



mgr inż. Dorota Trzybulska

Badanie ekspresji wybranych genów odpowiedzialnych za reorganizację cytoszkieletu aktynowego komórek uczestniczących w procesie zapalnym u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

Rozprawa doktorska

wykonana w Zakładzie Reumatologii i Immunologii Klinicznej
Katedry Immunologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pod kierunkiem prof. dr. hab. n. med. Pawła Zbigniewa Hrycaja

Praca dofinansowana w ramach projektu UM Poznań nr 502-14-01127189-09458 oraz z projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (nr POKL 8.2.2/30-49-12/13).

Poznań, 2014

Serdecznie dziękuję

*Panu prof. dr. hab. n. med. Pawłowi Hrycajowi
za cenne uwagi merytoryczne i pomoc w przygotowaniu rozprawy doktorskiej,*

*Panu prof. dr. hab. n. med. Janowi Sikorze
za umożliwienie wykonania badań i okazaną życzliwość*

*oraz
wszystkim pozostałym Pracownikom Katedry Immunologii Klinicznej
za wszelką pomoc i pracę w niezwykle koleżeńskiej atmosferze.*

Wykaz zastosowanych skrótów

W tekście pracy symbole genów są pisane czcionką pochyloną, przy czym symbole genów ludzkich pisane są wielkimi literami (z wyjątkiem genów bardzo konserwatywnych) a genów mysich i szczurzych małymi literami poprzedzonymi pierwszą wielką literą. Symbole białek pisane są czcionką prostą, wielkimi literami [1, 2].

ACR	Amerykańskie Kolegium Reumatologiczne (ang. <i>American College of Rheumatology</i>)
anty-CCP	przeciwciała przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (ang. <i>anti-cyclic citrullinated peptide antibodies</i>)
Bcl-2	białka regulujące uwalnianie cytochromu c i AIF z mitochondriów (ang. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BxPC3	linia komórkowa raka trzustki
Blk	kinaza tyrozynowa Blk z komórek B (ang. <i>B lymphocyte kinase</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
C5a	anafilatoksyna powstała z rozpadu dopełniacza C5
c-Fos	protoonkogen c-Fos (ang. <i>v-Fos Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ) murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>)
c-Jun	protoonkogen c-Jun (ang. <i>v-Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog</i> , od jap. <i>ju-nana</i>)
c-Ras	protoonkogen c-Ras (ang. <i>proto-oncogene Ras</i>)
CAS	białko adaptorowe CAS (ang. <i>Crk-associated substrate</i>)
CCL2	białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (ang. <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>)
CCR	receptor dla CCL (ang. <i>C-C chemokine receptor</i>)
CD	antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>)
CD40L	ligand CD40 (ang. <i>CD40 ligand</i>)
Cdc42	GTPaza z rodziny Rho (ang. <i>cell division cycle 42</i>)
CDK-2	kinaza zależna od cyklin 2 (ang. <i>cyclin-dependent kinase 2</i>)
Chp	białko homologiczne do Cdc42 (ang. <i>Cdc42 homologous protein</i>)
CpG	wyspy CpG-bogate w dinukleotydy CpG odcinki promotorów
CRP	białko C-reaktywne (ang. <i>C reactive protein</i>)
CX3CL1	fraktalkina, chemokina z grupy CX3C
CXCL5/ENA78	nabłonkowe białko 78 aktywujące neutrofile (ang. <i>epithelial neutrophil-activating protein 78</i>)
CXCL8	interleukina 8
CXCL10/IP-10	białko indukowane przez interferon (ang. <i>interferon gamma-induced protein 10</i>)
CXCL12/SDF-1 α	czynnik pochodzenia stromalnego 1 (ang. <i>stromal cell-derived factor 1</i>)
D6	receptor D6 (ang. <i>decoy 6 receptor</i>)
DARC	glikoproteina Fy lub CD234 (ang. <i>Duffy antigen/receptor for</i>

	<i>chemokines</i>)
DAS28	wskaźnik aktywności choroby uwzględniający ocenę liczby bolesnych i obrzękniętych stawów (ang. <i>28-joints disease activity score</i>)
DMEM	podłoże Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DNMT	metylotransferaza DNA (ang. <i>mammalian DNA methyltransferase</i>)
e-NOS	endotelialna syntaza tlenku azotu (ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ErbB-2	gen kodujący HER2 (ang. <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>)
FAK	kinaza płytek przylegania (ang. <i>focal adhesion kinase</i>)
Fgr	kinaza Fgr (ang. <i>Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog</i>)
Fyn	kinaza tyrozynowa Fyn
GEF	czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (ang. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i>)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GPCR	receptory sprzężone z białkami G (ang. <i>G protein coupled receptors</i>)
Hck	kinaza z rodziny Src (ang. <i>hematopoietic cell kinase</i>)
HER2	receptor 2 ludzkiego czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HLA-DRB1	antygen zgodności tkankowej DRB1 (ang. <i>human leukocyte antigen DRB1</i>)
Hrd1	ludzka ligaza E3 ubikwityny z domeną RING (ang. <i>E3 ubiquitin ligase, human RING domain 1</i>)
ICAM-2	międzykomórkowa molekula adhezyjna-1 (ang. <i>intercellular adhesion molecule 2</i>)
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukina
Lck	kinaza tyrozynowa białek specyficzna dla limfocytów (ang. <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>)
LFA-1	antygen związany z czynnością limfocytów 1 (ang. <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>)
LINE-1	długi rozproszony element jądrowy (ang. <i>long interspersed nuclear element 1</i>)
LPS	lipopolisacharyd
Lyn	kinaza tyrozynowa białek Lyn (ang. <i>Lck/Yes-related novel protein</i>)

	<i>tyrosine kinase</i>)
Mac-1	CD11b/CD18 (ang. <i>macrophage 1 antigen</i>)
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP-1	białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (ang. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
mDia	efektor białek Rho (ang. <i>protein diaphanous homolog 1</i>)
MIP	białko zapalne makrofagów (ang. <i>macrophage inflammatory protein</i>)
Miro-1	mitochondrialna GTPaza Rho 1 (ang. <i>mitochondrial Rho GTPase 1</i>)
c-myc	onkogen c-myc (ang. <i>cellular c-myc</i>)
myb	protoonkogen myb (od ang. <i>myeloblastosis</i>)
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (ang. <i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells</i>)
NK	komórki NK (ang. <i>natural killer cells</i>)
OB	szybkość opadania krwinek czerwonych (odczyn Biernackiego)
PECAM	cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłónka (ang. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PDGF	plytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet-derived growth factor</i>)
PGE2	prostaglandyna E2 (ang. <i>prostaglandin E2</i>)
PTPN22	niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 22 (ang. <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>)
RA-FLS	synowioocyty typu B (ang. <i>rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes</i>)
RANK	aktywator receptora jądrowego czynnika κB (ang. <i>receptor activator for nuclear factor κB</i>)
RANKL	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κB (ang. <i>receptor activator for nuclear factor κB ligand</i>)
Rac	GTPaza Rac z rodziny Rho
RANTES/CCL5	β-chemokina CCL5 (ang. <i>regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>)
Ras	białko typu Ras (od ang. <i>rat sarcoma</i>)
Rho	białko ρ
Rif	białko z rodziny Rif (ang. <i>Rho in filopodia</i>)
RF	czynnik reumatoidalny (ang. <i>rheumatoid factor</i>)
Rnd	białko z rodziny Rho
ROCK	Rho-zależna kinaza (ang. <i>Rho-associated protein kinase</i>)
siRNA	krótkie interferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
SUMO-1	ubikwitynopodobne małe białko modyfikujące (ang. <i>small ubiquitin-like modifier 1</i>)
TC10/RHOQ	GTPaza Cdc42-podobna TC10 (ang. <i>ras-like protein TC10</i>)
TCL	białko tc10-podobne wiążące GTP (ang. <i>tc10-like GTP-binding protein</i>)

TNF- α	czynnik martwicy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TTF	czynnik transkrypcji tarczycowej (ang. <i>thyroid transcription factor</i>)
US28	receptor chemokin US28
Wnt	nazwa białka od połączenia nazw ang. <i>Int/Wg(Wingless)</i>
Wrch-1	GTPaza z rodziny Rho (ang. <i>Wnt responsive Cdc42 homolog 1</i>)
VAS	wizualna skala analogowa (ang. <i>visual analog scale</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
Yes	kinaza tyrozynowa Yes (ang. <i>tyrosine-protein kinase Yes</i>)
Yrk	kinaza powiązana z Yes (ang. <i>Yes-related kinase</i>)

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	10
1.1. <i>Reumatoidalne zapalenie stawów</i>	10
1.1.1. Ogólna charakterystyka choroby	10
1.1.2. Przyczyny rozwoju RZS	12
1.1.2.1. Zaburzenia immunologiczne	13
1.1.2.2. Czynniki środowiskowe	14
1.1.2.3. Czynniki genetyczne	14
1.1.2.3.1. Polimorfizm <i>PTPN22</i> R620W + anty-CCP	14
1.1.2.3.2. HLA-DRB*1	14
1.1.2.3.3. Zmiany epigenetyczne	15
1.1.2.3.4. Ścieżka sygnałowa Wnt	16
1.1.2.3.5. mikroRNA	16
1.1.3. Stan zapalny	17
1.1.3.1. Rola synowocytów w RZS	18
1.1.3.2. Rola monocytów w RZS	20
1.1.3.3. Chemotaksja	22
1.1.3.3.1. <i>CCL2</i>	24
1.2. <i>Charakterystyka badanych genów z uwzględnieniem ich roli w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego</i>	26
1.2.1. Rola cytoszkieletu w procesach komórkowych	26
1.2.2. <i>Nck2</i>	27
1.2.3. <i>RhoA</i>	28
1.2.4. <i>Src</i>	29
1.2.5. <i>CAVI</i>	30
2. ZAŁOŻENIA TEORETYCZNE I CELE BADAŃ	33
3. MATERIAŁY I METODY	34
3.1. <i>Materiały</i>	34
3.1.1. Materiał biologiczny	34
3.1.2. Ocena kliniczna RZS	35
3.1.3. Roztwory i odczynniki chemiczne	36
3.1.4. Bufory i barwniki	37
3.1.5. Sprzęt jednorazowy	38
3.1.6. Aparatura	38
3.2. <i>Metody doświadczalne</i>	39
3.2.1. Izolacja monocytów z krwi obwodowej	39
3.2.2. Izolacja RNA	40
3.2.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji	41
3.2.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)	42

3.2.5. Obliczenie względnej ekspresji badanych genów	44
3.2.6. Hodowla pierwotna synowocytów typu B	45
3.2.7. Ocena cytometryczna komórek	45
3.2.8. Analiza ekspresji <i>CAVI</i> w synowocytach typu B.....	46
3.2.9. Optymalizacja warunków transfekcji siRNA.....	47
3.2.10. Dobór optymalnej dawki IL-1 β pobudzającej ekspresję <i>CCL2</i>	49
3.2.11. Przebieg eksperymentu badającego wpływ wyciszenia ekspresji <i>CAVI</i> na ekspresję <i>CCL2</i>	50
3.2.12. Analiza <i>Western blotting</i>	51
3.2.12.1. Izolacja i pomiar stężenia białek	51
3.2.12.2. Rozdział elektroforetyczny białek.....	51
3.2.12.3. Pólsuchy transfer białek na membranę.....	52
3.2.12.4. Inkubacja z przeciwciałami	53
3.2.13. Analiza statystyczna wyników	54
4. WYNIKI	55
4.1. <i>Charakterystyka grup chorych</i>	55
4.2. <i>Ocena ekspresji wybranych genów w komórkach CD14⁺</i>	57
4.2.1. Analiza względnej ekspresji transkryptu genów <i>Nck2</i> , <i>RhoA</i> , <i>Src</i> i <i>CAVI</i> w komórkach CD14 ⁺ u chorych na RZS, grupie kontrolnej oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów.....	57
4.2.2. Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu badanych genów w badanych grupach.....	60
4.2.3. Analiza ekspresji transkryptu <i>CAVI</i> w synowocytach typu B oraz w monocytach	62
4.3. <i>Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu badanych genów a klinicznymi i laboratoryjnymi markerami aktywności RZS</i>	63
4.4. <i>Część doświadczalna</i>	66
4.4.1. Pierwotne linie synowocytów typu B.....	66
4.4.2. Wyniki optymalizacji warunków transfekcji	67
4.4.3. Wyniki optymalizacji dawki IL-1 β pobudzającej ekspresję <i>CCL2</i>	68
4.4.4. Ekspresja <i>CCL2</i> w odpowiedzi na zredukowaną ekspresję <i>CAVI</i> w synowocytach typu B	70
5. DYSKUSJA	72
5.1. <i>Ocena poziomów transkryptu wybranego zestawu genów w komórkach CD14⁺</i> ...	72
5.2. <i>Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu <i>Nck2</i>, <i>RhoA</i> i <i>Src</i> a klinicznymi i laboratoryjnymi markerami aktywności RZS</i>	79
5.3. <i>Analiza wpływu <i>CAVI</i> na indukowaną IL-1β ekspresję <i>CCL2</i> w synowocytach typu B pochodzących z płynu stawowego</i>	80
6. WNIOSKI	83

7. STRESZCZENIE	84
8. SUMMARY	86
9. BIBLIOGRAFIA.....	88
10. SPIS TABEL I RYCIN.....	106
11. ZAŁĄCZNIK.....	108

1. WSTĘP

Układ immunologiczny człowieka ze względu na wszechobecność limfocytów w organizmie oraz ich ilość, jest podobnie jak system nerwowy i hormonalny układem integracyjnym, który powinien posiadać skuteczne mechanizmy homeostatyczne uniemożliwiające rozpoznanie antygenów własnych jako obcych. Niestety, dość często dochodzi do zaburzeń stanu tolerancji immunologicznej objawiających się nadmierną odpowiedzią układu odpornościowego, ukierunkowaną przeciwko własnym komórkom, wywołujących przewlekły stan zapalny oraz powodujących trwałe uszkodzenia. W ten sposób rozwijają się choroby autoimmunizacyjne [3].

1.1. Reumatoidalne zapalenie stawów

1.1.1. Ogólna charakterystyka choroby

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęstszych chorób autoimmunizacyjnych ze względnie stałą częstością występowania szacowaną średnio między 0,5 a 1% w populacji europejskiej i północnoamerykańskiej [4], przy czym kobiety chorują trzykrotnie częściej niż mężczyźni. Chociaż RZS może wystąpić w każdym wieku, jego początek przypada najczęściej na czwartą i piątą dekadę życia, przy czym u 80% pacjentów rozwija się między 35. a 50. rokiem życia [5].

RZS to przewlekła, postępująca choroba układowa tkanki łącznej objawiająca się zapaleniem błony maziowej stawów, kaletki maziowej oraz pochewki ścięgien [6]. RZS ma charakter heterogenny i wykazuje dużą zmienność kliniczną. RZS rozwija się zazwyczaj powoli, początkowo z zajęciem stawów nadgarstkowych, śródrečno-palcowych lub międzypaliczkowych bliższych rąk. Zmiany te są najczęściej symetryczne. W badaniu przedmiotowym stwierdza się obrzęk, wysięk, bolesność uciskową i ruchową oraz ograniczenie ruchomości stawu [7]. Do objawów pozastawowych należą: guzki reumatoidalne (u 20-30% chorych), reumatoidalne zapalenie naczyń, objawy opłucnowo-płucne i neurologiczne, zespół Felty'ego oraz osteoporoza wtórna, którą może nasilać leczenie glukokortykoidami [5]. W przebiegu RZS u 15-20% chorych może rozwinąć się zespół Sjögrena [5, 8]. W wielu przypadkach skraca się oczekiwana średnia długość życia chorego na RZS głównie w wyniku przyspieszonego rozwoju miażdżycy i związanych z nią incydentów sercowo-naczyniowych [9].

Przy rozpoznaniu RZS wykorzystuje się zazwyczaj wyniki oznaczeń szybkości opadania erytrocytów (odczyn Biernackiego, OB), stężenie białka C-reaktywnego (ang. *C reactive protein*, CRP), obecność czynnika reumatoidalnego (ang. *rheumatoid factor*, RF) oraz stężenie przeciwciał przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu białku P (ang. *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*, anty-CCP). Objawy radiologiczne mają dużą wartość w ocenie stopnia destrukcji chrząstki i nadżerek kostnych powstałych w przebiegu choroby [5]. Do oceny radiologicznej progresji zmian stawowych wykorzystuje się najczęściej skalę Sharpa w modyfikacji van der Heijde [10], dawniej stosowano także pięciostopniową skalę Larsena-Dale'a [11] lub prostą skalę Steinbrockera uwzględniającą cztery stadia rozwoju choroby [12].

W roku 2010 przyjęto nowe kryteria klasyfikacyjne RZS wg Amerykańskiego Kolegium Reumatologicznego (ang. *American College of Rheumatology*, ACR) i Europejskiej Ligi Przeciwreumatycznej (ang. *European League Against Rheumatism*, EULAR) (Tabela 1) [13], które zastąpiły dotychczasowe kryteria ACR z 1987 roku [14].

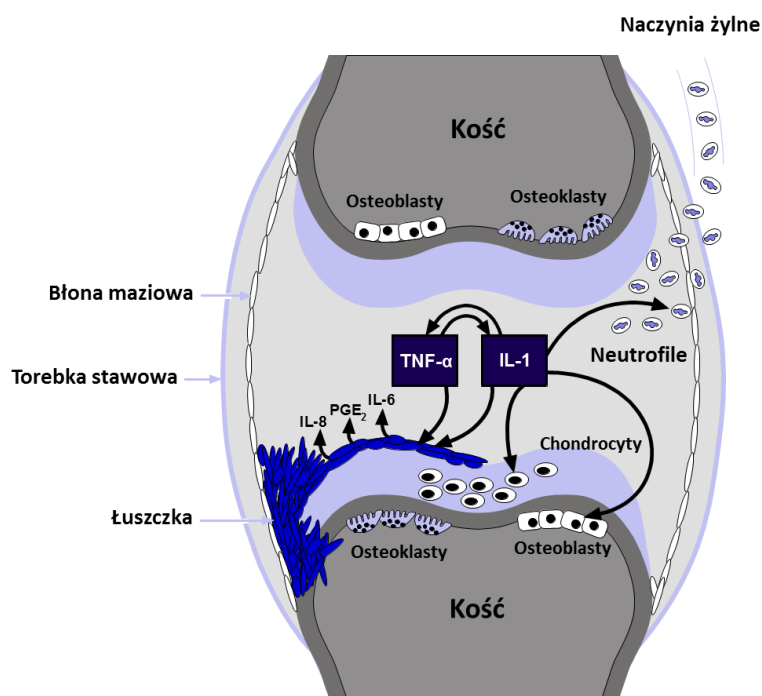
Tabela 1. **Kryteria klasyfikacyjne RZS wg ustaleń ACR i EULAR z 2010 roku** [13]

Kryteria klasyfikacyjne RZS wg ACR i EULAR (Suma punktów z poszczególnych kategorii musi być większa lub równa 6)		
Kategoria	Objawy	Punkty
A. Zajęcie stawów	1 duży staw	0
	2-10 dużych stawów	1
	1-3 małych stawów (z zajęciem dużych stawów lub bez)	2
	4-10 małych stawów (z zajęciem dużych stawów lub bez)	3
	>10 dużych stawów (w tym co najmniej 1 mały staw)	5
B. Serologia	RF i przeciwciała anty-CCP ujemne	0
	RF lub przeciwciała anty-CCP o niskim mianie	2
	RF lub przeciwciała anty-CCP o wysokim mianie	3
C. Laboratoryjne wykładniki stanu zapalnego	Stężenie CRP i OB w normie	0
	Stężenie CRP zwiększone lub OB przyspieszone	1
D. Czas trwania objawów	<6 tygodni	0
	≥6 tygodni	1

Wczesne trafne rozpoznanie RZS na długo przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby, a następnie podjęcie prawidłowej terapii mogą zapobiec nieodwracalnym zmianom w stawach w późniejszym okresie choroby. Leczenie chorych na RZS powinno być kompleksowe, jednak wielu pacjentów nie reaguje odpowiednio na dostępne lekarstwa i potrzebne są alternatywne terapie [15]. Chociaż w leczeniu RZS dostępne są leki przeciwbólowe, niesteroidowe leki przeciwzapalne i leki modyfikujące przebieg choroby (głównie metotreksat i leflunomid), skuteczność terapii ogranicza się zwykle do złagodzenia objawów choroby i spowolnienia jej progresji. Z końcem lat 90-tych ubiegłego wieku do armamentarium terapeutycznego w RZS weszły leki biologiczne, głównie antagoniści: TNF- α (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliksymab) [16], receptora IL-1 (anakinra) [17], receptora IL-6 (tocylizumab) [18], CD20 (rytuksymab) [19], CD80/CD86 (abatacept) [20], które w połączeniu z drobnocząsteczkowymi lekami modyfikującymi przebieg choroby potrafią całkowicie zatrzymać progresję RZS u znacznego odsetka chorych. Ograniczeniem stosowania leków biologicznych jest parenteralna droga podania [21], potencjalne działania niepożądane (m.in. zakażenia), wysoka cena i nawroty choroby po zakończonej terapii [22].

1.1.2. Przyczyny rozwoju RZS

Ponieważ etiologia RZS jest nieznana, patogenezą nie została w pełni wyjaśniona. Powszechnie uważa się, że odpowiednia kombinacja zarówno czynników środowiskowych, do których zalicza się m.in. palenie papierosów czy zakażenia niektórymi wirusami i szczepami mykoplazmy, jak i indywidualnych predyspozycji genetycznych oraz nadmiernej aktywacji układu immunologicznego sprzyja wystąpieniu choroby. Bodźcami wyzwalającymi symptomy choroby mogą być poważne urazy lub znaczny wysiłek fizyczny [6].



Ryc. 1. Zmiany w stawach powstałe w przebiegu RZS

1.1.2.1. Zaburzenia immunologiczne

Interleukina (IL)-1 β i czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) są jednymi z głównych cytokin przyczyniających się do destrukcji chrząstki u osób chorych na RZS [23]. Mechanizm ich działania obejmuje stymulację synowocytów i chondrocytów do produkcji metaloproteinaz i prostaglandyny E₂, redukcję syntezy proteoglikanów i kolagenu typu II i IX oraz nasilenie resorpcji kości [24]. Ponadto wpływają na ekspresję innych cytokin oraz ich receptorów i wzmagają ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna niezbędnych w procesie napływu komórek zapalnych do stawów [23].

Oprócz IL-1 β , w surowicy oraz w płynie stawowym u chorych stwierdza się wysokie stężenie IL-6 [25], stymulującej komórki B i zwiększającej tym samym miejscowe wytwarzanie czynnika reumatoidalnego [26] a także podwyższone stężenia IL-12, IL-15, IL-32, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) oraz chemokin [27].

1.1.2.2. Czynniki środowiskowe

Wiele czynników środowiskowych wydaje się mieć wpływ na rozwój RZS. Najlepiej udokumentowanym pozagenetycznym czynnikiem ryzyka jest palenie papierosów. Składniki dymu tytoniowego zwiększają cytrulinację białek i sprzyjają tym samym inicjacji procesów autoimmunizacyjnych w RZS. U osób z określonymi predyspozycjami genetycznymi palenie szczególnie wpływa na przebieg RZS [27].

W patogenezie RZS wskazuje się również na rolę patogenów, tj. mykoplazmy, parwowirus B19, renowirusy, bakterie jelitowe, mykobakterie i wirus Epsteina-Barr, mający motyw „wspólnego epitopu” QKRAA, co określa się zjawiskiem mimikry molekularnej [27]. Ostatnio jako czynnik ryzyka wymienia się także zakażenia jamy ustnej bakteriami powodującymi paradontozę, a w szczególności *Porphyromonas gingivalis* [28].

1.1.2.3. Czynniki genetyczne

1.1.2.3.1. Polimorfizm PTPN22 R620W + anty-CCP

W schorzeniach autoimmunologicznych, polimorfizm 1858 C/T genu kodującego niereceptorową fosfatazę tyrozynową typu 22 (ang. *protein tyrosine phosphatase N22*, PTPN22), który odpowiada za zmianę R620W w sekwencji aminokwasów, jest ważnym genetycznym czynnikiem ryzyka. Jest on szczególnie charakterystyczny dla populacji kaukaskiej. Allel ryzyka T wzmacnia działanie fosfatazy, co modyfikuje aktywację komórek T i powoduje utratę negatywnej regulacji ścieżek sygnałowych.

Analiza tego polimorfizmu w populacji szwedzkiej wykazała, że obecność przeciwciał anty-CCP oraz przynajmniej jednego allela T jest swoiste dla RZS i w badanej grupie pozwoliła na bezbłędną identyfikację chorych na RZS na kilka lat przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby [29].

1.1.2.3.2. HLA-DRB*1

RZS jest kojarzone również z występowaniem podtypów HLA-DRB1*04: *0401, *0404, *0405, *0408 [30] oraz z występowaniem podtypów HLA-DRB1*0101, *0102, *1001, *1002 w niektórych grupach etnicznych [31]. Wszystkie kojarzone z RZS allele HLA-DRB1 kodują w swoim trzecim hiperzmiennym regionie w pozycji 70-74 aminokwasy QKRAA(*0401), QRRRAA (*0404, *0405, *0408, *0101, *0102,

*1402) i RRRAA (*1001, *1002) [32]. Te tak zwane „wspólne epitopy” (ang. *shared epitopes*) są obecne u około 80-90% wszystkich chorych na RZS (dotyczy rasy kaukaskiej) [33]. Nie wiadomo jak „wspólne epitopy” w HLA-DRB1*04 wpływają na rozwój RZS. Według hipotezy motyw „wspólnego epitopu” występuje również w antygenach różnych mikroorganizmów, gdzie odgrywa rolę epitopu w układzie immunologicznym i w ostateczności prowadzi do „przełamania” tolerancji podczas odpowiedzi immunologicznej [34].

W licznych badaniach udowodniono, że „wspólny epitop” jest markerem prognostycznym dla klinicznego przebiegu oraz stopnia zaawansowania choroby [35, 36]. Pacjenci będący homozygotami dla „wspólnego epitopu” mają częściej cięższy przebieg choroby niż pacjenci z tylko jednym „wspólnym epitopem”. Szczególnie HLA-DR4 pozytywne allele „wspólnego epitopu” związane są z wyższym ryzykiem rozwoju RZS, a zwłaszcza większym nasileniem zmian destrukcyjnych [30].

1.1.2.3.3. Zmiany epigenetyczne

Pomimo licznych zidentyfikowanych zmian w genomie człowieka, implikacje zaburzeń genetycznych nie w pełni wyjaśniają ryzyko wystąpienia RZS, o czym może świadczyć współczynnik zgodności rzędu 12-15% u bliźniąt monozygotycznych [37]. Dobrze scharakteryzowaną cechą wielu chorób, w szczególności nowotworowych, jest zróżnicowana metylacja wysp CpG w DNA [38, 39]. Według dostępnych danych istotną rolę w patogenezie RZS odgrywa hipometylacja ogólna genów kodujących czynniki wzrostu, receptory, molekuly adhezyjne i enzymy degradujące macierz [40, 41] lub hipometylacja wysp CpG w promotorze genu *LINE1* [42] oraz hipermetylacja promotora genu *DR3* w synowiocytach u chorych na RZS [43], co może odpowiadać za aktywowanie i agresywny fenotyp tych komórek. Oprócz tego obserwuje się również hipometylację regionu promotorowego *IL6* w jednojądrowych komórkach krwi obwodowej [44] oraz *CD40L* w komórkach CD4⁺ [45].

Ponadto w błonie maziowej zaobserwowano wzmożoną ekspresję czynników transkrypcyjnych nie ulegających ekspresji w normalnych warunkach, odpowiadających za aktywację wielu genów zaangażowanych w patogenezę RZS [41, 46].

Wyniki badań przedstawione przez Nakano i wsp. sugerują, że cytokiny obecne w środowisku błony maziowej mogą przyczyniać się do epigenetycznych modyfikacji synowocytów typu B w RZS. IL-1 β , TNF- α oraz LPS hamują ekspresję DNA-metylotransferaz (ang. *DNA-methyltransferase*, DNMT) w RZS, a długotrwale

działanie IL-1 β może potencjalnie wpływać na wzór metylacji DNA synowocytów typu B poprzez zmianę ekspresji *DNMT* [37].

1.1.2.3.4. Ścieżka sygnałowa Wnt

W patogenezie RZS istotną rolę odgrywa również ścieżka sygnałowa Wnt (skrót od połączenia nazw ang. *Int/Wg(Wingless)*). Jej aktywacja w synowocytach typu B uzyskanych od chorych na RZS reguluje ekspresję wielu białek mogących potencjalnie promować zapalenie błony maziowej i jej rozrost, być może niezależnie od tak ważnych cytokin jak TNF- α czy IL-1 β . Prowadzi to tym samym do utworzenia łuszczyki oraz uszkodzeń chrząstki i kości o charakterze erozji [47].

1.1.2.3.5. mikroRNA

Do wiedzy o dość powszechnych czynnikach genetycznych będących predyktorami RZS takich jak anty-CCP czy liczne polimorfizmy genów dochodzi również obecność mikroRNA (miRNA).

Ekspresja miR-155, miR-146a, miR-124a czy miR-203 w synowocytach typu B, miR-146 i miR-155 w błonie maziowej oraz miR-146a, miR-155, miR-132 i miR-16 w jednojądrowych komórkach krwi obwodowej u chorych na RZS różni się w porównaniu do osób zdrowych i chorych na osteoporozę [48-52]. Tkankowe miRNA są nie tylko kluczowymi cząsteczkami regulującymi ekspresję genów, lecz są także postrzegane jako biomarkery dla wielu chorób. Według badań, ekspresja miRNA obecnego w płynie stawowym jest wyższa niż w osoczu, co może odzwierciedlać warunki panujące w stawach. Murata i wsp. wskazali możliwość wykorzystania miRNA pochodzących z wysięków oraz osocza jako biomarkerów diagnostycznych w RZS [53].

1.1.3. Stan zapalny

Prawidłowa odpowiedź układu immunologicznego na zakażenia lub inne czynniki wywołujące stan zapalny jest jednym z najważniejszych mechanizmów strzegących organizm przed chorobą [54]. Proces zapalny występujący w RZS jest zjawiskiem przewlekłym i postępującym, a jego mechanizm jest złożony [3]. Ostatecznie dochodzi do destrukcji przylegających ścięgien, chrząstki i kości, gdyż są one narażone na działanie inwazyjnej łuszczy (łac. *pannus*) oraz enzymów hydrolitycznych produkowanych przez osteoklasty [55].

Do pogrubienia i rozrostu błony maziowej u chorych na RZS przyczyniają się dwa kluczowe zjawiska: proliferacja synowocytów oraz charakterystyczna dla procesu zapalnego infiltracja komórek jednojądrowych. W procesie zapalnym dochodzi m.in. do zmiany ładunku elektrycznego krążących leukocytów na dodatni, co powoduje ich przyleganie do komórek śródbłonna za pośrednictwem cząsteczek adhezyjnych. W RZS aktywowane monocyty/makrofagi napływają do stawów i produkują cytokiny oraz mediatory odpowiedzialne za stan zapalny błony maziowej [56]. Występowanie komórek zapalnych w stawach osób chorujących na RZS może być wytłumaczone również obecnością chemokiny CCL2 (ang. *chemokine (C-C motif) ligand 2*) i IL-8 w płynie stawowym [57, 58].

Ważnym zjawiskiem występującym w procesie zapalnym w błonie maziowej jest neoangiogeneza [59]. Synowocyty typu B hodowane w warunkach hipoksji wykazują zwiększoną ekspresję czynników proangiogennych. Środowisko hipoksyczne promuje i wzmacnia angiogenezę w objętej stanem zapalnym błonie maziowej czyniąc z niej proangiogenną i proinwazyjną tkankę [60]. Podczas gdy proliferacja komórek błony maziowej występuje w różnych zapaleniach stawów, to tworzenie łuszczy oraz nadżerki kości są typowe dla RZS [61]. Ważną rolę w powstawaniu łuszczy odgrywa synowiolina/Hrd1, która ulega nadekspresji preferencyjnie w makrofagach i synowocytach i jest białkiem proproliferacyjnym oraz antyapoptotycznym [62, 63]. Powstała łuszczyka tworzy barierę między chrząstką a płynem stawowym, blokując w ten sposób dostęp substancji odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania chrząstki. Jednocześnie wytwarza ona czynniki aktywujące osteoklasty uszkadzające chrząstkę i strukturę nasady kości [64].

Patogeneza RZS jest związana z zaburzeniami funkcji wielu rodzajów komórek. Produkty m.in. komórek B i T, monocytów/makrofagów i synowocytów odgrywają istotną rolę w aspekcie przewlekłego stanu zapalnego w RZS [65].

1.1.3.1. Rola synowocytów w RZS

Torebka stawowa jest zbudowana z warstwy zewnętrznej, zwanej włóknistą i wewnętrzną, zwanej błoną maziową. Błona maziowa jest unerwioną, miękką błoną łącznotkankową stanowiącą wewnętrzną warstwę torebki stawowej o dobrze rozwiniętej sieci naczyń krwionośnych [64]. Otacza ona staw i odżywia nieukrwioną chrząstkę. Jest podzielona anatomicznie i funkcjonalnie na dwie warstwy: głęboką (łac. *subintima*) i powierzchnią (łac. *intima*). Warstwa powierzchniowa ma grubość około 20-40 μm , na którą składają się od 1 do 3 rzędów komórek. W normalnych warunkach dominują w niej dwa typy komórek: synowocyty typu A i B [66, 67]. Synowocyty typu A powstają w wyniku dojrzewania monocytów krwi obwodowej, migrujących do błony maziowej ze szpiku kostnego. Są one zaliczane do jednojądrowych komórek fagocytujących i tak jak inne makrofagi tkankowe wykazują słabą zdolność do podziałów komórkowych. Synowocyty typu A produkują szerokie spektrum cytokin prozapalnych, chemokin i czynników wzrostu, tj. IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α czy prostaglandynę E2 (ang. *prostaglandin E2*, PGE2) [68], co z kolei aktywuje synowocyty typu B i indukuje produkcję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, prostanoidów, katepsyn i różnych mediatorów stanu zapalnego [69].

Synowocyty typu B nazywane również synowocytami fibroblastycznymi (ang. *rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes*, RA-FLS) są jednymi z głównych komórek przyczyniających się do destrukcji stawu. Poprzez skoordynowaną ekspresję czynników regulujących napływ, przeżywalność i utrzymanie poszczególnych subpopulacji leukocytów w stawie, odpowiadają za utrzymywanie się zapalenia [7, 64, 67] często z towarzyszącym wysiękiem [70]. Płyn stawowy, który w normalnych warunkach pełni funkcję amortyzującą w stawie i jest nośnikiem substancji odżywczych dla chrząstki, u chorych na RZS wykazuje m.in. zmniejszoną lepkość i zawiera liczne granulocyty wielojądrzaste, które mogą pochłaniać kompleksy immunologiczne, co skutkuje produkcją reaktywnych metabolitów tlenowych i innych mediatorów zapalenia. Wzmożone wytwarzanie produktów cyklooksigenazowego i lipooksygenazowego szlaku metabolizmu kwasu

arachidonowego przez komórki obecne w płynie stawowym i tkankach stawu nasila podmiotowe i przedmiotowe objawy zapalenia [5].

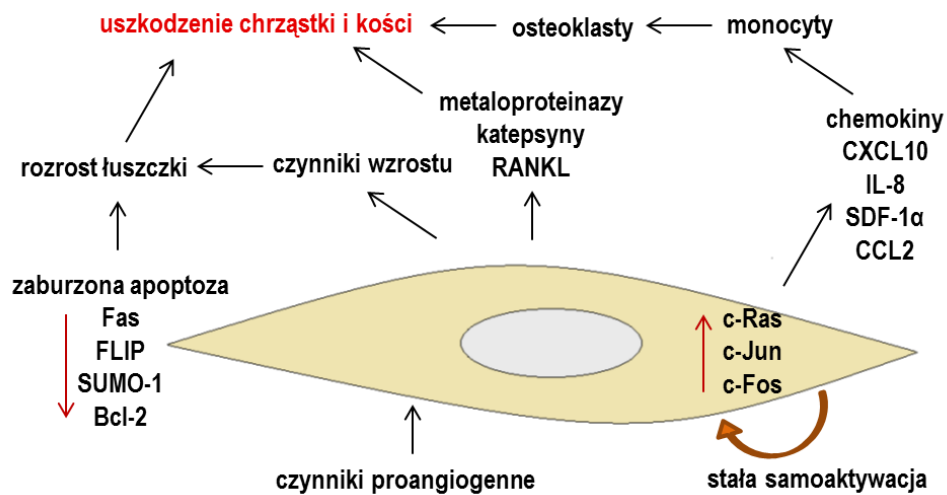
Synowioocyty typu B stanowią 75% wszystkich synowioocytów. Mają one wrzecionowaty, owalny lub poligonalny kształt [71], są bipolarne, posiadają duże jasne jądra komórkowe z wieloma jąderkami i gęste, szorstkie retikulum endoplazmatyczne [66, 67]. Synowioocyty typu B produkują kolagen, fibronektynę, kwas hialuronowy i inne glikozaminoglikany do przestrzeni stawowej [69]. Fenotypowo komórki te przypominają komórki nowotworowe, szczególnie pod względem nadmiernych podziałów komórkowych oraz agresywnego działania. Wykazują wysoki poziom ekspresji licznych onkogenów, tj. c-fos, ras, raf, myc i myb [67]. Synowioocyty typu B stymulowane zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) wykazują wzmożoną aktywność telomerazy, co ma związek z nadmierną aktywnością proliferacyjną tych komórek a jest charakterystyczne głównie dla komórek nowotworowych i macierzystych [72]. Jednak w odróżnieniu od nich, synowioocyty nie wykazują cech złośliwości i wydają się być napędzane mechanizmem parakrynowym [55]. Ponadto *in vitro* wykazują zdolność do wzrostu poza monowarstwą, tworzą skupiska, a wraz z liczbą kolejnych pasaży, tracą pierwotny fenotyp. Przed 3 pasażem przestają produkować cytokiny, czynniki wzrostu i metaloproteinazy, ale ich pierwotny fenotyp można łatwo odtworzyć poprzez inkubację z IL-1 β [41, 55, 67, 71]. Charakteryzuje je ekspresja m.in. kadheryny-11, kolagenu typu IV i V, wimentyny, CD90, CD55, niektórych integryn i ich receptorów [73].

Synowioocyty typu B są nie tylko komórkami efektorowymi, ale przyczyniają się również do miejscowej produkcji cytokin, mediatorów stanu zapalnego czy enzymów proteolitycznych, degradujących macierz zewnątrzkomórkową. Pomimo, że pierwotnie nie są komórkami układu immunologicznego, wraz z biegiem choroby zaczynają wykazywać ekspresję cząsteczek HLA-DR oraz cytokin zapalnych charakterystycznych dla RZS [67, 74].

Synowioocyty typu B pochodzące z płynu stawowego są fenotypowo i funkcjonalnie podobne do tych uzyskanych w tradycyjny sposób z wycinków. To daje możliwość badania komórek u chorych z niskim stopniem aktywności choroby, kiedy otrzymanie wycinka błony maziowej jest zazwyczaj niemożliwe, jak również pozwala na określenie czy wraz z przebiegiem choroby lub/i stosowaniem odpowiedniej terapii zmienia się funkcja fibroblastów [61].

Wyniki badań przeprowadzonych przez Neidhart i wsp. sugerują, że obecne w płynie stawowym synowioocyty typu B pełnią ważną rolę w destrukcji stawu w RZS. Ich obserwacje wskazują jednocześnie na fakt, że niszczenie chrząstki może być spowodowane również oderwanymi od błony maziowej krążącymi synowioocytami, obecnymi być może nawet we krwi, co chociaż po części wyjaśniałoby układową naturę choroby [70].

Reasumując, zdolność synowioocytów typu B do produkcji szerokiego spektrum czynników prozapalnych i chemoatraktantów sprawia, że mogą one być uważane zarówno za komórki aktywnie napędzające proces zapalny w patogenezie RZS jak i być postrzegane za cel dla leków przeciwzapalnych i modyfikujących przebieg choroby [75].



Ryc. 2. Schemat ukazujący rolę synowioocytów typu B w patogenezie RZS

1.1.3.2. Rola monocytów w RZS

Komórki linii mielomonocytarnej mają zdolność różnicowania się w kilka typów komórek biorących udział w rozwoju RZS, tj. monocyty/makrofagi, osteoklasty i komórki dendrytyczne. Sposób różnicowania tych komórek może być łatwo ukierunkowany m.in. poprzez zaburzenie równowagi cytokin bądź czynników wzrostu, które mają miejsce w stawach, krwi obwodowej i szpiku kostnym chorych na RZS.

Napływ dużej ilości neutrofilów i następujący po nim napływ monocytów są częścią ostrej odpowiedzi zapalnej [76]. Monocyty/makrofagi stanowią integralną część

układu immunologicznego i posiadają wielorakie istotne funkcje biologiczne, potencjalnie wpływające na zapoczątkowanie i rozwój RZS [25]. Dowiedziono, że monocyty nie są jednorodną populacją. Bazując na ich fenotypie i funkcjach wyróżnia się trzy populacje monocytów: klasyczną, lecz mniej dojrzałą o profilu ekspresji markerów powierzchniowych $CD14^{++}/CD16^{-}/CD62L^{+}/CX3CR1^{low}/CCR2^{+}/VEGFR1^{high}$, nieklasyczną, bardziej dojrzałą o profilu $CD14^{low}/CD16^{+}/CD62L^{-}/CX3CR1^{high}/CCR2^{-}/VEGFR1^{low}$ oraz mniej liczne monocyty z fenotypem pośrednim. Podczas gdy monocyty klasyczne uczestniczą w odpowiedzi zapalnej indukowanej patogenami lub uszkodzeniem tkanek, monocyty nieklasyczne tłumią stan zapalny i wspomagają gojenie tkanek [77-79]. Wykazano, że liczba monocytów $CD14^{+}CD16^{+}$ jest podwyższona w aktywnej fazie RZS, co wydaje się być indukowane cytokinami, tj. $TGF\beta 1$, GM-CSF i IL-10, uwalnianymi ze stawów zajętych procesem zapalnym [80]. Jednocześnie donosi się również o niższej liczbie monocytów $CD14^{+}CD16^{+}$ u chorych na RZS w porównaniu do osób zdrowych [81].

RZS jest chorobą, w której toczący się w organizmie stan zapalny ma szczególne odzwierciedlenie w stawach. Zapalenie błony maziowej łączy się nierozdzielnie z napływem komórek zapalnych. Jest to wieloetapowy proces regulowany obecnością chemokin i ekspresją molekuł adhezyjnych, ukierunkowujących migrację leukocytów z krwi obwodowej [82]. Obecnie poznano ponad 50 typów chemokin wykazujących aktywność w stosunku do komórek pochodzących ze szpiku kostnego [83]. Białkami dającymi monocytom sygnał do migracji w kierunku stawów są dobrze poznane chemokiny, tj. β -chemokina CCL5 (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*, RANTES/CCL5), białko indukowane przez interferon (ang. *interferon gamma-induced protein 10*, IP-10/CXCL10), nabłonkowe białko 78 aktywujące neutrofile (ang. *epithelial neutrophil-activating protein 78*, ENA78/CXCL5), białko zapalne makrofagów 1 α (ang. *macrophage inflammatory protein*, MIP-1 α /CCL3), MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2 i fraktalkina/CX3CL1 produkowane przez synowioocyty typu B i makrofagi w odpowiedzi na stymulację TNF- α i IL-1 β [67, 82, 84], czy też nowo poznana pod względem właściwości chemotaktycznych IL-17 wydzielana przez komórki T [85]. Chemokiny uwalniane przez leukocyty i synowioocyty typu B mogą indukować stymulację tych komórek drogą autokrynową lub parakrynową prowadząc do destrukcji stawu [83].

Zaobserwowano, że liczba makrofagów obecnych w błonie maziowej koreluje ze stopniem uszkodzenia stawów, a ich podwyższona ilość jest wczesną oznaką

aktywnej choroby [77, 86]. Badania scyntygraficzne, w których u chorych na RZS wyznakowano monocyty za pomocą heksametylopropyleno-aminooksymu znakowanego technetem (^{99m}Tc - ^{99m}Tc -HMPAO) wskazały na podtrzymywanie stanu zapalnego błony maziowej poprzez ciągły napływ krążących we krwi obwodowej monocytów oraz na istotny napływ wyznakowanych komórek odpowiadający zajęciu stawów w RZS [87, 88].

Krążące monocyty posiadają małą ilość aktywny fibrylarnej (F), jednak pod wpływem adhezji dochodzi do szybkiej polimeryzacji aktywny globularnej (G), polimeryzacji tubuliny i tworzenia filamentów pośrednich [89]. Rozwój odpowiedzi immunologicznej obejmuje w dużej mierze migrację leukocytów z krwi do tkanki docelowej, gdzie pełnią one funkcję efektorową [90].

Monocyty jako cel w terapii RZS są ważne zarówno w aspekcie wpływu na aktywność zapalną choroby [56] jak i progresji zmian stawowych, co może się wiązać po części z ich zdolnością do różnicowania się w osteoklasty mające zdolność resorpcji tkanki kostnej [91]. Wykazano, że afereza monocytów pozwala na uzyskanie znacznej poprawy klinicznej u chorych na RZS opornych na terapię lekami biologicznymi i modyfikującymi przebieg choroby (ang. *disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARDs) [92].

1.1.3.3. Chemotaksja

Ukierunkowana chemotaksją migracja leukocytów pozostaje pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych, tj. gradient rozpuszczonych chemokin obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej lub prezentowanych na powierzchni innych komórek i sygnałów adhezyjnych promujących haptotaksję [90].

Migracja leukocytów z krwi do tkanek obejmuje przyleganie między krążącymi leukocytami a komórkami śródbłona naczyń, co stanowi wstęp do diapedezy. Monocyty wykorzystują dwie drogi przechodzenia przez śródbłonek: przezkomórkową i międzykomórkową [93]. W odpowiedzi na chemokiny krążące we krwi obwodowej monocyty napływają do miejsca, w którym toczy się proces zapalny w sposób zależny od selektyn i integryn. Ekspresja tych cząsteczek różni się zazwyczaj w zależności od typu leukocytów oraz naczyń krwionośnych zlokalizowanych w różnych częściach ciała. Cytoplazmatyczna domena integryn oddziałuje ze składnikami cytoszkieletu, gdzie integryny koordynują sygnały generowane podczas łączenia pozakomórkowych ligandów z zależną od cytoszkieletu ruchliwością, zmianą kształtu oraz reakcją

fagocytarną. Napływ monocytów następuje średnio po godzinie i trwa aż do momentu zatrzymania napływu neutrofilii. Dojrzałe monocyty przekształcają się w tkance w makrofagi i spełniają funkcję efektorową przez okres od kilku dni do kilku tygodni. Wydzielane w organizmie TNF- α oraz IL-1 β wykazują zdolność stymulacji komórek innych niż leukocyty do wydzielania chemoatraktantów, które następnie wiążą się do receptorów na leukocytach, wzmagają powinowactwo integrzyn dla ich ligandów i stymulują ukierunkowany gradientem stężeń chemoatraktantów ruch komórek [76].

Chemokiny wiążą się do specyficznych receptorów powierzchniowych sprzężonych z białkami G, co wywołuje dysocjację podjednostki G α od podjednostki G $\beta\gamma$ i aktywuje kaskadę sygnałów błonowo-cytoplazmatycznych [94]. Prowadzi to do polaryzacji sieci filamentów aktynowych i miozynowych odpowiednio w przedniej i tylnej części komórki. Ostatecznie dochodzi do zmiany kształtu leukocytów ze sferycznego „stanu spoczynku” w spolaryzowany, asymetryczny kształt, a komórka zaczyna poruszać się w kierunku źródła chemokin [95].

W pierwszym etapie pod wpływem różnych bodźców (np. TNF- α , IL-1 β lub anafilatoksyny C5a) na powierzchni komórek endotelialnych ekspresji ulegają selektyny P i E, których ligandami są niektóre sjałowane glikoproteiny obecne na komórkach krążących. Ułatwia to tworzenie między nimi czasowych połączeń, co powoduje przyleganie i wolne, z szybkością około 50 $\mu\text{m/s}$, toczenie komórek po śródbłonku [96].

W drugim etapie następuje interakcja pomiędzy integrzynami, antygenem związanym z czynnością limfocytów 1 (ang. *lymphocyte function-associated antigen 1*, LFA-1) i antygenem makrofagowym 1 (ang. *macrophage 1 antigen*, Mac-1) a międzykomórkową molekułą adhezyjną 2 (ang. *intercellular adhesion molecule 2*, ICAM-2). Normalnie połączenia takie są dość słabe, ale obecność chemokin wytwarzanych w ognisku zapalnym, związanych z proteoglikanami na powierzchni śródbłonka, powoduje zmiany konformacyjne integrzyn i zwiększa wytrzymałość wiązania, co w efekcie powoduje silne przyleganie i unieruchomienie leukocytów.

W trzecim etapie leukocyty trawersują ścianę naczynia przy współdziałaniu cząsteczki adhezji komórkowej płytek i śródbłonka (ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM/CD31), posługując się metaloproteinazami wytwarzanymi przez komórki i stymulowane produktami bakteryjnymi leukocyty. Komórki migrują przez tkanki zgodnie z gradientem chemokin (np. CXCL8, CCL2) [3].

1.1.3.3.1. CCL2

Chemokiny są białkami wydzielanymi w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, które kontrolują migrację neutrofilii, limfocytów, komórek dendrytycznych i monocytów/makrofagów [97]. Chemokiny zostały podzielone pod względem funkcji na dwie główne podgrupy: chemokiny zapalne, kontrolujące napływ leukocytów do miejsc zapalnych i chemokiny homeostatyczne, które pełnią „funkcje porządkowe” i zapewniają równowagę we wtórnych narządach limfatycznych jak i w ich obrębie, a także w szpiku kostnym i grasicy podczas hematopoezy [98].

CCL2 znane również jako MCP-1 (ang. *monocyte chemotactic protein-1*) jest białkiem wykazującym aktywność chemotaktyczną dla monocytów oraz bazofili. Gen kodujący białko CCL2 jest położony na krótkim ramieniu chromosomu 17 w pozycji 17q11.2-q12 (17: 32,582,304-32,584,222) i posiada 3 egzony. Masa cząsteczkowa białka wynosi 11,025 kDa. Jest ono produkowane przez różnorodne komórki, tj. astrocyty, monocyty, komórki śródbłonna lub fibroblasty, konstytutywnie bądź poprzez indukcję różnorodnymi mediatorami, tj. płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF), IL-1 i IL-4, TNF- α , czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), lipopolisacharyd (LPS), interferon gamma (IFN- γ). CCL2 powstaje jako prekursor białkowy zawierający peptyd sygnałowy o długości 23 aminokwasów, który w wyniku modyfikacji przekształca się w dojrzały peptyd o długości 76 aminokwasów [99, 100].

CCL2 podlega O-glikozylacji, co przekłada się na masę białka. Wysoce glikozylowane formy białka CCL2 wykazują dłuższy okres półtrwania, natomiast słabsza glikozylacja wzmacnia jego bioaktywność. Głównym zadaniem CCL2 jest aktywowanie leukocytów do chemotaksji, co stanowi kluczowy etap rozwoju odpowiedzi immunologicznej [101]. Przypuszcza się, że CCL2 ulega dimeryzacji i łączy się z glikozaminoglikanami na powierzchni tkanek i ustanawia gradient, który kieruje monocyty do miejsca infekcji lub stanu zapalnego [102]. CCL2 wiąże się do swojego receptora CCR2 (ang. *C-C chemokine receptor type 2*) – jednego z receptorów sprzężonych z białkami G (ang. *G-protein-coupled receptor*, GPCR), co w rezultacie inicjuje serię sygnałów komórkowych powodujących napływ monocytów do tkanek zajętych procesem zapalnym w wielu przewlekłych chorobach zapalnych [103]. Możliwe jest również wiązanie się CCL2 do receptorów: CCR4 [89], US28 (receptor GPCR kodowany przez wirusa cytomegalii), D6 (ang. *decoy 6 receptor*) i DARC (ang.

Duffy antigen/receptor for chemokines) [98]. Badania *in vivo* sugerują, że CCL2 powoduje chemotaksję monocytów do ognisk zapalenia nie tylko w RZS [104], ale ma również istotne znaczenie w patogenezie miażdżycy [105] i łuszczycy [106]. CCL2 odgrywa ponadto rolę w gruźlicy [107], zapaleniu kłębuszków nerkowych [108], astmie alergicznej [109] i stwardnieniu rozsianym [110]. Według badań, CCL2 wydzielane przez śródbłonek, aktywuje będące prekursorami komórek piankowatych krążące monocyty do migracji przez tkankę podśródbłonkową we wczesnych zmianach miażdżycowych [111]. Błona maziowa i płyn stawowy od chorych na RZS zawierają podwyższone stężenia CCL2. CCL2 wzmacnia aktywność żelatynaz i kolagenaz w nadsączach hodowanych *in vitro* synowocytów typu B [83]. CCL2 jest białkiem chemotaktycznym i aktywującym dla monocytów, komórek pamięci T i komórek dendrytycznych, „wabiącym” komórki do miejsca, w którym powstało zranienie lub toczy się proces zapalny. Oprócz aktywności chemotaktycznej, wiele nowych badań wskazuje na udział CCL2 w rozwoju centralnego układu nerwowego, sprzyjaniu metastazie i angiogenezie, jak również na uczestnictwo CCL2 w podziałach komórkowych, apoptozie i syntezie białek. CCL2 bierze udział w indukowanej VEGF angiogenezie, zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych i pobudza ekspresję VEGF [112]. Białko CCL2 jest postrzegane jako obiecujący biomarker do monitorowania aktywności młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, w którym stężenie surowicze tego białka maleje wraz z poprawą kliniczną [113].

1.2. Charakterystyka badanych genów z uwzględnieniem ich roli w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego

1.2.1. Rola cytoszkieletu w procesach komórkowych

Białka cytoszkieletu są kodowane przez około 2,8% ludzkiego genomu i są częścią złożonej i precyzyjnie regulowanej sieci polimerów, w skład której wchodzi mikrofilamenty, mikrotubule i filamenty pośrednie. Cytoszkielet leukocytów odgrywa kluczową rolę w spełnianiu przez nie funkcji obronnych obejmujących ukierunkowaną migrację komórek do miejsc zapalnych (poprzez reorganizację cytoszkieletu oraz formowanie ognisk przylegania) [114, 115], aktywację odpowiedzi immunologicznej czy cytotoksyczność lub apoptozę [90]. Podczas aktywacji komórek T przez komórki prezentujące antygeny cytoszkielet bierze udział w tworzeniu i stabilizacji synaps immunologicznych między tymi komórkami [95]. Cytoszkielet aktynowy pełni istotną funkcję w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów, prowadząc m.in. do ekspresji genów związanych z procesem zapalnym [116]. Zmiany w cytoszkiecie aktynowym należą do najlepiej poznanych odpowiedzi komórkowych obserwowanych pod wpływem aktywacji GTPazy należących do rodziny białek Rho. Aktywowane GTPazy regulują dynamikę cytoszkieletu poprzez polimeryzację, stabilizację oraz jego reorganizację [117]. Struktura cytoszkieletu jest niezwykle plastyczna, co sprawia, że dobrze reaguje na bodźce zewnątrzkomórkowe [116].

Polimeryzacja aktyny i wydłużanie filamentów w przedniej części komórki połączone z zależnym od białka Rho kurczeniem filamentów aktynowo-miozynowych w tylnej części stanowią główną siłę napędzającą migrację komórek. Z pewnymi wyjątkami (komórki dendrytyczne i dobrze zróżnicowane makrofagi), komórki układu odpornościowego nie formują włókien naprężeniowych ani przyczepów ogniskowych, co może wyjaśniać ich wyższy wskaźnik ruchliwości na podłożu integrynowym w porównaniu do fibroblastów czy komórek śródbłonna [90].

Zmiany dynamiki cytoszkieletu, regulowane przez Rho GTPazy, mają wpływ na migrację i polarność komórki, są związane z transportem wewnątrzkomórkowym, tworzeniem połączeń międzykomórkowych oraz cytokinezą. Dynamiczne rearanżacje cytoszkieletu mają miejsce za sprawą aktywności białek Rho i wpływają na kształt komórki, kontakty między nimi jak również między komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową. Białka rodziny Rho, które oddziałują na szereg białek

efektorowych, tj. kinazy Rho-zależne i białka mDia, kontrolują organizację i dynamikę cytoszkieletu aktynowego [118].

Do aktywnej chemotaksji niezbędne są zarówno polimeryzacja jak i depolimeryzacja aktyny. Aby migrować, leukocyty wydłużają przednią część komórki czyli bogate w F-aktynę lamellipodium stanowiące krawędź oraz uropod. Zatem do migracji komórek niezbędne są: polimeryzacja aktyny, która napędza rozszerzanie lamellipodium, rozrywanie istniejących kontaktów ogniskowych i formowanie nowych [119]. Zauważono, że w odróżnieniu od komórek przypominających fibroblasty, pobudzone chemoatraktantem leukocyty charakteryzują się odmienną strategią poruszania się i rozmieszczeniem receptorów. W leukocytach integryny i inne receptory adhezyjne gromadzą się w uropodzie, co sprawia że przypomina on wiodące pseudopodia komórek podobnych do fibroblastów [120].

1.2.2. *Nck2*

Nck2/Nckβ/Grb4 wraz z *Nck1/Nckα* należą do rodziny SH2/SH3 białek adaptorowych *Nck* (ang. *non-catalytic region of tyrosine kinase*). Pomimo że geny kodujące oba białka leżą na różnych chromosomach, *Nck1* i *Nck2* wykazują aż 68% identyczność na poziomie aminokwasowym [121]. Białka *Nck* stanowią ogniwa pomiędzy receptorami związanymi z kinazami tyrozynowymi, GTPazami rodziny Rho i kinazami Pak Ser/Tyr [122]. Uważa się, że zależna od *Nck* aktywacja GTPaz należących do nadrodziny białek Ras wpływa na takie procesy jak różnicowanie, proliferacja i migracja komórek [123].

Białko *Nck2* o masie 42 kDa jest kodowane przez gen *Nck2* zlokalizowany na chromosomie 2 w pozycji 2q12.2 [124]. Jego ekspresja jest dość rozpowszechniona w tkankach ludzkich [125]. *Nck2* wiąże PDGFR-β (Tyr¹⁰⁰⁹), a nadekspresja *Nck2* hamuje indukowane przez PDGF pofałdowanie błony cytoplazmatycznej, tzw. „*membrane ruffling*” i tworzenie lamellipodiów [126]. Domena SH3 (ang. *src homology 3*) *Nck2* wiąże się do bogatej w prolinę domeny białka PAK – dobrze znanego regulatora cytoszkieletu aktynowego.

Białko *Nck2* jest ważnym ogniwem w przekazywaniu sygnału komórkowego przez integryny z powierzchni komórkowej do cytoszkieletu aktynowego, co jest niezwykle istotne dla ruchu komórek [122]. Jest również wykorzystywane przez białko adaptorowe CAS wpływające na różnorodne ścieżki sygnałowe przy regulacji polaryzacji komórki określanej przez bodźce zewnątrzkomórkowe, tj. oddziaływania

międzykomórkowe czy gradient chemoatraktantów, jak również reguluje aktywność Cdc42 podczas migracji komórek w odpowiedzi na proces gojenia ran [127].

1.2.3. *RhoA*

RhoA jest jedną z izoform białka Rho należącą do rodziny małych Rho GTPaz. Gen kodujący białko RhoA położony jest na chromosomie 3 w pozycji p21.3. Obecnie opisano 22 geny kodujące GTPazy, które można podzielić na 8 podgrup: Cdc42 [Cdc42, TC10, TCL (TC10-like), Chp, Wrch-1], Rac (Rac1-Rac3, RhoG), Rho (RhoA-RhoC), Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), RhoD (RhoD and Rif), RhoH/TTF, RhoBTB (RhoBTB1 and RhoBTB 2) oraz Miro (Miro-1 i Miro-2) [128]. Aktywność tych enzymów jest kontrolowana przez czynniki wymiany nukleotydu guaniny (ang. *guanine nucleotide exchange factor*, GEF), białka aktywujące GTP-azy oraz inhibitory dysocjacji nukleotydów guaninowych blokujących spontaniczną aktywację. Obecnie zidentyfikowano ponad 50 białek efektorowych dla Rho, Rac i Cdc42, włączając w to kinazy serynowo-treoninowe, tyrozynowe, lipidowe, lipazy, oksydazy czy białka „rusztujące” [129]. GTPazy Rho są zaangażowane zarówno pośrednio jak i bezpośrednio w wiele procesów komórkowych, a w szczególności w regulację dynamiki cytoszkieletu aktynowego [130].

Aktywacja Rho, Rac lub Cdc42 prowadzi odpowiednio do łączenia kurczliwych filamentów aktynowo-miozynowych, wydłużenia bogatych w aktynę lamellipodiów i filopodiów [131]. Te niezwykle specyficzne oddziaływania na cytoszkielet aktynowy wskazują na szereg dobrze poznanych ścieżek przekazywania sygnału kontrolowanych przez każdą GTPazę prowadzących zarówno do polimeryzacji aktyny jak i łączenia filamentów aktynowych [129]. Białka z rodziny Rho są jednymi z kluczowych molekuł odbierających sygnały zewnątrzkomórkowe i będących łącznikami receptorów powierzchniowych z cytoszkieletem aktynowym [132].

Oprócz wpływu GTPaz na reorganizację cytoszkieletu aktynowego warto zaznaczyć, że enzymy te uczestniczą również w regulacji polaryzacji komórek, fazie G1 cyklu komórkowego, dynamice mikrotubul czy transporcie pęcherzykowym [131]. GTPazy mają również wpływ na transkrypcję genów poprzez ścieżki sygnałowe niezwiązane z cytoszkieletem aktynowym m.in. aktywują jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B) szczególnie w odpowiedzi na cytokiny zapalne [133]. Ponadto białko RhoA umożliwia skupianie się kurczliwych filamentów aktomiozyny i jest powiązane

z kompleksami ognisk przylegania [130]. Dostępne dane sugerują, że przekazywanie sygnału szczególnie z RhoA, a nie Rac1 czy Cdc42, ma istotne znaczenie w poruszaniu się monocytów [89].

1.2.4. Src

Białko Src wraz z Blk, Yrk, Fgr, Fyn, Yes, Hck, Lck i Lyn tworzy rodzinę niereceptorowych kinaz tyrozynowych Src i zostało zidentyfikowane jako pierwszy ludzki protoonkogen. W zależności od otrzymanego sygnału Src pośredniczy w aktywacji wielu ścieżek sygnałowych prowadzących do fagocytozy, uwalniania mediatorów procesu zapalnego, proliferacji, adhezji, migracji i chemotaksji komórek [134].

Gen kodujący białko Src jest położony na chromosomie 20 w pozycji q11.23 i koduje białko o masie 59,83 kDa [135]. Liczne doniesienia naukowe wskazują na udział Src w wielu procesach immunologicznych zachodzących w komórkach układu odpornościowego m.in. związanych z ukierunkowaną migracją komórek.

Aktywność kinazy Src może być regulowana poprzez fosforylację lub defosforylację jej reszt tyrozynowych [136]. W takiej formie przemieszcza się ona do błony komórkowej, gdzie może fosforylować inne białka m.in. kinazę płytek przylegania (ang. *focal adhesion kinase*, FAK), stanowiącą istotny czynnik w przekazywaniu sygnałów z uczestnictwem integrzyn [137], które współpracując ze sobą promują adhezję komórek, zmiany w ich morfologii, regulują cykl komórkowy oraz transkrypcję genów [134]. W procesach zapalnych w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych kinaza Src fosforyluje kortaktynę, p130Cas, p190RhoGAP, tym samym przyczyniając się do regulowania struktury cytoszkieletu [138, 139]. Kinazy Src są również jednymi z głównych białek, które kontrolują stymulowaną przez LPS fosforylację paksyliny oraz ruch monocytów [140], a co za tym idzie zastosowanie inhibitorów kinaz Src blokuje polimeryzację aktyny [141].

O wpływie Src na proces zapalny z udziałem cytoszkieletu świadczą badania przeprowadzone przez Kim i wsp. Wykazano, że cytochalazyna B, która w sposób pośredni blokuje polimeryzację aktyny i hamuje chemotaksję neutrofilii [142], jak i siRNA przeciw aktynie wykazują bardzo podobny wzór działania i są w stanie obniżyć zarówno indukowaną LPS fosforylację jak i aktywność kinazy Src, bez zmiany ogólnego poziomu białka. To pozwala rozpatrywać Src w kategorii nowego potencjalnego celu interwencji farmakologicznej skupiającego uwagę na rearanżacji

cytoszkieletu aktynowego. Co więcej, bezpośrednie oddziaływanie Src z aktyną zostało potwierdzone za pomocą immunoprecypitacji wykonanej za pomocą „dzikiego” typu aktyny sprzężonego z białkiem zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) i wyznakowanego hemaglutyniną białka Src. Stąd też uważa się, że reorganizacja cytoszkieletu aktynowego może być istotnym elementem regulacji odpowiedzi zapalnej, w której dochodzi do kontroli aktywacji Src i innych molekuł na kolejnych etapach ścieżki sygnałowej [116].

1.2.5. CAV1

Kaweole są wklęsłymi strukturami o wielkości 50-100 nm w kształcie Ω umieszczonymi w błonie cytoplazmatycznej. Ze względu na obecność białek G, eNOS i niereceptorowych kinaz tyrozynowych, kaweole regulują przekazywanie sygnału w obrębie komórki, jak również biorą udział w transcytozie, endocytozie, utrzymywaniu homeostazy gospodarki lipidowej, przebiegu cyklu komórkowego i migracji komórek [143, 144].

CAV1 wraz z CAV2 i CAV3 należy do rodziny kaweolin będących integralnymi białkami membranowymi. Te trzy białka mają podobną strukturę [145]. CAV1 stanowi najważniejszy komponent umieszczonych *in vivo* w błonie cytoplazmatycznej kaweoli odgrywających rolę w organizacji wielu ścieżek sygnałowych w komórce [146]. Choć pewna wartość progowa jest wymagana do tworzenia tych struktur (średnio od 100 do 200 cząsteczek) [147] zauważono, że CAV1 może tworzyć funkcjonalne mikrodomeny w błonie cytoplazmatycznej niezależnie od zdolności do tworzenia kaweoli [148].

Gen *CAV1* ulega ekspresji w wielu typach komórek a szczególnie w tych, które znajdują się w końcowym stadium różnicowania m.in. w komórkach śródbłonna, adipocytach, pneumocytach typu I, komórkach mięśni gładkich, makrofagach i synowocytach [149]. CAV1 należy do kategorii białek, których funkcja zależy od umiejscowienia komórki [150]. Jest ono integralnym białkiem membranowym, nie mającym styczności ze środowiskiem pozakomórkowym, złożonym ze 178 aminokwasów o masie cząsteczkowej rzędu 21-22 kDa. Wyróżnia się dwie formy CAV1: α i β . Forma β białka jest krótsza o 31 aminokwasów (około 3 kDa), zlokalizowanych na początku łańcucha polipeptydu w położeniu 2-32. Gen kodujący *CAV1* jest umieszczony na dłuższym ramieniu chromosomu 7 (7q31.1) [145]. Fosforylacja na serynie umieszczonej w pozycji 80 łańcucha polipeptydowego

w retikulum endoplazmatycznym zamienia CAV1 w bioaktywne białko sekrecyjne [145].

CAV1 oddziałuje z różnymi molekułami sygnałowymi i reguluje ich aktywność. Zazwyczaj bezpośrednie oddziaływanie z molekułą prowadzi do jej inaktywacji [151]. CAV1 hamuje transdukcję sygnałów przez wiązanie białek sygnałowych, tj. kinaz Src, eNOS, integryn, G α podjednostki H-Ras, kinazy białkowej C do swojej domeny „rusztującej” (ang. *caveolin scaffolding domain*, CDS) znajdującej się z pozycji 82-101 łańcucha polipeptydowego [152, 153]. CAV1 α może również przekazywać sygnały poza kaweolami wewnątrz komórki poprzez fosforylację na Tyr14, która wzrasta w odpowiedzi na stres komórkowy, czynniki wzrostu i stymulacje hormonami [154; 155]. Uważa się, że CAV1 wiąże i utrzymuje w nieaktywnym stadium wiele białek związanych z proliferacją, tj. naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*, EGF), receptor 2 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*, ErbB2) jak również białka przyżyciowe. Niewątpliwie zdolność CAV1 do modulacji sygnałów wewnątrz komórki ma ważne konsekwencje dla procesów związanych z transformacją nowotworową i tworzeniem guzów [156].

Rola tego genu w migracji komórek nowotworowych jest wciąż niejasna i wydaje się zależeć od rodzaju komórek [153]. W raku trzustki i raku piersi CAV1 wykazuje działanie hamujące migrację komórek, natomiast obniżenie ekspresji CAV1 w komórkach raka trzustki BxPC3 dramatycznie podnosi ich inwazyjność [156].

Białko Rho wiąże sieci składników cytoszkieletu takich jak filamina A i filamenty pośrednie. Ekspresja CAV1 jest powiązana ze wzmożoną produkcją i fosforylacją filaminy A, która jest białkiem łączącym filamenty aktyny, zaangażowanym w dynamiczny remodeling sieci cytoszkieletu aktynowego podczas migracji komórek i przekazywania sygnałów w komórce [157, 158]. Spadek ekspresji CAV1 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc H1299 pociąga za sobą spadek fosforylacji filaminy A, co skutkuje zahamowaniem indukowanej chemoatraktantem migracji tych komórek [159]. CAV1 i Rho-GTPazy zaliczane są do kluczowych białek sygnałowych pośredniczących w remodelingu cytoszkieletu aktynowego [160]. Wskazuje się także na zdolność CAV1 do regulacji polaryzacji i ukierunkowanej migracji komórek przez procesy wymagające aktywności Src i Rho-GTPaz [161].

CAV1 odgrywa ważną rolę w poruszaniu się komórki poprzez kontrolę składu błony cytoplazmatycznej, polaryzację cząstek sygnałowych i reorganizację

cytoszkieletu aktynowego. Ufosforylowane białko CAV1 prawdopodobnie bierze udział w mechanotransdukcji i reorganizacji cytoszkieletu aktynowego za pośrednictwem integryn, zatem brak ekspresji CAV1 redukuje migrację komórek [148, 155]. Dowiedziono, że CAV1 reguluje migrację komórek przez mechanizm zależny od ścieżki sygnałowej PI3K/Akt [153].

2. ZAŁOŻENIA TEORETYCZNE I CELE BADAŃ

Proces zapalny w RZS rozpoczyna się w błonie maziowej stawów. Liczne badania wykazują, że ilość obecnych w stawach monocytów/makrofagów koreluje ze stopniem aktywności choroby. Przewlekły charakter RZS jest skutkiem dysproporcji między stężeniem cytokin prozapalnych a przeciwzapalnych. Chemokiny, które są produkowane w nadmiernych ilościach przez komórki obecne w stawach, wywołują morfologiczne i funkcjonalne zmiany odpowiedzialne za migrację komórek zapalnych do stawów. Ponieważ aktywacja komórek zapalnych zależy w dużej mierze od dynamicznej reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, założono, że poziomy mRNA genów *CAVI*, *Nck2*, *Src* i *RhoA* funkcjonujących jako regulatory cytoszkieletu aktynowego i czynniki wpływające na stan zapalny, różnią się istotnie u chorych na RZS, osób zdrowych i chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów.

Druga część badań skupia się na funkcji synowocytów typu B związanej z produkcją chemokin. Na podstawie wcześniejszych doniesień naukowych założono, że czasowe zmniejszenie ekspresji genu *CAVI* regulującego aktywność molekuł sygnałowych w synowocytach typu B, może istotnie wpływać na ekspresję chemokiny *CCL2* odpowiadającej za napływ monocytów do miejsc, w których toczy się stan zapalny.

W związku z powyższym obrano następujące cele pracy:

- 1) Ocena względnego poziomu mRNA genów *Nck2*, *RhoA*, *Src* i *CAVI* w grupie chorych na RZS oraz porównanie z grupą kontrolną i porównawczą złożoną z chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów.
- 2) Ocena zależności poziomów ekspresji badanych genów z wybranymi laboratoryjnymi i klinicznymi parametrami aktywności RZS.
- 3) Ocena zależności ekspresji *CCL2* od poziomu ekspresji *CAVI* w synowocytach typu B.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał biologiczny

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Załącznik 1).

Ekspresję genów przeanalizowano łącznie u 111 osób. W badaniu wzięły udział osoby pełnoletnie bez cech ostrej infekcji bakteryjnej lub wirusowej.

Krew do badań pozyskano od włączonych kolejno do badania 51 chorych na RZS: 37 kobiet i 14 mężczyzn. Kryteriami wykluczenia z badania były oznaki zakażenia, współistnienie innej niż RZS układowej choroby tkanki łącznej i wystąpienie choroby nowotworowej.

Grupę kontrolną (GK) stanowiło 49 zdrowych osób (34 kobiety i 15 mężczyzn), z negatywnym wywiadem w kierunku chorób autoimmunologicznych, będących honorowymi dawcami krwi w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu. Mediana ich wieku wynosiła 43 (7).

Grupę porównawczą dla grupy badanych stanowiło 11 chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS) (9 kobiet i 2 mężczyzn) hospitalizowanych w Oddziale Rehabilitacyjnym Szpitala im. Teodora Dunina w Kościanie. Do badania zostali zakwalifikowani tylko ci chorzy, u których nie stwierdzano cech uogólnionego stanu zapalnego.

Każdy pacjent został zapoznany z założeniami badania a następnie wyraził pisemną zgodę na pobranie i wykorzystanie materiału biologicznego, w tym na wykonanie badań genetycznych.

Płyn stawowy pozyskano od 3 chorych na RZS poprzez nakłucie stawów kolanowych ze wskazań terapeutycznych. Chorzy wyrazili pisemną zgodę na pobranie płynu stawowego w celu założenia hodowli synowocytów typu B i wykorzystanie ich do badań opisanych w części doświadczalnej.

3.1.2. Ocena kliniczna RZS

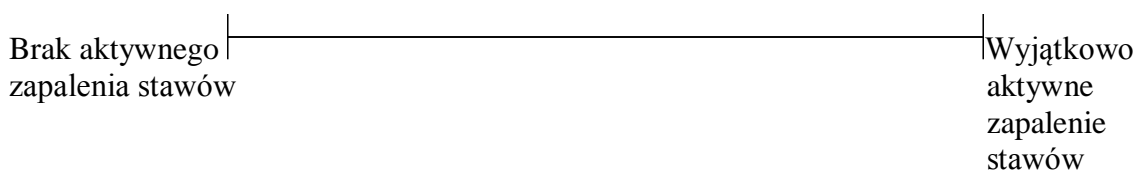
Od wszystkich chorych zebrano informacje dotyczące chorób współistniejących, przyjmowanych leków, jak również oznaczono OB metodą Westergrena [162] oraz stężenie surowiczego CRP metodą wysokoczułą (ang. *high-sensitivity CRP*, hs-CRP).

U 42 chorych oceniono liczbę bolesnych (ang. *tender joints*, TEN28) i obrzękniętych (ang. *swollen joints*, SW28) stawów. Każdorazowo uwzględniano 28 symetrycznych stawów: stawy barkowe, łokciowe, nadgarstkowe, kolanowe, stawy śródrečno–palcowe i międzypaliczkowe bliższe. Do oceny aktywności choroby wykorzystano wizualną skalę analogową (ang. *visual analog scale*, VAS).

VAS jest prostym narzędziem pozwalającym na subiektywną ocenę danego parametru. Jest to graficzny odcinek o długości 100 mm, opisany słownie, prezentujący skrajne pozycje na końcach (od minimum po stronie lewej do maksimum po stronie prawej). Na skali zaznacza się pionową kreską (|) miejsce, które odpowiada stopniowi nasilenia badanego parametru. Odległość w mm od początku skali do zaznaczonego miejsca jest wynikiem oceny danego parametru (zakres 1-100 mm) [163]. W badaniu użyto skali VAS do:

- oceny natężenia bólu przez pacjenta,
- oceny nasilenia choroby przez pacjenta,
- niezależnej oceny stopnia nasilenia choroby przez lekarza.

Konstrukcję przykładowej skali VAS do oceny nasilenia choroby dokonywanej przez pacjenta i lekarza przedstawia Rycina 3.



Ryc. 3. Konstrukcja wizualnej skali analogowej do oceny aktywności choroby

Ponadto obliczono wskaźnik aktywności choroby DAS28 (ang. *28-joints disease activity score*) zalecany przez EULAR do oceny aktywności RZS oraz pozwalający ocenić skuteczność zastosowanego leczenia. Użyty w niniejszej pracy wskaźnik DAS28 obliczono z uwzględnieniem OB na podstawie wzoru:

$$\text{DAS28-OB} = 0,56 \times \sqrt{\text{TEN28}} + 0,28 \times \sqrt{\text{SW28}} + 0,7 \times \ln \text{OB} + 0,014 \times \text{PtGA}$$

gdzie:

ln – logarytm naturalny,

PtGA – ocena aktywności choroby przez pacjenta na skali VAS (ang. *Patient Global Assessment of Disease Activity*) [164].

Interpretacja wyniku DAS28-OB:

$\leq 2,6$ – remisja

$2,6 < \text{DAS28-OB} \leq 3,2$ – niska aktywność RZS

$3,2 < \text{DAS28-OB} \leq 5,1$ – umiarkowana aktywność RZS

$> 5,1$ – duża aktywność RZS.

3.1.3. Roztwory i odczynniki chemiczne

Agaroza (*Sigma*)

Akrylamid-Bisakrylamid 29:1 (*Bio-Rad*)

Alkohol etylowy 95% (*POCh*)

APS-nadsiarczan amonu (*Sigma*)

Błękit trypanu 0,4% (*Sigma*)

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent 10x (*Bio-Rad*)

Chloroform (*POCh*)

deoksyrybonukleotydy 2,5 mM (*Fermentas*)

EDTA (*Sigma*)

Glicyna (*POCh*)

Inhibitor proteaz (*Sigma*)

Interleukina-1 β (*Sigma*)

Izopropanol (*POCh*)

Lipofektamina Lipofectamine2000 (*Invitrogen*)

6 \times Loading Dye Solution (*Fermentas*)

Marker wielkości mas GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (*Fermentas*)

Metanol (*Sigma*)

Midori Green (*Nippon Genetics Europe*)

Molekularny marker masy białek (*Fermentas*)

Ponceau-S (*Sigma*)

RIPA-bufor do izolacji białka (*Sigma*)

SDS-dodecylosiarczan sodu (*BioShop*)

Substraty dla peroksydazy chrzanowej *Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (*ThermoScientific*)

TEMED N,N,N',N'-tetrametylenoetylenodiamina (*Sigma*)

Trizma BASE (*Sigma*)

Trizol (*Sigma*)

Trypsyna (*Life Technologies*)

Tween 20 (*Sigma*)

Wywoływacz i utrwalacz (*Primax*)

3.1.4. Bufory i barwniki

PBS - roztwór soli fizjologicznej zbuforowany fosforanem o pH 7,4:

NaCl [137 mM] + KCl [2,7 mM] + Na₂HPO₄ [4,3 mM] + KH₂PO₄ [1,4 mM]

Bufor TBE 10× stężony:

Tris Base [88 mM] + kwas borowy [89 mM] + EDTA [2mM]

Bufor TBS 10×stężony:

Tris Base [10 mM] + NaCl [1,5 M]

Bufor TBS-Tween:

100 ml buforu 10×TBS + 900 ml wody ultraczystej + 1 ml Tween-20

Bufor glicynowy 10× stężony:

Tris Base [0,25 M] + glicyna [1.92 M] + SDS [1%]

Bufor do transferu białek 5× stężony (800 ml):

15,15 g Tris Base + 72 g glicyny + 1,25 g SDSu

Bufor do transferu 1×:

40 ml buforu do transferu 5× + 40 ml metanolu + 120 ml wody ultra czystej

Bufor obciążający do białek 3× stężony, pH 6,8:

4% SDS + 10% β-merkaptoetanol + 20% glicerol + 0,004% błękit bromofenolowy + 0,125 M Tris HCl

3.1.5. Sprzęt jednorazowy

Końcówki do pipet automatycznych (*Eppendorf*)

Naczynia do hodowli *in vitro* T-25 cm² i T-75 cm² (*SPL Life Sciences*)

Pipety Pasteur'a sterylne 3 ml (*Medlab*)

Płytki Petri'ego (*TPP*)

Probówki polipropylenowe sterylne 1,5 ml (*Axygen*)

Probówki polipropylenowe 15 ml i 50 ml (*BD Falcon*)

Cienkościenne probówki polipropylenowe 200 µl (*Axygen*)

3.1.6. Aparatura

Aparat do archiwizacji żeli (*Syngene*)

Aparat do elektroforezy pionowej białek (*Bio-Rad*)

Aparat do elektroforezy poziomej (*Life Technologies*)

Aparat do ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym Rotor Gene 6000 (*Corbett Life Science*)

Aparat do półsuchego transferu białek Mini Semi Dry Blotting System EPS-B0020 (*EPS-BIO*)

Cieplarka Air-Jacketed DH Autoflow Automatic CO₂ Incubator (*NuAir*)

Cytometr przepływowy FACScan (*Becton Dickinson*)

Komora laminarna HeraSafe (*Heraeus*)

Mikroskop odwrócony ECLIPSE TS100 (*Nikon*)

Pipety automatyczne (*Eppendorf*)

Spektrofotometr BioPhotometer (*Eppendorf*)

NanoDrop[®] ND-1000 (*Thermo Scientific*)

Termocykler Mastercycler ep (*Eppendorf*)

Mieszadło wirowe Minishaker MS1 (*IKA*)

Wirówka EBA 12R (*Hettich*)

Zasilacz (*Bio-Rad*)

3.2. Metody doświadczalne

3.2.1. Izolacja monocytów z krwi obwodowej

Do izolacji monocytów użyto kuleczek Dynabeads® CD14⁺ (*Life Technologies*). Są to nadparamagnetyczne, sferyczne cząstki polimerowe o takiej samej wielkości, mające powierzchnię zdolną do adsorbowania lub sprzęgania bioreaktywnych molekuł lub komórek. Są utworzone z polistyrenu i materiału magnetycznego osadzonego w równomiernie rozmieszczonych porach. Związki żelaza są zamknięte wewnątrz kuleczek przez dodatkową warstwę polimeru [165].

Izolację monocytów wykonano według poniższych etapów:

1. Przygotowanie kulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałem anti-CD14:

Potrzebną ilość kulek Dynabeads® przenoszono do próbówki (25 µl zawiesiny kuleczek na 1 ml krwi). Do zawiesiny dodawano tę samą objętość buforu 1 (PBS + 0.1% BSA, pH 7.4). Probówkę umieszczano w statywie magnetycznym na minutę, po czym odrzucano supernatant. Probówkę wyjmowano ze statywu i zawieszano przemyte kuleczki w buforze 1 w objętości odpowiadającej początkowej objętości pobranych kuleczek magnetycznych.

2. Przygotowanie krwi:

Krew poddawano obróbce w dniu pobrania. 8 ml krwi obwodowej pobierano do probówek z EDTA i rozcieńczano w buforze 2 (PBS + 0.1% BSA + 2 mM EDTA, pH 7.4) w stosunku 1:2 w celu wyeliminowania rozpuszczalnej formy CD14⁺ i innych składników surowicy mogących zredukować wydajność immunomagnetycznej izolacji monocytów [165]. Całość wirowano 10 minut przy prędkości 600 × g w temperaturze 18-25°C. Frakcję osocza odrzucano i uzupełniano schłodzonym buforem 2 do początkowej objętości.

3. Pozytywna izolacja komórek CD14⁺:

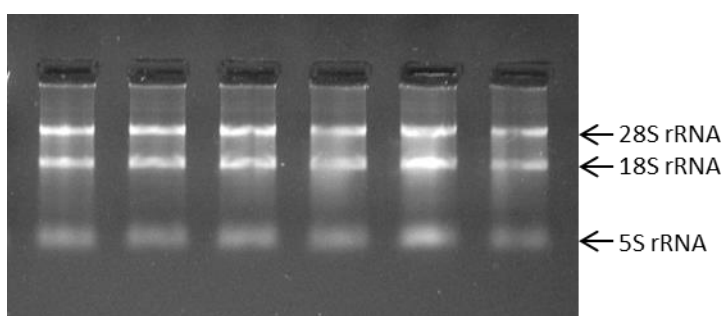
Do przygotowanej próbki krwi dodawano odpowiednią ilość kuleczek Dynabeads (25 µl kulek na 1 ml krwi). Próbki inkubowano przez 20 minut w temperaturze 4°C łagodnie obracając i przechylając. Następnie umieszczano je w statywie magnetycznym na 2 minuty. Supernatant odrzucano, natomiast komórki związane z kulkami przemywano 3 razy buforem PBS. Komórki lizowano przy pomocy Trizolu i przechowywano w temperaturze -70°C do momentu izolacji RNA.

3.2.2. Izolacja RNA

RNA wyizolowano przy użyciu odczynnika Trizol wg metody Chomczyńskiego i Sacchi [166]. Do prób z Trizolem dodano po 200 μ l chloroformu i intensywnie wytrząsano przez około 30 sekund. Próby inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej i wirowano 15 minut przy prędkości $12000 \times g$ w 4°C . 500 μ l fazy wodnej zawierającej RNA przeniesiono do nowej probówki, po czym dodano 700 μ l izopropanolu. Po całkowitym wytrącaniu RNA w -20°C próby wirowano 15 minut przy prędkości $12000 \times g$, 4°C . Izopropanol usunięto a osad przemyto 1 ml schłodzonego 75% etanolu (przygotowanego z wodą wolną od RNaz), wirując 15 minut $12000 \times g$, 4°C . Supernatant usunięto a osadzony RNA rozpuszczano w 10 μ l H_2O .

Pomiaru stężenia RNA i oceny stopnia zanieczyszczenia preparatu białkami (na podstawie współczynnika 260/280) dokonano z wykorzystaniem oprogramowania ND-1000 v. 3.7.1. nanosząc 1 μ l rozpuszczonego RNA na podstawkę spektrofotometru NanoDrop[®] ND-1000. Uzyskana wartość 260/280 nm mieściła się najczęściej w zakresie 1.8-2.0, co jest typowym wynikiem uzyskanym dla prób RNA, wskazującym na wysoką czystość materiału.

Dodatkowo sprawdzono integralność RNA, przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika dla kwasów nukleinowych Midori Green DNA Stain (*Nippon Genetics Europe*) w buforze $1 \times \text{TBE}$ przy napięciu elektrycznym 100 V. Zdjęcie wykonano aparatem Canon PowerShot G10 za pomocą oprogramowania Gene Tools v. 4.01 (e) (*Syngene*).



Ryc. 4. **Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego całkowitego RNA.** Do kieszonek nałożono po 1 μ g całkowitego RNA i poddano rozdziałowi elektroforetycznemu w żelu agarozowym. Na rycinie oznaczono główne frakcje rybosomalnego RNA (rRNA).

3.2.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Syntezę komplementarnego DNA (cDNA) przeprowadzono za pomocą zestawu do odwrotnej transkrypcji QuantiTect Reverse Transcription (*Qiagen*) według następujących etapów:

1. Przygotowanie mieszaniny eliminującej genomowy DNA z reakcji:

gDNA Wipeout Buffer 7×	2 μ l
RNA	1 μ g
woda wolna od RNaz	do 12 μ l
	<hr/>
	14 μ l

2. Dwuminutowa inkubacja w temperaturze 42°C

3. Umieszczenie próbek na lodzie

4. Przygotowanie mieszaniny z odwrotną transkryptazą:

RT	1 μ l
RT buffer	4 μ l
RT Random Primer mix	1 μ l
+ RNA	14 μ l
	<hr/>
	20 μ l

5. 20-minutowa inkubacja w temperaturze 42°C

6. 3-minutowa inkubacja w temperaturze 95°C

7. Zsyntetyzowany cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do momentu przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.2.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Poziom ekspresji badanych genów oznaczano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, qPCR*). Reakcje przeprowadzono w probówkach cienkościennych przeznaczonych do PCR wykonanych z polipropylenu w objętości końcowej 12,5 μ l, z wykorzystaniem zsyntetyzowanego cDNA, starterów specyficznych dla badanych genów (Tabela 2) i zoptymalizowanego zestawu QuantiFast[®] SYBR Green PCR (*Qiagen*).

Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji transkryptów wybranych genów w przeliczeniu na jedną próbę był następujący:

- 6,25 μ l mieszaniny 2 \times QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix
- + 1,25 μ l mieszaniny starterów [stężenie końcowe każdego startera dla badanych genów wynosiło 1 μ M, dla *PBGD* 0,75 μ M]
- + 3,75 μ l wody wolnej od nukleaz
- + 1,25 μ l cDNA

Profil reakcji qPCR:

1. Denaturacja wstępna 95°C, 5 minut
 2. Denaturacja 95°C, 10 sekund
 3. Przyłączenie starterów i synteza nici komplementarnej 60°C, 30 sekund
 4. Analiza krzywej topnienia produktów reakcji w celu zweryfikowania specyficzności reakcji obejmująca podgrzanie produktów reakcji z 70°C do 95°C i ciągłą analizę zmiany fluorescencji.
- } 40 cykli

Każdorazowo przy ustalaniu poziomu monocytarnej ekspresji badanych genów w każdej reakcji stosowano kontrolę negatywną bez cDNA oraz kalibrator w celu skorygowania rozbieżności powstających pomiędzy przeprowadzanymi z osobna reakcjami. Za kalibrator posłużył cDNA pozyskany z hodowanych *in vitro* pierwotnych synowocytów typu B. Reakcje wykonano w dwóch powtórzeniach.

Reakcje qPCR przeprowadzono przy użyciu aparatu Rotor-Gene 6000 (*Corbett Research*) i oprogramowania Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.

Przy projektowaniu par starterów unikano wyboru miejsc hybrydyzacji starterów z mogącymi wystąpić polimorfizmami pojedynczego nukleotydu. Startery tworzące parę przyłączały się w różnych eksonach lub na ich łączeniu.

Tabela 2. Charakterystyka starterów użytych do reakcji qPCR

<i>CAVI</i> NM_001753	Sensowny (ekson 2)	Antysensowny (ekson 3)
sekwencja (5'→3')	GACCCTAAACACCTCAAC	AACCAGTATTTTCGTACACAG
temperatura topnienia	58,7°C	59°C
długość produktu	134 pz	
<i>PBGD</i> NM_000190	Sensowny (ekson 11)	Antysensowny (ekson 12/13)
sekwencja (5'→3')	GCCAAGGACCAGGACATC	<u>TCAGGTACAGTTGCCCATC</u>
temperatura topnienia	62°C	60,4°C
długość produktu	160 pz	
<i>Src</i> NM_005417	Sensowny (ekson 2)	Antysensowny (ekson 3)
sekwencja (5'→3')	GACCTGTCCTTCAAGAAAG	GGATGTAGCCTGTCTGTC
temperatura topnienia	59,3°C	60,6°C
długość produktu	103 pz	
<i>Nck2</i> NM_001004720	Sensowny (ekson 1)	Antysensowny (ekson 2)
sekwencja (5'→3')	CCCTCGTGAAGAACCTGAAG	CACATAGGCGAACTTGACGA
temperatura topnienia	64,2°C	64,2°C
długość produktu	173 pz	
<i>RhoA</i> NM_001664.2	Sensowny (ekson 3)	Antysensowny (ekson 4)
sekwencja (5'→3')	CAGAAAAGTGGACCCCAGAA	TGCCTTCTTCAGGTTTCACC
temperatura topnienia	60,2°C	58°C
długość produktu	147 pz	
<i>CCL2</i> NM_002982	Sensowny (ekson 2)	Antysensowny (ekson 3)
sekwencja (5'→3')	AGAAGAATCACCAGCAGCAAGT	GGAATCCTGAACCCACTTC
temperatura topnienia	61,5°C	61,7°C
długość produktu	102 pz	

3.2.5. Obliczenie względnej ekspresji badanych genów

Do określenia względnej ekspresji genów zastosowano metodę opartą na tworzeniu krzywej standardowej dla każdej pary użytych starterów z osobna [167].

Krzywe standardowe wygenerowano na podstawie qPCR dla pięciu sześciokrotnych rozcieńczeń mieszaniny losowo wybranych prób cDNA, odpowiadających zakresowi spodziewanych poziomów ekspresji badanych genów. Wydajność reakcji, oceniana jako przyrost produktu po każdym jej cyklu, została wyliczona automatycznie w oparciu o nachylenie krzywej standardowej wg wzoru:

$$\text{Wydajność [\%]} = \left(10^{\left(\frac{1}{\text{nachylenie krzywej standardowej}} \right)} - 1 \right) \times 100\%$$

Analizy wyników dokonano za pomocą oprogramowania Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 oraz programu Excel 2010.

Ekspresję badanych genów normalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego *PBGD* stanowiącego kontrolę endogenną. Wyniki ekspresji genów w komórkach CD14⁺ odnoszono dodatkowo do ustalonego kalibratora.

Wyniki wyrażono w jednostkach arbitralnych jako [gen badany/gen referencyjny].

3.2.6. Hodowla pierwotna synowocytów typu B

Synowioocyty typu B pozyskano w wyniku założenia hodowli pierwotnej komórek obecnych w płynie stawowym pobranym od chorych na RZS według dostępnego protokołu [168]. Wysiłek stawowy aspirowano ze stawów kolanowych do sterylnych probówek z EDTA, następnie rozcieńczano buforem PBS w proporcji 1:2 i wirowano 10 minut przy prędkości 1500 rpm w temperaturze pokojowej. Osad zawieszano w pożywce Eagle'a zmodyfikowanej przez Dulbecco (ang. *Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM) z 10% zawartością bydlęcej surowicy płodowej oraz dodatkiem antybiotyku i antymykotyku (10000 U penicyliny/ml, 10 mg streptomycyny/ml i 25 µg amfoterycyny B/ml) i inkubowano 24 godziny. Następnego dnia odmywano nieadherentne leukocyty wielojądrzaste, limfocyty i monocyty, pozostawiając adherentne makrofagi i kolonie formujące synowioocyty typu B i hodowano w sterylnych, wentylowanych butelkach T-flask, na pożywce DMEM z 10% zawartością bydlęcej surowicy płodowej i dodatkiem antybiotyku-antymykotyku w 37°C w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ o 100% wilgotności.

Z uwagi na fakt, że makrofagi/monocyty wykazują większą oporność na działanie tripsyny, zazwyczaj średnio po 3-4 pasażu synowioocyty typu B są dominującą, względnie jednorodną populacją komórek [67, 70]. FLS pozyskane z płynu stawowego są morfologicznie bardzo podobne do fibroblastów pochodzących z błony maziowej. Wykazują również inne cechy fibroblastów pozyskanych z błony maziowej i jest wysoce prawdopodobne, że reprezentują subpopulację fibroblastów, które się od niej oderwały [42].

3.2.7. Ocena cytometryczna komórek

Komórki uzyskane z hodowli pierwotnej poddawano bezpośredniej reakcji z zestawem przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromem (Tabela 3). Dodatkowo wykonano kontrolę izotypową.

Tabela 3. Przeciwciała wykorzystane do oceny cytometrycznej komórek

Symbol przeciwciała	Fluorochrom	Klon	Źródło
CD14	Pe	MφP9	Becton Dickinson (345785)
CD163	APC	215927	R&D (FAB1607A)
CD45	APC-Cy7	2D-1	Becton Dickinson (348815)

Komórki inkubowano z przeciwciałami w temperaturze pokojowej przez 20 minut bez dostępu światła. Następnie dodano około 500 μ l roztworu lizującego (FACS lysing solution, Becton Dickinson) w rozcieńczeniu 1:10 i ponownie inkubowano 10 minut w ciemności. Komórki dwukrotnie przepłukano w roztworze PBS wirując 4 minuty $1200 \times g$. Osad komórek zawieszono w około 500 μ l PBS i poddano akwizycji w cytometrze przepływowym FACScan firmy Becton Dickinson. Każdorazowo zbierano 30000 komórek.

3.2.8. Analiza ekspresji *CAVI* w synowocytach typu B

Zdolność wyhodowanych *in vitro* synowocytów typu B do ekspresji genu *CAVI* sprawdzono jakościowo za pomocą reakcji PCR.

Reakcja PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej w przeliczeniu na jedną próbkę:

3,1 μ l wody wolnej od nukleaz

5 μ l mieszaniny DreamTaq PCR Master Mix 2 \times z dodatkiem obciążacza (*Fermentas*)

0,4 μ l mieszanina starterów (5 μ M startera sensownego + 5 μ M startera antysensownego)

1,5 μ l cDNA

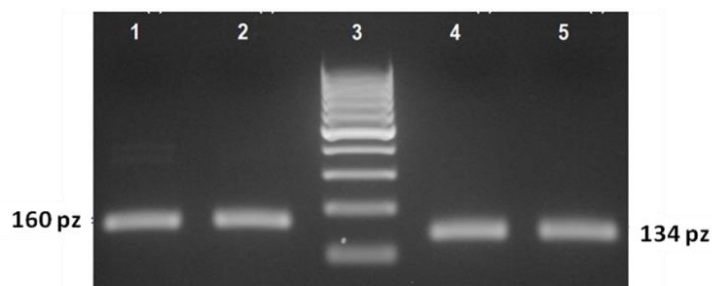
Profil reakcji:

1. Denaturacja wstępna 95°C, 3 minuty
 2. Denaturacja 95°C, 30 sekund
 3. Przyłączenie starterów 60 °C, 30 sekund
 4. Synteza nici DNA 72°C 30 sekund
 5. Synteza końcowa 72°C 10 minut
- } 35 cykli

Rozdział elektroforetyczny:

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika dla kwasów nukleinowych Midori Green DNA Stain (*Nippon Genetics Europe*) w buforze 1 \times TBE przy napięciu 100 V w obecności markera wielkości mas 100 pz DNA Ladder (*Fermentas*).

Po rozdziale żel analizowano w świetle UV i fotografowano (Ryc. 5.). Zdjęcie wykonano aparatem Canon PowerShot G10 za pomocą oprogramowania Gene Tools v. 4.01 (e) (*Syngene*).



Ryc. 5. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR.

- 1 i 2 - gen referencyjny *hPBGD*
- 3 - marker wielkości DNA 100 pz
- 4 i 5 – gen badany *CAVI*

3.2.9. Optymalizacja warunków transfekcji siRNA

A) W celu dobrania optymalnych stężeń odczynników do transfekcji synowocytów typu B wykorzystano BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo (*Invitrogen*) oraz lipofektaminę (Lipofectamine 2000, *Invitrogen*). BLOCK-iTTM jest znakowanym fluoresceiną dwuniciowym dupleksem RNA o tej samej długości, ładunku i konfiguracji co standardowy siRNA. Sekwencja BLOCK-iTTM nie jest homologiczna do żadnego z poznanych ludzkich genów. Naładowane dodatnio liposomy powstałe w wyniku połączenia lipofektaminy i siRNA pozwalają na fuzję tych kompleksów z negatywnie naładowanymi komórkami.

W momencie osiągnięcia około 80% konfluencji usuwano pożywkę, komórki przemywano dwukrotnie jałowym buforem PBS i poddano działaniu roztworu trypsyny z EDTA. Gdy połączenia między komórkami zaczynały zanikać, a komórki odrywały się od powierzchni butelki, dodawano dwie objętości pożywki hodowlanej z surowicą w celu zahamowania aktywności trypsyny. Zawartość pipetowano i przelewano do probówki typu Falcon. Komórki wirowano przy prędkości $200 \times g$ przez 5 minut. Po wirowaniu usuwano supernatant, a osad komórkowy rozbijano i zawieszano w 10 ml buforu PBS. W celu określenia orientacyjnej liczby żywych komórek, pobierano 50 μ l zawiesiny komórek i mieszano z błękitem trypanu w stosunku 1:1. Komórki liczone przy użyciu komory Bürkera z uwzględnieniem liczby żywych komórek.

Po określeniu średniej liczby komórek, w każdym dołku o powierzchni $9,6 \text{ cm}^2$ na płaskodennej płytce sześciodołkowej umieszczano po 10^5 synowocytów zawieszonych w 2,5 ml pożywki DMEM. Następnego dnia pożywkę usunięto, komórki przepłukano pożywką Opti-MEM i dodano po 2 ml Opti-MEM (*Life Technologies*) na dołek. W osobnych probówkach do 250 μ l Opti-MEM dodawano rozcieńczone siRNA

BLOCK-iT (stężenia końcowe: 10 nM, 100 nM i 200 nM siRNA). Do drugiej porcji pożywki 250 µl dodano odczynnik do transfekcji Lipofectamine®2000 (0,2% lub 0,4% v/v). Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej rozcieńczone siRNA i lipofektaminę połączono, delikatnie wymieszano i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksów lipofektamina-kwas nukleinowy. Po 20 minutach do każdego dołka dodano po 500 µl powstałych kompleksów w różnych kombinacjach. Następnie komórki hodowano w obecności siRNA przez 48 godzin.

Na podstawie wizualnej oceny intensywności emitowanej fluorescencji zależnej od wydajności transfekcji oraz tempa wzrostu badanych komórek wybrano najlepsze warunki, w których wyznakowany fluoresceiną BLOCK-iT wnikał do badanych komórek.

B) W dalszej kolejności dobrano optymalną dawkę CAV1-siRNA (sc-29241, *Santa Cruz Biotechnology*) obniżającą poziom CAV1.

Do transfekcji użyto CAV1-siRNA o stężeniu końcowym 10, 50 i 100 nM oraz takie same stężenia siRNA kontrolnego siRNA-A (sc-37007, *Santa Cruz Biotechnology*). Transfekcję przeprowadzono wg opisu w punkcie A.

Sekwencja i lokalizacja użytego siRNA w mRNA CAV1 były następujące:

Sensowna: 5' AACCAGAAGGGACACACAG 3'

Antysensowna: 5' CUGUGUGUCCCUUCUGGUU 3'

5' EKSON1/EKSON2-~~starterF~~-EKSON2/EKSON3-~~siRNA~~-EKSON3-~~starterR~~-EKSON3 3'

3.2.10. Dobór optymalnej dawki IL-1 β pobudzającej ekspresję CCL2

Ponieważ hodowane *in vitro* synowioocyty typu B są zdolne do spontanicznej produkcji cytokin jedynie przez pierwsze tygodnie hodowli, aby pobudzić w nich ekspresję genu *CCL2*, konieczne jest poddanie ich stymulacji np. IL-1 β uważaną za czynnik odgrywający główną rolę w rozwoju stanu zapalnego błony maziowej [169].

W związku z powyższym synowioocyty typu B inkubowano w pożywce z dodatkiem IL-1 β w stężeniach 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml i 10 ng/ml w celu ustalenia optymalnej dawki IL-1 β zdolnej do pobudzenia ekspresji *CCL2*. Po upływie 2 godzin zebrano nadsącza komórkowe, w których następnie oznaczono stężenie wydzielonej chemokiny *CCL2*, komórki przemyto buforem PBS i lizowano za pomocą Trizolu, a następnie określono względną ekspresję *CCL2* za pomocą qPCR.

Stężenie *CCL2* w nadsączach uzyskanych z hodowli eksperymentalnej oznaczono za pomocą testu ELISA Quantikine Human *CCL2*/MCP-1 Immunoassay (R&D) według następującego protokołu:

Przygotowanie próbek:

Nadsącza komórkowe zebrane po inkubacji komórek z IL-1 β przechowywano w temperaturze -70°C. Po rozmrożeniu wirowano 5 minut przy prędkości 900 \times g.

Standard o stężeniu 2000 pg/ml *CCL2* rozcieńczono za pomocą odczynnika Calibrator Diluent RD5L (1 \times). Pozostałe standardy przygotowano na podstawie rozcieńczeń wyjściowego standardu: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml i 31.2 pg/ml.

Procedura wykonania testu:

Do studzienek dodano po 200 μ l standardów, kontroli negatywnej i badanych nadsączy. Płytkę zabezpieczono przed parowaniem folią samoprzylepną a następnie inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej.

Zawartość studzienek opróżniono i przemywano 3 razy po 400 μ l buforem przemywającym Wash Buffer 1 \times dokładnie usuwając resztki buforu po każdym cyklu. Do każdej studzienki dodano 200 μ l koniugatu i inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej zabezpieczając studzienki folią samoprzylepną.

Po godzinie powtórzono cykle przemywania.

Następnie do każdej studzienki dodano po 200 μ l roztworu substratu i inkubowano 20 minut chroniąc płytkę przed światłem.

Do każdej studzienki dodano roztwór hamujący reakcję, który powoduje zmianę barwy zawartości dołków z niebieskiego na żółty.

Odczytu dokonano za pomocą czytnika ELx800 (BioTek) przy użyciu oprogramowania KCjunior™ Data Analysis przy długości fali 450 nm i fali referencyjnej w zakresie 540-570 nm.

Względna ekspresja transkryptu *CCL2* została oznaczona za pomocą reakcji qPCR wg metod opisanych w punktach od 3.2.2. do 3.2.5.

3.2.11. Przebieg eksperymentu badającego wpływ wyciszenia ekspresji *CAV1* na ekspresję *CCL2*

Do eksperymentów używano komórek pochodzących z 3-10 pasażu. Komórki są wówczas bardziej jednorodne niż w pasażu 1-2. Użyty *CAV1*-siRNA (h) to specyficzny dla *CAV1* mały interferujący RNA o długości 19-25 nukleotydów. Użyty kontrolny siRNA-A nie posiada sekwencji homologicznej do żadnego ludzkiego mRNA.

Komórki transfekowano zgodnie z opisem w punkcie 3.2.9. z wykorzystaniem *CAV1*-siRNA (50 nM) i kontrolnego siRNA-A (50 nM). W celu sprawdzenia wydajności procesu transfekcji, każdorazowo równoległe do prowadzonych transfekcji komórki transfekowano siRNA znakowanym fluoresceiną BLOCK-iT i oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym.

Ze uwagi na fakt, że we wstępnych doświadczeniach zaobserwowano wzrost ekspresji wyciszanego genu pod wpływem IL-1 β , po 48 godzinach komórki poddawano ponownej transfekcji. Następnie komórki transfekowane oraz nietransfekowane inkubowano w obecności IL-1 β rozcieńczonej w Opti-MEM w stężeniu 1 ng/ml w celu wzbudzenia ekspresji *CCL2*. Równoległe inkubowano komórki w Opti-MEM bez dodatku IL-1 β . Po upływie 2 godzin pożywkę zbierano, komórki lizowano Trizolem w celu izolacji RNA lub buforem RIPA służącym do izolacji białek. Próby przechowywano w -70°C do momentu wykonania analiz. W zebranych materiale biologicznym oceniono ekspresję *CAV1* i *CCL2*. Eksperyment wykonano trzykrotnie w trzech niezależnych powtórzeniach na komórkach pochodzących od trzech pacjentów.

3.2.12. Analiza *Western blotting*

3.2.12.1. Izolacja i pomiar stężenia białek

Izolację białek przeprowadzono przy użyciu buforu RIPA. Do uzyskanego osadu komórkowego podawano 11,25 μl buforu RIPA i intensywnie pipetowano. Dodatkowo, by uchronić białka przed degradacją, dodawano 1,25 μl inhibitora proteaz (*Sigma*). Całość inkubowano na lodzie przez 60 minut a następnie wirowano 10 minut $10000 \times g$, po czym mierzono stężenie białka. Pomiaru stężenia ogólnej ilości białka w poszczególnych próbach dokonano metodą Bradford [170]. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko przesunięcia maksimum absorpcji roztworu barwnika – błękitu brylantowego Coomassie G-250 z 465 nm do 595 nm po związaniu z białkowymi resztami argininy, co wiąże się ze zmianą barwy z brunatnej na błękitną. Do oznaczenia stężenia białka dla jednej próby należało przygotować:

- 125 μl $2 \times$ stężonego odczynnika Bradford (*Bio-Rad*),
- 123,75 μl wody ultraczystej,
- 1,25 μl badanej próby zawierającej białko umieszczone w buforze RIPA.

Próba ślepa zawierała 125 μl $2 \times$ stężonego odczynnika Bradford, 123,75 μl wody ultraczystej i 1,25 μl buforu RIPA.

Absorbancję mierzono na spektrofotometrze przy użyciu sterylnych kuwet *UVette* (*Eppendorf*). Aby wyznaczyć stężenie białka w badanych próbach, wykonano krzywą kalibracyjną przy użyciu szeregu rozcieńczeń surowiczej albuminy bydlęcej (ang. *BSA-bovine serum albumin*).

3.2.12.2. Rozdział elektroforetyczny białek

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono w 12% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem dodecylosiarczanu (IV) sodu wg systemu Laemmli [171]. Do kieszonek nakładano marker wielkości PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (*Fermentas*), próbę zawierającą 20-30 μg białka zawieszzonego w buforze RIPA, 10 μl buforu obciążająco-denaturującego Laemmli $3 \times$ i uzupełnioną wodą ultraczystą do końcowej objętości 18 μl . Tak przygotowane próby denaturowano przed rozdziałem w 99°C 5 minut, chłodzono i nakładano na żel. Do pustych kieszonek nakładano rozcieńczony bufor obciążająco-denaturujący w celu równomiernego obciążenia wszystkich kieszonek, zapewniając w ten sposób prawidłowy rozdział prób. Rozdział prowadzono w $1 \times$ buforze glicynowym przy pomocy aparatu do elektroforezy pionowej

firmy Bio-Rad przez godzinę początkowo przy napięciu 100 V, następnie po przejściu prób przez żel zagęszczający przy napięciu 150 V.

Tabela 4. **Żele poliakryloamidowe do elektroforezy białek**

Składnik żelu	12% żel rozdzielający	5% żel zagęszczający
Woda ultraczysta	2,08 ml	1,095 ml
PAA 40%	1,44 ml	225 µl
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	1,2 ml	-
0,375 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	450 µl
SDS 10%	48 µl	18 µl
APS 10%	24 µl	9 µl
TEMED	7,2 µl	2,71 µl

3.2.12.3. Półsuchy transfer białek na membranę

Na 10 minut przed końcem elektroforezy bibuły i membranę z fluorku poliwinylidenu aktywowaną metanolem moczo w rozcieńczonym buforze do transferu. Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego dokonano półsuchego transferu białek na membranę przy użyciu aparatu do transferu półsuchego. Transfer prowadzono przez 50 minut przy napięciu elektrycznym około 13 V i natężeniu prądu elektrycznego rzędu 300-400 mA. Po transferze membranę z białkami wybarwiono 0,1% roztworem Ponceau-S w celu uwidocznienia frakcji białek. Barwnik usunięto a membranę przepłukano dwukrotnie wodą ultraczystą i przecięto na wysokości 30 kDa w celu jednoczesnego uwidocznienia obu badanych białek. Membrany blokowano przez noc w 4°C w roztworze 5% odtłuszczonego mleka rozpuszczonego w buforze TBS-T.

3.2.12.4. Inkubacja z przeciwciałami

Po blokowaniu membranę płukano trzykrotnie buforem TBS-T, a następnie inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej z przeciwciałem I-rzędowym przeciw CAV1 w 2% odtłuszczonym mleku rozpuszczonym w buforze TBS-T, rozcieńczonym w proporcji 1:5000. Następnie membranę płukano 3 razy po 10 minut buforem TBS-T i inkubowano w temperaturze pokojowej z przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym w 2% odtłuszczonym mleku w proporcji 1:20000. Część membrany z białkami o masie większej niż 30 kDa inkubowano z przeciwciałem przeciw β -aktynie sprzężonym z peroksydazą chrzanową rozcieńczonym w 2% odtłuszczonym mleku w proporcji 1:3000. Nadmiar przeciwciał usunięto, płuczając dwukrotnie po 10 minut buforem TBS-T oraz przez dwukrotne 5-minutowe płukanie buforem 1 \times TBS.

Do detekcji użyto odczynników SuperWest/Femto. Do wizualizacji wyników wykorzystano klisze rentgenowskie niebieskoczule. Czas naświetlania wyznaczono eksperymentalnie (10-60 sekund). Zmiany w ekspresji białka oceniono na podstawie intensywności zaczerwienia kliszy, wywołanej reakcją katalizowaną przez peroksydazę chrzanową sprzężoną z przeciwciałem II-rzędowym (lub sprzężonym z peroksydazą chrzanową przeciwciałem dla β -aktyny) za pomocą oprogramowania ImageJ. Ilość białka normalizowano względem sygnału otrzymanego dla β -aktyny jako białka referencyjnego.

Tabela 5. Przeciwciała wykorzystane do analizy *Western blotting*

Białko	Przeciwciało I-rzędowe	Przeciwciało II-rzędowe
CAV1 21 kDa	anty-CAV1, kozie poliklonalne 0.5 mg/ml, peptyd C-DELSEKQVYDAH (AP16383PU-N, Acris)	ośle anty-kozie poliklonalne IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową 0.4 mg/ml (sc-2033, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>)
β -aktyna 43 kDa	Actin I-19 HRP, kozie poliklonalne IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (sc-1616, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	

3.2.13. Analiza statystyczna wyników

Do analizy statystycznej wykorzystano programy Excel 2010, GraphPad Prism6 oraz STATISTICA, wersja 10.0 (www.statsoft.com).

Dane dotyczące grup badanych przedstawiono w postaci mediany i rozstępu międzykwartyłowego (ang. *interquartile range*, IQR) będącego różnicą między trzecim i pierwszym kwartyłem. Normalność rozkładu zmiennych ciągłych dotyczących badanych grup sprawdzano za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku niespełnienia kryteriów rozkładu normalnego, do sprawdzenia różnic w obrębie trzech grup stosowano analizę wariancji ANOVA Kruskala-Wallis'a, a następnie wykonano analizę *post hoc* stosując wielokrotne porównania średnich rang badanych grup. Dla grup o rozkładach normalnych i jednorodnych wariancjach (testowanych testem Levene'a) stosowano analizę ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. W zależności od typu rozkładu zmienne ilościowe poddano analizie korelacji Pearsona lub nieparametrycznej korelacji rang Spearmana.

W części doświadczalnej pracy używano jedno- lub dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W celu dokonania porównań między grupami wykonano analizę *post hoc*:

- dla porównań w odniesieniu do ustalonej grupy kontrolnej używano testu Dunnett'a,
- dla porównań między wszystkimi grupami zastosowano test HSD Tukey'a,
- dla wielokrotnych porównań w dwuczynnikowej ANOVA użyto testu Šídák'a.

Wyniki istotne statystycznie oznaczono w następujący sposób:

* dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka grup chorych

Tabela 6. Charakterystyka chorych na RZS

Chorzy na RZS	
Wiek [lata]	55 (8)
Płeć K/M	37/14
Czas trwania choroby [lata]	7 (8)
BMI [kg/m ²]	25,35 (5,02)
Schorzenia współistniejące, n (%)	
Nadciśnienie tętnicze	17 (33,33)
Choroby tarczycy	9 (17,65)
Hiperlipidemia	9 (17,65)
Choroba zwyrodnieniowa stawów kręgosłupa	5 (9,8)
Osteoporoza	4 (7,84)
Cukrzyca	2 (3,92)
Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka	2 (3,92)
Zakrzepowe zapalenie żył głębokich	2 (3,92)
Zespół cieśni nadgarstka	2 (3,92)
Anemia	1 (1,96)
Astma	1 (1,96)
Choroba niedokrwienna serca	1 (1,96)
Kamica nerkowa	1 (1,96)
Paluch koślawy	1 (1,96)
Przyjmowane leki	
Metotreksat, n (%)	44 (86,28)
Dawka przyjmowanego metotreksatu [mg/tydzień]	15 (5)
Glukokortykoidy, n (%)	33 (64,71)
NLPZ, n (%)	45 (88,24)
Sulfasalazyna, n (%)	1 (1,96)
Parametry laboratoryjne i kliniczne RZS	
OB (norma do 20 mm/h)	30 (24)
CRP (norma do 5 mg/l)	12,9 (16,65)
Liczba obrzękniętych stawów (0-28)	9 (10)
Liczba bolesnych stawów (0-28)	15 (13)
Aktywność choroby w skali VAS lekarza [mm]	48 (37)
Aktywność choroby w skali VAS pacjenta [mm]	58,5 (34)
Ból w skali VAS [mm]	55,5 (42)
DAS28-OB	6,25 (1,83)
28,57% chorych w przedziale $3,2 < \text{DAS28-OB} \leq 5,1$	
71,43% chorych z $\text{DAS28-OB} > 5,1$	

O ile nie wskazano inaczej, dane przedstawiają medianę (IQR).

VAS – wizualna skala analogowa, OB – odczyn Biernackiego, CRP - białko C-reaktywne, BMI – wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)

Tabela 7. Charakterystyka grupy chorych na ChZS

Chorzy na ChZS	
Wiek [lata], mediana (IQR)	62 (5)
Płeć K/M	9/2
Choroba zwyrodnieniowa, n (%)	
- kręgosłupa	9 (81,81)
- stawów kolanowych	2 (18,18)
- stawów biodrowych	1 (9,09)

4.2. Ocena ekspresji wybranych genów w komórkach CD14⁺

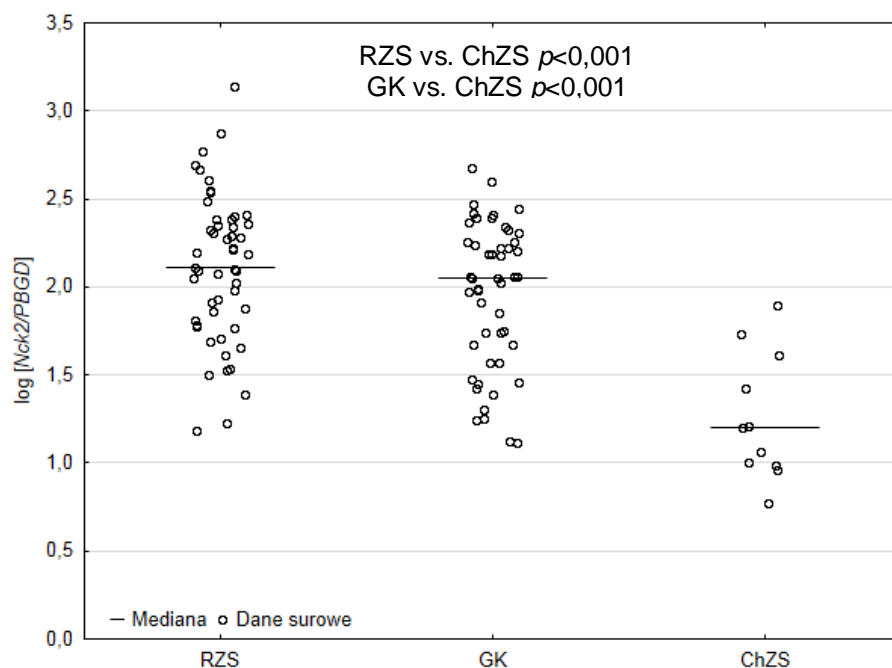
4.2.1. Analiza względnej ekspresji transkryptu genów *Nck2*, *RhoA*, *Src* i *CAVI* w komórkach CD14⁺ u chorych na RZS, grupie kontrolnej oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów

Ekspresję badanych genów w monocytach CD14⁺ oceniono za pomocą reakcji qPCR i normalizowano względem genu referencyjnego *PBGD* oraz ustalonego kalibratora. Wyniki wyrażone w postaci logarytmów dziesiętnych przedstawiają Tabela 8 oraz Ryciny 6-9.

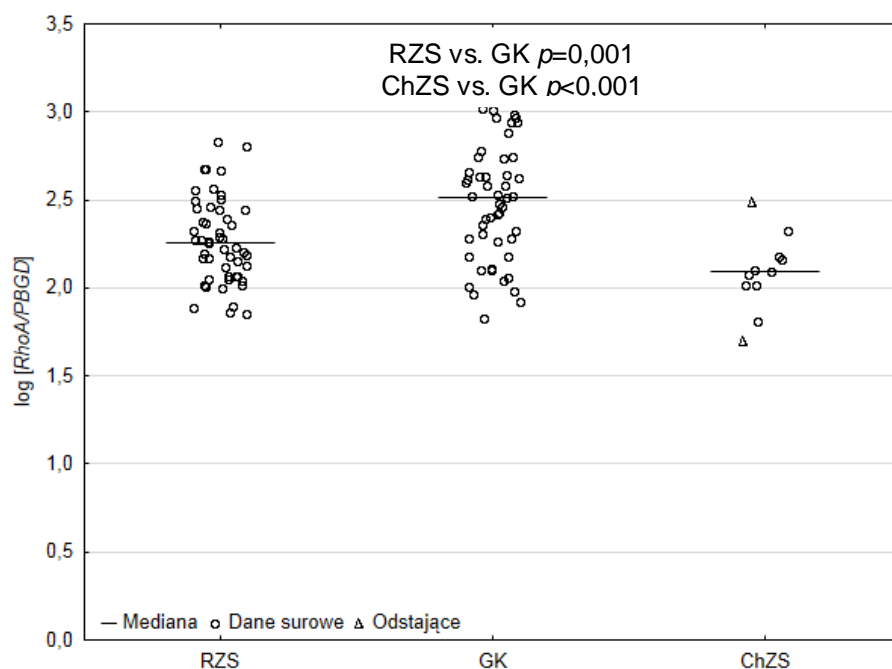
Tabela 8. Względne poziomy transkryptów badanych genów w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS, grupie kontrolnej oraz u chorych na ChZS

	RZS	GK	ChZS	<i>p</i>	
log[<i>Nck2</i>/<i>PBGD</i>]	Minimum	1,187	1,119	0,772	<0,001* RZS vs. ChZS
	Średnia±SD	2,109±0,420	1,961±0,415	1,262±0,360	
	Mediana (IQR)	2,114 (0,599)	2,054 (0,584)	1,206 (0,622)	<0,001* GK vs. ChZS
	Maksimum	3,136	2,676	1,899	
log[<i>RhoA</i>/<i>PBGD</i>]	Minimum	1,849	1,826	1,699	0,001# RZS vs. GK
	Średnia±SD	2,270±0,240	2,475±0,324	2,088±0,217	
	Mediana (IQR)	2,258 (0,382)	2,518 (0,388)	2,088 (0,165)	<0,001# GK vs. ChZS
	Maksimum	2,836	3,022	2,491	
log[<i>Src</i>/<i>PBGD</i>]	Minimum	1,653	1,083	1,463	0,239
	Średnia±SD	2,228±0,358	2,158±0,368	2,030±0,381	
	Mediana (IQR)	2,224 (0,501)	2,242 (0,565)	1,834 (0,681)	
	Maksimum	3,352	2,710	2,540	
log[<i>CAVI</i>/<i>PBGD</i>]	Minimum	0,163	1,314	1,984	0,458
	Średnia±SD	2,631±0,791	2,475±0,478	2,547±0,295	
	Mediana (IQR)	2,590 (0,752)	2,449 (0,516)	2,473 (0,362)	
	Maksimum	4,897	3,721	3,028	

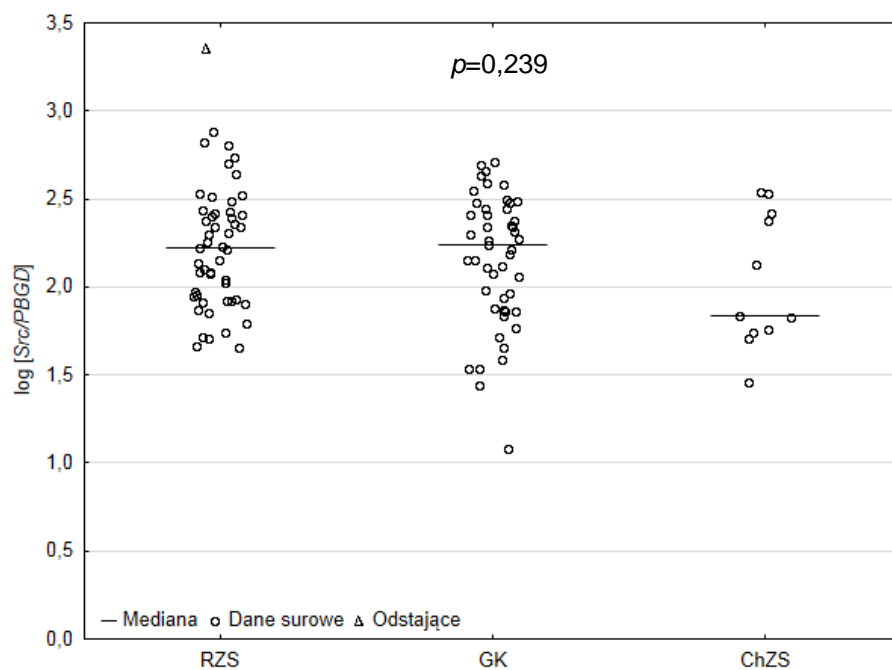
IQR - rozstęp międzykwartyłowy, *ANOVA Kruskala-Wallis z wielokrotnym porównaniem średnich rang, #ANOVA, test *post hoc* Tukey'a, SD - odchylenie standardowe



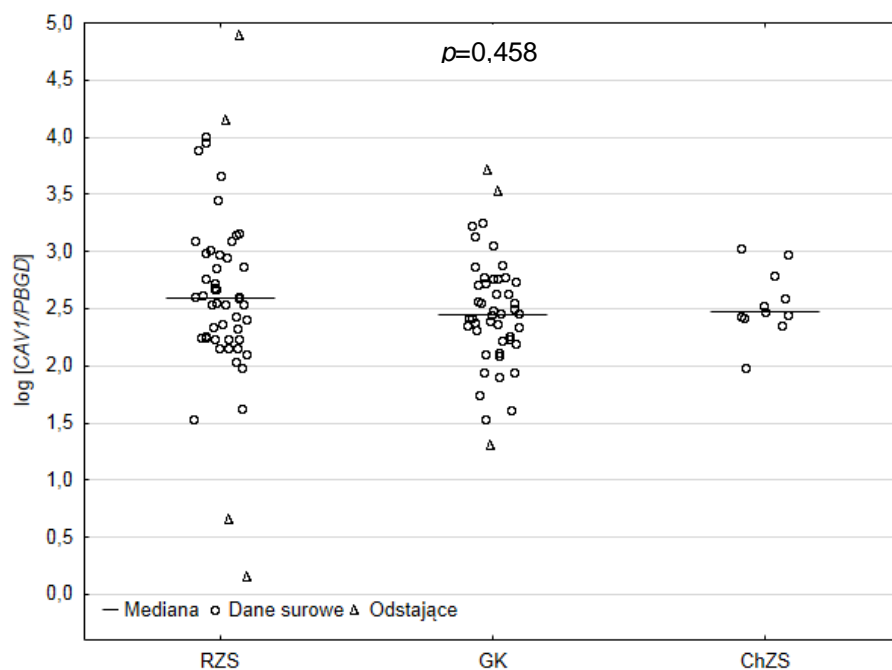
Ryc. 6. Względna ekspresja genu *Nck2* na poziomie transkryptu w monocytach $CD14^+$ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS). Różnice pomiędzy średnimi rang określono testem nieparametrycznym ANOVA Kruskala-Wallis'a, a następnie przeprowadzono wielokrotne porównania średnich rang badanych grup.



Ryc. 7. Względna ekspresja genu *RhoA* na poziomie transkryptu w monocytach $CD14^+$ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS). Rozkłady zmiennej porównano testem jednoczynnikowej ANOVA, a następnie dokonano porównań par średnich testem *post hoc* Tukey'a.



Ryc. 8. Względna ekspresja genu *Src* na poziomie transkryptu w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS). Rozkłady zmiennych porównano testem jednoczynnikowej ANOVA.



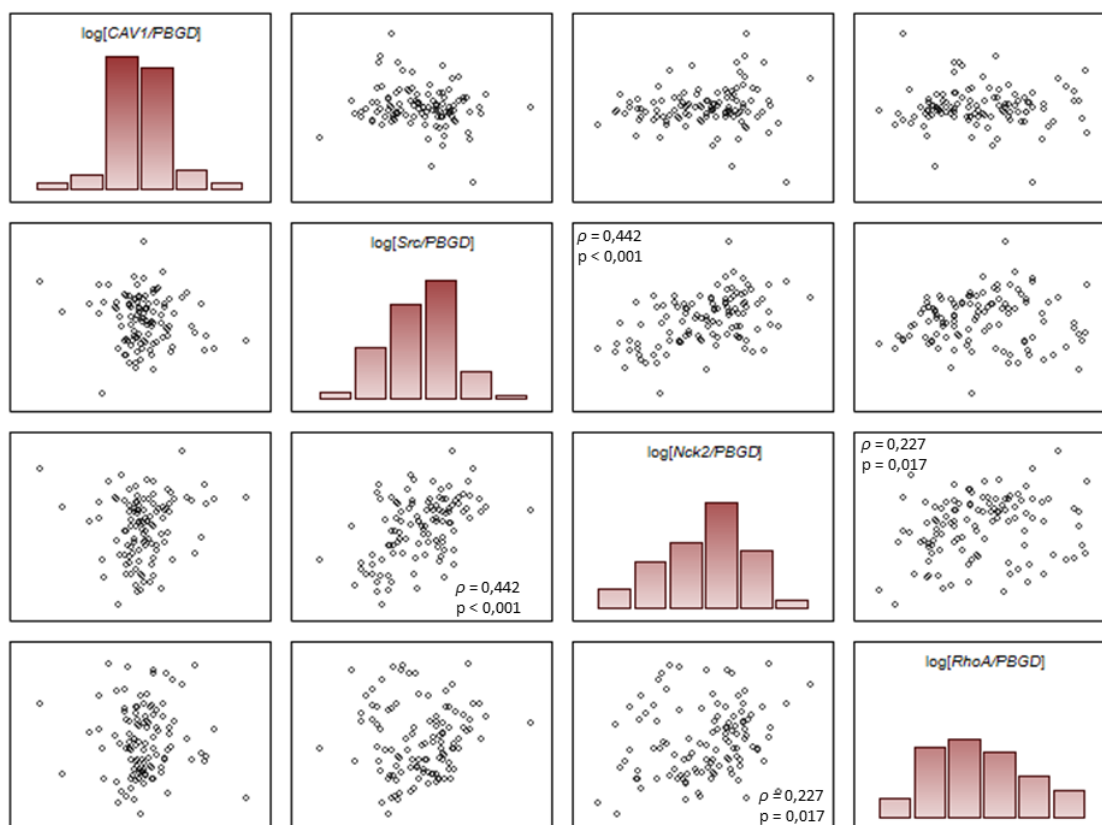
Ryc. 9. Względna ekspresja genu *CAV1* na poziomie transkryptu w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową (ChZS). Różnice pomiędzy średnimi rang określono testem nieparametrycznym ANOVA Kruskala-Wallisa.

4.2.2. Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu badanych genów w badanych grupach

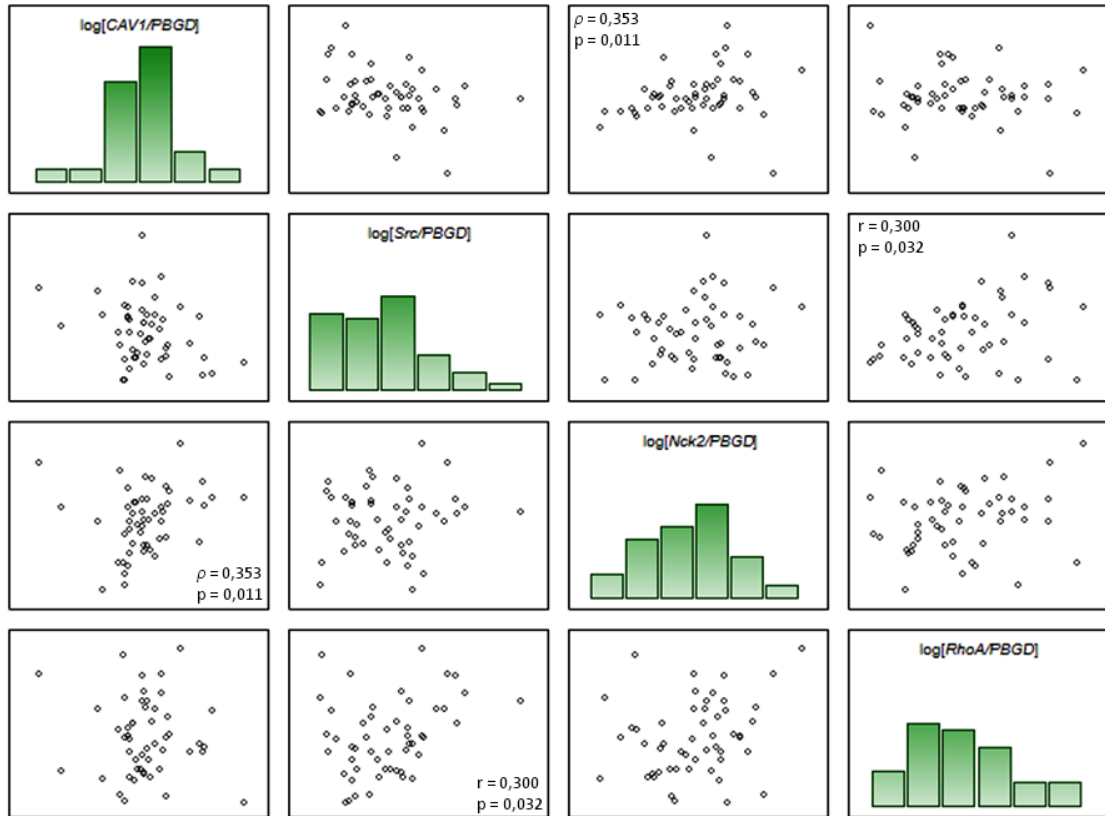
Wyniki analizy korelacji przedstawia Tabela 8. oraz Ryciny 10. i 11.

Tabela 9. Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu badanych genów we wszystkich badanych grupach (●) oraz tylko w grupie chorych na RZS (●).

CAVI	ρ Spearmana=-0,209 $p=0,142$	ρ Spearmana=0,353 $p=0,011$	ρ Spearmana=0,012 $p=0,936$
ρ Spearmana=-0,087 $p=0,369$	Src	ρ Spearmana=0,015 $p=0,915$	r Pearsona=0,300 $p=0,032$
ρ Spearmana=0,154 $p=0,110$	ρ Spearmana=0,442 $p<0,001$	Nck2	ρ Spearmana=0,223 $p=0,116$
ρ Spearmana=0,062 $p=0,524$	r Pearsona=0,046 $p=0,634$	ρ Spearmana=0,227 $p=0,017$	RhoA



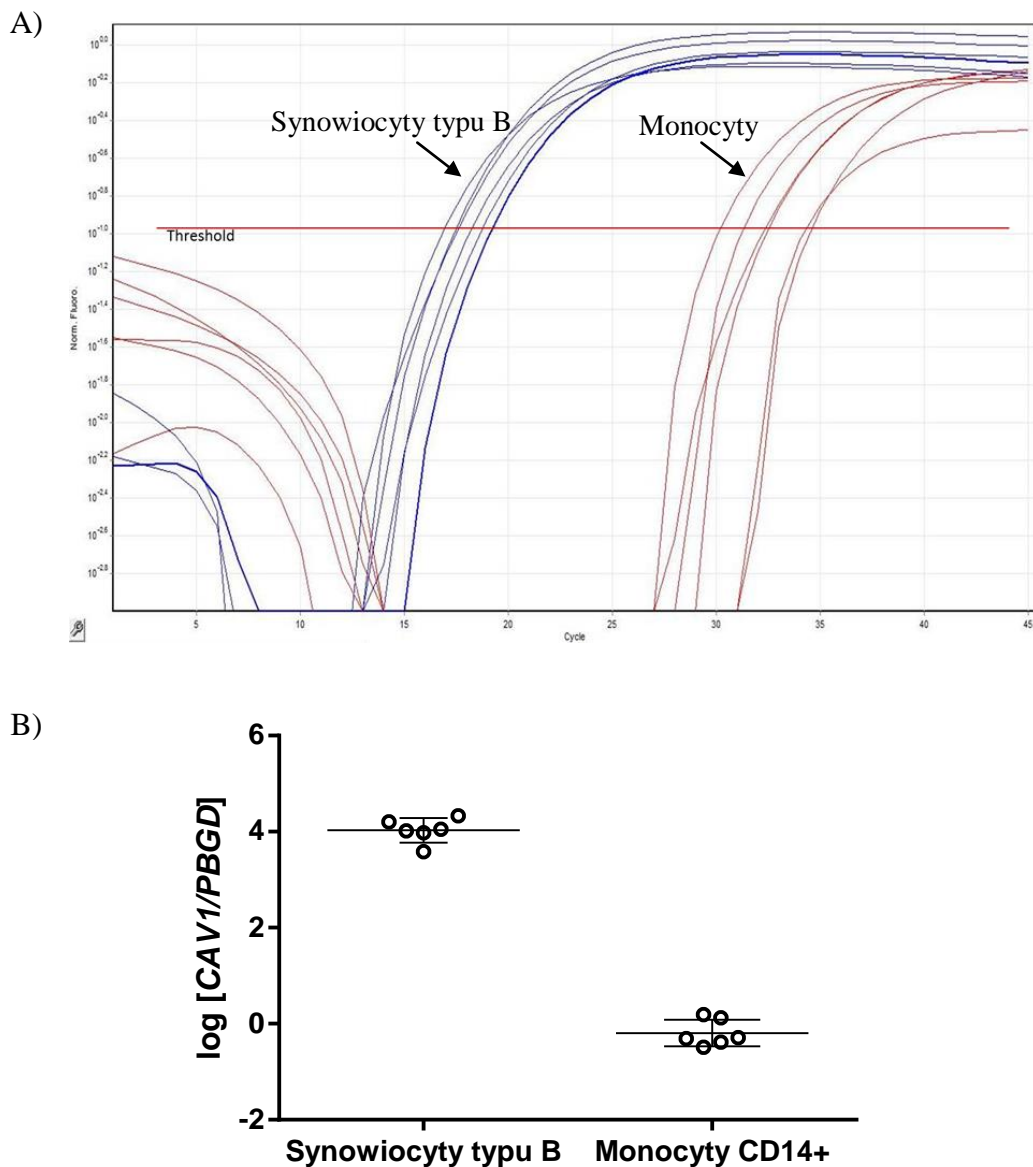
Ryc. 10. Graficzna prezentacja zależności między względnymi poziomami transkryptu badanych genów w monocytach CD14⁺ we wszystkich badanych grupach. Naniesione punkty przedstawiają dane surowe odpowiadające logarytmom dziesiętnym względnych poziomów ekspresji ustalonych za pomocą qPCR.



Ryc. 11. Graficzna prezentacja zależności między względnymi poziomami transkryptu badanych genów w monocytach CD14^+ u chorych na RZS. Naniesione punkty przedstawiają dane surowe odpowiadające logarytmom dziesiętnym względnym poziomów ekspresji ustalonych za pomocą qPCR.

4.2.3. Analiza ekspresji transkryptu *CAVI* w synowiocytach typu B oraz w monocytach

Analizując wyniki uzyskane w reakcji qPCR dostrzeżono znaczną różnicę w ekspresji *CAVI* w monocytach CD14⁺ w porównaniu z poziomem ekspresji obecnym w synowiocytach. Ekspresja *CAVI* w materiale pozyskanym z synowiocytów typu B ($4,027 \pm 0,254$) była znacznie wyższa ($p < 0,001$) niż w monocytach ($-0,194 \pm 0,279$).



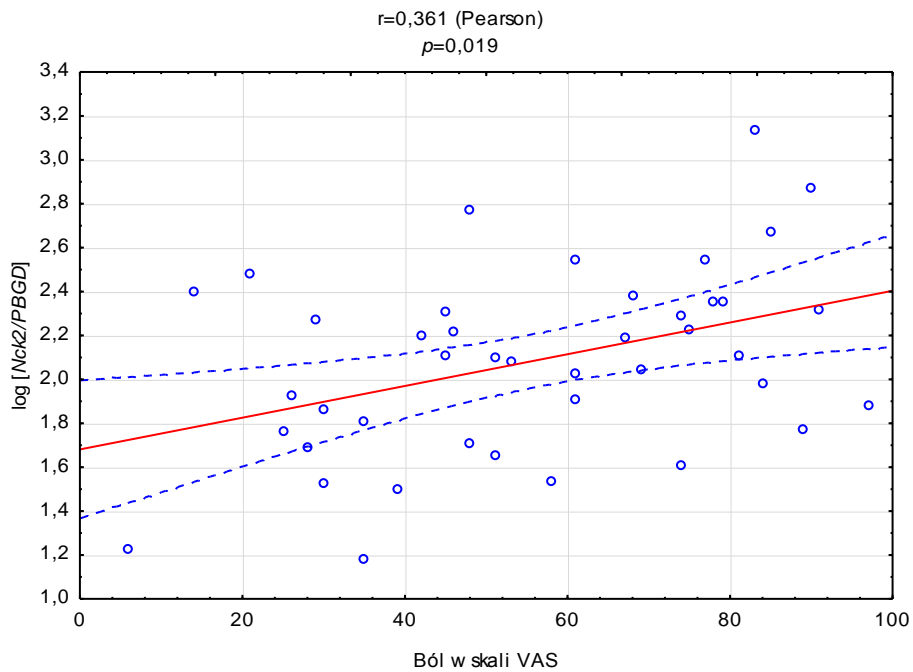
Ryc. 12. Porównanie ekspresji *CAVI* na poziomie transkryptu w monocytach i synowiocytach pozyskanych od osób chorych na RZS. A) Prezentacja przyrostu fluorescencji w trakcie qPCR. B) Znormalizowana względna ekspresja mRNA *CAVI* w obu typach komórek. Wykres przedstawia średnie zlogarytmowane wartości ekspresji \pm SD. Test *t*-Studenta, $n=6$, $p < 0,001$.

4.3. Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu badanych genów a klinicznymi i laboratoryjnymi markerami aktywności RZS

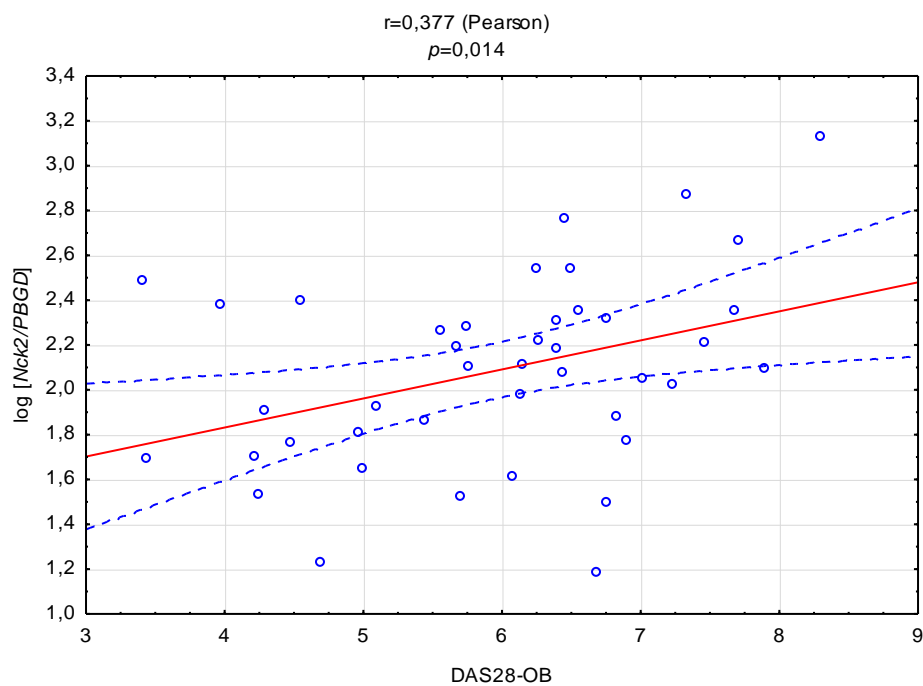
Na podstawie analizy korelacji wykazano szereg zależności dotyczących względnych poziomów transkryptu genów *Src*, *Nck2*, *RhoA* oraz klinicznych i laboratoryjnych wskaźników aktywności RZS. Wybrane zależności przedstawia Tabela 9. i Ryciny 12-15.

Tabela 10. Wyniki analizy korelacji rang Spearmana i korelacji liniowej Pearsona* między względnymi poziomami transkryptu badanych genów oraz klinicznymi i laboratoryjnymi parametrami RZS w grupie chorych

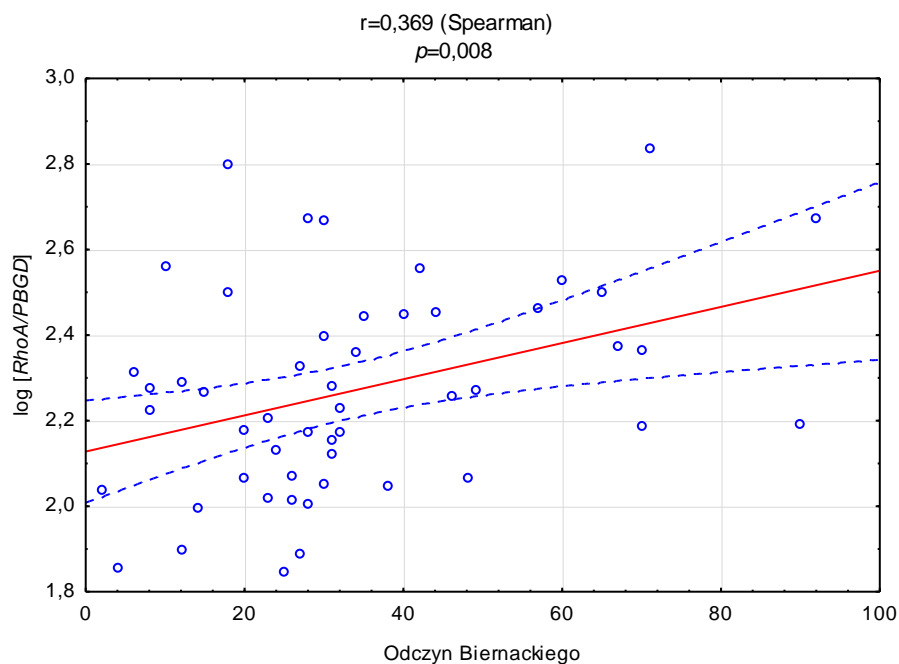
Zmienna 1	Zmienna 2	Współczynnik korelacji	p
<i>Nck2</i>	ból w skali VAS	0,361	0,019
	DAS28-OB	0,377*	0,014
<i>RhoA</i>	OB	0,369	0,008
<i>Src</i>	czas trwania choroby	-0,283	0,045
	liczba obrzękniętych stawów	0,287	0,050
liczba bolesnych stawów	liczba obrzękniętych stawów	0,722	<0,001
	ból w skali VAS	0,433	0,004
	aktywność choroby w skali VAS wg pacjenta	0,318	0,040
	aktywność choroby w skali VAS wg lekarza	0,377	0,014
	DAS28-OB	0,779	<0,001
liczba opuchniętych stawów	ból w skali VAS	0,380	0,013
	aktywność choroby w skali VAS wg lekarza	0,738	<0,001
	DAS28-OB	0,810	<0,001
ból w skali VAS	aktywność choroby w skali VAS wg pacjenta	0,833*	<0,001
	aktywność choroby w skali VAS wg lekarza	0,365	0,017
	DAS28-OB	0,561*	<0,001
aktywność choroby w skali VAS wg pacjenta	aktywność choroby w skali VAS wg lekarza	0,338	0,028
	surowicze stężenie CRP	0,329	0,033
	DAS28-OB	0,508*	<0,001
aktywność choroby w skali VAS wg lekarza	OB	0,417	0,006
	surowicze stężenie CRP	0,475	0,002
	DAS28-OB	0,653	<0,001
DAS28-OB	surowicze stężenie CRP	0,592	<0,001
	OB	0,549	<0,001
OB	surowicze stężenie CRP	0,621	<0,001



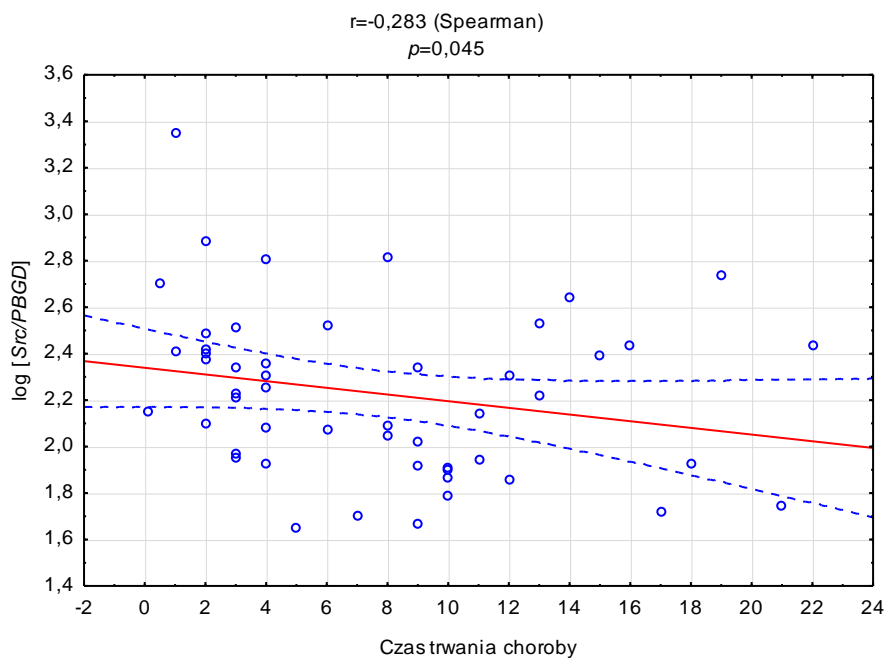
Ryc. 13. Graficzna prezentacja zależności między bólem wyrażonym w VAS a względnymi poziomami transkryptu genu *Nck2* w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS.



Ryc. 14. Graficzna prezentacja zależności między DAS28-OB a względnymi poziomami transkryptu genu *Nck2* w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS.



Ryc. 15. Graficzna prezentacja zależności między wartościami OB a względnymi poziomami transkryptu genu *RhoA* w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS.

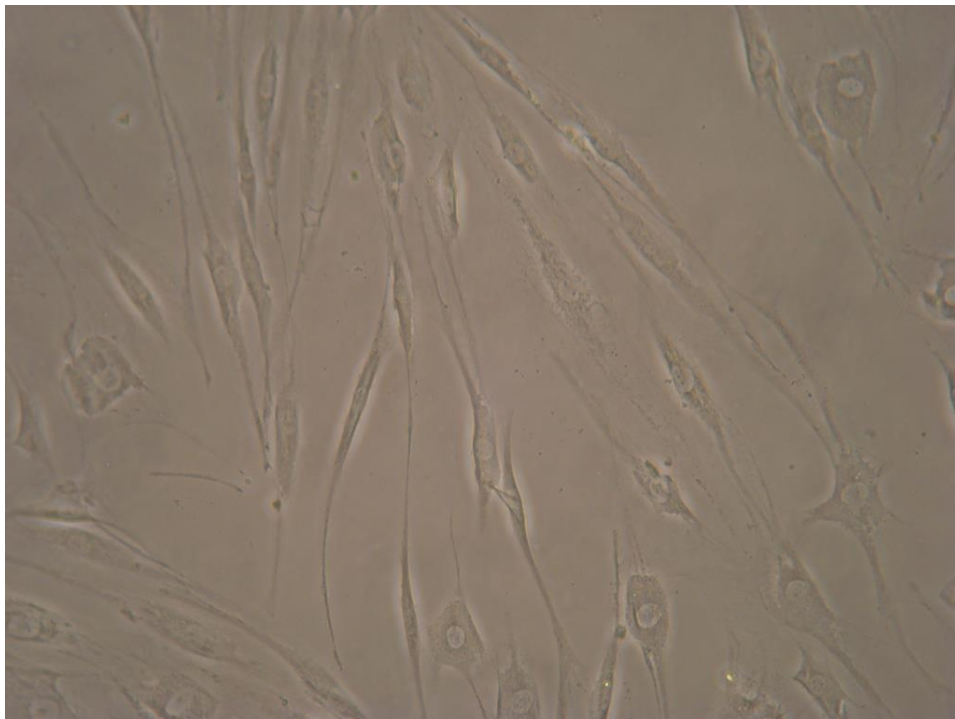


Ryc. 16. Graficzna prezentacja zależności między czasem trwania choroby a względnymi poziomami transkryptu genu *Src* w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS.

4.4. Część doświadczalna

4.4.1. Pierwotne linie synowiocytów typu B

W wyniku hodowli *in vitro* komórek obecnych w płynach stawowych pochodzących od chorych na RZS, po 3. pasażu uzyskano populację synowiocytów typu B. Komórki charakteryzowały się typowym dla fibroblastów wrzecionowatym kształtem oraz rosły w sposób zależny od podłoża. Analiza cytometryczna z wybranym zestawem przeciwciał nie wykazała ekspresji molekuł charakterystycznych dla linii mielomonocytarnej i leukocytów.

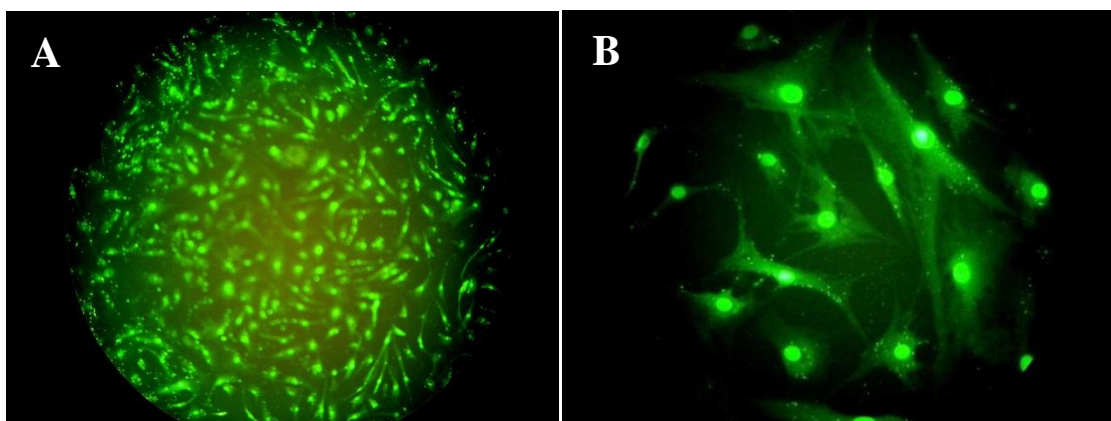


Ryc. 17. Synowioocyty typu B uzyskane z płynu stawowego. Zdjęcie wykonane aparatem Sony Cyber-shot DSC-W55 w mikroskopie odwróconym Nikon ECLIPSE TS100 (okular 10×, obiektyw 20×/0,40).

4.4.2. Wyniki optymalizacji warunków transfekcji

A) W wyniku transfekcji komórek oligomerem BLOCK-iT i oceny w mikroskopie fluorescencyjnym określono wydajność transfekcji.

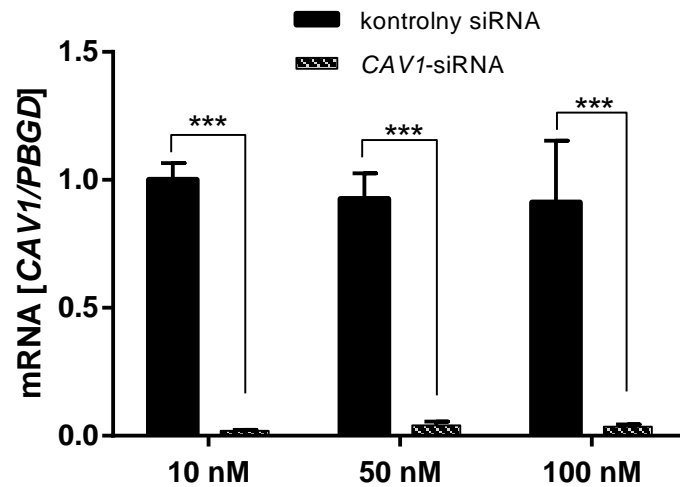
Intensywny sygnał fluorescencyjny emitowany głównie z jąder komórkowych niemal wszystkich komórek (Ryc. 19.) wskazał na wysoką wydajność transfekcji już przy użyciu najniższego stężenia sprzęgniętego z fluoresceiną oligomeru dsRNA (10 nM) oraz stężenia lipofektaminy 0,2% v/v.



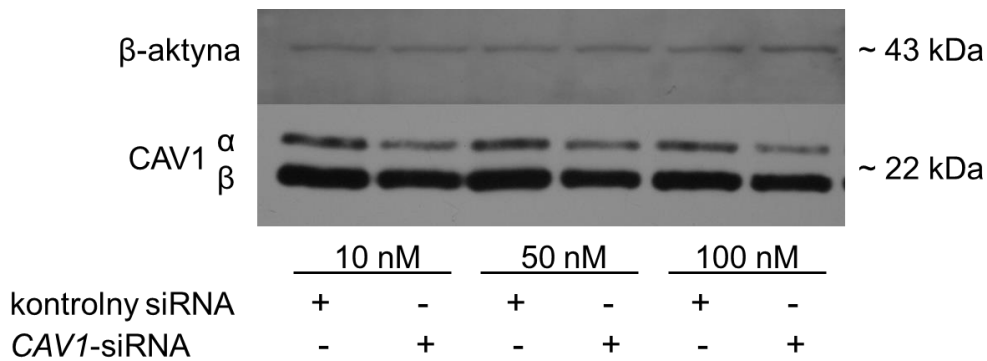
Ryc. 18. **Obraz mikroskopowy synowocytów typu B uzyskany 48 godzin po transfekcji BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo.** Zdjęcia wykonane aparatem NIKON E4500 w mikroskopie fluorescencyjnym Hund Wetzlar H600 w obiektywie 40/0,65 (A) oraz 10/0,25 (B). Intensywny sygnał pochodzący z jąder komórkowych wskazuje na wysoką wydajność transfekcji synowocytów typu B użytym znakowanym fluoresceiną oligomerem dsRNA (10 nM) oraz lipofektaminą (0,2% v/v).

B) Po 48 godzinach transfekowania komórek *CAVI*-siRNA lub kontrolnym siRNA zaobserwowano ponad 90% obniżenie poziomu ekspresji *CAVI* dla użytych stężeń siRNA (10, 50 i 100 nM) w odniesieniu do transfekcji kontrolnym siRNA ($p < 0,001$). Ekspresja *CAVI* w stadium potranslacyjnym jest regulowana głównie poprzez ubikwitynację i degradację w lizosomach, co wpływa na bardzo wolne tempo degradacji *CAVI* [172]. Intensywność prążków uwidoczonych na kliszy rentgenowskiej normalizowano względem β -aktyny. Wskazano na obniżenie średnio o około 32%, 58% i 54% (dla kolejno użytych stężeń siRNA) poziomu białka *CAVI* (zarówno izoformy α i β) w odniesieniu do komórek transfekowanych kontrolnym siRNA. Do dalszych analiz używano siRNA w stężeniu 50 nM.

A)



B)

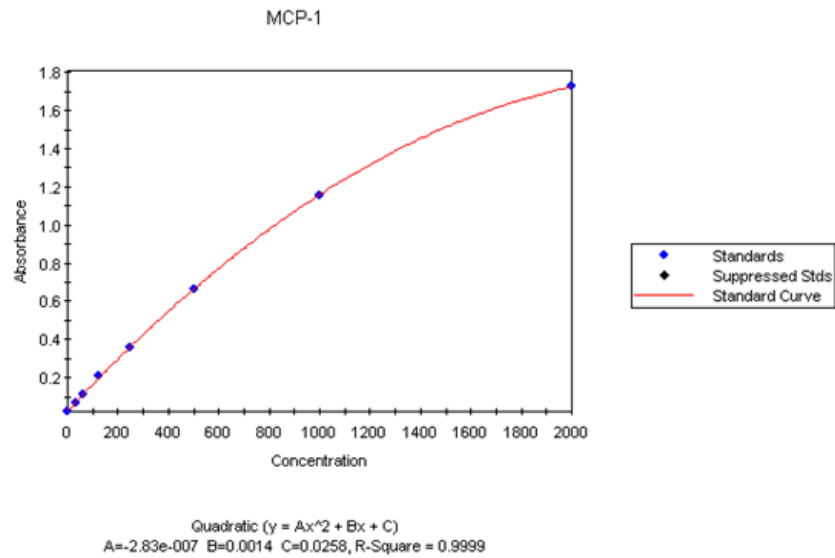


Ryc. 19. **Optymalizacja warunków transfekcji synowocytów.** Synowocyty typu B transfekowano *CAVI*-siRNA o stężeniu końcowym 10 nM, 50 nM i 100 nM. Względny poziom transkryptu *CAVI* określono za pomocą qPCR normalizując wyniki względem genu referencyjnego *PBGD* (A). Metodą Western blot wykryto białko *CAV1* oraz β -aktynę użytą jako białko referencyjne. Do pomiaru densytometrycznego prążków wykorzystano oprogramowanie ImageJ (B). Wykres przedstawia średnie \pm SD. Różnice między średnimi analizowano za pomocą dwuczynnikowej ANOVA i testu *post hoc* Šidák'a, $n=3$, *** $p<0,001$.

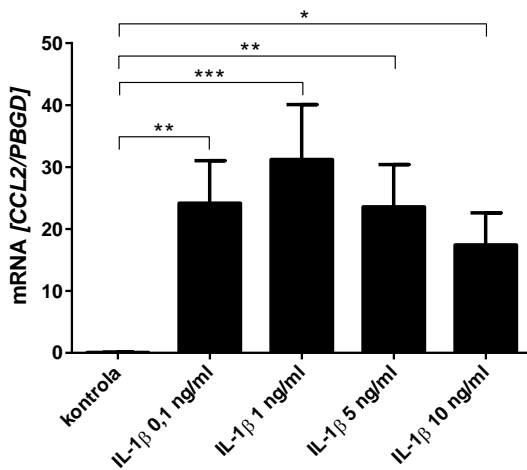
4.4.3. Wyniki optymalizacji dawki IL-1 β pobudzającej ekspresję CCL2

W wyniku analizy poziomu transkryptu *CCL2* oraz oceny stężenia wydzielonej chemokiny *CCL2* w pożywce do eksperymentu wybrano IL-1 β o stężeniu końcowym 1 ng/ml. Pod wpływem tego stężenia zaobserwowano bowiem około 139-krotny wzrost stężenia *CCL2* w pożywce (204,46 ng/ml \pm 5,83) w porównaniu do hodowli kontrolnej ($p<0,001$) oraz około 35-krotny wzrost na poziomie transkryptu (31,23 \pm 8,85) ($p<0,001$). Nie zaobserwowano liniowego wzrostu poziomu *CCL2* w sposób zależny od dawki IL-1 β .

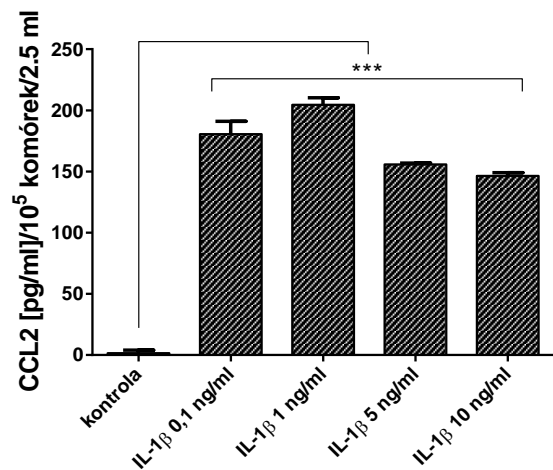
A)



B)



C)



Ryc. 20. **Dobór optymalnej dawki IL-1 β pobudzającej ekspresję CCL2 w synowocytach typu B.** Dzień przed planowanym eksperymentem, na płytkach 6-dółkowych umieszczono po 10^5 komórek zawieszonych w pożywce DMEM bez dodatku surowicy. Następnego dnia komórki poddano 2-godzinnej inkubacji z IL-1 β w dawkach 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml i 10 ng/ml w celu ustalenia optymalnej dawki IL-1 β zdolnej do pobudzenia ekspresji CCL2. Wykresy przedstawiają krzywą standardową zastosowaną w teście ELISA do wyliczenia stężenia CCL2 (A), względny poziom transkryptu genu *CCL2* oznaczony za pomocą qPCR (B) i stężenie CCL2 w pożywce pochodowlanej oznaczone testem ELISA (C). Różnice między średnimi analizowano testem ANOVA i testem *post hoc* Dunnett'a zaznaczając istotność statystyczną w stosunku do kontroli. Wykresy przedstawiają średnie \pm SD, n=3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4.4. Ekspresja *CCL2* w odpowiedzi na zredukowaną ekspresję *CAVI* w synowocytach typu B

W celu sprawdzenia wpływu *CAVI* na ekspresję *CCL2*, synowocyty typu B poddano dwukrotnej transfekcji *CAVI*-siRNA, a następnie inkubowano 2 godziny z IL-1 β w celu wzbudzenia ekspresji *CCL2*. Testem ELISA oznaczono stężenie *CCL2* w pożywce po inkubacji z IL-1 β . Z komórek wyizolowano RNA i białko do oceny ekspresji *CAVI* i *CCL2* technikami qPCR oraz Western blot. Zaobserwowano:

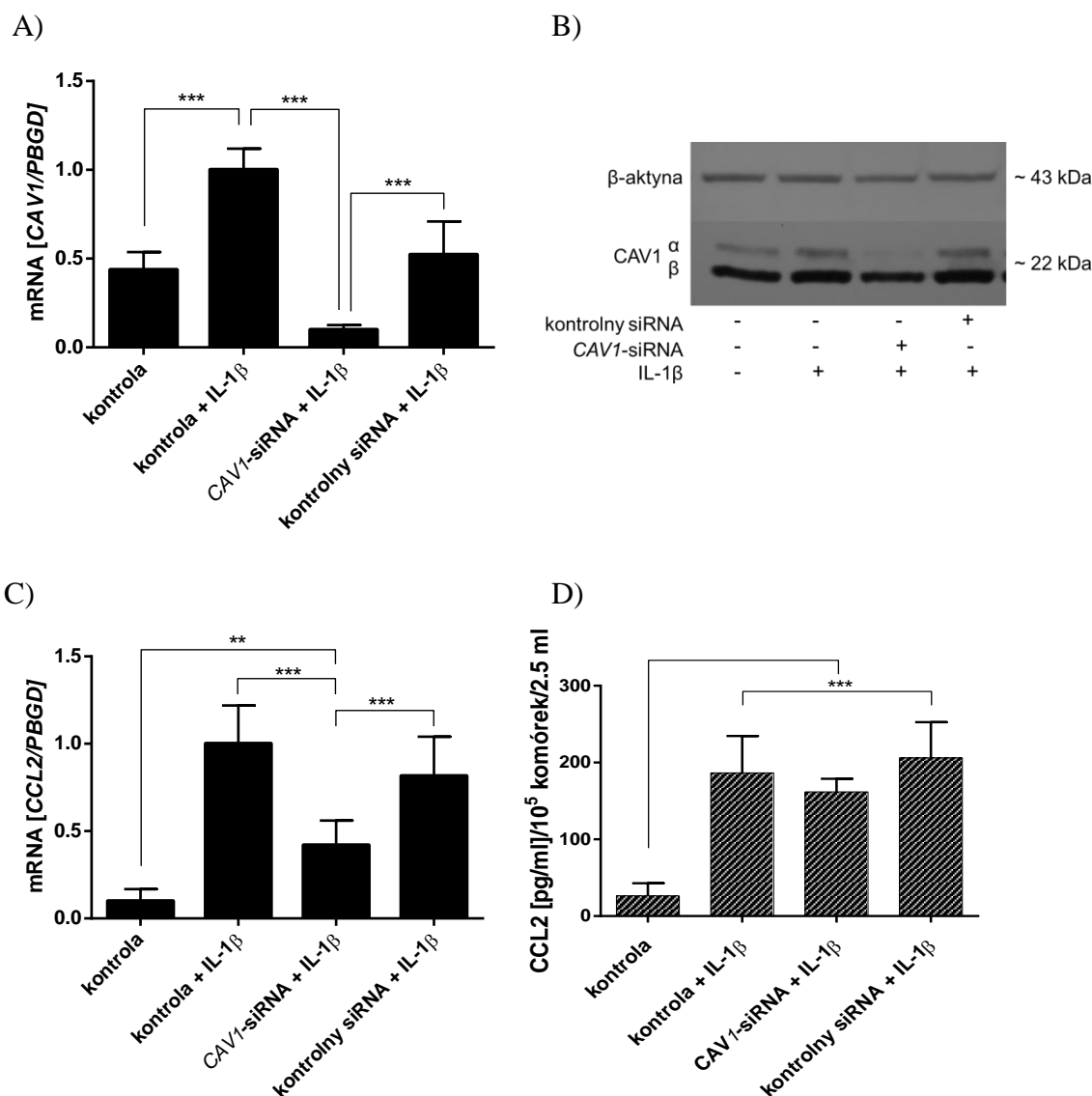
A) obniżony o około 90% poziom transkryptu *CAVI* ($0,10 \pm 0,03$) w komórkach transfekowanych *CAVI*-siRNA w stosunku do komórek nie poddanych transfekcji ($1,00 \pm 0,12$) ($p < 0,001$). W stosunku do komórek transfekowanych kontrolnym siRNA ($0,52 \pm 0,19$) odnotowano około 81% spadek ekspresji *CAVI* ($p < 0,001$). Użyte startery pozwalały na ocenę poziomu obu wariantów mRNA genu *CAVI*.

B) obniżony o około 70% poziom białka w porównaniu do komórek nietransfekowanych lub transfekowanych kontrolnym siRNA. Ponadto, na skutek inkubacji z IL-1 β zaobserwowano, podobnie jak w przypadku transkryptu, około 2-krotny wzrost poziomu *CAV1*, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o indukowanej IL-1 β ekspresji *CAV1* [173, 174]. Efekt ten był widoczny szczególnie na izoformie α .

C) osłabiony średnio o 58,11% wzrost poziomu transkryptu *CCL2* w stosunku do komórek niepoddanych transfekcji ($1,00 \pm 0,22$) ($p < 0,001$) oraz słabszy o około 49% poziom transkryptu *CCL2* ($p < 0,001$) w porównaniu do komórek transfekowanych kontrolnym siRNA ($0,82 \pm 0,23$). W odniesieniu do komórek nieinkubowanych z IL-1 β ($0,10 \pm 0,07$) zaobserwowano średnio około 4,23-krotny wzrost poziomu transkryptu w komórkach transferowanych *CAVI*-siRNA ($0,42 \pm 0,14$) w porównaniu do 10,1- i 8,24-krotnych wzrostów odpowiednio dla komórek nietransfekowanych i transfekowanych kontrolnym siRNA.

D) średnio 7,5-krotny wzrost stężenia *CCL2* w próbie kontrolnej ($26,27 \pm 16,56$ pg/ml) w stosunku do komórek nietransfekowanych ($186,61 \pm 48,05$ pg/ml) ($p < 0,001$) lub transfekowanych kontrolnym siRNA ($206,00 \pm 46,73$ pg/ml) ($p < 0,001$) oraz średnio 6,16-krotny w komórkach transfekowanych *CAVI*-siRNA ($191,96 \pm 16,95$ pg/ml) ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano istotnego statystycznie zmniejszonego stężenia *CCL2* wydzielanego przez komórki ze zmniejszoną ekspresją *CAV1*.

Barwienie błękitem trypanu nie wykazało wpływu przeprowadzonej transfekcji na żywotność synowocytów.



Ryc. 21. Wpływ wyciszenia ekspresji *CAVI* na ekspresję *CCL2* w synowocytach typu B. Dzień przed planowanym eksperymentem, na płytkach 6-dołkowych umieszczono po 10^5 komórek zawieszonych w pożywce DMEM bez dodatku surowicy. Następnego dnia część komórek transfekowano *CAVI*-siRNA lub kontrolnym siRNA. Po 48 godzinach hodowli komórki poddawano ponownej transfekcji. Następnie inkubowano je z IL-1 β w celu pobudzenia ekspresji *CCL2*. Poziom transkryptu *CAVI* w komórkach oceniono za pomocą qPCR (A) oraz Western blot (B). Poziom transkryptu *CCL2* oceniono za pomocą qPCR (C) a testem ELISA oznaczono poziom wydzielonego do pożywki białka (D). Wykresy przedstawiają średnie \pm SD z doświadczeń wykonanych na każdej z trzech linii w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach. Różnice między średnimi analizowano za pomocą testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5. DYSKUSJA

W pierwszej części pracy określono poziomy transkryptów genów *Nck2*, *RhoA*, *Src* i *CAVI* w monocytach CD14⁺. O wyborze tej populacji komórek zdecydował jej istotny udział w patogenezie przewlekłego procesu zapalnego występującego w RZS [102].

Funkcje cytoszkieletu aktynowego są bardzo zróżnicowane. Wiele doniesień ukazuje jedynie jego funkcjonalną rolę, bez wskazywania konkretnych mechanizmów molekularnych, za pomocą których dochodzi w komórce do reakcji na dane bodźce [116]. Szczególnie ważną rolę cytoszkieletu aktynowego podkreśla się w aktywacji monocytów zachodzącej pod wpływem związania chemoatraktantów. Wiśniewski i wsp. wykazali, że w krwi pełnej będącej naturalnym środowiskiem monocytów, pod wpływem chemokiny CCL2 dochodzi do zmiany kształtu tych komórek będącej skutkiem aktywacji procesu polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny oraz reorganizacji cytoszkieletu, które są jednymi z elementów odpowiedzi chemotaktycznej. Jednocześnie stwierdzono, że odpowiedź na inne chemoatraktanty, tj. MIP-1 α i RANTES była niedostrzegalna, co może wynikać z różnic w ekspresji odpowiednich im receptorów będących cechą osobniczą [175].

5.1. Ocena poziomów transkryptu wybranego zestawu genów w komórkach CD14⁺

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano podwyższony poziom transkryptu *Nck2* w monocytach osób chorych na RZS. Różnica ta była istotna statystycznie jedynie w odniesieniu do nielicznej grupy utworzonej z chorych na ChZS. W związku z brakiem istotnych różnic między chorymi na RZS a osobami zdrowymi, nie można wnioskować o podwyższonym poziomie *Nck2* jako o parametrze typowym dla RZS.

Dostępna literatura nie podaje zbyt wielu informacji dotyczących poziomu ekspresji *Nck2* w monocytach. Tym bardziej wyniki badań odnoszące się do materiału pozyskanego od chorych na RZS są na chwilę obecną raczej jednostkowe.

Informacje dostępne w bazie NCBI GEO Profiles [176] wskazują na zwiększenie ekspresji genu *Nck2* w monocytach w odpowiedzi na inkubację z LPS (GEO: GDS1407) [177] oraz na zmniejszenie jego ekspresji w odpowiedzi na terapię anty-TNF- α zastosowaną u chorych na RZS (GEO: GDS2952). W makrofagach pochodzących z płynów stawowych, pobranych od pięciu chorych na RZS, stwierdzono

podwyższony poziom ekspresji *Nck2* w porównaniu do makrofagów pozyskanych z materiału kontrolnego (GEO: GDS3192) [178]. Wydaje się zatem, że wystąpienie różnicy w ekspresji *Nck2* zależy w pewnym względzie od stopnia dojrzałości monocytów.

Chociaż powyższe informacje pochodzą jedynie z mikromacierzy przystosowanych do analizy transkryptomicznej i dotyczą nielicznych prób, można zaobserwować pewną prawidłowość w ekspresji *Nck2*, która odpowiada wzorcom ekspresji genów charakterystycznych dla procesu zapalnego. Podobne wnioski nasuwają się po przestudiowaniu najnowszych wyników badań uzyskanych przez Thamilarasan i wsp., którzy ośmioosobowej grupie chorych na stwardnienie rozsiane podali octan glatirameru będący immunomodulatorem stosowanym w terapii stwardnienia rozsianego. Już po pierwszym dniu odnotowano istotny statystycznie spadek ekspresji transkryptu genu *Nck2* w monocytach ($p=0,017$) [179], co może dodatkowo potwierdzać przypuszczenia o prozapalnych właściwościach białka *Nck2*.

Analiza poziomu transkryptu genu *RhoA* wykazała istotny statystycznie niższy poziom mRNA u chorych na RZS w porównaniu do osób zdrowych. W odniesieniu do grupy chorych na ChZS poziom ten był nieznacznie wyższy.

Na udział białek Rho w procesach charakterystycznych dla rozwoju RZS wskazują doniesienia o istotnej roli RhoA oraz czynników wymiany nukleotydów w kontrolowaniu procesu zapalnego i immunomodulacji, jak również w aktywacji [180] oraz proliferacji synowocytów fibroblastycznych [181]. Ekspresja *RhoA* w monocytach CD14⁺ chorych na RZS nie była do tej pory oznaczana.

Uzyskane wyniki nie wpisują się w ogólnie przyjęty model funkcji genu *RhoA*, w którym oprócz wymaganej aktywnej formy białka, można by również oczekiwać znacząco wyższych poziomów transkryptu w komórkach tak aktywnych w charakterystycznym dla RZS procesie zapalnym jakimi są monocyty. Lecz okazuje się, że poziom białka RhoA może być wyższy pomimo uzyskanych niższych poziomów transkryptu, co potwierdzają wyniki uzyskane przez Pu i wsp. dotyczące ekspresji *RhoA* w przerzutowym raku nerki [182]. Wydaje się, że w przypadku wystąpienia podwyższonego poziomu białka RhoA, zahamowanie ścieżki RhoA/ROCK ulegającej w monocytach aktywacji pod wpływem CCL2 może prowadzić do redukcji napływu monocytów do miejsc zapalnych oraz nieść korzyści w leczeniu chorób autoimmunologicznych i alergii [183, 184]. Ocena poziomu białka RhoA w monocytach

CD14⁺ u chorych na RZS okazuje się być w tym przypadku kluczowa.

Aktywność RhoA stanowi ważny czynnik warunkujący ruch komórek. Należy jednak mieć na uwadze, że w przeciwieństwie do komórek, których wzrost jest uwarunkowany obecnością podłoża, w krążących monocytach nie powstają włókna naprężeniowe kontrolowane przez RhoA [117, 185]. Zatem *RhoA* oraz inne geny mogą odznaczać się odmiennym charakterem ekspresji, zależnym od rodzaju komórek. Nie wyklucza się jednak, że w obu przypadkach zarówno forma aktywna (związana z GTP) jak i nieaktywna RhoA może hamować migrację komórek na drodze zupełnie odmiennych mechanizmów. W przypadku formy nieaktywnej dzieje się to zgodnie z założeniami dotyczącymi kierunku działania białka RhoA. Natomiast zbyt aktywna forma może wzmacniać adhezję i zakłócać polaryzację komórek, co może wpływać negatywnie na ich poruszanie się. Generalnie uważa się, że w przypadku migracji komórek musi być zachowany pewien optymalny poziom RhoA i stopień jego aktywacji, natomiast zmiany w morfologii komórek nie zawsze przekładają się na możliwość przemieszczania się komórki [186, 187]. Opinie badaczy dotyczące funkcji *RhoA* pozostają podzielone. W badaniu Heasman i wsp. komórki T z obniżoną ekspresją RhoA nie tworzyły szerokiego lamellipodium na komórkach śródbłonka i nie wykazywały cech spolaryzowania. Komórki te charakteryzował także wydłużony „ogon” i trudności z oderwaniem się od podłoża. Jednocześnie zasugerowano, że aktywacja RhoA w poszczególnych etapach diapedezy jest regulowana niezależnie przez różne czynniki wymiany nukleotydów w zależności od unikalnego mikrośrodowiska [188]. Z drugiej strony, badania przeprowadzone na komórkach szczurzych wykazały, że inhibicja RhoA skutkuje osłabionym ruchem komórek o słabszym przyleganiu do podłoża, tj. komórki T i makrofagi [189]. W obliczu tych doniesień ciężko jednoznacznie określić funkcję genu *RhoA* w kontrolowaniu ruchów monocytów w RZS.

Okazuje się, że RhoA posiada dwojaką naturę również w regulacji ekspresji cytokin. Białko RhoA jest znane z regulacji ekspresji innych genów poprzez czynniki transkrypcyjne, tj. NF- κ B czy ROCK (ang. *Rho-associated protein kinase*). Nakayama i wsp. przeprowadzili badania, w których wykazano zdolność RhoA do indukcji ekspresji cytokin zapalnych m.in. CCL2 w adipocytach 3T3-L1 [190]. Natomiast w neutrofilach znajdujących się w stanie spoczynku, RhoA hamuje ekspresję TNF- α i zależną od NF- κ B ekspresję chemokin CXC i CC [191].

W pracy wykazano słabą, lecz istotną statystycznie zależność między poziomami transkryptów genów *Nck2* oraz *RhoA* w monocytach CD14⁺ u wszystkich badanych osób. Być może zależność ta wynika z udziału produktów białkowych obu genów w podobnych procesach sterujących dynamiką cytoszkieletu aktynowego. Na poziomie funkcjonalnym, białka adaptorowe Nck oddziałują z różnymi molekułami efektorowymi i, wpływając na aktywność RhoA w szczególności poprzez proteasomalną degradację Nck1, uczestniczą w reorganizacji cytoszkieletu [192].

Analiza ekspresji *Src* na poziomie transkryptu nie wykazała istotnych statystycznie różnic między analizowanymi grupami.

W badaniu, w którym ustalano profil ekspresji genów w błonie maziowej pozyskanej od chorych na RZS, wykazano podwyższony poziom transkryptu *Src* w porównaniu do zdrowej tkanki (GEO: GDS1857) [193]. Przekładając to na aktywność jaką wykazuje białko Src, może to mieć związek ze wzmożoną angiogenezą [194] lub nasilonymi podziałami komórkowymi, które prowadzą do pogrubienia błony maziowej [195]. Brakuje natomiast analogicznych danych dotyczących poziomu ekspresji *Src* w monocytach pozyskanych od chorych na RZS. Wiadomo, że ekspresja kinaz tyrozynowych z rodziny Src może być indukowana czynnikami prozapalnymi a migracja monocytów/makrofagów do ognisk zapalnych wiąże się w dużym stopniu z ich wzmożoną aktywnością [54]. Src wraz z innymi białkami z rodziny Src bierze także udział w odpowiedzi immunologicznej i zwiększeniu produkcji cytokin prozapalnych w RZS [196].

Chociaż wiadomo, że reorganizacja cytoszkieletu jest w sposób bezpośredni zależna od kinaz Src, jednocześnie opisuje się działający w drugą stronę układ, w którym wszelkie zmiany w cytoszkielecie mogą decydować o przekazywaniu sygnałów w komórkach z udziałem Src [197]. Src wpływa w szeroko pojętym znaczeniu na aktywność komórek w odpowiedzi zapalnej poprzez interakcje z wieloma receptorami i ligandami, a poprzez regulację zmian w cytoszkielecie aktynowym dopasowuje zmiany morfologiczne w zależności od otrzymanego sygnału prowadząc do fagocytozy, chemotaksji bądź adhezji makrofagów [134]. Kumar i wsp. wykazali, że aktywna forma Src w prawidłowych monocytach warunkuje ich chemotaksję wywołaną m.in. rozpuszczalną selektyną E [198] lub RANK [199]. Zatem wyższy poziom ekspresji *Src* wraz z towarzyszącą wzmożoną aktywnością tego białka mógłby

w pewnym stopniu wskazywać na aktywację monocytów obecnych w świetle naczyń krwionośnych jeszcze zanim doszłoby do diapedezy.

Wiele chorób zapalnych zależy w dużym stopniu od aktywacji makrofagów a zahamowanie aktywności Src może się okazać korzystne w schorzeniach mających z nimi związek [134]. Choć etiologia RZS wciąż pozostaje nieznana, wyniki ostatnich badań upatrują w osteoklastach potencjalny cel terapeutyczny a zahamowanie napływu ich komórek prekursorowych - monocytów oraz ograniczenie ich aktywności, m.in. poprzez modyfikację ścieżek sygnałowych zależnych od Src, może dodatkowo zapobiec niszczeniu tkanki kostnej, stanowiąc tym samym nowe podejście w terapii przeciwko RZS. Pomimo wyraźnego udziału Src w migracji monocytów, wciąż nie wyjaśniono czy katalityczna aktywacja Src jest również niezbędna do funkcjonowania osteoklastów powstających z monocytów [199, 200].

Wykazano również słabą, lecz istotną statystycznie zależność poziomu transkryptu *Src* od *RhoA* w grupie chorych na RZS. Na poziomie funkcjonalnym białek stwierdzono, że aktywowana przez integryny kinaza Src przyczynia się do hamowania aktywności Rho poprzez fosforylację i aktywację białka przyspieszającego hydrolizę GTP– p190RhoGAP [201]. Analiza ta nie uwzględniała jednak poziomów ekspresji *Src* i *RhoA*, a niejednoznacznie określona rola RhoA w migracji komórek uniemożliwia interpretację tej zależności.

W niniejszej pracy wykazano podwyższony poziom monocytarnej ekspresji genu *CAVI* u chorych na RZS. Uzyskany wynik, choć nieistotny statystycznie, może mieć związek z prozapalnym charakterem tego genu.

Przy oznaczaniu ekspresji *CAVI* w komórkach krwi początkowo podważano celowość takich badań. Podczas gdy jedno z doniesień naukowych mówi o braku ekspresji kaweolin w komórkach krwi osób zdrowych [202], ostatecznie ustalono, że *CAVI* ulega ekspresji tylko w komórkach linii mieloidalnej (m.in. w granulocytach i monocytach) a nie limfoidalnej, z jednoczesnym ustaleniem wyjątków dla komórek układu odpornościowego w zależności od stanu aktywacji i dojrzałości komórki jak to ma miejsce w przypadku białaczki z komórek T [203]. W rzeczywistości okazuje się, że *CAVI* ulega ekspresji w monocytach, ale poziom ten jest znacznie niższy niż w synowocytach pozyskanych od chorych na RZS, co wykazano dodatkowo w niniejszej pracy. Może to mieć związek z nadzwyczaj licznymi kaweolami obserwowanymi głównie w komórkach śródbłonna, mięśni gładkich naczyń

krwionośnych, adipocytach i fibroblastach [203, 204].

Dotychczasowe badania wskazują istotny udział podwyższonego poziomu CAV1 m.in. w procesie różnicowania monocytów do makrofagów [205], co ma duże znaczenie w rozwoju procesu zapalnego w RZS. W przypadku neutrofilów obniżony poziom CAV1 osłabia ich mobilność [206], natomiast całkowity brak CAV1 hamuje napływ leukocytów oraz zmienia profil komórek T na przeciwzapalny w miazdżycy [207]. W komórkach śródbłonna aorty pochodzenia bydłowego (ang. *bovine aortic endothelial cells*, BAEC) sytuacja wygląda zupełnie na odwrót. Obniżenie ekspresji *Cav1* za pomocą siRNA powoduje w nich istotne zmiany w strukturze cytoszkieletu związane ze wzmożonym formowaniem się lamellipodiów, sprzyjając intensywniejszym ruchom migracyjnym tych komórek [208].

Kaweole jako rodzaj tratw lipidowych, koordynują przekazywanie sygnałów. Odbywa się to za pośrednictwem skumulowanych w nich białek adaptorowych oddziałujących na kolejne molekuly sygnałowe [209]. Wydaje się, że białko CAV1 budujące kaweole odgrywa paradoksalną funkcję w przekazywaniu sygnałów. Dzieje się tak ponieważ wiąże ono i hamuje aktywność wielu receptorów bądź enzymów, które aby ulec aktywacji tak czy inaczej muszą się najpierw znaleźć w obrębie kaweoli [155].

Mimo że CAV1 oddziałuje z wieloma białkami koordynującymi reorganizację cytoszkieletu aktynowego, a w szczególności GTPazami z rodziny białek Rho, to jego dokładna rola w kontrolowaniu tego procesu wciąż wymaga dodatkowych wyjaśnień [210]. Prace dotyczące komórek nowotworowych wskazują, że CAV1 utrzymuje RhoA w obrębie kaweoli, a fosforylacja CAV1 na tyrozynie 14 za pośrednictwem kinazy Src sprzyja aktywacji RhoA. Duże znaczenie w regulacji aktywności RhoA nadaje się więc szczególnie izoformie α CAV1 [211].

Obecny stan wiedzy nie określa jednoznacznie charakteru tego genu w rozwoju procesu zapalnego. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, w części doświadczalnej pracy zauważono, że IL-1 β indukuje ekspresję CAV1 w synowocytach typu B zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Podwyższony poziom mRNA *CAV1* odnotowali również Takizawa i wsp. w fibroblastach dziąsłowych inkubowanych z IL-1 β , którzy w wycinkach pobranych od osób z zapalną chorobą przyzębia zaobserwowali obecność jednojądrowych komórek układu odpornościowego, co przemawia za udziałem CAV1 w rozwoju procesu zapalnego [212].

O jego właściwościach prozapalnych może świadczyć również fakt, że stosowanie niektórych inhibitorów cyklooksygenazy 2 aktywowanej czynnikami

indukującymi stan zapalny wpływa na zmniejszenie ekspresji CAV1 [213].

Catalán i wsp. wykazali silną korelację ekspresji CAV1 ze stężeniem CRP u osób z BMI wskazującym na nadwagę. Odnotowali również silną korelację ekspresji CAV1 z poziomem CCL2 w tkance tłuszczowej podskórnej i trzewnej. Okazuje się, że przy otyłości i insulinooporności dochodzi do przewlekłej aktywacji układu odpornościowego, która, podobnie jak w RZS, objawia się zaburzeniami produkcji cytokin, wzmożoną syntezą białek ostrej fazy i aktywacją prozapalnych ścieżek przekazywania sygnału [214].

W badaniu przeprowadzonym na makrofagach pęcherzykowych z obniżoną ekspresją genu *CFTR*, którego nieprawidłowy produkt wywołuje mukowiscydozę, wykazano dwukrotnie wyższy poziom CAV1 kształtujący prozapalny fenotyp tych komórek [215]. Z drugiej strony istnieją doniesienia o obniżonym poziomie CAV1 w komórkach o tych samych cechach, który może podtrzymywać stan zapalny z powodu zaburzeń w lokalizacji oksygenazy hemowej 1 [216].

Sytuacja przedstawia się podobnie w pęcherzykowych i otrzewnowych makrofagach mysich, w których obniżona ekspresja *Cav1* wzmagą indukowaną LPS produkcję cytokin prozapalnych, tj. TNF- α i IL-6 [217, 218].

W opozycji do przedstawionego prozapalnego charakteru *CAVI* pozostają również wyniki badań dotyczących łuszczycy, będącej, podobnie jak RZS, przewlekłą chorobą zapalną wynikającą z nieprawidłowości w pracy układu immunologicznego. U chorych na łuszczycę wykazano bowiem znacznie niższą ekspresję CAV1 w komórkach skóry pobranych z miejsc ze zmianami łuszczycowymi w porównaniu do wycinków pobranych ze zdrowych fragmentów skóry. Dodatkowo zaobserwowano odwrotną korelację między ekspresją CAV1 a nadmierną proliferacją keratynocytów oraz angiogenezą. Uznaje się, że w łuszczycy regulacja pracy komórek układu immunologicznego odbiega od powszechnego schematu, a obniżony poziom ekspresji CAV1 tłumaczy się tu wpływem niektórych interleukin, TNF- α i interferonu [219].

Podobny wynik uzyskano również w monocytach i neutrofilach izolowanych z krwi chorych na twardzinę układową [220]. U pacjentów obserwowano znaczne obniżenie poziomu ekspresji CAV1 również w zajętych przez chorobę płucach i w skórze [221].

Funkcje komórek warunkowane aktywnością cytoszkieletu aktynowego są w ostatnich latach często badanymi procesem. Trzeba jednak mieć na uwadze fakt, że

przylegające fibroblasty i krążące leukocyty wykazują odmienną strukturę w stanie spoczynku, co uniemożliwia ujednoczenie wyników badań dla obu rodzajów komórek [222]. Analiza ekspresji wybranych genów wyrażona poziomem transkryptu nie wskazuje ich związku z RZS. Rozpatrując uzyskane wyniki w kontekście aktywacji komórek zapalnych, tj. monocytów CD14⁺ można przypuszczać, że reorganizacja cytoszkieletu aktynowego, skutkująca m.in. migracją komórek i podtrzymywaniem przewlekłego stanu zapalnego jest uwarunkowana bądź innymi genami, bądź formą aktywną produktów badanych genów, które stanowią elementy szlaku przekazywania sygnału w komórkach.

5.2. Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu *Nck2*, *RhoA* i *Src* a klinicznymi i laboratoryjnymi markerami aktywności RZS

W wyniku analizy korelacji wykazano słabe, lecz istotne statystycznie zależności między poziomami transkryptu genu *Nck2* a natężeniem bólu wyrażonym w VAS i wskaźnikiem aktywności RZS DAS28-OB. Można tu mówić jedynie o pewnym trendzie w kierunku wzrastającego poziomu transkryptu genu *Nck2* towarzyszącego nasileniu wymienionych parametrów aktywności choroby, prawdopodobnie związanego z prozapalnym charakterem tego genu opisanym w rozdziale 5.1. Wymaga to jednak walidacji na znacznie większej i bardziej zróżnicowanej pod względem aktywności choroby grupie chorych na RZS.

W niniejszej pracy wykazano także słabą, lecz wysoce istotną statystycznie zależność między poziomem transkryptu genu *RhoA* a OB. Znaczenie tej zależności nie jest jasne. O ile OB jest niezwykle wartościowym parametrem służącym do oceny procesu zapalnego, o tyle trudna okazuje się interpretacja takiej korelacji, zważywszy na obniżony poziom transkryptu *RhoA* w badanej grupie chorych na RZS oraz brak istotnej korelacji ekspresji *RhoA* z DAS28-OB. Dostępna literatura podaje występowanie korelacji ekspresji *RhoA* w makrofagach i komórkach T ze stopniem aktywności choroby w eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu nerwów u szczurów [189]. Inny przykład, dotyczący raka piersi, wskazuje korelację między poziomem ekspresji *RhoA* w krążących limfocytach a ekspresją oznaczoną w biopatach. W związku z tym, że poziom limfocytarnego *RhoA* odzwierciedlał w dużym stopniu zmiany typowe dla miejsc zmienionych nowotworowo, autorzy tej publikacji zasugerowali nawet możliwość wykorzystania limfocytów jako substytutu biopatów [223].

W wykonanej analizie korelacji znaleziono słabą negatywną zależność między poziomem transkryptu *Src* a czasem trwania choroby. 86,28% włączonych do badania chorych na RZS otrzymywało metotreksat, który hamuje zapalenie i redukuje poziom obecnych w surowicy cytokin zapalnych [224-226]. Z drugiej strony, mając na uwadze fakt, że zdecydowana większość pacjentów wykazywała dużą aktywność choroby (71,43% chorych z DAS28-OB>5,1), przyczyna powstałej zależności może również tkwić w uruchamianych dodatkowo mechanizmach prozapalnych, wykorzystujących w większym stopniu inne kinazy tyrozynowe z rodziny *Src*. Właściwe byłoby zatem przeprowadzenie podobnego badania, skoncentrowanego na chorych na RZS, u których rozpoznanie byłoby na tyle świeże, że pozwalałoby na ocenę ekspresji *Src* przed podjęciem jakiegokolwiek terapii przeciwzapalnej.

W związku z brakiem podobnych wyników w literaturze, trudno ocenić praktyczne znaczenie zaobserwowanych zależności.

5.3. Analiza wpływu CAV1 na indukowaną IL-1 β ekspresję CCL2 w synowiocytach typu B pochodzących z płynu stawowego

Przeprowadzone doświadczenie miało na celu określenie czy CAV1 jako molekula biorąca udział w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych wpływa na indukowaną IL-1 β ekspresję chemokiny CCL2 w synowiocytach typu B pochodzących z płynu stawowego. W wyniku zmniejszenia ekspresji CAV1 za pomocą siRNA zaobserwowano, że w warunkach eksperymentu, istotnie statystycznie ograniczenie wzrostu poziomu transkryptu genu *CCL2* nie przekładało się na poziom CCL2 wydzielonego przez synowioocyty typu B.

Dotychczas nie opublikowano podobnych prac mówiących o zależności ekspresji chemoatraktantów od CAV1 w materiale pozyskanym od chorych na RZS.

Powszechnie uważa się, że białko CAV1 wpływa hamująco na cząsteczki sygnałowe ze względu na możliwość hamowania aktywności kinaz [227]. Podobnie zakładali Li i wsp. w badaniu dotyczącym zapalenia siatkówki. Wykazano jednak, że u myszy z wyciszoną ekspresją CAV1, poziom chemoatraktantów będących efektorami szlaku transdukcyjnego TLR4, tj. CCL2, CXCL1, IL-6 i IL-1 β był znacznie niższy niż w materiale kontrolnym. Tym samym stwierdzono, że ekspresja CAV1 może nasilać procesy zapalne [228] przyczyniając się do wzmożonego napływu leukocytów. Podczas gdy TLR1-6 są wykrywane w synowiocytach typu B, szczególnie TLR 2-4 są przeważającymi funkcjonalnymi TLR w tych komórkach, a staw objęty stanem

zapalnym oraz jego otoczenie są źródłem wielu potencjalnych ligandów TLR [229], które wraz z CAV1 mogą odpowiadać za ekspresję molekuł prozapalnych.

Majkova i wsp. wykazali, że obniżenie poziomu CAV1 niemal całkowicie zapobiega indukcji ekspresji CCL2 pod wpływem 3,3',4,4'-tetrachlorobifenylu (PCB77) w komórkach śródbłonna. Wyniki te potwierdzono w warunkach *in vivo* w badaniu przeprowadzonym na myszach *LDL^{-/-}/Cav1^{-/-}*, którym podano PCB77. Podobny wzór ekspresji zaobserwowano także dla IL-6 zarówno na poziomie mRNA jak i białka obecnego w osoczu, co sugeruje, że CAV1 może być wspólnym regulatorem odpowiedzi zapalnej indukowanej przez toksyczne właściwości PCB77, mogącego zwiększać ryzyko rozwoju miażdżycy. Wykazano również, że ekspresja CCL2 pobudzana PCB77 zachodziła w sposób zależny od kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) p38 oraz JNK (ang. *c-Jun amino-terminal kinase*). Powyższe wyniki sugerują, że funkcjonalne kaweole są niezbędne do pobudzenia ekspresji CCL2 [230].

Zupełnie odwrotną do prezentowanych powyżej zależności odnotowali Gardner i wsp. W badaniu nad hepatotoksycznością paracetamolu wykazano podwyższoną ekspresję CCL2 w wątrobie pozyskanej od myszy *Cav-1^{-/-}*, co powiązano z napływem monocytów i indukcją procesów naprawczych sterowanych makrofagami M2 o fenotypie przeciwzapalnym [231].

W mysich komórkach pęcherzykowych płuc typu 1 wykazano, że wywołany nadekspresją CAV1 znaczny wzrost poziomu p38MAPK jak i jej fosforylacji, a także wzrost poziomu NF-κB indukuje ekspresję cytokin zapalnych. Tym samym dowiedziono, że CAV1 jest ważnym aktywatorem procesu zapalnego [151]. Na podstawie badań molekularnych dotyczących obszaru promotorowego *CCL2* zidentyfikowano pewne elementy regulatorowe *cis* oraz czynniki *trans* zaangażowane w regulację ekspresji tego genu. Udowodniono, że dwa miejsca wiążące NF-κB zlokalizowane około 2,6 kpz od miejsca inicjacji transkrypcji odgrywają istotną rolę w indukcji transkrypcji *CCL2* w odpowiedzi na IL-1β i TNF-α [98]. To wyjaśniałoby po części zaobserwowane w pracy zahamowanie transkrypcji *CCL2* w komórkach ze zmniejszoną ekspresją CAV1.

Powyższe doniesienia dotyczą jedynie modeli zwierzęcych. Analizując je można stwierdzić, że ekspresja genu *CCL2* jest istotnie uwarunkowana ekspresją *CAV1*, ale otrzymane w niniejszej pracy wyniki nasuwają przypuszczenia, że ostateczny poziom *CCL2* wydzielonego przez wykorzystane w pracy komórki ustalany jest na poziomie

procesów potranslacyjnych. W dalszych badaniach należałoby przeprowadzić podobne doświadczenie na synowiocytach typu B z trwale wyciszoną ekspresją *CAVI* by sprawdzić, czy podobnie jak we wcześniejszych doniesieniach jedynie całkowity brak ekspresji tego genu gwarantuje zahamowanie ekspresji *CCL2* pod wpływem induktorów. Warto byłoby również sprawdzić czy dysproporcje w poziomie transkrypcji i wydzielonego białka *CCL2* nie wynikają przypadkiem z obecności w synowiocytach pewnych niepoznanych dotąd regulatorów sterowanych aktywnością poszczególnych izoform *CAVI*. Choć już dawno sugerowano istnienie co najmniej dwóch odrębnych populacji kaweoli w obrębie jednej komórki warunkowanych obecnością obu izoform *CAVI*, to publikowane prace nie rozgraniczają ich funkcji [232]. Uważa się, że forma *CAVI α* jest bardziej wydajna w tworzeniu kaweoli a jej fosforylacja na tyrozynie 14 ułatwia wiązanie zarówno induktorów jak i białek efektorowych w szlaku sygnalizacyjnym [148]. Z kolei *CAVI β* wydaje się być formą dominującą i bardziej stabilną w synowiocytach typu B, a w warunkach *in vivo* jako jedyna ulega fosforylacji na serynie i może być wydzielana poza komórkę. Proporcje między obiema izoformami mogą być regulowane na poziomie transkrypcji, a rozróżnienie ich funkcji wydaje się ważnym zagadnieniem w procesie regulacji wielu procesów komórkowych [233].

Odkrycie zjawiska interferencji RNA stało się nie tylko skutecznym narzędziem w poznawaniu mechanizmów biologicznych, ale dało również początek badaniom nad lekami nowej generacji wykorzystującym cząsteczki siRNA do wyciszania genów o wzmożonej ekspresji, których produkty nie są wydzielane poza komórkę a odgrywają kluczową rolę w patogenezie chorób. W RZS stanowi to nowe podejście w terapii, które zakłada długotrwałe działanie leku w dokładnie określonych stawach [65].

Zrozumienie mechanizmów regulujących funkcje genów biorących udział w patogenezie RZS może stanowić alternatywę dla leków biologicznych celujących w indywidualne cytokiny. Jednak obok przywrócenia równowagi w ekspresji cytokin pro- i przeciwzapalnych w organizmie, w proponowanych nowych strategiach leczenia wykorzystujących terapię genową uwzględnia się również precyzyjne celowanie w określone geny lub geny będące kluczowymi regulatorami wielu mechanizmów w komórkach istotnych w patogenezie RZS. Ostatecznie ma to na celu doprowadzenie m.in. do „genetycznej synowektomii”, zakłócenia przekazywania sygnału na ścieżkach sygnałowych istotnych z terapeutycznego punktu widzenia, hamowania angiogenezy i procesów związanych z degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej [65].

6. WNIOSKI

1. Na poziomie transkryptu nie dostrzega się związku *RhoA* z trendem wyznaczonym przez aktywną postać produktu białkowego regulującą dynamikę cytoszkieletu aktynowego.
2. Nie wyklucza się, że ekspresja badanych genów może być uwydatniona dopiero przy opuszczaniu przez monocyty światła naczynia krwionośnego.
3. Ze względu na ograniczoną liczbę publikacji dotyczących *Nck2*, przeanalizowanie ekspresji tego genu w innych chorobach zapalnych może znacznie przybliżyć profil ekspresji tego genu.
4. Przypuszcza się, że słabe zależności między względnymi poziomami mRNA genów *Nck2*, *RhoA* i *Src* a niektórymi parametrami aktywności RZS mogą mieć związek z prozapalnym charakterem produktów białkowych tych genów.
5. Ograniczenie ekspresji genu *CAVI* w synowocytach typu B pochodzących z płynu stawowego wpływa na poziom transkryptu *CCL2*, ale nie decyduje o poziomie wydzielonego produktu białkowego.

7. STRESZCZENIE

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) dotyczy ok. 1% populacji i jest zaliczane do najczęściej występujących schorzeń autoimmunologicznych. Pod wpływem białek chemotaktycznych (m.in. CCL2), wydzielanych przez komórki błony maziowej, dochodzi do warunkowanej reorganizacją cytoszkieletu aktywnego aktywacji monocytów. Skutkuje to m.in. produkcją cytokin prozapalnych i ich napływem do stawów, napędzającym przewlekły stan zapalny błony maziowej. Następstwem tych procesów jest często stopniowa i nieodwracalna destrukcja stawów.

Cele pracy obejmowały: (1) określenie względnego poziomu transkryptu genów *Nck2*, *RhoA*, *Src* i *CAVI* w monocytach CD14⁺ u chorych na RZS (n=51) i porównanie z wynikami uzyskanymi dla grupy kontrolnej (GK, n=49) i grupy porównawczej, utworzonej z chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS) (n=11); (2) przeprowadzenie analizy korelacji poziomów transkryptu badanych genów z laboratoryjnymi i klinicznymi parametrami aktywności RZS; (3) określenie wpływu *CAVI* na indukowaną IL-1 β ekspresję genu *CCL2* w synowiocytach typu B pochodzących z płynów stawowych pobranych od chorych na RZS.

Względną ekspresję wybranych genów oceniono za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). U chorych na RZS zaobserwowano znacznie wyższy poziom transkryptu genu *Nck2* ($p < 0,001$ vs. ChZS) oraz niższy *RhoA* ($p = 0,001$ vs. GK). Poziomy *Src* oraz *CAVI* były wyższe u chorych na RZS, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Ponadto znaleziono istotne statystycznie zależności między poziomem transkryptu *Nck2* a DAS28-OB ($r = 0,377$, $p = 0,014$) i bólem wyrażonym w VAS ($r = 0,361$, $p = 0,019$), ekspresją *RhoA* a OB ($r = 0,369$, $p = 0,008$), jak również między poziomem *Src* a czasem trwania choroby ($r = -0,283$, $p = 0,045$).

W wyniku hodowli *in vitro* komórek obecnych w płynach stawowych uzyskano populację synowocytów typu B. Ekspresję *CAVI* zmniejszono przy użyciu siRNA. Poziom ekspresji genów *CAVI* i *CCL2* oceniano na poziomie transkryptu reakcją qPCR, poziom *CCL2* mierzono testem ELISA a *CAVI* metodą Western blot. Zmniejszenie ekspresji *CAVI* osłabiło transkrypcję genu *CCL2* indukowaną IL-1 β około 2-krotnie ($p < 0,001$) w porównaniu do komórek nie poddanych transfekcji lub transfekowanych kontrolnym siRNA. Poziom białka *CCL2* wydzielanego przez stymulowane komórki nie różnił się istotnie.

Pomimo znalezionych zależności między poziomami mRNA badanych genów a niektórymi parametrami aktywności RZS, nie stwierdzono wspólnego wzoru ekspresji na poziomie transkryptu, charakterystycznego dla procesu zapalnego. Może to mieć związek z prozapalną aktywnością jedynie produktów białkowych tych genów. Stwierdzono, że ograniczenie ekspresji *CAVI* w synowiocytach typu B pochodzących z płynu stawowego wpływa na poziom transkryptu *CCL2*, ale nie decyduje o poziomie wydzielonego produktu białkowego.

Pojęcia kluczowe: reumatoidalne zapalenie stawów, monocyty, synowioocyty typu B, stan zapalny, reorganizacja cytoszkieletu aktynowego

8. SUMMARY

Analysis of expression of selected genes involved in the actin cytoskeleton reorganization in cells contributing to inflammation from patients with rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) affects about 1% of the population and is one of the most common autoimmune diseases. Chemoattractants secreted by synovial cells (e.g. CCL2) can activate monocytes by actin cytoskeleton reorganization. This may result in an increased monocytes influx into the joint cavity and production of proinflammatory cytokines perpetuating synovitis. The consequence of these processes is progressive and irreversible joint damage.

The aims of this study were: (1) to compare relative transcriptional levels of *Nck2*, *RhoA*, *Src* and *CAVI* mRNA in CD14⁺ monocytes obtained from RA patients (n=51), the control group consisted of healthy subjects (HS, n=49) and patients with osteoarthritis (OA, n=11), (2) to look for correlations between the expression of the genes being investigated and laboratory and clinical features of RA activity and (3) to determine the effect of CAV1 on IL-1 β -induced expression of CCL2 in RA fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS) present in synovial fluids.

The expression levels of each gene studied were determined by quantitative real-time PCR (qPCR). *Nck2* mRNA expression was significantly higher in RA patient when compared to OA patients ($p<0,001$), *RhoA* mRNA expression was significantly lower than in HS ($p=0,001$). mRNA levels of *Src* and *CAVI* were elevated in RA patients but the difference was not statistically significant.

Statistically significant correlations were found between *Nck2* mRNA levels and DAS28-ESR ($r=0,377$, $p=0,014$) and VAS pain ($r=0,361$, $p=0,019$), *RhoA* mRNA levels and ESR ($r=0,369$, $p=0,008$) and *Src* mRNA levels and the disease duration ($r=-0,283$, $p=0,045$).

Primary cell cultures of RA-FLS were established from RA synovial fluids aspirated from inflammatory knee joint effusions. *CAVI* expression was knocked down by specific siRNA. Transcript levels of *CAVI* and *CCL2* were assessed by qPCR, CCL2 concentration was measured by ELISA and *CAVI* knockdown was assessed by Western blot. Knockdown of *CAVI* expression resulted in ~2-fold decrease of IL-1 β -induced CCL2 vs. non-transfected or non-targeting siRNA ($p<0,001$). Amount of secreted CCL2

secreted by stimulated cells did not differ significantly.

Correlations found between mRNA levels of genes studied and laboratory and clinical parameters of RA activity may be related to proinflammatory activity of protein products of these genes. Despite this, there are no common expression pattern at the level of transcription. Function of *CAVI* in RA-FLS has not been unequivocally determined because only transcription of *CCL2* was *CAV1*-dependent.

Key words: rheumatoid arthritis, monocytes, RA-FLS, inflammation, actin cytoskeleton reorganization

9. BIBLIOGRAFIA

1. **Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S.** Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*. 2002, 79(4):464-470.
2. **Sundberg JP, Schofield PN.** Commentary: mouse genetic nomenclature. Standardization of strain, gene, and protein symbols. *Vet Pathol*. 2010, 47(6):1100-1104.
3. **Ptak W, Ptak M, Szczepanik M.** *Podstawy immunologii*. Warszawa, 2008; Wyd. PZWL, ISBN: 978-83-200-3526-1.
4. **Silman AJ, Pearson JE.** Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002, 4 Suppl 3:S265-272.
5. **Fauci A, Langford CA.** *Harrison. Reumatologia*. II. Lublin, 2012; Wyd. Czelej, ISBN: 978-83-7563-101-2.
6. **Huber LC, Distler O, Turner I, Gay RE, Gay S, Pap T.** Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006, 45(6):669-675.
7. **Filer A.** The fibroblast as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol*. 2013, 13(3):413-419.
8. **Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Font J.** The overlap of Sjögren's syndrome with other systemic autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 2007, 36(4):246-255.
9. **Gabriel SE, Michaud K.** Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009, 11(3):229.
10. **van der Heijde D.** How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 1999, 26(3):743-745.
11. **Larsen A, Dale K, Eek M.** Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn*. 1977, 18(4):481-491.
12. **Steinbrocker O, Treger H, Cornelius H.** Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA*. 1949, 140: 659-662.
13. **Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO.** 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010, 69(9):1580-8. Erratum: *Ann Rheum Dis*. 2010, 69(10):1892.
14. **Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS.** The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988, 31(3):315-324.
15. **Abeles AM, Marjanovic N, Park J, Attur M, Chan ES, Al-Mussawir HE, Dave M, Fisher MC, Stuchin SA, Abramson SB, Pillinger MH.** Protein isoprenylation regulates secretion of matrix metalloproteinase 1 from rheumatoid synovial fibroblasts: effects of statins and farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors. *Arthritis*

Rheum. 2007, 56(9):2840-2853; Errata: *Arthritis Rheum.* 2007, 56(10):3510. Al-Mussawir, Hayfez.

16. **van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ.** Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013, 9(3):164-172.

17. **Mertens M, Singh JA.** Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol.* 2009, 36(6):1118-1125.

18. **Navarro G, Taroumian S, Barroso N, Duan L, Furst D.** Tocilizumab in rheumatoid arthritis: A meta-analysis of efficacy and selected clinical conundrums. *Semin Arthritis Rheum.* 2013, doi: 10.1016/j.semarthrit.2013.08.001.

19. **Covelli M, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Macchioni P.** Safety of rituximab in rheumatoid arthritis. *Reumatismo.* 2010, 62(2):101-106.

20. **Vicente Rabaneda EF, Herrero-Beaumont G, Castañeda S.** Update on the use of abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013, 9(7):599-621.

21. **Courties G, Presumey J, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F.** RNA interference-based gene therapy for successful treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2009, 9(5):535-538.

22. **Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y.** Gene therapy for arthritis. *Gene Ther.* 2003, 10(10):902-911.

23. **Bingham CO.** The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl.* 2002, 65:3-9.

24. **Pieczyk M, Anderson P.** Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001, 15(5):789-803.

25. **Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester GR.** Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9(6):224.

26. **Abdel Meguid MH, Hamad YH, Swilam RS, Barakat MS.** Relation of interleukin-6 in rheumatoid arthritis patients to systemic bone loss and structural bone damage. *Rheumatol Int.* 2013, 33(3):697-703.

27. **Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR.** *Kelley's Textbook of Rheumatology.* Philadelphia, 2013; Wyd: Elsevier, ISBN: 978-1-4377-1738-9.

28. **Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F.** The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther.* 2010, 12(5):218.

29. **Johansson M, Arlestig L, Hallmans G, Rantapää-Dahlqvist S.** PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Res Ther.* 2006, 8(1):R19.

30. **Reveille JD.** The genetic contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1998, 10(3):187-200.

31. **Weyand CM, Goronzy JJ.** Inherited and noninherited risk factors in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1995, 7(3):206-213.
32. **Auger I, Roudier J.** Influence of the QKRAA/QRRAA/RRRAA motifs of the third hypervariable region of HLA-DRB1 in the development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1997, 24(1):227-228.
33. **Wagner U, Kaltenhäuser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Häntzschel H, Kalden JR, Wassmuth R.** HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997, 40(2):341-351.
34. **Albani S, Carson DA.** A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol Today.* 1996, 17(10):466-470.
35. **Stavropoulos C, Spyropoulou M, Koumantaki Y, Kappou I, Kaklamani V, Linos A, Giziaki E, Kaklamani E.** HLA-DRB1 alleles in Greek rheumatoid arthritis patients and their association with clinical characteristics. *Eur J Immunogenet.* 1997, 24(4):265-274.
36. **Meyer JM, Evans TI, Small RE, Redford TW, Han J, Singh R, Moxley G.** HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1999, 26(5):1024-1034.
37. **Nakano K, Boyle DL, Firestein GS.** Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol.* 2013, 190(3):1297-1303.
38. **Robertson KD.** DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005, 6(8):597-610.
39. **Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD.** DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 2008, 647(1-2):30-38.
40. **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. *Immunol Lett.* 2011, 135(1-2):96-99.
41. **Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M.** DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009, 60(12):3613-3622.
42. **Neidhart M, Rethage J, Kuchen S, Künzler P, Crowl.** Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis Rheum.* 2000, 43(12):2634-2647.
43. **Takami N, Osawa K, Miura Y, Komai K, Taniguchi M, Shiraishi M, Sato K, Iguchi T, Shiozawa K, Hashiramoto.** Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(3):779-787.
44. **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 Rheum.* 2008, 58(9):2686-2693.

45. **Liao J, Liang G, Xie S, Zhao H, Zuo X, Li F, Chen J, Zhao M, Chan TM, Lu Q.** CD40L demethylation in CD4(+) T cells from women with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol.* 2012, 145(1):13-18.
46. **Lu Q.** The critical importance of epigenetics in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2013, 41:1-5.
47. **Sen M.** Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2005, 44(6):708-713.
48. **Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D.** Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008, 58(4):1001-1009.
49. **Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, Saura R, Kurosaka M, Kumagai S.** MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009, 60(5):1294-1304.
50. **Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H.** Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2008, 58(5):1284-1292.
51. **Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK.** Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008, 10(4):R101.
52. **Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, Gay R, Buckley CD, Tak PP, Gay S, Kyburz D.** Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.* 2011, 63(2):373-381.
53. **Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T.** Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010, 12(3):R86.
54. **Okutani D, Lodyga M, Han B, Liu M.** Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, 291(2):L129-141.
55. **Takeuchi T, Abe T.** Tyrosine phosphorylated proteins in synovial cells of rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol.* 1998, 17(5-6):365-381.
56. **Davignon JL, Hayder M, Baron M, Boyer JF, Constantin A, Apparailly F, Poupot R, Cantagrel A.** Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2013, 52(4):590-8, pp. Apr;52(4):590-598.
57. **Peichl P, Ceska M, Effenberger F, Haberhauer G, Broell H, Lindley IJ.** Presence of NAP-1/IL-8 in synovial fluids indicates a possible pathogenic role in rheumatoid

arthritis. *Scand J Immunol*. 1991, 34(3):333-339.

58. **Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM.** Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol*. 1991, 147(7):2187-2195.

59. **Thairu N, Kiriakidis S, Dawson P, Paleolog E.** Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: learning the lessons of the colorectal cancer experience. *Angiogenesis*. 2011, 14(3):223-234.

60. **Akhavani MA, Madden L, Buyschaert I, Sivakumar B, Kang N, Paleolog EM.** Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009, 11(3):R64.

61. **Stebulis JA, Rossetti RG, Atez FJ, Zurier RB.** Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *J Rheumatol*. 2005, 32(2):301-306.

62. **Amano T, Yamasaki S, Yagishita N, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Aratani S, Fujita H, Zhang L, Ikeda R, Fujii R, Miura N, Komiya S, Nishioka K, Maruyama I, Fukamizu A, Nakajima T.** Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes Dev*. 2003, 17(19):2436-2449.

63. **Tsuchimochi K, Yagishita N, Yamasaki S, Amano T, Kato Y, Kawahara K, Aratani S, Fujita H, Ji F, Sugiura A, Izumi T, Sugamiya A, Maruyama I, Fukamizu A, Komiya S, Nishioka K, Nakajima T.** Identification of a crucial site for Synoviolin expression. *Mol Cell Biol*. 2005, 25:7344-7356.

64. **Zimmermann-Górska I.** *Choroby reumatyczne*. Warszawa, 2004; Wyd. PZWL, ISBN: 832002918X.

65. **Jorgensen C, Apparailly F.** Prospects for gene therapy in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010, 24(4):541-552.

66. **Mor A, Abramson SB, Pillinger MH.** The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*. 2005, 115(2):118-128.

67. **Bartok B, Firestein GS.** Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010, 233(1):233-255.

68. **Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE.** Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res*. 2001, 3(2):118-126.

69. **Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K.** Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol*. 2000, 63(1):17-31.

70. **Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S.** Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum*. 2003, 48(7):1873-1880.

71. **Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS.** Acquisition, culture, and phenotyping of

synovial fibroblasts. *Methods Mol Med.* 2007, 135:365-375.

72. **Tsumuki H, Hasunuma T, Kobata T, Kato T, Uchida A, Nishioka K.** Basic FGF-induced activation of telomerase in rheumatoid synoviocytes. *Rheumatol Int.* 2000, 19(4):123-128.

73. **Bottini N, Firestein GS.** Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 2012, 13;9(1):24-33.

74. **Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U.** Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med.* 2010, 16(10):458-468.

75. **Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T.** Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9(6):223.

76. **Abul Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai.** *Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition.* 2012; Wyd. Elsevier, ISBN: 9781437715286.

77. **Hamilton JA, Tak PP.** The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 2009, 60(5):1210-1221.

78. **Konakahara S, Saitou M, Hori S, Nakane T, Murai K, Itoh R, Shinsaka A, Kohroki J, Kawakami T, Kajikawa M, Masuho Y.** A neuronal transmembrane protein LRFN4 induces monocyte/macrophage migration via actin cytoskeleton reorganization. *FEBS Lett.* 2011, 21;585(14):2377-2384.

79. **Lee HW, Choi HJ, Ha SJ, Lee KT, Kwon YG.** Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1835(2):170-179.

80. **Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H.** CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002, 46(10):2578-2586.

81. **Cairns AP, Crockard AD, Bell AL.** The CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2002, 21(5):189-192.

82. **Nadiv O, Beer Y, Goldberg M, Agar G, Loos M, Katz Y.** Decreased induction of IL-1beta in fibroblast-like synoviocytes: a possible regulatory mechanism maintaining joint homeostasis. *Mol Immunol.* 2007, 44(12):3147-3154.

83. **Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S.** Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J.* 2008, 275(18):4448-4455.

84. **Pierer M, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U, Hantzschel H, Michel BA, Gay RE, Gay S, Kyburz D.** Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol.* 2004, 15;172(2):1256-1265. Errata: *J Immunol.* 2004, 15;172(4):2703.

85. **Shahrara S, Pickens SR, Dorfleutner A, Pope RM.** IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immuno.* 2009, 182(6):3884-3891.
86. **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. *Ann Rheum Dis.* 2005, 64(6):834-838.
87. **Thurlings RM, Wijbrandts CA, Bennink RJ, Dohmen SE, Voermans C, Wouters D, Izmailova ES, Gerlag DM, van Eck-Smit BL, Tak PP.** Monocyte scintigraphy in rheumatoid arthritis: the dynamics of monocyte migration in immune-mediated inflammatory disease. *PLoS One.* 2009, 4(11):e7865.
88. **van Hemert FJ, Thurlings R, Dohmen SE, Voermans C, Tak PP, van Eck-Smit BL, Bennink RJ.** Labeling of autologous monocytes with ^{99m}Tc-HMPAO at very high specific radioactivity. *Nucl Med Biol.* 2007, 34(8):933-938.
89. **Pomorski P, Watson JM, Haskill S, Jacobson KA.** How adhesion, migration, and cytoplasmic calcium transients influence interleukin-1beta mRNA stabilization in human monocytes. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004, 57(3):143-157.
90. **Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F.** Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol.* 2004, 4(2):110-122.
91. **Zupan J, Jeras M, Marc J.** Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochemia Medica.* 2013, 23(1):43-63.
92. **Sanmartí R, Marsal S, Valverde J, Casado E, Lafuente R, Kashiwagi N, Rodríguez-Cros JR, Erra A, Reina D, Gratacós J.** Adsorptive granulocyte/monocyte apheresis for the treatment of refractory rheumatoid arthritis: an open pilot multicentre trial. *Rheumatology (Oxford).* 2005, 44(9):1140-1144.
93. **Carman CV, Springer TA.** A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004, 167(2):377-388.
94. **Fernandez EJ, Lolis E.** Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002, 42:469-499.
95. **Fenteany G, Glogauer M.** Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol.* 2004, 11(1):15-24.
96. **Granger DN, Schmid-Schonbein GW.** *Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion.* Oxford University Press, 1995; ISBN: 0195081021.
97. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009, 29(6):313-326.
98. **Yadav A, Saini V, Arora S.** MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity. *Clin Chim Acta.* 2010, 411(21-22):1570-1579.
99. **Berckmans RJ, Nieuwland R, Kraan MC, Schaap MC, Pots D, Smeets TJ,**

- Sturk A, Tak PP.** Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2005, 7(3):R536-544.
100. **Pavkova Goldbergova M, Lipkova J, Pavek N, Gatterova J, Vasku A, Soucek M, Nemecek P.** RANTES, MCP-1 chemokines and factors describing rheumatoid arthritis. *Mol Immunol.* 2012, 52(3-4):273-278.
101. **Niu J, Kolattukudy PE.** Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond).* 2009, 117(3):95-109.
102. **Shi C, Pamer EG.** Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011, 11(11):762-774.
103. **Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C.** Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2003, 7(1):35-48.
104. **Villiger PM, Terkeltaub R, Lotz M.** Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. *J Immunol.* 1992, 149(2):722-727.
105. **Kusano KF, Nakamura K, Kusano H, Nishii N, Banba K, Ikeda T, Hashimoto K, Yamamoto M, Fujio H, Miura A, Ohta K, Morita H, Saito H, Emori T, Nakamura Y, Kusano I, Ohe T.** Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ J.* 2004, 68(7):671-676.
106. **Lembo S, Capasso R, Balato A, Cirillo T, Flora F, Zappia V, Balato N, Ingrosso D, Ayala F.** MCP-1 in psoriatic patients: effect of biological therapy. *J Dermatolog Treat.* 2014, 25(1):83-86.
107. **Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, Montano M, Barnes PF, Selman M, Granados.** A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med.* 2005, 202:1649-1658.
108. **Spoettl T, Hausmann M, Herlyn M, Gunckel M, Dirmeier A, Falk W, Herfarth H, Schoelmerich J, Rogler G.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clin Exp Immunol.* 2006, 145:190-199.
109. **Ip WK, Wong CK, Lam CW.** Interleukin (IL)-4 and IL-13 upregulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-t. *Clin Exp Immunol.* 2006, 145:162-172.
110. **Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y.** Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl).* 2006, 112:195-204.
111. **Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN.** Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.* 1991, 88(4):1121-1127.
112. **Hong KH, Ryu J, Han KH.** Monocyte chemoattractant protein-1-induced

angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*. 2005, 105(4):1405-1407.

113. **Yao TC, Kuo ML, See LC, Ou LS, Lee WI, Chan CK, Huang JL.** RANTES and monocyte chemoattractant protein 1 as sensitive markers of disease activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis: a six-year longitudinal study. *Arthritis Rheum*. 2006, 54(8):2585-2593.

114. **Grande-García A, del Pozo MA.** Caveolin-1 in cell polarization and directional migration. *Eur J Cell Biol*. 2008, 87(8-9):641-647.

115. **Rogers KR, Morris CJ, Blake DR.** The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation. *Ann Rheum Dis*. 1992, 51(4):565-571.

116. **Kim JY, Lee YG, Kim MY, Byeon SE, Rhee MH, Park J, Katz DR, Chain BM, Cho JY.** Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. *Biochem Pharmacol*. 2010, 79(3):431-443.

117. **Xu Y, Li J, Ferguson GD, Mercurio F, Khambatta G, Morrison L, Lopez-Girona A, Corral LG, Webb DR, Bennett BL, Xie W.** Immunomodulatory drugs reorganize cytoskeleton by modulating Rho GTPases. *Blood*. 2009, 114(2):338-345.

118. **Nowak JM, Grzanka A, Zuryń A, Stepień A.** The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008, 62:110-117.

119. **Aflaki E, Balenga NA, Luschnig-Schratl P, Wolinski H, Povoden S, Chandak PG, Bogner-Strauss JG, Eder S, Konya V, Kohlwein SD, Heinemann A, Kratky D.** Impaired Rho GTPase activation abrogates cell polarization and migration in macrophages with defective lipolysis. *Cell Mol Life Sci*. 2011, 68(23):3933-3947.

120. **Mañes S, Ana Lacalle R, Gómez-Moutón C, Martínez-A C.** From rafts to crafts: membrane asymmetry in mog cells. *Trends Immunol*. 2003, 24(6):320-326.

121. **Lettau M, Pieper J, Gerneth A, Lengl-Janssen B, Voss M, Linkermann A, Schmidt H, Gelhaus C, Leippe M, Kabelitz D, Janssen O.** The adapter protein Nck: role of individual SH3 and SH2 binding modules for protein interactions in T lymphocytes. *Protein Sci*. 2010, 19(4):658-669.

122. **Buday L, Wunderlich L, Tamás P.** The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal*. 2002, 14(9):723-731.

123. **JH, McCarty.** The Nck SH2/SH3 adaptor protein: a regulator of multiple intracellular signal transduction events. *Bioessays*. 1998, 20(11):913-921.

124. **Chen M, She H, Davis EM, Spicer CM, Kim L, Ren R, Le Beau MM, Li W.** Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *Biol Chem*. 1998, 273(39):25171-25178.

125. **Tu Y, Li F, Wu C.** Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell*. 1998, 9(12):3367-3382.

126. **Chen M, She H, Kim A, Woodley DT, Li W.** Nckbeta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *Mol Cell Biol.* 2000, 20(21):7867-7880.
127. **Funasaka K, Ito S, Hasegawa H, Goldberg GS, Hirooka Y, Goto H, Hamaguchi M, Senga T.** Cas utilizes Nck2 to activate Cdc42 and regulate cell polarization during cell migration in response to wound healing. *FEBS.* 2010, 277(17):3502-3513.
128. **Aspenström P, Fransson A, Saras J.** Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 2004, 377(Pt 2):327-337.
129. **Jaffe AB, Hall A.** Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005, 21:247-269.
130. **Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL.** Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci.* 2013, 14(4):7089-7108.
131. **Etienne-Manneville S, Hall A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002, 420(6916):629-635.
132. **Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, Marks AR, Rabbani LE.** Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation.* 2001, 103(24):2967-2972.
133. **Perona R, Montaner S, Saniger L, Sánchez-Pérez I, Bravo R, Lacal JC.** Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997, 11(4):463-475.
134. **Byeon SE, Yi YS, Oh J, Yoo BC, Hong S, Cho JY.** The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* 2012, 2012:512926.
135.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000197122;r=20:35973088-36034453
136. **Roskoski R.** Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 331(1):1-14.
137. **Qayyum T, Fyffe G, Duncan M, McArdle PA, Hilmy M, Orange C, Halbert G, Seywright M, Horgan PG, Underwood MA, Edwards J.** The interrelationships between Src, Cav-1 and RhoGD12 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer.* 2012, 106(6):1187-1195.
138. **Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ.** Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci.* 1997, 2:d501-518.
139. **Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y, Hirai H.** A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 1994, 13(16):3748-3756.

140. **Williams LM, Ridley AJ.** Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000, 164(4):2028-2036.
141. **Kleveta G, Borzęcka K, Zdioruk M, Czerkies M, Kuberczyk H, Sybirna N, Sobota A, Kwiatkowska K.** LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. *J Cell Biochem.* 2012, 113(1):80-92.
142. **Kowalsk M.** *Immunologia kliniczna.* Łódź, 2000. Wyd. Mediton, ISBN: 83-913433-0-8.
143. **Senetta R, Stella G, Pozzi E, Sturli N, Massi D, Cassoni P.** Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *J Cell Mol Med.* 2013, 17(3):325-336.
144. **Mercier I, Jasmin JF, Pavlides S, Minetti C, Flomenberg N, Pestell RG, Frank PG, Sotgia F, Lisanti MP.** Clinical and translational implications of the caveolin gene family: lessons from mouse models and human genetic disorders. *Lab Invest.* 2009, 89(6):614-623.
145. **Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP.** Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004, 84(4):1341-1379.
146. **Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K.** Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(3):818-831.
147. **Shu L, Shayman JA.** Glycosphingolipid Mediated Caveolin-1 Oligomerization. *J Glycomics Lipidomics.* 2012, Suppl 2:1-6.
148. **Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR.** Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev.* 2008, 27(4):715-735.
149. **Ohnuma K, Inoue H, Uchiyama M, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C.** T-cell activation via CD26 and caveolin-1 in rheumatoid synovium. *Mod Rheumatol.* 2006, 16(1):3-13.
150. **Quest AF, Lobos-González L, Nuñez S, Sanhueza C, Fernández JG, Aguirre A, Rodríguez D, Leyton L, Torres V.** The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr Mol Med.* 2013, 13(2):266-281.
151. **Lv XJ, Li YY, Zhang YJ, Mao M, Qian GS.** Over-expression of caveolin-1 aggravate LPS-induced inflammatory response in AT-1 cells via up-regulation of cPLA2/p38 MAPK. *Inflamm Res.* 2010, 59(7):531-541.
152. **Boettcher JP, Kirchner M, Churin Y, Kaushansky A, Pompaiah M, Thorn H, Brinkmann V, Macbeath G, Meyer TF.** Tyrosine-phosphorylated caveolin-1 blocks bacterial uptake by inducing Vav2-RhoA-mediated cytoskeletal rearrangements. *PLoS*

Biol. 2010, 8(8):e1000457.

153. **Luanpitpong S, Talbott SJ, Rojanasakul Y, Nimmannit U, Pongrakhananon V, Wang L, Chanvorachote P.** Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. *J Biol Chem.* 2010, 285(50):38832-38840.

154. **Hill MM, Scherbakov N, Schiefermeier N, Baran J, Hancock JF, Huber LA, Parton RG, Parat MO.** Reassessing the role of phosphocaveolin-1 in cell adhesion and migration. *Traffic.* 2007, 8(12):1695-1705.

155. **Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO.** A role for caveolae in cell migration. *FASEB J.* 2004, 18(15):1801-1811.

156. **Han F, Zhu HG.** Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res.* 2010, 159(1):443-450.

157. **Mammoto A, Huang S, Ingber DE.** Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. *J Cell Sci.* 2007, 120(3):456-467.

158. **Stahlhut M, van Deurs B.** Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2000, 11(1):325-337.

159. **Shatz M, Lustig G, Reich R, Liscovitch M.** Caveolin-1 mutants P132L and Y14F are dominant negative regulators of invasion, migration and aggregation in H1299 lung cancer cells. *Exp Cell Res.* 2010, 316(10):1748-1762.

160. **Fecchi K, Travaglione S, Spadaro F, Quattrini A, Parolini I, Piccaro G, Raggi C, Fabbri A, Felicetti F, Carè A, Fiorentini C, Sargiacomo M.** Human melanoma cells express FGFR/Src/Rho signaling that entails an adhesion-independent caveolin-1 membrane association. *Int J Cancer.* 2012, 130(6):1273-1283.

161. **Grande-García A, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivielso JM, del Pozo MA.** Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol.* 2007, 177(4):683-694.

162. **Westergren A.** Diagnostic tests: the erythrocyte sedimentation rate range and limitations of the technique. *Triangle.* 1957, 3(1):20-25.

163. **Wewers ME, Lowe NK.** A critical review of visual analogue scales in the measurement of clinical phenomena. *Res Nurs Health.* 1990, 13(4):227-236.

164. **Prevo 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(1):44-48.

165. **Neurauter AA, Bonyhadi M, Lien E, Nøkleby L, Ruud E, Camacho S, Aarvak T.** Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007, 106:41-73.

166. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987, 162(1):156-159.
167. **Larionov A, Krause A, Miller W.** A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 2005, 6:62.
168. **Scanu A, Oliviero F, Braghetto L, Ramonda R, Luisetto R, Calabrese F, Pozzuoli A, Punzi L.** Synovial cell cultures from synovial fluid. *Reumatismo.* 2007, 59(1):66-70.
169. **Kay J, Calabrese L.** The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004, 43(Suppl 3):iii2-9.
170. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72:248-254.
171. **Westermeier, Reiner.** *Electrophoresis in Practice.* Darmstadt, 2006. Wyd. John Wiley & Sons, ISBN: 3527604448.
172. **Chen T, Liu L, Xu HX, Wang WQ, Wu CT, Yao WT, Yu XJ.** Significance of caveolin-1 regulators in pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013, 14(8):4501-4507.
173. <https://acr.confex.com/acr/2006/webprogram/Paper5821.html>.
174. **Baugé C, Girard N, Leclercq S, Galéra P, Boumédiène K.** Regulatory mechanism of transforming growth factor beta receptor type II degradation by interleukin-1 in primary chondrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1823(5):983-986.
175. **Wisniewski T, Bayne E, Flanagan J, Shao Q, Wnek R, Matheravidathu S, Fischer P, Forrest MJ, Peterson L, Song X, Yang L, Demartino JA, Struthers M.** Assessment of chemokine receptor function on monocytes in whole blood: In vitro and ex vivo evaluations of a CCR2 antagonist. *J Immunol Methods.* 2010, 352(1-2):101-110.
176. **Edgar R, Domrachev M, Lash AE.** Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30(1):207-210.
177. **Wurfel MM, Park WY, Radella F, Ruzinski J, Sandstrom A, Strout J, Bumgarner RE, Martin TR.** Identification of high and low responders to lipopolysaccharide in normal subjects: an unbiased approach to identify modulators of innate immunity. *J Immunol.* 2005, 175(4):2570-2578.
178. **Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB.** TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol.* 2008, 9(4):378-387.
179. **Thamilarasan M, Hecker M, Goertsches RH, Paap BK, Schröder I, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK.** Glatiramer acetate treatment effects on gene expression in

- monocytes of multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*. 2013, 10(1):126.
180. **Xu H, Liu P, Liang L, Danesh FR, Yang X, Ye Y, Zhan Z, Yu X, Peng H, Sun L.** RhoA-mediated, tumor necrosis factor alpha-induced activation of NF-kappaB in rheumatoid synoviocytes: inhibitory effect of simvastatin. *Arthritis Rheum*. 2006, 54(11):3441-3451.
181. **Nakayamada S, Kurose H, Saito K, Mogami A, Tanaka Y.** Small GTP-binding protein Rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2005, 7(3):R476-484.
182. **Pu YS, Wang CW, Liu GY, Kuo YZ, Huang CY, Kang WY, Shun CT, Lin CC, Wu WJ, Hour TC.** Down-regulated expression of RhoA in human conventional renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2008, 28(4B):2039-2043.
183. **Honing H, van den Berg TK, van der Pol SM, Dijkstra CD, van der Kammen RA, Collard JG, de Vries HE.** RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *J Leukoc Biol*. 2004, 75(3):523-528.
184. **Glezeva N, Collier P, Voon V, Ledwidge M, McDonald K, Watson C, Baugh J.** Attenuation of monocyte chemotaxis--a novel anti-inflammatory mechanism of action for the cardio-protective hormone B-type natriuretic peptide. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013, 6(4):545-557.
185. **Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, Koenderman L.** Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell*. 2001, 12(7):2137-2145.
186. **Tkach V, Bock E, Berezin V.** The role of RhoA in the regulation of cell morphology and motility. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005, 61(1):21-33.
187. **Nobes CD, Hall A.** Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*. 1999, 144(6):1235-1244.
188. **Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ.** Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J Cell Biol*. 2010, 190(4):553-563.
189. **Zhang Z, Fauser U, Schluesener HJ.** Expression of RhoA by inflammatory macrophages and T cells in rat experimental autoimmune neuritis. *J Cell Mol Med*. 2007, 11(1):111-119.
190. **Nakayama Y, Komuro R, Yamamoto A, Miyata Y, Tanaka M, Matsuda M, Fukuhara A, Shimomura I.** RhoA induces expression of inflammatory cytokine in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, 379(2):288-292.
191. **Fessler MB, Arndt PG, Just I, Nick JA, Malcolm KC, Worthen GS.** Dual role for RhoA in suppression and induction of cytokines in the human neutrophil. *Blood*. 2007, 109(3):1248-1256.
192. **Buvall L, Rashmi P, Lopez-Rivera E, Andreeva S, Weins A, Wallentin H, Greka A, Mundel P.** Proteasomal degradation of Nck1 but not Nck2 regulates RhoA

activation and actin dynamics. *Nat Commun.* 2013, 29;4:2863.

193. **Ungethuen U, Haeupl T, Witt H, Koczan D, Krenn V, Huber H, von Helversen TM, Drungowski M, Seyfert C, Zacher J, Pruss A, Neidel J, Lehrach H, Thiesen HJ, Ruiz P, Bläss S.** Molecular signatures and new candidates to target the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Physiol Genomics.* 2010, 42A(4):267-282.

194. **Kilarski WW, Jura N, Gerwins P.** Inactivation of Src family kinases inhibits angiogenesis in vivo: implications for a mechanism involving organization of the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 2003, 291(1):70-82.

195. **Takayanagi H, Juji T, Miyazaki T, Iizuka H, Takahashi T, Isshiki M, Okada M, Tanaka Y, Koshihara Y, Oda H, Kurokawa T, Nakamura K, Tanaka S.** Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin Invest.* 1999, 104(2):137-146.

196. **Tristano AG.** Tyrosine kinases as targets in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2009, 9(1):1-9.

197. **Dearden-Badet MT, Mouchiroud G.** Re-distribution of phospholipase C gamma 2 in macrophage precursors is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Src kinases. *Cell Signal.* 2005, 17(12):1560-1571.

198. **Kumar P, Hosaka S, Koch AE.** Soluble E-selectin induces monocyte chemotaxis through Src family tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 2001, 276(24):21039-21045.

199. **Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Sturn DH, Wiedermann CJ.** Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum.* 2004, 50(7):2309-2316.

200. **Miyazaki T, Tanaka S, Sanjay A, Baron R.** The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol.* 2006, 16(2):68-74.

201. **Arthur WT, Petch LA, Burridge K.** Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 2000, 10(12):719-722.

202. **Tsuji Y, Nakagawa T, Hatanaka M, Takeuchi T, Matsumoto E, Takenaka H, Shimizu A.** Quantification of caveolin isoforms using quantitative real-time RT-PCR, and analysis of promoter CpG methylation of caveolin-1 alpha in human T cell leukemia cell lines. *Int J Mol Med.* 2006, 18(3):489-495.

203. **Harris J, Werling D, Hope JC, Taylor G, Howard CJ.** Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends Immunol.* 2002, 23(3):158-164.

204. **Parton RG, Simons K.** The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8(3):185-194.

205. **Fu Y, Moore XL, Lee MK, Fernández-Rojo MA, Parat MO, Parton RG, Meikle PJ, Sviridov D, Chin-Dusting JP.** Caveolin-1 plays a critical role in the differentiation of monocytes into macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012, 32(9):e117-125.

206. **Hu G, Ye RD, Dinauer MC, Malik AB, Minshall RD.** Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008, 294(2):L178-186.
207. **Engel D, Beckers L, Wijnands E, Seijkens T, Lievens D, Drechsler M, Gerdes N, Soehnlein O, Daemen MJ, Stan RV, Biessen EA, Lutgens E.** Caveolin-1 deficiency decreases atherosclerosis by hampering leukocyte influx into the arterial wall and generating a regulatory T-cell response. *FASEB J.* 2011, 25(11):3838-3848.
208. **Gonzalez E, Nagiel A, Lin AJ, Golan DE, Michel T.** Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004, 279(39):40659-40669.
209. **Matkó J, Szöllösi J.** Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? *Immunol Lett.* 2002, 82(1-2):3-15.
210. **Ravid D, Chuderland D, Landsman L, Lavie Y, Reich R, Liscovitch M.** Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration. *Exp Cell Res.* 2008, 314(15):2762-2773.
211. **Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, Kojic LD, Cox ME, Griffith OL, Chan SK, Jones SJ, Leung SP, Masoudi H, Leung S, Wiseman SM, Nabi IR.** Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2008, 68(20):8210-8220.
212. **Takizawa N, Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K.** Secreted caveolin-1 enhances periodontal inflammation by targeting gingival fibroblasts. *Biomed Res.* 2013, 34(1):1-11.
213. **Kim SR, Park JH, Lee ME, Park JS, Park SC, Han JA.** Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner. *Mech Ageing Dev.* 2008, 129(12):706-713.
214. **Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Silva C, Rotellar F, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Frühbeck G.** Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008, 68(2):213-219.
215. **Xu Y, Krause A, Hamai H, Harvey BG, Worgall TS, Worgall S.** Proinflammatory phenotype and increased caveolin-1 in alveolar macrophages with silenced CFTR mRNA. *PLoS One.* 2010, 5(6):e11004.
216. **Zhang PX, Murray TS, Villella VR, Ferrari E, Esposito S, D'Souza A, Raia V, Maiuri L, Krause DS, Egan ME, Bruscia EM.** Reduced caveolin-1 promotes hyperinflammation due to abnormal heme oxygenase-1 localization in lipopolysaccharide-challenged macrophages with dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Immunol.* 2013, 190(10):5196-5206.
217. **Wang XM, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM.** The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of

- TLR4 with caveolin-1. *J Immunol.* 2009, 182(6):3809-3818.
218. **Wang XM, Kim HP, Song R, Choi AM.** Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006, 34(4):434-442.
219. **Ma WY, Zhuang L, Cai DX, Zhong H, Zhao C, Sun Q.** Inverse correlation between caveolin-1 expression and clinical severity in psoriasis vulgaris. *J Int Med Res.* 2012, 40(5):1745-1751.
220. **Richard M, Oates J, Silver R.M, Hoffman S, Tourkina E.** Caveolin-1 Regulates Normal and Scleroderma Leukocyte Functions (2070). ACR, San Francisco, 2008.
221. **Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida CJ, Jasmin JF, Musick M, Lisanti MP, Jiménez SA.** Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008, 58(9):2854-2865.
222. **Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K.** RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol.* 2001, 154(1):147-160.
223. **Bellizzi A, Mangia A, Chiriatti A, Petroni S, Quaranta M, Schittulli F.** RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease. *Int J Mol Med.* 2008, 22(1):25-31.
224. **Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH.** Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001, 60(8):729-735.
225. **Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA.** Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2003, 42(10):1189-1196.
226. **Cutolo M, Bisso A, Sulli A, Felli L, Briata M, Pizzorni C, Villaggio B.** Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000, 27(11):2551-2557.
227. **Shack S, Wang XT, Kokkonen GC, Gorospe M, Longo DL, Holbrook NJ.** Caveolin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway increases arsenite cytotoxicity. *Mol Cell Biol.* 2003, 23(7):2407-2414.
228. **Li X, Boyce TM, Iqbal TM, Khan MS, Mandal MN, Wheatley N, Callegan MC, Carr DJJ, Elliott MH.** Paradoxical role of Caveolin-1 in inflammatory modulation in the retina (P018). KENES, Berlin, 2012.
229. **Leech MT, Morand EF.** Fibroblasts and synovial immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2013, 13(4):565-569.
230. **Majkova Z, Smart E, Toborek M, Hennig B.** Up-regulation of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 by coplanar PCB77 is caveolin-1-dependent.

Toxicol Appl Pharmacol. 2009, 237(1):1-7.

231. **Gardner CR, Gray JP, Joseph LB, Cervelli J, Bremer N, Kim Y, Mishin V, Laskin JD, Laskin DL.** Potential role of caveolin-1 in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010, 245(1):36-46.

232. **Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP.** Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem.* 1995, 270(27):16395-16401.

233. **Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T.** Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci.* 2000, 113(19):3509-3517.

10. SPIS TABEL I RYCIN

Ryc. 1. Zmiany w stawach powstałe w przebiegu RZS	13
Ryc. 2. Schemat ukazujący rolę synowocytów typu B w patogenezie RZS	20
Ryc. 3. Konstrukcja wizualnej skali analogowej do oceny aktywności choroby	35
Ryc. 4. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego całkowitego RNA.	40
Ryc. 5. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR.....	47
Ryc. 6. Względna ekspresja genu <i>Nck2</i> na poziomie transkryptu w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS).....	58
Ryc. 7. Względna ekspresja genu <i>RhoA</i> na poziomie transkryptu w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS).....	58
Ryc. 8. Względna ekspresja genu <i>Src</i> na poziomie transkryptu w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS).....	59
Ryc. 9. Względna ekspresja genu <i>CAVI</i> na poziomie transkryptu w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS, w grupie kontrolnej (GK) oraz u chorych na chorobę zwyrodnieniową (ChZS).....	59
Ryc. 10. Graficzna prezentacja zależności między względnymi poziomami transkryptu badanych genów w monocytach CD14 ⁺ we wszystkich badanych grupach.	60
Ryc. 11. Graficzna prezentacja zależności między względnymi poziomami transkryptu badanych genów w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS.....	61
Ryc. 12. Porównanie ekspresji <i>CAVI</i> na poziomie transkryptu w monocytach i synowocytach pozyskanych od osób chorych na RZS.....	62
Ryc. 13. Graficzna prezentacja zależności między bólem wyrażonym w VAS a względnymi poziomami transkryptu genu <i>Nck2</i> w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS.....	64
Ryc. 14. Graficzna prezentacja zależności między DAS28-OB a względnymi poziomami transkryptu genu <i>Nck2</i> w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS.....	64
Ryc. 15. Graficzna prezentacja zależności między wartościami OB a względnymi poziomami transkryptu genu <i>RhoA</i> w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS.	65

Ryc. 16. Graficzna prezentacja zależności między czasem trwania choroby a względnymi poziomami transkryptu genu <i>Src</i> w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS.....	65
Ryc. 17. Synowioocyty typu B uzyskane z płynu stawowego.	66
Ryc. 18. Obraz mikroskopowy synowioocytów typu B uzyskany 48 godzin po transfekcji BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo.....	67
Ryc. 19. Optymalizacja warunków transfekcji synowioocytów.	68
Ryc. 20. Dobór optymalnej dawki IL-1β pobudzającej ekspresję CCL2 w synowioocytach typu B.....	69
Ryc. 21. Wpływ wyciszenia ekspresji <i>CAVI</i> na ekspresję <i>CCL2</i> w synowioocytach typu B.....	71
Tabela 1. Kryteria klasyfikacyjne RZS wg ustaleń ACR i EULAR z 2010 roku.....	11
Tabela 2. Charakterystyka starterów użytych do reakcji qPCR	43
Tabela 3. Przeciwciała wykorzystane do oceny cytometrycznej komórek	45
Tabela 4. Żele poliakrylamidowe do elektroforezy białek	52
Tabela 5. Przeciwciała wykorzystane do analizy <i>Western blotting</i>	53
Tabela 6. Charakterystyka chorych na RZS	55
Tabela 7. Charakterystyka grupy chorych na ChZS	56
Tabela 8. Względne poziomy transkryptów badanych genów w monocytach CD14 ⁺ u chorych na RZS, grupie kontrolnej oraz u chorych na ChZS	57
Tabela 9. Analiza korelacji między względnymi poziomami transkryptu badanych genów we wszystkich badanych grupach oraz tylko w grupie chorych na RZS.	60
Tabela 10. Wyniki analizy korelacji rang Spearmana i korelacji liniowej Pearsona* między względnymi poziomami transkryptu badanych genów oraz klinicznymi i laboratoryjnymi parametrami RZS w grupie chorych.....	63

11. ZAŁĄCZNIK



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Medicum
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1021/09

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zmianie dnia 11 maja 1996 r. w sprawie szczególnych zasad dowodowania dnia 11 marca 2003 r. w sprawie szczególnych wymagań Drob 2004r. Nr 53, poz. 553 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia odpowiedzialności cywilnej badacza i opiekuna (Dz. U. Nr 1 z dnia 11 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. 2004 Nr 194, poz. niepublikowanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 194, w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w Zasadami Przewidywanego Przewodzenia Badania Klinicznego – G

uch lekarza i lekarza dentyisty (Dz. U. 1997, Nr 20, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z finansowania oraz tytułu dyplomata komisji bioetycznej (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i opiekuna (Dz. U. 2004, Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2004 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia (Dz. U. 2004, Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. 2004, Nr 194, poz. niepublikowanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 194, w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w Zasadami Przewidywanego Przewodzenia Badania Klinicznego – G

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 03 grudnia 2009 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:
prof. JM dr hab. Paweł Hrycaj

w sprawie prowadzenia badań w
**Zakładzie Reumatologii i Immunologii Klinicznej
Katedry Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu**

Główny badacz: mgr inż. Dorota Trzybulska

**Członkowie zespołu
badawczego: prof. UM dr hab. Paweł Hrycaj
dr r. med. Anna Olewicz-Gawlik**

Temat badań: "Badanie ekspresji wybranych genów odpowiedzialnych za reorganizację cytoszkieletu aktywnego komórek uczestniczących w procesie zapalnym u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dy. hab. med. Zygmunt Przybylski