with SLE. A: atorvastatin; F: fluvastatin; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; M/F: male/female; R: rosuvastatin; S: simvastatin; UN: unknown; Y/N: yes/no.

on the ENMC criteria. There were no necrotizing myopathies diagnosed between 2004 and 2007. Subsequently, two or three cases of IMNM per year were seen during the period 2008–11, with a substantial increase to 10 cases in 2012 (43.5% of all necrotizing myopathy biopsies and 35.8% of biopsies performed that year), which is significantly more than during the 2004–11 period [χ^2 (df1)=54.124, $P < 0.0001$]. This trend was confirmed in the following 18 months (January 2013 to June 2014; Fig. 1): eight identified necrotizing myopathies also exceeds the incidence observed during the years 2004–11 [χ^2 (df1)=30.268, $P < 0.0001$]. The rapid increase in the incidence of necrotizing myopathy in the recent 2.5 years (2012 to June 2014) represents a significant change compared with previous years [χ^2 (df1)=82.460, $P < 0.0001$].

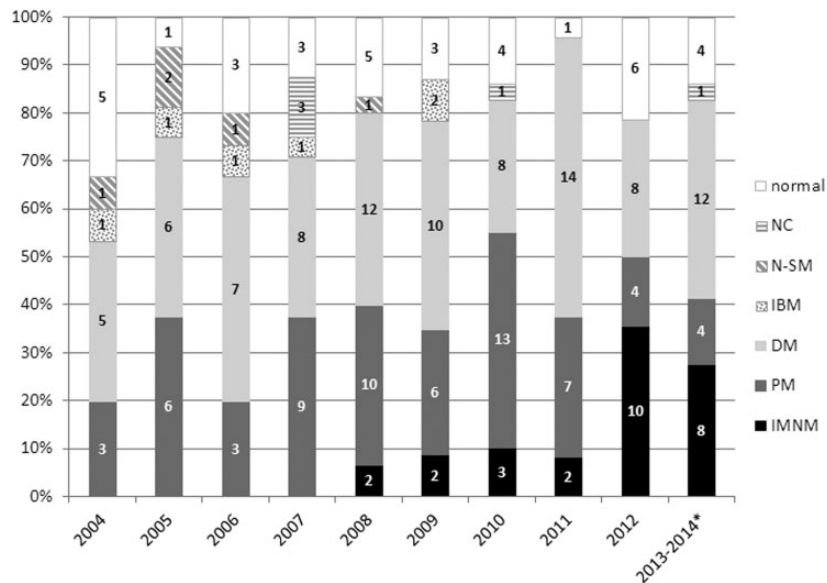
Most biopsies of patients with IMNM displayed prominent muscle fibre necrosis without any inflammatory infiltrates. Ten biopsies contained scarce lymphocytes, which stained positively for CD8 in six cases and for CD20 in one case, while in the remaining three cases lymphocytes could not be typed because they were not present on

the slides used for immunostaining. There were no detectable differences in biopsy pattern with respect to the presence or absence of anti-HMGCR antibodies.

Autoantibodies

Of 217 serum samples available, anti-HMGCR autoantibodies were found in 15 (6.9%). Eleven of these 15 anti-HMGCR-positive patients had necrotic histology on biopsy, and 4 were classified as PM based on a classical finding of invasion of inflammatory cells into muscle fibres in three of them and inflammatory infiltration surrounding muscle fibres without invasion in one case. Sixteen patients with IMNM who were not tested for anti-HMGCR antibodies neither had necrotic findings on biopsy nor used statins.

Four IMNM patients were positive for anti-SRP antibodies, two were anti-Jo-1 positive, two were anti-Ro/La positive, one was anti-Ku positive, one had isolated anti-Ro52 positivity and four were ANA positive with no identifiable specific autoantibody. Anti-CCP antibodies, considered highly specific for RA, were detected in two

Fig. 1 Percentage distribution of biopsy results in individual years

*Data from January 2013 to June 2014. Numbers in boxes indicate absolute numbers of biopsy results. IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy; NC: non-classifiable; N-SM: non-specific myositis.

IMNM patients; one of them had an overlap with RA (patient 13). Anti-HMGCR autoantibodies overlapped with other autoantibodies in two patients only (anti-CCP and ANA). There were no differences in muscle strength, presence of myalgia or serum creatine kinase levels between anti-HMGCR-positive and -negative patients with IMNM.

Statin use

Of the total of 233 patients with IIM, 36 (15.5%) had a history of prior statin use (data were not available for two individuals). Among the 36 statin users, 15 (41.7%) developed anti-HMGCR antibodies and 13 (36.1%) presented with necrotizing myopathy in the biopsy. Eleven of the 13 patients with IMNM and a history of statin use were positive for anti-HMGCR antibodies. The two IMNM patients exposed to statins without anti-HMGCR antibodies were anti-Ro52 and ANA positive, respectively. All 15 anti-HMGCR-positive patients had been treated with statins in the past (100%), whereas only 21 out of the remaining 202 (10.4%) anti-HMGCR-negative IIM patients had a history of statin use ($P < 0.0001$). Thirteen of the 27 IMNM patients were statin users (48.1%), whereas only 23 among 204 (11.3%) non-IMNM patients had been exposed to statins ($P < 0.0001$).

There is a strong association in our cohort between statin use and the presence of anti-HMGCR-positive necrotizing myopathy, because 11 of 15 anti-HMGCR-positive patients who used statins developed IMNM. There were only four anti-HMGCR-positive patients with history of statin exposure who did not have necrotizing myopathy. These four patients showed a classical polymyositis pattern on biopsy.

These findings suggest a strong association of statin use both with the development of anti-HMGCR antibodies and with necrotizing myopathy.

Atorvastatin, simvastatin, fluvastatin and rosuvastatin were used by 22 (61%), 9 (25%), 2 (5.5%) and 2 (5.5%) patients, respectively. Four patients switched to different statins, and in five patients (13.8%) the specific statin used was not known. Individual drugs and details on their use are summarized in Table 1.

None of the IMNM patients was on statins at the time of biopsy [mean time between statin discontinuation and muscle biopsy was 16.2 (28.8) months; range 2 weeks to 8 years]. In the group of non-IMNM patients, five had biopsy performed while using statins, and in two individuals the exact date of statin discontinuation was not known. In all the other non-IMNM patients, the mean time between stopping statins and muscle biopsy was 7.5 (15.2) months (range 2 weeks to 5 years; not significant). Three patients were on a combination of statin and fibrate; two of them had a classical PM pattern in muscle biopsy with one of them being anti-HMGCR positive, while the third patient had normal biopsy findings and was anti-HMGCR negative. Patients using statins were older than non-users [64.5 (7.7) vs 53.8 (13.9) years; $P < 0.0001$ for whole group and 67.6 (6.6) vs 45.9 (18.1) years; $P = 0.0004$ for the IMNM cohort].

Discussion

We report a significantly increasing incidence of IMNM among patients evaluated for IIM in our centre over the past 10 years. No IMNM cases were seen in the years 2004–07. The first patients with IMNM started to appear during the 2008–11 period, with a sharp increase in 2012,

and this higher frequency has subsequently been maintained for 18 months. The referral pattern remained unchanged during the whole period of our study. We have evaluated all biopsies performed since 2004 in our centre, irrespective of the final diagnosis, and all biopsies were taken and processed in the same way at the same department and read by a single experienced pathologist using a pre-specified protocol for the recording of pathological findings. Therefore, we believe the number of IMNM cases is genuinely increasing over time and the results are not influenced by recent interest in necrotizing myopathies.

Based on our results, it seems that, for the most part, statin-induced IMNM is responsible for the increasing incidence. Ten out of 18 patients with IMNM seen in 2012–14 were treated with statins and all but one had anti-HMGCR antibodies, thus confirming the likely role of statins in the pathogenesis of the disease. In addition, two other patients seen in 2011 were treated with statins and were anti-HMGCR positive. Only two statin users among IMNM patients did not have the anti-HMGCR antibodies. Moreover, anti-HMGCR antibodies were not found in any statin non-user with either IMNM or another subtype of IIM. This strong association of anti-HMGCR antibodies and statin use among IMNM patients is remarkable and confirms previous results reported in patients from Johns Hopkins University [15].

More than 80% of patients with statin-associated IMNM from our cohort used atorvastatin. This finding probably reflects the fact that atorvastatin has been the most frequently prescribed statin in the Czech Republic since 2006 and is becoming increasingly popular (supplementary Fig. S1, available at *Rheumatology* Online) [11, 12]. However, the disease is not limited to atorvastatin users, and other statins are also implicated. The average duration of statin use prior to the onset of symptoms was 2.67 years (range 2 months to 6.5 years), in accordance with previous findings [16].

In summary, we describe an increased incidence of necrotizing myopathy in recent years. Almost half of the cases are anti-HMGCR-positive IMNM patients. Statins are most likely to be responsible given the striking association with the presence of anti-HMGCR positivity.

Acknowledgements

Z.B. was supported by funding from the Myositis Support Group UK and Association Francais contre les Myopathies.

Funding: This work was supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization 00023728 (Institute of Rheumatology) and 00064203 (University Hospital Motol).

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* Online.

References

- 1 Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR *et al.* 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disord* 2004;14:337–45.
- 2 Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G *et al.* A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 2010;62:2757–66.
- 3 Allenbach Y, Benveniste O. Acquired necrotizing myopathies. *Curr Opin Neurol* 2013;26:554–60.
- 4 Mohassel P, Mammen AL. The spectrum of statin myopathy. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:747–52.
- 5 Vogel H, Zamecnik J. Diagnostic immunohistology of muscle diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:181–93.
- 6 Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *New Engl J Med* 1975;292:344–7.
- 7 Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *New Engl J Med* 1975;292:403–7.
- 8 Griggs RC, Askanas V, DiMauro S *et al.* Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 1995;38:705–13.
- 9 Kuncova K, Sedlackova M, Vencovsky J *et al.* Inflammatory myopathy associated with statins: report of three cases. *Mod Rheumatol* 2014;24:366–71.
- 10 Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J, McHugh N. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. *Rheumatology* 2007;46:1005–8.
- 11 State Institute for Drug Control. <http://www.sukl.cz/informace-o-dodavkach-v-cr-v-letech-2001-2010>. (8 June 2015, date last accessed).
- 12 State Institute for Drug Control. <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-zakladni-informace>. (8 June 2015, date last accessed).
- 13 Alarcon-Segovia D. Mixed connective tissue disease and overlap syndromes. *Clin Dermatol* 1994;12:309–16.
- 14 Rider LG, Koziol D, Giannini EH *et al.* Validation of manual muscle testing and a subset of eight muscles for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Care Res* 2010;62:465–72.
- 15 Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L *et al.* Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:713–21.
- 16 Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA *et al.* Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle Nerve* 2010;41:185–90.

5. Závěr

V rámci své dizertační práce jsem se zabývala třemi molekulárními aspekty (malé regulační RNA, S100 proteiny a autoprotilátky) revmatologických onemocnění.

Objevili jsme expresi nové třídy malých regulačních RNA, PIWI-interagující RNA (piRNA), v synoviálních fibroblastech (SF) pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a osteoartrózou (OA). Hladiny piRNA byly v RASF mírně deregulované oproti OASF. Dále jsme zjistili, že PIWIL proteiny, vazební partneři piRNA molekul, jsou regulovány prozánětlivými cytokiny a TLR-ligandy. Hypotézu, že PIWI/piRNA systém pomáhá v synoviálních fibroblastech regulovat expresi retrotranspozómů, se nám nepodařilo potvrdit. Methylace ani exprese LINE-1 se krátkodobým umlčením PIWI proteinů nezměnily. Zjistili jsme však, že PIWIL4 reguluje expresi histondeacetylázy 1 (HDAC1), která výrazně přispívá k destrukci RA kloubu. Dále jsme provedli screening cirkulujících miRNA (c-miRNA) u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi. Expresie šesti c-miRNA byla odlišná u pacientů s myozitidou oproti zdravým kontrolám, expresie dalších tří c-miRNA se měnila s aktivitou myozitidy. Myslíme si, že některé z těchto deregulovaných c-miRNA možná představují vhodný biomarker a mohou přispívat k patogenezi myozitidy.

Ve druhé části dizertační práce jsou shrnuty výsledky prací zaměřených na studium S100 proteinů u revmatologických onemocnění. Zjistili jsme zvýšenou hladinu S100A4 proteinu u pacientů s polymyozitidou a její s převážně mimosvalovou aktivitou onemocnění. S100A4 protein bývá pro svůj význam při metastazování nádorů nazýván metastazin. Myozitida je často asociována s malignitami a uvažovali jsme, zda by znalost hladiny S100A4 nepomohla pomoci s jejich včasnou diagnostikou. S100A4 však u pacientů s malignitou nebylo zvýšené oproti zdravým kontrolám, a pacienti s pozitivitou protilátek anti-TIF1- γ , která je často doprovází nádorové onemocnění, měli dokonce hladiny S100A4 oproti zdravým kontrolám snižené. Možným vysvětlením je spotřebování S100A4 proteinu v nádorové tkáni.

Proteiny S100A8/9 (kalprotektin) a S100A12 (kalgranulin) jsme studovali v kontextu časně revmatoidní artritidy. Popsali jsme významné zvýšení jejich hladin v časném stádiu RA a jejich rychlou normalizaci po nasazení léčby. Zejména S100A8/9 významně koreloval s počtem oteklých kloubů, aktivitou onemocnění a se zánětlivým markerem CRP. Vstupní vysoké hladiny S100A8/9 byly navíc dobrým prediktorem zlepšení klinických parametrů. Zdá se tedy, že S100A8/9 je nadějný biomarker u RA poskytující doplňující informace o rozsahu kloubního zánětu, což by mohlo umožnit rychlejší nasazení individualizované léčby.

Třetí část dizertační práce je věnována autoprotilátkám u myozitidy. V přehledovém článku jsem shrnula údaje o anti-PM-Scl protilátkách, jejichž přítomnost je charakteristická pro překryvný syndrom polymyozitidy a systémové sklerózy. Na následujících dvou publikacích jsem se podílela detekcí autoprotilátek metodou radioimunoprecipitace, kterou jsem v Revmatologickém ústavu zavedla. Při průřezové studii výskytu a charakteru artritidy u myozitidy jsme zjistili, že 53% pacientů s myozitidou mělo artritidu někdy v průběhu onemocnění a u 22% pacientů se příznaky artritidy objevily ještě před prvními známkami myozitidy. Nejčastěji se jednalo o symetrickou neerozivní polyartitidu postihující zápěstí a drobné klouby na ruce, což může vést k chybné diagnóze revmatoidní artritidy. Potvrdili jsme známou asociaci artritidy s přítomností antisynthetázových protilátek anti-Jo-1, žádné jiné významné protilátkové asociace jsme nenašli. Retrospektivní studie o incidenci nekrotizující myopatie popisuje významný vzestup výskytu této dříve vzácné nemoci v posledních letech. V séru většiny pacientů s nekrotizující myopatií jsme detekovali anti-HGMCR protilátky, všichni anti-HGMCR pozitivní pacienti anamnesticky užívali statiny. Vznikající incidenci nekrotizující myopatie si tedy vysvětlujeme častějším užíváním statinů.

Patogeneze systémových autoimunitních onemocnění je velmi komplexní a svojí doktorskou prací jsem přidala jeden dílek do velké skládačky. Lepší porozumění příčinám a podkladům revmatologických onemocnění pomůže nalézt nové cílené terapie a specifické biomarkery, které umožní léčbu šitou na míru konkrétnímu pacientovi.

6. Použitá literatura

1. Klareskog L, Catrina AI, Paget S: **Rheumatoid arthritis**. *Lancet (London, England)* 2009, **373**(9664):659-672.
2. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW: **Rheumatoid arthritis**. *Lancet (London, England)* 2010, **376**(9746):1094-1108.
3. Vencovský J: **Revmatoidní artritida**. In: *Revmatologie*. Edited by K Pavelka JV, P Horák, L Šenolt, H Mann, J Štěpán. Praha: Maxdorf; 2012: 262-279.
4. Skeoch S, Bruce IN: **Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation?** *Nature reviews Rheumatology* 2015, **11**(7):390-400.
5. Puttevijs D, De Vusser P, Geusens P, Dens J: **Increased cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: an overview**. *Acta cardiologica* 2014, **69**(2):111-118.
6. Sokka T, Abelson B, Pincus T: **Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update**. *Clinical and experimental rheumatology* 2008, **26**(5 Suppl 51):S35-61.
7. **Rheumatoid arthritis** [<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/multimedia/rheumatoid-arthritis/img-20007979>]
8. van der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes RE, Huizinga TW, Thomson W, Worthington J, van der Helm-van Mil AH, de Vries RR: **Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis**. *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(4):916-923.
9. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ: **Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins**. *Arthritis and rheumatism* 2000, **43**(1):30-37.
10. Gao XJ, Olsen NJ, Pincus T, Stastny P: **HLA-DR alleles with naturally occurring amino acid substitutions and risk for development of rheumatoid arthritis**. *Arthritis and rheumatism* 1990, **33**(7):939-946.
11. V Hořejší JB: **Základy imunologie**. Praha: TRITON; 2009.
12. Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE: **Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned?** *Immunogenetics* 2011, **63**(8):459-466.
13. Brown JH, Jardtetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: **Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1**. *Nature* 1993, **364**(6432):33-39.
14. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: **The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis**. *Arthritis and rheumatism* 1987, **30**(11):1205-1213.
15. Gough A, Faint J, Salmon M, Hassell A, Wordsworth P, Pilling D, Birley A, Emery P: **Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome**. *Arthritis and rheumatism* 1994, **37**(8):1166-1170.
16. Elshazli R, Settin A: **Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update**. *Immunobiology* 2015, **220**(8):1012-1024.
17. Stanford SM, Bottini N: **PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene**. *Nature reviews Rheumatology* 2014, **10**(10):602-611.
18. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ: **Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins**. *Arthritis and rheumatism* 1996, **39**(5):732-735.
19. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE: **The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide**. *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(2):425-432.
20. Sverdrup B, Kallberg H, Bengtsson C, Lundberg I, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L: **Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study**. *Arthritis research & therapy* 2005, **7**(6):R1296-1303.
21. Yahya A, Bengtsson C, Larsson P, Too CL, Mustafa AN, Abdullah NA, Muhamad NA, Klareskog L, Murad S, Alfredsson L: **Silica exposure is associated with an increased risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis in an Asian population: evidence from the Malaysian MyEIRA case-control study**. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 2014, **24**(2):271-274.

22. Essouma M, Noubiap JJ: **Is air pollution a risk factor for rheumatoid arthritis?** *Journal of inflammation (London, England)* 2015, **12**:48.
23. de Smit MJ, Brouwer E, Vissink A, van Winkelhoff AJ: **Rheumatoid arthritis and periodontitis; a possible link via citrullination.** *Anaerobe* 2011, **17**(4):196-200.
24. Makrygiannakis D, af Klint E, Lundberg IE, Lofberg R, Ulfgren AK, Klareskog L, Catrina AI: **Citrullination is an inflammation-dependent process.** *Annals of the rheumatic diseases* 2006, **65**(9):1219-1222.
25. Pruijn GJ: **Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis.** *Frontiers in immunology* 2015, **6**:192.
26. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM: **Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis.** *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(4):961-973.
27. Rommel C, Camps M, Ji H: **PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(3):191-201.
28. McInnes IB, Schett G: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *The New England journal of medicine* 2011, **365**(23):2205-2219.
29. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, McInnes IB, Bresnihan B, Tak PP: **Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2005, **64**(6):834-838.
30. Schinnerling K, Soto L, Garcia-Gonzalez P, Catalan D, Aguilon JC: **Skewing dendritic cell differentiation towards a tolerogenic state for recovery of tolerance in rheumatoid arthritis.** *Autoimmunity reviews* 2015, **14**(6):517-527.
31. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, McInnes IB: **Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis.** *Arthritis research & therapy* 2006, **8**(1):R15.
32. Moret FM, Hack CE, van der Wurff-Jacobs KM, de Jager W, Radstake TR, Lafeber FP, van Roon JA: **Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity.** *Arthritis research & therapy* 2013, **15**(5):R155.
33. Lebre MC, Jongbloed SL, Tas SW, Smeets TJ, McInnes IB, Tak PP: **Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles.** *The American journal of pathology* 2008, **172**(4):940-950.
34. Jongbloed SL, Benson RA, Nickdel MB, Garside P, McInnes IB, Brewer JM: **Plasmacytoid dendritic cells regulate breach of self-tolerance in autoimmune arthritis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009, **182**(2):963-968.
35. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW: **The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis.** *Nature reviews Rheumatology* 2014, **10**(10):593-601.
36. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science (New York, NY)* 2004, **303**(5663):1532-1535.
37. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A: **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** *The Journal of cell biology* 2007, **176**(2):231-241.
38. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V *et al*: **NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.** *Science translational medicine* 2013, **5**(178):178ra140.
39. Schuerwegh AJ, Ioan-Facsinay A, Dorjee AL, Roos J, Bajema IM, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE: **Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(6):2586-2591.
40. Van Boxel JA, Paget SA: **Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes.** *The New England journal of medicine* 1975, **293**(11):517-520.
41. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM: **Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease?** *Immunology* 1999, **97**(2):188-196.

42. Randen I, Mellbye OJ, Forre O, Natvig JB: **The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue.** *Scandinavian journal of immunology* 1995, **41**(5):481-486.
43. Panayi GS: **Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism?** *Nature clinical practice Rheumatology* 2006, **2**(2):58-59.
44. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF *et al*: **Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig.** *The New England journal of medicine* 2003, **349**(20):1907-1915.
45. James EA, Rieck M, Pieper J, Gebe JA, Yue BB, Tatum M, Peda M, Sandin C, Klareskog L, Malmstrom V *et al*: **Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy.** *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014, **66**(7):1712-1722.
46. Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan-Lancaster J: **LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study.** *Arthritis and rheumatism* 2010, **62**(4):929-939.
47. Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmermann SY, Koehl U, Moller B, Gay S, Kaltwasser JP *et al*: **Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2007, **66**(9):1151-1156.
48. Carvalho H, da Silva JA, Souto-Carneiro MM: **Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis.** *Autoimmunity reviews* 2013, **12**(3):401-409.
49. Lopez-Olivo MA, Amezaga Urruela M, McGahan L, Pollono EN, Suarez-Almazor ME: **Rituximab for rheumatoid arthritis.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2015, **1**:CD007356.
50. Bottini N, Firestein GS: **Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors.** *Nature reviews Rheumatology* 2013, **9**(1):24-33.
51. Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S: **Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice.** *The American journal of pathology* 1996, **149**(5):1607-1615.
52. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnaker EM, Tarner IH, Robbins PD *et al*: **Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints.** *Nature medicine* 2009, **15**(12):1414-1420.
53. Klein K, Gay S: **Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis, a review.** *Current opinion in pharmacology* 2013, **13**(3):420-425.
54. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M: **DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(12):3613-3622.
55. Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, Li RN, Lin YC, Lin CH, Tsai WC, Liu HW, Yen JH: **Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis.** *Immunology letters* 2011, **135**(1-2):96-99.
56. Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG: **Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(9):2686-2693.
57. Fu LH, Ma CL, Cong B, Li SJ, Chen HY, Zhang JG: **Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis.** *Acta pharmacologica Sinica* 2011, **32**(11):1373-1380.
58. Kawabata T, Nishida K, Takasugi K, Ogawa H, Sada K, Kadota Y, Inagaki J, Hirohata S, Ninomiya Y, Makino H: **Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis.** *Arthritis research & therapy* 2010, **12**(4):R133.
59. Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, Yoshida A, Yamana J, Yamamura M, Ninomiya Y *et al*: **Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(10):3365-3376.
60. Schett G, Teitelbaum SL: **Osteoclasts and Arthritis.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2009, **24**(7):1142-1146.

61. Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, Hanslik-Schnabel B, Wanivenhaus A, Chott A, Smolen JS, Schett G: **Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2005, **175**(4):2579-2588.
62. Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B: **How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(10):2936-2948.
63. Tam LS, Kitazaki GD, Gonzalez-Gay MA: **Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis?** *Rheumatology (Oxford, England)* 2014, **53**(6):1108-1119.
64. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J *et al*: **EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update.** *Annals of the rheumatic diseases* 2014, **73**(3):492-509.
65. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T *et al*: **2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis.** *Arthritis care & research* 2012, **64**(5):625-639.
66. Smolen JS, Aletaha D: **Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges.** *Nature reviews Rheumatology* 2015, **11**(5):276-289.
67. Solomon DH, Bitton A, Katz JN, Radner H, Brown EM, Fraenkel L: **Review: treat to target in rheumatoid arthritis: fact, fiction, or hypothesis?** *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014, **66**(4):775-782.
68. Felson D: **Defining remission in rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2012, **71** Suppl 2:i86-88.
69. Donahue KE, Gartlehner G, Jonas DE, Lux LJ, Thieda P, Jonas BL, Hansen RA, Morgan LC, Lohr KN: **Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis.** *Annals of internal medicine* 2008, **148**(2):124-134.
70. Rau R: **Glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis.** *Expert opinion on pharmacotherapy* 2014, **15**(11):1575-1583.
71. Santiago T, da Silva JA: **Safety of glucocorticoids in rheumatoid arthritis: evidence from recent clinical trials.** *Neuroimmunomodulation* 2015, **22**(1-2):57-65.
72. Gaujoux-Viala C, Gossec L: **When and for how long should glucocorticoids be used in rheumatoid arthritis? International guidelines and recommendations.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2014, **1318**:32-40.
73. Wienecke T, Gotzsche PC: **Paracetamol versus nonsteroidal anti-inflammatory drugs for rheumatoid arthritis.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2004(1):CD003789.
74. Wang D, Li Y, Liu Y, Shi G: **The use of biologic therapies in the treatment of rheumatoid arthritis.** *Current pharmaceutical biotechnology* 2014, **15**(6):542-548.
75. Hwang YG, Moreland LW: **Induction therapy with combination TNF inhibitor and methotrexate in early rheumatoid arthritis.** *Current rheumatology reports* 2014, **16**(5):417.
76. Keiserman M, Codreanu C, Handa R, Xibille-Friedmann D, Mysler E, Briceno F, Akar S: **The effect of antidrug antibodies on the sustainable efficacy of biologic therapies in rheumatoid arthritis: practical consequences.** *Expert review of clinical immunology* 2014, **10**(8):1049-1057.
77. Scott IC, Kingsley GH, Scott DL: **Can we discontinue synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis?** *Clinical and experimental rheumatology* 2013, **31**(4 Suppl 78):S4-8.
78. van den Broek M, Huizinga TW, Dijkmans BA, Allaart CF: **Drug-free remission: is it already possible?** *Current opinion in rheumatology* 2011, **23**(3):266-272.
79. Vencovský J: **Idiopatické zánětlivé myopatie.** In: *Revmatologie*. Edited by Pavelka V, Horák, Šenolt, Mann, Štěpán. Praha: Maxdorf; 2012: 382-392.
80. Dalakas MC: **Inflammatory Muscle Diseases.** *The New England journal of medicine* 2015, **373**(4):393-394.
81. Kiely PD, Chua F: **Interstitial lung disease in inflammatory myopathies: clinical phenotypes and prognosis.** *Current rheumatology reports* 2013, **15**(9):359.
82. **Dermatomyositis.** In: *ADAM Multimedia Encyclopedia*.
83. Deshmukh S, White G, Katifi HA, Malik N: **Inclusion body myositis a clinical review with illustrative case report.** *Acute medicine* 2008, **7**(2):73-76.
84. O'Hanlon TP, Carrick DM, Targoff IN, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, Gao X, Oddis CV, Morel PA, Malley JD *et al*: **Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic**

- inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQA1 allelic profiles distinguish European American patients with different myositis autoantibodies.** *Medicine* 2006, **85**(2):111-127.
85. Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, Christopher-Stine L, Lloyd TE, Leffell MS, Zachary AA: **Increased frequency of DRB1*11:01 in anti-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy.** *Arthritis care & research* 2012, **64**(8):1233-1237.
 86. Mierau R, Dick T, Bartz-Bazzanella P, Keller E, Albert ED, Genth E: **Strong association of dermatomyositis-specific Mi-2 autoantibodies with a tryptophan at position 9 of the HLA-DR beta chain.** *Arthritis and rheumatism* 1996, **39**(5):868-876.
 87. Mamyrova G, O'Hanlon TP, Sillers L, Malley K, James-Newton L, Parks CG, Cooper GS, Pandey JP, Miller FW, Rider LG: **Cytokine gene polymorphisms as risk and severity factors for juvenile dermatomyositis.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(12):3941-3950.
 88. Chinoy H, Lamb JA, Ollier WE, Cooper RG: **An update on the immunogenetics of idiopathic inflammatory myopathies: major histocompatibility complex and beyond.** *Current opinion in rheumatology* 2009, **21**(6):588-593.
 89. Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C: **Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions.** *Autoimmunity reviews* 2002, **1**(1-2):29-35.
 90. Hamann PD, Cooper RG, McHugh NJ, Chinoy H: **Statin-induced necrotizing myositis - a discrete autoimmune entity within the "statin-induced myopathy spectrum".** *Autoimmunity reviews* 2013, **12**(12):1177-1181.
 91. Jones JD, Kirsch HL, Wortmann RL, Pillinger MH: **The causes of drug-induced muscle toxicity.** *Current opinion in rheumatology* 2014, **26**(6):697-703.
 92. Levine SM: **Cancer and myositis: new insights into an old association.** *Current opinion in rheumatology* 2006, **18**(6):620-624.
 93. Love LA, Weinberg CR, McConnaughey DR, Oddis CV, Medsger TA, Jr., Reveille JD, Arnett FC, Targoff IN, Miller FW: **Ultraviolet radiation intensity predicts the relative distribution of dermatomyositis and anti-Mi-2 autoantibodies in women.** *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(8):2499-2504.
 94. Venalis P, Lundberg IE: **Immune mechanisms in polymyositis and dermatomyositis and potential targets for therapy.** *Rheumatology (Oxford, England)* 2014, **53**(3):397-405.
 95. Zong M, Lundberg IE: **Pathogenesis, classification and treatment of inflammatory myopathies.** *Nature reviews Rheumatology* 2011, **7**(5):297-306.
 96. Page G, Chevrel G, Miossec P: **Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(1):199-208.
 97. McNiff JM, Kaplan DH: **Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus.** *Journal of cutaneous pathology* 2008, **35**(5):452-456.
 98. Confalonieri P, Bernasconi P, Megna P, Galbiati S, Cornelio F, Mantegazza R: **Increased expression of beta-chemokines in muscle of patients with inflammatory myopathies.** *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2000, **59**(2):164-169.
 99. Lopez De Padilla CM, McNallan KT, Crowson CS, Bilgic H, Bram RJ, Hein MS, Ytterberg SR, Amin S, Peterson EJ, Baechler EC *et al*: **BAFF expression correlates with idiopathic inflammatory myopathy disease activity measures and autoantibodies.** *The Journal of rheumatology* 2013, **40**(3):294-302.
 100. Oddis CV, Reed AM, Aggarwal R, Rider LG, Ascherman DP, Levesque MC, Barohn RJ, Feldman BM, Harris-Love MO, Koontz DC *et al*: **Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: a randomized, placebo-phase trial.** *Arthritis and rheumatism* 2013, **65**(2):314-324.
 101. Malmstrom V, Venalis P, Albrecht I: **T cells in myositis.** *Arthritis research & therapy* 2012, **14**(6):230.
 102. Fasth AE, Dastmalchi M, Rahbar A, Salomonsson S, Pandya JM, Lindroos E, Nennesmo I, Malmberg KJ, Soderberg-Naucler C, Trollmo C *et al*: **T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009, **183**(7):4792-4799.
 103. Tournadre A, Lenief V, Eljaafari A, Miossec P: **Immature muscle precursors are a source of interferon-beta in myositis: role of Toll-like receptor 3 activation and contribution to HLA class I up-regulation.** *Arthritis and rheumatism* 2012, **64**(2):533-541.

104. Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea AM, Tanaseanu C, Dumitrache S, Otelea D, Tamsulea I *et al*: **Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases**. *Autoimmunity* 2009, **42**(1):41-49.
105. Dalakas MC: **Mechanisms of disease: signaling pathways and immunobiology of inflammatory myopathies**. *Nature clinical practice Rheumatology* 2006, **2**(4):219-227.
106. Dalakas MC: **Interplay between inflammation and degeneration: using inclusion body myositis to study "neuroinflammation"**. *Annals of neurology* 2008, **64**(1):1-3.
107. Sallum AM, Kiss MH, Silva CA, Wakamatsu A, Vianna MA, Sachetti S, Marie SK: **Difference in adhesion molecule expression (ICAM-1 and VCAM-1) in juvenile and adult dermatomyositis, polymyositis and inclusion body myositis**. *Autoimmunity reviews* 2006, **5**(2):93-100.
108. Unger L, Kampf S, Luthke K, Aringer M: **Rituximab therapy in patients with refractory dermatomyositis or polymyositis: differential effects in a real-life population**. *Rheumatology (Oxford, England)* 2014, **53**(9):1630-1638.
109. Tansley SL, McHugh NJ: **Myositis specific and associated autoantibodies in the diagnosis and management of juvenile and adult idiopathic inflammatory myopathies**. *Current rheumatology reports* 2014, **16**(12):464.
110. **Chronic diseases and health promotion** [<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>]
111. **Za více než třetinu pracovních neschopností mohou tradičně nemoci dýchací soustavy** [<http://www.cssz.cz/cz/o-cssz/informace/media/tiskove-zpravy/tiskove-zpravy-2015/2015-08-31-za-vice-nez-tretinu-pracovnich-neschopnosti-mohou-tradicne-nemoci-dychaci-soustavy.htm>]
112. **Nemoci svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně (M00-M99)** [<http://www.uzis.cz/cz/mkn/M00-M99.html>]
113. K Pavelka HD, J Štolfa: **Spondyloartritidy**. In: *Ravmatologie*. Edited by K Pavelka JV, P Horák, L Šenolt, H Mann, J Štěpán. Praha: Maxdorf; 2012: 287-340.
114. P Horák TT: **Systémový lupus erythematodes**. In: *Revmatologie*. Edited by K Pavelka JV, P Horák, L Šenolt, H Mann, J Štěpán. Praha: Maxdorf; 2012: 341-369.
115. K Pavelka RB: **Vaskulitidy**. In: *Revmatologie*. Edited by K Pavelka JV, P Horák, L Šenolt, H Mann, J Štěpán. Praha: Maxdorf; 2012: 406-425.
116. Barnes J, Mayes MD: **Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers**. *Current opinion in rheumatology* 2012, **24**(2):165-170.
117. Bečvář R: **Systémová sklerodermie**. In: *Revmatologie*. Edited by K Pavelka JV, P Horák, L Šenolt, H Mann, J Štěpán. Praha: Maxdorf: 374-382.
118. Esteller M: **Non-coding RNAs in human disease**. *Nature reviews Genetics* 2011, **12**(12):861-874.
119. Sai Lakshmi S, Agrawal S: **piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs**. *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(Database issue):D173-177.
120. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA: **A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins**. *Nature* 2006, **442**(7099):199-202.
121. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T: **The small RNA profile during Drosophila melanogaster development**. *Developmental cell* 2003, **5**(2):337-350.
122. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW *et al*: **DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes**. *Genes & development* 2008, **22**(7):908-917.
123. Ross RJ, Weiner MM, Lin H: **PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma**. *Nature* 2014, **505**(7483):353-359.
124. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ: **MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline**. *Developmental cell* 2007, **12**(4):503-514.
125. Lin H, Spradling AC: **A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary**. *Development (Cambridge, England)* 1997, **124**(12):2463-2476.
126. Cheng J, Guo JM, Xiao BX, Miao Y, Jiang Z, Zhou H, Li QN: **piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells**. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2011, **412**(17-18):1621-1625.

127. Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, Kandel ER: **A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity.** *Cell* 2012, **149**(3):693-707.
128. Sugimoto K, Kage H, Aki N, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D: **The induction of H3K9 methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a locus.** *Biochemical and biophysical research communications* 2007, **359**(3):497-502.
129. Liu C, Qu L, Dong B, Xing X, Ren T, Zeng Y, Jiang B, Meng L, Wu J, Shou C: **Combined phenotype of 4 markers improves prognostic value of patients with colon cancer.** *The American journal of the medical sciences* 2012, **343**(4):295-302.
130. Zhao YM, Zhou JM, Wang LR, He HW, Wang XL, Tao ZH, Sun HC, Wu WZ, Fan J, Tang ZY *et al*: **HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection.** *Cancer* 2012, **118**(10):2708-2717.
131. Wang Y, Liu Y, Shen X, Zhang X, Chen X, Yang C, Gao H: **The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2012, **5**(4):315-325.
132. Taubert H, Wach S, Jung R, Pugia M, Keck B, Bertz S, Nolte E, Stoehr R, Lehmann J, Ohlmann CH *et al*: **Piwil 2 expression is correlated with disease-specific and progression-free survival of chemotherapy-treated bladder cancer patients.** *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2015, **21**:371-380.
133. Yan H, Wu QL, Sun CY, Ai LS, Deng J, Zhang L, Chen L, Chu ZB, Tang B, Wang K *et al*: **piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma.** *Leukemia* 2015, **29**(1):196-206.
134. Huang G, Hu H, Xue X, Shen S, Gao E, Guo G, Shen X, Zhang X: **Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer.** *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2013, **15**(7):563-568.
135. Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, Jarzembowski JA, Wikenheiser-Brokamp KA, Suarez BK, Whelan AJ *et al*: **DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma.** *Science (New York, NY)* 2009, **325**(5943):965.
136. Melo SA, Moutinho C, Roperio S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R, Fernandez AF, Davalos V, Villanueva A, Montoya G *et al*: **A genetic defect in exportin-5 traps precursor miRNAs in the nucleus of cancer cells.** *Cancer cell* 2010, **18**(4):303-315.
137. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M: **Dynamic epigenetic regulation of the miRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis.** *Oncogene* 2012, **31**(16):2062-2074.
138. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D: **Altered expression of MiRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(4):1001-1009.
139. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, Koenders MI, van den Berg WB, Smolen J, Redlich K: **Essential role of miRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice.** *Arthritis and rheumatism* 2011, **63**(5):1281-1288.
140. Pers YM, Jorgensen C: **MiRNA in 2012: Biotherapeutic potential of miRNAs in rheumatic diseases.** *Nature reviews Rheumatology* 2013, **9**(2):76-78.
141. Filkova M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, Filer A, Raza K, Buckley CD, Snow M *et al*: **Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2014, **73**(10):1898-1904.
142. Filkova M, Jungel A, Gay RE, Gay S: **MiRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy.** *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2012, **26**(3):131-141.
143. Churov AV, Oleinik EK, Knip M: **MiRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential.** *Autoimmunity reviews* 2015, **14**(11):1029-1037.
144. Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S *et al*: **Distinctive patterns of miRNA expression in primary muscular disorders.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(43):17016-17021.
145. Georgantas RW, Streicher K, Greenberg SA, Greenlees LM, Zhu W, Brohawn PZ, Higgs BW, Czapiga M, Morehouse CA, Amato A *et al*: **Inhibition of myogenic miRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies.** *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014, **66**(4):1022-1033.

146. Lai NS, Yu HC, Chen HC, Yu CL, Huang HB, Lu MC: **Aberrant expression of miRNAs in T cells from patients with ankylosing spondylitis contributes to the immunopathogenesis.** *Clinical and experimental immunology* 2013, **173**(1):47-57.
147. Huang CH, Wei JC, Chang WC, Chiou SY, Chou CH, Lin YJ, Hung PH, Wong RH: **Higher expression of whole blood miRNA-21 in patients with ankylosing spondylitis associated with programmed cell death 4 mRNA expression and collagen cross-linked C-telopeptide concentration.** *The Journal of rheumatology* 2014, **41**(6):1104-1111.
148. Huang J, Song G, Yin Z, Luo X, Ye Z: **Elevated miR-29a expression is not correlated with disease activity index in PBMCs of patients with ankylosing spondylitis.** *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 2014, **24**(2):331-334.
149. Stagakis E, Bertias G, Verginis P, Nakou M, Hatzia Apostolou M, Kritikos H, Iliopoulos D, Boumpas DT: **Identification of novel miRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression.** *Annals of the rheumatic diseases* 2011, **70**(8):1496-1506.
150. Deng X, Su Y, Wu H, Wu R, Zhang P, Dai Y, Chan TM, Zhao M, Lu Q: **The role of miRNAs in autoimmune diseases with skin involvement.** *Scandinavian journal of immunology* 2015, **81**(3):153-165.
151. Broen JC, Radstake TR, Rossato M: **The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis.** *Nature reviews Rheumatology* 2014, **10**(11):671-681.
152. Croci S, Zerbini A, Boiardi L, Muratore F, Bisagni A, Nicoli D, Farnetti E, Pazzola G, Cimino L, Moramarco A *et al*: **MiRNA markers of inflammation and remodelling in temporal arteries from patients with giant cell arteritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2015.
153. Skoglund C, Carlsen AL, Weiner M, Kurz T, Hellmark T, Eriksson P, Heegaard NH, Segelmark M: **Circulating miRNA expression pattern separates patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis from healthy controls.** *Clinical and experimental rheumatology* 2015, **33**(2 Suppl 89):S-64-71.
154. Shimizu C, Kim J, Stepanowsky P, Trinh C, Lau HD, Akers JC, Chen C, Kanegaye JT, Tremoulet A, Ohno-Machado L *et al*: **Differential expression of miR-145 in children with Kawasaki disease.** *PloS one* 2013, **8**(3):e58159.
155. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB: **S100 proteins in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2015, **15**(2):96-109.
156. Bianchi ME: **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.** *Journal of leukocyte biology* 2007, **81**(1):1-5.
157. **S100A4 (S100 Calcium Binding Protein A4)**
[<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/S100A4ID42192ch1q21.html>]
158. Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA: **Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes.** *International journal of molecular sciences* 2012, **13**(3):2893-2917.
159. Mishra SK, Siddique HR, Saleem M: **S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence.** *Cancer metastasis reviews* 2012, **31**(1-2):163-172.
160. Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R: **Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer.** *Cancer research* 2000, **60**(6):1595-1603.
161. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M: **The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis.** *British journal of cancer* 2005, **92**(11):1955-1958.
162. Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E: **Metastasis-inducing S100A4 protein: implication in non-malignant human pathologies.** *Current molecular medicine* 2008, **8**(6):492-496.
163. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*.** *PLoS pathogens* 2009, **5**(10):e1000639.
164. Wright EK, De Cruz P, Geary R, Day AS, Kamm MA: **Fecal biomarkers in the diagnosis and monitoring of Crohn's disease.** *Inflammatory bowel diseases* 2014, **20**(9):1668-1677.
165. Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, Fitzgerald O, Roth J: **Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis.** *Rheumatology (Oxford, England)* 2003, **42**(11):1383-1389.

166. Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, Bresnihan B: **Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane.** *The Journal of rheumatology* 1999, **26**(12):2523-2528.
167. Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Simmen B, Michel BA, Pavelka K, Gay RE, Gay S, Neidhart M: **S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases.** *Annals of the rheumatic diseases* 2006, **65**(12):1645-1648.
168. Oslejskova L, Grigorian M, Hulejova H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhofer J, Gay S, Neidhart M, Brabcova H, Suchy D *et al*: **Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford, England)* 2009, **48**(12):1590-1594.
169. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewe R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK: **Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2007, **66**(8):1093-1097.
170. De Rycke L, Baeten D, Foell D, Kruithof E, Veys EM, Roth J, De Keyser F: **Differential expression and response to anti-TNFalpha treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis.** *The Journal of pathology* 2005, **206**(1):17-27.
171. Foell D, Wulffraat N, Wedderburn LR, Wittkowski H, Frosch M, Gerss J, Stanevicha V, Mihaylova D, Ferriani V, Tsakalidou FK *et al*: **Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial.** *Jama* 2010, **303**(13):1266-1273.
172. Klingelhofer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshoj I, Pavelka K, Neidhart M, Gay S, Ambartsumian N, Hansen BS *et al*: **Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(3):779-789.
173. van Lent PL, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, Nacken W, van den Berg WB, Roth J: **Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2008, **67**(12):1750-1758.
174. Cerezo LA, Kuncova K, Mann H, Tomcik M, Zamecnik J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J *et al*: **The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies.** *Rheumatology (Oxford, England)* 2011, **50**(10):1766-1772.
175. Seeliger S, Vogl T, Engels IH, Schroder JM, Sorg C, Sunderkotter C, Roth J: **Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in inflammatory muscle diseases.** *The American journal of pathology* 2003, **163**(3):947-956.
176. Oktayoglu P, Bozkurt M, Mete N, Caglayan M, Em S, Nas K: **Elevated serum levels of calprotectin (myeloid-related protein 8/14) in patients with ankylosing spondylitis and its association with disease activity and quality of life.** *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 2014, **62**(6):880-884.
177. Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GR: **Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity.** *Lupus* 1993, **2**(1):47-50.
178. Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Leelahavanichkul A, Kittikovit V, Hirankarn N, Pisitkun T, Avihingsanon Y: **Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis.** *Lupus* 2015.
179. Schenatto CB, Xavier RM, Bredemeier M, Portela LV, Tort AB, Dedavid e Silva TL, Souza DO, Brenol JC: **Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus.** *Annals of the rheumatic diseases* 2006, **65**(6):829-831.
180. Fragoso-Loyo H, Cabiedes J, Atisha-Fregoso Y, Llorente L, Sanchez-Guerrero J: **Utility of serum S100B protein for identification of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus.** *The Journal of rheumatology* 2010, **37**(11):2280-2285.
181. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Sumova B, Distler A, Beyer C, Cerezo LA, Becvar R *et al*: **S100A4 amplifies TGF-beta-induced fibroblast activation in systemic sclerosis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2015, **74**(9):1748-1755.
182. Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F, Perosa F: **Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role.** *Autoimmunity reviews* 2011, **10**(8):503-508.

183. Vencovský J: **Autoprotiilátky**. In: *Buněčné a molekulární základy imunologie*. Edited by H Tlaskalová-Hogenová VH, M Bilej. Praha: Česká imunologická společnost; 2013: 105-115.
184. Suurmond J, Diamond B: **Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity**. *The Journal of clinical investigation* 2015, **125**(6):2194-2202.
185. Renaudineau Y, Garaud S, Le Dantec C, Alonso-Ramirez R, Daridon C, Youinou P: **Autoreactive B cells and epigenetics**. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2010, **39**(1):85-94.
186. Fojtíková M: **Imunologické vyšetřovací metody v revmatologii**. In: *Revmatologie*. Edited by K Pavelka JV, P Horák, L Šenolt, H Mann, J Štěpán. Praha: Maxdorf; 2012: 40-57.
187. Kay J, Upchurch KS: **ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria**. *Rheumatology (Oxford, England)* 2012, **51 Suppl 6**:vi5-9.
188. Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG: **An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis**. *The Journal of experimental medicine* 1957, **105**(5):425-438.
189. Klareskog L, Amara K, Malmstrom V: **Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis**. *Current opinion in rheumatology* 2014, **26**(1):72-79.
190. Bax M, Huizinga TW, Toes RE: **The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis**. *Seminars in immunopathology* 2014, **36**(3):313-325.
191. Ghirardello A, Borella E, Beggio M, Franceschini F, Fredi M, Doria A: **Myositis autoantibodies and clinical phenotypes**. *Auto-immunity highlights* 2014, **5**(3):69-75.
192. Mohassel P, Mammen AL: **Statin-associated autoimmune myopathy and anti-HMGCR autoantibodies**. *Muscle & nerve* 2013, **48**(4):477-483.
193. Z Betteridge JD: **Procedure for the preparation of samples (immunoprecipitation) for the immunoprecipitation (IP) examination**. In: *Laboratory Manual* Bath, UK: Bath Institute for Rheumatic Diseases 2011.
194. Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ: **Novel autoantibodies and clinical phenotypes in adult and juvenile myositis**. *Arthritis research & therapy* 2011, **13**(2):209.
195. Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP: **Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites**. *Kidney international* 1992, **41**(6):1690-1700.
196. Baerlecken NT, Nothdorft S, Stummvoll GH, Sieper J, Rudwaleit M, Reuter S, Matthias T, Schmidt RE, Witte T: **Autoantibodies against CD74 in spondyloarthritis**. *Annals of the rheumatic diseases* 2014, **73**(6):1211-1214.
197. Kim YG, Sohn DH, Zhao X, Sokolove J, Lindstrom TM, Yoo B, Lee CK, Reveille JD, Taurog JD, Robinson WH: **Role of protein phosphatase magnesium-dependent 1A and anti-protein phosphatase magnesium-dependent 1A autoantibodies in ankylosing spondylitis**. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014, **66**(10):2793-2803.
198. Suzuki R, Honda S, Kirino Y: **PIWI Expression and Function in Cancer**. *Frontiers in genetics* 2012, **3**:204.
199. Bamezai S, Rawat VP, Buske C: **Concise review: The Piwi-piRNA axis: pivotal beyond transposon silencing**. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2012, **30**(12):2603-2611.
200. Neidhart M, Rethage J, Kuchen S, Kunzler P, Crowl RM, Billingham ME, Gay RE, Gay S: **Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression**. *Arthritis and rheumatism* 2000, **43**(12):2634-2647.
201. Hawtree S, Muthana M, Wilkinson JM, Akil M, Wilson AG: **Histone deacetylase 1 regulates tissue destruction in rheumatoid arthritis**. *Human molecular genetics* 2015.
202. Krol J, Loedige I, Filipowicz W: **The widespread regulation of miRNA biogenesis, function and decay**. *Nature reviews Genetics* 2010, **11**(9):597-610.
203. Zeng L, Cui J, Wu H, Lu Q: **The emerging role of circulating miRNAs as biomarkers in autoimmune diseases**. *Autoimmunity* 2014, **47**(7):419-429.
204. Zahr ZA, Baer AN: **Malignancy in myositis**. *Current rheumatology reports* 2011, **13**(3):208-215.
205. Citera G, Goni MA, Maldonado Cocco JA, Scheines EJ: **Joint involvement in polymyositis/dermatomyositis**. *Clin Rheumatol* 1994, **13**(1):70-74.

7. Seznam zkratek

ACPA	anti-citrullinated protein antibodies
ACR	American College of Rheumatology
ADCC	autoantibody dependent cellular cytotoxicity
ANA	antinuclear antibodies
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibody
anti-CCP	anti-cyclic citrullinated peptide antibody
anti-HMGCR	anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A reductasis antibody
anti-TIF1- γ	anti-transcriptional intermediary factor 1 γ antibody
APC	antigen presenting cells
BAFF	B cell-activating factor of the TNF family
BCR	B-cell receptor
CAM	cancer associated myositis
CD	cluster of differenciation
CK	creatine kinase
c-miRNA	cirkulující microRNA
CRP	C-reaktivní protein
DAS28	disease activity score of 28 joints
DAS28	disease activity
DC	dendritic cell
DM	dermatomyozitida
DMARD	disease modifying antirheumatic drugs
DNMT1	DNA methyltransferáza 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMG	elektromyografie
EULAR	the European League Against Rheumatism
GK	glukokortikoidy
H3K9	histon 3 lysin 9
HAQ	health assessment questionnaire
HC	healthy controls
HDAC	histone deacetylase
HLA	human leukocytar antigen
IBM	inclusion body myositis
IFN I	interferon I typu
IIM	idiopathic inflammatory myositis
IL	interleukine
ILD	interstitial lung disease
IMNM	immune mediated necrotizing myopathy
IZM	idiopatické zánětlivé myopatie
IZNM	imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie
LINE1	long interspersed nuclear element 1

LPS	lipopolysaccharide
MAA	myositis associated autoantibodies
MAC	membrane attack complex
MCSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MKN	mezinárodní klasifikace nemocí
MMP	matrix metalloproteinases
MMT	manual muscle test
mRNA	messenger RNA
MSA	myositic specific autoantibodies
MSD	musculoskeletal diseases
MYOACT	myositis disease activity assessments visual analog scales
ncRNA	non-coding RNA
NET	neutrophil extracellular trap
NSA	nesteroidních antirevmatika
OA	osteoartróza
PAD	peptidylarginindeamináza
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
piRNA	PIWI-interagující RNA
PIWI	P-element Induced Wimpy testis
PIWIL	PIWI-like
PM	polymyozitida
RA	revmatoidní artritida
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
RF	revmatoidní faktor
RIP	radioimunoprecipitace
RISC	RNA-induced silencing complex
SCID	severe combined immunodeficiency disease
SD	standart deviation
SEM	standart error of the mean
SF	synoviální fibroblasty
SJC	swollen joint count
SLE	systemový lupus erythematoses
SpA	spondyloartritidy
SRP	signal recognition particle
SSc	systemová sklerodermie
TGF- β	transforming growth factor β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α
UTR	untranslated region
VAS	visual analogue scale

8. Seznam publikací

Publikace k tématu disertační práce

Pleštilová L, Neidhart M, Russo G, Frank-Bertoncelj M, Ospelt C, Ciurea A, Kolling C, Gay RE, Michel BA, Vencovský J, Gay S, Jüngel A. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in rheumatoid arthritis Manuscript Submitted to *Annals of Rheumatic Diseases*, IF 10,377

Misunova M, Salinas-Riester G, Luthin S, Pommerenke C, Fojtikova M, Zavada J, Klein M, **Pleštilová L**, Svitalkova T, Cepek P, Novota P, Vencovsky J. Microarray analysis of circulating miRNAs in the serum of patients with polymyositis and dermatomyositis reveals a distinct disease expression profile and is associated with disease activity, *Clin Exp Rheumatology*, Manuscript Number: CER 8302 15 IF 2,9

Pleštilová L, Mann H, Andrés Cerezo L, Pecha O, Vencovský J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 levels associate with disease activity rather than cancer development in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther*. 2014 Oct 31;16(5):468. IF 4,12

Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, **Pleštilová L**, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jul 26;13(4):R122. IF 4,45

Klein M, Mann H, **Pleštilová L**, Betteridge Z, McHugh N, Remáková M, Novota P, Vencovský J. Arthritis in idiopathic inflammatory myopathy: clinical features and autoantibody associations. *J Rheumatol*. 2014 Jun;41(6):1133-9. IF 3,2

Klein M, Mann H, **Pleštilová L**, Zámečník J, Betteridge Z, McHugh N, Vencovský J. Increasing incidence of immune-mediated necrotizing myopathy: single-centre experience. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Jun 24. pii: kev229. IF 4,47

Pleštilová L, Vencovský J. Anti-PM-Scl autoprotílátky u myozitid. *Čes. Revmatol*. 2009; 17(4): 200-204. Prošel recenzním řízením, bez IF

Publikace, které nejsou zahrnuty do disertační práce

Herbert MK, Stammen-Vogelzangs J, Verbeek MM, Rietveld A, Lundberg IE, Chinoy H, Lamb JA, Cooper RG, Roberts M, Badrising UA, De Bleecker JL, Machado PM, Hanna MG, **Pleštilová L**, Vencovsky J, van Engelen BG, Pruijn GJ. Disease specificity of autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in sporadic inclusion body myositis versus known autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 2015 Feb 24. pii: annrheumdis-2014-206691. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206691. *IF* 9,27

Šenolt L, Cerezo LA, Šumová B, Pecha O, **Pleštilová L**, Forejtová Š, Růžičková O, Hušáková M, Závada J, Pavelka K, Vencovský J, Mann H. High levels of metastasis-inducing S100A4 protein and treatment outcome in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort. *Biomarkers*. 2015 Feb;20(1):47-51. *IF* 2.2

Sglunda O, Mann H, Hulejová H, Kuklová M, Pecha O, **Pleštilová L**, Filková M, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreased Circulating Visfatin Is Associated with Improved Disease Activity in Early Rheumatoid Arthritis: Data from the PERAC Cohort. *PLoS One*. 2014 Jul 28;9(7):e103495. *IF* 3,5

Sglunda O, Mann HF, Hulejová H, Pecha O, **Pleštilová L**, Růžičková O, Fojtíková M, Sléglová O, Forejtová S, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decrease in serum interleukin 21 levels is associated with disease activity improvement in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Physiol Res*. 2014 Apr 3. *IF* 1,5

Filková M, Hulejová H, Kuncová K, **Pleštilová L**, Cerezo LA, Mann H, Klein M, Zámečník J, Gay S, Vencovský J, Senolt L. Resistin in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther*. 2012 May 11;14(3):R111. *IF* 4,45