

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Molekuly „DASH systému“ v lokálních a systémových patogenetických
procesech revmatoidní artritidy

Lucie Šromová

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a Patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř Biologie Nádorové Buňky

Ústav Biochemie a Experimentální Onkologie

1. Lékařská Fakulta

Univerzita Karlova v Praze

U nemocnice 5

128 53, Praha 2

Školitel: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract	5
Úvod	6
Hypotéza.....	10
Cíle práce.....	10
Materiál a metody.....	11
Pacientský soubor.....	11
Biologický materiál	12
Izolace mononukleárních buněk	12
Příprava plazmy a synoviální tekutiny pro analýzy.....	12
Analýza buněk průtokovou cytometrií	12
Stanovení DPP-IV-podobné enzymové aktivity	13
Izolace a kvantifikace celkové RNA, real-time RT PCR.....	13
Enzyme-linked immunoassay (ELISA)	14
DPP-IV, FAP a SDF	14
Substance P	14
Statistická analýza	14
Výsledky.....	15
I. Identifikace DASH molekul nesoucích DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu v plazmě a na povrchu mononukleárních buněk periferní krve a synoviální tekutiny a jejich reakčních partnerů.....	15
Detekce DASH molekul na mononukleárních buňkách.....	15
Detekce molekul DASH systému v plazmě periferní krve a solubilní komponentě synoviální tekutiny.....	17
II. Porovnání exprese a DPP-IV-podobné aktivity vybraných DASH molekul, jejich substrátů a receptorů u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) ve srovnání s pacienty s osteoartrózou (OA) na lokální a systémové úrovni	18
Periferní krev	18
Synoviální tekutina	19
III. Intraindividuální posouzení vztahu DASH molekul ke klinickému průběhu RA.....	21
Diskuze.....	22
Závěry.....	25
Zkratky	25
Literatura	26

Abstrakt

Biologická funkce řady lokálních mediátorů účastnících se na patogenezi revmatoidní artritidy (RA) je kontrolována proteolytickým odštěpením dvou aminoterminálních aminokyselin prostřednictvím dipeptidylpeptidázy-IV (DPP-IV) a molekul vykazujících DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu ("Dipeptidylpeptidáze-IV Aktivitou a/nebo Strukturou Homologní molekuly- DASH).

Cílem této disertační práce bylo identifikovat spektrum DASH molekul podílejících se na celkové DPP-IV-podobné enzymové aktivitě u nemocných s RA v periferní krvi a synoviální tekutině a srovnat ho s kontrolní skupinou pacientů trpících osteoartrózou (OA) a dále popsát vztah těchto molekul k aktivitě onemocnění u RA.

Prokázali jsme, že dominantním nositelem DPP-IV-podobné enzymové aktivity v plazmě a synoviální tekutině u pacientů s RA je kanonická DPP-IV. DPP-IV-podobná aktivita a kanonická DPP-IV byla dále detekována na povrchu mononukleárních buněk v krvi i synoviální tekutině

U pacientů s RA jsme pozorovali sníženou DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu i expresi DPP-IV na mononukleárních buňkách synoviální tekutiny. U těchto pacientů navíc zastoupení DPP-IV+ T lymfocytů v synoviální tekutině negativně korelovalo s koncentrací prozánětlivého mediátoru SDF (stromal cell-derived factor-1 α), který je substrátem DPP-IV. V krevní plazmě jsme u pacientů s RA prokázali významně nižší aktivitu a koncentraci DPP-IV ve srovnání s OA a negativní korelaci mezi koncentrací C reaktivního proteinu (CRP) a enzymovou aktivitou DPP-IV. Nepozorovali jsme rozdíl v DPP-IV-podobné enzymové aktivitě ani expresi na krevních mononukleárních buňkách (BMNC) mezi pacienty s RA a OA. Při intraindividuálním porovnání došlo u pacientů s poklesem aktivity RA k poklesu DPP-IV na BMNC a současně nárůstu plazmatické DPP-IV.

Tyto výsledky svědčí pro možný vztah DPP-IV k aktivitě RA a možnou využitelnost tohoto enzymu při monitoringu léčby. Pozorovaná snížená dostupnost DPP-IV na mononukleárních buňkách v synoviální tekutině navíc naznačuje její možnou přímou patogenetickou roli na lokální úrovni prostřednictvím omezení degradace SDF a tím zvýšení jeho prozánětlivého působení.

Abstract

The biological half-life of several pro-inflammatory mediators involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) is controlled by molecules exhibiting dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV)-like enzymatic activity (Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologues- DASH).

The aim of this thesis was to identify the molecular source of the DPP-IV-like enzymatic activity in the peripheral blood and synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis as compared to control patients with osteoarthritis (OA), and to evaluate the association of DPP-IV with the disease activity.

We found that the main source of the DPP-IV-like enzyme activity in the plasma and in the synovial fluid in patients with RA is the canonical DPP-IV. DPP-IV-like enzymatic activity and canonical DPP-IV were also detected on the cell surface of blood and synovial fluid mononuclear cells.

Significantly lower DPP-IV-like enzymatic activity and DPP-IV expression in the synovial fluid mononuclear cells was found in RA as opposed to OA patients. In the synovial fluid of RA patients there was also a negative correlation between the concentration of the pro-inflammatory DPP-IV substrate SDF (stromal cell-derived factor-1 α) and the proportion of the DPP-IV+ T cells. The blood plasma DPP-IV-like enzymatic activity and concentration were lower in patients with active RA as compared to OA, while there were no differences in DPP-IV expression on the blood mononuclear cells (BMNC). In a follow-up study, intraindividual comparison in patients with disease remission revealed that there was an increase of the blood plasma DPP-IV and a decrease of DPP-IV on BMNC in RA patients during the less active phase of their disease.

The association between RA activity and the changes in the blood plasma and the blood mononuclear cell DPP-IV in individual patients supports the possible role of DPP-IV as a disease activity marker. The lower local availability of DPP-IV in the synovial fluid in RA may in addition participate on the disease progression by the reduced degradation of the pro-inflammatory chemokine SDF.

Úvod

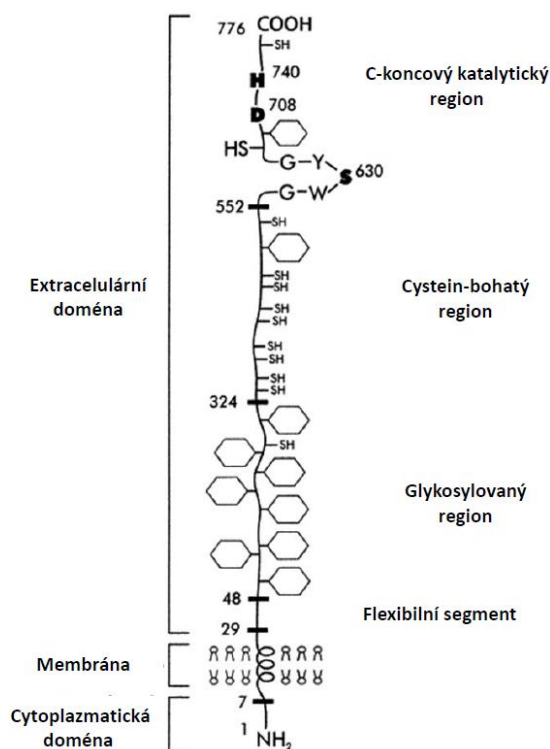
Revmatoidní artritida (RA) je zánětlivé autoimunitní onemocnění, jehož patogenese není dosud zcela objasněna, nicméně za rizikové faktory lze považovat genetickou predispozici (zejména exprese HLA-DR4), pohlavní hormony a infekční nebo jiné antigeny ovlivňující imunitní systém. U pacientů s RA dochází vlivem autoimunitního procesu především k destrukci kloubů, a následně i postižení dalších orgánů (McInnes a Schett 2011). Rozvoj zánětlivého poškození u RA je spojený s infiltrací buněk do synoviálního prostředí kloubu, přičemž významnou roli v těchto procesech hrají T lymfocyty (Loetscher a Moser 2002). Buňky v synoviálním prostředí secernují prozánětlivé cytokiny, což stimuluje migraci dalších buněk do synoviální tekutiny i tkáně a vznik uskupení buněk podobných sekundárním lymfatickým orgánům. V důsledku zvýšené dostupnosti prozánětlivých mediátorů dochází k stimulaci synovialocytů a fibroblastů podporující formování zánětlivého pannu, který produkuje kolagenasy a stromelysin, jež jsou zodpovědné za postupnou destrukci chrupavek a kostí. (Loetscher a kol., 2002, McInnes a kol., 2011). Řada z těchto mediátorů jako např. SDF (stromal cell-derived factor-1 α), SP (substance P), VIP (vasoaktivní intestinální peptid), RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), má svůj biologický poločas kontrolovaný DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou (Ohnuma a kol., 2011). Jejich změněná dostupnost tak mimo jiné může vznikat i v důsledku změny proteolytického opracování a vést k ovlivnění progresu onemocnění (Sedo a kol., 2005).

SDF (Stromal cell-derived factor 1- α) je chemoatraktant produkovaný synoviálními buňkami a endotelem (Bradfield a kol., 2003). V patogenesi RA se SDF podílí především na stimulaci infiltrace lymfocytů a monocytů/makrofágů do zanícené synovie (Wolf a kol., 2008). Infiltrující buňky (zejména CD4+ T lymfocyty) exprimují membránový receptor pro SDF – CXCR4 (Bradfield a kol., 2003). Exprese CXCR4 je rovněž zvyšována parakrinním působením některých dalších lokálních mediátorů, které jsou přítomné v zánětlivém kloubu a předpokládá se, že osa CXCR4 - SDF je zásadně významná pro setrvání imunitních buněk v synoviálním prostředí. To ve svém důsledku vede k další perpetuaci zánětlivého procesu způsobujícím následnou destrukci kloubů (Pablos a kol., 2003, Proost a kol., 2006).

Neuropeptid Substance P (SP) je prozánětlivý mediátor interagující s tachykinovými receptory NK1, NK2 a NK3, nicméně nejvyšší afinitu má k receptoru NK (Maggi 1995). Vyšší koncentrace SP byla ve srovnání s kontrolními skupinami nalezena v synoviální tekutině pacientů s RA (Westermarck a kol., 2001). SP vykazuje prozánětlivé účinky na monocyty, lymfocyty, ale též synovialocyty v prostředí zanícené synoviální tkáně. To vede k další produkci řady prozánětlivých cytokinů, kolagenáz a adhezivních molekul, podílejících se na formování synoviálního pannu a tím dalším rozvoji vlastního onemocnění (Lambert a kol., 1998)

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, CD26, EC 3.4.14.5, Obrázek 1) odštěpuje díky své hydrolytické aktivitě N-terminální dipeptid z peptidů majících jako předposlední aminokyselinu prolin nebo alanin. Po dlouhá léta byla DPP-IV považována za jedinou molekulu vykazující takovouto enzymovou aktivitu. Další studie ovšem postupně prokázaly existenci dalších molekul nesoucích podobnou enzymovou aktivitu a rovněž několik molekul bez charakteristické hydrolytické aktivity, ovšem DPP-IV sekvenčně podobných. Studium vlastností a biologických funkcí těchto molekul vedlo k definici „Dipeptidylpeptidáze-IV podobných strukturou a/nebo aktivitou homologních“ (DASH) molekul (Sedo a Malík 2001). Většina těchto molekul tedy vykazuje DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu, přičemž ovšem některé své biologické funkce vykonávají tyto molekuly nezávisle na své vnitřní enzymové aktivitě. DASH molekuly jsou často multifunkční proteiny, nesoucí různé biologické funkce, v závislosti na exprimující tkáni či buněčném systému, ale i subcelulární lokalizaci a kontextu

daného mikroprostředí. DASH a molekuly s nimiž funkčně interagují (substráty, receptory), představují „DASH systém“, jehož (de)regulace se pravděpodobně uplatňuje v řadě patogenetických procesů (Sedo a kol., 2001).



Obrázek 1. Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, CD26, EC 3.4.14.5). DPP-IV je transmembránový protein II. typu obsahující 6 aminokyselin dlouhou cytoplazmatickou doménu, extracelulární doménu s krátkým flexibilním segmentem a C-koncovým regionem se serin-proteázovým typem katalytického centra. Serin⁶³⁰ tvoří katalytickou triádu s kyselinou asparagovou⁷⁰⁸ a histidinem⁷⁴⁰. Převzato z Mentlein 1999 (Mentlein 1999).

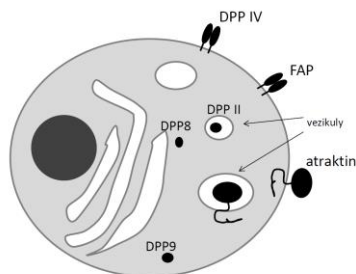
DPP-IV poprvé identifikovali na základě její proteolytické aktivity Hopsu-Havu a Glenner v jaterních homogenátech (Hopsu-Havu a Glenner 1966). DPP-IV pak byla následně identifikována a její protein charakterizován v celé řadě tkání i buněk (např. epitel, endotel, glie, buňky imunitního systému) za fyziologických i patologických okolností (Lambeir a kol., 2003, Sedo a kol., 2008) a její solubilní forma se také vyskytuje v tělních tekutinách včetně krevní plazmy (Sedo a kol., 2005, Balaziová a kol., 2006). Tato multifunkční molekula svojí enzymovou aktivitou vykonává různé imunoregulační funkce a mnoho úloh též zastává v metabolismu živin i patogenezi diabetu mellitu.

V imunitním systému je kanonická DPP-IV identická s diferenciačním antigenem CD26. Je exprimována zejména CD4+CD45RO+ paměťovými T lymfocyty a je asociována s Th1 imunitní odpovědí. Obvykle nedetekovatelná, nebo jen velmi málo exprimována je DPP-IV na B-lymfocytech, NK buňkách a na monocytech zdravých jedinců (Ohnuma a kol., 2011). K její upregulaci dochází na aktivovaných T lymfocytech (Morimoto a kol., 1989). DPP-IV je rovněž ko-stimulační molekulou T lymfocytů podílející se na jejich aktivaci a proliferaci. Tyto účinky jsou pravděpodobně závislé na její intrinsické enzymové aktivitě (Ohnuma a kol., 2008, Ohnuma a kol., 2011). V *in vitro* studiích byl použitím DPP-IV inhibitorů prokázán pokles produkce některých cytokinů (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 a IFN gamma) a zvýšení produkce supresivního cytokinu transformujícího růstového faktoru beta (Ansorge a kol., 1997, Reinhold a kol., 1997, Reinhold a kol., 1997, Reinhold a kol., 1998, Lendeckel a kol.,

2003) Vzhledem k funkčnímu významu v imunoregulacích je v současnosti DPP-IV v imunitním systému intenzivně studována v souvislosti s možnými důsledky její systémově farmakologicky navozené inhibice při léčbě diabetu mellitu 2. typu gliptiny (Stulc a Sedo 2010). Mezi neenzymové účinky DPP-IV lze zařadit její interakci s adenosin deaminázou, dále i s membránově vázanou protein. tyrosin fosfatázou CD45 či její vazbu ke kolagenu a fibronektinu (Tanaka a kol., 1994, Tanaka a kol., 1995, Aytac a Dang 2004). DPP-IV takto zprostředkovává kontakt mezi buňkami navzájem i mezi buňkami a extracelulární matrix. Její interakce s proteiny extracelulární matrix jsou významné pro invazi a migraci nádorových buněk a tím i pro další metastazování nádorů, stejně tak jako pro migrace lymfocytů do zánětlivé tkáně synovie (Dang a Morimoto 2002, Kikkawa a kol., 2003, Kikkawa a kol., 2005).

Změny exprese DPP-IV byly popsány v biopsiích z různých typů lidských tumorů, kdy u některých z nich je považována za možný prognostický ukazatel (Tanaka a kol., 1995, Busek a kol., 2004) DPP-IV byla studována v transformovaných nervových buňkách, gliálních buňkách či melanomech. Potlačení tumorigeneze v důsledku re-exprese DPP-IV bylo pozorováno na buňkách melanomu či neuroblastomu (Wesley a kol., 1999, Arscott a kol., 2009). Nicméně v pokročilých stadiích melanomu spojeném již s tvorbou metastáz, exprese DPP-IV tento protinádorový efekt spojený se změnami invazivity nevykazuje (Pethiyagoda a kol., 2000). Zvýšená exprese kanonické DPP-IV byla pozorováno v tkáních pocházejících z gliomů s vyšším stupněm malignity dle WHO (Stremenova a kol., 2007). V permanentních i primárních liniích odvozených z těchto nádorů byl pozorován negativní efekt DPP-IV-podobné enzymové aktivity na růst buněk in vitro (Busek a kol., 2012).

Kromě kanonické DPP-IV/CD26 patří mezi DASH molekuly (Obrázek 2) například Fibroblastový aktivační protein alfa (FAP), DPP-II, DPP8 a DPP9, dříve byl mezi ně řazen i atraktin (Wrenger a kol., 2006, Wrenger a kol., 2006).



Obrázek 2. Buněčná lokalizace DASH molekul. DPP-IV a FAP jsou lokalizovány na buněčné membráně, jejich aktivní doména je orientována extracelulárně. Atraktin je exprimovaný na membráně i v intracelulárních vesikulech. DPP8 a DPP9 jsou typicky cytosolické enzymy. DPP-II je lokalizována v intracelulárních vesikulech. (DPP - Dipeptidylpeptidáza, FAP – fibroblastový aktivační protein alfa), převzato a upraveno dle Wrenger a kol. 2006, Maes a kol 2007.

Atraktin byl primárně identifikován jako solubilní DPP-IV-enzymově aktivní protein, který však nevykazuje strukturní homologii s kanonickou DPP-IV (Duke-Cohan a kol., 1995). Následné práce popisují i jeho expresi na buňkách periferní krve, zejména na monocytech (Wrenger a kol., 2006). Další studie však zpochybnily existenci jeho intrinsické proteolytické aktivity, ale prokázaly jeho schopnost zvyšovat specifickou aktivitu kanonické DPP-IV, pravděpodobně přímou intermolekulární interakcí obou molekul, zprostředkovanou CUB doménou Atraktinu (Jonathan-Duke Cohan, osobní sdělení). Friedrich a kol. (2007) izolovali atraktin z plazmy periferní krve a prokázali, že atraktin nemá podíl na DPP-IV-podobné enzymové aktivitě a jeho regulační účinky jsou spíše důsledky neenzymových interakcí (Friedrich a kol., 2007).

Dipeptidylpeptidáza-II (DPPII, „Quiescent cell“ prolinová dipeptidáza) je intracelulární proteáza s pH optimumem v kyselé oblasti (Underwood a kol., 1999). Při neutrálním pH má stejnou substrátovou specifitu jako DPP-IV, avšak v buňkách je tato molekula lokalizována ve vesikulech (Chiravuri a kol., 2000).

Dipeptidylpeptidáza 8 a 9 (DPP8 a DPP9) jsou DASH molekuly vykazující DPP-IV-podobnou exopeptidázovou aktivitu i strukturní homologii (21% resp. 19%) s kanonickou DPP-IV (Sedo a kol., 2001, Qi a kol., 2003). Oba enzymy jsou exprimovány v buňkách imunitního systému a epiteliálních strukturách různých tkání (Qi a kol., 2003, Bank a kol., 2011). Maes a kol. (2007) díky frakcionaci leukocytů prokázali, že molekuly DPP8 a DPP9 jsou dominantně lokalizovány v cytosolu, zatímco kanonická DPP-IV je exprimována především v membránové frakci (Maes a kol., 2007). Ojedinelé je pozorování Bankové et al. (Bank a kol., 2011) popisující v nepermeabilizovaných myších splenocytech a permanentních buněčných liniích Jurkat (T lymfoblastoidní linie) a H9 (embryonální kmenové buňky) DPP-IV-podobnou aktivitu inhibovatelnou specifickými inhibitory DPP8 a 9. Autoři spekulují, zda se jedná o primárně extracelulární lokalizaci nebo o sekundární interakci původně extracelulárně secernované molekuly s plazmatickou membránou. Struktura molekul DPP8 a 9 navíc neobsahuje typickou transmembránovou doménu (Abbott a kol., 2000, Qi a kol., 2003).

Fibroblastový aktivační protein alfa (FAP), známý též pod názvem sepráza, je strukturně vysoce homologní s kanonickou DPP-IV a je považován za produkt její genové duplikace (Busek a kol., 2004). Kromě DPP-IV-podobné enzymové aktivity vykazuje i endopeptidázovou gelatinázovou aktivitu (Aertgeerts a kol., 2005). Stejně jako DPP-IV bývá jeho solubilní forma secernována buňkami a nacházíme jej též v plazmě periferní krve (Lee a kol., 2006). Expres FAP bývá spojována s migračním fenotypem buněk a jeho lokalizace byla prokázána např. v invadopodiích maligních buněk a spolu s dalšími secernovanými proteázami hraje roli v degradaci složek extracelulární matrix (Sedo a kol., 2001, Ramirez-Montagut a kol., 2004). FAP je exprimován nejen v řadě tumorů, ale i aktivovanými fibroblasty synoviální tkáně a u pacientů s osteoartrózou byla prokázána jeho role v destrukci chrupavky (Bauer a kol., 2006, Ospelt a kol., 2010). Ghersi a kol. popisují formace membránově vázaných komplexů FAP s DPP-IV a jejich vliv na migraci a invazi buněk (Ghersi a kol., 2002, Ghersi a kol., 2006). V našich studiích (Balaziova a kol., 2011), jsme prokázali ko-expresi DPP-IV a FAP na primárních kulturách i permanentních liniích odvozených z gliálních tumorů.

V posledních letech došlo k značnému rozšíření poznatků o možném využití diagnostického a terapeutického potenciálu DASH molekul, stejně tak jako ve studiu jejich funkčního významu v patogenezi řady onemocnění. U pacientů s RA byl pozorován pokles solubilní DPP-IV-podobné enzymové aktivity v periferní krvi ve srovnání s kontrolami a rovněž vyšší intenzita exprese na mononukleárních buňkách periferní krve (Balaziova a kol., 2006, Ohnuma a kol., 2011). Někteří autoři se rovněž snažili najít rozdíly v těchto parametrech mezi pacienty s vyšší/nížší aktivitou onemocnění (Gerli a kol., 1996, Ulusoy a kol., 2012) či jejich vztah ke klinickým parametrům souvisejícími s aktivitou RA. Jen málo prací se však zaměřilo u pacientů s revmatoidní artritidou na konkrétní charakterizaci DASH molekul, které by byly dostupné buďto v solubilní formě cirkulující v tělních tekutinách nebo jako membránově vázané molekuly a svojí DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou by se tak mohly přímo podílet na proteolytickém opracování lokálních mediátorů. Dosud publikované výsledky (Gerli a kol., 1996, Balaziova a kol., 2006) navíc naznačují, že lze očekávat jejich odlišné chování a úlohu na systémové úrovni tj. v periferní krvi a v lokálním synoviálním mikroprostředí. Dosud nebyla provedena longitudiální studie, která by se zaměřila na intraindividuální charakterizaci molekul DASH systému u jednotlivých pacientů v závislosti na vývoji aktivity jejich onemocnění.

Hypotéza

Ve srovnání s pacienty s osteoartrózou (OA) jsou u pacientů trpících revmatoidní artritidou (RA) pozorovány významné rozdíly DPP-IV na systémové (periferní krev) a lokální (kloubní výpotek) úrovni.

Důsledkem je pravděpodobně změna zpracování biologicky aktivních peptidů přítomných jak v cirkulaci, tak v kloubním prostředí přítomnou solubilní, nebo na buněčných površích lokalizovanou DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou a tím i výsledný patogenetický efekt - perpetuace a rozvoj zánětlivého procesu.

Identifikace molekul "DASH systému", jejichž exprese je v souběhu nebo v důsledku zmíněné dysregulace změněna, může vést k nalezení nových diagnostických přístupů a nebo prognostických úvah a současně k návrhu nových terapeutických modalit, regulujících specificky aktivitu patogeneticky významných DASH molekul.

Cíle práce

- I. Identifikace DASH molekul nesoucích DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu v plazmě a na povrchu mononukleárních buněk periferní krve a synoviální tekutiny a jejich reakčních partnerů**
- II. Porovnání exprese a DPP-IV-podobné aktivity vybraných DASH molekul, jejich substrátů a receptorů u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) ve srovnání s pacienty s osteoartrózou (OA) na lokální a systémové úrovni**
- III. Intraindividuální posouzení vztahu vybraných DASH molekul v periferní krvi ke klinickému průběhu RA**

Materiál a metody

Pacientský soubor

V Revmatologickém ústavu v Praze byla rekrutována skupina pacientů s aktivní RA (diagnostika dle standardních kritérií (Arnett a kol., 1988) a kontrolní skupina tvořená pacienty s osteoartrózou (OA), kteří měli v době zařazení do studie výpotek v kolenním kloubu (Tabulka 1).

Aktivita revmatoidní artritidy byla hodnocena na základě tzv. DAS28 skóre (Prevoa a kol., 1995) vypočítaného z hodnoty plazmatické koncentrace C-reaktivního proteinu (CRP), pacientem uvedené hodnoty VAS (vizuální analogové škály) a počtu bolavých a oteklých kloubů (<http://www.das-score.nl/>).

Tabulka 1. Klinické charakteristiky studovaných skupin pacientů.

	Revmatoidní artritida (n=27)	Osteoartróza (n=15)
Věk	59 ± 13	62±11
Muži/Ženy	7/20	6/9
Délka onemocnění (roky)	12.5±12.4	-
Počet bolavých kloubů (0-28)	9±6.3	-
Počet oteklých kloubů (0-28)	11± 6.7	-
DAS 28	5.8±1.1	-
FW (mm/h)	56±28.2	10±6.4
CRP (mg/l)	44±26	5± 4

DAS 28, disease activity score; CRP, C-reaktivní protein, FW, rychlost sedimentace červených krvinek. Hodnoty jsou uvedeny jako medián±SD.

Následné (follow-up) vyšetření bylo u pacientů s RA provedeno v době, kdy neměli kloubní výpotek a uplynulo alespoň 6 měsíců od vstupního vyšetření a zařazení do studie. Intraindividuální změny studovaných parametrů byly hodnoceny u pacientů vykazujících alespoň mírný pokles aktivity onemocnění, definovaný jako změna DAS28 skóre (pokles DAS28 větší než 0.6 oproti vstupnímu vyšetření, jestliže současná hodnota je menší než 5.1 a nebo jako pokles DAS28 větší než 1.2 jestliže současná hodnota je větší než 5.1, Tabulka 2) (https://www.rheumatology.org/practice/clinical/indexes/members/Disease_Activity_Score_Sheet.pdf).

Tabulka 2. Klinická charakteristika skupiny pacientů s RA vykazující alespoň mírný pokles aktivity onemocnění ve follow-up vyšetření.

	Vstupní hodnoty	Follow-up
Věk	60±16	61±16
Muži/Ženy	5/13	5/13
Délka onemocnění (roky)	4.5±13.3	5.5±13.5
Počet bolavých kloubů (0-28)	9±6	2±3
Počet oteklých kloubů (0-28)	11.5±6.5	2.5±6.6
DAS 28	5.66±0.97	3.49±1.22
FW (mm/h)	56±27.7	30±24.1
CRP (mg/l)	51.08±24.49	7.31±19.13

DAS 28, disease activity score; CRP, C-reaktivní protein, FW, rychlost sedimentace červených krvinek. Hodnoty jsou uvedeny jako medián±SD.

V letech 2011-2012 (5 let po vstupním odběru) pak u všech pacientů zařazených do studie bylo provedeno kontrolní rentgenologické vyšetření k posouzení přítomnosti eroze

kloubů. Pouze u pěti pacientů byla pozorována progresse erozí kloubů (Tabulka 3).

Tabulka 3. Radiologicky hodnocená progresse erozí kloubů u pacientů zahrnutých do studie

Kód pacienta	Pohlaví	Stupeň eroze		
		Vstupní vyšetření	Follow-up vyšetření	Vyšetření po 4 letech
1	žena	I	II	III
22	žena	I	I	II
34	žena	III	IV	IV
35	muž	II	IV	IV
47	muž	I	I	III

Pacientům byla při vstupním vyšetření odebrána periferní krev a synoviální tekutina. V rámci follow-up vyšetření pak byl proveden pouze odběr periferní krve. Studie byla schválena etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze a byla v souladu s Helsinskou deklarací. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Biologický materiál

Izolace mononukleárních buněk

Periferní krev byla odebrána do „BD Cell preparation tube“ (BD Biosciences, USA) obsahující jako protisrážlivou látku heparin a ficoll pro efektivní gradientovou separaci. Vacutainer byl centrifugován 20 minut při teplotě 20°C a 2000g kdy došlo k oddělení erytrocytů a vytvoření vrstvy BMNC

Synoviální tekutina byla po punkci výpotku z kolene odebrána do sterilních „BD Vacutainer“ (BD Biosciences, USA) obsahujících heparin. Mononukleární buňky byly získány gradientovou centrifugací (40 minut při teplotě 20°C a 1000g) na gradientu vytvořeného pomocí Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Sweden).

Vyizolované buňky byly odebrány, dvakrát promyty roztokem PBS a následně byla stanovena jejich koncentrace na přístroji Z2 Coulter (Beckman Coulter, USA). Viabilita izolovaných buněk byla potvrzena testem s Trypanovou modří.

Příprava plazmy a synoviální tekutiny pro analýzy

Periferní krev i synoviální tekutina byly po odebrání do BD vacutaineru s heparinem uloženy na led. Pro stanovení koncentrace Substance P byl vždy 1ml heparinizované krve ihned po odběru přenesen do zkumavky obsahující aprotinin (0,014 TIU/ml vzorku, Sigma Aldrich, USA). Všechny typy vzorků byly následně centrifugovány (15 minut, 4°C, 850g) a supernatanty odebrány. Vzorky pro analýzu DPP-IV-podobné enzymové aktivity byly ihned analyzovány, alikvoty pro stanovení koncentrace DPP-IV, FAP, SDF a SP byly zamrazeny na -80°C.

Analýza buněk průtokovou cytometrií

Pro imunofenotypizační studie byly použity vzorky heparinizované periferní krve (PB) nebo synoviální tekutiny (SF) získané z kloubního výpotku. Vzorky SF byly centrifugovány (5 min, 4 °C, 233 g), pelet promyt a resuspendován v RPMI 1640 mediem (Lonza, Švýcarsko) a zfiltrován (50 µm cup filters, BD Biosciences, USA). 50µl vzorku bylo inkubováno 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě se směsí protilátek (Tabulka 4).

Tabulka 4. Protilátky pro průtokovou cytometrii

Protilátka	Zdroj	Ředění	Klon	Fluorochrom	Výrobce
anti-CD3	myš	1 : 20	SK7	PerCP	BD Bioscience
anti-CD4	myš	1 : 20	SK3	APC	BD Bioscience
anti-CD8	myš	1 : 20	SK1	PE-Cy7	BD Bioscience
anti-CD14	myš	1 : 20	M5E2	APC-Cy7	BD Bioscience
anti-CD26/DPP-IV	krysa	1 : 20	222113	FITC	RD systems
anti-CXCR4	myš	1 : 20	12G5	PE	RD systems
anti-FAP α stalk region	králík	1 : 50	-	-	Abcam
anti-FAP α spacer region	králík	1 : 50	-	-	Abcam
anti-NK1 receptor	králík	1 : 50	-	-	Abcam
anti-rabbit IgG H&L	koza	1 : 50	-	FITC	Abcam

PerCP - Peridinin chlorofyl protein; APC, Alofykocyanin; PE-Cy7, Fykoerytrin -Cyanin-7; APC-Cy7, Alofykocyanin -Cyanin-7; FITC, Fluorescein isothiokyanát; PE, Fykoerytrin

Erytrocyty ve vzorcích byly lyzovány pomocí BD FACS Lysing solution (BD Biosciences, USA) a vzorky byly následně promyty roztokem BD Cell wash (BD Biosciences, USA). V případě nepřímé imunofluorescence byla po tomto promytí provedena 30 minut dlouhá inkubace ve tmě a při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou (Tabulka 4). Analýza byla prováděna na přístroji BD FACS Canto (BD Biosciences, USA) se softwarem Diva 5 pro akvizici. K vlastnímu kvantitativnímu vyhodnocení pak byl používán software FlowJo (TreeStar, Inc. USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako % pozitivních buněk ze sledované populace, nebo jako podíl mediánu intenzity fluorescence (MFI) pozitivních a negativních populací buněk.

Stanovení DPP-IV-podobné enzymové aktivity

DPP-IV-podobná enzymová aktivita byla stanovována spektrofotometricky za přítomnosti 50 μ mol/l 7-(Glycyl-L-Prolylamido)-4-methylkumarinu (Bachem AG, Švýcarsko) jako substrátu. Detekce byla prováděna při excitační vlnové délce 380 nm a emisní 460 nm na spektrofotometru Perkin Elmer LS50B (Perkin Elmer, USA). Aktivita byla měřena v krevní plazmě, supernatantu synoviální tekutiny a ve viabilních mononukleárních buňkách periferní krve a synoviální tekutiny při pH 7,4 a 37°C. Pro zjištění celkové aktivity byly pak buňky permeabilizovány pomocí 0.1% Triton X-100 (Balaziova a kol., 2006). Inhibiční studie byly prováděny s použitím specifických inhibitorů DPP-IV a DPP8/9, získaných v rámci spolupráce s Ferring Research (USA) (Stremenova a kol., 2007) .

Izolace a kvantifikace celkové RNA, real-time RT PCR

Mononukleární buňky vyizolované z periferní krve i synoviální tekutiny byly resuspendovány v 2,5 ml izolačního činidla TriZol (Life Technologies, USA), celková RNA byla izolována činidlem TriZol dle instrukcí výrobce. Koncentrace celkové RNA byla stanovena kitem RiboGreen RNA Quantitation Kit (Life Technologies, USA). Ke studiu exprese DPP-IV, FAP, NK1R, CXCR4 a β -aktin (interní referenční transkript) mRNA byly využity gen kódující region-specifické priméry a fluorogenní TaqMan próby, připravené v programu Primer Express (Applied Biosystems - Life Technologies, USA). Jejich přehled je

uveden v tabulce 5. Expres byla kvantifikována spřaženou real time RT-PCR s využitím ThermoScript One-Step System (Life Technologies, USA). Analýzy byly prováděny v dubletech v MicroAmp Optical 96-jamkové desce na přístroji ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems - Life Technologies, USA). Expres cílových transkriptů byla normalizována na expresi mRNA β -aktinu použitím Δ Ct metody (Livak a Schmittgen 2001)

Enzyme-linked immunoassay (ELISA)

DPP-IV, FAP a SDF

Pro stanovení koncentrace DPP-IV, FAP a SDF byly použity komerčně dodávané kity „DuoSet“ firmy RD Systems (USA) DPP-IV/CD26 DY1180, FAP DY3715 a CXCL12/SDF DY350. Příprava všech reagensů byla provedena dle instrukcí výrobce. Vzorky heparinizované plazmy i synoviální tekutiny byly pro stanovení DPP-IV a FAP naředěny 1000x, pro analýzu SDF 2x roztokem 1% BSA v PBS. 96-jamková destička byla přes noc inkubována na třepačce při pokojové teplotě se 100 μ l roztoku protilátky, 4x opláchnuta roztokem PBS s 0,05% Tween-20 na přístroji Hydroflex (Tecan, Švýcarsko) a hodinu blokována roztokem 1% BSA v PBS. Po promytí byly do jamek nanесeny vzorky i standardy v duplikátech a dvě hodiny inkubovány na třepačce při pokojové teplotě. Po promytí byla do jamek nanесena detekční protilátka a inkubována (2 hodiny, pokojová teplota). Poté byly jamky promyty a 20 minut (SDF 40 minut) inkubovány ve tmě s roztokem Streptavidin-HRP (součást kity) a následně se 100 μ l substrátu (DY999, RD systems USA), připraveného smícháním roztoků „Color reagent A“ (stabilizovaný peroxid vodíku) a „Color reagent B“ (stabilizovaný tetrametylbenzidín) v poměru 1:1 (20 minut DPP-IV a FAP, 40 minut SDF). Reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 2N kyseliny sírové. Optická densita byla měřena na přístroji Sunrise (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 450nm s korekcí na 540nm.

Substance P

Pro stanovení koncentrace byl použit Substance P Parameter Assay Kit firmy RD systems (USA) KGE007, který funguje na principu kompetitivního enzymového imunostanovení. Do každé jamky bylo dle instrukcí napipetováno 50 μ l naředěné plazmy (1:1 s roztokem „Calibrator diluent“, součást kity), 50 μ l primární protilátky a 50 μ l konjugované Substance P. Deska s jamkami byla 3 hodiny inkubována na třepačce při pokojové teplotě a 4x opláchnuta roztokem PBS s 0,05% Tween-20 na přístroji Hydroflex (Tecan, Švýcarsko). Do jamek bylo přidáno 200 μ l substrátu (peroxid vodíku a tetrametylbenzidín v poměru 1:1, součást kity). Reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 2N kyseliny sírové. Optická densita byla měřena na přístroji Sunrise (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 450nm s korekcí na 540nm.

Statistická analýza

Statistická analýza byla prováděna v programu Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., USA). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou hodnoceny pomocí Mann-Whitneyho U-testu a v případě intraindividuálního posuzování změn u pacientů pak použitím Wilcoxonova párového testu, korelace byly analyzovány pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Tabulka 5. Přehled primérů a prób pro real time RT-PCR

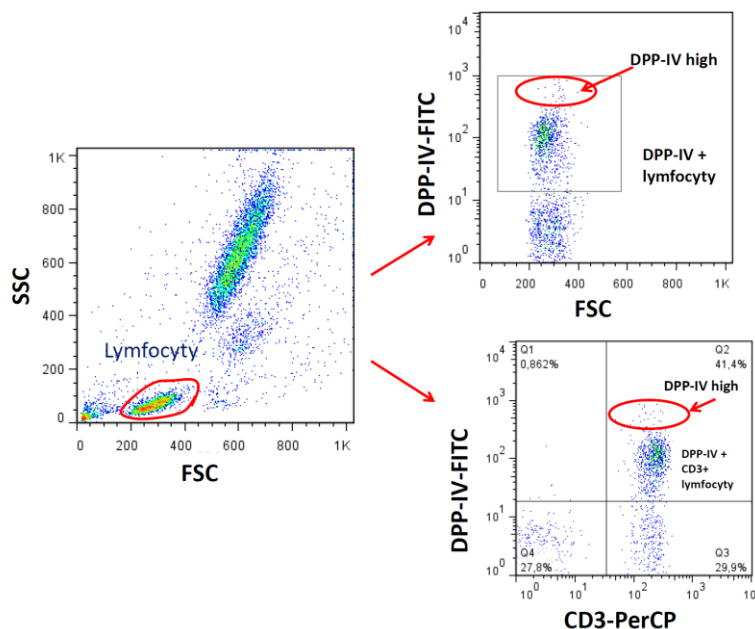
Transkript	GeneBank Vstupní číslo.	Sekvence a finální koncentrace primérů a TaqMan prób
DPP-IV	NM_001935	Forward primér: 5'-TGGAAGTTCTTCTGGGACTG-3', 200 nmol/l Reverse primér: 5'-GATAGAATGTCCAAACTCATCAAATGT-3', 200 nmol/l TaqMan próba: 5'-(6-FAM)CACCGTGCCCGTGGTCTCTGCT(TAMRA)-3', 200 nmol/l
FAP	NM_004460	Forward primér: 5'-TGCCACCTCTGCTGTGC-3', 200 nmol/l Reverse primér: 5'-GAAGCATTACACTTTTCATGGT-3', 200 nmol/l TaqMan próba: 5'-(6-FAM)TGCATGTCTTACGCCCTTCAAGAGTTC(TAMRA)-3', 200 nmol/l
NK1	NM_001058	Forward primér: 5'-CAGTGGTGAACCTTACCTATGCT-3', 400 nmol/l Reverse primér: 5'-GATGTATGATGGCCATGTACCTATC-3', 400 nmol/l TaqMan próba: 5'-(6-FAM)TCCACAACCTCTTTCCCATCGCCG(TAMRA)-3', 200 nmol/l
CXCR4	NM_001008540	Forward primér: 5'-CATGGGTTACCAGAAGAACTGA-3', 400 nmol/l Reverse primér: 5'-GACTGCCTTGCATAGGAAGTTC-3', 400 nmol/l TaqMan próba: 5'-(6-FAM)CACCTGTCAGTGGCCGACCTCCT(TAMRA)-3', 200 nmol/l
β-Aktin	NM_001101	Forward primér: 5'-CTGGCACCCAGCACAATG-3', 200 nmol/l Reverse primér: 5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3', 200 nmol/l TaqMan próba: 5'-(VIC)AGCCGCGGATCCACACGGAGT(TAMRA)-3', 200 nmol/l

Výsledky

I. Identifikace DASH molekul nesoucích DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu v plazmě a na povrchu mononukleárních buněk periferní krve a synoviální tekutiny a jejich reakčních partnerů

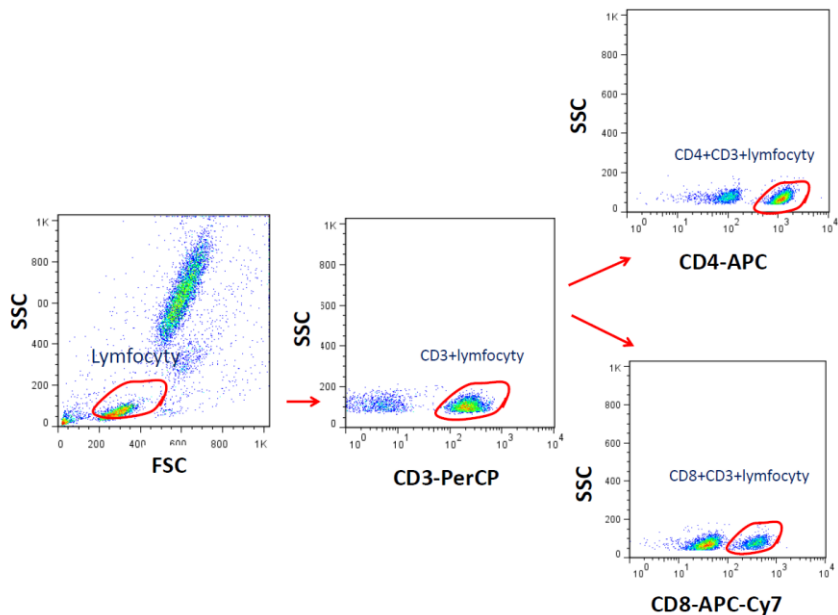
Detekce DASH molekul na mononukleárních buňkách

Metodou průtokové cytometrie byla analyzována přítomnost DPP-IV, FAP, CXCR4 a NK1 receptoru na populacích lymfocytů a v monocytech v periferní krvi a synoviální tekutině pacientů s RA a OA. Lymfocyty byly definovány dle optických parametrů a následně s využitím monoklonální protilátky anti-CD3 jako T lymfocyty (Obrázek 3).



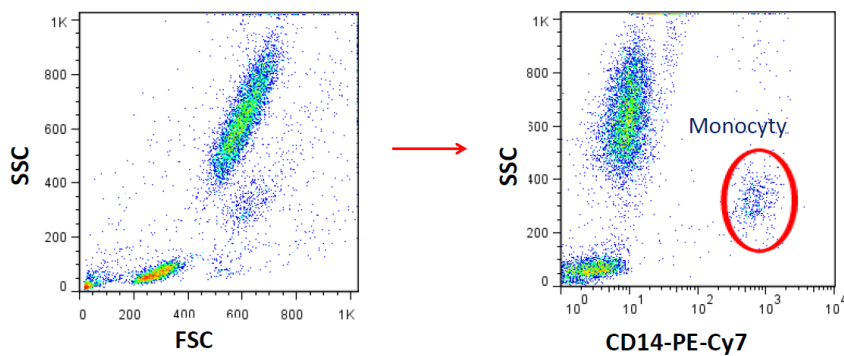
Obrázek 3. Gatovací strategie pro identifikaci lymfocytární populace a exprese DPP-IV. DPP-IV je dominantně lokalizována na CD3+ lymfocytech, zatímco na CD3- lymfocytech je prakticky nedetekována. V některých vzorcích byla patrná přítomnost DPP-IV vysoce pozitivní (high) populace CD3+lymfocytů. Typický experiment.

Subpopulace lymfocytů (Obrázek 4) byly definovány jako Th (CD4+CD3+lymfocyty) a Tc (CD8+CD3+lymfocyty). Monocyty byly identifikovány jako CD14+ buňky (Obrázek 5 a 6)

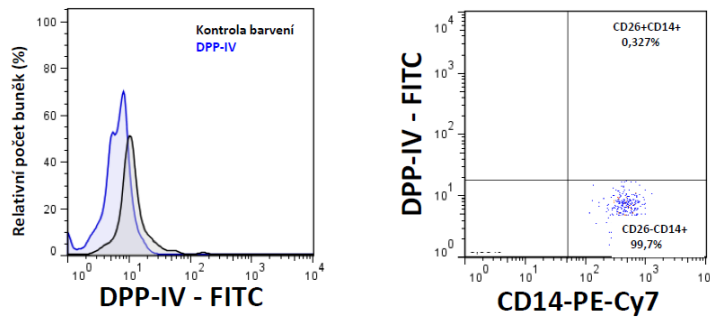


Obrázek 4. Gatovací strategie pro identifikaci T lymfocytárních subpopulací CD4+ a CD8+ buněk . Typický experiment.

Na všech analyzovaných vzorcích periferní krve i synoviální tekutiny pacientů s RA i OA byla detekována přítomnost DPP-IV a receptoru CXCR4. Zatímco CXCR4 byl exprimován na lymfocytech i monocytech, DPP-IV byla dominantně (95-100%) přítomná na CD3+ lymfocytech. Pozitivita detekovaná na CD3- lymfocytech a monocytech (definovaných jako CD14+ buňky) byla spíše výjimečná a na hranici detekce. Ve většině vzorků nebyla hodnotitelná tzv. DPP-IV high populace pozitivních buněk (Obrázek 3).



Obrázek 5. Gatovací strategie pro identifikaci monocytní populace. Monocyty byly charakterizovány jako CD14+buňky. Typický experiment.

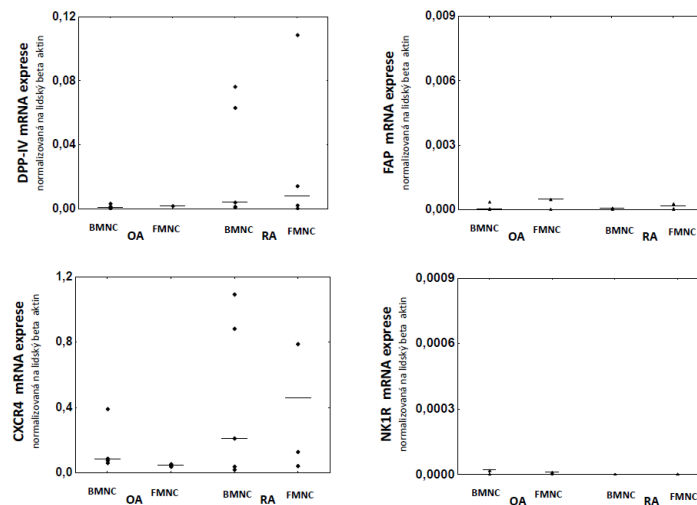


Obrázek 6. Detekce exprese DPP-IV na monocyttech (CD14+ buňkách).

Není detekovatelná změna intenzity fluorescence po obarvení monocytů protilátkou proti DPP-IV s fluorochromem FITC oproti kontrole barvení (vlevo) ani subpopulace DPP-IV pozitivních buněk (dot-plot, vpravo). Typický experiment.

Na vzorcích BMNC ani FMNC nebyla metodou průtokové cytometrie prokázána přítomnost FAP ani receptoru NK1 žádnou z použitých protilátek. Proto jsme se rozhodli ověřit na několika vzorcích separovaných BMNC a FMNC případnou expresi FAP a NK1-R transkriptu pomocí real-time RT-PCR. V grafu jsou uvedeny relativní hodnoty exprese jednotlivých transkriptů normalizovaných na hodnotu exprese beta-aktinu (Obrázek 7). Tyto výsledky potvrdily, že FAP a NK1R (NK1 receptor) nebyly v mononukleárních buňkách přítomny ani na úrovni transkriptu.

Na všech vzorcích BMNC i FMNC byla nalezena povrchově vázaná DPP-IV-podobná enzymová aktivita, jejímž zdrojem je tedy pravděpodobně kanonická DPP-IV.



Obrázek 7. Exprese mRNA DPP-IV, FAP, NK1R a CXCR4 v mononukleárních buňkách normalizovaná na lidský beta aktin. Na mononukleárních buňkách periferní krve (BMNC) i synoviální tekutiny (FMNC) byla u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) i osteoartrózou (OA) potvrzena přítomnost transkriptu DPP-IV a CXCR4, zatímco exprese FAP a NK1R zde prokázána nebyla.

Detekce molekul DASH systému v plazmě periferní krve a solubilní komponentě synoviální tekutiny

Ve všech vzorcích plazmy periferní krve i solubilní (bezbuněčné) komponentě synoviální tekutiny byla detekována DPP-IV-podobná enzymová aktivita, která byla velmi

dobře inhibovatelná DPP-IV specifickým inhibitorem (IC50 pro rekombinantní protein 2 nmol/l vs. 4,8 nmol/l ve vzorcích plazmy a 5,8 nmol/l pro solubilní frakci SF). Pro specifický inhibitor DPP8/9 (IC50 pro rekombinantní protein DPP8 je 4 nmol/l a pro DPP9 20 nmol/l) byly naměřeny hodnoty IC50 546 nmol/l ve vzorcích plazmy a 498 nmol/l pro solubilní frakci SF svědčící proti významné přítomnosti těchto enzymů v námi analyzovaném materiálu.

Koncentrace DPP-IV stanovená metodou ELISA signifikantně korelovala s DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou v plazmě ($r=0.83$, $p<0.001$) i v synoviální tekutině ($r=0.61$, $p<0.001$). FAP byl ve vzorcích s využitím ELISA rovněž detekovatelný, avšak jeho koncentrace byla několikanásobně nižší než koncentrace DPP-IV a s DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou nekoreloval (Tabulky 6 a 7). Z těchto výsledků vyplývá, že dominantním nositelem DPP-IV-podobné enzymové aktivity v plazmě periferní krve a solubilní komponentě synoviální tekutiny je kanonická DPP-IV.

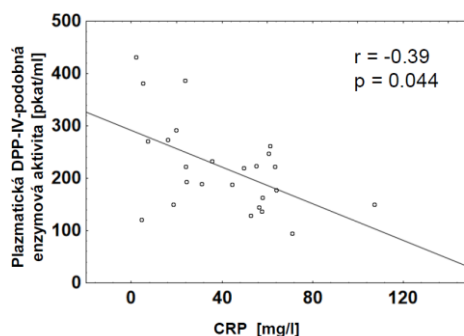
Koncentrace biologicky aktivních substrátů DPP-IV SDF a SP byly ve všech našich vzorcích nad detekčním limitem použité metody, avšak dostupné protilátky proti SDF a SP neumožňují rozlišení peptidů biologicky aktivních (intaktních) a inaktivovaných (proteolyticky opracovaných) DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou. Stanovená koncentrace je tak spíše nepřímou informací o celkovém množství a obratu prozánětlivého mediátoru než o jeho biologicky aktivní frakci.

II. Porovnání exprese a DPP-IV-podobné aktivity vybraných DASH molekul, jejich substrátů a receptorů u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) ve srovnání s pacienty s osteoartrózou (OA) na lokální a systémové úrovni

Periferní krev

Ve vzorcích BMNC pacientů s aktivní RA ve srovnání s nemocnými s OA nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v DPP-IV-podobné enzymové aktivitě ani procentuálním zastoupení DPP-IV či CXCR4 pozitivních buněk (Tabulka 6). Pacienti s aktivní RA ve srovnání s kontrolní skupinou ovšem vykazovali signifikantně nižší plazmatickou DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitu i koncentraci DPP-IV v krevní plazmě (Tabulka 6). Tato aktivita u pacientů s RA významně negativně korelovala s koncentrací proteinu akutní fáze CRP ($r = -0.39$ $p<0.05$, Obrázek 8).

U pacientů s RA byla oproti kontrolní skupině pozorována vyšší plazmatická koncentrace SDF i SP, ale nebyla zde nalezena žádná statisticky významná korelace ani s DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou ani s ELISA stanovenými koncentracemi DPP-IV a FAP. Rovněž nebyl pozorován statisticky významný vztah obou prozánětlivých mediátorů k přítomnosti DPP-IV a receptoru CXCR4 na povrchu krevních mononukleárních buněk.



Obrázek 8. Negativní korelace koncentrace CRP a DPP-IV-podobné enzymové aktivity v plazmě periferní krve pacientů s RA. Spearmanův korelační koeficient

Synoviální tekutina

Signifikantně nižší DPP-IV-podobná enzymová aktivita i množství DPP-IV pozitivních buněk bylo pozorováno ve vzorcích FMNC u pacientů s RA ve srovnání s OA (Tabulka 7). Ve FMNC nemocných s RA byla navíc pozorována i nižší intenzita exprese u DPP-IV pozitivních lymfocytů (vyjádřená jako medián intenzity fluorescence - MFI pozitivní/negativní populace; medián±SD 34.2±14.0 v RA vs. 65.3±30.6 v OA, p= p<0.05) než u pacientů s OA. Stejně jako v periferní krvi, byla u pacientů s OA i v buňkách ze synoviální tekutiny DPP-IV dominantně exprimována na CD4+ lymfocytech, zatímco u pacientů s RA nebyla podobná převažující exprese DPP-IV na CD4+ v porovnání s CD8+ lymfocyty synoviální tekutiny pozorována (Obrázek 9),

DPP-IV-podobná enzymová aktivita, stejně jako ELISA stanovená koncentrace DPP-IV a FAP v solubilní komponentě synoviální tekutiny mezi oběma skupinami nemocných nevykazovaly signifikantní rozdíl (Tabulka 7)

Tabulka 6. Porovnání exprese a DPP-IV-podobné enzymové aktivity vybraných DASH molekul a přítomnost jejich substrátů a receptorů u pacientů s revmatoidní artritidou ve srovnání s pacienty s osteoartrózou v periferní krvi

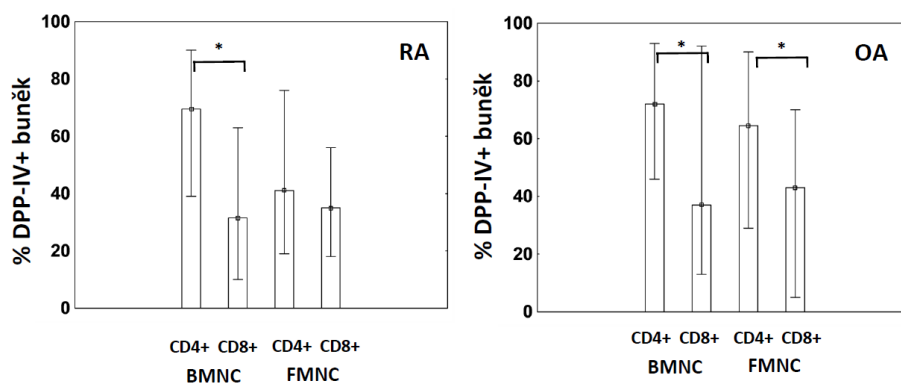
	Revmatoidní artritida	Osteoartróza	Statistická analýza
BMNC			
DPP-IV-podobná enzymová aktivita pkat/10 ⁵ buněk	0.15±0.075	0.18±0.079	n.s.
DPP-IV+ lymfocyty (%)	46.7±14.9	50.9±18.4	n.s.
DPP-IV+ monocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
FAP+ lymfocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
FAP+ monocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
CXCR4+ lymfocyty (%)	28.5±25.5	20.0±18.2	n.s.
CXCR4+ monocyty (%)	44.5±26.5	43.0±24.6	n.s.
NK1R+ lymfocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
NK1R+ lymfocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
Plazma			
DPP-IV-podobná enzymová aktivita pkat/ml	220.15±83.6	376.9±144.9	p<0.001
DPP-IV koncentrace ng/ml	465.1±215.6	953.3±368.4	p<0.001
FAP koncentrace ng/ml	56.7±47.3	73.3±30.7	n.s.
SDF koncentrace pg/ml	170.0±214.0	50.0 ± 51.0	p<0.05
SP koncentrace pg/ml	495.0±83.6	262.0±220.7	p<0.05

BMNC – mononukleární buňky periferní krve, DPP-dipeptidylpeptidáza, FAP – fibroblastový aktivační protein alfa, SDF - Stromal cell-derived factor 1- α , SP – substance P, n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl mezi skupinami, hodnoty jsou vyjádřeny jako medián±SD

Tabulka 7. Porovnání exprese a DPP-IV-podobné enzymové vybraných DASH molekul a přítomnost jejich substrátů a receptorů u pacientů s revmatoidní artritidou ve srovnání s pacienty s osteoartrózou v synoviální tekutině

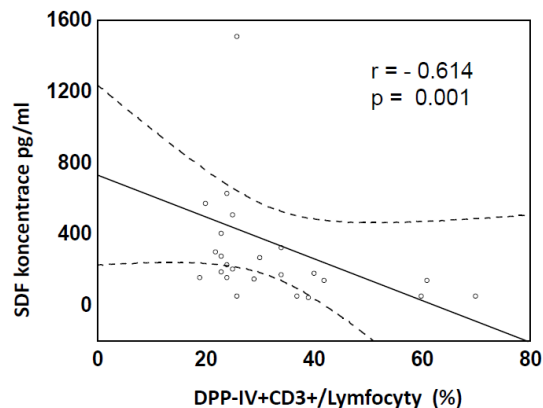
	Revmatoidní artritida	Osteoartróza	Statistická analýza
FMNC			
DPP-IV-podobná enzymová aktivita pkat/10 ⁵ buněk	0.16±0.16	0.37±0.84	p<0.05
DPP-IV+ lymfocyty (%)	33.7±15.9	52.6±16.4	p<0.05
DPP-IV+ monocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
FAP+ lymfocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
FAP+ monocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
CXCR4+ lymfocyty (%)	38.5±22.6	23.0±24.5	n.s.
CXCR4+ monocyty (%)	37.0±23.8	37.0±20.9	n.s.
NK1R+ lymfocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
NK1R+ monocyty (%)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	
Solubilní komponenta			
DPP-IV-podobná enzymová aktivita pkat/ml	90.9±33.9	96.5±30.8	n.s.
DPP-IV koncentrace ng/ml	315.0 ± 152.0	293.0 ± 101.0	n.s.
FAP koncentrace ng/ml	58.0 ± 38.0	49.0 ± 41.0	n.s.
SDF koncentrace pg/ml	174.0±513.0	55.0 ± 219.0	p<0.05
SP koncentrace pg/ml	459.0±126.5	256.0±192.7	p<0.05

FMNC – mononukleární buňky synoviální tekutiny, DPP–dipeptidylpeptidáza, FAP – fibroblastový aktivační protein alfa, SDF - Stromal cell-derived factor 1- α , SP – substance P, n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl mezi skupinami, hodnoty jsou vyjádřeny jako medián±SD



Obrázek 9. Procentuelní zastoupení DPP-IV pozitivních buněk v rámci CD4+ a CD8+ populací lymfocytů. BMNC – mononukleární buňky periferní krve, FMNC – mononukleární buňky synoviální tekutiny, DPP-IV –dipeptidylpeptidáza-IV, RA – revmatoidní artritida, OA – osteoartróza, * p< 0.05, Manm-Whitneyův U test

U pacientů s RA byla pozorována vyšší koncentrace SDF i SP ve srovnání s kontrolní skupinou. Na rozdíl od systémové úrovně (periferní krve), na lokální úrovni (v kloubním výpotku) koncentrace SDF v solubilní komponentě u pacientů s RA významně negativně korelovala s množstvím DPP-IV+ CD3+lymfocytů synoviálního výpotku ($R = -0.614$; $p = 0.001$, Obrázek 10)



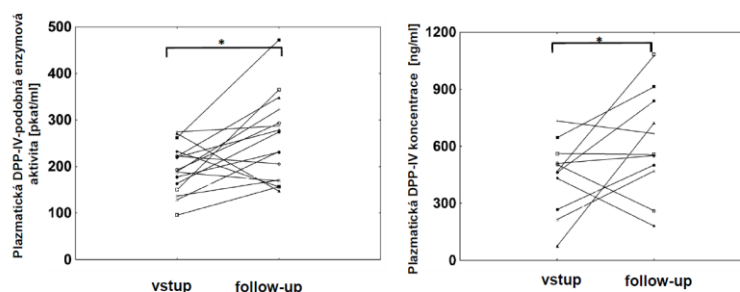
Obrázek 10. Negativní korelace procentuálního zastoupení DPP-IV+CD3+lymfocytů (DPP-IV+T lymfocytů) a koncentrace SDF (stromal cell-derived factor 1- α) v synoviální tekutině pacientů s RA. Spearmanův korelační koeficient.

III. Intraindividuální posouzení vztahu DASH molekul ke klinickému průběhu RA

Jako dominantní nositel DPP-IV-enzymové aktivity v krevní plazmě i na mononukleárních buňkách periferní krve u pacientů s RA byla v první části studie identifikována kanonická DPP-IV. Proto byla intraindividuální sledování vztahu DASH molekul ke klinickému průběhu RA zaměřena na studium exprese a enzymové aktivity kanonické DPP-IV.

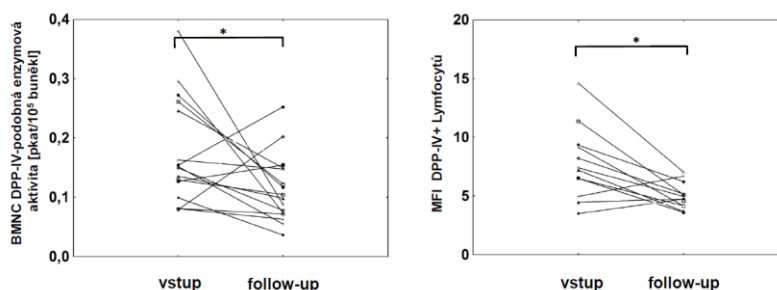
Pro analýzu byli ze skupiny pacientů s aktivní RA vybráni ti, u nich došlo k definovanému zlepšení (tj. poklesu aktivity onemocnění – viz Materiál a Metody, https://www.rheumatology.org/practice/clinical/indexes/members/Disease_Activity_Score_Sheet.pdf). U 13 pacientů našeho experimentálního souboru (72%), bylo toto zlepšení stavu onemocnění asociováno se vzestupem plazmatické DPP-IV-podobné enzymové aktivity alespoň o 20% ve srovnání se vstupní hodnotou u daného pacienta. U 3 pacientů (17%) zůstala aktivita nezměněna a u 2 (11%) poklesla.

Celkově lze říci, že plazmatická DPP-IV-podobná enzymová aktivita vzrostla na $141 \pm 46\%$ (medián \pm SD, $p=0.011$) v porovnání se vstupními hodnotami jednotlivých pacientů. Podobný vzestup na $168 \pm 25\%$ (medián \pm SD, $p=0.033$) vstupních hodnot individuálních pacientů byl pozorovaný i v případě koncentrace proteinu plazmatické DPP-IV stanovené metodou ELISA (Obrázek 11). Navzdory tomuto pozorování, vzestup plazmatické DPP-IV u pacientů s poklesem aktivity RA medián této hodnoty zůstává asi o 30% nižší než u pacientů bez zánětlivého kloubního onemocnění.



Obrázek 11. Intraindividuální porovnání plazmatické DPP-IV u pacientů s poklesem aktivity RA. Plazmatická DPP-IV-podobná enzymová aktivita a DPP-IV koncentrace analyzované u pacientů vykazujících pokles aktivity RA. Znázornění individuálních vstupních a follow-up hodnot. * $p < 0.05$, Wilcoxonův párový test

Opačný trend byl u nemocných s poklesem aktivity RA pozorován v BMNC (Obrázek 12). Povrchová DPP-IV-podobná enzymová aktivita BMNC poklesla na $66 \pm 56\%$ (medián \pm SD, $p=0.018$) individuálních vstupních hodnot pacientů. Procentuální zastoupení DPP-IV pozitivních lymfocytů u jednotlivých pacientů sice signifikantně pokleslo o $11 \pm 80\%$ (medián \pm SD, $p=0.029$), ale větší a významnější změny byly pozorovány v expresi DPP-IV kvantifikované jako medián intenzity fluorescence, který poklesl na $63 \pm 31\%$ vstupních hodnot (medián \pm SD, $p=0.005$).



Obrázek 12. Intraindividuální porovnání přítomnosti DPP-IV na povrchu mononukleárních buněk periferní krve (BMNC) u pacientů s poklesem aktivity RA. DPP-IV-podobná enzymová aktivita povrchu BMNC a medián intenzity fluorescence (MFI) DPP-IV+ lymfocytů u pacientů vykazujících pokles aktivity onemocnění RA. Znázornění individuálních vstupních a follow-up hodnot. * $p < 0.05$, Wilcoxonův párový test

Závěrem lze říci, že pokles aktivity RA individuálních pacientů byl spojen s nárůstem plazmatické DPP-IV a poklesem DPP-IV mononukleárních buněk periferní krve

Diskuze

Několik dřívějších studií, včetně prací naší laboratoře, poukazuje na možnou roli dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologních molekul (DASH) v autoimunitních zánětlivých onemocněních jako např. systémový lupus erythematosus a revmatoidní artritida (Hagihara a kol., 1987, Gotoh a kol., 1989, Kobayashi a kol., 2002).

Cílem této disertační práce bylo identifikovat spektrum DASH molekul podílejících se na celkové DPP-IV-podobné enzymové aktivitě u nemocných s RA v periferní krvi a synoviální tekutině a srovnat ho s kontrolní skupinou pacientů trpících osteoartrózou (OA) a dále posoudit možný vztah těchto molekul k aktivitě RA. Námi provedené inhibiční studie za využití specifických inhibitorů spolu s ELISA analýzami potvrdily dominantní podíl kanonické DPP-IV na celkové DPP-IV-podobné enzymové aktivitě jak v periferní krvi tak i synoviální tekutině a to i včetně významné korelace mezi DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou a koncentrací DPP-IV proteinu. Tato pozorování jsou v souladu s prací Durinx a kol. (Durinx a kol., 2000) v níž autoři popisují 95% podíl kanonické DPP-IV na celkové DPP-IV-podobné enzymové aktivitě v krevní plazmě. Naše imunodetekční studie, stejně tak jako expresní studie na úrovni mRNA, navíc neprokázaly přítomnost FAP na mononukleárních buňkách jak v periferní krvi, tak v synoviální tekutině, proto i zde je vysoce pravděpodobné, že membránově lokalizovaná DPP-IV-podobná enzymová aktivita BMNC a FMNC je pravděpodobně dominantním atributem kanonické DPP-IV. Pro další porovnání jsme se tedy zaměřili na studium kanonické DPP-IV v periferní krvi a synoviální tekutině u pacientů s RA ve srovnání s OA a následně na vlastní dynamiku DPP-IV u jednotlivých pacientů ve vztahu k aktivitě jejich onemocnění.

U pacientů trpících RA byla prokázána nižší plazmatická DPP-IV-podobná enzymová aktivita ve srovnání s kontrolní skupinou s nezářlivým kloubním onemocněním (Busso a kol., 2005, Balaziová a kol., 2006). Toto pozorování jsme dále rozvinuli v této práci, kdy pozorovaná plazmatická DPP-IV-podobná enzymová aktivita i koncentrace proteinu DPP-IV

byly o 50% nižší ve srovnání s pacienty s osteoartrózou. Ačkoliv Cuchacovich a kol. (Cuchacovich a kol., 2001) prokázali, že u pacientů s RA (na rozdíl od zdravých kontrol) dochází k hypersialylaci DPP-IV a tím ke snížení její specifické enzymové aktivity, naše výsledky v souladu s dalšími (Cordero a kol., , Busso a kol., 2005, Ulusoy a kol., 2012) ukazují, že nižší enzymová aktivita pozorovaná u RA pacientů je z velké části způsobena spíše poklesem koncentrace proteinu DPP-IV v plazmě. Funkční důsledek tohoto pozorování však stále zůstává neobjasněn. Nižší DPP-IV-podobná enzymová aktivita byla některými autory popisována i v synoviální tekutině pacientů s RA ve srovnání s OA (Gotoh a kol., 1989, Sedo a kol., 2005), nicméně tento závěr nebyl u všech autorů jednoznačný (Busso a kol., 2005) a zřejmě může záviset i na způsobu vyjádření specifické enzymové aktivity (přepočítání na objem nebo na koncentraci celkového proteinu ve vzorku; vzhledem k tomu, že celková koncentrace proteinu je ve výpotku u pacientů s RA významně vyšší než u OA, enzymová aktivita vyjádřená ve vztahu k celkové koncentraci proteinu mohou zdánlivě maskovat skutečný proteolytický potenciál DPP-IV přítomné v synoviální tekutině). V naší studii nebyl pozorován významný rozdíl mezi DPP-IV-podobnou enzymovou aktivitou synoviální tekutiny RA a OA pacientů vyjadřovanou na jednotku objemu výpotku (Sromova a kol., 2010).

Signifikantní vzestup exprese antigenu DPP-IV na CD4+ lymfocytech byl popsán u pacientů s chronickou (medián trvání onemocnění 11.5 let) revmatoidní artritidou (Ellingsen T 2007), zatímco u krátkodobě diagnostikovaných pacientů (< 6 měsíců), signifikantní rozdíl ve srovnání se zdravými kontrolami pozorován nebyl (Ellingsen a kol., 2012). V naší studii byli jako kontrolní skupina použiti pacienti s osteoartrózou. Nepozorovali jsme signifikantní rozdíl v proporcii DPP-IV pozitivních lymfocytů ani v intenzitě exprese DPP-IV mezi oběma patientskými skupinami. Variabilita v délce trvání onemocnění, rozdíly v použitých protilátkách anti-DPP-IV a rozdílné kontrolní skupiny (pacienti s osteoartrózou vs. zdravé kontroly) použité v naší studii mohli zapříčinit pozorovaný rozdíl mezi našimi výsledky a daty v citované literatuře. V souladu s dříve publikovanými výsledky naší laboratoře (Balaziová a kol., 2006), jsme nepozorovali signifikantní rozdíly v DPP-IV-podobné enzymové aktivitě na mononukleárních buňkách periferní krve mezi RA a OA pacienty, zatímco v FMNC byla pozorována významně nižší DPP-IV-podobná enzymová aktivita u pacientů s RA. Tato nižší enzymová aktivita korespondovala i s nižším procentuálním zastoupením DPP-IV+ lymfocytů i intenzitě exprese DPP-IV (MFI) na těchto buňkách (Sromova a kol., 2010). Naše pozorování podporují i dřívější práce Muscata a kolektivu, kteří pozorovali procentuálně menší populaci DPP-IV+CD3+FMNC vykazující též nižší intenzitu fluorescence u pacientů s aktivní RA ve srovnání s OA. (Muscat a kol., 1994), avšak v další práci částečně poukazují na fakt, že přesné počty pozitivních buněk jsou do jisté míry závislé i na typu použité protilátky (Gerli a kol., 1996). DPP-IV pozitivita na buňkách je spojována s migračním fenotypem buněk infiltrujících revmatoidní synovii (Ohnuma a kol., 2006). Tento jev může být příčinou relativního úbytku DPP-IV+ FMNC v kloubním výpotku u RA pacientů pozorovaných v této studii, avšak nelze vyloučit ani primární pokles exprese DPP-IV FMNC u pacientů s RA (Sromova a kol., 2010).

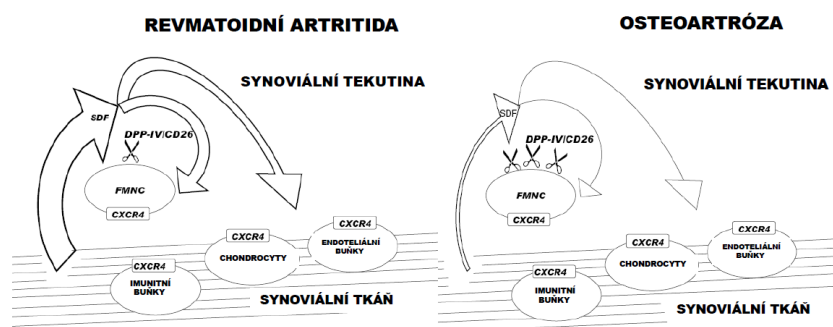
Na buňkách periferní krve je DPP-IV exprese dominantně přítomna na CD4+ T lymfocytech (Morimoto a kol., 1989). Podobnou distribuci jsme v naší studii pozorovali u OA BMNC i FMNC, nikoliv však u RA, kde DPP-IV pozitivita byla rovnoměrně rozložena mezi CD4+ a CD8+ buňky i když relativní proporce obou těchto subpopulací ve výpotku se mezi oběma skupinami nemocných významně nelišila (Obrázek 9).

SDF, biologický substrát DPP-IV, dosahuje vyšších koncentrací v synoviální tekutině nemocných s RA než s OA (Wei a kol., 2006, Kim a kol., 2007). Tato zvýšená dostupnost SDF v synoviálním prostředí je považována za faktor vedoucí ke zvýšené neovaskularizaci, infiltraci imunitních buněk do synoviální membrány a k destruktivnímu účinku na chondrocyty (Pablos a kol., 2003, Bauer a kol., 2006). Tento efekt zvýšeného uvolňování

SDF, substrátu DPP-IV, ze zánětlivé tkáně může být dále potencován námi pozorovanou nižší přítomností DPP-IV na FMNC přítomných v synoviální tekutině (Sromova a kol., 2010), Obrázek 13). V průběhu pěti let po ukončení studie došlo k progresi eroze kloubů u sledované skupiny pacientů pouze u pěti. Pravděpodobně i z tohoto důvodu jsme při porovnání ostatních sledovaných parametrů na této malé skupině nemohli pozorovat žádný významný vztah k námi sledovaným parametrům. Soubor nemocných by z tohoto hlediska vyžadoval další sledování.

Některé publikované studie spekulují možný vztah DPP-IV a aktivity RA. Cordero a kol. (Cordero a kol., 2001) popsali negativní korelaci mezi koncentrací proteinu DPP-IV v krevním séru a počtem oteklých kloubů, avšak nepozorovali rozdíly v sérové koncentraci DPP-IV mezi skupinami s aktivní a neaktivní RA. Podobně ani Ulusoy a kol. (Ulusoy a kol., 2012) nepozorovali významný vztah DPP-IV v krevním séru s aktivitou RA. Vyšší exprese DPP-IV v T lymfocytech byla pozorována u pacientů s aktivní RA ve srovnání s pacienty s méně aktivní RA (Muscat a kol., 1994, Gerli a kol., 1996). Dříve publikované výsledky naší pracovní skupiny prokázaly negativní korelaci mezi enzymovou aktivitou plazmatické DPP-IV a koncentrací CRP (Balaziová a kol., 2006). Dosud prováděné studie vycházely většinou z interindividuálních skupinových porovnaní, která vzhledem k poměrně značné populační variabilitě přítomnosti DPP-IV v biologickém materiálu mohou ve statistických porovnáních vést k falešně negativním výsledkům. Pokusili jsme se tedy charakterizovat vztah DPP-IV a aktivity RA na intraindividuální bázi. V průběhu naší studie měli jednotliví pacienti rozdílnou léčbu, v závislosti na klinickém posouzení ošetřujícího lékaře (glukokortikoidy, metotrexát, anti-TNF alfa a anti-CD20 protilátky, leflunomid, sulfasalazin případně jejich kombinace). Navzdory heterogenitě použité léčby jsme ve follow-up vyšetření pozorovali signifikantní vzestup plazmatické DPP-IV-podobné enzymové aktivity i koncentrace u pacientů s definovaným poklesem aktivity RA. Podobný vzestup DPP-IV-podobné enzymové aktivity, spojený s posunem z kyselých do více neutrálních glykoforem cirkulující DPP-IV, byl již dříve popsán u nemocných s klinickým zlepšením RA navozeným anti-TNF cílenou terapií (Mavropoulos a kol., 2005).

Kromě těchto změn v hladině solubní DPP-IV jsme v naší studii pozorovali, že i DPP-IV-podobná enzymová aktivita na BMNC a exprese na lymfocytech klesá souběžně s poklesem DAS28, tedy se snížením aktivity RA u jednotlivých pacientů. Intraindividuální pokles exprese DPP-IV antigenu byl nejvíce patrný na CD4+ T lymfocytech ($p=0.055$), což je v souladu s popsanou dominantní přítomností DPP-IV v této lymfocytární subpopulaci u RA pacientů (Muscat a kol., 1994).



Obrázek 13. Hypotetizovaná vzájemná interakce DPP-IV a SDF-CXCR4 signalizace v synoviálním mikroprostředí. V synoviální tkáni pacientů s RA je buňkami produkováno a secernováno více SDF než u OA. Ačkoliv DPP-IV-podobná enzymová aktivita v synoviální tekutině se u pacientů s RA a OA neliší, nižší hydrolytický potenciál FMNC může u pacientů s RA zvyšovat dostupnost aktivního SDF a tím i vlastní parakrinní účinky tohoto mediátoru a potencovat tak další prozánětlivé procesy. FMNC: mononukleární buňky synoviální tekutiny; SDF: stromal cell-derived factor-1; DPP-IV: dipeptidylpeptidáza-IV (Sromova a kol., 2010)

Závěry

- Kanonická DPP-IV je hlavním nositelem DPP-IV-podobné enzymové aktivity v krevní plazmě, synoviální tekutině a velmi pravděpodobně i na povrchu BMNC a FMNC u nemocných s RA (i OA).
- U nemocných s RA ve srovnání s OA je významně nižší enzymová aktivita a koncentrace DPP-IV v krevní plazmě a exprese a aktivita DPP-IV na FMNC. U pacientů s RA nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v expresi a aktivitě DPP-IV na BMNC oproti kontrolní OA skupině.
- Intraindividuálně pozorované snížení exprese a aktivity DPP-IV na BMNC, a vzestup koncentrace i aktivity plazmatické DPP-IV spojené s poklesem aktivity onemocnění a negativní korelace plazmatické aktivity DPP-IV s CRP naznačují vztah tohoto enzymu k aktivitě RA a jeho možnou využitelnost při sledování léčby.
- Nižší dostupnost DPP-IV na FMNC může vést k omezení degradace SDF a tím ke zvýšení jeho prozánětlivého působení v synoviálním prostředí

Zkratky

BMNC	mononukleární buňky periferní krve
BSA	hovězí sérový albumin
CD	diferenční skupina (clusters of differentiation)
CRP	C-reaktivní protein
CXCR4	CXC chemokinový receptor 4
DAS28	disease activity score 28
DASH	dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologní molekuly
DPP	dipeptidylpeptidáza
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAP	fibroblastový aktivační protein- α
FMNC	mononukleární buňky synoviální tekutiny
FW	rychlost sedimentace červených krvinek
FSC	forward scatter detektor umístěn v ose dopadajícího paprsku
IC50	koncentrace inhibitoru potřebná k inhibici 50% enzymové aktivity
MAb	monoklonální protilátka
MFI	medián intenzity fluorescence
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NK1	neurokininový receptor 1
OA	osteoartróza
PB	periferní krev
PBS	fosfátový pufr
RA	revmatoidní artritida
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
SDF	stromal cell-derived factor-1 α / CXCL 12
SF	synoviální tekutina
SP	substance P
SSC	side scatter detektor v úhlu 90° na dopadající paprsek
Tc	cytotoxické T lymfocyty
Th	pomocné T lymfocyty
VAS	vizuální analogová škála
VIP	vasoaktivní intestinální peptid

Literatura

- Abbott, C. A., Yu, D. M., Woollatt, E., Sutherland, G. R., McCaughan, G. W. a Gorrell, M. D. (2000). "Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8." *Eur J Biochem* **267**(20): 6140-6150.
- Aertgeerts, K., Levin, I., Shi, L., Snell, G. P., Jennings, A., Prasad, G. S., Zhang, Y., Kraus, M. L., Salakian, S., Sridhar, V., Wijnands, R. a Tennant, M. G. (2005). "Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha." *J Biol Chem* **280**(20): 19441-19444.
- Ansorge, S., Buhling, F., Kahne, T., Lendeckel, U., Reinhold, D., Tager, M. a Wrenger, S. (1997). "CD26/dipeptidyl peptidase IV in lymphocyte growth regulation." *Adv Exp Med Biol* **421**: 127-140.
- Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H. a Luthra, H. S. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." *Arthritis & Rheumatism* **31**(3): 315-324.
- Arscott, W. T., LaBauve, A. E., May, V. a Wesley, U. V. (2009). "Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation." *Oncogene* **28**(4): 479-491.
- Aytac, U. a Dang, N. H. (2004). "CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy." *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**(1): 11-18.
- Balaziová, E., Busek, P., Stremenová, J., Sromová, L., Krepela, E., Lízová, L. a Sedo, A. (2011). "Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein-alpha in transformed astrocytic cells." *Mol Cell Biochem* **354**(1-2): 283-289.
- Balaziová, E., Sedová, L., Mares, V., Vlasicová, K., Sevcik, J. a Sedo, A. (2006). "Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs (DASH): contributing factors in the pathogenesis of rheumatic diseases?" *Advances in Experimental Medicine & Biology* **575**: 169-174.
- Bank, U., Heimburg, A., Wohlfarth, A., Koch, G., Nordhoff, K., Julius, H., Helmuth, M., Breyer, D., Reinhold, D., Tager, M. a Ansorge, S. (2011). "Outside or inside: role of the subcellular localization of DP4-like enzymes for substrate conversion and inhibitor effects." *Biol Chem* **392**(3): 169-187.
- Bauer, S., Jendro, M. C., Wadle, A., Kleber, S., Stenner, F., Dinser, R., Reich, A., Faccin, E., Godde, S., Dinges, H., Muller-Ladner, U. a Renner, C. (2006). "Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes." *Arthritis Res Ther* **8**(6): R171.
- Bradfield, P. F., Amft, N., Vernon-Wilson, E., Exley, A. E., Parsonage, G., Rainger, G. E., Nash, G. B., Thomas, A. M., Simmons, D. L., Salmon, M. a Buckley, C. D. (2003). "Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue." *Arthritis Rheum* **48**(9): 2472-2482.
- Busek, P., Malik, R. a Sedo, A. (2004). "Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(3): 408-421.
- Busek, P., Stremenová, J., Sromová, L., Hilser, M., Balaziová, E., Kosek, D., Trylčová, J., Strnad, H., Krepela, E. a Sedo, A. (2012). "Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(5): 738-747.
- Busso, N., Wagtmann, N., Herling, C., Chobaz-Peclat, V., Bischof-Delaloye, A., So, A. a Grouzmann, E. (2005). "Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis." *Am J Pathol* **166**(2): 433-442.
- Cordero, O. J., Salgado, F. J., Mera-Varela, A. a Nogueira, M. (2001). "Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatology International* **21**(2): 69-74.
- Cuchacovich, M., Gatica, H., Pizzo, S. V. a Gonzalez-Gronow, M. (2001). "Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." *Clinical & Experimental Rheumatology* **19**(6): 673-680.
- Dang, N. H. a Morimoto, C. (2002). "CD26: an expanding role in immune regulation and cancer." *Histol Histopathol* **17**(4): 1213-1226.
- Duke-Cohan, J. S., Morimoto, C., Rocker, J. A. a Schlossman, S. F. (1995). "A novel form of dipeptidylpeptidase IV found in human serum. Isolation, characterization, and comparison with T lymphocyte membrane dipeptidylpeptidase IV (CD26)." *J Biol Chem* **270**(23): 14107-14114.
- Durinx, C., Lambeir, A. M., Bosmans, E., Falmagne, J. B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S. a De Meester, I. (2000). "Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides." *Eur J Biochem* **267**(17): 5608-5613.
- Ellingsen, T., Hansen, I., Thorsen, J., Kuno Moller, B., Tarp, U., Jacobsen, S., Lund Hetland, M., Vestergaard, A., Horslev-Petersen, K. a Stengaard-Pedersen, K. (2012). "Up-regulated dipeptidyl-peptidase IV (CD26) on monocytes was unaffected by effective DMARD treatment in early steroid and DMARD-naive rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* **30**(1): 58-63.

Ellingsen T, H. N., Møller BK, Hjelm-Poulsen J, Stengaard-Pedersen K. (2007). "In active chronic rheumatoid arthritis, dipeptidyl peptidase IV density is increased on monocytes and CD4(+) T lymphocytes." Scandinavian Journal of Immunology **66**(4): 451-457.

Friedrich, D., Hoffmann, T., Bar, J., Wermann, M., Manhart, S., Heiser, U. a Demuth, H. U. (2007). "Does human attractin have DP4 activity?" Biol Chem **388**(2): 155-162.

Gerli, R., Muscat, C., Bertotto, A., Bistoni, O., Agea, E., Tognellini, R., Fiorucci, G., Cesarotti, M. a Bombardieri, S. (1996). "CD26 surface molecule involvement in T cell activation and lymphokine synthesis in rheumatoid and other inflammatory synovitis." Clinical Immunology & Immunopathology **80**(1): 31-37.

Gherzi, G., Dong, H., Goldstein, L. A., Yeh, Y., Hakkinen, L., Larjava, H. S. a Chen, W. T. (2002). "Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex." J Biol Chem **277**(32): 29231-29241.

Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S. a Chen, W. T. (2006). "The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices." Cancer Res **66**(9): 4652-4661.

Gotoh, H., Hagihara, M., Nagatsu, T., Iwata, H. a Miura, T. (1989). "Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis." Clin Chem **35**(6): 1016-1018.

Hagihara, M., Ohhashi, M. a Nagatsu, T. (1987). "Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythematosus-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." Clin Chem **33**(8): 1463-1465.

Hopsu-Havu, V. K. a Glenner, G. G. (1966). "A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide." Histochemie **7**(3): 197-201.

Chiravuri, M., Agarraberes, F., Mathieu, S. L., Lee, H. a Huber, B. T. (2000). "Vesicular localization and characterization of a novel post-proline-cleaving aminodipeptidase, quiescent cell proline dipeptidase." J Immunol **165**(10): 5695-5702.

Kikkawa, F., Kajiyama, H., Ino, K., Shibata, K. a Mizutani, S. (2003). "Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV." Int J Cancer **105**(6): 779-783.

Kikkawa, F., Kajiyama, H., Shibata, K., Ino, K., Nomura, S. a Mizutani, S. (2005). "Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression." Biochim Biophys Acta **1751**(1): 45-51.

Kim, K. W., Cho, M. L., Kim, H. R., Ju, J. H., Park, M. K., Oh, H. J., Kim, J. S., Park, S. H., Lee, S. H. a Kim, H. Y. (2007). "Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction." Arthritis & Rheumatism **56**(4): 1076-1086.

Kobayashi, H., Hosono, O., Mimori, T., Kawasaki, H., Dang, N. H., Tanaka, H. a Morimoto, C. (2002). "Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **29**(9): 1858-1866.

Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpe, S. a De Meester, I. (2003). "Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV." Crit Rev Clin Lab Sci **40**(3): 209-294.

Lambert, N., Lescoulié, P. L., Yassine-Diab, B., Enault, G., Mazieres, B., De Preval, C. a Cantagrel, A. (1998). "Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes." Clin Exp Immunol **113**(2): 269-275.

Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., Lee, C. S., Chun, J. G. a McKee, P. A. (2006). "Anti-plasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein." Blood **107**(4): 1397-1404.

Lendeckel, U., Arndt, M., Bukowska, A., Tadge, J., Wolke, C., Kahne, T., Neubert, K., Faust, J., Ittenson, A., Ansorge, S. a Reinhold, D. (2003). "Synergistic action of DPIV and APN in the regulation of T cell function." Adv Exp Med Biol **524**: 123-131.

Livak, K. J. a Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Loetscher, P. a Moser, B. (2002). "Homing chemokines in rheumatoid arthritis." Arthritis Res **4**(4): 233-236.

Maes, M. B., Dubois, V., Brandt, I., Lambeir, A. M., Van der Veken, P., Augustyns, K., Cheng, J. D., Chen, X., Scharpe, S. a De Meester, I. (2007). "Dipeptidyl peptidase 8/9-like activity in human leukocytes." J Leukoc Biol **81**(5): 1252-1257.

Maggi, C. A. (1995). "The mammalian tachykinin receptors." Gen Pharmacol **26**(5): 911-944.

Mavropoulos, J. C., Cuchacovich, M., Llanos, C., Aguilon, J. C., Gatica, H., Pizzo, S. V. a Gonzalez-Gronow, M. (2005). "Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy augments dipeptidyl peptidase IV activity and decreases autoantibodies to GRP78/BIP and phosphoglucose isomerase in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **32**(11): 2116-2124.

McInnes, I. B. a Schett, G. (2011). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis." N Engl J Med **365**(23): 2205-2219.

Mentlein, R. (1999). "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides." Regul Pept **85**(1): 9-24.

Morimoto, C., Torimoto, Y., Levinson, G., Rudd, C. E., Schrieber, M., Dang, N. H., Letvin, N. L. a Schlossman, S. F. (1989). "1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells." J Immunol **143**(11): 3430-3439.

Muscat, C., Bertotto, A., Agea, E., Bistoni, O., Ercolani, R., Tognellini, R., Spinozzi, F., Cesarotti, M. a Gerli, R. (1994). "Expression and functional role of 1F7 (CD26) antigen on peripheral blood and synovial fluid T cells in rheumatoid arthritis patients." Clinical & Experimental Immunology **98**(2): 252-256.

Ohnuma, K., Hosono, O., Dang, N. H. a Morimoto, C. (2011). "Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology." Adv Clin Chem **53**: 51-84.

Ohnuma, K., Inoue, H., Uchiyama, M., Yamochi, T., Hosono, O., Dang, N. H. a Morimoto, C. (2006). "T-cell activation via CD26 and caveolin-1 in rheumatoid synovium." Mod Rheumatol **16**(1): 3-13.

Ohnuma, K., Takahashi, N., Yamochi, T., Hosono, O., Dang, N. H. a Morimoto, C. (2008). "Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function." Front Biosci **13**: 2299-2310.

Ospelt, C., Mertens, J. C., Jungel, A., Brentano, F., Maciejewska-Rodriguez, H., Huber, L. C., Hemmatazad, H., Wuest, T., Knuth, A., Gay, R. E., Michel, B. A., Gay, S., Renner, C. a Bauer, S. (2010). "Inhibition of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase 4 increases cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **62**(5): 1224-1235.

Pablos, J. L., Santiago, B., Galindo, M., Torres, C., Brehmer, M. T., Blanco, F. J. a Garcia-Lazaro, F. J. (2003). "Synoviocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis." J Immunol **170**(4): 2147-2152.

Pethiyagoda, C. L., Welch, D. R. a Fleming, T. P. (2000). "Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells." Clin Exp Metastasis **18**(5): 391-400.

Prevo, M. L., van 't Hof, M. A., Kuper, H. H., van Leeuwen, M. A., van de Putte, L. B. a van Riel, P. L. (1995). "Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis." Arthritis & Rheumatism **38**(1): 44-48.

Proost, P., Struyf, S., Loos, T., Gouwy, M., Schutysse, E., Conings, R., Ronsse, I., Parmentier, M., Grillet, B., Opdenakker, G., Balzarini, J. a Van Damme, J. (2006). "Coexpression and interaction of CXCL10 and CD26 in mesenchymal cells by synergising inflammatory cytokines: CXCL8 and CXCL10 are discriminative markers for autoimmune arthropathies." Arthritis Res Ther **8**(4): R107.

Qi, S. Y., Riviere, P. J., Trojnar, J., Junien, J. L. a Akinsanya, K. O. (2003). "Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases." Biochem J **373**(Pt 1): 179-189.

Ramirez-Montagut, T., Blachere, N. E., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Rettig, W. J., Garin-Chesa, P. a Houghton, A. N. (2004). "FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor." Oncogene **23**(32): 5435-5446.

Reinhold, D., Bank, U., Buhling, F., Lendeckel, U., Faust, J., Neubert, K. a Ansorge, S. (1997). "Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells." Immunology **91**(3): 354-360.

Reinhold, D., Hemmer, B., Gran, B., Born, I., Faust, J., Neubert, K., McFarland, H. F., Martin, R. a Ansorge, S. (1998). "Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+ T cell clones." J Neuroimmunol **87**(1-2): 203-209.

Reinhold, D., Kahne, T., Tager, M., Lendeckel, U., Buhling, F., Bank, U., Wrenger, S., Faust, J., Neubert, K. a Ansorge, S. (1997). "The effect of anti-CD26 antibodies on DNA synthesis and cytokine production (IL-2, IL-10 and IFN-gamma) depends on enzymatic activity of DP IV/CD26." Adv Exp Med Biol **421**: 149-155.

Sedo, A., Duke-Cohan, J. S., Balaziová, E. a Sedova, L. R. (2005). "Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?" Arthritis Research & Therapy **7**(6): 253-269.

Sedo, A. a Malík, R. (2001). "Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities?" Biochimica et Biophysica Acta **1550**(2): 107-116.

Sedo, A., Stremenova, J., Busek, P. a Duke-Cohan, J. S. (2008). "Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy?" Expert Opin Med Diagn **2**(6): 677-689.

Sromová, L., Marecková, H., Sedová, L., Balaziová, E. a Sedo, A. (2010). "Dipeptidyl peptidase-IV in synovial fluid and in synovial fluid mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis." Clinica Chimica Acta **411**(15-16): 1046-1050.

Stremenova, J., Krepela, E., Mares, V., Trim, J., Dbaly, V., Marek, J., Vanickova, Z., Lisa, V., Yea, C. a Sedo, A. (2007). "Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade." International Journal of Oncology **31**(4): 785-792.

Stulc, T. a Sedo, A. (2010). "Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: is there a risk of oncological and immunological adverse effects?" Diabetes Research & Clinical Practice **88**(2): 125-131.

- Tanaka, T., Duke-Cohan, J. S., Kameoka, J., Yaron, A., Lee, I., Schlossman, S. F. a Morimoto, C. (1994). "Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3082-3086.
- Tanaka, T., Umeki, K., Yamamoto, I., Sakamoto, F., Noguchi, S. a Ohtaki, S. (1995). "CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma." Int J Cancer **64**(5): 326-331.
- Ulusoy, H., Kamanli, A., Ilhan, N., Kuru, O., Arslan, S., Alkan, G. a Ozgocmen, S. (2012). "Serum levels of soluble CD26 and CD30 and their clinical significance in patients with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **32**(12): 3857-3862.
- Underwood, R., Chiravuri, M., Lee, H., Schmitz, T., Kabcenell, A. K., Yardley, K. a Huber, B. T. (1999). "Sequence, purification, and cloning of an intracellular serine protease, quiescent cell proline dipeptidase." J Biol Chem **274**(48): 34053-34058.
- Wei, L., Sun, X., Kanbe, K., Wang, Z., Sun, C., Terek, R. a Chen, Q. (2006). "Chondrocyte death induced by pathological concentration of chemokine stromal cell-derived factor-1." J Rheumatol **33**(9): 1818-1826.
- Wesley, U. V., Albino, A. P., Tiwari, S. a Houghton, A. N. (1999). "A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells." J Exp Med **190**(3): 311-322.
- Westermarck, T., Rantapaa-Dahlqvist, S., Wallberg-Jonsson, S., Kjorell, U. a Forsgren, S. (2001). "Increased content of bombesin/GRP in human synovial fluid in early arthritis: different pattern compared with substance P." Clin Exp Rheumatol **19**(6): 715-720.
- Wolf, M., Albrecht, S. a Marki, C. (2008). "Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions." Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1185-1198.
- Wrenger, S., Faust, J., Friedrich, D., Hoffmann, T., Hartig, R., Lendeckel, U., Kahne, T., Thielitz, A., Neubert, K. a Reinhold, D. (2006). "Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function." J Leukoc Biol **80**(3): 621-629.
- Wrenger, S., Guth, B., Schultze, B., Hoffmann, T., Friedrich, D., Kahne, T., Faust, J., Neubert, K. a Reinhold, D. (2006). "Expression of dipeptidyl peptidase IV-like enzymes in human peripheral blood mononuclear cells." Adv Exp Med Biol **575**: 87-91.

Seznam publikací doktoranda, které jsou podkladem disertace :

Dipeptidyl peptidase-IV in synovial fluid and in synovial fluid mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis.

Sromova L, Mareckova H, Sedova L, Balaziova E, Sedo A.
Clin Chim Acta. 2010 Aug 5;411(15-16):1046-50

IF: 2,389

Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein- α in transformed astrocytic cells.

Balaziova E, Busek P, Stremenova J, Sromova L, Krepela E, Lizcova L, Sedo A.
Mol Cell Biochem. 2011 Aug;354(1-2):283-9.

IF:2,057

Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity.

Busek P, Stremenova J, Sromova L, Hilser M, Balaziova E, Kosek D, Trylcova J, Strnad H, Krepela E, Sedo A.

Int J Biochem Cell Biol. 2012 May;44(5):738-47.

IF: 4,152

Intraindividual changes of dipeptidyl peptidase-IV in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are associated with the disease activity

Sromova L., Busek P., Sedova L., Sedo A

Under re-review in BMC Musculoskeletal Disorders