

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta



**Mechanismy atypické glykosylace pantové  
oblasti imunoglobulinu IgA1 u IgA nefropatie.**

## DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:	<b>Mgr. Jana Jemelková</b>
Studijní obor:	Lékařská imunologie
Forma studia:	Prezenční
Školící pracoviště:	Ústav imunologie, Lékařská fakulta UPOL
Školitel:	prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství.

V Olomouci dne

.....

*Děkuji touto cestou prof. MUDr. Milanu Raškovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu celého doktorského studia. Také mu vřele děkuji za to, že mi umožnil nahlédnout do světa vědy. Dále děkuji všem kolegyním a kolegům z Ústavu imunologie LF UP za podporu a za vytvoření přátelského prostředí na pracovišti. Velký dík patří mé rodině a nejbližším za podporu a pochopení během mého studia.*

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Mgr. Jana Jemelková  
Název práce: Mechanismy atypické glykosylace pantové oblasti imunoglobulinu IgA1 u IgA nefropatie.  
Typ práce: Disertační  
Pracoviště: Ústav imunologie, Lékařská fakulta UP, Olomouc  
Vedoucí práce: prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2023

### Abstrakt:

IgA nefropatie je charakterizována ukládáním imunitních komplexů obsahujících IgA1 v ledvinách. U pacientů s IgA nefropatií je v séru i v ledvinách detekováno atypicky glykosylované IgA1 (Gd-IgA1), které se vyznačuje sníženým obsahem galaktózy na *O*-glykanech pantové oblasti a které slouží jako antigen pro tvorbu specifických autoprotilátek. Na modelových buněčných liniích byla pozorována souvislost mezi deregulací exprese a aktivity vybraných glykosyltransferáz a tvorbou Gd-IgA1. Zvýšená produkce Gd-IgA1 může rovněž souviset s působením interleukinu 6 (IL-6). Ke zvýšení hladiny IL-6 dochází například při slizničních infekcích, kdy u některých pacientů pozorujeme přechodné zhoršení stavu.

V této práci byla v mononukleárních buňkách z periferní krve a jejich subpopulacích analyzována exprese pěti vybraných glykosyltransferáz účastnících se glykosylace IgA1. Byl sledován vliv působení IL-6 na změny v expresi glykosyltransferáz. S hladinou intracelulární glykosyltransferázy GalNAc-T14 bylo v modelových buněčných liniích uměle manipulováno a byl pozorován její vliv na tvorbu Gd-IgA1. Byla hodnocena souvislost mezi expresí glykosyltransferáz a hladinou Gd-IgA1 v séru.

Hladiny mRNA *GALNT14* (gen pro glykosyltransferázu GalNAc-T14) byly výrazně zvýšené v mononukleárních buňkách periferní krve pacientů s IgA nefropatií oproti zdravým dárcům. Po stimulaci IL-6 exprese *GALNT14* ještě rostla. Změny v expresi byly pozorovány i u dalších glykosyltransferáz zapojených do tvorby Gd-IgA1. Exprese *C1GALT1* byla snížena v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech pacientů s IgA nefropatií a její hladiny negativně korelovaly s přítomností Gd-IgA1 v séru. Exprese *ST6GALNAC2* byla v buňkách periferní krve pacientů s IgA nefropatií zvýšená. Po *in vitro* stimulaci lymfoblastoidní tkáňové kultury vedlo zvýšení hladiny GalNAc-T14 ke zvýšení produkce Gd-IgA1, a naopak snížení exprese *GALNT14* mělo za následek pokles produkce Gd-IgA1.

Deregulace hladin enzymů GalNAc-T14, C1GalT1 a ST6GalNAc-II představuje faktor přispívající k abnormální produkci Gd-IgA1 u pacientů s IgA nefropatií.

Klíčová slova: IgA nefropatie, glykosylace IgA1, Gd-IgA1, interleukin 6, glykosyltransferázy  
Jazyk: český

## Bibliographical identification

Author: Mgr. Jana Jemelková  
Title: Mechanisms of atypical glycosylation of the IgA1 hinge region in IgA nephropathy.  
Type of thesis: PhD  
Department: Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc  
Supervisor: prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.  
The year of presentation: 2023

### Abstract:

IgA nephropathy is characterized by the deposition of immune complexes containing IgA1 in the kidneys. Patients with IgA nephropathy have elevated levels of aberrantly glycosylated IgA1 with reduced content of galactose in *O*-glycans (Gd-IgA1), which serves as an epitope for specific autoantibodies production. The formation of Gd-IgA1 is associated with deregulation of the expression and activity of certain glycosyltransferases in model cell lines. Increased production of Gd-IgA1 was observed after stimulation of model cell lines with interleukin 6 (IL-6). Mucosal-tissue infections increase IL-6 production and, in some patients, are associated with temporal worsening of the condition.

In this work, the expression of five selected glycosyltransferases was analyzed in peripheral blood mononuclear cells and their subpopulations. The effect of IL-6 stimulation on the expression of the glycosyltransferases was assessed. The intracellular level of glycosyltransferase GalNAc-T14 was artificially modified and the effect on Gd-IgA1 production in model cell lines was analyzed. The association between the expression of glycosyltransferases and the level of Gd-IgA1 in serum was evaluated.

Expression of *GALNT14* encoding GalNAc-T14 was significantly increased in peripheral blood mononuclear cells of patients with IgA nephropathy compared to healthy donors, and its levels further increased after IL-6 stimulation. Expression of other glycosyltransferases involved in Gd-IgA formation was also deregulated. *C1GALT1* expression was decreased in IgA<sup>+</sup> B lymphocytes of patients with IgA nephropathy. Its levels were negatively correlated with the presence of Gd-IgA1 in serum. *ST6GALNAC2* expression was increased in peripheral blood cells of patients with IgA nephropathy. After *in vitro* stimulation of Gd-IgA1 producing lymphoblastoid cell line, the overexpression of GalNAc-T14 enhanced Gd-IgA1 production, and conversely, knock-down of GalNAc-T14 resulted in a decrease in galactose deficiency.

Deregulation of GalNAc-T14, C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzyme levels contributes to abnormal production of Gd-IgA1 in patients with IgA nephropathy.

Key words: IgA nephropathy, IgA1 glycosylation, Gd-IgA1, interleukin 6, glycosyltransferases  
Language: Czech

## Obsah

ÚVOD .....	- 1 -
TEORETICKÁ ČÁST .....	- 3 -
1 IgA nefropatie – klinický úvod .....	- 3 -
1.1 Epidemiologie .....	- 3 -
1.2 Diagnostika a histopatologie .....	- 4 -
1.3 Klinický obraz .....	- 5 -
1.4 Léčba .....	- 5 -
2 Patogeneze IgA nefropatie .....	- 8 -
2.1 Struktura IgA1 .....	- 8 -
2.2 Abnormální glykosylace IgA1 u pacientů s IgA nefropatií .....	- 11 -
2.3 Ovlivnění <i>O</i> -glykosylace IgA1 signálními molekulami .....	- 12 -
2.4 Původ Gd-IgA1 .....	- 15 -
2.5 Genetické vlivy spojené s produkcí Gd-IgA1 .....	- 16 -
2.6 Tvorba autoprotilátek proti Gd-IgA1 .....	- 17 -
2.7 Tvorba patogenních imunitních komplexů .....	- 18 -
2.8 Úloha komplementu v patogenezi IgA nefropatie .....	- 21 -
2.9 Poškození funkce ledvin .....	- 24 -
3 Experimentální přístupy k terapii IgA nefropatie .....	- 26 -
3.1 Inhibice tvorby protilátek .....	- 26 -
3.2 Ovlivnění slizničního imunitního systému .....	- 27 -
3.3 Protizánětlivá léčba .....	- 28 -
3.4 Zásah do komplementové kaskády .....	- 30 -
3.5 Terapie budoucnosti .....	- 30 -
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	- 32 -
CÍLE PRÁCE .....	- 32 -

4	Analýza exprese vybraných glykosyltransferáz v mononukleárních buňkách z periferní krve a jejich stimulace IL-6 .....	- 33 -
4.1	Metodika .....	- 33 -
4.2	Výsledky .....	- 37 -
5	Vliv zvýšení nebo snížení hladiny GalNAc-T14 na produkci Gd-IgA1 ....	- 41 -
5.1	Metodika .....	- 41 -
5.2	Výsledky funkčních analýz.....	- 53 -
6	Analýza exprese vybraných glykosyltransferáz v buněčných subpopulacích z periferní krve. ....	- 64 -
6.1	Metodika .....	- 64 -
6.2	Výsledky .....	- 68 -
7	DISKUSE .....	- 73 -
8	ZÁVĚR.....	- 78 -
9	CITOVANÁ LITERATURA .....	- 79 -
10	SEZNAM ZKRATEK.....	- 92 -
11	PŘÍLOHY.....	- 94 -
12	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORKY.....	- 108 -
13	PUBLIKACE I-IV.....	- 111 -

## ÚVOD

IgA nefropatie byla poprvé popsána v roce 1968 Jeanem Bergerem a Nicole Hinglaisovou. Jedná se o celosvětově nejčastější primární glomerulonefritidu, tedy zánětlivé onemocnění glomerulů ledvin. Diagnostika se opírá o průkaz přítomnosti imunoglobulinu A (IgA) v biopticky odebraném vzorku tkáně ledvin. Průběh onemocnění je značně variabilní. Zatímco někteří pacienti vykazují jen minimální příznaky, až 40% pacientů progreduje v průběhu let k terminálnímu selhání ledvin (D'Amico, 2000; Lv et al., 2008). IgA nefropatie se svou podstatou řadí mezi autoimunitní onemocnění. Běžně aplikovaná léčba je nespecifická a odvíjí se od závažnosti symptomů. Podávají se antihypertensiva a imunosupresiva (Podracká a Matoušovic, 2013). Experimentální přístupy k léčbě se snaží cíleně zvrátit nebo zastavit patogenezi onemocnění a k tomu je potřeba znát podrobně molekulární mechanismy, které jsou zodpovědné za rozvoj IgA nefropatie.

IgA prokázané v ledvinách pacientů s IgA nefropatií spadá do podtřídy IgA1. Vyznačuje dlouhou pantovou oblastí s navázanými *O*-glykany. U pacientů s IgA nefropatií je pozorováno zvýšené zastoupení abnormálně glykosylovaného IgA1 (Gd-IgA1) charakterizovaného aberantní strukturou připojených *O*-glykanů se sníženým zastoupením terminální galaktózy, a to jak v séru, tak i v ledvinných depozitech (Moldoveanu et al., 2007; Wada et al., 2018; Nakazawa et al., 2019a). Tvorba Gd-IgA1 je zásadním krokem v patogenezi IgA nefropatie. Gd-IgA1 je rozpoznáváno specifickými autoprotilátkami a dohromady tvoří imunokomplexy, které se ukládají v ledvinách a iniciují zde zánětlivou odpověď, což vede k poškození ledvin (Knoppova et al., 2016). Původ ani molekulární mechanismus produkce Gd-IgA1 není dosud zcela objasněn.

V pantové oblasti IgA1 je obvykle navázáno 4 – 5 *O*-glykanů. Jejich základní strukturou je disacharid obsahující *N*-acetylgalaktosamin a galaktózu. Tento disacharid může být dále modifikován navázáním až dvou sialových kyselin. *O*-glykany jsou tvořeny postupným připojováním jednotlivých cukrů na peptidový řetězec pomocí enzymů glykosyltransferáz. Abnormity v expresi, aktivitě a intracelulární lokalizaci glykosyltransferáz účastnících se tvorby *O*-glykanů IgA1 souvisí s produkcí Gd-IgA1. Rozdíly v expresi určitých glykosyltransferáz byly

pozorovány mezi modelovými buněčnými liniemi původem od pacientů s IgA nefropatií a zdravých dárců (Suzuki et al., 2008a).

U pacientů s IgA nefropatií se objevuje přechodná makroskopická hematurie v souvislosti s infekcí horních cest dýchacích nebo trávicího traktu. Interleukin-6 (IL-6) je prozánětlivý cytokin, jehož hladiny se v průběhu infekcí zvyšují. Stimulace IL-6 vede v modelových buněčných liniích ke změnám v expresi glykosyltransferáz a vyšší produkci Gd-IgA1 (Suzuki et al., 2014; Yamada et al., 2017).

Cílem této práce byla analýza exprese pěti vybraných glykosyltransferáz v primárních buňkách periferní krve pacientů s IgA nefropatií a zdravých dárců. Vliv IL-6 na expresi glykosyltransferáz byl testován za účelem prozkoumání souvislosti mezi zhoršením stavu u pacientů pozorovaným v průběhu slizničních infekcí. Dále, na základě předběžných studií naznačujících možné zapojení glykosyltransferázy GalNAc-T14 do etiopatogeneze IgA nefropatie, byl tento enzym podrobně analyzován a s jeho expresí bylo uměle manipulováno v modelových buněčných liniích. Byl sledován vliv hladiny GalNAc-T14 na produkci Gd-IgA1. Hladina glykosyltransferázy GalNAc-T14 byla experimentálně zvýšena vnášením plazmidu, snížena pomocí siRNA a zcela vyřazena metodou CRISPR/Cas9. V závěrečné části byla provedena analýza exprese vybraných glykosyltransferáz přímo na subpopulacích primárních buněk z periferní krve, konkrétně v T lymfocytech, B lymfocytech a IgA pozitivních B lymfocytech. Exprese glykosyltransferáz byla srovnávána s hladinou Gd-IgA1 v séru.



## TEORETICKÁ ČÁST

### 1 IgA nefropatie – klinický úvod

#### 1.1 Epidemiologie

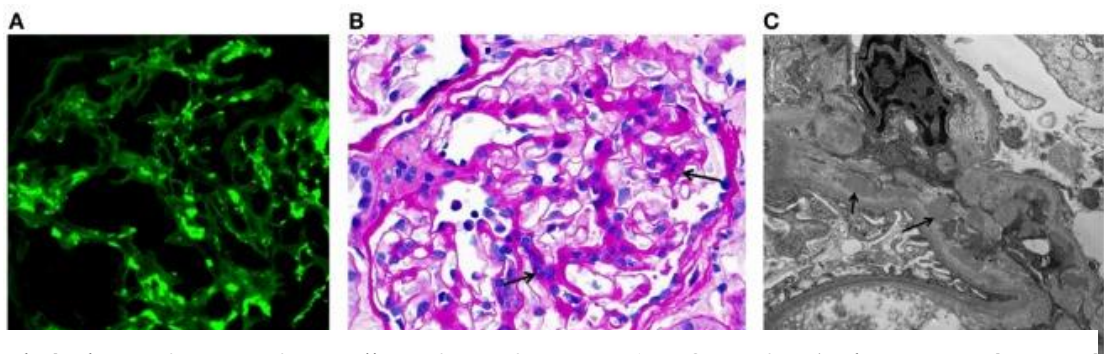
IgA nefropatie je celosvětově nejčastější primární glomerulonefritidou s geograficky proměnlivou incidencí s průměrnou hodnotou 2,5 nových případů na 100 000 obyvatel za rok (McGrogan et al., 2011). Prevalence onemocnění je vyšší v Asii, nižší výskyt IgA nefropatie je pozorován v Evropě a USA a nejméně častá je v Africe. V České republice je incidence IgA nefropatie 1,1 nových případů na 100 000 obyvatel za rok (Rychlík et al., 2004). Rozdíly v rozšíření onemocnění mohou souviset s různou distribucí rizikových alel a výskytem specifických infekčních agens v jednotlivých lokalitách. Vzhledem k tomu, že diagnóza IgA nefropatie je založena na průkazu přítomnosti imunoglobulinu A (IgA) v mezangiu ledvin, hodnoty incidence a prevalence jsou ovlivněny frekvencí screeningových biopsií ledvin a podmínkami indikace k biopsiím v jednotlivých státech. Ani intenzivní screeningový program v Japonsku však sám o sobě nevysvětluje vysokou četnost IgA nefropatie u východních Asiatů. Studie přítomnosti IgA v mezangiu ledvin ve vzorcích odebraných posmrtně odhalila deposita IgA u 1,3 % obyvatel Finska, avšak u 15,6 % kadaverózních dárců orgánů v Japonsku (Varis et al., 1993; Suzuki et al., 2003). Kromě etnicky rozličné zátěže v populaci tato data naznačují, že se IgA nefropatie může dlouhodobě rozvíjet i bez klinických příznaků. Genderová distribuce se rovněž liší geograficky, zatímco v Evropě a severní Americe převažuje IgA nefropatie u mužů v poměru 2-3:1, v Asii je tento poměr vyrovnaný (Wyatt a Julian, 2013; Deng et al., 2018).

U 30 až 40 % pacientů progreduje onemocnění k terminálnímu selhání ledvin (Radford et al., 1997; D'Amico, 2000; Lv et al., 2008). Na základě studie zahrnující kohorty pacientů z Evropské validační studie (VALIGA) a kohorty pacientů ze severní Ameriky bylo stanoveno 27% riziko progresse onemocnění k závažné ztrátě funkce ledvin případně k terminálnímu selhání ledvin během 10 let od stanovení diagnózy (Barbour et al., 2016).

## 1.2 Diagnostika a histopatologie

Diagnóza spočívá ve fluorescenčně mikroskopickém průkazu glomerulárních deposit IgA v biopsii odebrané tkáně ledvin (Obrázek 1). Přítomnost IgA může být doprovázena výskytem IgG, IgM a proteinu C3 komplementové kaskády, což naznačuje že se jedná o imunitní komplexy (Jennette, 1988). Pomocí světelné mikroskopie je možné pozorovat histopatologické změny na glomerulech, elektronovou mikroskopií je možné detekovat i ložiska imunitních komplexů (Obrázek 1) (Haas, 2005).

K hodnocení bioptického nálezu a k predikci progresu onemocnění na základě histologických změn byla v roce 2009 zavedena Oxfordská klasifikace IgA nefropatie (Working Group of the International IgA Nephropathy Network, 2009a; Working Group of the International IgA Nephropathy Network, 2009b). Oxfordská klasifikace stanovuje tzv. MEST skóre, které zahrnuje hodnotící kritéria: mezangiální hypercelularitu (M), endokapilární hypercelularitu (E), průkaz segmentální glomerulosklerózy (S) a přítomnost tubulární atrofie anebo intersticiální fibrózy (T). V roce 2017 byla do této klasifikace přidána ještě přítomnost celulárních a fibrocelulárních srpků (C, MEST-C skóre) (Trimarchi et al., 2017). Význam Oxfordské klasifikace spočívá v tom, že na jejím základě lze odhadnout celkovou prognózu onemocnění a do jisté míry i odpověď na léčbu bez ohledu na klinicko-laboratorní údaje. Oxfordská klasifikace byla validována v různých studiích a na různých populacích, největší z nich byla studie VALIGA čítající kohortu větší než tisíc pacientů (Coppo et al., 2014; Coppo et al., 2020).



Obrázek 1. **Mikroskopie tkáně ledvin pacienta s IgA nefropatií.** A) Fluorescenční značení IgA deponovaného v glomerulárním mezangiu. B) Světelná mikroskopie vzorku. Šipky označují místa expanze mezangiální matrix a mezangiální hypercelularity. C) Snímek z elektronového mikroskopu. Šipky označují místa se zvýšenou elektronovou densitou reprezentující ložiska mezangiálních a paramezangiálních imunitních komplexů. Převzato z (Knoppova et al., 2016).

### 1.3 Klinický obraz

Klinická manifestace IgA nefropatie je různorodá, zatímco u některých pacientů probíhá jako asymptomatická mikrohematurie, u jiných se rychle rozvíjí progresivní glomerulonefritida. Pacienti s příznaky mikroskopické hematurie s minimální proteinurií mají obecně dobrou prognózu, nicméně i u části z nich se postupně rozvíjí hypertenze a výraznější proteinurie (Szeto et al., 2001; Shen et al., 2008; Gutierrez et al., 2012). Proto je i u pacientů s asymptomatickým projevem vhodné pravidelné sledování proteinurie a měření krevního tlaku.

Naproti tomu je i poměrně častý progresivní rozvoj onemocnění. Jak již bylo zmíněno výše, u 27 % pacientů dochází do deseti let k výraznému poklesu „odhadované“ glomerulární filtrace (eGFR), a tím ke ztrátě funkce ledvin. Kromě histopatologického nálezu se špatná prognóza onemocnění pojí s hypertenzí, proteinurií a sníženou eGFR v době stanovení diagnózy (Barbour a Reich, 2012). Vzácnější je rychle progredující onemocnění, které se vyznačuje přítomností srpků v bioptickém nálezu, při kterém dochází již po roce od stanovení diagnózy k terminálnímu selhání ledvin u 43 % případů (Lv et al., 2013).

U dětí se častěji IgA nefropatie projeví poprvé jako epizoda makroskopické hematurie doprovázející infekci horních cest dýchacích. Je zde patrná spojitost s aktivací imunitního systému a tvorbou velkého množství protilátek, které se následně mohou usazovat v ledvinách. Tato manifestace je naopak velmi vzácná u osob starších 40 let (Wyatt a Julian, 2013). Nefrotický syndrom (tj. proteinurie větší než 50 mg/kg tělesné hmotnosti/24 hodin a pokles hladiny albuminu v séru pod 30 g/l) se vyskytuje v čase stanovení diagnózy pouze ojediněle (Herlitz et al., 2014).

Značná variabilita klinických projevů a vývoje onemocnění naznačuje, že diagnóza IgA nefropatie může zahrnovat určité subtypy onemocnění, které nemůžeme rozlišit současnými diagnostickými prostředky.

### 1.4 Léčba

V roce 2012 byly publikovány doporučené postupy pro léčbu glomerulonefritid iniciativou KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes). Léčebné postupy byly zhodnoceny na základě podrobného rozboru studií s vysokou výpovědní hodnotou podle zásad medicíny založené na důkazech. Postupy umožňují lékařům

rozhodovat o léčbě na základě dostupných klinicko-laboratorních údajích (Cattran et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že pro IgA nefropatii neexistuje specifická léčba, zaměřuje se terapie na zmírnění symptomů jako je vysoký krevní tlak a proteinurie. K tomu slouží antihypertensiva označovaná jako blokátory renin-angiotenzinového systému (RAS). Jedná se o inhibitory ACE („angiotensin converting enzyme“) a blokátory receptorů pro angiotenzin II. Jejich nepřímé působení spočívá ve snížení krevního tlaku, dilataci cév, a tím snížení tlaku v ledvinách, což má za následek pokles proteinurie. Působí ovšem i přímo v ledvinách. Mezangiální buňky a tubulární epiteliální buňky totiž zvyšují produkci angiotenzinu II jako prozánětlivého cytokinu při probíhající glomerulonefritidě (Chan et al., 2005; Urushihara et al., 2012). Doporučují se u všech pacientů s proteinurií vyšší než 0,5 g/24 h. Jejich pozitivní efekt na míru proteinurie byl jednoznačně doložen v randomizovaných intervenčních i observačních studiích. Proteinurie představuje významný prognostický faktor u IgA nefropatie a zásadně ovlivňuje rychlost progresse onemocnění. Neléčená arteriální hypertenze je spojená s větší proteinurií a rychlejším poklesem glomerulární filtrace (Kunz et al., 2008). Léčbu podporuje dietní opatření s omezeným příjmem sodíku a fosfátu. Jako možná podpůrná léčba je podáván rybí olej, jehož omega-3 nenasycené mastné kyseliny mohou působit v ledvinách protizánětlivě a mají pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Jednoznačné potvrzení jeho účinku na průběh onemocnění IgA nefropatie však nebylo podáno (Reid et al., 2011).

Použití kortikosteroidů je voleno u pacientů jevících známky aktivity a progresse onemocnění s přetrvávající středně těžkou až těžkou proteinurií (> 1 g/24 h) navzdory užívání blokátorů RAS. Prednison nebo methylprednisolon je podáván po dobu 6 měsíců, následně by měla být léčba přerušena. Při výrazněji snížené glomerulární filtraci (<0,66 ml/s) již obvykle nejsou účinné (Matoušovic et al., 2008; Podracká a Matoušovic, 2013). Rozbor KDIGO vyhodnotil účinnost podávání cytostatika cyklofosfamidu spolu s kortikosteroidy jako nedostatečně doloženou a doporučuje se jen v případě rychle progredujícího onemocnění vyznačujícího se rychlým poklesem glomerulární filtrace, nefrotickou proteinurií anebo pokročilými zánětlivými projevy v histologickém nález. Rovněž použití imunosupresivních léčiv jako je mykofenolát mofetil, azatiprin nebo cyklosporin A není nadále doporučeno.

Tonzilektomie byla považována za užitečný způsob eradikace lokálních ložisek infekce vzhledem k manifestacím makroskopické hematurie v souvislosti s infekty horních cest dýchacích. Její vliv na snížení proteinurie nebo zpomalení poklesu glomerulární filtrace však nebyl prokázán a nyní není doporučována v jiných než otolaryngologických indikacích (Podracká a Matoušovic, 2013). Tonzilektomií pro kavkazskou populaci nedoporučuje ani KDIGO, ale revize z r. 2021 připouští možný užitek pro východoasijskou populaci na základně japonských studií, ve kterých tonzilektomie společně s pulzem kortikosteroidů zpomalovala progresi onemocnění (Yuzawa et al., 2016).

Dialyzační léčba a transplantace ledvin je indikována v případě terminálního selhání ledvin. Z důvodů autoimunitního původu IgA nefropatie je však transplantace problematická, u 10-50 % pacientů dochází do deseti let k rekurenci onemocnění (Ponticelli a Glassock, 2010; Lim et al., 2019).

## 2 Patogeneze IgA nefropatie

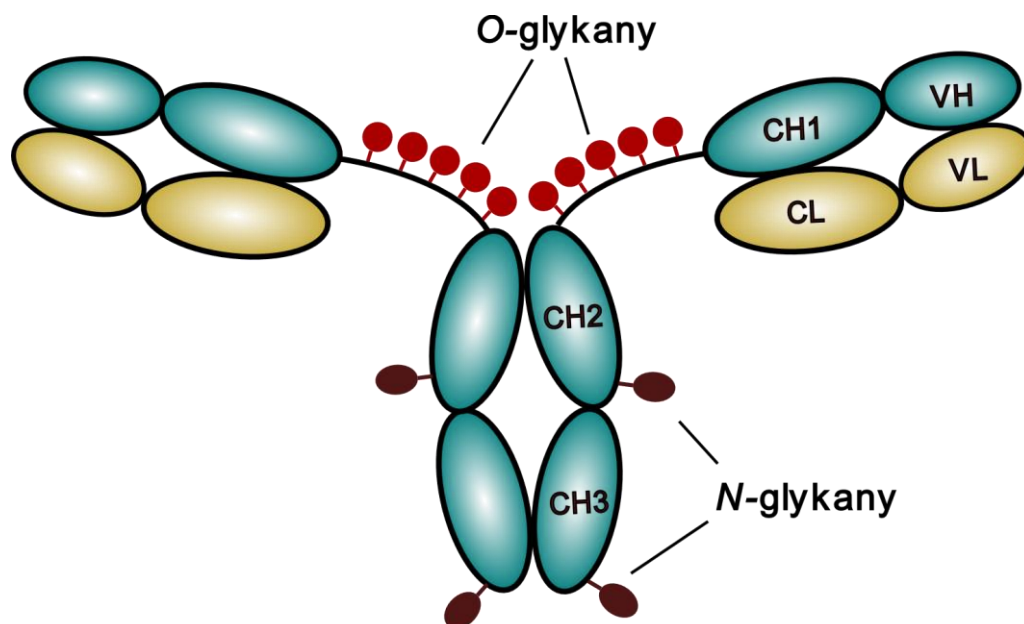
IgA nefropatie je multifaktoriální onemocnění (Suzuki et al., 2011). Pravděpodobně na základě genetických predispozic a vlivem vnějšího prostředí (např. infekcí) dochází k rozvoji onemocnění, který zahrnuje několik jednotlivých kroků. Prvním faktorem je tvorba IgA1 se sníženou galakosylací v pantové oblasti (Gd-IgA1). Proti tomuto aberantnímu IgA1 se tvoří autoprotilátky třídy IgG příp. IgA, dochází k tvorbě cirkulujících imunokomplexů, které se následně ukládají v ledvinách a iniciují zde zánět a poškození ledvin.

### 2.1 Struktura IgA1

IgA je u lidí tvořeno v množství přibližně 66mg/kg za den, což je více než všechny ostatní třídy protilátek dohromady. Dvě třetiny z vyprodukovaného množství IgA jsou vylučovány na slizniční povrch a jedna třetina zůstává v cirkulaci (Papista et al., 2011). Většina slizničního IgA je produkována plazmatickými buňkami ve slizniční tkáni ve formě dimerů spojených J řetězcem (glykoproteinem o molekulové hmotnosti 16 kDa). Toto polymerní IgA se může vázat na polymerní imunoglobulinový receptor na vnitřním povrchu epitelálních buněk, přes které je transcytózou transportováno na slizniční povrch. Část polymerního imunoglobulinového receptoru je odštěpena a zůstává navázána na IgA, tato část je nazývána sekreční komponenta IgA a dohromady tvoří sekreční IgA.

V cirkulaci je IgA rovněž hojně zastoupeno. Je tvořeno plazmatickými buňkami sídlícími v kostní dřeni. Průměrná koncentrace IgA v séru u dospělého člověka je 2mg/ml, a je tedy po IgG druhou nejčastější protilátkou. IgA v krevním řečišti podléhá rychlému rozkladu s poločasem rozpadu 3–5 dní. U lidí a vyšších primátů se IgA vyskytuje ve dvou podtřídách, tj. IgA1 a IgA2. V periferní krvi je z 90% zastoupena podtřída IgA1, a to z převážné většiny v monomerní formě (Woof a Kerr, 2006; Papista et al., 2011).

Lidské IgA je glykoprotein, jehož cukerná složka tvoří až 6 % molekulové hmotnosti. IgA2 má na těžkém řetězci 4-5 glykanů vázaných přes dusík (*N*-glykanů), zatímco IgA1 pouze 2 (de Haan et al., 2020). Pantová oblast IgA1 je prodloužená



**IgA1** -P-V-P-S-T-P-P-T-P-S-P-S-T-P-P-T-P-S-P-S-C-  
**IgA2** -P-V-P-.....P-P-P-P-C-

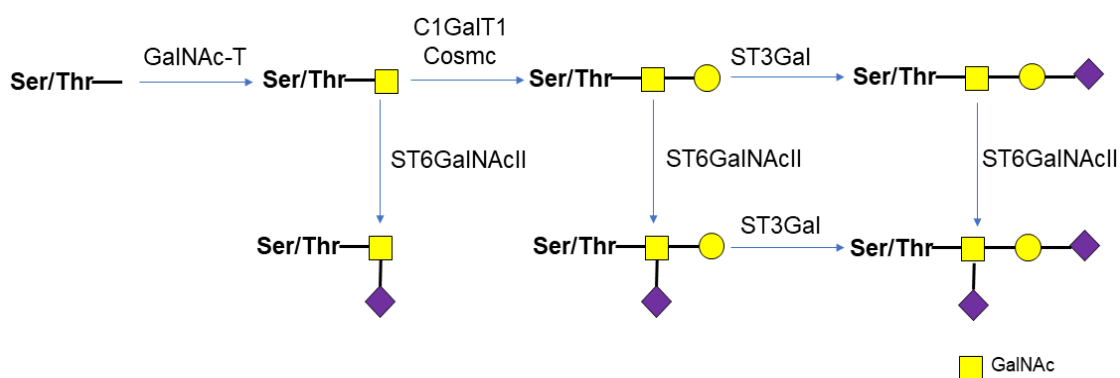
Obrázek 2. **Struktura IgA1.** IgA1 je tvořeno dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci spojenými disulfidovými můstky. Těžký řetězec se skládá ze 3 konstantních podjednotek a variabilní domény. Podjednotky CH1 a CH2 propojuje prodloužená pantová oblast, na které může být navázáno až 6 *O*-glykanů. 2 *N*-glykany jsou připojeny v konstantní oblasti těžkého řetězce. Na obrázku dole je znázorněna aminokyselinová sekvence pantové oblasti IgA1, červeně jsou vyznačeny aminokyseliny, které bývají glykosylovány. IgA2 má pantovou oblast kratší a je bez *O*-glykosylace. (VH – variabilní oblast těžkého řetězce, VL – variabilní oblast lehkého řetězce, CH – konstantní oblast těžkého řetězce, CL – konstantní oblast lehkého řetězce)

oproti IgA2. Nachází se zde 9 potenciálních glykosylačních míst. 3–6 z nich je obsazeno glykany vázanými na serin nebo treonin přes atom kyslíku, tzv. *O*-vázané glykany (viz Obrázek 2). *O*-glykanový řetězec je tvořen v Golgiho aparátu postupným připojováním jednotlivých cukrů. Je tvořen *N*-acetylgalaktosaminem (GalNAc), na který se obvykle váže galaktóza (Gal), a oba tyto cukry mohou být sialylovány (Baenziger a Kornfeld, 1974; Takahashi et al., 2012).

Připojování cukrů je zprostředkováno enzymy glykosyltransferázami (viz Obrázek 3). V prvním kroku je připojen GalNAc na serin nebo treonin pomocí enzymu z rodiny *N*-acetylgalaktosaminyltransferáz (polypeptid:UDP-*N*-acetylgalaktosamin transferasy, EC:2.4.1.41). Předpokládá se, že v B lymfocytech tuto vazbu zprostředkovává *N*-acetylgalaktosaminyltransferáza 2 (GalNAc-T2) (Iwasaki et al.,

2003), ale je možné zapojení i dalších enzymů z této rodiny (Stewart et al., 2019). Fylogeneticky nejpříbuznější je GalNAc-T14. Oba tyto enzymy mají lektinovou doménu a mohou, jak iniciovat připojení *N*-acetylgalaktosaminu na holý peptid, tak i následně zvyšovat denzitu glykanů na glykopeptidu (Bennett et al., 2012). Připojení galaktózy je katalyzováno Core 1 galaktosyltransferázou 1 (C1GalT1, *N*-acetylgalaktosaminid:UDP- $\alpha$ -D-glukosa transferasa EC:2.4.1.122). Stabilita C1GalT1 je závislá na interakci s jejím molekulárním šaperonem Cosmc, bez něhož je C1GalT1 urychleně degradována (Ju a Cummings, 2005). Kyselina sialová, konkrétně kyselina *N*-acetylneuraminová (NeuAc), je připojována na galaktózu  $\alpha$ 2,3-sialyltransferázou I (ST3Gal1, galaktosaminid:CMP-neuraminát transferasa, EC: 2.4.3.2) a na GalNAc pomocí  $\alpha$ 2,6-sialyltransferázy II (ST6GalNAcII, *N*-acetylgalaktosaminid:CMP-*N*-acetyl-neuraminát transferasa EC: 2.4.3.4). Pokud se NeuAc naváže na volný GalNAc, dochází k předčasné sialylaci, a na tuto strukturu už nemůže být následně připojena galaktóza (Suzuki et al., 2014).

Význam *O*-glykosylace IgA1 spočívá ve stabilizaci konformace pantové oblasti, zabraňuje nevhodné orientaci Fab a Fc fragmentů protilátky. Fab fragmenty IgA1 jsou více rozevřeny a 3D struktura připomíná spíše písmeno T než Y jako u neglykosylovaných protilátek. *O*-glykosylace IgA1 pravděpodobně zabraňuje samovolné agregaci IgA1 (Van den Steen et al., 1998). Na *O*-glykany se mohou nespecificky vázat některé druhy bakterií, a tak se IgA1 účastní přirozené imunitní obrany na sliznicích. *O*-glykosylace může zvyšovat rezistenci vůči proteázám, některé druhy bakterií však produkují speciální proteázy štěpící IgA1 právě v pantové oblasti (např. *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*) (Plaut, 1983).



Obrázek 3. Postupná tvorba *O*-glykanů IgA1 za katalýzy příslušných glykosyltransferáz.

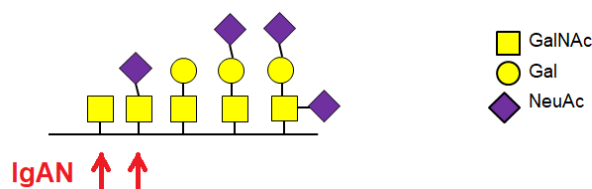


## 2.2 Abnormální glykosylace IgA1 u pacientů s IgA nefropatií

Složení *O*-glykanů na molekulách IgA1 je heterogenní. Nejčastěji však bývá pantová oblast obsazena 4 nebo 5 glykany obsahujícími ve svých řetězcích dohromady 4 molekuly galaktózy (Nakazawa et al., 2019a; Ohyama et al., 2020). U pacientů s IgA nefropatií je pozorováno na molekulách IgA1 snížené zastoupení galaktózy (tzv. IgA1 deficientní na galaktózu – Gd-IgA1) viz Obrázek 4 (Andre et al., 1990; Mestecky et al., 1993; Tomana et al., 1999; Odani et al., 2000; Moldoveanu et al., 2007; Nakazawa et al., 2019a). Zvýšený výskyt Gd-IgA1 byl pozorován v séru pacientů s IgA nefropatií, a také v ledvinných depositech (Allen et al., 2001; Hiki et al., 2001; Wada et al., 2018) i v moči (Suzuki et al., 2016).

Pro výzkumné účely byly připraveny imortalizované buněčné linie odvozené z buněk produkujících IgA1 u pacientů s IgA nefropatií a u zdravých jedinců (modelové buněčné linie). Tyto buněčné linie odrážely míru produkce Gd-IgA1 v séru u jejich dárců (Suzuki et al., 2008a). Usuzuje se z toho, že Gd-IgA1 je tvořeno díky abnormálním biosyntetickým procesům v buňkách produkujících IgA1 spíše než, že by byla galaktóza následně odstraňována z již vytvořených glykanových řetězců. Aberace *O*-glykosylace u IgA nefropatie je specifická pouze pro molekuly IgA1, u molekul IgD nebo C1 inhibitoru zůstává zastoupení galaktózy v *O*-glykanech na stejné úrovni jako u zdravých jedinců (Smith et al., 2006). Stejně tak je třeba uvést, že samotná produkce Gd-IgA1 onemocnění nezpůsobí. K tomu je potřeba více faktorů, o kterých bude pojednáno dále (Gharavi et al., 2008).

Změny v *O*-glykosylaci bývají obecně spojovány s deregulací exprese a aktivity glykosyltransferáz zodpovědných za tvorbu těchto glykanů. Toto bylo rovněž pozorováno v modelových buněčných liniích. U linií pocházejících od pacientů s IgA



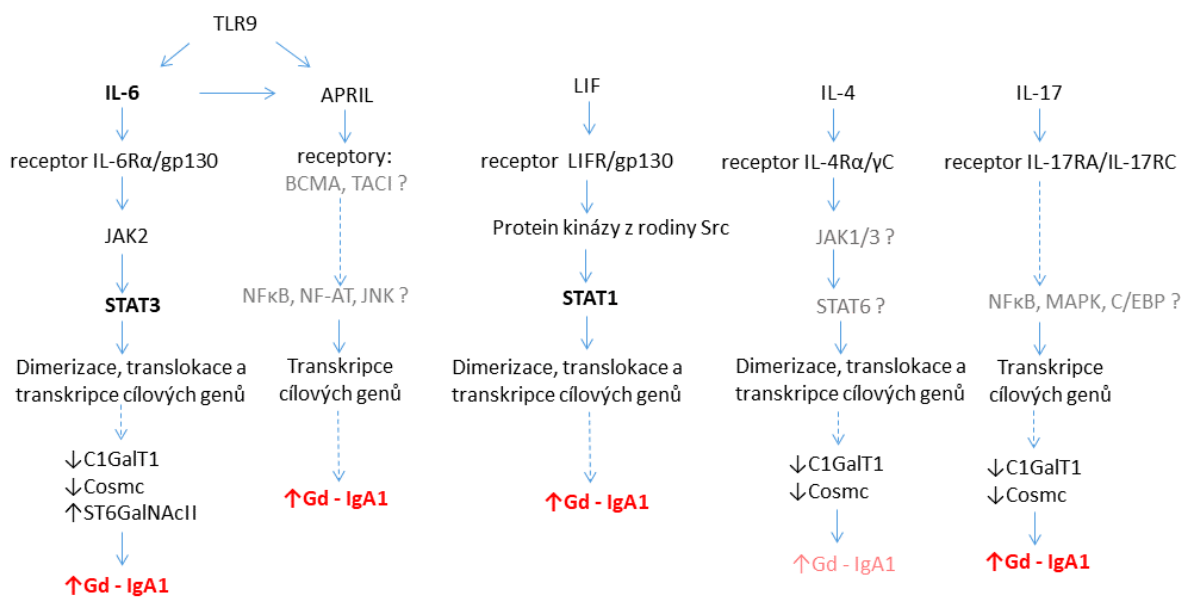
Obrázek 4. Složení *O*-glykanů vyskytujících se na IgA1. U pacientů s IgA nefropatií je častěji zastoupená zkrácená forma *O*-glykanů, a to terminální, příp. sialylovaný N-acetylgalaktosamin.

nefropatií byla oproti liniím od zdravých dárců pozorována snížená exprese a aktivita C1GalT1 a naopak zvýšená exprese a aktivita ST6GalNAcII (Suzuki et al., 2008a; Suzuki et al., 2014). Analýza exprese 18 lidských GalNAc-transferáz ukázala, že jediná GalNAc transferáza, jejíž exprese se významně liší mezi modelovými liniemi buněk produkujících IgA1 izolovaných od zdravých dárců a pacientů s IgA nefropatií je GalNAc-T14 (Raška et al., 2012).

### 2.3 Ovlivnění *O*-glykosylace IgA1 signálními molekulami

Expresi glykosyltransferáz a tím i produkce Gd-IgA1 v modelových buněčných liniích může být ovlivněna cytokiny (Obrázek 5). Nejvíce prostudované a zdokumentované je působení interleukinu 6 (IL-6). Stimulace IL-6 výrazně snižovala expresi a aktivitu C1GalT1 a Cosmc a zvyšovala expresi a aktivitu ST6GalNAcII, a následně docházelo i k vyšší produkci Gd-IgA1 (Suzuki et al., 2014; Yamada et al., 2017).

Zvýšení produkce Gd-IgA1 po stimulaci IL-6 bylo výraznější u modelových linií odvozených od pacientů s IgA nefropatií ve srovnání s liniemi od zdravých dárců. Za účelem zjištění mechanismu zodpovědného za tento rozdíl byla zkoumána aktivace signální dráhy Jak/STAT po stimulaci IL-6. Ukázalo se, že fosforylace STAT3 na pozici Y705 byla intenzivnější a trvala delší dobu v buněčných liniích od pacientů s IgA nefropatií. Fosforylace Y705 je nezbytná pro vytvoření dimerů STAT3, které se následně přemísťují do jádra buňky a působí zde jako transkripční faktor (Shuai et al., 1994). Vliv IL-6 asociovaný s prodlouženou fosforylací Y705 a produkcí Gd-IgA1 byl zrušen použitím inhibitoru STAT3 (Stattic) a inhibitoru Jak2 (AZD1480), což potvrdilo, že signalizace skrze signální dráhu Jak2/STAT3 je zodpovědná za nárůst Gd-IgA1 po stimulaci IL-6. Jednou z možností, jak může Jak2/STAT3 signální dráha ovlivňovat glykosylaci IgA1 je skrze aktivaci transkripčního faktoru SP1/3, který nasedá na promotor genu *C1GALT1* a vypíná jeho expresi. Další zapojené faktory však doposud popsány nebyly. Zesílená a prodloužená aktivace STAT3 po stimulaci IL-6 představuje patogenní mechanismus, který vede ke zvýšené produkci Gd-IgA1 u pacientů s IgA nefropatií (Yamada et al., 2017).



Obrázek 5. Cytokiny a jiné signální molekuly ovlivňující produkci Gd-IgA1 v buněčných liniích. IL-6, APRIL, LIF, IL-4 a IL-17 zvyšují produkci Gd-IgA1. Šedě jsou znázorněny signální molekuly, které se mohou účastnit signální dráhy vedoucí k nadprodukcí Gd-IgA1, jejich působení však ještě nebylo ověřeno experimentálně. Přerušovaná čára šipek znázorňuje, že jsou v této části signální dráhy zapojeny další molekuly, které jsou pro zjednodušení vynechány, příp. nejsou známy.

Předpokládá se, že během infekce horních cest dýchacích nebo gastrointestinálního traktu, které bývají spojovány s epizodami makroskopické hematurie u pacientů s IgA nefropatií, by mohlo vlivem působení lokálně produkovaného IL-6 docházet k nárazovému zvýšení produkce Gd-IgA1 plazmatickými buňkami (Mestecky et al., 2016). Během infekcí navíc aktivují bakteriální složky (PAMP „pathogen associated molecular patterns“) i signální dráhu TLR9-MyD88 („Toll like receptor 9, Myeloid differentiation primary response 88“), což vede ke zvýšení produkce IL-6 (Novak et al., 2011a). Kromě zvýšené produkce IL-6 dochází po aktivaci TLR9 ke zvýšení syntézy signální molekuly APRIL („A proliferation-inducing ligand“). APRIL patří do superrodiny tumor nekrotizujícího faktoru, je významným aktivátorem B lymfocytů a je schopný v B lymfocytech indukovat izotypový přesmyk na IgA. U buněčných linií produkujících IgA1 docházelo působením APRIL ke zvýšení produkce Gd-IgA1 (Makita et al., 2020). Zapojení signální molekuly APRIL v patogenezi IgA nefropatie podporuje i zjištění, že někteří pacienti s IgA nefropatií mají jeho hladinu v séru zvýšenou. Určité polymorfismy v genu pro TLR9 jsou asociovány s klinickým průběhem IgA nefropatie (Suzuki et al., 2008b). Specifické

polymorfismy TLR9 vedoucí k jeho zvýšené aktivaci, a tím k nárůstu exprese IL-6 a APRIL, by mohly souviset se zvýšením hladin Gd-IgA1 u pacientů s IgA nefropatií.

LIF („Leukemia inhibitory factor“) patří do rodiny cytokinů typu IL-6, a podle genomových asociačních studií (GWAS) polymorfismy v lokusu *LIF* genu jsou spojovány se zvýšeným rizikem rozvoje IgA nefropatie (Gharavi et al., 2011). Také po jeho působení na modelové buněčné linie izolované od pacientů s IgA nefropatií docházelo ke zvýšení produkce Gd-IgA1. Na rozdíl od IL-6 však nedocházelo k navýšení produkce celkového množství IgA1. Abnormální signalizace v tomto případě souvisela se zesílenou aktivací STAT1 a dále skrze přenos signálu přes proteinkinázy z rodiny Src, nikoliv přes Jak2, jako tomu bylo u IL-6 (Yamada et al., 2020).

Působení IL-4 snižovalo expresi *CIGALT1* a *CIGALT1C1* ( genu pro šaperon Cosmc), avšak enzymatická aktivita byla snížena jen mírně a ST6GalNAcII ovlivněna nebyla. I po působení IL-4 docházelo k mírnému navýšení produkce Gd-IgA1. Ve srovnání se stimulací IL-6 byl však nárůst nižší (Suzuki et al., 2014; Yamada et al., 2010). IL-4 aktivuje metylaci promotoru *CIGALT1C1*, dochází tak k epigenetickému umlčování tohoto genu a snížení jeho exprese (Sun et al., 2015).

Stimulace interleukinem 17 (IL-17) byla testována na IgA1-produkující lymfoblastoidní buněčné linii Dakiki. I u tohoto cytokinu docházelo ke snížení exprese *CIGALT1* a *CIGALT1C1*, což mělo za následek zvýšení produkce Gd-IgA1 (Lin et al., 2018). U pacientů s IgA nefropatií bylo pozorováno zvýšené procentuální zastoupení Th2 a Th17 lymfocytů v periferní krvi, které by mohly být zodpovědné za zvýšenou produkci IL-4 a IL-17 a následné zvýšení sekrece Gd-IgA1 B lymfocyty (Ruszkowski et al., 2019).

Mírný vliv na produkci IgA a Gd-IgA1 měla i stimulace TGF- $\beta$ 1, která rovněž souvisela se snížením exprese *CIGALT1* a *CIGALT1C1* (Xiao et al., 2017). V jiné studii (Suzuki et al., 2014) ale tento jev pozorován nebyl. Stimulace modelových buněčných linií pomocí IL-1, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , nebo TNF- $\alpha$  vliv na glykosylaci IgA1 neměla (Suzuki et al., 2014)

## 2.4 Původ Gd-IgA1

Většina IgA v cirkulaci se nachází v monomerní formě, má kompletní počet galaktózových zbytků v pantové oblasti a předpokládá se, že pochází z buněk aktivovaných v lymfatických orgánech následně migrujících do kostní dřeně, kde jsou jako dlouho žijící plazmatické buňky zodpovědné za systémovou produkci protilátek. Tvorba slizničního IgA je iniciována v lymfatické tkáni asociované se sliznicemi (např. krční mandle nebo Peyerovy pláty ve střevech). Zde jsou v lymfoidních folikulech antigeny prezentovány naivním B buňkám, které jsou aktivovány a dochází u nich k izotypovému přesmyku na IgA pozitivní B lymfocyty. Ty migrují skrze lymfatický a oběhový systém a usazují se v cílových oblastech v lamina propria, kde finálně diferencují a produkují polymerní IgA, které je transcytózou přeneseno na slizniční povrch (Woof a Kerr, 2006). Hlavními funkcemi slizničního imunitního systému je obrana proti patogenům, ale také navození imunitní tolerance vůči neškodným antigenům např. z potravy a udržení symbiózy s komensálními bakteriemi.

Stále není jednoznačně zodpovězena otázka, jestli je aberantní forma Gd-IgA1 tvořena buňkami aktivovanými v sekundárních lymfatických orgánech vnitřních, nebo je tvorba Gd-IgA1 indukována ve slizniční tkáni a souvisí s narušením migrace a správné cílové lokalizace těchto buněk do podslizniční tkáně. Případně dostává-li se Gd-IgA1 nějakým dosud nepopsaným mechanismem z lamina propria do cirkulace.

Pro zapojení slizničního imunitního systému do patogeneze IgA nefropatie hovoří jednak fakta, že IgA je hlavním imunoglobulinem zodpovědným za ochranu slizničních povrchů a zvýšené hladiny Gd-IgA1 v cirkulaci u pacientů s IgA nefropatií jsou v polymerní formě, která se typicky vyskytuje na sliznicích (Suzuki et al., 2008a), ale také pozorování, kdy u některých pacientů s IgA nefropatií dochází k exacerbaci onemocnění v souvislosti s infekcí horních cest dýchacích nebo gastrointestinálního traktu a k následnému zvýšení hladin polymerního IgA v séru (Feehally et al., 1986). Při charakterizaci B lymfocytů z periferní krve nesoucích na svém povrchu Gd-IgA1 jsme zjistili, že u pacientů s IgA nefropatií se skládají častěji z lehkého řetězce typu  $\lambda$  a exprimují chemokinové receptory CCR10 a CCR9, které by tyto buňky měly navádět do slizniční tkáně horních dýchacích cest a do střev (Zachová et al., 2022; Publikace III). Můžeme tedy předpokládat, že tyto buňky byly aktivovány v lymfatické tkáni

asociované s příslušnými sliznicemi v průběhu infekce, což podporuje teorii zapojení slizničního imunitního systému v patogenezi IgA nefropatie.

## 2.5 Genetické vlivy spojené s produkcí Gd-IgA1

Zvýšené hladiny Gd-IgA1 v séru byly pozorovány u čtvrtiny přímých příbuzných pacientů se sporadickou formou IgAN a u téměř poloviny příbuzných s familiální formou tohoto onemocnění (Gharavi et al., 2008). Dá se tedy říci že zvýšené hladiny Gd-IgA1 jsou dědičným znakem. Byly identifikovány jednonukleotivé polymorfismy („single-nucleotide polymorphisms“ SNP) v genech pro *C1GALT1* a *ST6GALNAC2*, které představují rizikové alely pro rozvoj IgA nefropatie (Li et al., 2007a; Li et al., 2007b; Pirulli et al., 2009; Zhu et al., 2009). Následné GWAS studie potom potvrdily výskyt genetické variace v genu pro *C1GALT1* spojené s rizikem rozvoje IgA nefropatie (Gale et al., 2017; Kiryluk et al., 2017). V práci Kiryluk *et al.* bylo popsáno, že množství Gd-IgA1 v séru je geneticky podmíněné a souvisí s variantou rs13226913-T v lokusu *C1GALT1*. Rizikový SNP zvyšující hladinu Gd-IgA1 se nachází v nekódující oblasti genu a má regulační funkci, snižuje expresi mRNA *C1GALT1*. Častěji se vyskytuje u evropské populace, u obyvatel východní Asie je poměrně vzácný. Další rizikový lokus související s vyšší hladinou Gd-IgA1 byl identifikován v *C1GALT1C1* (v genu pro šaperon Cosmc nezbytný pro správné fungování C1GalT1). Dohromady tyto dva SNP vysvětlují 7 % případů variability v hladině cirkulujícího Gd-IgA1 v evropské populaci, ale jen 2 % v asijské (Kiryluk et al., 2017).

V GWAS studiích bylo identifikováno téměř 20 dalších lokusů s charakteristickými SNP se spíše mírným vlivem na riziko rozvoje IgA nefropatie, což z ní dělá onemocnění s komplikovaným polygenním základem. Byly popsány rizikové i protektivní HLA alely, signifikantní lokusy pro geny účastníci se přirozené imunity (*DEFA*, *CARD9*, *VAV3*), pro cytokiny (*LIF-OSM*, *TNFSF13*) nebo pro geny účastníci se komplementové kaskády (*CFH/CFHR*, *ITGAM-ITGAX*) (Sanchez-Rodriguez et al., 2021).

MicroRNA účastníci se regulace genové exprese, jsou krátké nekódující RNA, které se vážou na cílovou molekulu mRNA, čímž urychlují její degradaci, případně znemožňují translaci proteinů. Následně dochází ke snížení exprese cílového proteinu. Exprese miR-let-7b, jejímž cílem je *GALNT2* (mRNA genu pro GalNAc-T2) byla u

pacientů s IgA nefropatií zvýšená (Serino et al., 2015). V buňkách periferní krve byla u pacientů s IgA nefropatií rovněž pozorována vyšší exprese miR-148b, jejímž cílovým genem je *C1GALT1* (Serino et al., 2012). Navíc bylo zjištěno, že SNP rs1047763-G (1365G) spojovaný s náchylností k IgA nefropatii, usnadňuje vazbu miR-148b do cílové oblasti *C1GALT1* (Pirulli et al., 2009; Serino et al., 2012). I na úrovni epigenetiky tak může docházet ke snížení exprese *C1GalT1*, což má za následek vyšší produkci Gd-IgA1.

## 2.6 Tvorba autoprotilátek proti Gd-IgA1

Dalším zásadním příspěvkem do patogeneze IgA nefropatie je tvorba autoprotilátek interagujících s Gd-IgA1. Hladiny Gd-IgA1 a proti nim specifických autoprotilátek spolu u pacientů s IgA nefropatií korelují (Placzek et al., 2018). Množství autoprotilátek v séru souvisí se závažností (konkrétně s mírou proteinurie) a s progresí onemocnění (Berthoux et al., 2012; Maixnerová et al., 2019). Tyto autoprotilátky jsou třídy IgG, někdy v kombinaci s IgA (Suzuki et al., 2009; Placzek et al., 2018).

Při rutinní imunofluorescenční mikroskopii byla běžně diagnostikována absence IgG v glomerulech pacientů s IgA nefropatií (Bellur et al., 2011; Wada et al., 2013). Při podrobnějším zkoumání však bylo zjištěno, že IgG se nachází v ledvinné tkáni všech testovaných pacientů a ve srovnání s pacienty s membranózní glomerulonefritidou nebo lupusovou nefritidou, u kterých se rovněž IgG v ledvinách nachází, bylo u pacientů s IgA nefropatií IgA obohaceno o frakci specifickou proti Gd-IgA1 (Rizk et al., 2019). Pomocí konfokální mikroskopie bylo v této studii dále zjištěno, že IgA a IgG je v glomerulárních depositech kolokalizováno, je tedy přítomno ve formě imunokomplexů.

Autoprotilátky proti Gd-IgA1 produkované buňkami pacientů s IgA nefropatií se vyznačují specifickou sekvencí aminokyselin v hypervariabilní oblasti 3 („complementarity determining region 3“, CDR3) těžkého řetězce, která zesiluje vazbu na glykany deficientní na galaktózu. Konkrétně ve specifických autoprotilátkách pacientů s IgA nefropatií došlo na 3. pozici v CDR3 k záměně alaninu za serin. Následné experimenty ukázaly, že serin je zde nezbytný pro vazbu na terminální GalNAc v pantové oblasti Gd-IgA1. Tyto autoprotilátky se záměnou aminokyselin jsou selektovány během afinitní maturací v periferních lymfatických uzlinách (Huang et al., 2016; Suzuki et al., 2009).

V současné době víme, že jsou tyto autoprotilátky cílené na pantovou oblast Gd-IgA1 obsahující terminální GalNAc, nicméně stále zbývá určit přesně které glykoformy Gd-IgA1 a jaké konkrétní epitopy vyvolávají jejich tvorbu. Stále rovněž není jednoznačně zodpovězena otázka, zdali autoprotilátky u IgA nefropatie vznikají v odpovědi přímo na Gd-IgA1, případně jestli jsou indukovány některými patogeny nesoucími epitopy mimikující pantovou oblast Gd-IgA1, u kterých by potom mohlo docházet ke zkřížené reaktivitě (Mestecky et al., 2016). Některá mikrobiální agens obsahují na svých površích GalNAc, jedná se např. o virus Epsteina-Barrové, respirační syncytiální virus, herpes simplex virus nebo streptokoky. Mikroby by tedy mohly teoreticky spouštět tvorbu autoprotilátek u IgA nefropatie. Glykanové epitopy však zpravidla navozují tvorbu nízkoafinitních přirozených protilátek třídy IgM, na rozdíl od detekovaných autoprotilátek pacientů s IgA nefropatií, které jsou třídy IgG a prošly somatickou hypermutací (Huang et al., 2016), a proto se teorie o mikrobiální indukci autoprotilátek proti Gd-IgA1 jeví jako málo pravděpodobná. Jakým způsobem však k jejich indukci dochází dosud nebylo objasněno.

## 2.7 Tvorba patogenních imunitních komplexů

Jak již bylo uvedeno, samotná přítomnost Gd-IgA1 v séru k rozvoji IgA nefropatie nestačí, neboť Gd-IgA1 se dá prokázat i u jedinců bez IgA nefropatie. Rovněž autoprotilátky IgG reagující s Gd-IgA1 byly detekovány u nízkého počtu zdravých jedinců (Suzuki et al., 2009). Předpokládá se tedy, že patogenní jsou jimi vytvořené velké imunokomplexy, které se ukládají v ledvinách, kde iniciují zánětlivé reakce. Prvotní analýzy ukázaly, že se Gd-IgA1 nachází převážně ve vysokomolekulárních frakcích séra současně s IgG (Tomana et al., 1997). Následně bylo potvrzeno, že se cirkulující imunitní komplexy u pacientů s IgA nefropatií skládají z polymerního Gd-IgA1, které je vázáno protilátkami IgG specifickými k *O*-glykanům Gd-IgA1 (Tomana et al., 1999). Funkční analýzy imunitních komplexů tvořených Gd-IgA1-IgG potom ukázaly jejich schopnost indukovat proliferaci kultivovaných primárních mezangiálních buněk (Novak et al., 2005).

Když byly vytvořené imunokomplexy Gd-IgA1 s anti-Gd-IgA1 specifickými protilátkami injektovány do imunodeficientních myší, docházelo u nich k ukládání těchto imunokomplexů v ledvinách a k následnému poškození ledvin typickému pro IgA nefropatii s detekovanou proteinurií, hematurií a hypercelularitou mezangia

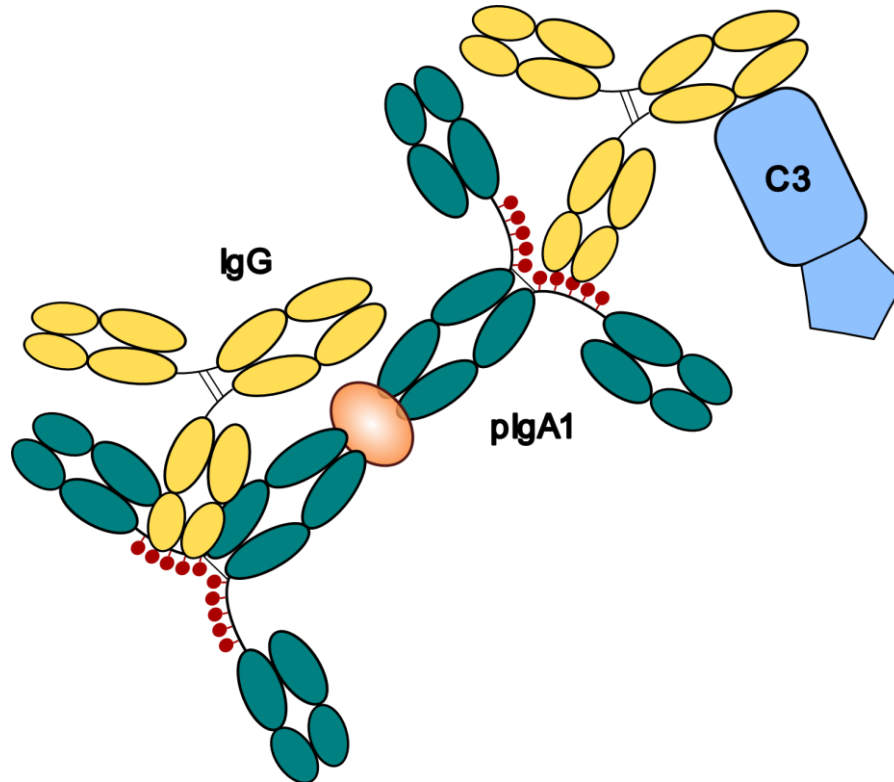


(Moldoveanu et al., 2021). Injekce samotného Gd-IgA1 nebo autoprotilátky poškození nezpůsobilo. Dokládá to tedy důležitost tvorby imunokomplexů tvořených Gd-IgA1-IgG jako pravděpodobně nezbytného zásahu při rozvoji IgA nefropatie.

Ukládání imunitních komplexů obsahujících IgA v glomerulárních kapilárách pokusných myší nastalo téměř ihned po jejich injekci. Nicméně, imunokomplexy usazené v ledvinách byly během 24h odstraněny (Yamaji et al., 2014). Stejně tak při transplantaci ledviny obsahující latentní deposita IgA pacientům, kteří netrpěli IgA nefropatií, docházelo k postupnému vymizení IgA z transplantované ledviny (Sofue et al., 2013). Pro postupný rozvoj IgA nefropatie je tedy pravděpodobně nezbytná kontinuální nebo opakovaná tvorba patogenních imunitních komplexů. I akutní vzplanutí IgA nefropatie vyznačující se makroskopickou hematurií, které se objevuje souběžně s infekcí horních cest dýchacích nebo gastrointestinálního traktu, může být spojeno s přechodnou nadprodukcí imunitních komplexů. Patogeneze IgA nefropatie by mohla tedy souviset s nerovnováhou mezi tvorbou a eliminací patogenních imunokomplexů.

IgA1 v cirkulaci má běžně poměrně krátký poločas rozpadu (~5 dní). Je katabolizováno hepatocyty nesoucími na svém povrchu asialoglykoproteinový receptor (ASGP-R), který váže IgA1 a další glykoproteiny s terminální galaktózou nebo *N*-acetylgalaktosaminem (Stockert et al., 1982; Tomana et al., 1988). Pacienti s IgA nefropatií mají celkově zvýšené hladiny IgA v séru (Maeda et al., 2003). Samotná galaktózová deficiencie Gd-IgA1 by vazbě IgA1 na ASGP-R bránit neměla, pouze v kombinaci s předčasnou a zvýšenou sialylací, která by následnou vazbu již inhibovala. Gd-IgA1 cirkulující v podobě velkých imunitních komplexů však nemůže projít přes endoteliální fenestrace do Disseho prostoru a k hepatocytům se tedy nedostane a nemůže zde být katabolizováno (Wisse et al., 2008; Knoppova et al., 2016).

Velikost a složení imunitních komplexů určuje jejich biologickou aktivitu (Obrázek 6). Velké imunitní komplexy s molekulovou hmotností 800-900 kDa obsahující IgA1 aktivují mezangiální buňky. A navíc vyšší zastoupení Gd-IgA1 v imunitních komplexech ještě zesiluje jejich stimulační efekt, kdy dochází k proliferaci mezangiálních buněk, zvýšené produkci některých cytokinů a komponent extracelulární matrix (Novak et al., 2011b; Novak et al., 2005). Naopak imunitní komplexy s nižší molekulovou hmotností měly na mezangiální buňky inhibiční efekt.



Obrázek 6. **Imunitní komplex.** Možné složení patogenního imunitního komplexu tvořeného polymerním IgA1, dvěma molekulami IgG a složkou komplementu C3. Přibližná molekulová hmotnost znázorněného imunokomplexu je 822 kDa a měl by tedy potenciál stimulovat mezangiální buňky.

Množství patogenních imunitních komplexů tvořených Gd-IgA1-IgG je zvýšené v cirkulaci a v moči u pacientů s IgA nefropatií a toto množství ještě narůstá v období aktivního onemocnění. Imunitní komplexy s Gd-IgA1 vylučované močí mohou představovat i možný biomarker IgA nefropatie (Matoušovic et al., 2006; Suzuki et al., 2016). Co se týče léčebných zásahů naše výsledky dokládají, že prednison může snižovat množství IgA-IgG imunokomplexů v séru u pacientů s IgA nefropatií, a to až na úroveň zdravých jedinců po jednom měsíci jejího trvání. Toto pozorování podporuje význam léčby kortikosteroidy u indikovaných pacientů (Kosztyu et al., 2018, Publikace IV).

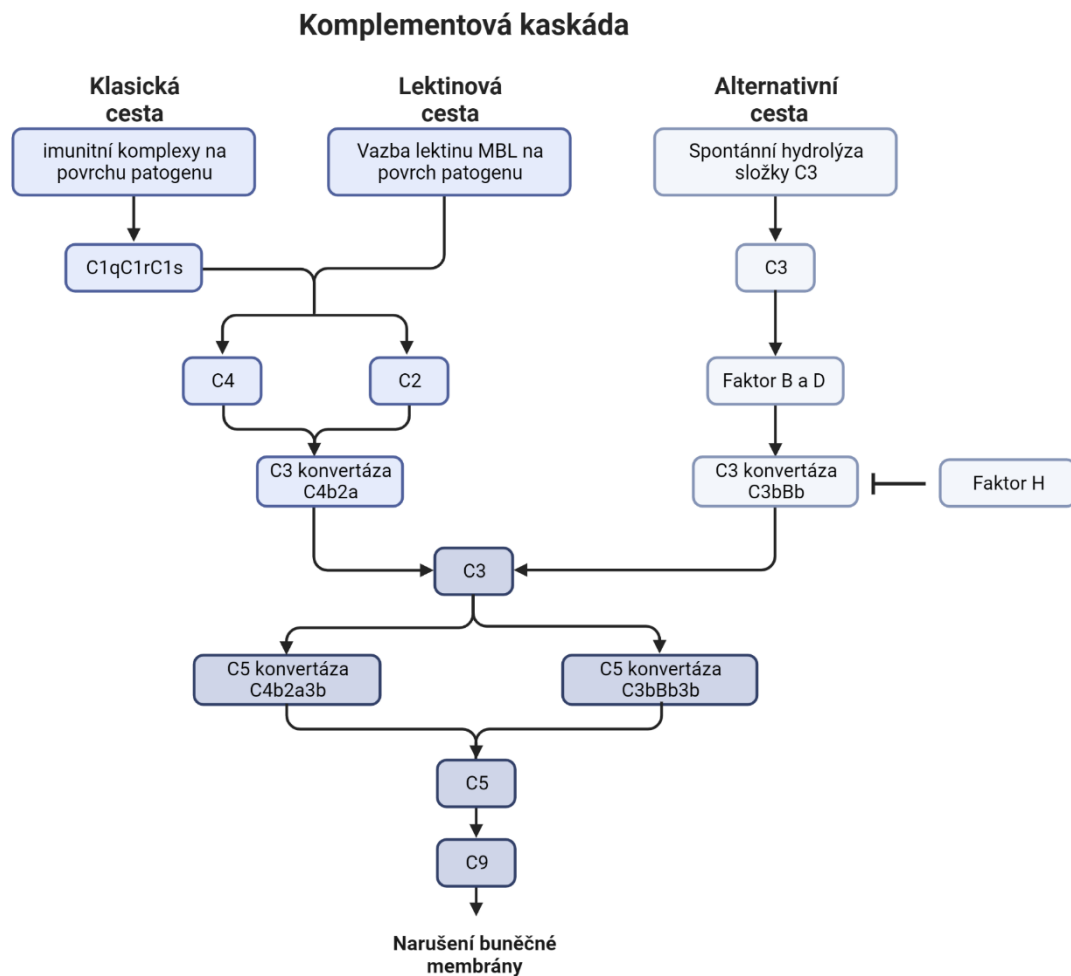
## 2.8 Úloha komplementu v patogenezi IgA nefropatie

V mezangiálních depozitech se u pacientů s IgA nefropatií vyskytuje kolokalizovaně kromě IgA a IgG běžně také složka komplementu C3 (Jennette, 1988; Muda et al., 1995). C3 je detekovatelná i v cirkulujících imunokomplexech obsahujících IgA (Czerkinsky et al., 1986). Zvýšené hladiny proteolytických fragmentů složky C3 v séru u pacientů s IgA nefropatií byly asociovány se závažností histologických nálezů a s progresí onemocnění (Solling, 1984; Wyatt a Julian, 1988; Zwirner et al., 1997). Naopak studie zkoumající posmrtně přítomnost IgA v ledvinách u jedinců bez klinických příznaků onemocnění ukázala, že se u asymptomatických jedinců složka C3 jako kodepositum IgA téměř nenachází (Varis et al., 1993).

Aktivace komplementové kaskády se běžně děje třemi způsoby (Obrázek 7). Klasická cesta je aktivována vazbou složky C1 na imunitní komplexy obsahující IgG (IgG1 a IgG3, s menší afinitou IgG2) nebo IgM navázané na povrchu patogena. Aktivovaná C1 štěpí další složky a vytváří se C3 konvertáza. Alternativní cesta je zahájena spontánní hydrolýzou složky C3. Za účasti faktoru D se tvoří komplex C3bBb, který slouží jako alternativní C3 konvertáza štěpící velké množství C3 na C3a a C3b. Properdin slouží k její stabilizaci. Faktor H, Faktor I a DAF („decay accelerating factor“) inhibují tvorbu alternativní C3 konvertázy a regulují tak samovolnou aktivaci komplementové kaskády na buněčných površích hostitele. Poslední, lektinová cesta aktivace komplementu je iniciována přímou vazbou sérového lektinu MBL („mannose-binding lectin“), případně ficolinu na sacharidové struktury povrchů některých mikrobů bez účasti protilátek. MBL má podobnou funkci jako C1, štěpí C2 a C4 za tvorby C3 konvertázy klasické cesty (C4bC2a).

Vytvořením C3 konvertázy se tyto tři cesty aktivace komplementu scházejí. Připojením složky C3b na C3 konvertázu je vytvořena C5 konvertáza. Fragment C5b vytvořený působením C5 konvertázy na sebe váže složky C6, C7, C8 a C9, které vytvoří v membráně atakované buňky póry (C5b-9), naruší membránu a tím osmotickou rovnováhu buňky a může dojít až k její lýze (Murphy a Weaver, 2017).

Jaderné buňky hostitele většinou nebývají komplementem lyzovány, ale i tak je může komplement poškozovat. Například na podocytech v ledvinách dochází působením C5b-9 k uvolnění různých proteáz, oxidantů, prostanoidů, komponent extracelulární matrix a cytokinů. Kromě toho dochází také ke změnám cytoskeletu



Obrázek 7. **Komplementová kaskáda.** Schéma zobrazuje tři způsoby aktivace komplementové kaskády, tvoří se C3 konvertáza a následně C5 konvertáza. Komplementová kaskáda končí vytvořením póru v membráně atakované buňky složkami C5b-C9. Faktor H inhibuje tvorbu C3 konvertázy, a tím blokuje průběh komplementové kaskády aktivované alternativní dráhou. (Schéma bylo vytvořeno v programu BioRender.)

podocytů a jejich uvolňování z bazální membrány s následně se rozvíjející proteinurii (Nangaku et al., 2005). V mezangiálních buňkách dochází působením C5b-9 k indukci produkce cytokinů IL-6 a TGF- $\beta$ , popř. přímo k apoptóze vyvolané vnitřní dráhou (Qiu et al., 2014; Zhang et al., 2014). Složky C5b-9 bývají detekovány v mezangiálních depositech pacientů s IgA nefropatií (Rauterberg et al., 1987).

Vzhledem k tomu, že v ledvinách u pacientů s IgA nefropatií je často kromě složky C3 detekován také Faktor H a properdin, usuzuje se, že je komplement při IgA nefropatii aktivován zejména alternativní cestou (Tomino et al., 1981; Miyazaki et al., 1984; Rauterberg et al., 1987). Bylo popsáno, že polymerní IgA1 je schopné aktivovat

alternativní dráhu komplementu (Hiemstra et al., 1987), nicméně mechanismus tohoto procesu není zcela objasněn. Předpokládá se, že dochází jeho přítomností ke stabilizaci C3 konvertázy (Daha et al., 2011).

Polymerní IgA může aktivovat komplement také lektinovou cestou (Roos et al., 2001). Polymerní IgA váže MBL *in vitro* pravděpodobně skrze *N*-glykany. MBL byl detekován v glomerulárních depositech v kolokalizaci s IgA téměř u jedné čtvrtiny pacientů s IgA nefropatií a jeho přítomnost korelovala se závažností onemocnění (Endo et al., 1998; Matsuda et al., 1998; Roos et al., 2006). Klasická cesta aktivace komplementu se v patogenezi IgA nefropatie spíše neuplatňuje. Její komponenty byly detekovány v bioptických nálezech u méně než 10% pacientů a souvisely se špatnou prognózou onemocnění (Lee et al., 2013). Aktivace komplementu klasickou cestou tedy nebude nejspíš specifická pro IgA nefropatii, ale vyskytuje se souvislosti s těžkým poškozením ledvin.

GWAS studie identifikovaly protektivní SNP v genech *CFHRI/3* („complement factor H-related genes“), jež má za následek inaktivaci těchto genů. SNP v jedné alele snižuje riziko rozvoje IgA nefropatie o 26 % a v obou alelách dokonce o 45 % (Kiryluk et al., 2014). Inaktivace těchto genů souvisí s vyšší hladinou Faktoru H v séru a nižší hladinou složky C3a a stejně tak s nižší mírou ukládání C3 v mezangiu ledvin (Zhu et al., 2015). Výskyt tohoto polymorfismu se liší geograficky, nejčastější frekvence byla detekována u jedinců afrického původu (55% v Nigérii) a nejnižší v Jižní Americe a ve východní Asii (Holmes et al., 2013), což se do jisté míry shoduje s geografickou prevalencí IgA nefropatie. Hypotetický mechanismus protektivní delece *CFHRI/3* u IgA nefropatie spočívá v související zvýšené koncentraci regulačního Faktoru H a absenci kompetice *CFHRI* s Faktorem H, jež zvyšuje jeho funkční aktivitu (Ansari et al., 2013; Tortajada et al., 2013). Vzhledem k tomu, že Faktor H působí jako inhibitor tvorby alternativní C3 konverzázy, podporují tato pozorování zapojení alternativní cesty aktivace komplementu v patogenezi IgA nefropatie.

Zdali dochází k aktivaci komplementu již v cirkulaci na imunitních komplexech nebo *in situ* v glomerulárním mezangiu nebylo doposud zcela objasněno. Zvýšené hladiny štěpných produktů složky C3 v séru u pacientů s IgA nefropatií naznačují, že by imunitní komplexy tvořené Gd-IgA1-IgG mohly sloužit přímo jako aktivační povrch komplementové kaskády (Wyatt a Julian, 1988). Na druhou stranu, mezangiální buňky se samy o sobě účastní regulace komplementu. Produkují totiž

Faktor H a v zánětlivém prostředí vyvolaném působením cytokinů IL-1 nebo TNF $\alpha$  zvyšují produkci složky C3 (van den Dobbelen et al., 1994; Wan et al., 2007). Navíc bylo pozorováno, že polymerní Gd-IgA1 stimuluje mezangiální buňky k sekreci C3 (Schmitt et al., 2014), což zase svědčí ve prospěch aktivace komplementu lokálně v glomerulu. Aktivace komplementu má důležitou roli v patogenezi a klinické prezentaci IgA nefropatie.

## 2.9 Poškození funkce ledvin

Mezangiální buňky se nachází v glomerulu ledvin a jsou nezbytné pro jeho správnou funkci. Vytváří strukturní podporu kapilárních smyček, modulují glomerulární filtraci, tvoří mezangiální matrix, mají schopnost fagocytovat, monitorují koncentraci glukózy v lumen kapilár a vylučují růstové faktory a cytokiny. Změny ve fyziologii mezangiálních buněk jsou časnou událostí při progresivním glomerulárním poškození vedoucímu ke ztrátě funkce ledvin.

Aktivace mezangiálních buněk se projevuje jejich proliferací a uvolněním mnoha prozánětlivých a profibrotických mediátorů, mezi které patří TNF- $\alpha$ , destičkový aktivační faktor (PAF), IL-1 $\beta$ , IL-6, destičkový růstový faktor (PDGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), TGF- $\beta$  a různé chemokiny (Coletta et al., 2000; Abboud, 2012). Uvolněné mediátory přitahují infiltrující makrofágy, monocyty a T lymfocyty, které mají důležitou roli v iniciaci a udržování zánětlivého prostředí vedoucímu ke glomerulárnímu poškození. Vylučované růstové faktory a prozánětlivé cytokiny narušují rovnováhu mezi produkcí a degradací mezangiální matrix a dochází k její akumulaci (Gomez-Guerrero et al., 2005). Mezangiální buňky mohou být aktivované cirkulujícími imunitními komplexy s vysokou molekulovou hmotností, které se na ně vážou skrze receptor pro transferin (CD71) a spouštějí v nich signální dráhy MAPK/ERK a PI3K/Akt, z nichž dráha PI3K/Akt vede k jejich proliferaci a dráha MAPK/ERK stimuluje produkci cytokinů včetně IL-6 (van den Dobbelen et al., 1994; Tamouza et al., 2012). IL-6 je silným aktivátorem mezangiálních buněk a působí i jako jejich autokrinní růstový faktor. Zvýšené hladiny IL-6 pozorované v séru, moči i ledvinách u pacientů s IgA nefropatií mohou být spolu s dalšími faktory zodpovědné za patologickou proliferaci mezangiálních buněk (toto téma a celkově vliv interleukinu-6 na rozvoj IgA nefropatie je podrobně shrnut v Publikaci II; Groza et al., 2022).

Podocyty jsou epiteliální buňky nacházející se na vnější straně membrány glomerulárních kapilár, kde zajišťují specifitu filtrační bariery. Tubulární epiteliální buňky tvoří výstelku ledvinných tubulů, umožňují reabsorpci vody a některých látek z glomerulárního filtrátu. Na podocyty a tubulární epiteliální buňky se polymerní Gd-IgA1 přímo neváže (Chan et al., 2005; Lai et al., 2008). Nicméně *in vitro* experimenty ukázaly, že faktory uvolňované stimulovanými mezangiálními buňkami, zejména TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  a angiotenzin II, aktivují podocyty a mění následně glomerulární permeabilitu (Lai et al., 2009). TNF- $\alpha$  uvolněný z mezangiálních buněk aktivuje podocyty k jeho další produkci a dochází k autokrinní stimulaci podocytů. U pacientů s IgA nefropatií byla na podocytech pozorována zvýšená exprese receptorů pro TNF- $\alpha$ : TNFR1 a TNFR2. Po aktivaci TNFR na podocytech může docházet ke zvýšení jejich produkce IL-6 nebo až k indukci apoptózy (Lai et al., 2008).

Faktory uvolňované stimulovanými mezangiálními buňkami ovlivňují i tubulární epiteliální buňky. IL-6 reguluje expresi receptoru pro angiotenzin II (AGTR1) na tubulárních epiteliálních buňkách. Interakce angiotenzinu II a AGTR1 aktivuje proteinkinasu C a dráhu MAPK, což vede k zánětlivé odpovědi v tubulointersticiu. Dochází k proliferaci tubulárních epiteliálních buněk a také expresi zánětlivých mediátorů včetně IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  a angiotensinu II (Chan et al., 2005). Angiotenzin II má zásadní roli jako mediátor glomerulární hemodynamické adaptace v renin-angiotenzinovém systému. Aldosteron uvolňovaný z mezangiálních buněk stimulovaných imunitními komplexy působí synergicky s angiotenzinem II indukci apoptózy v tubulárních epiteliálních buňkách (Leung et al., 2011). Mezangiální buňky, podocyty a tubulární epiteliální buňky spolu komunikují skrze uvolňované mediátory, a dochází k aktivaci zpětných vazeb pozitivních i negativních. Narušení rovnováhy v této komunikaci patogenními imunitními komplexy obsahujícími Gd-IgA1 vede k rozvoji zánětu a poškození funkce ledvin.

### 3 Experimentální přístupy k terapii IgA nefropatie

Manifestace onemocnění IgA nefropatie se různí jak mezi jedinci, tak i mezi různými etniky, což komplikuje navržení univerzálního protokolu pro léčbu. Standardní léčba blokátory RAS v některých případech nedokáže efektivně snížit proteinurii a následná léčba kortikosteroidy u těchto pacientů s sebou zase nese řadu nepříjemných vedlejších účinků. Nové poznatky o molekulární podstatě patogeneze IgA nefropatie umožnily navrhnout přístupy k cílené léčbě, která se zatím nepoužívá v běžné klinické praxi, ale v některých případech již prošla počátečními fázemi klinického testování (Tabulka 1).

#### 3.1 Inhibice tvorby protilátek

Vzhledem k tomu, že tvorba protilátek třídy IgA je nezbytným krokem v patogenezi IgA nefropatie, je jedním ze směrů cílené léčby potlačení produkce protilátek B lymfocyty. Ideální by bylo potlačení produkce přímo Gd-IgA1, případně autoprotilátek anti-Gd-IgA1. Rituximab, chimérická monoklonální protilátka proti povrchovému markeru CD20, se používá k eliminaci B lymfocytů u některých typů malignit a autoimunitních onemocnění a byla zkušebně použita i pro léčbu IgA nefropatie. Zatímco u některých kazuistik byl pozorován pozitivní efekt rituximabu (Chanchaoentana et al., 2017; Lundberg et al., 2017), studie provedená na 34 pacientech nepotvrdila jeho vliv na míru proteinurie ani glomerulární filtraci (Lafayette et al., 2017). Navíc, přestože došlo k účinné eliminaci B lymfocytů, hladiny Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 autoprotilátek v séru u pacientů léčených rituximabem neklesaly. Již vytvořené aktivní plazmatické buňky, které ztrácí povrchovou expresi CD20, rituximabem pravděpodobně eliminovány nebyly. Zajímavé ale je, že u jiných onemocněních souvisejících s tvorbou autoprotilátek jako je např. revmatoidní artritida nebo membranózní glomerulonefritidu rituximab účinný v jejich eliminaci je (Gauckler et al., 2021). Rozdíl v účinku rituximabu u těchto onemocnění a IgA nefropatii je dáván do souvislosti se zapojením slizničního imunitního systému v patogenezi IgA nefropatie (Lafayette et al., 2017). Pro zacílení i na dlouho žijící plazmatické buňky bylo navrženo použití monoklonálních protilátek proti povrchovému glykoproteinu CD38, které je v současné době ve druhé fázi klinického testování (číslo studie NCT05065970).

Na zásah do aktivace, diferenciaci a proliferaci B lymfocytů a případně i do izotypového přesmyku na IgA je cíleno použitím inhibitorů APRIL a BAFF.



Pozorovaná zvýšená exprese těchto signálních molekul u pacientů s IgA nefropatií a její souvislost se zvýšenými hladinami Gd-IgA1 a závažností onemocnění předurčuje APRIL a BAFF jako jeden z cílů terapie (Li et al., 2014; Zhai et al., 2016; Takahara et al., 2019). Pomocí působení humanizovaných monoklonálních protilátek proti APRIL bylo dosaženo snížení hladin Gd-IgA1, IgA, IgG a IgM v séru u pacientů s IgA nefropatií a následně i ke snížení proteinurie po 12 týdnech léčby (Barratt et al., 2021a; Mathur et al., 2022). Blisibimod inhibující BAFF byl rovněž testován v klinické studii II. a III. fáze, její výsledky však ještě nebyly publikovány (NCT02062684). Zásah do signalizace APRIL a BAFF je možné provést současně pomocí fúzního proteinu tvořeného vazebnou doménou jejich společného receptoru TACI a Fc fragmentem IgG. V současné době probíhají klinické testy II. fáze. Průběžné výsledky na nízkém počtu pacientů ukazují snížení hladin Gd-IgA1 v séru a snížení proteinurie po 24týdenní léčbě (Barratt et al., 2020).

### 3.2 Ovlivnění slizničního imunitního systému

Na základě poznatků, které naznačují, že zdrojem Gd-IgA1 jsou B lymfocyty aktivované ve slizničním imunitním systému, byla navržena lokální terapie kortikoidy uvolňujícími se v tenkém střevě. Jedná se o orálně podávaná léčiva obsahující budesonid, glukokortikoid se silným protizánětlivým účinkem. Tato léčiva jsou speciálně upravena, tak aby se účinná látka uvolňovala až v tenkém střevě, především v oblasti ileocekálního přechodu, v němž se nacházejí Peyeroovy pláty. Ze střeva je budesonid vstřebáván játry, kde je z převážné většiny metabolizován cytochromem P450, neměl by se tak dostávat do systému a způsobovat nežádoucí účinky typické pro léčbu běžně podávanými kortikosteroidy. Tyto léky jsou také používány pro terapii Crohnovy choroby. Klinické studie pro léčivo Nefecon ukázaly pozitivní vliv na míru proteinurie a funkce ledvin s přetrvávajícím účinkem (Barratt et al., 2021b), a proto na konci roku 2021 FDA ve zrychleném řízení schválila použití léku Nefecon (TARPEYO) pro pacienty s IgA nefropatií s rizikem rychlé progresy onemocnění. Jiným testovaným typem léčby mířeným na optimalizaci slizničního imunitního systému je snaha o regulaci střevního mikrobiomu.

### 3.3 Protizánětlivá léčba

Pro léčbu IgA nefropatie by mohly být účinné látky specificky inhibující rozvoj zánětu ideálně přímo v ledvinách. Pozornost byla zaměřena na cytosolickou protein-kinasu SYK, u které bylo v *in vitro* experimentech prokázáno, že po její inhibici v buněčné kultuře mezangiálních buněk aktivovaných imunokomplexy s IgA1, docházelo ke snížení exprese IL-6 a k inhibici proliferace (Kim et al., 2012). Inhibice SYK také tlumila zánětlivé reakce aktivovaných tubulárních epiteliálních buněk skrze dráhu NF- $\kappa$ B (Yiu et al., 2021). Klinická studie hodnotící vliv léčby fosfatinibem (inhibitorem SYK) prokázala relativní bezpečnost léčby a mírný vliv na míru proteinurie u pacientů s IgA nefropatií (Tam et al., 2019).

Signální dráha NF- $\kappa$ B je úzce spjata s iniciací zánětlivé reakce, její aktivace zprostředkovává transkripci zánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- $\alpha$ , IL-1 a IL-6 a rovněž zprostředkovává zánětlivé funkce Th17 buněk. Neklasická dráha NF- $\kappa$ B je aktivována při indukci izotypového přesmyku na IgA. V mezangiálních buňkách indukuje NF- $\kappa$ B expresi chemokinů MCP-1 a IL-8 (Zhang a Sun, 2015). V klinické studii PHOENIX (NCT03366337) bylo za účelem blokády dráhy NF- $\kappa$ B testováno léčivo bardoxolone methyl. Tato studie dokládá na oficiálních webových stránkách „clinicaltrials.gov“ dobrou snášenlivost přípravku a zlepšení funkce ledvin po 12týdenní léčbě u pacientů s IgA nefropatií, výsledky však zatím nebyly publikovány v odborném recenzovaném periodiku.

Jako potenciální imunomodulační látka bylo testováno pro léčbu IgA nefropatie antimalarikum hydroxychlorochin. Jeho specifita pro IgA nefropatii spočívá v tom, že inhibuje signalizaci skrze TLR9, jehož exprese může být u pacientů zvýšená (Li et al., 2014). Aktivace TLR9 indukuje produkci IL-6 a APRIL, které následně ovlivňují sekreci Gd-IgA1 (Makita et al., 2020). Z klinických studií vyplývá, že hydrochlorochin snižuje proteinurii u pacientů s IgA nefropatií, jeho účinek je ale ve srovnání s léčbou kortikosteroidy nižší. Jeho výhodou by mohly být méně závažné vedlejší účinky (Stefan a Mircescu, 2021).

**Tabulka 1.** Klinické studie cílených léčiv pro IgA nefropatii.

<b>Léčivo</b>	<b>Cíl léčby</b>	<b>Fáze</b>	<b>Číslo klinické studie</b>
Rituximab	Monoklonální protilátka proti CD20 (B lymfocyty)	IV.	NCT04525729
Felzartamab	Monoklonální protilátka proti CD38 (plazmablasty a plazmatické buňky)	II.	NCT05065970
Blisibimod	Monoklonální protilátka proti BAFF	II./III.	NCT02062684
Sibeprenlimab (VIS649)	Monoklonální protilátka proti APRIL	II. a III.	NCT04287985 NCT05248659 NCT05248646
Atacicept	Fuzní protein vazebné domény receptoru TACI s Fc fragmentem IgG – inhibitor APRIL a BAFF	II.	NCT04716231
Telitacicept (RC18)	Fuzní protein vazebné domény receptoru TACI s Fc fragmentem IgG – inhibitor APRIL a BAFF	II.	NCT04905212
Nefecon	Budesonid lokálně uvolňovaný v tenkém střevu	II. a III.	NCT01738035 NCT03643965
Fosfamatiniib	Inhibitor SYK	II.	NCT02112838
Bardoxolone methyl	Inhibitor signální dráhy NF-κB	II.	NCT03366337
Hydroxychlorochin	Inhibice signální dráhy TLR9	II.	NCT02942381
LNP023 (Iptacopan)	Inhibitor faktoru B	II. a III.	NCT03373461 NCT04578834 NCT04557462
IONIS-FB-LRx	Inhibitor faktoru B	II.	NCT04014335
BCX9930	Inhibitor faktoru D	II.	NCT05162066
APL-2	Inhibitor štěpení komponenty komplementové kaskády C3	II.	NCT03453619
Narsoplimab (OMS721)	Monoklonální protilátka proti MASP-2	II.	NCT02682407
Ravulizumab	Monoklonální protilátka proti komponentě komplementu C5	II.	NCT04564339
Cemdisiran	siRNA interferující s mRNA komponenty komplementu C5 navázaná na GalNAc	II.	NCT03841448
Avacopan (CCX168)	Inhibitor receptoru pro C5a	II.	NCT02384317

### 3.4 Zásah do komplementové kaskády

V současné době jsou intenzivně testovány různé způsoby ovlivnění průběhu komplementové kaskády u pacientů s IgA nefropatií (Tabulka 1). Pro zacílení na alternativní dráhu aktivace komplementu byly testovány inhibitory faktoru B LNP023 a IONIS-FB-LRx. Podjednotka Faktoru B je komponentou alternativní C3 konvertázy (Obrázek 7). Faktor B je štěpen za účasti Faktoru D, na který cílí látka BCX9930 v současné době rovněž testovaná pro léčbu IgA nefropatie. Dále probíhají klinické testy látky APL-2 blokující štěpení C3 na podjednotky C3a a C3b. Ve třetí fázi klinických studií pro léčbu IgA nefropatie je monoklonální protilátka narsoplimab, která blokuje MASP-2 a inhibuje tak lektinovou cestu aktivace komplementu. K inhibici pozdější fáze komplementové kaskády jsou testovány inhibitory C5 ve formě monoklonální protilátky ravulizumab anebo v podobě krátké interferující RNA (siRNA) inhibující produkci C5 v játrech (Huang a Xu, 2021).

### 3.5 Terapie budoucnosti

V současné době jsme schopni detekovat v periferní krvi buňky nesoucí na svém povrchu Gd-IgA1 (Zachová et al., 2022; Publikace III), zatím ovšem není potvrzeno, jsou-li tyto buňky přímo zodpovědné za sekreci Gd-IgA1, případně jakým způsobem je řízena jejich diferenciaci na plazmatické buňky produkující Gd-IgA1. Potenciální eliminace buněk zodpovědných za sekreci Gd-IgA1 by mohla být slibnou terapií budoucnosti. Vzhledem k jejich minoritnímu zastoupení by nemuselo při jejich eradikaci hrozit pacientům navození jakékoli imunodeficience.

Experimentální léčba by mohla cílit i na IL-6, jehož abnormální signalizace v buněčných liniích od pacientů s IgA nefropatií ovlivňuje expresi glykosyltransferáz a zesiluje tak tvorbu Gd-IgA1 (Yamada et al., 2017). Selektivní inhibice signální dráhy Jak-Stat, skrze kterou je v buňce veden přenos signálu z receptoru pro IL-6, by mohla být vhodným typem kauzální léčby IgA nefropatie.

Také zamezení tvorby imunokomplexů větších než 800 kDa, které aktivují mezangiální buňky, by mohlo specificky zasáhnout do procesu patogeneze IgA nefropatie. Pomocí molekul interagujících s Gd-IgA1, popř. s autoprotiilátkami anti-Gd-IgA1, by se narušil poměr mezi antigenem a autoprotiilátkami, výsledné komplexy by měly menší molekulovou hmotnost a ztratily by tak schopnost stimulovat

mezangiální buňky (Novak et al., 2005; Knoppova et al., 2016). Molekulou inhibující tvorbu velkých imunokomplexů by mohl být analog pantové oblasti Gd-IgA1, malý glykopeptid, který by interagoval s vazebným místem anti-Gd-IgA1 autoprotilátky. Tento peptid byl již laboratorně připraven pomocí rekombinantních technologií v *E.coli* s následnou glykosylací *in vitro* (Kasperova et al., 2013). Nicméně i u tohoto přístupu by bylo vhodné znát přesnou strukturu pantové oblasti Gd-IgA1 a tu napodobit.

Další prohloubení znalostí o molekulární podstatě patogeneze IgA nefropatie přináší nové možnosti v její léčbě. Po ověření účinnosti experimentálních léčebných přístupů na zvířecích modelech by se mohly dostat i do klinických studií a jednou snad doplní nebo nahradí současnou nespecifickou léčbu IgA nefropatie.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### CÍLE PRÁCE

- 1) Analyzovat rozdíl v expresi vybraných glykosyltransferáz v mononukleárních buňkách z periferní krve od pacientů s IgA nefropatií a zdravých dárců.
- 2) Zhodnotit vliv působení IL-6 na expresi vybraných glykosyltransferáz v mononukleárních buňkách z periferní krve.
- 3) Ověřit vliv změny exprese vybraných glykosyltransferáz na tvorbu Gd-IgA1.
- 4) Stanovit expresi glykosyltransferáz v jednotlivých buněčných subpopulacích mononukleárních buněk z periferní krve.

## 4 Analýza exprese vybraných glykosyltransferáz v mononukleárních buňkách z periferní krve a jejich stimulace IL-6

### 4.1 Metodika

#### 4.1.1 Soubor analyzovaných vzorků

Vzorky periferní krve byly odebrány 16-ti pacientům s IgA nefropatií na oddělení Nefrologie III. Interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a 15-ti zdravým dárcům na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Účastníci studie podepsali informovaný souhlas s odběrem vzorku. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc. Charakteristika kohorty pacientů a zdravých dárců je uvedena v Tabulce 2. Krev byla odebírána do odběrových zkumavek Vacuette s EDTA.

**Tabulka 2.** Charakteristika kohorty pacientů a zdravých dárců.

Charakteristika	IgAN	HC
Celkový počet jedinců	16	15
Počet žen	4	4
Věk	50,9 ± 18,54	ND
Krevní tlak (ST/DT, průměrné hodnoty) (mmHg)	129/76	ND
Progrese onemocnění (počet jedinců)	3	ND
eGFR (ml/s na 1.73 m <sup>2</sup> )	0,93 ± 0,47	ND
Proteinurie (g/den)	0,8 ± 0,8	ND
Poměr albumin/kreatinin v moči (mg/mmol)	59,9 ± 64,0	ND
Hematurie (Ery/μL)	75,9 ± 194,0	ND
Léčba RAS blokátory (počet jedinců)	16	0
Léčba glukokortikoidy (počet jedinců)	8	0

(Progrese onemocnění byla definována jako pokles eGFR >10 %/rok. Pro terapii glukokortikoidy byl použit prednison nebo methylprednisolon. Vybrané hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnot ± SD. IgAN, pacienti s IgA nefropatií; HC zdraví dárce, ND, neuvedeno; ST, systolický tlak; DT, diastolický tlak; eGFR, odhadovaná rychlost glomerulární filtrace; Ery, erytrocyty.)

#### 4.1.2 Izolace mononukleárních buněk z periferní krve

5 ml nesrážlivé krve bylo naředěno ve fosfátovém pufru PBS (BioSera) v poměru 1:1. Neředěná krev byla nanesena na vrstvu hustotního gradientu 1.077 g/m Ficoll-Paque PLUS (Cytiva) a centrifugována na 400 g, 40 min, při laboratorní teplotě. Prsteneček s koncentrovanými mononukleárními buňkami byl přenesen do čisté zkumavky, buňky byly promyty PBS a centrifugovány na 200 g, 20 min, při laboratorní teplotě.  $5 \times 10^5$  buněk bylo promyto v 1% fetálním bovinním séru (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific) v PBS, stočeno na 300 g, 5 min. Peleta byla resuspendována ve 300  $\mu$ l lyzačního pufru RLT (Qiagen) a zamražena na  $-80^{\circ}\text{C}$  pro pozdější použití.

#### 4.1.3 Stimulace mononukleárních buněk IL-6

Izolované mononukleární buňky byly resuspendovány v kultivačním médiu o složení 1% roztok penicilin-streptomycinu (BioSera), 10% FBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific) v RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Merck) na koncentraci  $1 \times 10^6$  buněk/ml. Do kultivačního média byl přidán roztok IL-6 (Gibco) o výsledné koncentraci 10 ng/ml. Buněčné kultury byly kultivovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při  $37^{\circ}\text{C}$  v atmosféře vzduchu s 5%  $\text{CO}_2$  po dobu 7 dnů. Poté byly buňky stočeny a peleta resuspendována v lyzačním pufru RLT a zamražena pro pozdější použití.

#### 4.1.4 Analýza exprese genů pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)

RNA byla izolována pomocí kitu RNeasy 96 Kit (Qiagen) za použití vakuové vývěvy QIAvac 96 dle manuálu výrobce. Zachycená RNA byla eluována do 90  $\mu$ l „RNase-free“ vody. Koncentrace a integrita RNA byla stanovena spektrofotometricky na přístroji Synergy HTX (BioTek). Genomická DNA byla odstraněna DNase a čistá RNA byla přepsána do cDNA pomocí kitu SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific). Složení reakce je uvedeno v Tabulce 3, cyklus reverzní transkripce je definován v Tabulce 4.



**Tabulka 3.** Odstranění genomické DNA a reverzní transkripce.

Složka	množství
10x ezDNase pufr	0,5 µl
Enzym ezDNase	0,5 µl
RNA	50 ng
RNase-free H <sub>2</sub> O	do celk. obj. 10 µl
inkubace 37 °C 2 min, následně zchlazení na ledu	
SuperScript IV VILO Master Mix	2 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	3 µl

**Tabulka 4.** Průběh reverzní transkripce

krok	teplota	čas
Annealing primerů a oligo(dT)	25 °C	10 min
Reverzní transkripce	50 °C	10 min
Inaktivace enzymů	85 °C	5 min

Analýza exprese vybraných genů, tj. hladina mRNA, byla stanovena kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR) za použití kitu gb SG PCR Master Mix (Generi Biotech) na přístroji LightCycler 480 instrument (Roche). Seznam stanovovaných genů a použitých primerů je uveden v Tabulce 5. Složení reakce a amplifikační cyklus je uveden v Tabulce 6 a Tabulce 7.

Vzorky byly analyzovány v duplikátech. Byly analyzovány křivky tání ampliconů jednotlivých genů a velikost produktu genu *GALNT14* byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy (Přílohy 3 a 4). Rovněž bylo ověřeno účinné odstranění gDNA, ve vzorcích s nepřešpanou RNA nedocházelo k amplifikaci produktů. Relativní exprese genů byla vztažena na expresi housekeepingového genu *GAPDH* ve vzorku, a byla srovnávána s průměrnou hladinou exprese vzorků zdravých jedinců. Relativní exprese byla vyjádřena pomocí metody  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak a Schmittgen, 2001). Byla ověřena účinnost amplifikace primerů (Příloha 4). Pro statistickou analýzu rozdílů v genové expresi byl použit neparametrický Mann-Whitney test, příp. pro větší počet skupin Kruskalův-Wallisův test s Dunnovým post-hoc testem. Data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 8 software.

**Tabulka 5.** Seznam analyzovaných genů a použité primery pro jejich kvantifikaci.

<b>Gen</b>	<b>Primer přímý 5'-3'</b>	<b>Primer zpětný 3'-5'</b>
<i>GALNT2</i>	GAACAGATCGAGGGCAACTC	TCGCGGAAAGTTTAAGAAACA
<i>GALNT14</i>	TATTAAACCGCACCCCTAC	CCAGTCCCTGTTCACCTCAC
<i>C1GALT1</i>	TGGGAGAAAAGGTTGACACC	GGCCCAAGTAGCTTTGACG
<i>C1GALT1C1</i>	CTGTCCCCAAGCCGTTCTA	CATGCGCTCATCCTCTGAAAT
<i>ST6GALNAC2</i>	ACCAGAAGCCTCTGCCAGTA	ATGGCTTCATTTTTTCGTTCG
<i>GAPDH</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGGATCTCG

**Tabulka 6.** Složení reakční směsi qPCR

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
10 mM primer přímý	0,25 ul
10 mM primer zpětný	0,25 ul
gb SG PCR Master Mix	5 ul
cDNA	2,5 ng
ddH <sub>2</sub> O	do celk. obj. 10 µl

**Tabulka 7.** Průběh qPCR

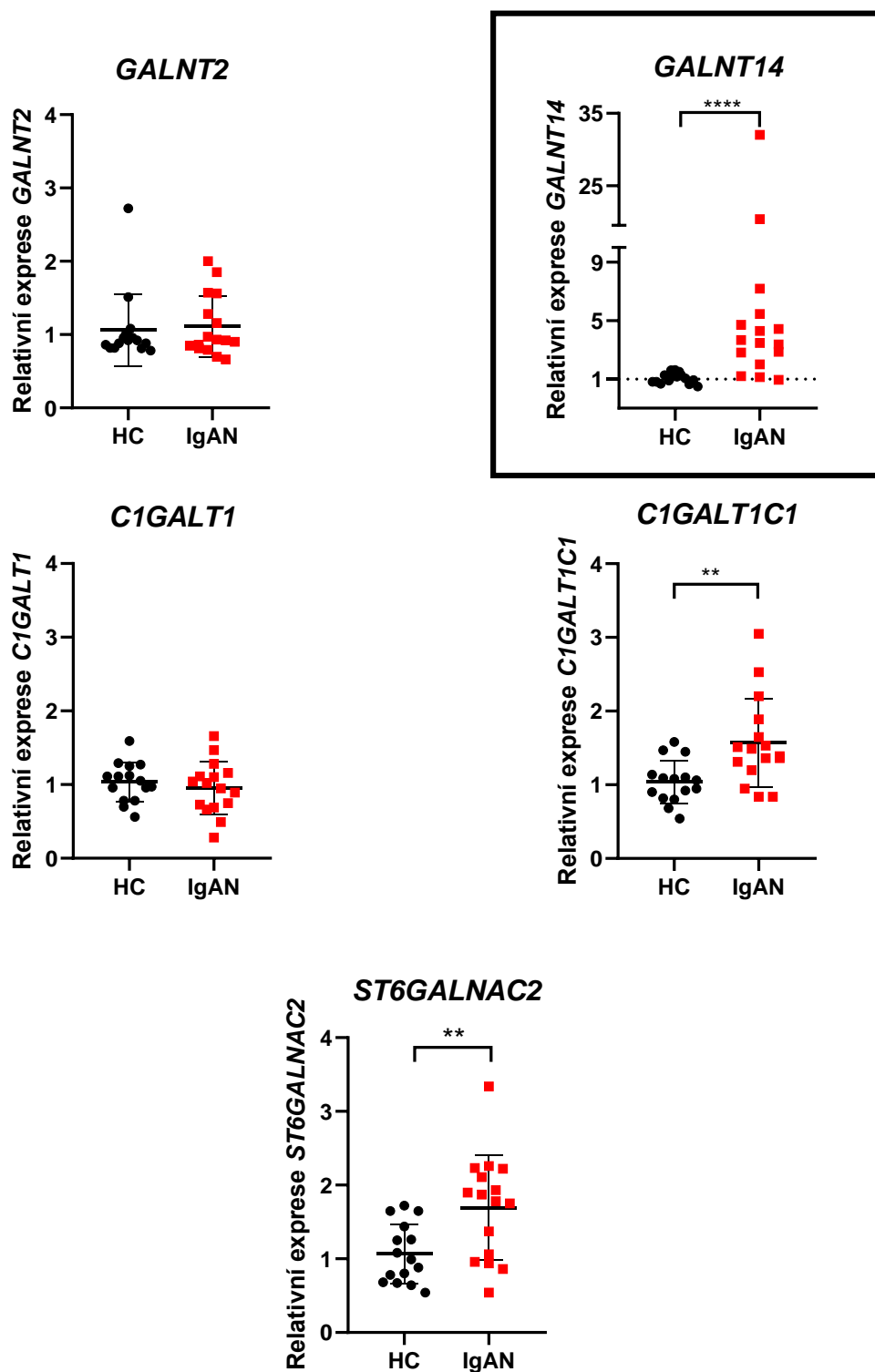
<b>krok</b>	<b>teplota</b>	<b>čas</b>
1. počáteční denaturace	95 °C	5 min
2. denaturace	95 °C	10 s
3. annealing primerů	58 °C	20 s
4. elongace	72 °C	30 s
Kroky 2–4 byly opakovány 40x.		

## 4.2 Výsledky

Nejvýraznější změny v hladinách mRNA vykazovala *GALNT14* (Obrázek 8), jejíž průměrná hodnota exprese byla 6x vyšší u pacientů s IgA nefropatií než u kontrol ( $p < 0,0001$ ). Téměř dvojnásobně zvýšenou expresi vykazovala *ST6GALNAC2* ( $p = 0,0018$ ). Graficky zobrazené výsledky pro expresi *ST6GALNAC2* naznačují, že by se pacienti mohli dělit na podskupinu se zvýšenou expresí tohoto genu, zatímco druhá skupina toto zvýšení nevykazuje. Mírné zvýšení exprese genu *CIGALTIC1* bylo pozorováno u pacientů. Exprese genů *GALNT2* a *CIGALTI* byla mezi skupinou pacientů a kontrol srovnatelná.

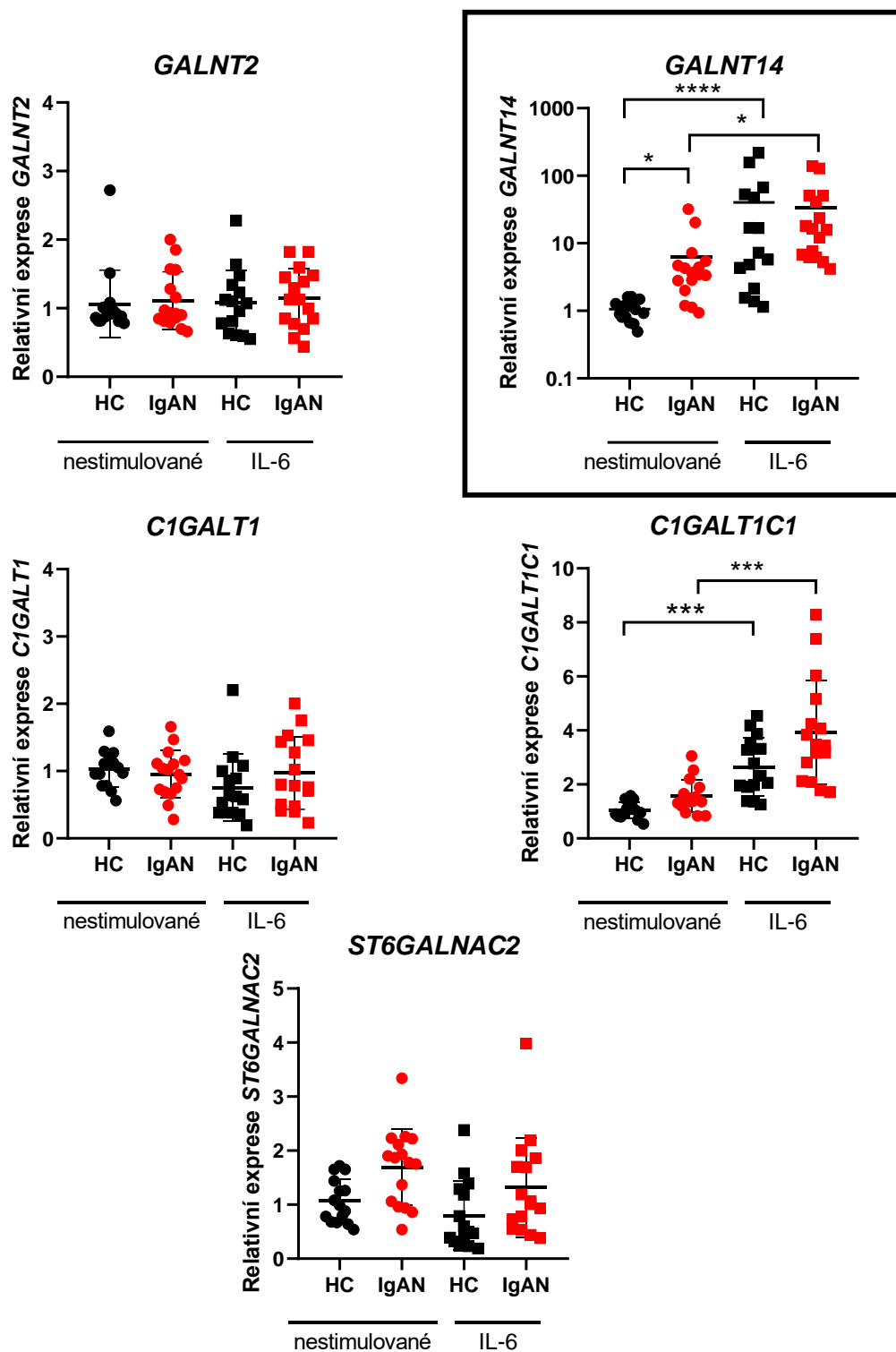
Abychom zjistili, jak ovlivňuje zánětlivé prostředí expresi glykosyltransferáz, byly mononukleární buňky stimulovány IL-6 jeden týden *in vitro*. Působením IL-6 došlo k nejvýraznějšímu nárůstu v expresi *GALNT14* (Obrázek 9), který byl patrný jak u pacientů s IgA nefropatií (8x), tak u kontrol (40x). Přestože počáteční hladina mRNA *GALNT14* u nestimulovaných buněk kontrolní skupiny byla nižší než u pacientů, po stimulaci IL-6 byly zvýšené hladiny *GALNT14* srovnatelné u pacientů i kontrol. Tyto výsledky naznačují, že vlivem působení IL-6 by mohlo docházet ke zvýšení exprese *GALNT14* v lymfocytech, což by mohlo souviset se změnami v glykosylaci IgA1. Na rozdíl od toho stimulace IL-6 neměla vliv na míru exprese příbuzné GalNAc transferázy *GALNT2*. V buňkách stimulovaných IL-6 se také zvyšovala exprese genu *CIGALTIC1*, a to u pacientů i u kontrol. Tyto změny však nebyly doprovázeny navýšením exprese *CIGALTI*, kde zůstaly hladiny i po stimulaci IL-6 na původní hodnotě. Exprese *ST6GALNAC2* vykazovala nepatrné snížení po stimulaci IL-6, které ovšem nedosahovalo statisticky významných změn.

Pacienti byli posléze rozděleni do skupin na základě probíhající terapie kortikosteroidy. Jevilo se, že léčení pacienti vykazují vyšší hladiny *GALNT14* v mononukleárních buňkách periferní krve (Obrázek 10). Naopak po stimulaci IL-6 nedocházelo u skupiny léčených pacientů k tak výraznému nárůstu exprese *GALNT14* jako u neléčených pacientů. U jednoho pacienta byla sledována exprese *GALNT14* po dobu 4 měsíců od zahájení léčby. Postupně u něj klesala odpověď na stimulaci IL-6. Zatímco na začátku léčby se u tohoto pacienta zvýšila hladina *GALNT14* po stimulaci IL-6 9x, po čtyřměsíční léčbě kortikoidy byl nárůst už jen 1,4 násobný (Obrázek 10).

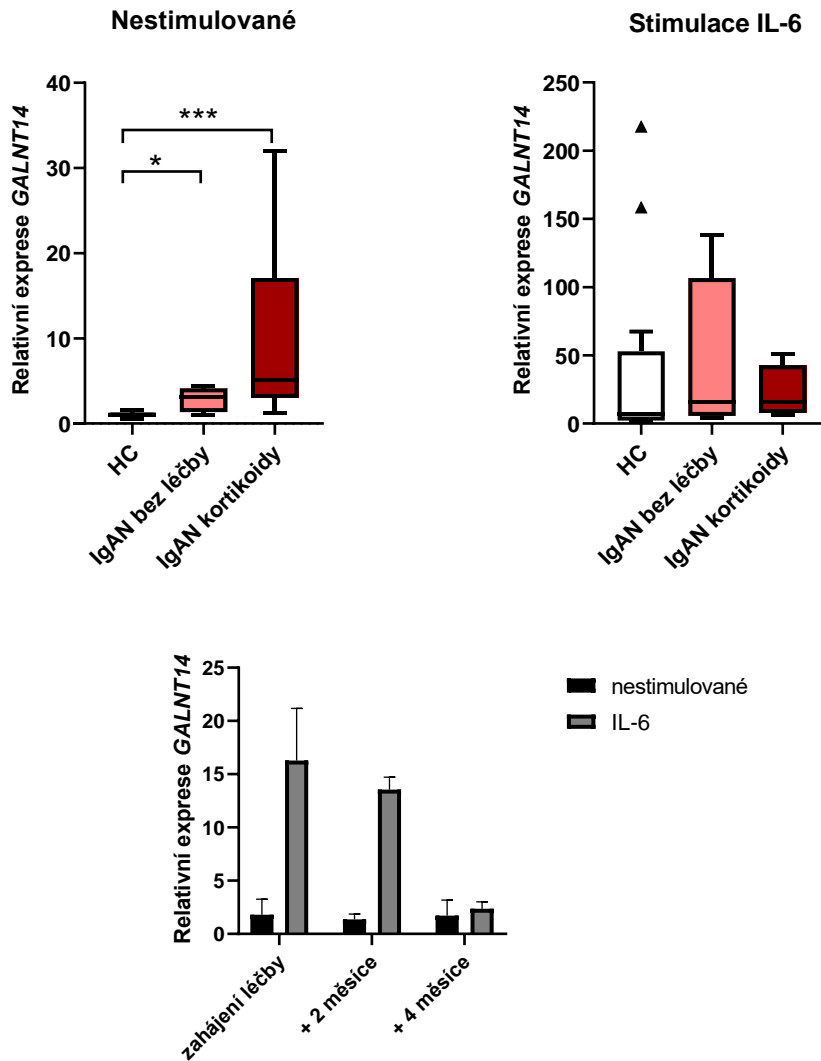


Obrázek 8. Rozdíly v expresi vybraných glykosyltransferáz mezi pacienty a kontrolami.

U pacientů s IgA nefropatií byla detekována statisticky významně vyšší exprese genů *GALNT14*, *C1GALT1C1* a *ST6GALNAC2* oproti kontrolní skupině. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Horizontální úsečky značí průměrné hodnoty, chybové úsečky směrodatnou odchylku.



Obrázek 9. Rozdíly v expresi vybraných glykosyltransferáz mezi pacienty s IgA nefropatií a kontrolami po stimulaci IL-6. Výrazný nárůst byl detekován v expresi genu *GALNT14* po stimulaci IL-6. Vlivem IL-6 docházelo rovněž ke zvýšení exprese *C1GALT1C1*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*;  $p < 0,0001$ . Horizontální úsečky značí průměrné hodnoty, chybové úsečky směrodatnou odchylku.



Obrázek 10. **Vliv kortikosteroidní terapie na expresi *GALNT14*.** Nahoře: Pacienti byli rozděleni na skupinu podrobující se kortikosteroidní terapii déle než jeden měsíc (n=8) a skupinu bez této terapie. Obrázek vlevo ukazuje, že skupina pacientů léčených kortikoidy vykazuje vyšší hladiny *GALNT14*. Na obrázku vpravo u skupiny pacientů léčených kortikoidy naopak vlivem IL-6 nestoupá hladina *GALNT14* tak výrazně jako u neléčených pacientů s IgA nefropatií. Dole: Jeden pacient byl sledován v průběhu času po zahájení léčby kortikoidy. Postupně se u něj snižovala odpověď na stimulaci IL-6. (Horizontální úsečky značí medián, chybové úsečky minimální a maximální hodnoty, odlehle hodnoty jsou znázorněny jako body. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Na základě výsledků v rozdílné genové expresi *GALNT14* v mononukleárních buňkách mezi pacienty s IgA nefropatií a kontrolami a na základě výrazné odpovědi na stimulaci IL-6 byla vybrána glykosyltransferáza GalNAc-T14 k dalším funkčním experimentům. Vliv změny hladiny enzymu GalNAc-T14 na glykosylaci IgA1 byl testován na immortalizovaných buněčných liniích produkujících IgA1.

## 5 Vliv zvýšení nebo snížení hladiny GalNAc-T14 na produkci Gd-IgA1

### 5.1 Metodika

#### 5.1.1 Biologický materiál

Buněčná linie Dakiki (ATCC; č. TIB-206) odvozená z lymfocytů od pacienta s karcinomem nosohltanu immortalizovaná virem Epstein-Barrové (EBV). Produkuje IgA1 s lehkým řetězcem izotypu  $\lambda$ . Secernované IgA1 vykazuje sníženou galaktosylaci v *O*-glykanech typickou pro IgA nefropatii (Raška et al., 2007). Linie Dakiki byla kultivována v RPMI-1640 obsahujícím 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich), 10% FBS (BioSera), 100 U/ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu (BioSera).

Buněčná linie 1123 odvozená z lymfocytů od pacienta s IgA nefropatií immortalizovaná EBV. Produkuje Gd-IgA1. Buněčná linie 3089 odvozená z lymfocytů od zdravého dárce immortalizovaná EBV. Produkuje IgA1. Tyto buněčné linie byly darovány Ústavem mikrobiologie Alabamské University v Birminghamu (Suzuki et al., 2008a). Buněčné linie původem od pacienta s IgA nefropatií a zdravého dárce byly kultivovány v RPMI-1640 obsahujícím 2 mM L-glutamin, 20% FBS, 100 U/ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu.

Buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C v atmosféře vzduchu s 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány každé 2-4 dny a jejich koncentrace byla udržována v rozmezí 0,3-1,5 × 10<sup>6</sup> buněk/ml. Buněčné linie byly pravidelně testovány na přítomnost mykoplazmat pomocí kitu Mycoplasma Detection Kit (SouthernBiotech).

#### 5.1.2 Analýza exprese *GALNT14* v buněčných liniích

5 × 10<sup>5</sup> buněk bylo odebráno, stočeno a resuspendováno ve 350 ul lyzačního pufru RLT obsahujícím  $\beta$ -merkaptoethanol. Buňky byly vortexovány 1 min. Pro izolaci RNA byl použit RNeasy minikit (Qiagen). RNA byla eluována do 35 ul ddH<sub>2</sub>O. Pro odstranění genomické DNA byl použit TurboDNase kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Průběh reakce je shrnut v Tabulce 8. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky a integrita RNA byla zhodnocena na základě poměru absorbance

při vlnových délkách 260nm a 280nm a dosahoval hodnot 2,0 – 2,1. 300ng RNA bylo přepsáno do cDNA pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (Tabulka 9). Analýza exprese *GALNT14* byla provedena pomocí qPCR stejným postupem jako v kapitole 4.1.4. Do jedné qPCR reakce o objemu 10  $\mu$ l bylo přidáno 15 ng cDNA.

**Tabulka 8.** Eliminace gDNA pomocí TURBO DNase kitu.

Složka	množství
10x TURBO DNase pufr	3,5 $\mu$ l
Enzym TURBO DNase	1 $\mu$ l
eluovaná RNA	35 $\mu$ l
inkubace 37 °C, 25 min	
DNase Inactivation reagentie	3,5 $\mu$ l
inkubace za LT 5 min, protřepáváno	
centrifugace 1,5 min, 10 000 g	
supernatant přenesen do čisté zkumavky, zamrazeno -80 °C	

**Tabulka 9.** Složení a průběh reverzní transkripce s reverzní transkriptázou SuperScript III

Složka	množství
100 $\mu$ M oligo(dT) <sub>20</sub>	0,5 $\mu$ l
10 mM dNTP Mix	1 $\mu$ l
RNA	300 ng
ddH <sub>2</sub> O	doplněno do 13 $\mu$ l
inkubace 65 °C, 5 min, poté zchlazeno na ledu	
5x FS Buffer	4 $\mu$ l
0,1 M DTT	1 $\mu$ l
Enzym RNaseOUT	1 $\mu$ l
Enzym SuperScript III RT	1 $\mu$ l
inkubace 50 °C, 60 min	
inkubace 70 °C, 15 min	
zchlazeno na 4 °C	



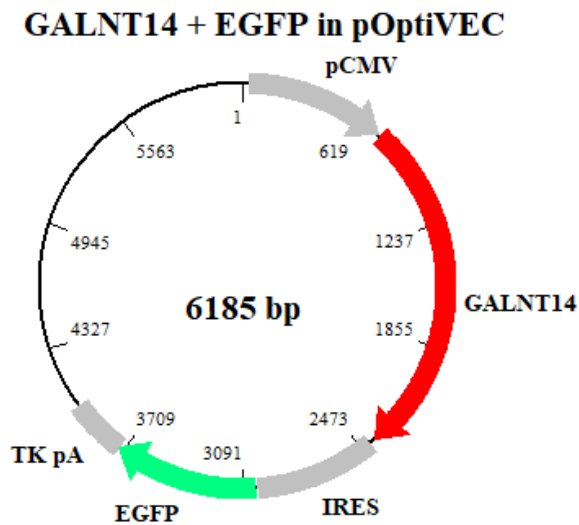
### 5.1.3 Transfekce buněčných linií

Za účelem zvýšení exprese GalNAc-T14 byly buněčné linie transfekovány bicistronickým plazmidem nesoucím gen pro *GALNT14* a *EGFP* ve vektoru pOptiVEC – TOPO (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Geny *GALNT14* a *EGFP* jsou zde odděleny vnitřní sekvencí pro nasednutí ribosomu („internal ribosomal entry site“ IRES původem z viru encefalomyokarditidy). Protein EGFP („Enhanced green fluorescence protein“) umožňuje snadnou detekci účinně transfekovaných buněk. Plazmid byl připraven analogickým postupem jako v mojí diplomové práci (Nováková, 2011). Vektor EGFP pOptiVEC TOPO byl namnožen pomocí PCR reakce a následně byl ligován s insertem *GALNT14*. Sekvence použitých primerů je uvedena v Tabulce 10. Plazmid byl klonován v buňkách *E. coli* (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a následně izolován pomocí kitu Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Sekvence plazmidu byla ověřena restriční analýzou a sekvenací provedenou v laboratoři Generi-Biotech (Hradec Králové). Mapa plazmidu je znázorněna na Obrázku 11. Celá sekvence plazmidu je uvedena v Příloze 1.

Za účelem snížení hladiny GalNAc-T14 byly buněčné linie transfekovány siRNA navrženými pro „knock-down“ mRNA GalNAc-T14 (ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs; Dharmacon, Horizon Discovery Group). Jako transfekční kontrola byla v tomto případě použita směs necílených siRNA (ON-TARGETplus non-targeting SMARTpool siRNAs).

**Tabulka 10.** Primery použité pro namnožení vektoru a insertu

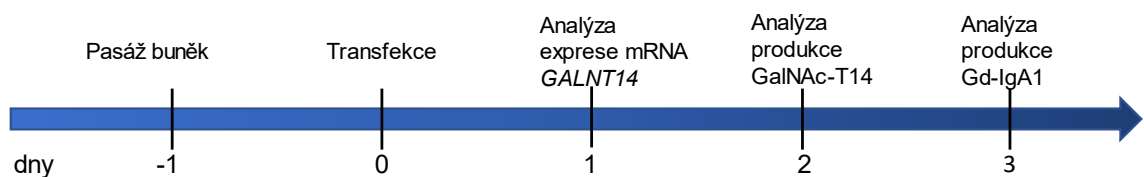
Název primeru	sekvence primeru 5'-3'	5' - fosforylace
pOptiVEC-EGFP přímý	AAGGGTTGGATCCCTACCGG	-
pOptiVEC-EGFP zpětný	AAGGGTTGGATCCTCTAGAGTCCG	-
GALNT14 přímý	CACCATGCGGCGCCTGACTC	ano
GALNT14 zpětný	TCAAGAGCTCACCATGTCCC	ano



Obrázek 11. Mapa plazmidu použitého pro zvýšení exprese *GALNT14*. (pCMV – promotor, IRES – vnitřní sekvence pro nasednutí ribosomu, TK pA – polyadenylační signál)

Buněčné linie byly den před transfekcí naředěny na koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk/ml. V den transfekce byly buňky stočeny a resuspendovány v poměru 2 miliony buněk na 100  $\mu$ l transfekčního roztoku (Nucleofector Solution C + Supplement), ke kterému byly přidány buď 2  $\mu$ g plazmidové DNA anebo 1,4  $\mu$ g siRNA. Transfekce byla provedena v přístroji Nucleofector 2b Device (Lonza) za použití programu Z-001 (Nováková, 2011; Yamada et al., 2017). Suspenze transfekovaných buněk byla převedena do 1,8 ml kultivačního média do 24jankového panelu.

Po 16h bylo buňkám vyměněno čerstvé kultivační médium. Po 24h byla analyzována exprese *GALNT14* pomocí qPCR. Po 36h byla analyzována účinnost transfekce pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie. Po 48h byla analyzována produkce GalNAc-T14 imunodetekcí na membráně po western blotingu. 64h po transfekci byla analyzována produkce Gd-IgA1 metodou ELISA a povrchová exprese Gd-IgA1 pomocí průtokové cytometrie (Obrázek 12).



Obrázek 12. Časový harmonogram experimentu.

#### 5.1.4 Vyhodnocení účinnosti transfekce pomocí fluorescenční mikroskopie

Bylo odebráno  $2 \times 10^5$  buněk transfekovaných bicistronickým plazmidem exprimujícím *GALNT14* a *EGFP* a stejný počet netransfekovaných buněk. Buňky promyté PBS byly resuspendovány ve 150  $\mu$ l PBS a stočeny na mikroskopické sklíčko pomocí centrifugy StatSpin Cytofuge 12 (IRIS). Preparát byl zakápnut 25  $\mu$ l PBS, překryt krycím sklíčkem a ihned mikroskopován za použití imerzního oleje přes objektiv zvětšující 63x přístrojem Leica DM6 B (Leica Microsystems GmbH).

#### 5.1.5 Vyhodnocení účinnosti transfekce pomocí průtokové cytometrie

Bylo odebráno  $3 \times 10^5$  buněk transfekovaných bicistronickým plazmidem exprimujícím *GALNT14* a *EGFP* a stejný počet netransfekovaných buněk. Buňky byly resuspendovány v 50  $\mu$ l 1% FBS v PBS a byly inkubovány s 0,5  $\mu$ l barviva pro určení životnosti buněk Fixable Viability Dye eFluor 450 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) po dobu 30 min ve tmě. Po promytí byly resuspendovány v PBS a fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru SONY Spectral Analyzer (SONY Biotechnology) a data byla vyhodnocena v programu FlowJo (Tree Star Inc.).

#### 5.1.6 Analýza produkce GalNAc-T14 imunodetekcí na membráně po western blottingu

$1 \times 10^6$  buněk bylo stočeno, promyto 1 ml PBS a resuspendováno v 80  $\mu$ l PBS. Ke vzorku byl přidán 5x koncentrovaný SDS nanášecí pufr. Vzorky byly inkubovány při 95 °C 10 min. Proteiny ve vzorcích (o objemu 20  $\mu$ l) byly separovány pomocí elektroforézy v 10% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek (SDS-PAGE). Poté byly proteiny přeneseny na PVDF membránu pomocí „semi-dry“ blotovacího zařízení. Elektrický proud byl nastaven na 0,8 mA na  $\text{cm}^2$  membrány a přenos probíhal 80 min.

Membrána byla blokována 2 h v 5% odtučněném mléku v TBS pufru s 0,1% Tweenem 20. Poté byla membrána přes noc inkubována s polyklonální králičí protilátkou specifickou proti GalNAc-T14 (Abcam) ředěnou v poměru 1:500 v blokovacím pufru. Po promytí byla membrána inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP) (Sigma-Aldrich, Merck). Sekundární protilátka byla ředěna v poměru 1:40 000 v blokovacím pufru a byla s membránou inkubována 1 h. Po promytí byla membrána inkubována s chemiluminiscenčním

čínidlem SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) a chemiluminiscence zaznamenána v přístroji G:BOX Chemi XX9 (Syngene). Za účelem normalizace naneseného množství proteinu byl následně na stejné membráně detekován  $\beta$ -aktin pomocí myši monoklonální protilátky (Santa Cruz Biotechnology) ředěné v poměru 1:200. Ta byla detekována sekundární protilátkou specifickou proti myšimu IgG konjugovanou s HRP (Sigma-Aldrich, Merck). Pro detekci chemiluminiscence bylo použito činidlo SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Fisher Scientific). Densitometrická analýza zachycených obrázků byla vyhodnocena v softwaru ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda). Relativní množství proteinu GalNAc-T14 bylo vztaženo na množství housekeepingového proteinu  $\beta$ -aktinu.

#### 5.1.7 Stanovení koncentrace IgA metodou ELISA

V supernatantech sesbíraných 64h po transfekci bylo stanoveno množství IgA a následně zastoupení Gd-IgA1. Na 96 jamkovou mikrotitrační desku (Nunc MaxiSorp) byl navázán kozí  $F(ab')_2$  fragment protilátky specifické proti lidskému imunoglobulinu A (0.1  $\mu$ g protilátky ředěné v PBS na jamku), inkubace probíhala přes noc za laboratorní teploty. Poté byly desky blokovány 1% bovinním sérovým albuminem (BSA, Sigma-Aldrich, Merck) v PBS s 0,05% Tweenem 20. Blokování probíhalo 3 h za laboratorní teploty. Po promytí byly do jamek nanášeny sériově ředěné vzorky v duplikátech. Zároveň s nimi byla na každý panel nanášena i koncentrační řada standardu ChromPure Human Serum IgA (Jackson ImmunoResearch), na základě čehož bylo stanoveno množství IgA ve vzorcích. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Navázané IgA bylo následně detekováno kozím  $F(ab')_2$  fragmentem protilátky specifickým proti lidskému imunoglobulinu A konjugovaným s HRP (Jackson ImmunoResearch) ředěným 1:10 000 v blokovacím pufru (inkubace 3 h za LT). Po promytí byl přidán chromogenní substrát *O*-phenylenediamin dihydrochlorid s peroxidem vodíku (Sigma-Aldrich, Merck). Po 5 minutách byla reakce zastavena přidáním 1M  $H_2SO_4$ . Absorbance byla měřena při 490 nm na přístroji Synergy HTX (BioTek), v jehož softwaru Gen5 byla vyhodnocena koncentrace IgA ve vzorcích.

### 5.1.8 Stanovení Gd-IgA1 v supernatantech metodou ELISA

Na 96 jamkovou mikrotitrační desku (Nunc MaxiSorp) byla navázána myší monoklonální protilátka 35A12 specifická proti Gd-IgA1 poskytnutá Dr. Kazuem Takahashi z Lékařské fakulty, Fujita Health University, Nagoya, Aichi v Japonsku. (Hiki et al., 2015). Protilátka byla ředěná v PBS, množství na jamku bylo 0,5 µg a inkubace probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Nespecifické vazby byly zablokovány 1% BSA (Sigma-Aldrich, Merck) v PBS s 0,05% Tweenem 20. Supernatanty byly naředěny v čerstvém kultivačním médiu, tak aby koncentrace celkového IgA byla ve všech vzorcích 50 ng/ml (~ 5 ng IgA na jamku), příp. 100 ng/ml. Inkubace probíhala přes noc při 4°C. Navázané Gd-IgA1 bylo detekováno kozím F(ab')<sub>2</sub> fragmentem protilátky specifickým proti lidskému imunoglobulinu A konjugovaným s HRP (Jackson ImmunoResearch) ředěným 1:10 000 v blokovacím pufru (inkubace 3 h za LT). Reakce byla vyvolána přidáním *O*-phenylenediamin dihydrochloridu s peroxidem vodíku a po 15 min zastavena přidáním 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance byla měřena při 490 nm na přístroji Synergy HTX (BioTek).

### 5.1.9 Detekce Gd-IgA1 exprimovaného na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie

Pro účely detekce povrchové exprese Gd-IgA1 byla protilátka 35A12 specifická proti Gd-IgA1 (Hiki et al., 2015) konjugována s biotinem za použití kitu Easy Biotin Labeling Kit (Abcam). Buňky byly nejprve ošetřeny proteázou Subtilisinem A (Sigma-Aldrich, Merck).  $1 \times 10^6$  buněk bylo resuspendováno v 0,05% roztoku Subtilisinu A v 5 mM Tris-HCl pufru (pH=7,4) a inkubováno 1,5 h za laboratorní teploty. Nespecifické vazby byly zablokovány inkubací buněk s 10% lidským sérem v PBS, inkubace trvala 10 min. Poté byly vzorky inkubovány se 4 µg biotinylované protilátky 35A12 v 5% FBS v PBS (1 h, 37 °C). Následně proběhla inkubace se Streptavidinem značeným fykoerytrinem (PE) ředěným 1:200 a 4 µg F(ab')<sub>2</sub> fragmentu protilátky specifického k lidskému imunoglobulinu A (Jackson ImmunoResearch) konjugovanému s fluoroforem Pacific Blue. Konjugace byla provedena pomocí kitu Pacific Blue Antibody Labeling Kit, Thermo Fisher Scientific (inkubace probíhala 30 minut ve tmě). Mezi jednotlivými kroky bylo vždy provedeno promytí buněčné suspenze pomocí PBS. Analýza byla provedena na přístroji SONY

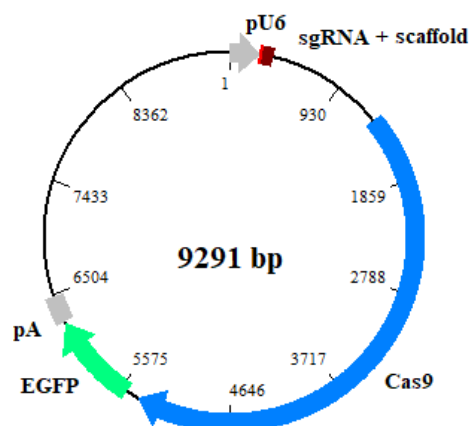
Spectral Analyzer (SONY Biotechnology) a data byla vyhodnocena v programu FlowJo software (Tree Star Inc.).

#### 5.1.10 Příprava buněčných linií Dakiki s knock-outem v genu pro *GALNT14*

Knock-out v genu pro *GALNT14* byl proveden technologií CRISPR/Cas9. Nukleotidová sekvence pro naváděcí RNA (single guide RNA) byla navržena v programu CHOPCHOP v3 (Labun et al., 2019). Komplementární fosforylované oligonukleotidy (Tabulka 11) navržené s kohezivními konci pro zaklonování byly hybridizovány (Tabulka 12), a poté vloženy do linearizovaného a defosforylovaného vektoru pX458 pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene) (Tabulka 13) Následná ligace vektoru s inzertem byla provedena za použití T4 DNA Ligázy (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (Tabulka 14). Takto vytvořeným plazmidem byly transformovány bakteriální buňky NEB 5-alpha Competent *E. coli* (New England BioLabs), které byly následně vysety na plotny s ampicilinem a byly inkubovány přes noc při 37°C. Z narostlých kolonií byla provedena PCR reakce za účelem ověření zaklonování inzertu ve správné orientaci (Tabulka 15 a Tabulka 16). Vybraná bakteriální kolonie byla inokulována do 40 ml tekutého média a kultivována přes noc při 37 °C. Následně byl z bakterií vyizolován plazmid pomocí kitu Plasmid Plus Midikit (Qiagen). Čistota vyizolované DNA byla ověřena spektrofotometricky (poměr absorbancí  $\lambda 260\text{nm}:\lambda 280\text{nm}$  byl 1,93). Sekvence plazmidu byla provedena zakázkově firmou SEQme (Dobříš). Zjednodušená mapa plazmidu je znázorněna na Obrázku 13. Celá sekvence plazmidu je uvedena v Příloze 2.

Plazmid nese gen pro endonukleázu Cas9, která provede na základě komplementarity naváděcí RNA dvojřetězcové zlomy v cílové sekvenci. Ty se potom buňka snaží opravit a při tomto procesu dochází k mutacím. Tam, kde dojde k posunu čtecího rámce, je gen vyřazen z provozu.

### KO GALNT14 in pX458



Obrázek 13. Mapa plazmidu použitého pro knock-out genu *GALNT14* pomocí metody CRISPR/Cas9. (pU6 – promotor pro U6 snRNA, sgRNA – sekvence pro naváděcí RNA, pA – polyadenylační signál)

Tabulka 11. Sekvence použitých oligonukleotidů

Název primeru	sekvence primeru 5'-3'
oligonukleotidy tvořící inzert plazmidu	
sgRNA GALNT14 F	CACCGTTGTCTTACAGGACTACACG
sgRNA GALNT14 R	AAACCGTGTAGTCCTGTAAGACAAC
primery pro PCR z kolonií	
pX458 přímý	CTGGCCTTTTGCTCACATGT
sgRNA GALNT14 R	AAACCGTGTAGTCCTGTAAGACAAC
primery pro sekvenaci mutací v <i>GALNT14</i>	
seq GALNT14 F	ATGAAGGCCACAAAACATCT
seq GALNT14 R	TTTCCTTCACTCTCCCCACTTA

Tabulka 12. Párování oligonukleotidů (annealing)

Složka	množství
100 μM oligonukleotid	1 μl
komplementární 100 μM oligonukleotid	1 μl
5x T4 DNA Ligase buffer (Invitrogen)	2 μl
ddH <sub>2</sub> O	6 μl
inkubace 37 °C, 30 min	
inkubace 95 °C, 5 min	
postupně chladit na 25 °C (pokles o 5 °C/min)	

**Tabulka 13.** Linearizace vektoru a jeho ošetření fosfatázou

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
plazmid pX458 pSpCas9(BB)-2A-GFP	1 µg
restrikční enzym BbsI 10,000 units/ml (NEB)	2,5 µl
pufr NEBuffer 2 10x	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 50 µl
inkubace 37 °C, přes noc	
fosfatáza CIP 10U/µl (NEB)	0,25 µl
inkubace 37 °C, 30 min	

**Tabulka 14.** Ligace vektoru s inzertem

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
50 nM duplex oligonukleotidů	1 µl
linearizovaný vektor pX458 (10ng/µl)	2,5 µl
5x T4 DNA Ligase buffer (Invitrogen)	4 µl
ddH <sub>2</sub> O	11,5 µl
enzym T4 DNA Ligase (Invitrogen) 0,5U/µl	1 µl
inkubace 37 °C, 30 min	
inkubace 16 °C, přes noc	
0,5 M EDTA	1 µl

**Tabulka 15.** Složení PCR reakce z kolonií

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
pufr 10X Standard Taq Reaction Buffer (NEB)	2,5 µl
10 mM dNTP mix	0,5 µl
10 µM přímý primer	0,5 µl
10 µM zpětný primer	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	20,9 µl
Taq DNA Polymerase (NEB)	0,125 µl
Templátová DNA byla přenesena přímo pipetovací špičkou z jednotlivých kolonií	



**Tabulka 16.** Průběh PCR reakce z kolonií

krok	teplota	čas
1. počáteční denaturace	95 °C	5 min
2. denaturace	95 °C	30 s
3. annealing primerů	53 °C	30 s
4. elongace	68 °C	1 min
5. konečná elongace	68 °C	5 min

Kroky 2 – 4 byly opakovány 30x.

Připraveným plazmidem byla transfekována buněčná linie Dakiki, stejným postupem jako v kapitole 5.1.3. I tento plazmid nese ve svém vektoru gen pro expresi *EGFP*, na základě čehož byly transfekované buňky vytříděny po jedné buňce do 96jamkového kultivačního panelu. K čerstvému kultivačnímu médiu byla přidána jedna třetina kondicionovaného média (supernatant odebraný z buněčné linie Dakiki procházející exponenciální fází růstu), aby bylo podpořeno množení buněk v počátečních fázích kultivace.

Po jednom měsíci, kdy se některé klony dostatečně namnožily, byl proveden screening za účelem zjistit, u kterých klonů došlo knock-outu v *GALNT14*. Analýza byla provedena imunodetekcí GalNAc-T14 na membráně po western blotu (viz 5.1.6). Paralelně byla z vybraných klonů byla izolována DNA pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Úsek DNA genu pro *GALNT14* s předpokládanou mutací byl amplifikován pomocí PCR s primery navrženými v programu CHOPCHOP v3 (Tabulka 11, Tabulka 17 a Tabulka18). Produkty PCR reakce byly přečištěny za použití ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (Tabulka 19) a následně byla provedena sekvenace (zakázkově, SEQme) za účelem ověření přítomnosti homozygotní mutace v genu pro *GALNT14*. Sekvence byly porovnávány v programu BioEdit 7.2 (Informer Technologies). Takto byly vybrány 3 klony s knock-outem v genu pro *GALNT14* a 3 klony se zachovanou produkcí GalNAc-T14 a u nich byla analyzována produkce Gd-IgA1 metodou ELISA (5.1.7 a 5.1.8). Klony byly zamrazeny a uskladněny pro pozdější využití.

**Tabulka 17.** Složení PCR reakce pro namnožení úseku genu *GALNT14* s mutací.

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
pufř 10X Standard Taq Reaction Buffer (NEB)	5 $\mu$ l
10 mM dNTP mix	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M primer seq GALNT14 F	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M primer seq GALNT14 R	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	39,75 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase (NEB)	0,250 $\mu$ l
DNA (50-300 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l

**Tabulka 18.** Průběh PCR reakce pro namnožení úseku genu *GALNT14* s mutací.

<b>krok</b>	<b>teplota</b>	<b>čas</b>
1. počáteční denaturace	95 °C	30s min
2. denaturace	95 °C	20 s
3. annealing primerů	51 °C	30 s
4. elongace	68 °C	20 s
5. konečná elongace	68 °C	5 min

Kroky 2 – 4 byly opakovány 40x.

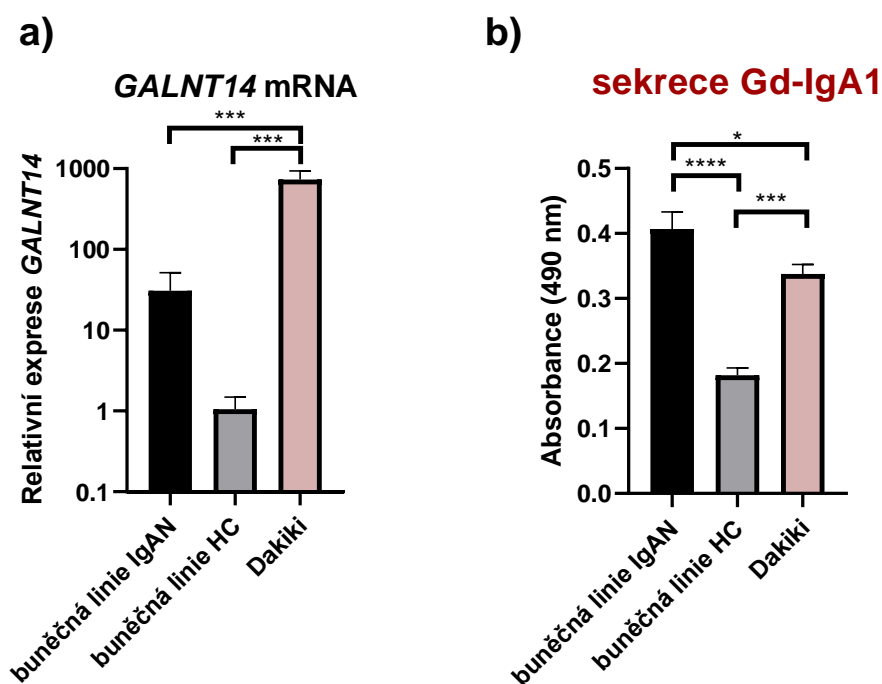
**Tabulka 19.** Příprava PCR produktu pro sekvenaci.

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
PCR produkt	10 $\mu$ l
enzym ExoSAP	1 $\mu$ l
inkubace 37 °C, 45 min	
inkubace 80 °C, 30 min	
zchladit na 4 °C	

## 5.2 Výsledky funkčních analýz

Při porovnání exprese *GALNT14* mezi buněčnými liniemi byla nejnižší hladina mRNA detekována u buněčné linie od zdravého dárce (Obrázek 14). Buněčná linie od pacienta s IgA nefropatií měla průměrně 30x vyšší hladiny mRNA *GALNT14* ve srovnání s buněčnou linií od zdravého dárce. Zcela nejvyšších hodnot dosahovala buněčná linie Dakiki, kde byla exprese *GALNT14* 700x vyšší než v buněčné linii od zdravého dárce.

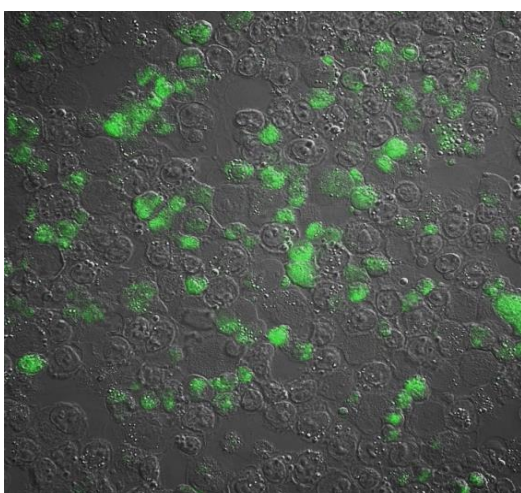
Všechny tyto buněčné linie produkovaly IgA1 a bylo vyhodnoceno zastoupení Gd-IgA1 v celkově vyprodukovaném IgA1. Nejvyšší podíl Gd-IgA1 je produkován linií původem od pacienta s IgA nefropatií. Oproti ní buněčná linie od zdravého dárce produkuje přibližně 2x méně Gd-IgA1. Linie Dakiki se podobá produkcí Gd-IgA1 linií od pacienta a produkuje pouze o jednu pětinu méně Gd-IgA1 (Obrázek 14 b).



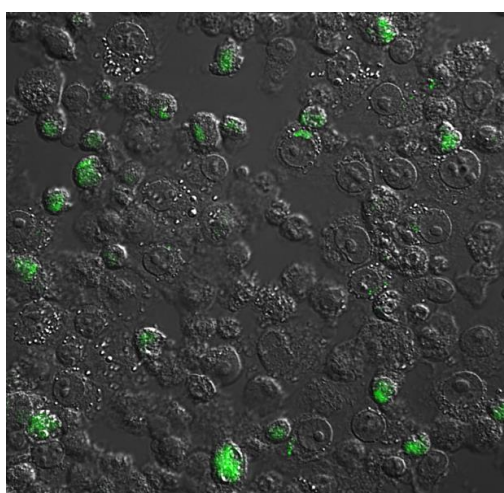
Obrázek 14. a) **Porovnání exprese *GALNT14* v buněčných liniích.** Relativní exprese *GALNT14* byla vztažena k hodnotám buněčné linie HC. (Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku hodnot naměřených ve 3 různých experimentech). b) **Porovnání sekrece Gd-IgA1 buněčnými liniemi.** Nejvyšší hladiny Gd-IgA1 produkuje linie od pacienta. (Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku dat naměřených v triplicátech. Pro statistické vyhodnocení byl použit jednofaktorový ANOVA test s Tukey post-hoc testem. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Do buněčných linií byl následně vnesen bicistronický plazmid obsahující gen pro *GALNT14* a *EGFP*. Na základě exprese *EGFP* byla pomocí průtokové cytometrie vyhodnocena transfekční účinnost, tj. kolik procent buněk produkuje vnesené geny (Obrázek 16). Produkci *EGFP* bylo možné pozorovat i pomocí fluorescenční mikroskopie (Obrázek 15). Vzhledem k tomu že je gen pro *EGFP* v plazmidu druhý v pořadí až za sekvencí IRES („Internal ribosomal entry site“), předpokládá se, že v buňkách, kde je exprimován *EGFP* je produkována i GalNAc-T14, jejíž gen se nachází přímo za promotorem.

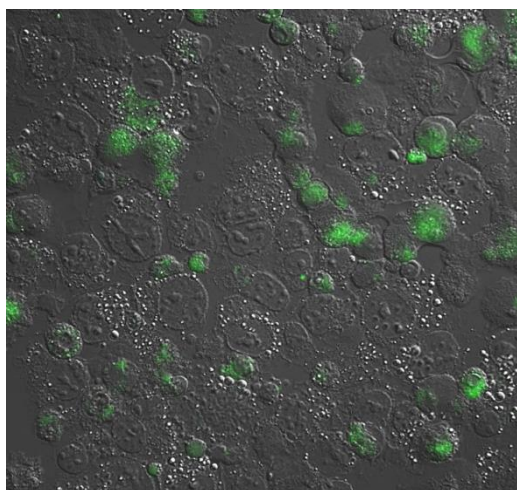
a) Dakiki



b) Buněčná linie IgAN

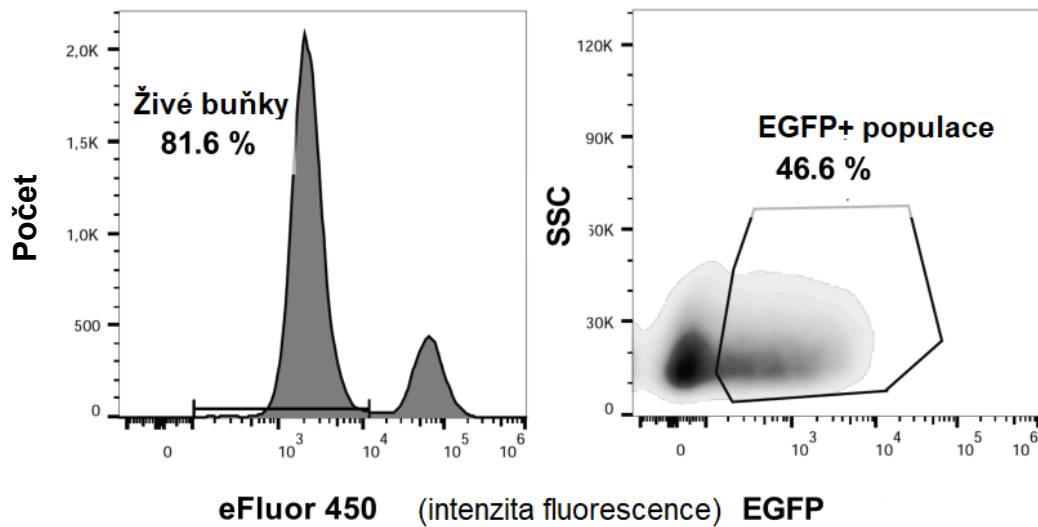


c) Buněčná linie HC

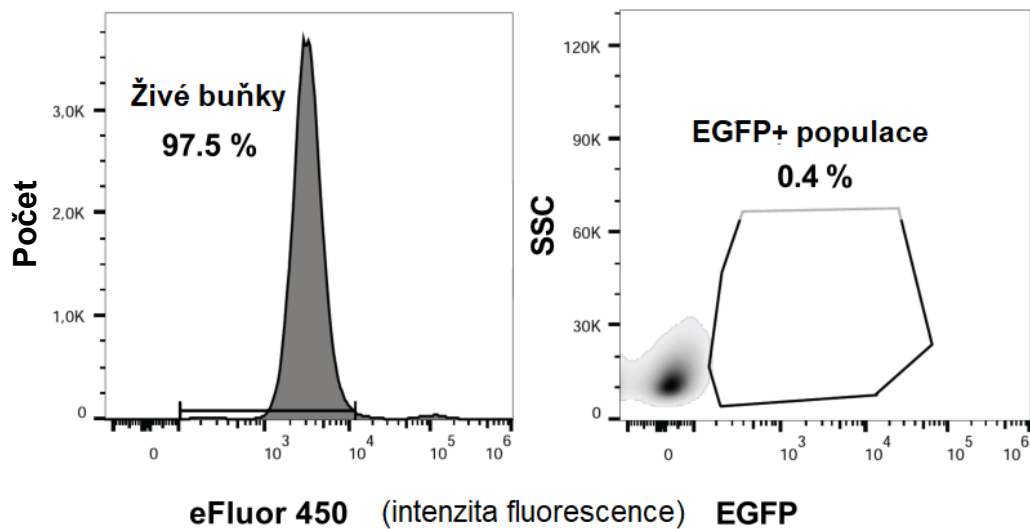


Obrázek 15. **Fluorescenční mikroskopie transfekovaných buněčných linií.** Účinně transfekované buňky exprimují kromě *GALNT14* také fluorescenční protein *EGFP*, který je možné vizualizovat pod mikroskopem. (Zvětšení 630x, Buněčná linie IgAN – buněčná linie původem od pacienta s IgA nefropatií, Buněčná linie HC – linie původem od zdravého dárce)

**a) Transfekované buňky Dakiki**



**b) Neovlivněné buňky Dakiki**



Obrázek 16. Vyhodnocení transfekční účinnosti. Dakiki buňky byly transfekovány plazmidem nesoucím gen pro *GALNT14* a *EGFP*. Na základě fluorescence exprimovaného *EGFP* byla stanovena transfekční účinnost v populaci živých buněk (negativní populace po značení Fixable Viability Dye eFluor 450, SSC – boční rozptyl).

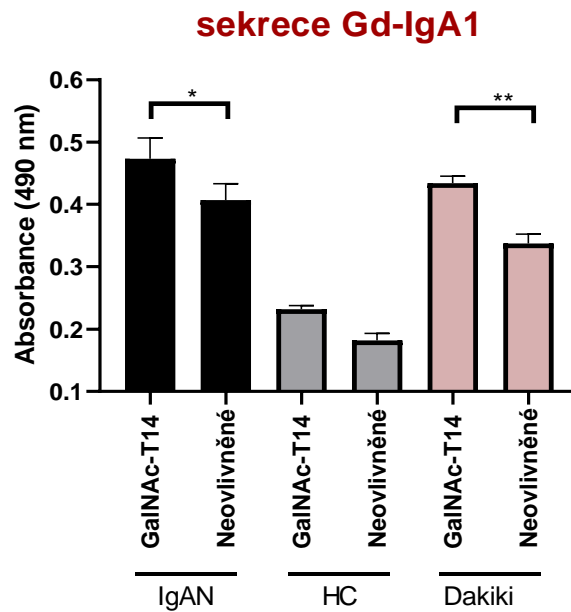
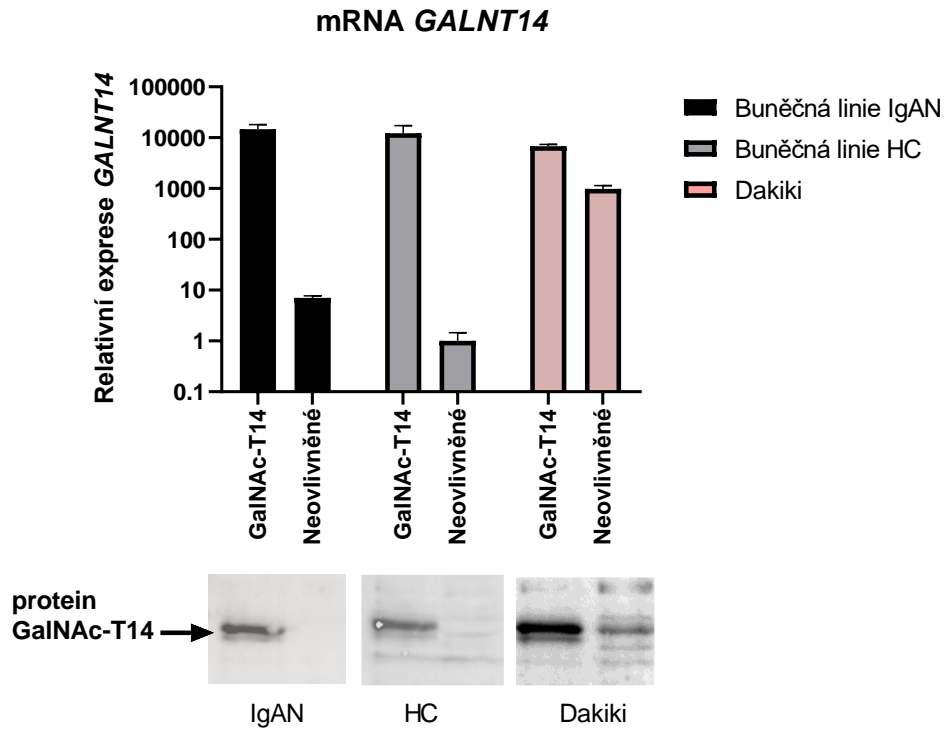
**Tabulka 20.** Stanovení životnosti a transfekční účinnosti pro všechny buněčné linie.

linie	životnost	transfekční účinnost
Dakiki	82 %	47 %
Buněčná linie IgAN	38 %	34 %
Buněčná linie HC	41 %	34 %

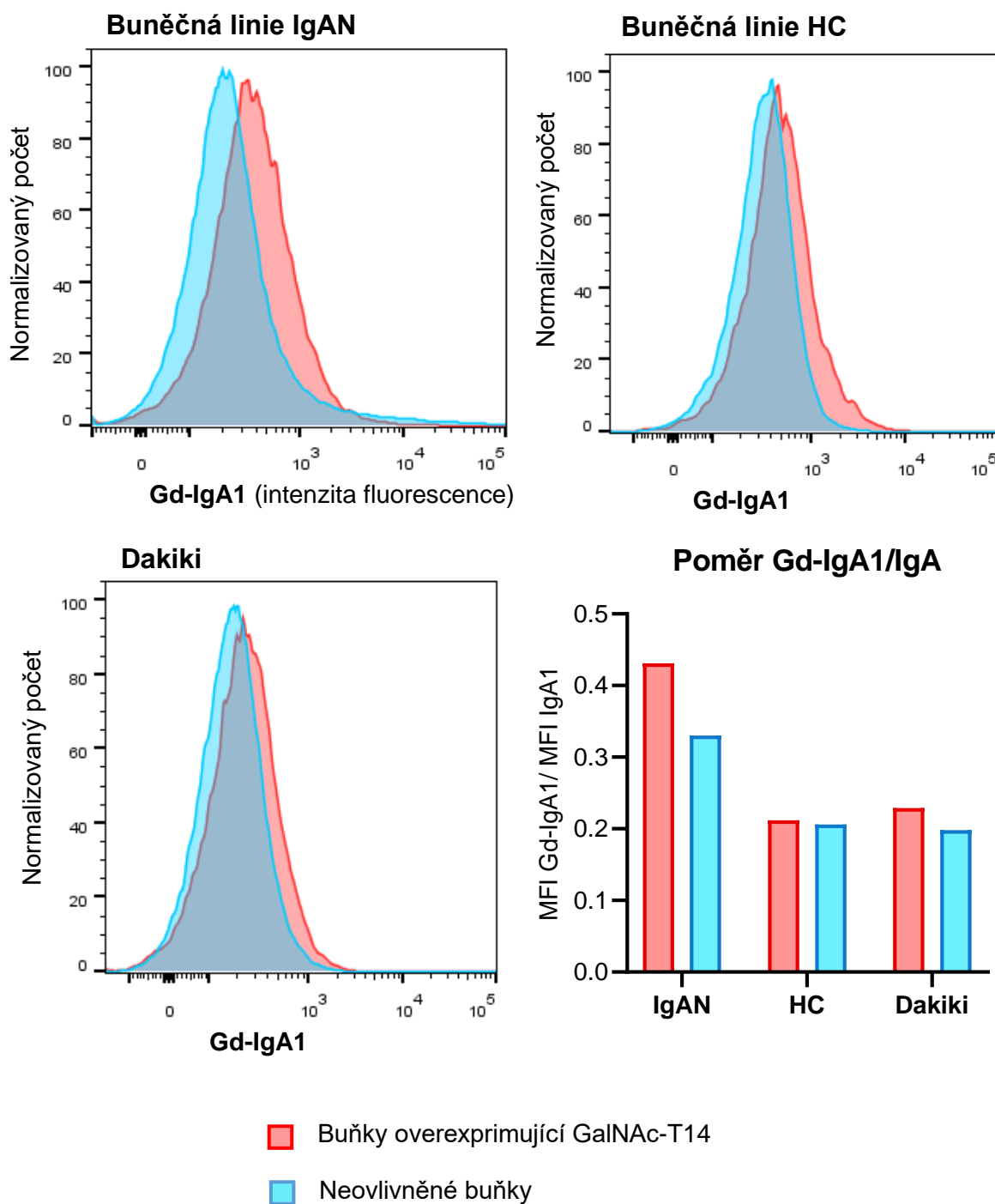
Účinnost transfekce byla nejvyšší pro buněčnou linii Dakiki (47 %) a 34 % pro buněčné linie ostatní (Tabulka 20). Buňky Dakiki se jevily jako odolnější vůči elektroporaci, zachovaná životnost byla přes 80 %, zatímco u buněčné linie od pacienta s IgA nefropatií a linie od zdravého dárce se pohybovala pouze okolo 40 % (Tabulka 20). Vyšší úmrtnost však nepředstavovala problém pro vyhodnocení změn v produkci Gd-IgA1, jelikož přeživší buňky produkovaly dostatečné množství IgA1 pro následné analýzy.

Transfekcí plasmidem kódujícím *GALNT14* bylo dosaženo umělého zvýšení exprese *GALNT14* v buněčných liniích a jejich hladiny mRNA se vyrovnaly (Obrázek 17). Rovněž byla potvrzena nadprodukce GalNAc-T14 na úrovni proteinu. (Bazální exprese GalNAc-T14 v buněčné linii od zdravého dárce a pacienta s IgA nefropatií byla však pod limitem detekce, data nejsou ukázána). U buněčných linií se zvýšenou expresí GalNAc-T14 následně došlo ke zvýšení sekrece Gd-IgA1. K nejvyššímu nárůstu v produkci Gd-IgA1 došlo u buněčné linie Dakiki (29 %,  $p = 0,008$ ). Buněčná linie původem od pacienta s IgA nefropatií zvýšila produkci Gd-IgA1 o 16 % ( $p = 0,036$ ) a buněčná linie od zdravého dárce o 27 %. Absolutní pořadí v produkci Gd-IgA1 však zůstalo zachováno (buněčná linie původem od pacienta s IgA nefropatií > Dakiki > buněčná linie od zdravého dárce), přestože se hladiny GalNAc-T14 vyrovnaly (Obrázek 17).

Pomocí průtokové cytometrie byla analyzována exprese Gd-IgA1 na povrchu buněk. U buněčných linií docházelo vlivem zvýšení exprese enzymu GalNAc-T14 ke zvýšení povrchové exprese Gd-IgA1, které bylo nejvýraznější u buněčné linie od pacienta s IgA nefropatií (Obrázek 18). Pozoruhodné bylo, že buněčné linie Dakiki a linie od zdravého dárce v souvislosti se zvýšením exprese GalNAc-T14 zvyšovaly i expresi celkového IgA1, a tak u těchto linií zůstal poměr Gd-IgA1 ku IgA1 zachován. Poměr Gd-IgA1/IgA1 byl u buněčné linie od pacienta s IgA nefropatií již na začátku vyšší oproti dalším liniím a po zvýšení hladiny GalNAc-T14 tento poměr ještě vzrostl. Tyto výsledky naznačují, že je u patientské linie jinak regulována exprese povrchového Gd-IgA1.



Obrázek 17. Vliv zvýšení hladiny GalNAc-T14 na sekreci Gd-IgA1. Buněčné linie původem od pacienta s IgA nefropatií (IgAN), od zdravého dárce (HC) a buněčná linie Dakiki byly transfekovány plasmidem nesoucím gen pro *GALNT14*. Na úrovni mRNA došlo k výraznému nárůstu hladin *GALNT14* ve všech liniích (nahore). Stejně tak bylo potvrzeno zvýšení exprese proteinu GalNAc-T14 (uprostřed). Na obrázku dole jsou znázorněny změny v produkci Gd-IgA1. (Vzorky byly analyzovány v triplicátech, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Pro statistické vyhodnocení byl použit jednofaktorový ANOVA test s Tukey post-hoc testem. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

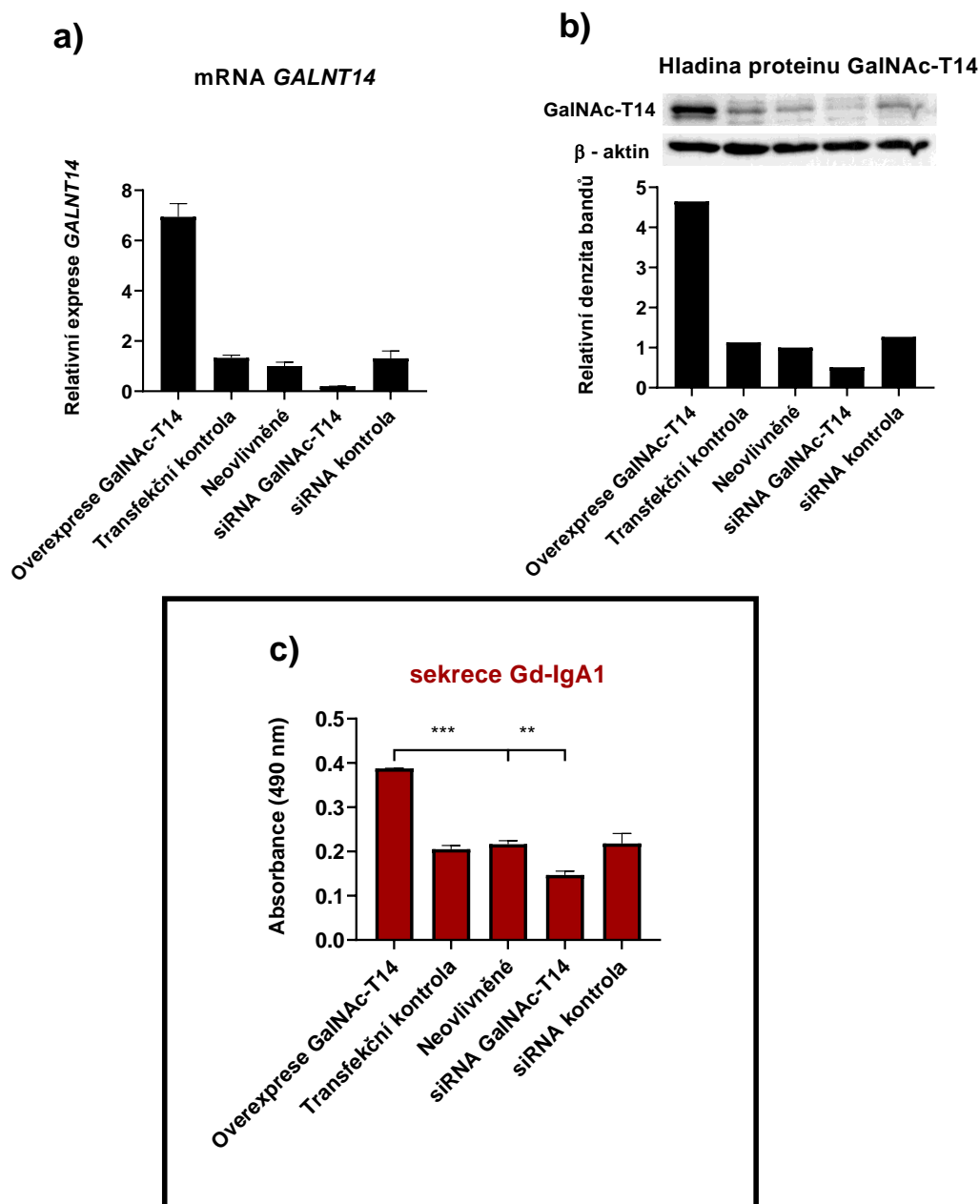


Obrázek 18. **Expres Gd-IgA1 na povrchu buněk.** Histogramy znázorňují posun v intenzitě fluorescence povrchového Gd-IgA1. Tento posun je nejvýraznější u buněčné linie pocházející od pacienta s IgA nefropatií (vlevo nahoře). Na grafu vpravo dole je vyjádřen poměr v MFI (median fluorescence intensity) povrchového Gd-IgA1 ku celkovému IgA1. Zatímco u buněčné linie od zdravého dárce a Dakiki zůstává tento poměr stejný i po zvýšení exprese GalNAc-T14, u linie od pacienta s IgAN se zastoupení povrchového Gd-IgA1 zvyšuje. (IgAN – buněčná linie od pacienta s IgA nefropatií, HC – buněčná linie od zdravého dárce)



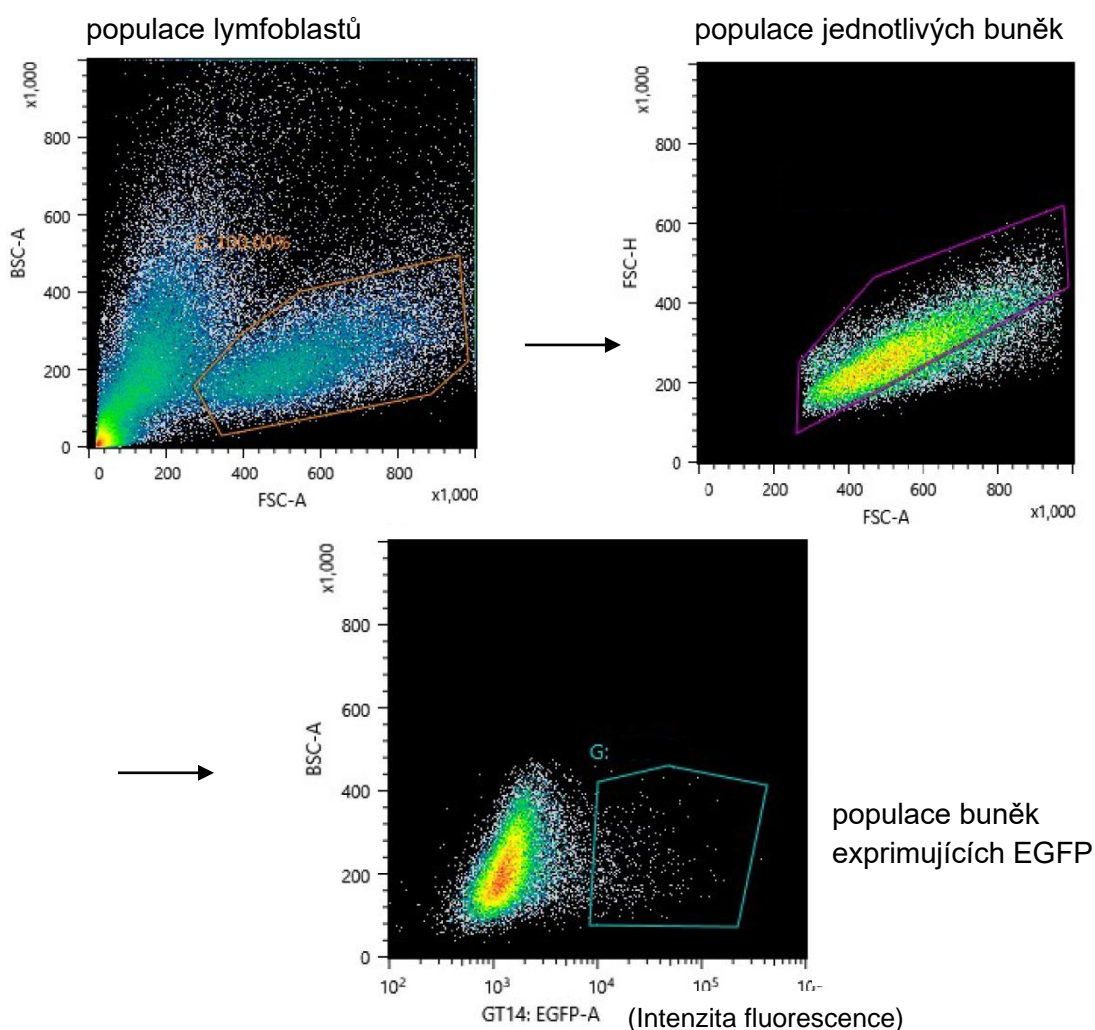
Vzhledem k vysoké bazální expresi GalNAc-T14 u buněčné linie Dakiki bylo možné provést kompletní funkční experiment, a to jak se zvýšením exprese *GALNT14*, tak i s jeho snížením pomocí siRNA (Obrázek 19). Transfekcí plazmidu kódujícího *GALNT14* bylo dosaženo 7-mi násobného zvýšení exprese mRNA tohoto genu a intracelulární produkce proteinu GalNAc-T14 se zvýšila 4x oproti neovlivněným buňkám. Naopak použitím siRNA klesla hladina mRNA 24h po transfekci na 20 % původní hodnoty exprese *GALNT14* a hladina enzymu GalNAc-T14 se snížila na 51% v porovnání s neovlivněnými buňkami. Při použití kontrolní (necílené) siRNA nebo po provedení transfekce bez plazmidu ke změnám v hladinách GalNAc-T14 nedocházelo (Obrázek 19 a, b).

Následně byla stanovena sekrece Gd-IgA1 do supernatantu buněčné kultury. Zvýšení hladiny GalNAc-T14 vyvolalo 1,8-mi násobné ( $p = 0,0001$ ) zvýšení produkce Gd-IgA1 a naopak pokles hladiny GalNAc-T14 snížil sekreci Gd-IgA1 na 67% ( $p = 0,0063$ ) hodnoty u neovlivněných buněk.



Obrázek 19. Vliv změny hladiny GalNAc-T14 na tvorbu Gd-IgA1 v buněčné linii **Dakiki**. V buněčné linii Dakiki bylo transfekcí plazmidu nesoucího gen pro *GALNT14* navozeno zvýšení hladiny („overexprese“) GalNAc-T14 a naopak transfekcí siRNA cílené na mRNA *GALNT14* byla hladina GalNAc-T14 uměle snížena. Jako transfekční kontrola byly použity buňky, které prošly procesem elektroporace, ale bez přítomnosti plazmidu. Jako siRNA kontrola byla do buněk vnesena necílená siRNA. **a)** Potvrzení změn v expresi *GALNT14* na úrovni mRNA. Relativní hladina mRNA *GALNT14* byla vztažena na expresi v neovlivněných buňkách. **b)** Potvrzení změn v hladinách proteinu GalNAc-T14. **c)** Změny v sekreci Gd-IgA1. Pro statistické vyhodnocení rozdílů byly použit jednofaktorový ANOVA test s Dunnettovým post-hoc testem, \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku vzorků analyzovaných v duplikátech.

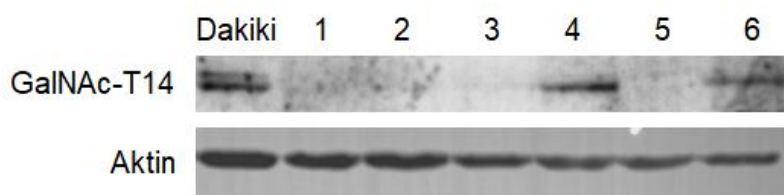
Za účelem studia vlivu enzymu GalNAc-T14 na produkci Gd-IgA1 byl příslušný gen (*GALNT14*) zcela knock-outován pomocí technologie CRISPR/Cas9 v buněčné linii Dakiki. Byl připraven plazmid nesoucí sekvenci pro naváděcí RNA cílenou na gen *GALNT14* a gen pro *EGFP*, na základě jehož exprese je možné vyselektovat účinně transfekované buňky (Obrázek 20). Tyto buňky byly pomocí sorteru vytříděny do 96jamkového panelu a z jednotlivých buněk byly vykultivovány klonů s identickou mutací v genu pro *GALNT14*.



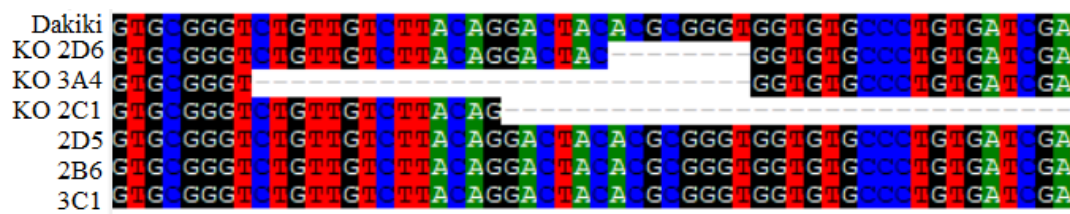
Obrázek 20. Strategie třídění buněk transfekovaných CRISPR/Cas9 plasmidem pro knock out *GALNT14*. Postupným výběrem byla vytříděna populace jednotlivých buněk Dakiki, které exprimovaly EGFP (populace G), tzn. byly účinně transfekovány plazmidem navrženým pro knock-out *GALNT14*. Tyto jednotlivě vytříděné buňky byly následně kultivovány, aby vytvořily populace geneticky identických klonů. (FSC-A/H přímý rozptyl – obsah/výška, BSC zadní rozptyl)

U jednotlivých klonů byla provedena imunodetekce GalNAc-T14 z buněčného lyzátu, za účelem zjištění, u kterých konkrétních klonů došlo ke ztrátě exprese GalNAc-T14 (Obrázek 21). Následně byla u vybraných klonů provedena sekvenace úseku DNA genu pro *GALNT14*, ve které byla očekávána přítomnost mutace. U klonů s knock-outem v genu pro *GALNT14* byla potvrzena přítomnost homozygotní mutace (Obrázek 22).

Na závěr byl ověřen fenotyp mutace, tj. vliv ztráty exprese GalNAc-T14 na glykosylaci produkovaného IgA1. Vybrané klony s knock-outovaným genem *GALNT14* byly srovnávány s původní buněčnou linií Dakiki a s klony, které prošly stejným metodickým procesem, ale nedošlo u nich k mutaci v genu pro *GALNT14*. U klonů s knock-outem v genu pro *GALNT14* se galaktózová deficiencie snížila o 34 % ( $p = 0,02$ ) oproti klonům se zachovanou expresí *GALNT14* (Obrázek 23).

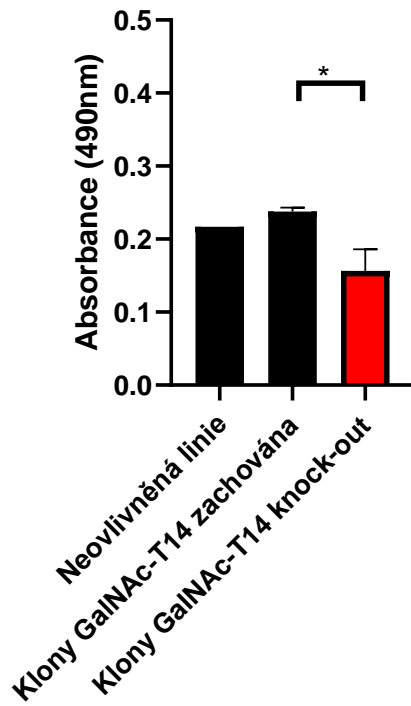


Obrázek 21. **Imunodetekce GalNAc-T14.** Na základě imunodetekce GalNAc-T14 byly selektovány buněčné klony s knock-outem v genu pro *GALNT14*. U klonů č. 1, 2, 3 a 5 došlo ke ztrátě produkce GalNAc-T14, zatímco u klonu 4 a 6 zůstala exprese GalNAc-T14 zachována.



Obrázek 22. **Výsledky sekvenace klonů vybraných pro analýzu produkce Gd-IgA1.** Sekvenace potvrdila delecii s posunem ve čtecím rámci v oblasti exonu *GALNT14* na pozici chr.2 30945859. U klonu KO 2C1 mutace spočívala v rozsáhlejší delecii 126 párů bází.

## sekrece Gd-IgA1



Obrázek 23. Analýza sekrece Gd-IgA1. U klonů s knock-outem v genu pro *GALNT14* došlo k poklesu produkce Gd-IgA1. Byla srovnávána produkce Gd-IgA1 mezi třemi klony s knock-outem *GALNT14*, třemi klony se zachovanou expresí GalNAc-T14 a s původní neovlivněnou linií Dakiki. (chybové úsečky značí směrodatnou odchylku mezi hodnotami tří klonů, pro statistické vyhodnocení byl použit jednofaktorový ANOVA test s Tukey post-hoc testem, \*  $p < 0,05$ ).

## 6 Analýza exprese vybraných glykosyltransferáz v buněčných subpopulacích z periferní krve.

### 6.1 Metodika

#### 6.1.1 Soubor analyzovaných vzorků

Vzorky periferní krve byly odebrány 10-ti pacientům s IgA nefropatií na oddělení Nefrologie III. Interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a 10-ti zdravým dárčům na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Účastníci studie podepsali informovaný souhlas s odběrem vzorku. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc. Pacientům bylo odebráno 16 ml krve do odběrových zkumavek Vacuette s EDTA. Od zdravých dárců byl pro izolaci mononukleárních buněk použit buněčný koncentrát („buffy coat“), který zbyl po darování krve do krevní banky a následné izolaci plazmy. Pacientům i zdravým dárčům byl navíc odebrán vzorek krve pro přípravu séra. Charakteristika skupiny pacientů s IgA nefropatií a zdravých dárců je popsána v Tabulce 21.

**Tabulka 21.** Charakteristika kohorty pacientů a zdravých dárců.

Charakteristika	IgAN	HC
Celkový počet jedinců	10	10
Počet žen	4	4
Věk	48,6 ± 14,70	40,7 ± 10,11
Krevní tlak (ST/DT, průměrné hodnoty) (mmHg)	132/79	ND
Progrese onemocnění (počet jedinců)	2	ND
eGFR (ml/s na 1.73 m <sup>2</sup> )	0,88 ± 0,28	ND
Proteinurie (g/den)	0,8 ± 0,6	ND
Poměr albumin/kreatinin v moči (mg/mmol)	45,0 ± 61,2	ND
Hematurie (Ery/μL)	19,5 ± 24,0	ND
Léčba RAS blokátory (počet jedinců)	10	0
Léčba glukokortikoidy (počet jedinců)	1	0

(Progrese onemocnění byla definována jako pokles eGFR > 10%/rok. Pro terapii glukokortikoidy byl použit prednison. Vybrané hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnot ± SD. IgAN, pacienti s IgA nefropatií; HC zdraví dárči; ND, neuvedeno; ST, systolický tlak; DT, diastolický tlak; eGFR, odhadovaná rychlost glomerulární filtrace; Ery, erytrocyty.)

### 6.1.2 Příprava a uchování séra

Vzorek krve pro přípravu séra byl pacientům odebrán do zkumavek Vacuette se separačním gelem. Vzorky byly ponechány 30 min při laboratorní teplotě. Poté byly centrifugovány 10 min při 2000 g. Sérum bylo odebráno do nových zkumavek a uchováno při teplotě -80 °C.

### 6.1.3 Stanovení koncentrace IgA a Gd-IgA1 v séru (po desialylaci IgA1)

Postup stanovení koncentrace IgA v séru je analogický jako u stanovení koncentrace IgA v supernatantu buněčné kultury (5.1.7). Sérum bylo ředěno v blokovacím pufru 150 000x, nanášeno v triplikátech do 96 jamkového panelu a následně ještě dále sériově ředěno.

Stanovení Gd-IgA1 v séru metodou ELISA probíhalo v sandwichovém uspořádání. Na 96 jamkovou desku byl navázán kozí F(ab')<sub>2</sub> fragment protilátky specifické proti lidskému imunoglobulinu A (Jackson ImmunoResearch, 0,25 µg protilátky ředěné v PBS na jamku), inkubace probíhala přes noc za laboratorní teploty. Poté byly panely blokovány 1% BSA, (Sigma-Aldrich, Merck) v PBS s 0,05% Tweenem 20. Blokování probíhalo 3 h za laboratorní teploty. Po promytí PBS byly do jamek nanášeny vzorky. Vzorky séra byly ředěny v blokovacím pufru 2 000x a následně ředěny faktorem 3. Pro vyhodnocení bylo použito ředění séra 18 000x. Jako standard pro ověření shodné reaktivity jednotlivých panelů bylo použito myelomové IgA1 s popsanou galaktózovou deficiencí (40 ng/ jamka) (Moldoveanu et al., 2007). Inkubace se vzorky probíhala 3 h za laboratorní teploty. Panely byly promyty 5x PBS s 0,05% Tweenem 20 a 1x 50 mM fosfátovým pufru (pH = 6). Navázané IgA ze vzorků bylo ošetřeno sialidasou A (GK80040, Agilent) ředěnou v 50 mM fosfátovém pufru (pH = 6) v poměru 1:2 500 3 h při 37 °C. Po promytí PBS s 0,05% Tweenem 20 byly panely inkubovány s monoklonální protilátkou 35A12 specifickou proti Gd-IgA1 (inkubace probíhala přes noc při 4 °C). Panely promyté PBS s 0,05% Tweenem 20 byly inkubovány se sekundární protilátkou anti-myší IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich, Merck) ředěnou 1:2 000 v blokovacím pufru (3h, laboratorní teplota). Reakce byla vyvolána přidáním *O*-phenylenediamin dihydrochloridu s peroxidem vodíku a po 7 min zastavena přidáním 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance byla měřena při 490 nm na přístroji Synergy HTX (BioTek).

#### 6.1.4 Izolace mononukleárních buněk z periferní krve

Izolace mononukleárních buněk z čerstvé periferní krve pacientů s IgA nefropatií probíhala stejným způsobem jako v sekci 4.1.2. Při izolaci mononukleárních buněk od zdravých dárců bylo použito 6 ml buněčného koncentrátu z „buffy coatu“. Koncentrát byl naředěn 1:3 v PBS, nanesen na vrstvu hustotního gradientu 1.077 g/m Ficoll-Paque PLUS a centrifugován při zrychlení 400 g, 40 min, při laboratorní teplotě. Prstenec s mononukleárními buňkami byl přenesen do čisté 50 ml zkumavky, buňky byly promyty PBS a centrifugovány na 300 g, 10 min. Poté byla peleta promyta PBS a stočena při 200 g 20 min, následovalo poslední promytí s centrifugací při 200 g, 15 min. Peleta byla resuspendována v 900  $\mu$ l 2% FBS v PBS. Přibližně  $3 \times 10^5$  buněk bylo odebráno, promyto a resuspendováno ve 300  $\mu$ l lyzačního pufru RLT (Qiagen) pro izolaci RNA. Ze zbylých buněk byly tříděny populace lymfocytů.

#### 6.1.5 Značení buněčných populací

Nespecifické vazby byly zablokovány inkubací buněk s 10% lidským sérem v PBS po dobu 10 min. Po promytí byly buněčné subpopulace T lymfocytů, B lymfocytů a IgA<sup>+</sup> B lymfocytů značeny protilátkami Brilliant Violet 510 anti-human CD3 (SONY Biotechnology), PE-CF594 Mouse Anti-Human CD19 (BD Biosciences,) a kozím F(ab')<sub>2</sub> fragmentem specifickým pro lidské IgA (Jackson ImmunoResearch) konjugovaným s fluoroforem Pacific Blue (Thermo Fisher Scientific). Značení probíhalo v roztoku 5% FBS v PBS 30 min ve tmě. Po promytí byly buňky resuspendovány ve 2 ml roztoku 2% FBS, 2 mM EDTA v PBS.

#### 6.1.6 Třídění buněčných populací

Buněčná suspenze byla přefiltrována přes buněčný filtr CellTrics s velikostí pórů 30  $\mu$ m (Sysmex). Značené buněčné populace byly vytříděny pomocí přístroje SH800 Cell Sorter (SONY Biotechnology). Subpopulace T lymfocytů, B lymfocytů a IgA<sup>+</sup> B lymfocytů byly vytříděny do samostatných zkumavek, promyty a resuspendovány ve 300  $\mu$ l lyzačního pufru RLT (Qiagen). Vzorky byly zamrazeny na -80 °C pro pozdější izolaci RNA. Z alikvotu vytříděných buněk byla provedena post-sort analýza za účelem ověření identity buněčné populace. Strategie třídění buněk je znázorněna v Příloze 5.



### 6.1.7 Analýza exprese genů pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)

RNA byla z buněčného lyzátu izolovaná pomocí RNeasy Micro Kitu (Qiagen) dle manuálu výrobce. Zachycená RNA byla eluována do 14  $\mu$ l „RNase-free“ vody. Koncentrace a integrita RNA byla stanovena spektrofotometricky na přístroji Synergy HTX (BioTek). Genomická DNA byla odstraněna pomocí ezDNase Enzyme (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) a čistá RNA byla přepsána do cDNA pomocí reverzní transkriptázy SuperScript IV (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) v termocykleru Biometra TOne (Analytik Jena). Složení reakce a průběh reverzní transkripce je definován v Tabulce 22. Analýza exprese vybraných glykosyltransferáz byla provedena analogicky jako v sekci 4.1.4.

**Tabulka 22.** Průběh reverzní transkripce s reverzní transkriptázou SuperScript IV.

<b>Složka</b>	<b>množství</b>
10x ezDNase pufr	1,15 $\mu$ l
Enzym ezDNase	1,15 $\mu$ l
eluovaná RNA	9,2 $\mu$ l
inkubace 37 °C 2 min, následně zchlazení na ledu	
100 $\mu$ M oligo(dT) <sub>20</sub>	0,5 $\mu$ l
10 mM dNTP Mix	1 $\mu$ l
inkubace 65 °C, 5 min, poté zchlazeno na ledu	
5x SS IV Buffer	4 $\mu$ l
0,1 M DTT	1 $\mu$ l
Enzym RNase inhibitor	1 $\mu$ l
Enzym SuperScript IV	1 $\mu$ l
inkubace 53 °C, 10 min	
inkubace 80 °C, 10 min	
zchlazeno na 4 °C	

## 6.2 Výsledky

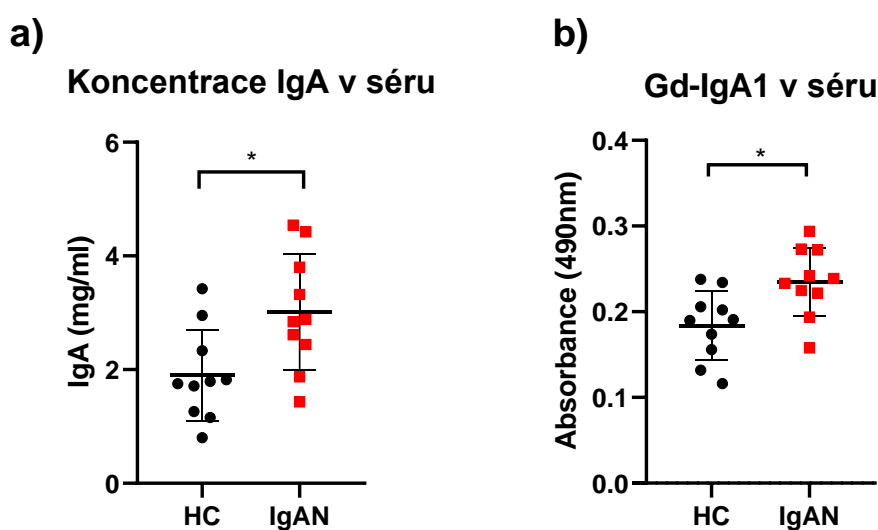
Za účelem rozšíření poznatků o expresi glykosyltransferáz v buňkách periferní krve (viz sekce 4) a zjištění, která subpopulace je zodpovědná za expresi konkrétních glykosyltransferáz, byly na nových vzorcích analyzovány hladiny mRNA jednotlivých glykosyltransferáz v subpopulacích T lymfocytů, B lymfocytů a IgA<sup>+</sup> B lymfocytů (čistota vytríděných buněčných populací je vyhodnocena v Tabulce 23). U této kohorty čítající deset pacientů s IgA nefropatií a deset zdravých dárců byla rovněž stanovena koncentrace IgA a hladina Gd-IgA1 v séru (Obrázek 24). Průměrná koncentrace IgA dosahovala u pacientů s IgA nefropatií 3,0 mg/ml, zatímco u zdravých dárců pouze 1,9 mg/ml ( $p = 0,014$ ). Hladiny Gd-IgA1 byly u pacientů s IgA nefropatií vyšší v průměru o jednu třetinu ( $p = 0,024$ ) (Obrázek 24).

Obrázek 25 znázorňuje distribuci exprese glykosyltransferáz v buněčných populacích souhrnně ve všech vzorcích od pacientů s IgA nefropatií i zdravých dárců. Základní distribuce se mezi pacienty a kontrolami nelišila. Gen pro glykosyltransferázu *GALNT2*, která je považována za hlavní enzym připojující GalNAc na pantovou oblast IgA1, je exprimován jak v T lymfocytech, tak srovnatelnou měrou i v B lymfocytech. V IgA<sup>+</sup> B lymfocytech však byla průměrná hladina exprese 3x nižší oproti celkové populaci B lymfocytů. Naproti tomu exprese *GALNT14* byla pod detekčním limitem v T lymfocytech, zato byla vysoce exprimována v B lymfocytech, a ještě více v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech, což podporuje její zapojení v glykosylaci IgA1.

Expresí *C1GALT1*, *C1GALT1C1* i *ST6GALNAC2* byla detekována ve všech analyzovaných subpopulacích. Gen *C1GALT1* vykazoval obzvláště vysokou expresi v B lymfocytech. Dále byla porovnávána exprese glykosyltransferáz mezi pacienty a zdravými dárci v subpopulacích B lymfocytů (Obrázek 26). Mírné snížení v expresi *GALNT2* bylo patrné u pacientů s IgA nefropatií jak v B lymfocytech, tak i přímo v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech, což by opět mohlo zvyšovat význam *GALNT14* v glykosylaci IgA1 u pacientů.

Rozdíly mezi pacienty a kontrolami byly pozorovány v expresi *C1GALT1*. Statisticky významné snížení vykazovaly IgA<sup>+</sup> B lymfocyty ( $p = 0,023$ ) pacientů s IgA nefropatií. Produktem tohoto genu je glykosyltransferáza C1GalT1, která připojuje galaktózu na GalNAc v pantové oblasti IgA1. Její snížená exprese může souviset se

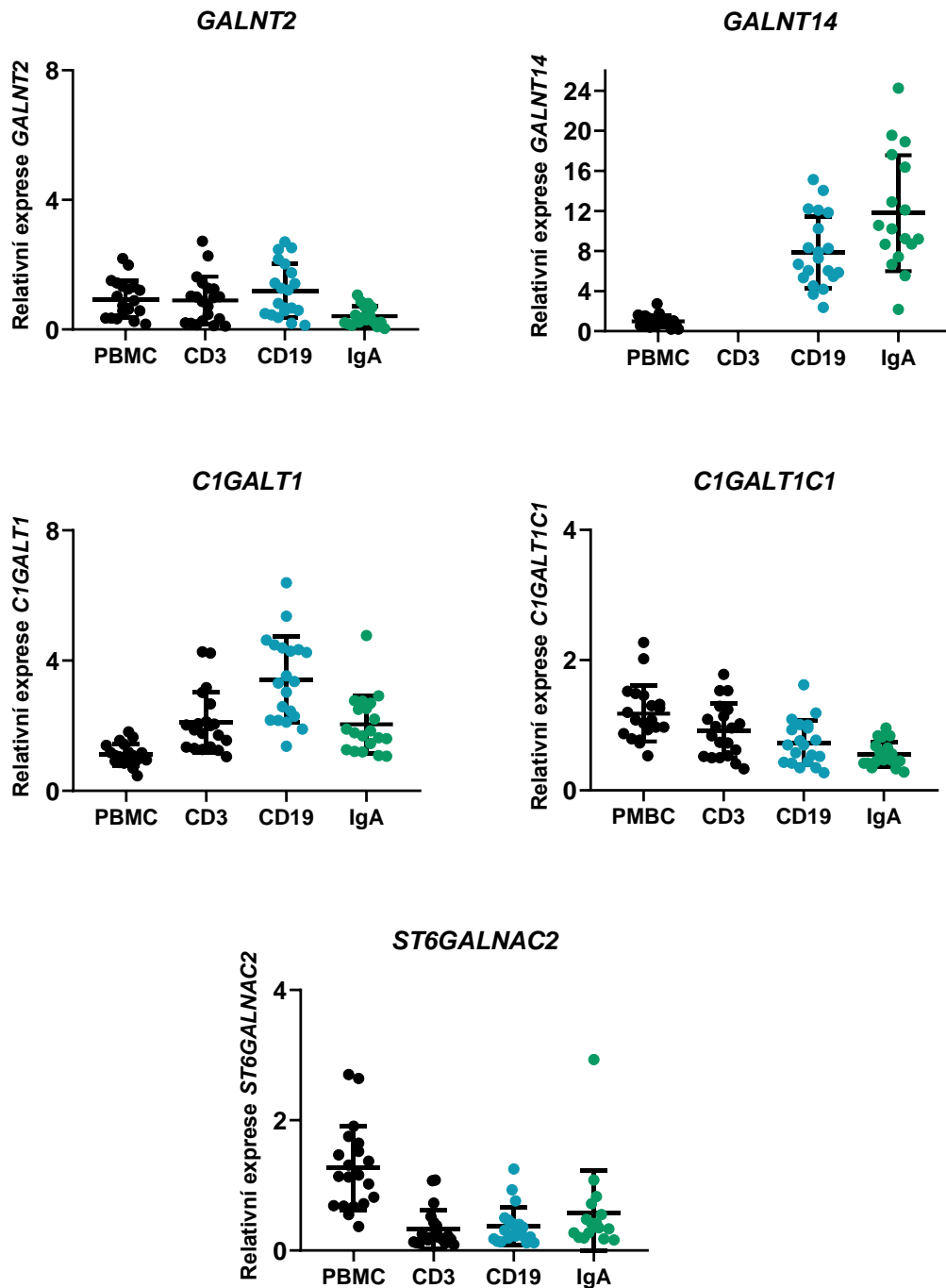
sníženou galaktosylací IgA1, tedy tvorbou Gd-IgA1. Byl proto sledován vztah mezi expresí *CIGALT1* v B lymfocytech a hladinou Gd-IgA1 v séru ve vzorcích pacientů i kontrol (Obrázek 27). Korelace mezi těmito veličinami byla statisticky významná jak v B lymfocytech ( $p = 0,022$ ), tak i přímo v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech ( $p = 0,046$ ). Potvrdilo se tedy, že snížení exprese *CIGALT1* v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech u pacientů s IgA nefropatií souvisí s mírou produkce Gd-IgA1 v séru.



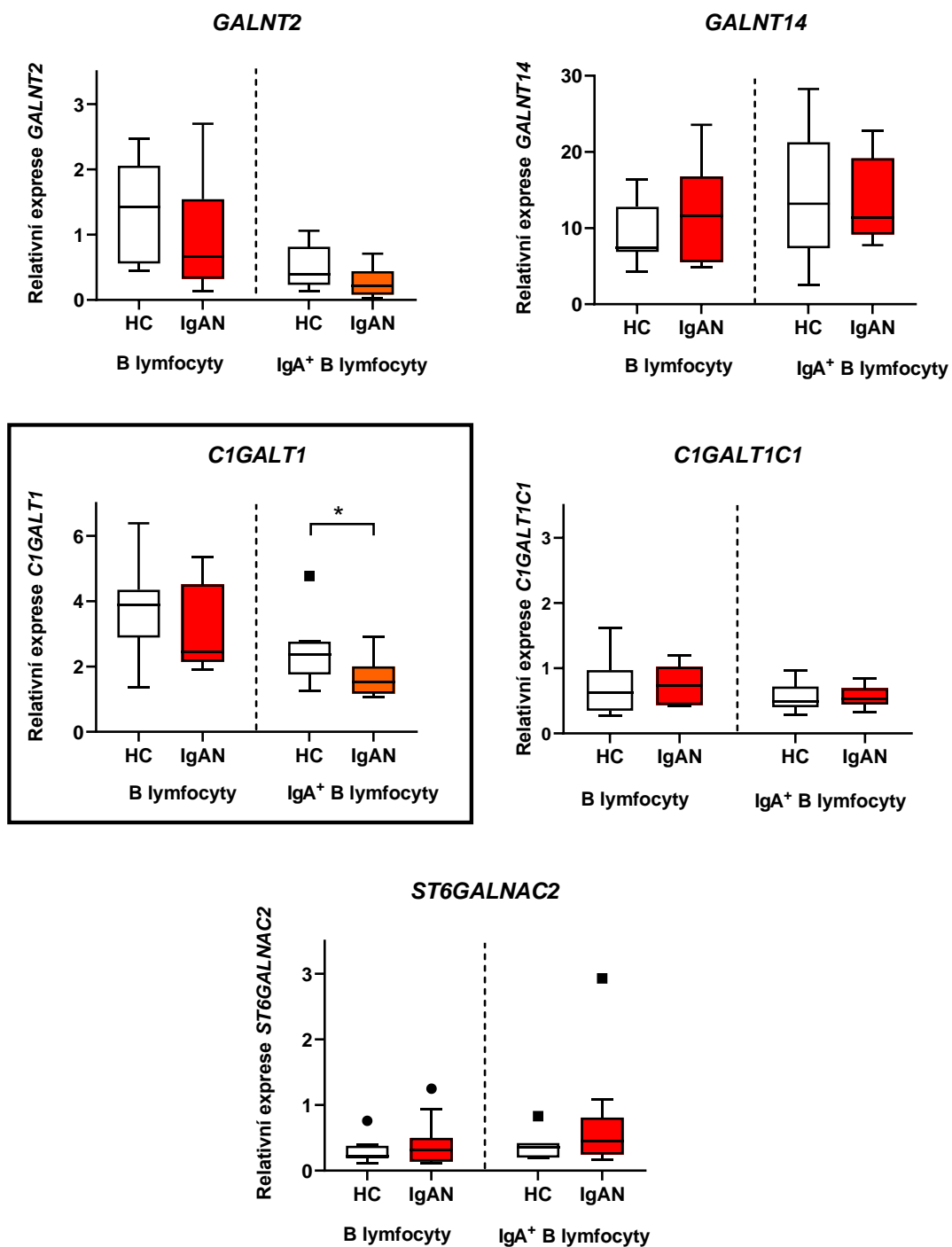
Obrázek 24. Hladiny IgA a Gd-IgA1 jsou v séru u pacientů s IgA nefropatií zvýšené. Koncentrace IgA v séru a hladina Gd-IgA1 byla stanovena u deseti pacientů s IgA nefropatií (IgAN) a deseti zdravých dárců (HC) pomocí metody ELISA. Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test, \*  $p < 0,05$ . Horizontální úsečky značí průměrné hodnoty, chybové úsečky směrodatnou odchylku.

Tabulka 23. Ověření čistoty vyříděných populací při post-sort analýze

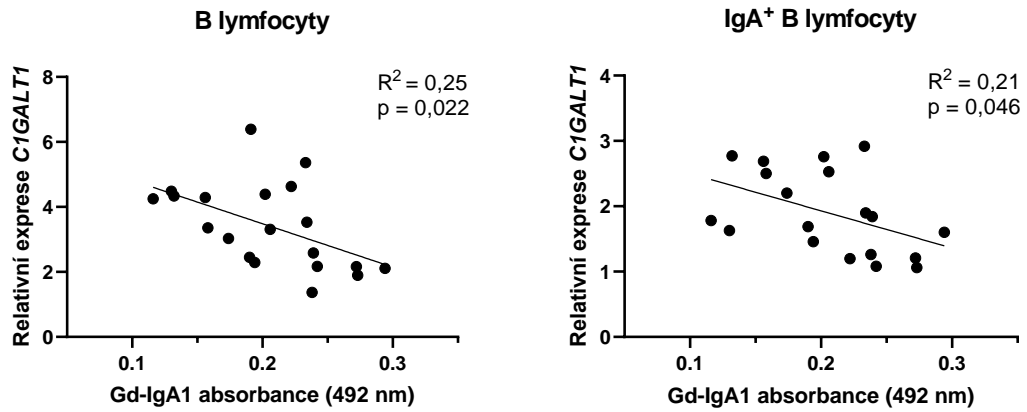
Populace	Zastoupení (%)	Směrodatná odchylka
T lymfocyty	98,11	1,48
B lymfocyty	96,42	2,22
IgA <sup>+</sup> B lymfocyty	78,79	7,09



Obrázek 25. Souhrnné výsledky exprese glykosyltransferáz v buněčných subpopulacích z periferní krve celého souboru vzorků (pacientů i zdravých dárců dohromady). PBMC – mononukleární buňky periferní krve, CD3 – T lymfocyty, CD19 – B lymfocyty, IgA – IgA<sup>+</sup> B lymfocyty. Relativní exprese genů byla vztažena na průměrnou hladinou exprese konkrétní glykosyltransferázy v PBMC zdravých jedinců. Horizontální úsečky značí průměrné hodnoty, chybové úsečky směrodatnou odchylku.



Obrázek 26. Rozdíly v expresi glykosyltransferáz mezi pacienty s IgA nefropatií (IgAN) a zdravými kontrolami (HC) v B lymfocytech a v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech. U pacientů s IgA nefropatií je patrná snížená exprese *C1GALT1*. Pro statistické vyhodnocení byl použit Mann-Whitney test, \*  $p < 0,05$ . Horizontální úsečky značí medián, chybové úsečky značí minimální a maximální hodnotu, odlehle hodnoty jsou znázorněny jako body.



Obrázek 27. **Expresse genu *C1GALT1* souvisí s množstvím Gd-IgA1 v séru.** Vyjádření korelace mezi expresí glykosyltransferázy *C1GALT1* a zastoupením Gd-IgA1 v séru u všech vzorků (pacienti s IgA nefropatií i zdraví dárce). (Hodnota p vyjadřuje pravděpodobnost, že sklon regresní přímky je 0.)

## 7 DISKUSE

Ke změnám v *O*-glykosylaci proteinů dochází během patogeneze různých onemocnění, doprovázejí maligní transformaci nádorových buněk a jsou pozorovány mimo jiné i u autoimunitních onemocnění jako je ulcerózní kolitida, Crohnova choroba nebo revmatoidní artritida (Reily et al., 2019; Kudelka et al., 2020; Mueller et al., 2021). Změny v glykosylaci pantové oblasti IgA1 u IgA nefropatie byly poprvé pozorovány v 90. letech (Andre et al., 1990; Městecký et al., 1993; Allen et al., 1995; Městecký et al., 2016;). Později byla potvrzena snížená galaktosylace IgA1 v séru u pacientů s IgA nefropatií (Moldoveanu et al., 2007). Od té doby je tvorba Gd-IgA1 intenzivně zkoumána a snažíme se přijít na to, proč se u pacientů s IgA nefropatií vyskytuje Gd-IgA1 v nadměrném množství.

Změny v *O*-glykosylaci bývají vyvolány změnami v expresi glykosyltransferáz, tedy enzymů, které připojují jednotlivé cukry na peptidový řetězec. *O*-glykosylace IgA1 je zahájena připojením *N*-acetylgalaktosaminu do pantové oblasti pomocí GalNAc-transferáz. Rodina GalNAc-transferáz čítá 20 enzymů, nicméně za hlavní enzym glykosylující IgA1 byla považována GalNAc-T2 (Iwasaki et al., 2003). Ukázalo se však, že pro některé pozice v pantové oblasti vykazuje GalNAc-T2 sníženou enzymatickou aktivitu (Stewart et al., 2019), tato místa by tedy mohla být GalNAcosylována jinými enzymy. V *in vitro* experimentech byla rovněž potvrzena schopnost GalNAc-T14 glykosylovat IgA1 (Stewart et al., 2021).

Analýza exprese genů rodiny GalNAc-transferáz v buněčných liniích produkujících IgA1 ukázala, že v liniích původem od pacientů s IgA nefropatií je jako jediná výrazně zvýšená hladina mRNA *GALNT14* a tato anomálie byla pozorována na modelových buněčných liniích i v předložené disertační práci (Obrázek 14) (Raška et al., 2012). V této práci byla navíc stanovena exprese vybraných glykosyltransferáz přímo v primárních buňkách z periferní krve od pacientů a zdravých dárců, a i zde byla pozorována výrazně zvýšená hladina *GALNT14* (Obrázek 8), zatímco hladina *GALNT2* byla u pacientů i kontrol srovnatelná.

U pacientů s IgA nefropatií v některých případech dochází k epizodám makroskopické hematurie, která následuje po prodělání infekcí horních cest dýchacích nebo gastrointestinálního traktu. Hladiny IL-6 se v průběhu infekce zvyšují a IL-6 působí v tomto případě jako prozánětlivý cytokin (Groza et al., 2022). Použitím IL-6

při *in vitro* stimulacích navozujeme prostředí mimikující zánět či probíhající infekci. Působení IL-6 bylo prozkoumáno u modelových buněčných linií od pacientů s IgA nefropatií, kde se ukázalo že dochází ke změně exprese některých glykosyltransferáz, následně se zvyšuje produkce Gd-IgA1 a tato odpověď je protražovaná oproti analogickým buňkám od zdravých dárců (Suzuki et al., 2014; Yamada et al., 2017). Já jsem pozorovala po stimulaci primárních buněk interleukinem-6 výrazný nárůst v expresi *GALNT14*, a to jak u patientských tak i kontrolních vzorků (Obrázek 9). Hladiny *GALNT2* působením interleukinu-6 ovlivněny nebyly.

Dílní výsledky předložené dizertační práce naznačují, že pacienti užívající kortikosteroidní terapii vykazují ještě vyšší expresi *GALNT14* než pacienti bez této terapie (Obrázek 10). Zdali to souvisí přímo s terapií anebo spíše s tím, že se jedná o podskupinu pacientů s celkově horším klinickým obrazem, nelze rozhodnout vzhledem k faktu, že nebyla dostupná dostatečně velká skupina pacientů indikovaných ke kortikosteroidní terapii před jejím zahájením. Je rovněž možné, že pacienti s horším klinickým obrazem, mají zvýšené hladiny IL-6 v séru, a to ovlivňuje expresi *GALNT14* (Segarra-Medrano et al., 2017). Na druhou stranu však u pacientů zaléčených kortikoidy nedocházelo k tak výraznému nárůstu *GALNT14* po stimulaci IL-6, což pravděpodobně souvisí s imunosupresivním a protizánětlivým působením kortikoidů. Na případu jednoho pacienta, sledovaného v čase po zahájení kortikosteroidní terapie se ukázalo, že se po 4 měsících léčby výrazně snížil nárůst exprese *GALNT14* po stimulaci IL-6 ve srovnání se stavem na počátku terapie (Obrázek 10). Nicméně je nutné připustit, že tento pacient nebyl zcela typický, došlo u něj k rozvoji IgA nefropatie v souvislosti s podáním biologické léčby anti-TNF $\alpha$  při ulcerózní kolitidě. Pro ověření hypotézy, že kortikosteroidy účinně inhibují nárůst exprese *GALNT14* v zánětlivém prostředí by bylo nutné provést další experimenty. Potom by to mohlo být jedním z vysvětlení, jak léčba kortikoidy snižuje produkci Gd-IgA1 (Kosztyu et al., 2018).

Funkční experimenty na modelových buněčných liniích ukázaly, že umělé zvýšení exprese *GALNT14* vede ke zvýšení produkce Gd-IgA1. To bylo nejvýraznější u linie Dakiki a linie původem od pacienta s IgA nefropatií, mírný nárůst v produkci Gd-IgA1 byla ale pozorována i u linie původem od zdravého dárce (Obrázek 17). Naopak snížení exprese *GALNT14* navozené pomocí siRNA vedlo ke snížení produkce Gd-IgA1 (Obrázek 19). Stejně tak buněčné klony s knock-outem v genu pro *GALNT14*



vytvořené metodou CRISPR/Cas9 produkovaly méně Gd-IgA1 (Obrázek 23). Bylo tedy prokázáno, že změny v hladině *GALNT14* ovlivňují produkci Gd-IgA1.

Kromě sekrece Gd-IgA1 jsem se také zaměřila na povrchovou expresi Gd-IgA1 na buňkách po zvýšení hladiny *GALNT14*. Přestože u všech linií došlo k mírnému zvýšení povrchové exprese Gd-IgA1, pouze u linie připravené od pacienta s IgA nefropatií došlo i k nárůstu poměru Gd-IgA1/IgA1 na povrchu buněk (Obrázek 18). Je možné, že pouze u pacientské linie je narušen některý regulační mechanismus v expresi Gd-IgA1 na povrchu buněk a u linie od zdravého dárce a linie Dakiki výsledek spíše odráží expresi celkového množství povrchového IgA, které po zvýšení hladiny *GALNT14* rovněž rostlo.

Analýza exprese vybraných glykosyltransferáz v buněčných subpopulacích T lymfocytů, B lymfocytů a IgA<sup>+</sup> B lymfocytů ukázala, že gen pro *GALNT14* je exprimován ve vysoké míře v B lymfocytech a ještě více v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech, zatímco v T lymfocytech byla exprese pod detekčním limitem (Obrázek 25). Vyplývá z toho tedy, že za dominanci exprese *GALNT14* v mononukleárních buňkách periferní krve je zodpovědná zejména populace B lymfocytů. U druhé kohorty pacientů popsané v kapitole 6 nedosahoval rozdíl v expresi *GALNT14* signifikantních hodnot ve srovnání se zdravými dárci (Obrázek 26). Příčinou je velký rozptyl detekovaných hladin mRNA a zřejmě i odlišnosti ve složení obou kohort. Zatímco u první kohorty pacientů s IgA nefropatií byla kortikoidy léčena polovina pacientů u druhé kohorty to byl pouze 1 pacient. V prvním případě právě skupina pacientů léčených kortikoidy vykazovala vyšší hladiny *GALNT14* (Obrázek 10). Exprese *GALNT2* byla detekována v T lymfocytech i v B lymfocytech. V IgA<sup>+</sup> subpopulaci B lymfocytů byla však exprese *GALNT2* výrazně nižší (Obrázek 25). Toto pozorování může opět naznačovat důležitost GalNAc-T14 v glykosylaci IgA1.

Exprese *CIGALTI* byla snížena v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech pacientů s IgA nefropatií a její hladiny do jisté míry korelovaly s přítomností Gd-IgA1 v séru (Obrázek 26 a Obrázek 27). V roce 2017 byla publikována GWAS studie, která identifikovala SNP v genu *CIGALTI* související se sníženou expresí tohoto genu u pacientů s IgA nefropatií (Kiryluk et al., 2017). Hladina mRNA *CIGALTI* může být regulována i na úrovni epigenetiky působením mikroRNA miR-148b, jejíž exprese je zvýšená v buňkách periferní krve pacientů s IgA nefropatií (Pirulli et al., 2009; Serino et al., 2012). Snížená exprese *CIGALTI* byla pozorována v IgA1 produkujících buněčných

liniích izolovaných z periferní krve pacientů s IgA nefropatií (Suzuki et al., 2008a), a také v B lymfocytech periferní krve pacientů s IgA nefropatií (Xing et al., 2020). V této disertační práci však bylo snížení exprese *C1GALT1* potvrzeno přímo v IgA<sup>+</sup> buňkách. Ještě průkaznější by bylo stanovení exprese v Gd-IgA1<sup>+</sup> buňkách, nicméně jejich zastoupení je v periferní krvi tak nízké, že zatím nebylo možné provést spolehlivě tuto analýzu. Je pravděpodobné, že snížená exprese *C1GALT1* v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech u pacientů s IgA nefropatií vede k nižší galaktosylaci, a tedy k produkci Gd-IgA1.

V buňkách periferní krve jsem rovněž pozorovala vyšší expresi *ST6GALNAC2* u pacientů s IgA nefropatií (Obrázek 8). Zvýšenou expresi a aktivitu tohoto enzymu vykazovaly i modelové buněčné linie izolované z periferní krve pacientů s IgA nefropatií (Raška et al., 2007; Suzuki et al., 2008a). Předpokládá se, že zvýšené hladiny *ST6GALNAC2* mohou vézt k předčasné sialylaci glykanů v pantové oblasti, které už následně nemohou být galaktosylovány. U genu *C1GALT1C1* jsem pozorovala mírně zvýšenou expresi v mononukleárech periferní krve u pacientů a jeho exprese se zvyšovala po stimulaci interleukinem-6 (Obrázek 8 a Obrázek 9). Avšak v modelových liniích byl pozorován opačný efekt (Suzuki et al., 2008a; Suzuki et al., 2014). V subpopulacích B lymfocytů rozdíl v expresi *C1GALT1C1* mezi pacienty s IgA nefropatií a kontrolami pozorován nebyl (Obrázek 26). Produktem genu pro *C1GALT1C1* je šaperon Cosmc, který je nezbytný pro správné skládání proteinu C1GalT1. Vzhledem k tomu, že tvorba Gd-IgA1 souvisí s hladinou mRNA *C1GALT1* (Obrázek 27), je pravděpodobné, že právě tento enzym z dvojice C1GalT1 a Cosmc je limitující složkou při snížené galaktosylaci molekul IgA1.

Změny v hladinách GalNAc-T14, C1GalT1 a ST6GalNAc-II mohou přispívat ke zvýšené produkci Gd-IgA1 u IgA nefropatie. Zda-li deregulace hladin těchto glykosyltransferáz působí samostatně nebo aditivně zatím nebylo ověřeno. Zvýšená hladina GalNAc-T14 navozená interleukinem-6 při infekci by mohla vést ke zvýšení hustoty *N*-acetylgalaktosaminů v pantové oblasti IgA1, mohla by tak být překročena kapacita C1GalT1 galaktosylovat většinu těchto glykanů anebo by volné *N*-acetylgalaktosaminové zbytky mohly být zablokovány kyselinou sialovou pomocí ST6GalNAc-II. Některé studie však naznačují, že celkový počet *O*-glykanových zbytků v pantové oblasti sérového IgA1 je spíše nižší u pacientů s IgA nefropatií (Nakazawa et al., 2019b., Yu et al., 2021). Toto pozorování by mohlo být vysvětleno

narušením rovnováhy mezi enzymy GalNAc-T14 a GalNAc-T2, kdy každý z nich vykazuje rozdílnou schopnost připojovat konkrétní počet *N*-acetylgalaktosaminů do pantové oblasti. *In vitro* experimenty ukázaly, že enzym GalNAc-T2 je schopen připojit až 6 *N*-acetylgalaktosaminových zbytků do pantové oblasti IgA1, zatímco GalNAc-T14 pouze 2-4 v závislosti na reakčních podmínkách (Stewart et al., 2021). Proč by se však na tento nižší počet *N*-acetylgalaktosaminů připojovala hůře galaktóza je předmětem spekulací. Jednou z možností je, že vlivem zvýšené hladiny GalNAc-T14 by mohl být blokován přístup galaktosyltransferáze C1GalT1 k pantové oblasti IgA1. Kromě toho by také GalNAc-T14 mohla připojovat *N*-acetylgalaktosamin v polohách, které jsou galaktosylovány s nižší účinností. Ve všech případech by tak mohlo vznikat abnormálně glykosylované IgA1, které slouží jako autoantigen při tvorbě imunitních komplexů. Je rovněž možné, že IgA nefropatie je heterogenní onemocnění a u různých skupin pacientů se mohou uplatňovat různé mechanismy tvorby Gd-IgA1. Tyto otázky je třeba zodpovědět dalším výzkumem.

## 8 ZÁVĚR

U modelových buněčných linií původem od pacientů s IgA nefropatií byla dříve pozorována deregulace hladin glykosyltransferáz GalNAc-T14, C1GalT1 a ST6GalNAc-II, které se účastní *O*-glykosylace IgA1. V této práci jsem prokázala, že u pacientů s IgA nefropatií jsou v buňkách periferní krve hladiny mRNA GalNAc-T14 výrazně zvýšené a v zánětlivém prostředí navozeném interleukinem-6 ještě rostou. Na modelových buněčných liniích se potom potvrdilo, že změny hladiny GalNAc-T14 přímo ovlivňují produkci Gd-IgA1. Vysoká hladina GalNAc-T14 v buňkách periferní krve může být jedním z patologických mechanismů zvýšené tvorby Gd-IgA1 u pacientů z IgA nefropatií.

V druhém kroku glykosylace IgA1 připojuje enzym C1GalT1 galaktózu do pantové oblasti. Prokázala jsem, že exprese *C1GALT1* je v IgA<sup>+</sup> B lymfocytech výrazně snižena a její hladiny odráží míru produkce Gd-IgA1 v séru. V posledním kroku syntézy *O*-glykanů v pantové oblasti je připojována kyselina sialová pomocí ST6GalNAc-II. Hladiny její mRNA byly v buňkách periferní krve u pacientů zvýšené. Tato glykosyltransferáza může předčasnou sialylací N-acetylgalaktosaminu zabránit následnému připojení galaktózy.

Tyto poznatky přispívají k porozumění mechanismům tvorby abnormálně glykosylovaného IgA1, které je klíčovým autoantigenem v patogenezi IgA nefropatie. Zvýšená produkce Gd-IgA1 u pacientů s IgA nefropatií souvisí se změnami v hladinách enzymů GalNAc-T14, C1GalT1 a ST6GalNAc-II. Cílené ovlivnění exprese těchto glykosyltransferáz by potenciálně mohlo představovat jeden z terapeutických přístupů ke specifické léčbě IgA nefropatie.

## 9 CITOVANÁ LITERATURA

- Abboud, H.E. 2012. Mesangial cell biology. *Experimental cell research* 318:979-985.
- Allen, A.C., E.M. Bailey, P.E. Brenchley, K.S. Buck, J. Barratt, and J. Feehally. 2001. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney international* 60:969-973.
- Allen, A.C., S.J. Harper, and J. Feehally. 1995. Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy. *Clinical and experimental immunology* 100:470-474.
- Andre, P.M., P. Le Pogamp, and D. Chevet. 1990. Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy. *Journal of clinical laboratory analysis* 4:115-119.
- Ansari, M., P.M. McKeigue, C. Skerka, C. Hayward, I. Rudan, V. Vitart, O. Polasek, A.M. Armbrecht, J.R. Yates, Z. Vatauvuk, G. Bencic, I. Kolcic, B.A. Oostra, C.M. Van Duijn, S. Campbell, C.M. Stanton, J. Huffman, X. Shu, J.C. Khan, H. Shahid, S.P. Harding, P.N. Bishop, I.J. Deary, A.T. Moore, B. Dhillon, P. Rudan, P.F. Zipfel, R.B. Sim, N.D. Hastie, H. Campbell, and A.F. Wright. 2013. Genetic influences on plasma CFH and CFHR1 concentrations and their role in susceptibility to age-related macular degeneration. *Human molecular genetics* 22:4857-4869.
- Baenziger, J., and S. Kornfeld. 1974. Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. *The Journal of biological chemistry* 249:7270-7281.
- Barbour, S.J., G. Espino-Hernandez, H.N. Reich, R. Coppo, I.S. Roberts, J. Feehally, A.M. Herzenberg, D.C. Cattran, N.A.V. Oxford Derivation, V. Consortia, V. Oxford Derivation North American, and V. Consortia. 2016. The MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. *Kidney international* 89:167-175.
- Barbour, S.J., and H.N. Reich. 2012. Risk stratification of patients with IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 59:865-873.
- Barratt, J., B. Hour, C. Sibley, A. Mittan, S. Roy, C. Stromatt, A. Endsley, J. Lo, and A. Glicklich. 2021a. FC 040 Interim results of phase 1 and 2 trials to investigate the safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity of Bion-1301 in patients with IgA nephropathy (Abstract). *Nephrology Dialysis Transplantation* 36:i27-i28
- Barratt, J., A. Stone, and J. Kristensen. 2021b. POS-830 Nefecon for the treatment of IgA nephropathy in patients at risk of progressing to end-stage renal disease: the NEFIGARD phase 3 trial results (Abstract). *Kidney international reports* 6:S361.
- Barratt, J., J.A. Tumlin, Y. Suzuki, A. Kao, A. Aydemir, Y. Zima, and G. Appel. 2020. MO039 The 24-week interim analysis results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase ii study of atacicept in patients with IgA nephropathy and persistent proteinuria. *Nephrology Dialysis Transplantation* 35:iii39
- Bellur, S.S., S. Troyanov, H.T. Cook, I.S. Roberts, A.N.N. Working Group of International Ig, and S. Renal Pathology. 2011. Immunostaining findings in IgA nephropathy: correlation with histology and clinical outcome in the Oxford classification patient cohort. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26:2533-2536.
- Bennett, E.P., U. Mandel, H. Clausen, T.A. Gerken, T.A. Fritz, and L.A. Tabak. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 22:736-756.
- Berthoux, F., H. Suzuki, L. Thibaudin, H. Yanagawa, N. Maillard, C. Mariat, Y. Tomino, B.A. Julian, and J. Novak. 2012. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23:1579-1587.
- Cattran, D.C., J. Feehally, H.T. Cook, Z.H. Liu, F.C. Fervenza, S.A. Mezzano, J. Floege, P.H. Nachman, D.S. Gipson, and M. Praga. 2012. Kidney disease: improving global

- outcomes (KDIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney International Supplements* 2:139-274.
- Coletta, I., L. Soldo, N. Polentarutti, F. Mancini, A. Guglielmotti, M. Pinza, A. Mantovani, and C. Milanese. 2000. Selective induction of MCP-1 in human mesangial cells by the IL-6/sIL-6R complex. *Experimental nephrology* 8:37-43.
- Coppo, R., S. Troyanov, S. Bellur, D. Cattran, H.T. Cook, J. Feehally, I.S. Roberts, L. Morando, R. Camilla, V. Tesar, S. Lunberg, L. Gesualdo, F. Emma, C. Rollino, A. Amore, M. Praga, S. Feriozzi, G. Segoloni, A. Pani, G. Cancarini, M. Durluk, E. Moggia, G. Mazzucco, C. Giannakakis, E. Honsova, B.B. Sundelin, A.M. Di Palma, F. Ferrario, E. Gutierrez, A.M. Asunis, J. Barratt, R. Tardanico, A. Perkowska-Ptasinska, and V.s.o.t.E.-E.I.W. Group. 2014. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney international* 86:828-836.
- Coppo, R., G. D'Arrigo, G. Tripepi, M.L. Russo, I.S.D. Roberts, S. Bellur, D. Cattran, T.H. Cook, J. Feehally, V. Tesar, D. Maixnerova, L. Peruzzi, A. Amore, S. Lundberg, A.M. Di Palma, L. Gesualdo, F. Emma, C. Rollino, M. Praga, L. Biancone, A. Pani, S. Feriozzi, R. Polci, J. Barratt, L. Del Vecchio, F. Locatelli, A. Pierucci, Y. Caliskan, A. Perkowska-Ptasinska, M. Durluk, E. Moggia, J.C. Ballarin, J.F.M. Wetzels, D. Goumenos, M. Papatiriou, K. Galesic, L. Toric, A. Papagianni, M. Stangou, L. Benozzi, S. Cusinato, U. Berg, R. Topaloglu, M. Maggio, M. Ots-Rosenberg, M. D'Amico, C. Geddes, O. Balafa, M. Quaglia, R. Cravero, C. Lino Cirami, B. Fellstrom, J. Floege, J. Egido, F. Mallamaci, C. Zoccali, and E.-E.I.W. Group. 2020. Is there long-term value of pathology scoring in immunoglobulin A nephropathy? A validation study of the Oxford Classification for IgA Nephropathy (VALIGA) update. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 35:1002-1009.
- Czerkinsky, C., W.J. Koopman, S. Jackson, J.E. Collins, S.S. Crago, R.E. Schrohenloher, B.A. Julian, J.H. Galla, and J. Mestecky. 1986. Circulating immune complexes and immunoglobulin A rheumatoid factor in patients with mesangial immunoglobulin A nephropathies. *The Journal of clinical investigation* 77:1931-1938.
- D'Amico, G. 2000. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 36:227-237.
- Daha, N.A., N.K. Banda, A. Roos, F.J. Beurskens, J.M. Bakker, M.R. Daha, and L.A. Trouw. 2011. Complement activation by (auto-) antibodies. *Molecular immunology* 48:1656-1665.
- de Haan N., Falck D. and Wuhler M. 2020. Monitoring of immunoglobulin N- and O-glycosylation in health and disease. *Glycobiology* 30(4):226-240.
- Deng, W., X. Tan, Q. Zhou, Z. Ai, W. Liu, W. Chen, X. Yu, and Q. Yang. 2018. Gender-related differences in clinicopathological characteristics and renal outcomes of Chinese patients with IgA nephropathy. *BMC nephrology* 19:31.
- Endo, M., H. Ohi, I. Ohsawa, T. Fujita, M. Matsushita, and T. Fujita. 1998. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 13:1984-1990.
- Feehally, J., T.J. Beattie, P.E. Brenchley, B.M. Coupes, N.P. Mallick, and R.J. Postlethwaite. 1986. Sequential study of the IgA system in relapsing IgA nephropathy. *Kidney international* 30:924-931.
- Gale, D.P., K. Molyneux, D. Wimbury, P. Higgins, A.P. Levine, B. Caplin, A. Ferlin, P. Yin, C.P. Nelson, H. Stanescu, N.J. Samani, R. Kleta, X. Yu, and J. Barratt. 2017. Galactosylation of IgA1 Is Associated with Common Variation in C1GALT1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28:2158-2166.
- Gauckler, P., J.I. Shin, F. Alberici, V. Audard, A. Bruchfeld, M. Busch, C.K. Cheung, M. Crnogorac, E. Delbarba, K. Eller, S. Faguer, K. Galesic, S. Griffin, M.W.F. van den

- Hoogen, Z. Hruskova, A. Jeyabalan, A. Karras, C. King, H.S. Kohli, G. Mayer, R. Maas, M. Muto, S. Moiseev, B. Odler, R.J. Pepper, L.F. Quintana, J. Radhakrishnan, R. Ramachandran, A.D. Salama, U. Schonermarck, M. Segelmark, L. Smith, V. Tesar, J. Wetzels, L. Willcocks, M. Windpessl, L. Zand, R. Zonozi, A. Kronbichler, and R.s. group. 2021. Rituximab in Membranous Nephropathy. *Kidney international reports* 6:881-893.
- Gharavi, A.G., Z. Moldoveanu, R.J. Wyatt, C.V. Barker, S.Y. Woodford, R.P. Lifton, J. Mestecky, J. Novak, and B.A. Julian. 2008. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19:1008-1014.
- Gharavi, A.G., K. Kiryluk, M. Choi, Y. Li, P. Hou, J. Xie, S. Sanna-Cherchi, C.J. Men, B.A. Julian, R.J. Wyatt, J. Novak, J.C. He, H. Wang, J. Lv, L. Zhu, W. Wang, Z. Wang, K. Yasuno, M. Gunel, S. Mane, S. Umlauf, I. Tikhonova, I. Beerman, S. Savoldi, R. Magistroni, G.M. Ghiggeri, M. Bodria, F. Lugani, P. Ravani, C. Ponticelli, L. Allegri, G. Boscutti, G. Frasca, A. Amore, L. Peruzzi, R. Coppo, C. Izzi, B.F. Viola, E. Prati, M. Salvadori, R. Mignani, L. Gesualdo, F. Bertinetto, P. Mesiano, A. Amoroso, F. Scolari, N. Chen, H. Zhang, and R.P. Lifton. 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature genetics* 43:321-327.
- Gomez-Guerrero, C., P. Hernandez-Vargas, O. Lopez-Franco, G. Ortiz-Munoz, and J. Egidio. 2005. Mesangial cells and glomerular inflammation: from the pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Current drug targets. Inflammation and allergy* 4:341-351.
- Groza, Y., J. Jemelkova, L.R. Kafkova, P. Maly, and M. Raska. 2022. IL-6 and its role in IgA nephropathy development. *Cytokine & growth factor reviews* 66:1-14.
- Gutierrez, E., I. Zamora, J.A. Ballarin, Y. Arce, S. Jimenez, C. Quereda, T. Olea, J. Martinez-Ara, A. Segarra, C. Bernis, A. Garcia, M. Goicoechea, S. Garcia de Vinuesa, J. Rojas-Rivera, M. Praga, and N. Grupo de Estudio de Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Espanola de. 2012. Long-term outcomes of IgA nephropathy presenting with minimal or no proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23:1753-1760.
- Haas, M. 2005. Histology and immunohistology of IgA nephropathy. *Journal of nephrology* 18:676-680.
- Herlitz, L.C., A.S. Bomback, M.B. Stokes, J. Radhakrishnan, V.D. D'Agati, and G.S. Markowitz. 2014. IgA nephropathy with minimal change disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9:1033-1039.
- Hiemstra, P.S., A. Gorter, M.E. Stuurman, L.A. Van Es, and M.R. Daha. 1987. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *European journal of immunology* 17:321-326.
- Hiki, Y., H. Odani, M. Takahashi, Y. Yasuda, A. Nishimoto, H. Iwase, T. Shinzato, Y. Kobayashi, and K. Maeda. 2001. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney international* 59:1077-1085.
- Hiki, Y., H. Hori, K. Yamamoto, Y. Yamamoto, Y. Yuzawa, N. Kitaguchi, and K. Takahashi. 2015. Specificity of two monoclonal antibodies against a synthetic glycopeptide, an analogue to the hypo-galactosylated IgA1 hinge region. *Journal of nephrology* 28:181-186.
- Holmes, L.V., L. Strain, S.J. Staniforth, I. Moore, K. Marchbank, D. Kavanagh, J.A. Goodship, H.J. Cordell, and T.H. Goodship. 2013. Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1 deletion at 1q32. *PloS one* 8:e60352.
- Huang, Z.Q., M. Raska, T.J. Stewart, C. Reily, R.G. King, D.K. Crossman, M.R. Crowley, A. Hargett, Z. Zhang, H. Suzuki, S. Hall, R.J. Wyatt, B.A. Julian, M.B. Renfrow, A.G. Gharavi, and J. Novak. 2016. Somatic Mutations Modulate Autoantibodies against Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27:3278-3284.
- Huang, X., and G. Xu. 2021. An Update on Targeted Treatment of IgA Nephropathy: An Autoimmune Perspective. *Frontiers in pharmacology* 12:715253.

- Chan, L.Y., J.C. Leung, S.C. Tang, C.B. Choy, and K.N. Lai. 2005. Tubular expression of angiotensin II receptors and their regulation in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16:2306-2317.
- Chanchaoentana, W., N. Townamchai, A. Leelahavanichkul, S. Wattanatorn, T. Kanjanabuch, Y. Avihingsanon, K. Praditpornsilpa, and S. Eiam-Ong. 2017. Rituximab for recurrent IgA nephropathy in kidney transplantation: A report of three cases and proposed mechanisms. *Nephrology* 22:65-71.
- Iwasaki, H., Y. Zhang, K. Tachibana, M. Gotoh, N. Kikuchi, Y.D. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, T. Kubota, and H. Narimatsu. 2003. Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. *The Journal of biological chemistry* 278:5613-5621.
- Jennette, J.C. 1988. The immunohistology of IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 12:348-352.
- Ju, T., and R.D. Cummings. 2005. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* 437:1252.
- Kasperova, A., H. Ueda, M. Stuchlova Horynova, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, B.A. Julian, J. Novak, J. Mestecky, and M. Raska. 2013. Prevention of Formation of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA1 Nephropathy (Abstract). In *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 490A.
- Kim, M.J., J.P. McDaid, S.P. McAdoo, J. Barratt, K. Molyneux, E.S. Masuda, C.D. Pusey, and F.W. Tam. 2012. Spleen tyrosine kinase is important in the production of proinflammatory cytokines and cell proliferation in human mesangial cells following stimulation with IgA1 isolated from IgA nephropathy patients. *Journal of immunology* 189:3751-3758.
- Kirylyuk, K., Y. Li, F. Scolari, S. Sanna-Cherchi, M. Choi, M. Verbitsky, D. Fasel, S. Lata, S. Prakash, S. Shapiro, C. Fischman, H.J. Snyder, G. Appel, C. Izzi, B.F. Viola, N. Dallera, L. Del Vecchio, C. Barlassina, E. Salvi, F.E. Bertinetto, A. Amoroso, S. Savoldi, M. Rocchietti, A. Amore, L. Peruzzi, R. Coppo, M. Salvadori, P. Ravani, R. Magistri, G.M. Ghiggeri, G. Caridi, M. Bodria, F. Lugani, L. Allegri, M. Delsante, M. Maiorana, A. Magnano, G. Frasca, E. Boer, G. Boscutti, C. Ponticelli, R. Mignani, C. Marcantoni, D. Di Landro, D. Santoro, A. Pani, R. Polci, S. Feriozzi, S. Chicca, M. Galliani, M. Gigante, L. Gesualdo, P. Zamboli, G.G. Battaglia, M. Garozzo, D. Maixnerova, V. Tesar, F. Eitner, T. Rauen, J. Floege, T. Kovacs, J. Nagy, K. Mucha, L. Paczek, M. Zaniew, M. Mizerska-Wasiak, M. Roszkowska-Blaim, K. Pawlaczek, D. Gale, J. Barratt, L. Thibaudin, F. Berthouix, G. Canaud, A. Boland, M. Metzger, U. Panzer, H. Suzuki, S. Goto, I. Narita, Y. Caliskan, J. Xie, P. Hou, N. Chen, H. Zhang, R.J. Wyatt, J. Novak, B.A. Julian, J. Feehally, B. Stengel, D. Cusi, R.P. Lifton, and A.G. Gharavi. 2014. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nature genetics* 46:1187-1196.
- Kirylyuk, K., Y. Li, Z. Moldoveanu, H. Suzuki, C. Reily, P. Hou, J. Xie, N. Mladkova, S. Prakash, C. Fischman, S. Shapiro, R.A. LeDesma, D. Bradbury, I. Ionita-Laza, F. Eitner, T. Rauen, N. Maillard, F. Berthouix, J. Floege, N. Chen, H. Zhang, F. Scolari, R.J. Wyatt, B.A. Julian, A.G. Gharavi, and J. Novak. 2017. GWAS for serum galactose-deficient IgA1 implicates critical genes of the O-glycosylation pathway. *PLoS genetics* 13:e1006609.
- Knoppova, B., C. Reily, N. Maillard, D.V. Rizk, Z. Moldoveanu, J. Mestecky, M. Raska, M.B. Renfrow, B.A. Julian, and J. Novak. 2016. The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Frontiers in immunology* 7:117.
- Kosztu, P., M. Hill, J. Jemelkova, L. Czernekova, L.R. Kafkova, M. Hruby, K. Matousovic, K. Vondrak, J. Zadrazil, I. Sterzl, J. Mestecky, and M. Raska. 2018. Glucocorticoids Reduce Aberrant O-Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy Patients. *Kidney & blood pressure research* 43:350-359.



- Kudelka, M.R., S.R. Stowell, R.D. Cummings, and A.S. Neish. 2020. Intestinal epithelial glycosylation in homeostasis and gut microbiota interactions in IBD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 17:597-617.
- Kunz, R., C. Friedrich, M. Wolbers, and J.F. Mann. 2008. Meta-analysis: effect of monotherapy and combination therapy with inhibitors of the renin angiotensin system on proteinuria in renal disease. *Annals of internal medicine* 148:30-48.
- Labun, K., T.G. Montague, M. Krause, Y.N. Torres Cleuren, H. Tjeldnes, and E. Valen. 2019. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic acids research* 47:W171-W174.
- Lafayette, R.A., P.A. Canetta, B.H. Rovin, G.B. Appel, J. Novak, K.A. Nath, S. Sethi, J.A. Tumlin, K. Mehta, M. Hogan, S. Erickson, B.A. Julian, N. Leung, F.T. Enders, R. Brown, B. Knoppova, S. Hall, and F.C. Fervenza. 2017. A Randomized, Controlled Trial of Rituximab in IgA Nephropathy with Proteinuria and Renal Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28:1306-1313.
- Lai, K.N., J.C. Leung, L.Y. Chan, M.A. Saleem, P.W. Mathieson, F.M. Lai, and S.C. Tang. 2008. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-alpha: glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology* 294:F945-955.
- Lai, K.N., J.C. Leung, L.Y. Chan, M.A. Saleem, P.W. Mathieson, K.Y. Tam, J. Xiao, F.M. Lai, and S.C. Tang. 2009. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24:62-72.
- Lee, H.J., S.Y. Choi, K.H. Jeong, J.Y. Sung, S.K. Moon, J.Y. Moon, S.H. Lee, T.W. Lee, and C.G. Ihm. 2013. Association of C1q deposition with renal outcomes in IgA nephropathy. *Clinical nephrology* 80:98-104.
- Leung, J.C., L.Y. Chan, S.C. Tang, M.F. Lam, C.W. Chow, A.I. Lim, and K.N. Lai. 2011. Oxidative damages in tubular epithelial cells in IgA nephropathy: role of crosstalk between angiotensin II and aldosterone. *Journal of translational medicine* 9:169.
- Li, G.S., H. Zhang, J.C. Lv, Y. Shen, and H.Y. Wang. 2007a. Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Kidney international* 71:448-453.
- Li, G.S., L. Zhu, H. Zhang, J.C. Lv, J.X. Ding, M.H. Zhao, Y. Shen, and H.Y. Wang. 2007b. Variants of the ST6GALNAC2 promoter influence transcriptional activity and contribute to genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Human mutation* 28:950-957.
- Li, W., X. Peng, Y. Liu, H. Liu, F. Liu, L. He, Y. Liu, F. Zhang, C. Guo, G. Chen, L. Zhang, Z. Dong, and Y. Peng. 2014. TLR9 and BAFF: their expression in patients with IgA nephropathy. *Molecular medicine reports* 10:1469-1474.
- Lim, W.H., M. Shingde, and G. Wong. 2019. Recurrent and de novo Glomerulonephritis After Kidney Transplantation. *Frontiers in immunology* 10:1944.
- Lin, J.R., J. Wen, H. Zhang, L. Wang, F.F. Gou, M. Yang, and J.M. Fan. 2018. Interleukin-17 promotes the production of underglycosylated IgA1 in DAKIKI cells. *Renal failure* 40:60-67.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lundberg, S., E. Westergren, J. Smolander, and A. Bruchfeld. 2017. B cell-depleting therapy with rituximab or ofatumumab in immunoglobulin A nephropathy or vasculitis with nephritis. *Clinical kidney journal* 10:20-26.
- Lv, J., H. Zhang, Y. Zhou, G. Li, W. Zou, and H. Wang. 2008. Natural history of immunoglobulin A nephropathy and predictive factors of prognosis: a long-term follow up of 204 cases in China. *Nephrology* 13:242-246.
- Lv, J., Y. Yang, H. Zhang, W. Chen, X. Pan, Z. Guo, C. Wang, S. Li, J. Zhang, J. Zhang, L. Liu, S. Shi, S. Wang, M. Chen, Z. Cui, N. Chen, X. Yu, M. Zhao, and H. Wang. 2013. Prediction of outcomes in crescentic IgA nephropathy in a multicenter cohort study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24:2118-2125.

- Maeda, A., T. Gohda, K. Funabiki, S. Horikoshi, I. Shirato, and Y. Tomino. 2003. Significance of serum IgA levels and serum IgA/C3 ratio in diagnostic analysis of patients with IgA nephropathy. *Journal of clinical laboratory analysis* 17:73-76.
- Maixnerova, D., C. Ling, S. Hall, C. Reily, R. Brown, M. Neprasova, M. Suchanek, E. Honsova, T. Zima, J. Novak, and V. Tesar. 2019. Galactose-deficient IgA1 and the corresponding IgG autoantibodies predict IgA nephropathy progression. *PloS one* 14:e0212254.
- Makita, Y., H. Suzuki, T. Kano, A. Takahata, B.A. Julian, J. Novak, and Y. Suzuki. 2020. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy. *Kidney international* 97:340-349.
- Mathur, M., J. Barratt, Y. Suzuki, F. Engler, M.F. Pasetti, J. Yarbrough, S. Sloan, and D. Oldach. 2022. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of VIS649 (Sibeprenlimab), an APRIL-Neutralizing IgG2 Monoclonal Antibody, in Healthy Volunteers. *Kidney international reports* 7:993-1003.
- Matoušovic, K., J. Novak, T. Yanagihara, M. Tomana, Z. Moldoveanu, R. Kulhavy, B.A. Julian, K. Konecny, and J. Mestecky. 2006. IgA-containing immune complexes in the urine of IgA nephropathy patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21:2478-2484.
- Matoušovic, K., J. Mestecky, M. Tomana, and J. Novak. 2008. [Treatment of IgA nephropathy]. *Vnitřní lékařství* 54:239-244.
- Matsuda, M., K. Shikata, J. Wada, H. Sugimoto, Y. Shikata, T. Kawasaki, and H. Makino. 1998. Deposition of mannan binding protein and mannan binding protein-mediated complement activation in the glomeruli of patients with IgA nephropathy. *Nephron* 80:408-413.
- McGrogan, A., C.F. Franssen, and C.S. de Vries. 2011. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26:414-430.
- Městecký, J., M. Tomana, P.A. Crowley-Nowick, Z. Moldoveanu, B.A. Julian, and S. Jackson. 1993. Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy. *Contributions to nephrology* 104:172-182.
- Městecký, J., J. Novak, Z. Moldoveanu, and M. Raska. 2016. IgA nephropathy enigma. *Clinical immunology* 172:72-77.
- Miyazaki, R., M. Kuroda, T. Akiyama, I. Otani, Y. Tofuku, and R. Takeda. 1984. Glomerular deposition and serum levels of complement control proteins in patients with IgA nephropathy. *Clinical nephrology* 21:335-340.
- Moldoveanu, Z., R.J. Wyatt, J.Y. Lee, M. Tomana, B.A. Julian, J. Mestecky, W.Q. Huang, S.R. Anreddy, S. Hall, M.C. Hastings, K.K. Lau, W.J. Cook, and J. Novak. 2007. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney international* 71:1148-1154.
- Moldoveanu, Z., H. Suzuki, C. Reily, K. Satake, L. Novak, N. Xu, Z.Q. Huang, B. Knoppova, A. Khan, S. Hall, H. Yanagawa, R. Brown, C.J. Winstead, D.B. O'Quinn, A. Weinmann, A.G. Gharavi, K. Kiryluk, B.A. Julian, C.T. Weaver, Y. Suzuki, and J. Novak. 2021. Experimental evidence of pathogenic role of IgG autoantibodies in IgA nephropathy. *Journal of autoimmunity* 118:102593.
- Muda, A.O., S. Feriozzi, S. Rahimi, and T. Faraggiana. 1995. Spatial arrangement of IgA and C3 as a prognostic indicator of IgA nephropathy. *The Journal of pathology* 177:201-208.
- Mueller, A.L., Z. Payandeh, N. Mohammadkhani, S.M.H. Mubarak, A. Zakeri, A. Alagheband Bahrami, A. Brockmueller, and M. Shakibaei. 2021. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. *Cells* 10:
- Murphy, K., and C. Weaver. 2017. Janeway's Immunobiology. In Garland Science, 49-71.
- Nakazawa, S., R. Imamura, M. Kawamura, T. Kato, T. Abe, T. Namba, H. Iwatani, K. Yamanaka, M. Uemura, H. Kishikawa, K. Nishimura, K. Oka, M. Tajiri, Y. Wada, and

- N. Nonomura. 2019a. Difference in IgA1 O-glycosylation between IgA deposition donors and IgA nephropathy recipients. *Biochemical and biophysical research communications* 508:1106-1112.
- Nakazawa, S., R. Imamura, M. Kawamura, T. Kato, T. Abe, Iwatani, K. Yamanaka, M. Uemura, H. Kishikawa, K. Nishimura, K. Oka, M. Tajiri, Y. Wada, and N. Nonomura. 2019b. Evaluation of IgA1 O-glycosylation in Henoch-Schönlein Purpura Nephritis Using Mass Spectrometry. *Transplantation Proceedings* 51 (5):1481-1487
- Nangaku, M., S.J. Shankland, and W.G. Couser. 2005. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16:1195-1204.
- Novak, J., M. Tomana, K. Matousovic, R. Brown, S. Hall, L. Novak, B.A. Julian, R.J. Wyatt, and J. Mestecky. 2005. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney international* 67:504-513.
- Novak, J., Z. Moldoveanu, B.A. Julian, M. Raska, R.J. Wyatt, Y. Suzuki, Y. Tomino, A.G. Gharavi, J. Mestecky, and H. Suzuki. 2011a. Aberrant glycosylation of IgA1 and anti-glycan antibodies in IgA nephropathy: role of mucosal immune system. *Advances in oto-rhino-laryngology* 72:60-63.
- Novak, J., L. Raskova Kafkova, H. Suzuki, M. Tomana, K. Matousovic, R. Brown, S. Hall, J.T. Sanders, T.M. Eison, Z. Moldoveanu, L. Novak, Z. Novak, R. Mayne, B.A. Julian, J. Mestecky, and R.J. Wyatt. 2011b. IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26:3451-3457.
- Nováková Jemelková, J. 2011. Příprava modelu pro studium vlivu vybraných glykosyltransferas na tvorbu O-glykanů imunoglobulinu A. In Katedra Biochemie. Univerzita Palackého, Olomouc. 32-38.
- Odani, H., Y. Hiki, M. Takahashi, A. Nishimoto, Y. Yasuda, H. Iwase, T. Shinzato, and K. Maeda. 2000. Direct evidence for decreased sialylation and galactosylation of human serum IgA1 Fc O-glycosylated hinge peptides in IgA nephropathy by mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications* 271:268-274.
- Ohyama, Y., H. Yamaguchi, K. Nakajima, T. Mizuno, Y. Fukamachi, Y. Yokoi, N. Tsuboi, D. Inaguma, M. Hasegawa, M.B. Renfrow, J. Novak, Y. Yuzawa, and K. Takahashi. 2020. Analysis of O-glycoforms of the IgA1 hinge region by sequential deglycosylation. *Scientific reports* 10:671.
- Papista, C., L. Berthelot, and R.C. Monteiro. 2011. Dysfunctions of the Iga system: a common link between intestinal and renal diseases. *Cellular & molecular immunology* 8:126-134.
- Pirulli, D., S. Crovella, S. Ulivi, C. Zadro, S. Bertok, S. Rendine, F. Scolari, M. Foramitti, P. Ravani, D. Roccatello, S. Savoldi, G. Cerullo, S.G. Lanzilotta, L. Bisceglia, L. Zelante, J. Floege, E. Alexopoulos, D. Kirmizis, G.M. Ghiggeri, G. Frasca, F.P. Schena, A. Amoroso, and A.N.C. European Ig. 2009. Genetic variant of C1GalT1 contributes to the susceptibility to IgA nephropathy. *Journal of nephrology* 22:152-159.
- Placzek, W.J., H. Yanagawa, Y. Makita, M.B. Renfrow, B.A. Julian, D.V. Rizk, Y. Suzuki, J. Novak, and H. Suzuki. 2018. Serum galactose-deficient-IgA1 and IgG autoantibodies correlate in patients with IgA nephropathy. *PLoS one* 13:e0190967.
- Plaut, A.G. 1983. The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* 37:603-622.
- Podracka, L., and K. Matousovic. 2013. [Practice guideline and trends for immunosuppressive treatment of glomerulonephritides according to KDIGO (Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis)]. *Vnitřní lékařství* 59:113-118.
- Ponticelli, C., and R.J. Glassock. 2010. Posttransplant recurrence of primary glomerulonephritis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 5:2363-2372.

- Qiu, W., J. Zhou, G. Zhu, D. Zhao, F. He, J. Zhang, Y. Lu, T. Yu, L. Liu, and Y. Wang. 2014. Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis via XAF1 gene activation mediated by p300-dependent IRF-1 acetylation. *Cell death & disease* 5:e1176.
- Radford, M.G., Jr., J.V. Donadio, Jr., E.J. Bergstralh, and J.P. Grande. 1997. Predicting renal outcome in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 8:199-207.
- Raška, M., Z. Moldoveanu, H. Suzuki, R. Brown, R. Kulhavy, J. Andrasi, S. Hall, H.L. Vu, F. Carlsson, G. Lindahl, M. Tomana, B.A. Julian, R.J. Wyatt, J. Mestecky, and J. Novak. 2007. Identification and characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1 alpha2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells. *Journal of molecular biology* 369:69-78.
- Raška, M., K. Yamada, T.J. Stewart, M. Stuchlova Horynova, Z.Q. Huang, H. Suzuki, Z. Moldoveanu, B.A. Julian, R.J. Wyatt, J. Mestecky, M.B. Renfrow, A.G. Gharavi, and J. Novak. 2012. Role of N-Acetylgalactosaminyl Transferases in the Synthesis of Aberrant IgA1 O-Glycans in IgA Nephropathy (Abstract). *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23:519A.
- Rauterberg, E.W., H.M. Lieberknecht, A.M. Wingen, and E. Ritz. 1987. Complement membrane attack (MAC) in idiopathic IgA-glomerulonephritis. *Kidney international* 31:820-829.
- Reid, S., P.M. Cawthon, J.C. Craig, J.A. Samuels, D.A. Molony, and G.F. Strippoli. 2011. Non-immunosuppressive treatment for IgA nephropathy. *The Cochrane database of systematic reviews* CD003962.
- Reily, C., T.J. Stewart, M.B. Renfrow, and J. Novak. 2019. Glycosylation in health and disease. *Nature reviews. Nephrology* 15:346-366.
- Rizk, D.V., M.K. Saha, S. Hall, L. Novak, R. Brown, Z.Q. Huang, H. Fatima, B.A. Julian, and J. Novak. 2019. Glomerular Immunodeposits of Patients with IgA Nephropathy Are Enriched for IgG Autoantibodies Specific for Galactose-Deficient IgA1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 30:2017-2026.
- Roos, A., L.H. Bouwman, D.J. van Gijlswijk-Janssen, M.C. Faber-Krol, G.L. Stahl, and M.R. Daha. 2001. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *Journal of immunology* 167:2861-2868.
- Roos, A., M.P. Rastaldi, N. Calvaresi, B.D. Oortwijn, N. Schlagwein, D.J. van Gijlswijk-Janssen, G.L. Stahl, M. Matsushita, T. Fujita, C. van Kooten, and M.R. Daha. 2006. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17:1724-1734.
- Ruszkowski, J., K.A. Lisowska, M. Pindel, Z. Heleniak, A. Debska-Slizien, and J.M. Witkowski. 2019. T cells in IgA nephropathy: role in pathogenesis, clinical significance and potential therapeutic target. *Clinical and experimental nephrology* 23:291-303.
- Rychlík, I., E. Jancova, V. Tesar, A. Kolsky, J. Lacha, J. Stejskal, A. Stejskalova, J. Dusek, and V. Herout. 2004. The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19:3040-3049.
- Sanchez-Rodriguez, E., C.T. Southard, and K. Kiryluk. 2021. GWAS-Based Discoveries in IgA Nephropathy, Membranous Nephropathy, and Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 16:458-466.
- Segarra-Medrano, A., C. Carnicer-Caceres, N. Valtierra-Carmeno, I. Agraz-Pamplona, N. Ramos-Terrades, E. Jatem Escalante, and E. Ostos-Roldan. 2017. Value of urinary levels of interleukin-6, epidermal growth factor, monocyte chemoattractant protein type1 and transforming growth factor beta1 in predicting the extent of fibrosis lesions in kidney biopsies of patients with IgA nephropathy. *Nefrologia* 37:531-538.
- Serino, G., F. Sallustio, S.N. Cox, F. Pesce, and F.P. Schena. 2012. Abnormal miR-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23:814-824.

- Serino, G., F. Sallustio, C. Curci, S.N. Cox, F. Pesce, G. De Palma, and F.P. Schena. 2015. Role of let-7b in the regulation of N-acetylgalactosaminyltransferase 2 in IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30:1132-1139.
- Shen, P., L. He, and D. Huang. 2008. Clinical course and prognostic factors of clinical early IgA nephropathy. *The Netherlands journal of medicine* 66:242-247.
- Shuai, K., C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Qureshi, D. Cowburn, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76:821-828.
- Schmitt, R., A.L. Stahl, A.I. Olin, A.C. Kristoffersson, J. Rebetz, J. Novak, G. Lindahl, and D. Karpman. 2014. The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M Protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy. *Journal of immunology* 193:317-326.
- Smith, A.C., J.F. de Wolff, K. Molyneux, J. Feehally, and J. Barratt. 2006. O-glycosylation of serum IgD in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17:1192-1199.
- Sofue, T., M. Inui, T. Hara, M. Moritoki, S. Nishioka, Y. Nishijima, K. Moriwaki, Y. Hayashida, N. Ueda, Y. Kushida, R. Haba, A. Nishiyama, Y. Kakehi, and M. Kohno. 2013. Latent IgA deposition from donor kidneys does not affect transplant prognosis, irrespective of mesangial expansion. *Clinical transplantation* 27 Suppl 26:14-21.
- Solling, J. 1984. Circulating immune complexes and complement breakdown product C3d in glomerulonephritis and kidney transplantation. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section C, Immunology* 92:213-220.
- Stefan, G., and G. Mircescu. 2021. Hydroxychloroquine in IgA nephropathy: a systematic review. *Renal failure* 43:1520-1527.
- Stewart, T.J., K. Takahashi, R.H. Whitaker, M. Raska, W.J. Placzek, J. Novak, and M.B. Renfrow. 2019. IgA1 hinge-region clustered glycan fidelity is established early during semi-ordered glycosylation by GalNAc-T2. *Glycobiology* 29:543-556.
- Stewart, T.J., K. Takahashi, N. Xu, A. Prakash, R. Brown, M. Raska, M.B. Renfrow, and J. Novak. 2021. Quantitative assessment of successive carbohydrate additions to the clustered O-glycosylation sites of IgA1 by glycosyltransferases. *Glycobiology* 31:540-556.
- Stockert, R.J., M.S. Kressner, J.C. Collins, I. Sternlieb, and A.G. Morell. 1982. IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:6229-6231.
- Sun, Q., J. Zhang, N. Zhou, X. Liu, and Y. Shen. 2015. DNA methylation in Cosmc promoter region and aberrantly glycosylated IgA1 associated with pediatric IgA nephropathy. *PLoS one* 10:e0112305.
- Suzuki, H., Z. Moldoveanu, S. Hall, R. Brown, H.L. Vu, L. Novak, B.A. Julian, M. Tomana, R.J. Wyatt, J.C. Edberg, G.S. Alarcon, R.P. Kimberly, Y. Tomino, J. Mestecky, and J. Novak. 2008a. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *The Journal of clinical investigation* 118:629-639.
- Suzuki, H., Y. Suzuki, I. Narita, M. Aizawa, M. Kihara, T. Yamanaka, T. Kanou, H. Tsukaguchi, J. Novak, S. Horikoshi, and Y. Tomino. 2008b. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19:2384-2395.
- Suzuki, H., R. Fan, Z. Zhang, R. Brown, S. Hall, B.A. Julian, W.W. Chatham, Y. Suzuki, R.J. Wyatt, Z. Moldoveanu, J.Y. Lee, J. Robinson, M. Tomana, Y. Tomino, J. Mestecky, and J. Novak. 2009. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *The Journal of clinical investigation* 119:1668-1677.
- Suzuki, H., K. Kiryluk, J. Novak, Z. Moldoveanu, A.B. Herr, M.B. Renfrow, R.J. Wyatt, F. Scolari, J. Mestecky, A.G. Gharavi, and B.A. Julian. 2011. The pathophysiology of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22:1795-1803.

- Suzuki, H., M. Raska, K. Yamada, Z. Moldoveanu, B.A. Julian, R.J. Wyatt, Y. Tomino, A.G. Gharavi, and J. Novak. 2014. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *The Journal of biological chemistry* 289:5330-5339.
- Suzuki, H., L. Allegri, Y. Suzuki, S. Hall, Z. Moldoveanu, R.J. Wyatt, J. Novak, and B.A. Julian. 2016. Galactose-Deficient IgA1 as a Candidate Urinary Polypeptide Marker of IgA Nephropathy? *Disease markers* 2016:7806438.
- Suzuki, K., K. Honda, K. Tanabe, H. Toma, H. Nihei, and Y. Yamaguchi. 2003. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney international* 63:2286-2294.
- Szeto, C.C., F.M. Lai, K.F. To, T.Y. Wong, K.M. Chow, P.C. Choi, S.F. Lui, and P.K. Li. 2001. The natural history of immunoglobulin a nephropathy among patients with hematuria and minimal proteinuria. *The American journal of medicine* 110:434-437.
- Takahara, M., T. Nagato, Y. Nozaki, T. Kumai, A. Katada, T. Hayashi, and Y. Harabuchi. 2019. A proliferation-inducing ligand (APRIL) induced hyper-production of IgA from tonsillar mononuclear cells in patients with IgA nephropathy. *Cellular immunology* 341:103925.
- Takahashi, K., A.D. Smith, K. Poulsen, M. Kilian, B.A. Julian, J. Mestecky, J. Novak, and M.B. Renfrow. 2012. Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 o-glycosylation. *Journal of proteome research* 11:692-702.
- Tam, W.F., J. Tumlin, J. Barratt, H.B. Rovin, S.I. Roberts, C. Roufosse, H.T. Cook, S. Tong, D. Magilavy, and R. Lafayette. 2019. SUN-036 Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibition in iga nephropathy: a global, phase ii, randomised placebo-controlled trial of fostamatinib. *Kidney international reports* 4:S168.
- Tamouza, H., J.M. Chemouny, L. Raskova Kafkova, L. Berthelot, M. Flamant, M. Demion, L. Mesnard, E. Paubelle, F. Walker, B.A. Julian, E. Tissandie, M.K. Tiwari, N.O. Camara, F. Vrtovnik, M. Benhamou, J. Novak, R.C. Monteiro, and I.C. Moura. 2012. The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney international* 82:1284-1296.
- Tomana, M., R. Kulhavy, and J. Mestecky. 1988. Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology* 94:762-770.
- Tomana, M., K. Matousovic, B.A. Julian, J. Radl, K. Konecny, and J. Mestecky. 1997. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney international* 52:509-516.
- Tomana, M., J. Novak, B.A. Julian, K. Matousovic, K. Konecny, and J. Mestecky. 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *The Journal of clinical investigation* 104:73-81.
- Tomino, Y., H. Sakai, Y. Nomoto, M. Endoh, S. Arimori, and T. Fujita. 1981. Deposition of C4-binding protein and beta 1H globulin in kidneys of patients with IgA nephropathy. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* 6:217-222.
- Tortajada, A., H. Yebenes, C. Abarrategui-Garrido, J. Anter, J.M. Garcia-Fernandez, R. Martinez-Barricarte, M. Alba-Dominguez, T.H. Malik, R. Bedoya, R. Cabrera Perez, M. Lopez Trascasa, M.C. Pickering, C.L. Harris, P. Sanchez-Corral, O. Llorca, and S. Rodriguez de Cordoba. 2013. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *The Journal of clinical investigation* 123:2434-2446.
- Trimarchi, H., J. Barratt, D.C. Cattran, H.T. Cook, R. Coppo, M. Haas, Z.H. Liu, I.S. Roberts, Y. Yuzawa, H. Zhang, J. Feehally, A.N.C.W.G.o.t.I.I.N.N. Ig, S. the Renal Pathology, and P. Conference. 2017. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney international* 91:1014-1021.

- Urushihara, M., Y. Kinoshita, S. Kondo, and S. Kagami. 2012. Involvement of the intrarenal renin-angiotensin system in experimental models of glomerulonephritis. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012:601786.
- van den Dobbelaars, M.E., F.J. van der Woude, W.E. Schroeijers, A.W. van den Wall Bake, L.A. van Es, and M.R. Daha. 1994. Binding of dimeric and polymeric IgA to rat renal mesangial cells enhances the release of interleukin 6. *Kidney international* 46:512-519.
- Van den Steen, P., P.M. Rudd, R.A. Dwek, and G. Opdenakker. 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 33:151-208.
- Varis, J., I. Rantala, A. Pasternack, H. Oksa, M. Jantti, E.S. Paunu, and R. Pirhonen. 1993. Immunoglobulin and complement deposition in glomeruli of 756 subjects who had committed suicide or met with a violent death. *Journal of clinical pathology* 46:607-610.
- Wada, Y., H. Ogata, Y. Takeshige, A. Takeshima, N. Yoshida, M. Yamamoto, H. Ito, and E. Kinugasa. 2013. Clinical significance of IgG deposition in the glomerular mesangial area in patients with IgA nephropathy. *Clinical and experimental nephrology* 17:73-82.
- Wada, Y., K. Matsumoto, T. Suzuki, T. Saito, N. Kanazawa, S. Tachibana, K. Iseri, M. Sugiyama, M. Iyoda, and T. Shibata. 2018. Clinical significance of serum and mesangial galactose-deficient IgA1 in patients with IgA nephropathy. *PloS one* 13:e0206865.
- Wan, J.X., N. Fukuda, M. Endo, Y. Tahira, E.H. Yao, H. Matsuda, T. Ueno, and K. Matsumoto. 2007. Complement 3 is involved in changing the phenotype of human glomerular mesangial cells. *Journal of cellular physiology* 213:495-501.
- Wisse, E., F. Jacobs, B. Topal, P. Frederik, and B. De Geest. 2008. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene therapy* 15:1193-1199.
- Woof, J.M., and M.A. Kerr. 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of pathology* 208:270-282.
- Working Group of the International IgA Nephropathy Network; the Renal Pathology Society: D.C. Cattran, R. Coppo, H.T. Cook, J. Feehally, I.S. Roberts, S. Troyanov, C.E. Alpers, A. Amore, J. Barratt, F. Berthoux, S. Bonsib, J.A. Bruijn, V. D'Agati, G. D'Amico, S. Emancipator, F. Emma, F. Ferrario, F.C. Fervenza, S. Florquin, A. Fogo, C.C. Geddes, H.J. Groene, M. Haas, A.M. Herzenberg, P.A. Hill, R.J. Hogg, S.I. Hsu, J.C. Jennette, K. Joh, B.A. Julian, T. Kawamura, F.M. Lai, C.B. Leung, L.S. Li, P.K. Li, Z.H. Liu, B. Mackinnon, S. Mezzano, F.P. Schena, Y. Tomino, P.D. Walker, H. Wang, J.J. Weening, N. Yoshikawa, and H. Zhang. 2009a. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney international* 76:534-545.
- Working Group of the International IgA Nephropathy Network; the Renal Pathology Society: I.S. Roberts, H.T. Cook, S. Troyanov, C.E. Alpers, A. Amore, J. Barratt, F. Berthoux, S. Bonsib, J.A. Bruijn, D.C. Cattran, R. Coppo, V. D'Agati, G. D'Amico, S. Emancipator, F. Emma, J. Feehally, F. Ferrario, F.C. Fervenza, S. Florquin, A. Fogo, C.C. Geddes, H.J. Groene, M. Haas, A.M. Herzenberg, P.A. Hill, R.J. Hogg, S.I. Hsu, J.C. Jennette, K. Joh, B.A. Julian, T. Kawamura, F.M. Lai, L.S. Li, P.K. Li, Z.H. Liu, B. Mackinnon, S. Mezzano, F.P. Schena, Y. Tomino, P.D. Walker, H. Wang, J.J. Weening, N. Yoshikawa, and H. Zhang. 2009b. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney international* 76:546-556.
- Wyatt, R.J., and B.A. Julian. 1988. Activation of complement in IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 12:437-442.
- Wyatt, R.J., and B.A. Julian. 2013. IgA nephropathy. *The New England journal of medicine* 368:2402-2414.
- Xiao, J., M. Wang, D. Xiong, Y. Wang, Q. Li, J. Zhou, and Q. Chen. 2017. TGF-beta1 mimics the effect of IL-4 on the glycosylation of IgA1 by downregulating core 1 beta1, 3-galactosyltransferase and Cosmc. *Molecular medicine reports* 15:969-974.

- Xing, Y., L. Li, Y. Zhang, F. Wang, D. He, Y. Liu, J. Jia, T. Yan, and S. Lin. 2020. C1GALT1 expression is associated with galactosylation of IgA1 in peripheral B lymphocyte in immunoglobulin a nephropathy. *BMC nephrology* 21:18.
- Yamada, K., N. Kobayashi, T. Ikeda, Y. Suzuki, T. Tsuge, S. Horikoshi, S.N. Emancipator, and Y. Tomino. 2010. Down-regulation of core 1 beta1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 25:3890-3897.
- Yamada, K., Z.Q. Huang, M. Raska, C. Reily, J.C. Anderson, H. Suzuki, H. Ueda, Z. Moldoveanu, K. Kiryluk, Y. Suzuki, R.J. Wyatt, Y. Tomino, A.G. Gharavi, A. Weinmann, B.A. Julian, C.D. Willey, and J. Novak. 2017. Inhibition of STAT3 Signaling Reduces IgA1 Autoantigen Production in IgA Nephropathy. *Kidney international reports* 2:1194-1207.
- Yamada, K., Z.Q. Huang, M. Raska, C. Reily, J.C. Anderson, H. Suzuki, K. Kiryluk, A.G. Gharavi, B.A. Julian, C.D. Willey, and J. Novak. 2020. Leukemia Inhibitory Factor Signaling Enhances Production of Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy. *Kidney diseases* 6:168-180.
- Yamaji, K., Y. Suzuki, H. Suzuki, K. Satake, S. Horikoshi, J. Novak, and Y. Tomino. 2014. The kinetics of glomerular deposition of nephritogenic IgA. *PLoS one* 9:e113005.
- Yiu, W.H., K.W. Chan, L.Y.Y. Chan, J.C.K. Leung, K.N. Lai, and S.C.W. Tang. 2021. Spleen Tyrosine Kinase Inhibition Ameliorates Tubular Inflammation in IgA Nephropathy. *Frontiers in physiology* 12:650888.
- Yu, G., Y. Zhang, B. Meng, X. Xie, Z. Wang, W. Ying, J. Lv and H. Zhang. 2021. O-glycoforms of polymeric immunoglobulin A1 in the plasma of patients with IgA nephropathy are associated with pathological phenotypes. *Nephrol Dial Transplant* 37(1):33-41.
- Yuzawa, Y., R. Yamamoto, K. Takahashi, R. Katafuchi, M. Tomita, Y. Fujigaki, H. Kitamura, M. Goto, T. Yasuda, M. Sato, M. Urushihara, S. Kondo, S. Kagami, Y. Yasuda, H. Komatsu, M. Takahara, Y. Harabuchi, K. Kimura, and S. Matsuo. 2016. Evidence-based clinical practice guidelines for IgA nephropathy 2014. *Clinical and experimental nephrology* 20:511-535.
- Zachová, K., J. Jemelkova, P. Kosztyu, Y. Ohyama, K. Takahashi, J. Zadrazil, J. Orsag, K. Matousovic, D. Galuszkova, N. Petejova, J. Mestecky, and M. Raska. 2022. Galactose-Deficient IgA1 B cells in the Circulation of IgA Nephropathy Patients Carry Preferentially Lambda Light Chains and Mucosal Homing Receptors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 33:908-917.
- Zhai, Y.L., L. Zhu, S.F. Shi, L.J. Liu, J.C. Lv, and H. Zhang. 2016. Increased APRIL Expression Induces IgA1 Aberrant Glycosylation in IgA Nephropathy. *Medicine* 95:e3099.
- Zhang, J., Y. Li, K. Shan, L. Wang, W. Qiu, Y. Lu, D. Zhao, G. Zhu, F. He, and Y. Wang. 2014. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPbeta acetylation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28:1511-1525.
- Zhang, H., and S.C. Sun. 2015. NF-kappaB in inflammation and renal diseases. *Cell & bioscience* 5:63.
- Zhu, L., W. Tang, G. Li, J. Lv, J. Ding, L. Yu, M. Zhao, Y. Li, X. Zhang, Y. Shen, H. Zhang, and H. Wang. 2009. Interaction between variants of two glycosyltransferase genes in IgA nephropathy. *Kidney international* 76:190-198.
- Zhu, L., Y.L. Zhai, F.M. Wang, P. Hou, J.C. Lv, D.M. Xu, S.F. Shi, L.J. Liu, F. Yu, M.H. Zhao, J. Novak, A.G. Gharavi, and H. Zhang. 2015. Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26:1195-1204.



Zwirner, J., M. Burg, M. Schulze, R. Brunkhorst, O. Gotze, K.M. Koch, and J. Floege. 1997. Activated complement C3: a potentially novel predictor of progressive IgA nephropathy. *Kidney international* 51:1257-1264.

## 10 SEZNAM ZKRATEK

ACE	angiotenzin konvertující enzym
AGTR	receptoru pro angiotensin II
Akt	proteinkináza Akt (někdy též proteinkináza B)
APRIL	signální molekula „A proliferation-inducing ligand“
ASGP-R	asialoglykoproteinový receptor
BAFF	cytokin „B-cell activating factor“
BSA	Bovinní sérový albumin
C1GalT1	Core 1 galaktosyltransferáza 1
<i>C1GALT1</i>	gen pro C1GalT1
<i>C1GALT1C1</i>	gen pro Cosmc
C3	složka komplementové kaskády C3
CD71	receptor pro transferin
CDR3	hypervariabilní oblast 3 („complementarity determining region 3“)
<i>CFHR1/3</i>	„complement factor H-related genes“
Cosmc	molekulární šaperon pro C1GalT1
dNTP	deoxynukleotidy
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFP	zelený fluorescenční protein „Enhanced green fluorescence protein“
eGFR	odhadovaná rychlost glomerulární filtrace
ERK	proteinkináza ERK „extracellular signal-regulated kinase“
FBS	fetální bovinní sérum
Gal	galaktóza
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
GalNAc-T2	<i>N</i> -acetylgalaktosaminyltransferáza 2
<i>GALNT2</i>	gen pro GalNAc-T2
GalNAc-T14	<i>N</i> -acetylgalaktosaminyltransferáza 14
<i>GALNT14</i>	gen pro GalNAc-T14
<i>GAPDH</i>	gen pro Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu
Gd-IgA1	IgA1 deficientní na galaktózu
GWAS	genomové asociační studie
HC	zdraví dárci
HRP	křenová peroxidáza
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IgA1	imunoglobulin A1

IgAN	pacienti s IgA nefropatií
IL	interleukin
IRES	vnitřní sekvence pro nasednutí ribosomu „internal ribosomal entry site“
Jak	Janusova kináza
KDIGO	iniciativa „Kidney Disease: Improving Global Outcomes“
LIF	cytokin „Leukemia inhibitory factor“
MAPK	proteinkinázy aktivované mitogeny „Mitogen-activated protein kinase“
MBL	Lektin vázající manózu
MCP-1	chemokin „monocyte chemoattractant protein-1“
MyD88	adaptorový protein „Myeloid differentiation primary response 88“
NeuAc	kyselina N-acetylneuraminová
NF- $\kappa$ B	transkripční faktor - Jaderný faktor kappa B
N-glykany	glykany vázané na protein přes dusík
O-glykany	glykany vázané na protein přes kyslík
oligo(dT)	primery složené z 12-20 deoxythymidinů
PBS	fosfátový pufr „phosphate buffered saline“
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PVDF	polyvinylidifluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAS	renin-angiotensinový systém
siRNA	krátká interferující RNA
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
ST3Gal1	$\alpha$ 2,3-sialyltransferáza I
ST6GalNAc-II	$\alpha$ 2,6-sialyltransferáza II
<i>ST6GALNAC2</i>	gen pro ST6GalNAc-II
STAT	transkripční faktor „Signal Transducer and Activator of Transcription“
SYK	tyrosinová protein kináza „spleen tyrosine kinase“
TACI	receptor pro APRIL a BAFF „Transmembrane activator and CAML interactor“
TBS	pufr „Tris buffered saline“
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta
TLR9	„Toll like receptor 9“
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
TNFR	receptor pro TNF- $\alpha$

## 11 PŘÍLOHY

### Příloha 1. Sekvence bicistronického plazmidu *GALNT14* + *EGFP* v pOptiVEC

```
1 AAAGTGCCAC CTGACGTCGA CGGATCGGGA GATCAGTTGA CATTGATTAT
51 TGACTAGTTA TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCAATTAGT TCATAGCCCA
101 TATATGGAGT TCCGCGTTAC ATAACCTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG
151 ACCGCCAAC GACCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA
201 TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA
251 CGGTAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
301 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC
351 AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA
401 GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
451 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG
501 TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT
551 CGTAACAACCT CCGCCCATTT GACGCAAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG
601 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA
651 GACGCCATCC ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC
701 AGCCTCCGGA CTCTAGAGGA TCCAACCCTT CACCatgcgg cgcctgactc
751 gtcggctggt tctgccagtc ttcggggtgc tctggatcac ggtgctgctg
801 ttcttctggg taaccaagag gaagttggag gtgccgacgg gacctgaagt
851 gcagaccct aagccttcgg acgctgactg ggacgacctg tgggaccagt
901 ttgatgagcg gcggtatctg aatgccaaaa agtggcgcggt tggtgacgac
951 ccctataagc tgtatgctt caaccagcgg gagagtgagc ggatctccag
1001 caatcgggcc atcccgaca ctcgccatct gagatgcaca ctgctggtgt
1051 attgcacgga ccttccacc actagcatca tcatcacctt ccacaacgag
1101 gcccgctcca cgctgctcag gaccatccgc agtgtattaa accgcacccc
1151 tacgcatctg atccgggaaa tcatattagt ggatgacttc agcaatgatc
1201 ctgatgactg taaacagctc atcaagttgc ccaaggtgaa atgcttgccg
1251 aataatgaac ggcaaggtct ggtccggtcc cggattcggg gcgctgacat
1301 cgcccagggc accactctga ctttctcga cagccactgt gaggtgaaca
1351 gggactggct ccagcctctg ttgcacaggg tcaaagagga ctacacgcgg
1401 gtggtgtgcc ctgtgatcga tatcattaac ctggacacct tcacctacat
1451 cgagtctgcc tcggagctca gaggggggtt tgactggagc ctccacttcc
1501 agtgggagca gctctccca gagcagaagg ctccggcgct ggacccacg
1551 gagcccatca ggactcctat catagctgga gggctcttcg tgatcgacaa
1601 agcttggttt gattacctg gaaatatga tatggacatg gacatctggg
1651 gtggggagaa ctttgaatc tccttcgag tgtggatgtg cgggggcagc
1701 ctagagatcg tcccctgcag ccgagtggg cacgtcttcc ggaagaagca
1751 cccctacgtt tcccctgatg gaaatgcaa cacgtatata aagaacacca
1801 agcggacagc tgaagtgtgg atggatgaat acaagcaata ctattacgct
```

1851 gcccgccat tcgccctgga gaggcccttc gggaatgttg agagcagatt  
1901 ggacctgagg aagaatctgc gctgccagag cttcaagtgg tacctggaga  
1951 atatctacc tgaactcagc atccccaagg agtcctccat ccagaagggc  
2001 aatatccgac agagacagaa gtgcctggaa tctcaaaggc agaacaacca  
2051 agaaaccca aacctaaagt tgagccctg tgccaaggtc aaaggcgaag  
2101 atgcaaagtc ccaggtatgg gccttcacat acaccagca gatcctccag  
2151 gaggagetgt gctgtcagt catcaccttg ttcctggcg cccagtggt  
2201 tcttgcctt tgcaagaatg gagatgaccg acagcaatgg accaaaactg  
2251 gttcccacat cgagcacata gcatcccacc tctgcctcga tacagatatg  
2301 ttcggtgatg gcaccgagaa cggcaaggaa atcgtcgtca acccatgtga  
2351 gtcctcactc atgagccagc actgggacat ggtgagctct tga-AGGGTT  
2401 GGATCCCTAC CGGTGCTGCG GCCGCGCAGT TAACGCCGCC CCTCTCCCTC  
2451 CCCCCCCCCT AACGTTACTG GCCGAAGCCG CTTGGAATAA GGCCGGTGTG  
2501 CGTTTGTCTA TATGTTATTT TCCACCATAT TGCCGTCTTT TGGCAATGTG  
2551 AGGGCCCGGA AACCTGGCCC TGTCTTCTTG ACGAGCATTC CTAGGGGTCT  
2601 TTCCCCTCTC GCCAAAGGAA TGCAAGGTCT GTTGAATGTC GTGAAGGAAG  
2651 CAGTTCCTCT GGAAGCTTCT TGAAGACAAA CAACGTCTGT AGCGACCCTT  
2701 TGCAGGCAGC GGAACCCCCC ACCTGGCGAC AGGTGCCCTCT GCGGCCAAAA  
2751 GCCACGTGTA TAAGATACAC CTGCAAAGGC GGCACAACCC CAGTGCCACG  
2801 TTGTGAGTTG GATAGTTGTG GAAAGAGTCA AATGGCTCTC CTCAAGCGTA  
2851 TTCAACAAGG GGCTGAAGGA TGCCCAGAAG GTACCCCATT GTATGGGATC  
2901 TGATCTGGGG CCTCGGTACA CATGCTTTAC ATGTGTTTAG TCGAGGTTAA  
2951 AAAAACGTCT AGGCCCCCCG AACCACGGGG ACGTGGTTTT CCTTTGAAAA  
3001 ACACGATGAT AATATGGCAT GGTGAGCAAG GCGGAGGAGC TGTTCCACCG  
3051 GGTGGTGCCC ATCCTGGTCG AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT  
3101 TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC GAGGGCGATG CCACCTACGG CAAGCTGACC  
3151 CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG CCCGTGCCCT GGCCACCCT  
3201 CGTGACCACC CTGACCTACG GCGTGCAGTG CTTACGCCGC TACCCGACC  
3251 ACATGAAGCA GCACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCGA AGGCTACGTC  
3301 CAGGAGCGCA CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA AGACCCGCGC  
3351 CGAGGTGAAG TTCGAGGGCG ACACCCTGGT GAACCGCATC GAGCTGAAGG  
3401 GCATCGACTT CAAGGAGGAC GGCAACATCC TGGGGCACAA GCTGGAGTAC  
3451 AACTACAACA GCCACAACGT CTATATCATG GCCGACAAGC AGAAGAACGG  
3501 CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC GGCAGCGTGC  
3551 AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCCA CGGCCCCGTG  
3601 CTGCTGCCCC ACAACCACTA CCTGAGCACC CAGTCCGCC TGAGCAAAGA  
3651 CCCCAACGAG AAGCGCGATC ACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG  
3701 CCGGGATCAC TCTCGGCATG GACGAGCTGT ACAAGTAAAA ACGGGGGAGG  
3751 CTAAGTAAAA CACGGAAGGA GACAATACCG GAAGGAACCC GCGCTATGAC  
3801 GGCAATAAAA AGACAGAATA AAACGCACGG GTGTTGGGTC GTTTGTTCAT

3851 AAACGCGGGG TTCGGTCCCA GGGCTGGCAC TCTGTGATA CCCCACCGAG  
3901 ACCCCATTGG GGCCAATACG CCCGCGTTTC TTCCTTTTCC CCACCCACC  
3951 CCCCAAGTTC GGGTGAAGGC CCAGGGCTCG CAGCCAACGT CGGGGCGGCA  
4001 GGCCCTGCCA TTACCGTCGA CCTCTAGCTA GAGCTTGGCG TAATCATGGT  
4051 CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC  
4101 ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT AATGAGTGAG  
4151 CTAACCTACA TTAATTGCGT TGCCTCACT GCCCCTTTC CAGTCGGGAA  
4201 ACCTGTGCTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC  
4251 GGTTTGCCTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG  
4301 CTCGGTCTGT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA  
4351 TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA  
4401 AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT  
4451 TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA  
4501 GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCCTTTCCC  
4551 CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG  
4601 ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCATAGCT  
4651 CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC  
4701 TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA  
4751 CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG  
4801 CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA  
4851 GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GAACAGTATT  
4901 TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA  
4951 GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTTT TTTTGTGTTGC  
5001 AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT  
5051 CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACCTCA CGTTAAGGGA  
5101 TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CTTTTTAAAT  
5151 TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC  
5201 TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC  
5251 TATTTCTGTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG  
5301 ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA  
5351 CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG CCAGCCGGAA  
5401 GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT  
5451 ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT  
5501 GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT  
5551 TTGGTATGGC TTCATTACAG TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA  
5601 TGATCCCCCA TGTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT  
5651 CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG  
5701 CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG  
5751 ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC  
5801 GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA

5851 GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC  
5901 TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC  
5951 ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG  
6001 CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG  
6051 AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA  
6101 TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA  
6151 ATAAACAAAT AGGGGTTC CGCACATTC CCCGA

(Červeným písmem je vyznačen gen pro *GALNT14*, zeleně gen pro *EGFP*. Žlutě je zvýrazněna část ověřená sekvenací.)

Příloha 2. Sekvence plazmidu pro knock-out *GALNT14* metodou CRISPR/Cas9.

1 GAGGGCCTAT TTCCCATGAT TCCTTCATAT TTGCATATAC GATACAAGGC  
51 TGTTAGAGAG ATAATGGAA TTAATTTGAC TGTAACACA AAGATATTAG  
101 TACAAAATAC GTGACGTAGA AAGTAATAAT TTCTTGGGTA GTTTGCAGTT  
151 TTAAAATTAT GTTTTAAAAT GGACTATCAT ATGCTTACCG TAACTTGAAA  
201 GTATTTTCGAT TTCTTGGCTT TATATATCTT GTGGAAAGGA CGAAACACCG  
251 TTGTCTTACA GGACTACACG GTTTTAGAGC TAGAAATAGC AAGTTAAAA  
301 AAGGCTAGTC CGTTATCAAC TTGAAAAAGT GGCACCGAGT CGGTGCTTTT  
351 TTGTTTTAGA GCTAGAAAATA GCAAGTTAAA ATAAGGCTAG TCCGTTTTTA  
401 GCGCGTGCGC CAATTCTGCA GACAAATGGC TCTAGAGGTA CCCGTTACAT  
451 AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCA  
501 TTGACGTCAA TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT  
551 GGAGTATTTA CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA  
601 TGCCAAGTAC GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG  
651 CATGTGCCC AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT  
701 CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT CGAGGTGAGC CCCACGTTCT  
751 GCTTCACTCT CCCCATCTCC CCCCCCTCCC CACCCCAAT TTTGTATTTA  
801 TTTATTTTTT AATTATTTTG TGCAGCGATG GGGGCGGGG GGGGGGGGG  
851 GCGCGGCCG GGGGGGGGG GGGGGGGGG GGGGGGGGG GGGGCGAGGC  
901 GGAGAGGTGC GCGGCAGCC AATCAGAGCG GCGCGCTCCG AAAGTTTCCT  
951 TTTATGGCGA GCGGCGGCG GCGGCGGCC TATAAAAAGC GAAGCGCGCG  
1001 GCGGCGGGA GTCGCTGCGC GCTGCCTTCG CCCCCTGCC CGCTCCGCC  
1051 CCGCTCGCG CCGCCGCC CCGCTCTGAC TGACCGCGTT ACTCCACAG  
1101 GTGAGCGGG GGGACGGCC TTCTCCTCCG GGCTGTAATT AGCTGAGCAA  
1151 GAGGTAAGGG TTTAAGGGAT GGTGGTTGG TGGGGTATTA ATGTTAATT  
1201 ACCTGGAGCA CCTGCCTGAA ATCACTTTTT TTCAGGTTGG ACCGGTGCCA  
1251 CCATGGACTA TAAGGACCAC GACGGAGACT ACAAGGATCA TGATATTGAT  
1301 TACAAAGACG ATGACGATAA GATGGCCCA AAGAAGAAGC GGAAGGTCGG  
1351 TATCCACGGA GTCCAGCAG CCGACAAGAA GTACAGCATC GGCCTGGACA  
1401 TCGGCACCAA CTCTGTGGC TGGGCCGTA TCACCGACGA GTACAAGGTG  
1451 CCCAGCAAGA AATTCAAGGT GCTGGGCAAC ACCGACCGGC ACAGCATCAA  
1501 GAAGAACCTG ATCGGAGCCC TGCTGTTCGA CAGCGGCGAA ACAGCCGAGG  
1551 CCACCCGGCT GAAGAGAACC GCCAGAAGAA GATACACCAG ACGGAAGAAC  
1601 CGGATCTGCT ATCTGCAAGA GATCTTCAGC AACGAGATGG CCAAGGTGGA  
1651 CGACAGCTTC TTCCACAGAC TGGAAGAGTC CTTCTGGTG GAAGAGGATA  
1701 AGAAGCACGA GCGGCACCCC ATCTTCGGCA ACATCGTGA CGAGGTGGCC  
1751 TACCACGAGA AGTACCCAC CATCTACCAC CTGAGAAAGA AACTGGTGA  
1801 CAGCACCGAC AAGGCCGACC TCGGCTGAT CTATCTGGCC CTGGCCACA



1851 TGATCAAGTT CCGGGGCCAC TTCCTGATCG AGGGCGACCT GAACCCCGAC  
1901 AACAGCGACG TGGACAAGCT GTTCATCCAG CTGGTGCAGA CCTACAACCA  
1951 GCTGTTCGAG GAAAACCCCA TCAACGCCAG CGGCGTGGAC GCCAAGGCCA  
2001 TCCTGTCTGC CAGACTGAGC AAGAGCAGAC GGCTGGAAAA TCTGATCGCC  
2051 CAGCTGCCCC GCGAGAAGAA GAATGGCCTG TTCGGAAACC TGATTGCCCT  
2101 GAGCCTGGGC CTGACCCCCA ACTTCAAGAG CAACTTCGAC CTGGCCGAGG  
2151 ATGCCAAACT GCAGCTGAGC AAGGACACCT ACGACGACGA CCTGGACAAC  
2201 CTGCTGGCCC AGATCGGCGA CCAGTACGCC GACCTGTTC TGGCCGCCAA  
2251 GAACCTGTCC GACGCCATCC TGCTGAGCGA CATCCTGAGA GTGAACACCG  
2301 AGATCACCAA GGCCCCCTG AGCGCCTCTA TGATCAAGAG ATACGACGAG  
2351 CACCACCAGG ACCTGACCCT GCTGAAAGCT CTCGTGCGGC AGCAGCTGCC  
2401 TGAGAAGTAC AAAGAGATTT TCTTCGACCA GAGCAAGAAC GGCTACGCCG  
2451 GCTACATTGA CGGCGGAGCC AGCCAGGAAG AGTTCTACAA GTTCATCAAG  
2501 CCCATCCTGG AAAAGATGGA CGGCACCGAG GAACTGCTCG TGAAGCTGAA  
2551 CAGAGAGGAC CTGCTGCGGA AGCAGCGGAC CTTGACAAC GGCAGCATCC  
2601 CCCACCAGAT CCACCTGGGA GAGCTGCACG CCATTCTGCG GCGGCAGGAA  
2651 GATTTTTACC CATTCTGAA GGACAACCGG GAAAAGATCG AGAAGATCCT  
2701 GACCTTCCGC ATCCCCTACT ACGTGGGCC TCTGGCCAGG GGAAACAGCA  
2751 GATTCGCCCTG GATGACCAGA AAGAGCGAGG AAACCATCAC CCCCTGGAAC  
2801 TTCGAGGAAG TGGTGGACAA GGGCGCTTCC GCCCAGAGCT TCATCGAGCG  
2851 GATGACCAAC TTCGATAAGA ACCTGCCCAA CGAGAAGGTG CTGCCCAAGC  
2901 ACAGCCTGCT GTACGAGTAC TTCACCGTGT ATAACGAGCT GACCAAAGTG  
2951 AAATACGTGA CCGAGGGAAT GAGAAAGCCC GCCTTCCTGA GCGGCGAGCA  
3001 GAAAAAGGCC ATCGTGGACC TGCTGTTCAA GACCAACCGG AAAGTGACCG  
3051 TGAAGCAGCT GAAAGAGGAC TACTTCAAGA AAATCGAGTG CTTGACTCC  
3101 GTGAAATCT CCGGCGTGGA AGATCGGTTT AACGCCCTCC TGGGCACATA  
3151 CCACGATCTG CTGAAAATTA TCAAGGACAA GGACTTCCTG GACAATGAGG  
3201 AAAACGAGGA CATTCTGGAA GATATCGTGC TGACCCTGAC ACTGTTTGAG  
3251 GACAGAGAGA TGATCGAGGA ACGGCTGAAA ACCTATGCCC ACCTGTTCTGA  
3301 CGACAAAGTG ATGAAGCAGC TGAAGCGGCG GAGATACACC GGCTGGGGCA  
3351 GGCTGAGCCG GAAGCTGATC AACGGCATCC GGGACAAGCA GTCCGGCAAG  
3401 ACAATCCTGG ATTTCTGAA GTCCGACGGC TTCGCCAACA GAACTTCAT  
3451 GCAGCTGATC CACGACGACA GCCTGACCTT TAAAGAGGAC ATCCAGAAAG  
3501 CCCAGGTGTC CGGCCAGGGC GATAGCCTGC ACGAGCACAT TGCCAATCTG  
3551 GCCGGCAGCC CCGCCATTAA GAAGGGCATC CTGCAGACAG TGAAGGTGGT  
3601 GGACGAGCTC GTGAAAGTGA TGGGCCGGCA CAAGCCCGAG AACATCGTGA  
3651 TCGAAATGGC CAGAGAGAAC CAGACCACCC AGAAGGGACA GAAGAACAGC  
3701 CGCGAGAGAA TGAAGCGGAT CGAAGAGGGC ATCAAAGAGC TGGGCAGCCA  
3751 GATCCTGAAA GAACACCCCG TGAAAAACAC CCAGCTGCAG AACGAGAAGC  
3801 TGTACCTGTA CTACCTGCAG AATGGGCGGG ATATGTACGT GGACCAGGAA

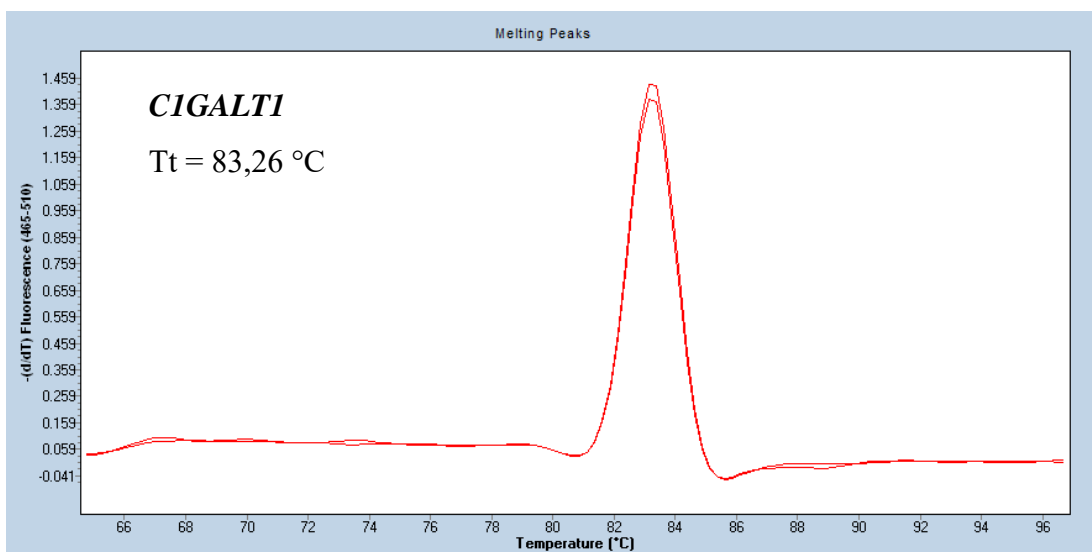
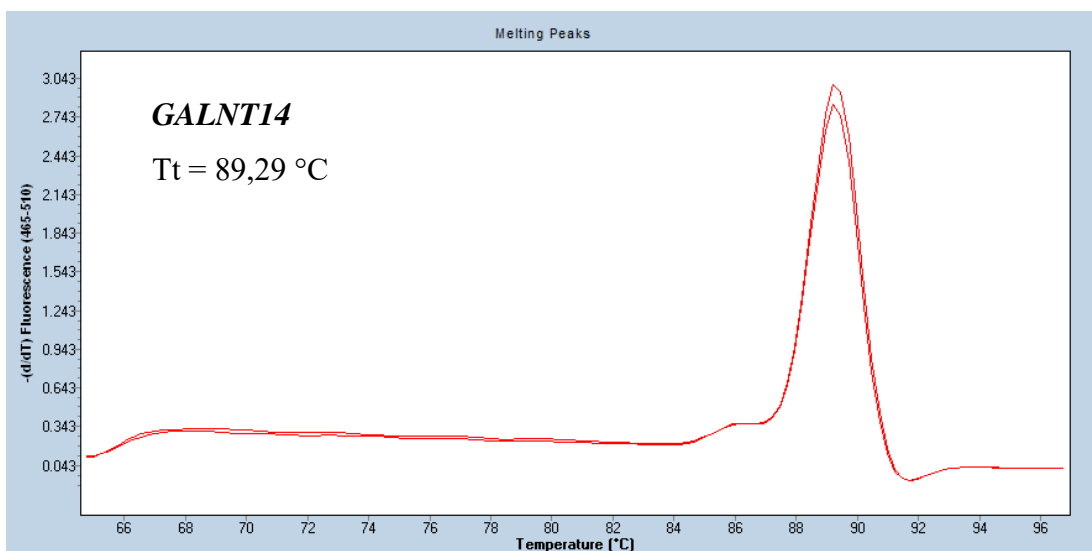
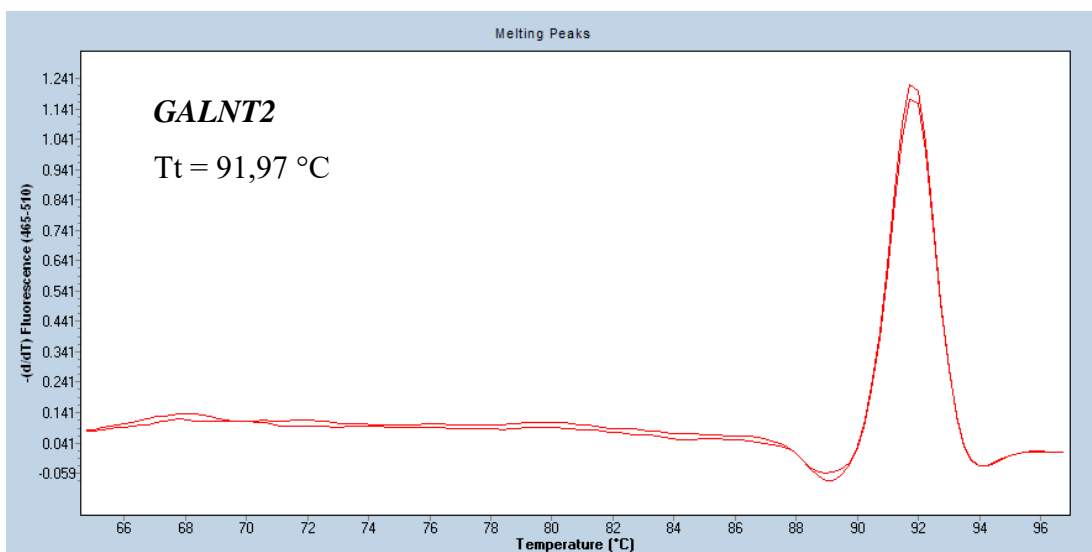
3851 CTGGACATCA ACCGGCTGTC CGACTACGAT GTGGACCATA TCGTGCCTCA  
3901 GAGCTTTCTG AAGGACGACT CCATCGACAA CAAGGTGCTG ACCAGAAGCG  
3951 ACAAGAACCG GGGCAAGAGC GACAACGTGC CCTCCGAAGA GGTCGTGAAG  
4001 AAGATGAAGA ACTACTGGCG GCAGCTGCTG AACGCCAAGC TGATTACCCA  
4051 GAGAAAAGTTC GACAATCTGA CCAAGGCCGA GAGAGGCGGC CTGAGCGAAC  
4101 TGGATAAGGC CGGCTTCATC AAGAGACAGC TGGTGGAAAC CCGGCAGATC  
4151 ACAAAGCACG TGGCACAGAT CCTGGACTCC CGGATGAACA CTAAGTACGA  
4201 CGAGAAATGAC AAGCTGATCC GGGAAGTGAA AGTGATCACC CTGAAGTCCA  
4251 AGCTGGTGTC CGATTTCCGG AAGGATTTCC AGTTTTACAA AGTGCGCGAG  
4301 ATCAACAACCT ACCACCACGC CCACGACGCC TACCTGAACG CCGTCGTGGG  
4351 AACCGCCCTG ATCAAAAAGT ACCCTAAGCT GGAAAGCGAG TTCGTGTACG  
4401 GCGACTACAA GGTGTACGAC GTGCGGAAGA TGATCGCCAA GAGCGAGCAG  
4451 GAAATCGGCA AGGCTACCGC CAAGTACTTC TTCTACAGCA ACATCATGAA  
4501 CTTTTTCAAG ACCGAGATTA CCCTGGCCAA CGGCGAGATC CGGAAGCGGC  
4551 CTCTGATCGA GACAAACGGC GAAACCGGGG AGATCGTGTG GGATAAGGGC  
4601 CGGGATTTTG CCACCGTGCG GAAAGTGCTG AGCATGCCCC AAGTGAATAT  
4651 CGTGAAAAAG ACCGAGGTGC AGACAGGCGG CTTCAGCAAA GAGTCTATCC  
4701 TGCCCAAGAG GAACAGCGAT AAGCTGATCG CCAGAAAGAA GGACTGGGAC  
4751 CCTAAGAAGT ACGGCGGCTT CGACAGCCCC ACCGTGGCCT ATTCTGTGCT  
4801 GGTGGTGGCC AAAGTGAAA AGGGCAAGTC CAAGAACTG AAGAGTGTGA  
4851 AAGAGCTGCT GGGGATCACC ATCATGGAAA GAAGCAGCTT CGAGAAGAAT  
4901 CCCATCGACT TTCTGGAAGC CAAGGGCTAC AAAGAAGTGA AAAAGGACCT  
4951 GATCATCAAG CTGCCTAAGT ACTCCCTGTT CGAGCTGGAA AACGGCCGGA  
5001 AGAGAAATGCT GGCCTCTGCC GGCGAAGTGC AGAAGGGAAA CGAACTGGCC  
5051 CTGCCCTCCA AATATGTGAA CTTCTGTAC CTGGCCAGCC ACTATGAGAA  
5101 GCTGAAGGGC TCCCCGAGG ATAATGAGCA GAAACAGCTG TTTGTGGAAC  
5151 AGCACAAGCA CTACCTGGAC GAGATCATCG AGCAGATCAG CGAGTTCTCC  
5201 AAGAGAGTGA TCCTGGCCGA CGCTAATCTG GACAAAGTGC TGTCCGCCTA  
5251 CAACAAGCAC CGGGATAAGC CCATCAGAGA GCAGGCCGAG AATATCATCC  
5301 ACCTGTTTAC CCTGACCAAT CTGGGAGCCC CTGCCGCCTT CAAGTACTTT  
5351 GACACCACCA TCGACCGGAA GAGGTACACC AGCACCAAAG AAGTGCTGGA  
5401 CGCCACCCTG ATCCACCAGA GCATCACCGG CCTGTACGAG ACACGGATCG  
5451 ACCTGTCTCA GCTGGGAGGC GACAAAAGGC CGGCGGCCAC GAAAAAGGCC  
5501 GGCCAGGCAA AAAAGAAAAA GGAATTCGGC AGTGGAGAGG GCAGAGGAAG  
5551 TCTGCTAACA TGCGGTGACG TCGAGGAGAA TCCTGGCCCA GTGAGCAAGG  
5601 GCGAGGAGCT GTTACCGGG GTGGTGCCCA TCCTGGTCTGA GCTGGACGGC  
5651 GACGTAAACG GCCACAAGTT CAGCGTGTCC GGCGAGGGCG AGGGCGATGC  
5701 CACCTACGGC AAGCTGACCC TGAAGTTCAT CTGCACCACC GGCAAGCTGC  
5751 CCGTGCCCTG GCCCACCCTC GTGACCACCC TGACCTACGG CGTGCAGTGC  
5801 TTCAGCCGCT ACCCCGACCA CATGAAGCAG CACGACTTCT TCAAGTCCGC

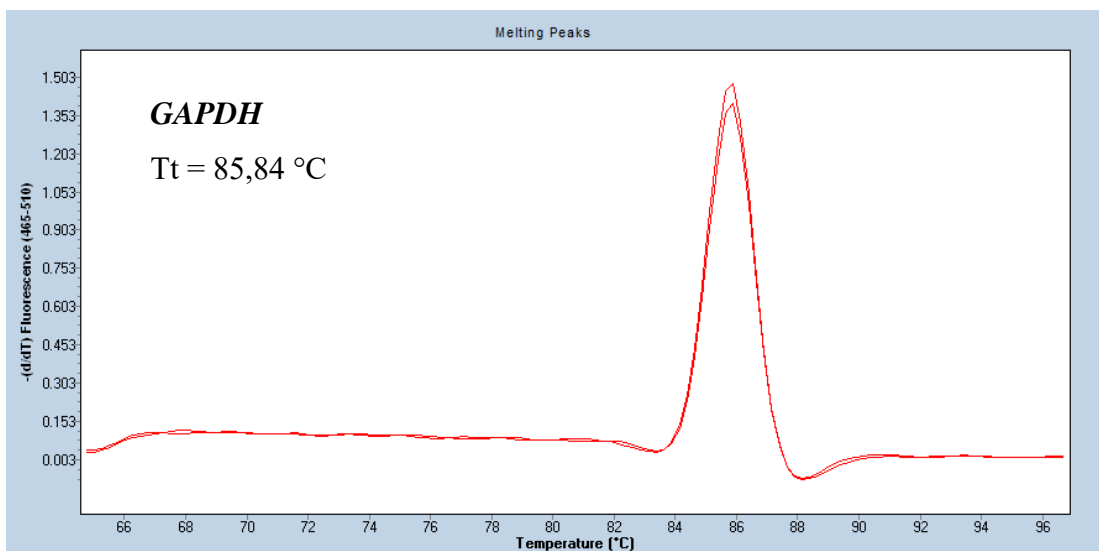
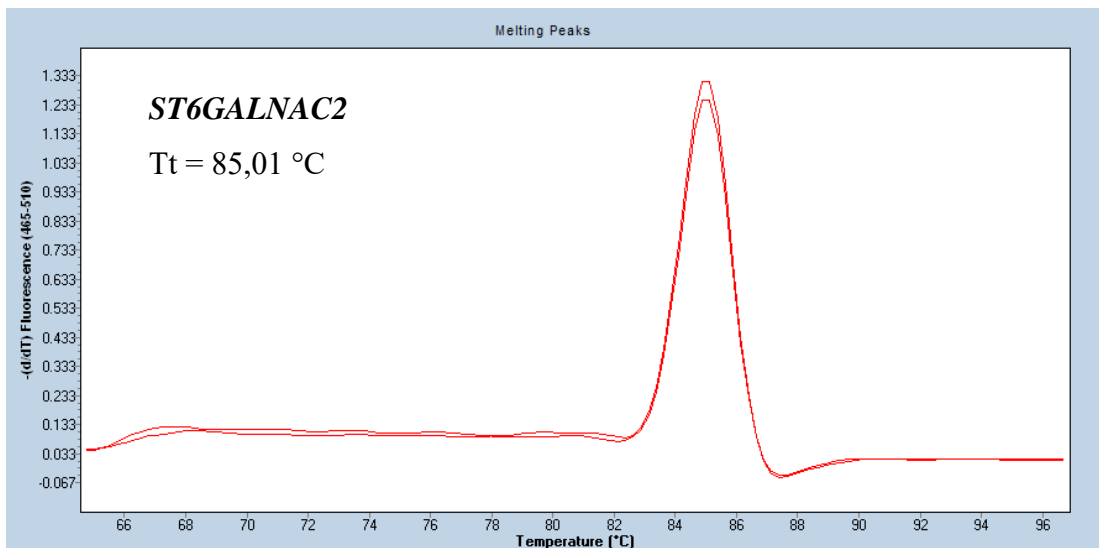
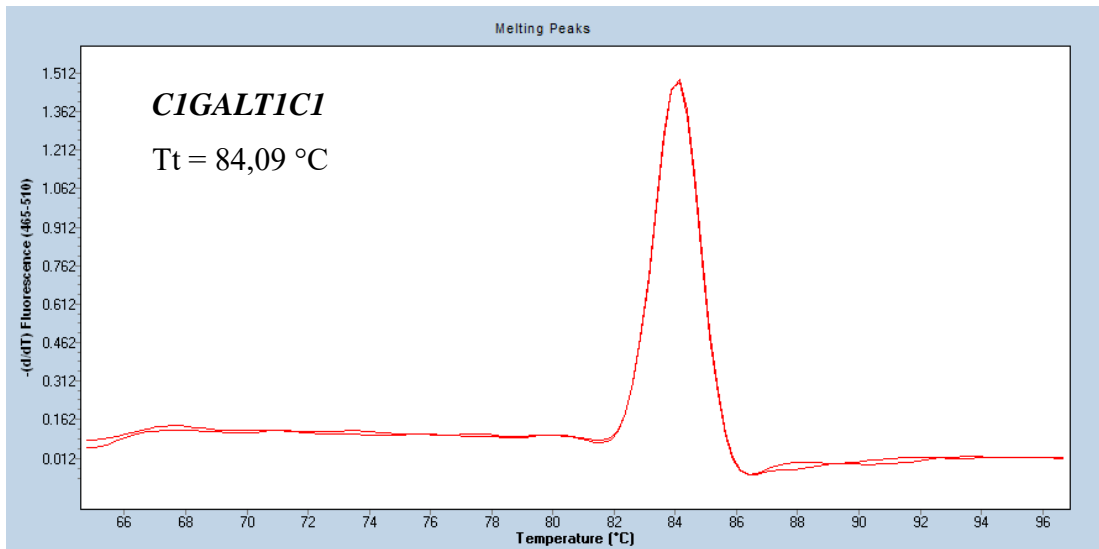
5851 CATGCCCGAA GGCTACGTCC AGGAGCGCAC CATCTTCTTC AAGGACGACG  
5901 GCAACTACAA GACCCGCGCC GAGGTGAAGT TCGAGGGCGA CACCCTGGTG  
5951 AACCGCATCG AGCTGAAGGG CATCGACTTC AAGGAGGACG GCAACATCCT  
6001 GGGGCACAAG CTGGAGTACA ACTACAACAG CCACAACGTC TATATCATGG  
6051 CCGACAAGCA GAAGAACGGC ATCAAGGTGA ACTTCAAGAT CCGCCACAAC  
6101 ATCGAGGACG GCAGCGTGCA GCTCGCCGAC CACTACCAGC AGAACACCCC  
6151 CATCGGCGAC GGCCCCGTGC TGCTGCCCGA CAACCACTAC CTGAGCACCC  
6201 AGTCCGCCCT GAGCAAAGAC CCCAACGAGA AGCGCGATCA CATGGTCCTG  
6251 CTGGAGTTCG TGACCGCCGC CGGGATCACT CTCGGCATGG ACGAGCTGTA  
6301 CAAGGAATTC TAACTAGAGC TCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG  
6351 TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCCTTC TTGACCCTGG  
6401 AAGGTGCCAC TCCCCTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG  
6451 CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA  
6501 CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGAGAATAG CAGGCATGCT GGGGAGCGGC  
6551 CGCAGGAACC CCTAGTGATG GAGTTGGCCA CTCCCTCTCT GCGCGCTCGC  
6601 TCGCTCACTG AGGCCGGGCG ACCAAAGGTC GCCCGACGCC CGGGCTTTGC  
6651 CCGGGCGGCC TCAGTGAGCG AGCGAGCGCG CAGCTGCCTG CAGGGGCGCC  
6701 TGATGCGGTA TTTTCTCCTT ACGCATCTGT GCGGTATTTT ACACCGCATA  
6751 CGTCAAAGCA ACCATAGTAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG  
6801 GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCTTAGC  
6851 GCCCGCTCCT TTCGCTTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT  
6901 TTCCCCGTCA AGCTCTAAAT CGGGGGCTCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT  
6951 GCTTTACGGC ACCTCGACCC CAAAAAATT GATTTGGGTG ATGGTTCACG  
7001 TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT  
7051 CCACGTTCTT TAATAGTGA CTCTTGTTCC AACTGGAAC AACACTCAAC  
7101 TCTATCTCGG GCTATTCTTT TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTCCGT  
7151 CTATTGGTTA AAAAATGAGC TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTTA  
7201 ACAAATATT AACGTTTACA ATTTTATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC  
7251 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA  
7301 CGCGCCCTGA CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG  
7351 TGACCGTCTC CGGGAGCTGC ATGTGTCAGA GGTTTTCACC GTCATCACCG  
7401 AAACGCGCGA GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA  
7451 TGTCATGATA ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA  
7501 ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG  
7551 TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA  
7601 AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCTTTT  
7651 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA  
7701 GTAAAAGATG CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGT ACATCGAACT  
7751 GGATCTCAAC AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT  
7801 TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC

7851 CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA  
7901 GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG  
7951 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC  
8001 ACTGCGGCCA ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC  
8051 CGCTTTTTTG CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG  
8101 AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG  
8151 CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAA CTATTAAGT GCGAACTACT  
8201 TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG  
8251 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT  
8301 GATAAATCTG GAGCCGGTGA GCGTGGAAGC CGCGGTATCA TTGCAGCACT  
8351 GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA  
8401 GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC  
8451 TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT  
8501 TTAGATTGAT TTA AAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA  
8551 TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT  
8601 CACTGAGCGT CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC  
8651 TTTTTTCTG CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC  
8701 CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG  
8751 GTA ACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTTT TTCTAGTGTA  
8801 GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC  
8851 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG  
8901 TGTCTTACCG GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG  
8951 GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT CGTGACACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA  
9001 CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG  
9051 CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG  
9101 AACAGGAGAG CGCACGAGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT  
9151 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA  
9201 TGCTCGTCAG GGGGGCGGAG CCTATGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT  
9251 TTTACGGTTC CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG T

(Červeným písmem je vyznačena sekvence pro expresi sgRNA. Žlutě je zvýrazněna část ověřená sekvenací.)

Příloha 3. Analýza křivek tání pro produkty jednotlivých primerů.





Příloha 4. Stanovení účinnosti amplifikace pro primerové páry *GAPDH* a *GALNT14*.

Stanovení účinnosti primerového páru pro expresi *GALNT14*.

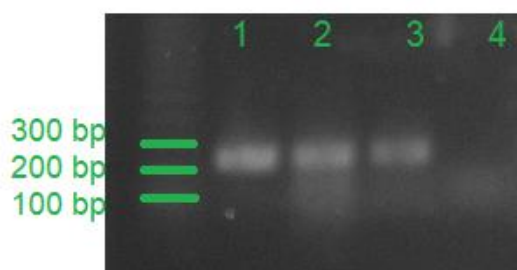
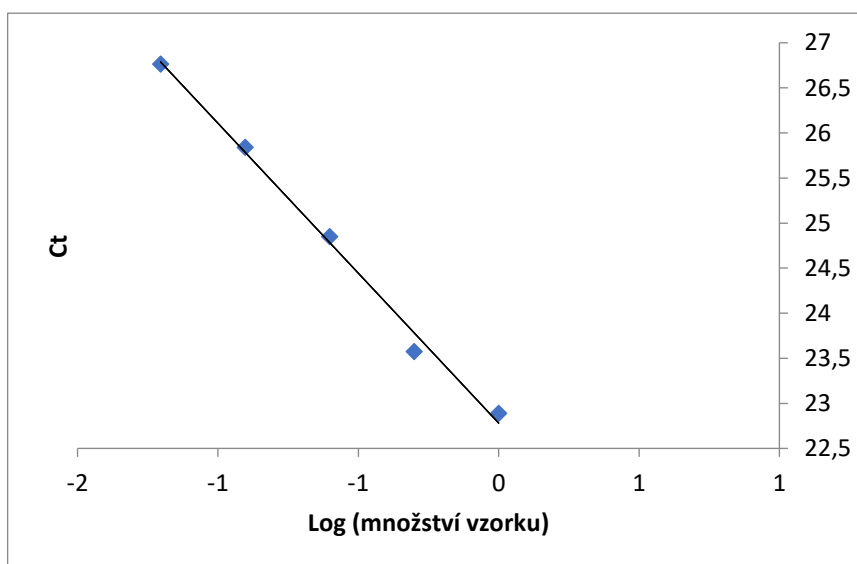
vzorek	Ct 1	Ct 2	Avg Ct	množství vzorku	Log (množství vzorku)
A	22,42	23,36	22,89	1,0000	0,00
B	23,64	23,51	23,575	0,5000	-0,30
C	25,14	24,56	24,85	0,2500	-0,60
D	25,56	26,12	25,84	0,1250	-0,90
E	26,88	26,65	26,765	0,0625	-1,20

Faktor ředění

Slope -3,326910987

R<sup>2</sup> 0,9938

Účinnost (%) 99,79



Obrázek 28. Analýza produktů qPCR při použití primerů pro amplifikaci úseku genu *GALNT14*. Produkty byly rozděleny agarózovou elektroforézou. Bylo potvrzeno, že při reakci vzniká jediný produkt o očekávané velikosti 224bp. (Dráhy 1, 2 a 3 - produkty cDNA připravené z buněčných linií Dakiki, buněčné linie od pacienta s IgA nefropatií a buňčné linie od zdravého dárce, 4 – vzorek nepřepsané RNA.)

Stanovení účinnosti primerového páru pro expresi *GAPDH*.

Vzorek	Ct 1	Ct 2	Avg Ct	Množství vzorku	Log (množství vzorku)
A	16,25	16,46	16,355	1,0000	0,00
B	17,81	17,38	17,595	0,5000	-0,30
C	18,29	18,14	18,215	0,2500	-0,60
D	19,54	19,59	19,565	0,1250	-0,90
E	20,78	20,23	20,505	0,0625	-1,20

Faktor ředění

2

Slope

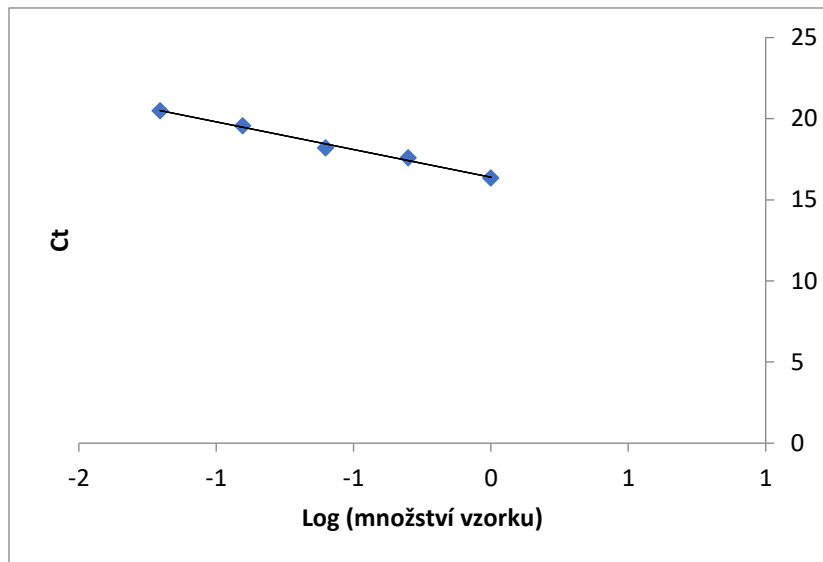
-3,411620153

R<sup>2</sup>

0,9911

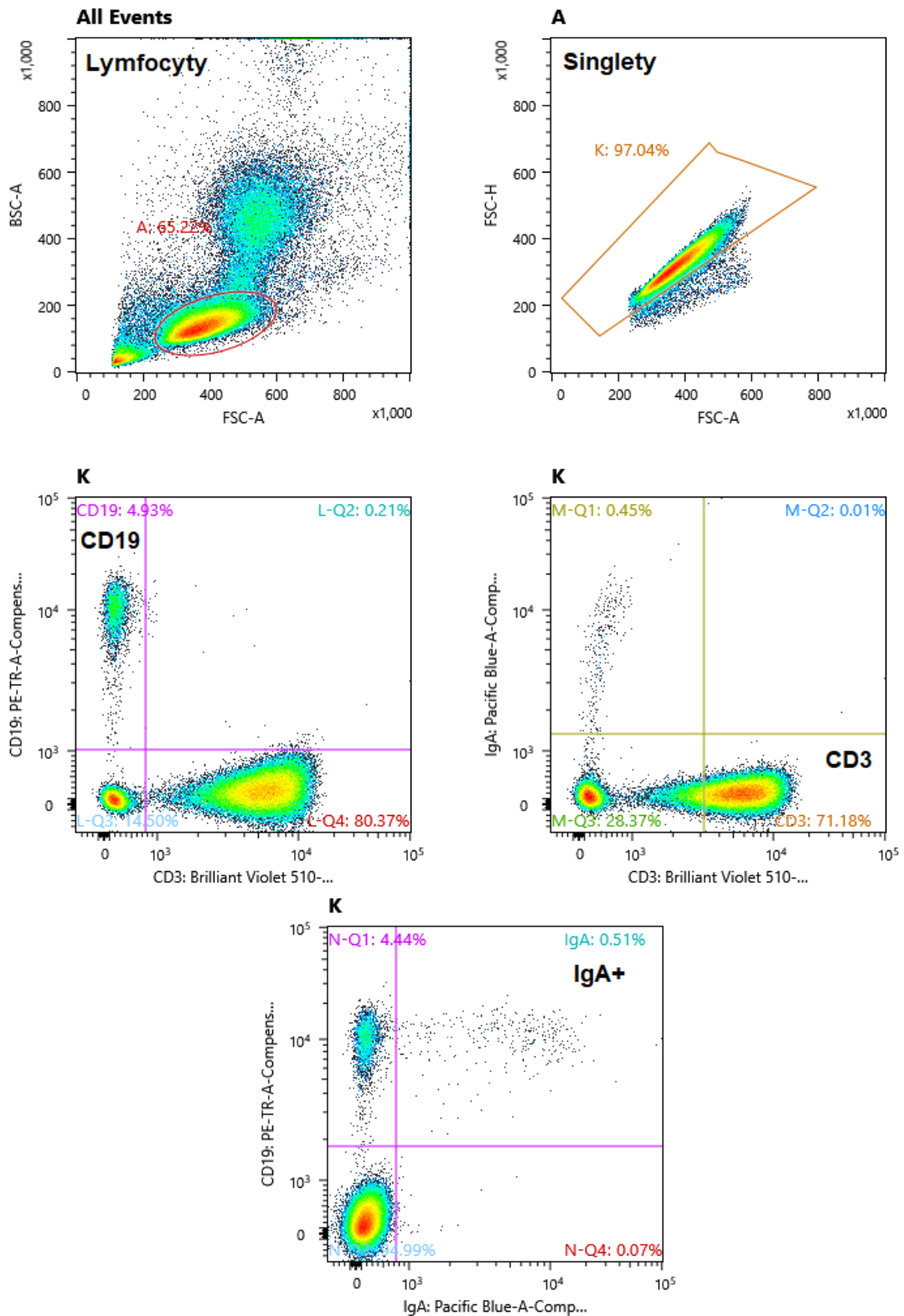
Účinnost (%)

96,39





Příloha 5. Strategie třídění buněk.



Obrázek 29. **Strategie třídění buněk.** Postupným výběrem byly vytříděny populace T lymfocytů (CD3), B lymfocytů (CD19) a IgA<sup>+</sup> B lymfocytů (IgA<sup>+</sup>). (BSC-A zadní rozptyl – obsah, FSC-A přímý rozptyl – obsah, FSC-H přímý rozptyl – výška, ostatní osy vyjadřují intenzitu fluorescence příslušného fluorochromu)

## 12 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORKY

- J. Jemelková**, M. Stuchlová Horynová, P. Kosztyu, K. Zachová, J. Zdražil, D. Galuszková, K. Takahashi, J. Novák, M. Raška. 2023. GalNAc-T14 may Contribute to Production of Galactose-Deficient Immunoglobulin A1, the Main Autoantigen in IgA Nephropathy. *Kidney International Reports*
- Groza, Y., **J. Jemelková**, L.R. Kafková, P. Malý, and M. Raška. 2022. IL-6 and its role in IgA nephropathy development. *Cytokine & growth factor reviews* 66:1-14.
- Zachová, K., **J. Jemelková**, P. Kosztyu, Y. Ohyama, K. Takahashi, J. Zdražil, J. Orság, K. Matoušovic, D. Galuszková, N. Petejová, J. Městecký, and M. Raška. 2022. Galactose-Deficient IgA1 B cells in the Circulation of IgA Nephropathy Patients Carry Preferentially Lambda Light Chains and Mucosal Homing Receptors. *Journal of the American Society of Nephrology* 33:908-917.
- Kosztyu, P., M. Hill, **J. Jemelková**, L. Czerneková, L.R. Kafková, M. Hrubý, K. Matoušovic, K. Vondrák, J. Zdražil, I. Šterzl, J. Městecký, and M. Raška. 2018. Glucocorticoids Reduce Aberrant O-Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy Patients. *Kidney & blood pressure research* 43:350-359.
- Šterzl I, Hill M, Stárka L, Velíková M, Kančeva R, **Jemelková J**, Czerneková L, Kosztyu P, Zdražil J, Matoušovic K, Vondrák K, Raška M. 2017. Patients With IgA Nephropathy Have Altered Levels of Immunomodulatory C19 Steroids. Glucocorticoid Therapy With Addition of Adrenal Androgens May Be the Choice. *Physiol Res.* 26;66(Supplementum 3):S433-S442.

### Abstrakta prezentací související s tématem – hlavní autor

- Jemelková J.**, Raška M.; Příprava buněčného modelu pro studium vlivu změny exprese vybraných GalNAc-T glykosyltransferas na produkci IgA1 s abnormálními O-glykany. *Alergie*, ročník 22, Supplementum 2, 2020: Page(79)
- Nováková J.**, Stewart T., Novak J., Raška M.; Overexpression of N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 Contributes to Galactose-Deficient IgA1 Production: Relevance for IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 24, 2013: Page(492A).

### Odborné přednášky související s tématem

- Jemelková J.**, Zachová K., Stuchlová Horynová M., Julian, B.A., Novák J., Raška M. Influence of N-acetylgalactosaminyltransferase 14 on surface galactose deficient IgA1 expression. Book of abstracts of the 11<sup>th</sup> International Conference Analytical Cytometry. *AMCA* 1, 2021: Page(88)
- Jemelková J.** Glykosyltransferáza GalNAc-T14 u IgA nefropatie. Semináře Ústavu imunologie LF UP a Fakultní nemocnice Olomouc (11.5.2022)

### **Plakátová sdělení související s tématem**

**Jemelková J.,** Zachová K., Raška M. Influence of IL-6 on B regulatory lymphocytes and  $\lambda$  light chain expression in IgA nephropathy. 35th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, CYTO Program Book, 2022:Page(240)

### **Abstrakta prezentací související s tématem – spoluautor**

Raška M., Zachová K., **Jemelková J.**, Kosztyu P., Takahashi K., Zadražil J., Matoušovic K., Městecký J. Nové poznatky o IgA nefropatii z pohledu buněčné imunologie. *Aktuality v Nefrologii*, ročník 28, Supplementum 1, 2022:Page(23).

Zachová K., **Jemelková J.**, Orsag J., Zadražil J, Raska M. Effect of interleukin – 6 on B cells responsible for Gd-IgA production in IgA nephropathy regarding to corticosteroid treatment. 6th European Congress of Immunology, 2021, *Eur. J. Immunol.*, 51:Page(293)

Zachová K., **Jemelková J.**, Takahashi K, Zadražil J, Mestecky J, Raška M. Nové možnosti výzkumu IgA nefropatie pomocí specifické protilátky detekující galaktosa- deficiční IgA1 *Alergie*, ročník 22, Supplementum 2, 2020: Page(35)

Šterzl I., Hill M., Stárka L., Velíkova M., Kanceva R., **Jemelková J.**, Czerneková L., Kosztyu P., Zadražil J., Matoušovic K., Raška M., Mestecky J. Terapie IgA nefropatie kortikoidy. *Alergie*, ročník 22, Supplementum 2, 2020: Page(34)

Novak J., Suzuki H., Yamada K., Moldoveanu Z., Takahashi K., Horynová M., **Nováková J.**, Julian B., Novak L., Poulsen K., Kilian M., Gharavi A., Renfrow M., Mestecky J., Raska M. Immune and inflammatory mechanisms, *NDT Plus*, Volume 4, Issue suppl\_2, June 2011, (Page)53

Raška M., Yamada K., Horynová M., Takahashi K., Suzuki H., Moldoveanu Z., **Nováková J.**, Kašperová A. Julian B. Kiryluk K., Mestecky J., Renfrow M., Gharavi A., Novak J. Role of GalNAc-Transferases in the Synthesis of Aberrant IgA1 O-glycans in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22, 2011: Page(625A).

### **Původní a souborné práce přímo nesouvisející s tématem**

**Nováková J.**, Slabý O., Vyzula R., Michálek J. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Aug 14;386(1):1-5

### **V průběhu studia byla práce podporována granty:**

GAČR P302/10/1055 (2011–2013) Studium glykosylace imunoglobulinu IgA1 u IgA nefropatie

IGA MZČR NT/11081 (2011–2014) Molekulární přístupy k eliminaci nebo inaktivaci patogenních cirkulujících imunitních komplexů u IgA nefropatie a Henoch Schoenleinovy purpury

KONTAKT LH/11046 (2011-2014) Studium vztahů mezi enzymy glykosylujícími IgA1 imunoglobulin u IgA nefropatie

IGA\_LF\_2012\_011 (2012) Nové imunologické metody v prevenci a diagnostice chorobných stavů.

OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0164 (2012-2014) Rozvoj mezinárodního týmu excelence pro výzkum a cílenou léčbu hematologických a imunologických chorob

OPVVV CEREBIT CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_025/0007397 (2019–2022) Centrum pro rekombinantní biotechnologie a imunoterapeutika

IGA\_LF\_2020\_016 (2020) Studium patogeneze a možností prevence u chorob s imunopatologickým základem VIII

### **Zapojení autorky do dalších projektů:**

OPVK CZ.1.07/2.4.00/31.0078 (2012–2014) DataLab-otevřená laboratoř biotechnologických aplikací

AZV NV19-05-00191 (2020-2022) Význam nespírálních forem spirochet *Borrelia burgdorferi* v patogenezi Lymeské boreliózy a post-boreliového syndromu

GAČR GF21-16423K (2021-2022) Malé proteiny blokující dráhu IL-23/IL-17 jako inhibitory střevního zánětu sekretované probiotickými bakteriemi.

### 13 PUBLIKACE I-IV

**Publikace I:** GalNAc-T14 may Contribute to Production of Galactose-Deficient Immunoglobulin A1, the Main Autoantigen in IgA Nephropathy. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.02.1072>

**Publikace II:** IL-6 and its role in IgA nephropathy development. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.04.001>

**Publikace III:** Galactose-Deficient IgA1 B cells in the Circulation of IgA Nephropathy Patients Carry Preferentially Lambda Light Chains and Mucosal Homing Receptors. <https://doi.org/10.1681/ASN.2021081086>

**Publikace IV:** Glucocorticoids Reduce Aberrant *O*-Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy Patients. <https://doi.org/10.1159/000487903>