

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Hana Dostálová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava a charakterizace rekombinantních glykoproteinů produkovaných v prokaryotních buňkách

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Hana Dostálová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. MUDr. Mgr Milan Raška, PhD.
Rok:	2018

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce prof. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, PhD. za odborné vedení diplomové práce, konzultace a cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Ústavu Imunologie LF UPOL za ochotu pomoci a za vytvoření příjemných pracovních podmínek, a to především Mgr. Petru Kosztyu, PhD., za pomoc při práci na experimentální části.

Zpracování práce bylo podpořeno Studentským grantem IGA_LF_2017_00.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
podpis diplomanta

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Hana Dostálová
Název práce	Příprava a charakterizace rekombinantních glykoproteinů produkovaných v prokaryotních buňkách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie LF UP
Vedoucí práce	Prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Rekombinantní proteiny nacházejí široké uplatnění v medicínské sféře, kde jsou základem léčby mnoha onemocnění. Díky rozvoji technologie rekombinantní DNA, proteinového inženýrství a biotechnologií lze lidské proteiny připravovat *in vitro*. Nejvyužívanějšími systémy pro jejich produkci jsou bakterie, kvasinky, hmyzí a savčí buňky. Díky genetickému inženýrství lze vlastnosti proteinu dále upravovat a zlepšovat, s využitím afinitních značek potom usnadňovat jejich purifikaci z buněčného lyzátu. Až 50 % biologicky aktivních proteinů se nachází v glykosylované formě. Tato posttranslační modifikace probíhá v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu a zahrnuje řadu enzymatických kroků. Glykoproteiny plní v organismu velkou škálu funkcí včetně imunitních. Jednou z imunologicky významných skupin jsou imunoglobuliny. Správná a funkční glykosylační dráha je klíčová pro správný chod fyziologických procesů v buňce i v celém organismu. Imunoglobulin A (IgA) představuje významný faktor slizniční ale i systémové imunity. Defekt v glykosylaci IgA1 je jedním z faktorů vzniku a rozvoje chronického onemocnění ledvin – IgA nefropatie. IgA1 deficientní v množství připojené galaktosy (Gd-IgA) je rozlišováno vznikajícími autoprotiilátkami třídy zejména IgG za vzniku vysokomolekulárních imunokomplexů. Ty se ukládají v mesangiu ledvin, kde aktivují zánětlivou reakci. Nemoc může vést až k selhání ledvin. Jedna z cest vývoje kauzální léčby je založena na aplikaci rekombinantních glykoproteinů odvozených od IgA, které budou kompetovat s Gd-IgA1 o vazbu autoprotiilátek bez vzniku patogenních imunomomplexů. Jedná se o rekombinantní glykoproteiny o menší molekulové hmotnosti než patologické Gd-IgA1. V rámci diplomové práce byly připraveny rekombinantní glykoproteiny IgA1 CH1-P-CH2 a samostatný těžký řetězec IgA1. Ty budou v dalším výzkumu použity pro studium jejich schopnosti inhibovat tvorbu patogenních imunitních komplexů typických pro IgA nefropatii.

Klíčová slova	Glykoproteiny, IgA1, IgA nefropatie, rekombinantní proteiny
Počet stran	66
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Hana Dostálová
Title	Preparation and characterization of recombinant glycoproteins produced in prokaryotic cells
Type of thesis	Master's
Department	Department of immunology, Faculty of medicine and dentistry, UP
Supervisor	Prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Recombinant proteins are widely used in medicine, and they are the basis for the treatment of many diseases. As a result of the advances of recombinant DNA technology, protein engineering and biotechnologies, human proteins can be prepared *in vitro*. The most common express systems are bacteria, yeasts, insect and mammalian cells. Thanks to genetic engineering, protein characteristics can be further modified and improved, and furthermore, using affinity tags we can facilitate their purification. Up to 50 % biologically active proteins can be found in their glycosylated form. This post-translation modification takes place in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and includes a number of enzymatic steps. Glycoproteins have various functions in organism, including immunological function. Immunoglobulins are one of immunologically important groups of glycoproteins. Correct and functional glycosylation is key to proper functioning physiological processes in cells and whole organism. Immunoglobulin A presents a significant factor in both mucosal and systemic immunity. Defects in glycosylation of immunoglobulin A1 (IgA1) is one of the main factors contributing to initiation and progression of IgA nephropathy, a chronic kidney disease. IgA1, which is deficient in number of added molecules of galactose (Gd-IgA1), is recognized by emerging autoantibodies, especially those of IgG isotype, which results in formation of high molecular weight immunocomplexes. These complexes are deposited in the renal mesangium and trigger inflammatory reactions. The disease can lead to renal failure. One way leading to the development of causal therapy is based on the use of recombinant IgA-derived glycoproteins that will compete with Gd-IgA1 to bind autoantibodies without the formation of pathogenic immunocomplexes. In the experimental part of this Master's thesis recombinant glycoproteins CH1-P-CH2 and IgA1 heavy chain were prepared. These proteins can be used in further studies to investigate their inhibitory effect on formation of pathological immunocomplexes typical for IgA nephropathy.

Keywords	Glycoproteins, IgA1, IgA nephropathy, recombinant proteins
Number of pages	66
Number of appendices	0
Language	Czech

CÍLE PRÁCE

V teoretické části práce je zpracována literární rešerše na téma rekombinantní proteiny, glykoproteiny, imunoglobulin A a jeho zapojení v nemoci IgA nefropatie.

Cílem experimentální části práce je příprava, purifikace a charakterizace glykoproteinů, konkrétně fragmentu těžkého řetězce IgA1 CH1-P-CH2 a celého těžkého řetězce IgA1.

OBSAH

Cíle práce.....	7
Obsah.....	8
1 Úvod.....	10
2 Současný stav řešené problematiky.....	11
2.1 Rekombinantní proteiny v medicíně.....	11
2.1.1 Rekombinantní technologie.....	12
2.1.2 Purifikace proteinů	19
2.2 Glykoproteiny	21
2.2.1 Glykosylace	21
2.2.2 Funkce glykanových řetězců	23
2.3 Imunoglobulin A.....	23
2.3.1 Struktura IgA.....	23
2.3.2 Funkce IgA	24
2.3.3 IgA1.....	25
2.3.4 IgA2.....	27
2.4 IgA nefropatie	27
2.4.1 Projevy a progrese	27
2.4.2 Etiopatogeneze	29
2.4.3 Léčba IgA nefropatie.....	31
3 Experimentální část	34
3.1 Materiál a chemikálie.....	34
3.1.1 Chemikálie.....	34
3.1.2 Pufry a roztoky	35
3.1.3 Přístrojové vybavení.....	38
3.1.4 Biologický materiál	38

3.2	Metody	39
3.2.1	Exprese proteinu v prokaryotním systému	39
3.2.2	Denaturační purifikace proteinů	40
3.2.3	Nativní purifikace proteinů	41
3.2.4	Dialýza proteinů	41
3.2.5	Zakoncentrování proteinů.....	41
3.2.6	Kvantifikace proteinů	41
3.2.7	SDS-PAGE	42
3.2.8	Semi-dry western blot	43
3.2.9	Glykosylace <i>in vitro</i>	44
3.2.10	ELISA detekce <i>de novo</i> tvorby imunokomplexů.....	44
4	Výsledky.....	46
4.1	Stanovení velikosti proteinů	46
4.2	Exprese proteinů	47
4.3	Optimalizace purifikační metody pro CH1-P-CH2 a těžký řetězec IgA1	49
4.3.1	Purifikace za denaturačních podmínek.....	49
4.3.2	Purifikace za nativních podmínek	52
4.4	Glykosylace <i>in vitro</i>	55
4.5	<i>De novo</i> tvorba imunokomplexů.....	56
5	Diskuze.....	58
6	Závěr.....	60
7	Literatura	61
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	66

1 ÚVOD

Rekombinantní technologie mají v biotechnologiích a medicíně své nenahraditelné místo. Od zavedení rekombinantně připravených peptidů do inzulinoterapie uběhly více jak tři dekády a produkty genového inženýrství si prorazily cestu do odvětví jakými jsou například onkologie či imunologie. Pro produkci rekombinantních proteinů lze nejčastěji využít bakteriálních, kvasinkových, hmyzích či savčích buněk. Nejvýznamnějším produkčním systémem nejen pro terapeutické proteiny jsou buňky prokaryotické v čele s *E.Coli*. Ačkoliv skrývají bakteriální systémy některá omezení, která musí být řešena dalšími *in vitro* metodami (produkce proteinů v neaktivní formě bez posttranslačních modifikací, tvorba nerozpustných inkluzních tělísek aj.), díky technologické a finanční nenáročnosti produkce zastiňují v biotechnologiích i dokonalejší buňky eukaryotické.

Jednou z nejčastějších modifikací proteinů je jejich glykosylace. *In vivo* je zajišťována v rámci post-translační modifikace v endoplazmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu. Podle typu vazby glykanu k proteinu rozlišujeme proces N-glykosylace a O-glykosylace. Glykoproteiny v organismu nalezneme mimo jiné jako sérové proteiny, konkrétně imunoglobuliny. Imunoglobulin A1 a jeho aberantní glykosylace hraje klíčovou roli v onemocnění IgA nefropatie (Mestecky *et al.*, 2013). V České republice dosahuje incidence téměř 12 případů na milion obyvatel (Maixnerova *et al.*, 2015). Proti podgalaktosylovaným IgA1 (Gd-IgA1) jsou namířeny tělu přirozené IgG protilátky. Vznikají patologické vysokomolekulární imunokomplexy, které nejsou metabolizovány v hepatocytech, ale ukládají se v mesangiu ledvin. Tato depozita vedou k proliferaci mesangiálních buněk, produkci prozánětlivých cytokinů a rozvoji nefritidy. Průběh nemoci může vést až k selhání ledvin. Podle Nováka (2005) mají proliferační vlastnosti pouze imunokomplexy větší 800 kDa.

Vyhlídková specifická terapie IgA nefropatie počítá s účastí rekombinantních glykoproteinů coby kompetitorů patientských Gd-IgA1 tvořících imunokomplexy s Gd-IgA1 specifickými IgG protilátkami.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

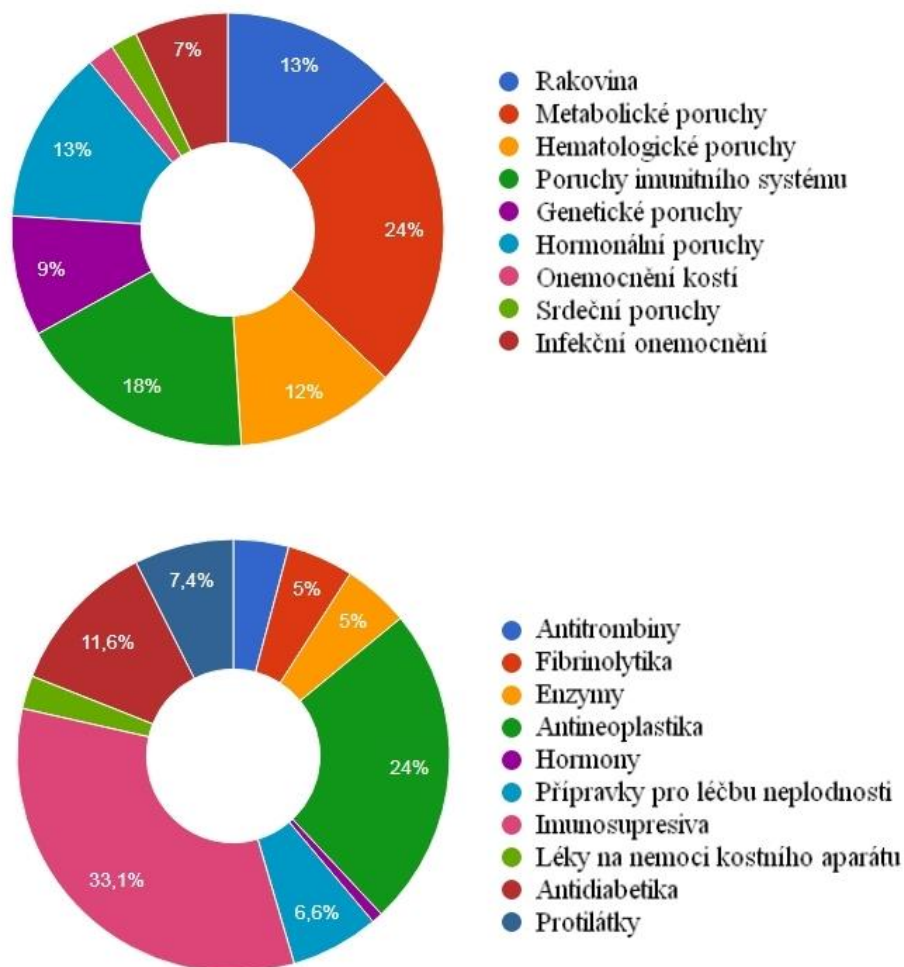
2.1 Rekombinantní proteiny v medicíně

V patogenezi mnohých onemocnění se setkáváme s defektním chováním proteinů, ať už se jedná o jejich expresi, funkčnost či aktivitu.

První rekombinantní proteiny byly získávány přímo ze svých originálních zdrojů původu (např. inzulin ze slinivky prasat, chymosin z žaludečních šťáv telat). Převrat přišel v sedmdesátých letech 20. století. Jako první navrhl a uskutečnil přípravu rekombinantní DNA v roce 1971 biochemik Paul Berg, který spojil úseky DNA ze dvou odlišných systémů (virů). Boyer a Cohen se v roce 1973 dostali v nově nastupujících biotechnologiích s rekombinantní DNA ještě dál. Zkonstruovali první umělý bakteriální plazmid pSC101 (Cohen *et al.*, 1973) a položili tak pomyslný základní kámen genetického inženýrství.

V letech 1977–78 se podařilo Boyerovi s Cohenem produkovat v bakteriálním systému i první potenciálně klinicky využitelné savčí proteiny, somatostatin a inzulin. Rekombinantní lidský inzulin, pod komerčním názvem Humulin, se stal v roce 1982 vůbec prvním produktem genetického inženýrství schváleným FDA ke vstupu na trh. Od tohoto milníku je k roku 2017 v USA schváleno 239 proteinových a peptidových terapeutik biotechnologického původu (Usmani *et al.*, 2017) a stovky dalších jsou v klinickém testování. Přehled oblastí medicíny využívající proteinová terapeutika a zastoupení nejčastějších forem léčiv jsou graficky zpracovány podle statistických dat THPdb databáze na Obrázek 1: Proteinová a peptidová terapeutika ve statistických datech z databáze THPdb k roku 2017. Výšečové grafy ukazují onemocnění a poruchy, v jejichž terapiích je proteinových terapeutik využíváno, a kategorie léčiv, ve kterých je nalezneme nejčastěji. Převzato z Usmani *et al.*, 2017.

Proteinová léčiva se od nízkomolekulárních v mnoha ohledech odlišují. Překážkou pro efektní využití proteinového terapeutika v organismu může být jeho velikost, rozpustnost, biologický poločas rozpadu, náchylnost k degradaci, biodostupnost či imunogenita. K modifikaci jejich omezujících vlastností je s výhodou využíváno nástrojů tzv. proteinového inženýrství. K úpravě farmakodynamiky a farmakokinetiky proteinových terapeutik přispívají nejčastěji změny aminokyselinové sekvence, glykosylace, PEGylace či konjugace s albuminem (Usmani *et al.*, 2017).



Obrázek 1: Proteinová a peptidová terapeutika ve statistických datech z databáze THPdb k roku 2017. Výšečové grafy ukazují onemocnění a poruchy, v jejichž terapiích je proteinových terapeutik využíváno, a kategorie léčiv, ve kterých je nalezneme nejčastěji. Převzato z Usmani et al., 2017.

2.1.1 Rekombinantní technologie

2.1.1.1 Molekulární klonování

Molekulární klonování zahrnuje experimentální techniky vedoucí k přenosu genu z jednoho organismu do druhého. Gen produkující cílový protein je z původního organismu izolován (např. tvorbou a screeningem genomické knihovny nebo izolací mRNA) a amplifikován metodou PCR. Gen je do hostitelského organismu vkládán jako součást tzv. vektoru. Je nutné tedy izolovaný gen spojit s vektorem. Soupravy pro přípravu vektorů jsou dnes běžně komerčně dostupné.

Ke spojení DNA vektoru a genové DNA je využíváno enzymatických reakcí katalyzovaných enzymem ligasou a restrikční endonukleasou. Štěpíme-li vektor i gen

stejnou endonukleasou, vzniknou štěpy s lepivými konci. Za využití enzymatické reakce ligasy jsou takto připravené fragmenty spojeny. Novější komerčně dostupné vektory využívají kromě štěpení DNA i jiné principy inserce transgenů. Kit Gateway od firmy Life Technologies (USA) funguje na principu rekombinace. K úspěšnému zabudování inzertu do vektoru využívá místně specifického systému rekombinace bakteriofága λ (Ručková *et al.*, 2014). Vektory pro TOPO klonování od stejné firmy zase využívají reakci DNA topoisomerasy, která funguje jako ligasa i restriktasa. TA klonovací systémy pracují s přesahující sekvencí adeninu, který na PCR amplikonu genu přirozeně přidává Taq polymerasa, a její komplementarity k thyminu na linearizovaných koncích vektorového plazmidu (dodává např. Thermofisher, USA).

Vektor je poté vnesen do hostitelské buňky. Buňky musí být pro přijetí vektoru kompetentní. Příprava kompetentních buněk je nejčastěji prováděna pomocí působení mírného teplotního šoku (42 °C) či elektroporací. Obě metody působí narušení propustnosti buněčné stěny a možnost přijmout vektor. Transformace hostitele (vnesení vektoru) není proces stoprocentní.

Jedinci obsahující transgen musí být selektováni za využití selekčního tlaku média či selekčního genu ve vektoru. Transformant je schopen svou proteosyntetickou drahou produkovat rekombinantní protein.

2.1.1.2 Klonovací vektory

V současné době existuje velké množství různých typů klonovacích vektorů. Společné a podstatné jsou 3 jejich nezbytné vlastnosti:

1. Obsahují geny k zajištění namnožení vektoru v hostitelské buňce, tedy geny pro vlastní replikaci.
2. Obsahují klonovací místo s řadou restričních míst pro restriční endonukleasy, díky jejichž působení je umožněna inserce klonovaného genu.
3. Nesou geny, které umožní selekci transformantů od buněk, které vektor nepřijaly, a od buněk, které obsahují prázdný vektor bez inzertu. (<http://labguide.cz/metody/klonovani/>)

Ideální vektor využívaný pro expresi proteinů v hostitelské buňce by měl navíc obsahovat sekreční signální peptid a odstranitelnou fúzní značku pro vyšší stabilitu a snazší purifikaci získaného proteinu.

Nejtradičnějšími vektory pro klonování jsou **plazmidy**. Jedná se o extrachromozomální sebereplikující se dvouvláknovou kruhovou DNA. Nevyužívají se přirozeně se vyskytující plazmidy, ale geneticky upravené, aby splňovaly podmínky úspěšné transformace a exprese v hostiteli. Často je transgen vložen v klonovacím místě uvnitř genu *LacZ*, jehož produktem je β -galaktosidasa. Samotné klonovací místo funkčnost genu nenarušuje, k jeho inaktivitě však dochází při úspěšné inzerci transgenu. Enzym β -galaktosidasa ve své aktivní formě hydrolyzuje bezbarvý substrát X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid) na intermediát, který spontánně oxiduje na modrý produkt. Pěstujeme-li bakterie na médiu doplněném o X-Gal, můžeme odlišit podle modro-bílého zbarvení kolonií bílé transformanty od modrých buněk s vektorem prázdným nebo buněk bez vektoru.

Plazmid by měl obsahovat takový promoter, který zajišťuje indukovatelnou a silnou expresi proteinu. Běžně využívané jsou např. promotery z *lac* a *trp* operonů *E.Coli*, promoter genu 10 z bakteriofága T7 či p^L promoter z fága λ .

Jako klonovacího vektoru se často využívá také **bakteriofágu λ** . Transgen je vložen do oblasti fágové DNA esenciální pro její zabudování do chromosomu hostitele. Rekombinantní fág se potom i s transgenem replikuje lytickou cestou, čehož je využito pro inkorporaci transgenu a jeho pomnožení v hostiteli.

Od výše uvedených základních vektorů jsou odvozené další. **Kosmid** je kombinací plazmidu a bakteriofága. Z plazmidu je využito počátku replikace, z bakteriofága specifických *cos* sekvencí, mezi něž je inert vložen. Pro inzerci je kosmid linearizován, po transformaci hostitele se DNA zacyklí a dále se replikuje jako plazmid z vlastního počátku replikace.

Modifikovanou verzí kosmidu je **fosmid**, který má počátek replikace odvozený od F faktoru *E. Coli*.

Pro potřeby klonování velkých fragmentů DNA (>47 kb) je třeba využít speciálních umělých bakteriálních a kvasinkových chromosomů – **BAC** a **YAC** (<http://labguide.cz/metody/klonovani>).

2.1.1.3 Expresní systémy

Pro expresi rekombinantních proteinů lze využít celou škálu hostitelských buněk, počínaje *E.Coli* až po savčí buněčné linie odvozené z lidských buněk. Podle požadavků

na kvalitu a kvantitu proteinu lze využít prokaryotických systémů, kvasinek, savčích buněk nebo buněk hmyzích. Výjimkou není ani využití vláknitých hub jako expresních systémů v biotechnologiích, nebo molekulární farmaření v transgenních rostlinách či zvířatech (Gomes *et al.*, 2016).

Bakteriální systémy

Nejstarším a nejvyužívanějším systémem pro produkci proteinů jsou systémy prokaryotní. Prim mezi všemi bakteriálními systémy hraje *E.Coli*, popsány a využívány jsou ale i další rody a druhy, např. *B. Subtilis* či *P. Fluorescens*.

Nespornými výhodami prokaryotních buněk jsou nízké požadavky a náklady na kultivaci, možnost velkokapacitní fermentace, snadná genová manipulovatelnost systému, rychlý nárůst kultur a vysoké výtěžky. Nežádoucí může být produkce proteinu v nerozpustných inkluzních tělískách a hromadění toxického produktu bakterií, endotoxinu. Problémy nastávají také u správné skladby a funkce proteinu. Bakteriální buňky absolutně postrádají aparát pro posttranslační modifikace a protein je produkován v neaktivní formě. I přes tato omezení převyšují systémy *E.Coli* a jiných systémy savčí, a to zejména finančně a technologicky (Tripathi, 2016).

K transformaci bakterií se používají plazmidové vektory (pUC, pET, pQE, ...) se zapojením některého z celé řady promoterů (T7, lac, trc, trp, pL, ...). Indukce exprese proteinů transformovanou bakterií může být v závislosti na použité variantě vektoru vyvolána nejčastěji teplem nebo přídatkem IPTG (Tripathi, 2016).

Kvasinkové systémy

Kvasinky mohou sloužit jako jednoduchý a levný nástroj pro přípravu vyšších eukaryotních proteinů v jejich správné konformaci. Částečně jsou schopny i savčích posttranslačních modifikací. Tento nástroj není dokonalý a mezi modifikacemi kvasinek a savčích buněk nalezneme nemalé rozdíly, jako je například jiný vzor glykosylace u nejvyužívanější *S.Cerevisiae*. Tento problém je však možné vyřešit alternativním kvasinkovým systémem, *P.Pastoris*, jehož glykosylace se blíží těm savcím. Benefitem kvasinek je kromě správného foldingu proteinů také vysoký výtěžek exprese, nízké náklady, velkokapacitní kultivace a rychlý růst (Gomes *et al.*, 2016).

Inzert je do buněk vložen pomocí specializovaných plazmidů (epizomální, centromerový, replikující se, integrační) či YAC. Využívané plazmidy jsou kompatibilní s *E.Coli*, ve které mohou být namnoženy, a obecně se označují termínem „shuttle“ vektory (Lundblad, 2001). Promotery jsou nejčastěji indukovatelné promotery GAL1 u *S.Cerevisiae* a AOX1 u *P.Pastoris*.

Savčí a hmyzí systémy

K získání eukaryotního rekombinantního proteinu, jehož aktivita by odpovídala biologické aktivitě přirozeného proteinu, je nutné použití adekvátních vyšších eukaryotních systémů. Správných požadovaných posttranslačních modifikací u proteinů savčího původu lze dosáhnout jedině v buňkách s vyvinutým aparátem posttranslačních úprav. Savčí hostitelské systémy produkují proteiny, které svými modifikacemi i aktivitou odpovídají jejich přirozeným variantám. Udržování a manipulace s těmito systémy je náročná jak finančně, tak technologicky. Navíc, výsledné výtěžky jsou nízké a rychlost růstu a produkce je pomalá. Levnější variantou s většími výnosy jsou buňky hmyzí. Jejich použití však může být v některých případech na úkor správně utvořených modifikací (Ručková *et al.*, 2014).

K vnesení transgenů do savčích buněk slouží specifické virové vektory, odvozené nejčastěji od retrovirů, lentovirů nebo adenovirů. K produkci proteinů v hmyzích systémech se využívá infekce buněk baculovirem společně s transferovým vektorem. Vzhledem k tomu, že baculoviry jsou přirozenými parazity úzké skupiny hmyzu a pro obratlovce nepředstavují riziko infekce, práce s nimi je bezpečnější, než je tomu u systému virových vektorů a savčích buněk (Gomes *et al.*, 2016).

Zajímavý posunem na poli přípravy rekombinantních proteinů je tzv. molekulární farmaření. Transgenní rostliny a živočichové jsou využívány jako „továrny“ na výrobu biofarmak, jakými jsou proteinová terapeutika či vakcíny.

Dostupné expresní systémy a jejich klady a zápory jsou shrnuty v Tabulka 1.

Tabulka 1: Přehled expresních systémů a jejich vlastností. Upraveno podle informací z článků Gomes et al., 2016 a Ručková et al., 2014.

Hostitelský systém	Příklad	Výhody použití	Nevýhody použití
Prokaryota	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>P. fluorescens</i>	Snadno kontrolovatelný a manipulovatelný, ověřený systém Levná produkce Rychlý růst Vysoké výtěžky Možnost sekrece do média Možnost kontinuální exprese	Produkce endotoxinů Chybí posttranslační modifikační (PTM) aparát Rozdíly v genetickém kódu Chybí introny Tvorba inkluzních tělísek
Kvasinky (nižší eukaryota)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>S. pombe</i>	Aparát pro PTM Jednoduchý a nenáročný systém pro eukaryotické proteiny Levná produkce Rychlý růst	Hypermanosylace Tendence zadržování proteinu v buňce Nižší výtěžky než <i>E. Coli</i> Rozdíly v genetickém kódu
Vláknité houby	<i>A. niger</i>	Glykosylace téměř jako u savců Vysoké výtěžky Nízké náklady	Komplexní systém Méně známo o jejich fyziologii
Savčí buňky	HEK 293, HeLa, CHO, COS, BHK	Produkce proteinů v jejich přirozené biologicky aktivní formě PTM	Finančně náročné Pomalý růst Nízké výtěžky Náročná technologie Náchylné ke kontaminaci
Hmyzí buňky/baculoviry	Sf-9, Sf-21 + baculoviry	Větší výtěžky než savčí systémy PTM podobná jako u savců Produkce glykoproteinů	Nelze exprimovat kontinuálně Vyšší nároky na kultivaci Pomalejší růst

2.1.2 Purifikace proteinů

Využití rekombinantních proteinů v klinické praxi se setkává s vysokými nároky na čistotu produktů. Proces a efektivitu purifikace lze usnadnit nástroji molekulárního klonování. Produkované rekombinantní proteiny jsou ve většině případů exprimovány s tzv. fúzními afinitními značkami (Tabulka 2). Ve většině případů se jedná o speciální krátké oligopeptidy, které umožňují selektivní vyvázání proteinů přes jeho ligand. S výhodou je tak pro purifikace proteinů využíváno metod **afinitní chromatografie**.

Fúzní značky jsou v purifikovaných produktech nežádoucí a lze se jich snadno zbavit díky přítomnosti specifické sekvence, která je spojuje s proteinem. Spojovací sekvence je specificky rozpoznávána proteasou (trombin, faktor Xa, entrokinasa, TEV proteasa), jejíž aktivitou dojde k odštěpení připojené fúzní značky (Ručková *et al.*, 2013). Výhodná je také fúze chitinové vazebné domény (CBD) s molekulou inteinu, která vykazuje autokatalytickou aktivitu. Odštěpení tagu lze provádět přímo na chromatografické koloně nebo v roztoku (Ručková *et al.*, 2013).

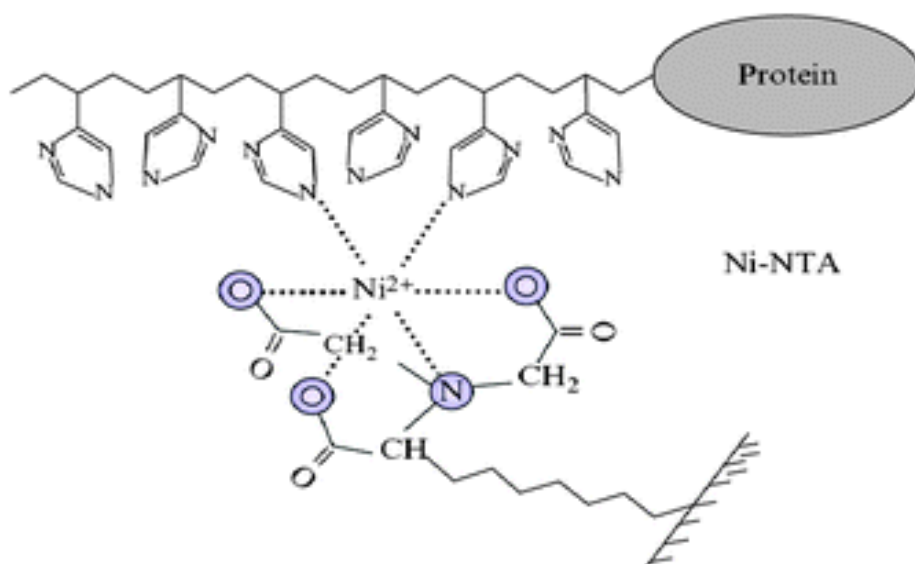
Tabulka 2: Příklady využívaných afinitních značek. Upraveno dle Saraswat *et al.* (2013)

Značka	Velikost	Ligand
Poly-His tag	5-15 aminokyselin	Ionty přechodných kovů
FLAG	8 aminokyselin	Protilátka anti-FLAG
Strep tag I	9 aminokyselin	Streptavidin
c-myc	10 aminokyselin	Protilátka anti-c-myc
CBP	26 aminokyselin	Calmodulin
CBD	27-189 aminokyselin	Celulosa
GST	26 kDa	Glutathion
MBD	40 kDa	Maltosa, amylosa

Základním prvkem pro afinitní chromatografii je kolona plněná maticí s molekulami ligandu. Každá fúzní značka vyžaduje jinou maticí, jiný ligand a jiný purifikační protokol, obecný princip metody je však u všech stejný. Na maticí plněnou kolonu je aplikován buněčný lyzát obsahující rekombinantní protein společně s balastními proteiny. Purifikovaný rekombinantní protein se díky své značce specificky a vratně váže na ligand v maticí kolony. Změnou pH, ligandu nebo iontové síly díky vhodným promývacím

roztokům je interakce tagu a ligandu oslabena a cílový protein je z kolony eluován (Ručková *et al.*, 2016).

Jednou z nejvyžívanějších systémů afinitní purifikace je IMAC (immobilized metal affinity chromatography), a to díky rozšíření a oblíbenosti práce s fúzní polyhistidinovou značkou. Principem purifikace je chelatace v matici imobilizovaných iontů přechodných kovů (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) histidinem. Ionty kovů jsou na matici imobilizovány chelatací nitriloacetátem (NTA) nebo diiminoacetátem (IDA). Imobilizovaný iont má k dispozici vazebná místa, na které je vyvazován histidin z fúzní značky proteinu (Wong *et al.*, 1991). K eluci fúzních proteinů lze kromě změny pH využít aplikace imidazolu, strukturně podobné sloučeniny. Imidazol vykazuje vyšší afinitu ke kovovým iontům v matici a vytěsňuje histidin z vazby.



Obrázek 2 Schéma Ni^{2+} zprostředkované vazby proteinu s polyhistidinovou značkou na matici IMAC. Převzato z Rowinska-Zyrek *et al.*, 2013.

2.2 Glykoproteiny

Nově vzniklé proteiny podstupují posttranslační modifikace, které jsou důležité pro jejich správnou funkci. Jednou z nejběžnějších úprav syntetizovaného proteinu je jeho glykosylace. Proces glykosylace probíhá převážně v intracelulárním systému membrán zahrnující membránové útvary endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Výsledkem glykosylace je vznik glykosidické vazby mezi aminokyselinou a sacharidem. Proteiny podstupující tento typ modifikace označujeme společným názvem glykoproteiny.

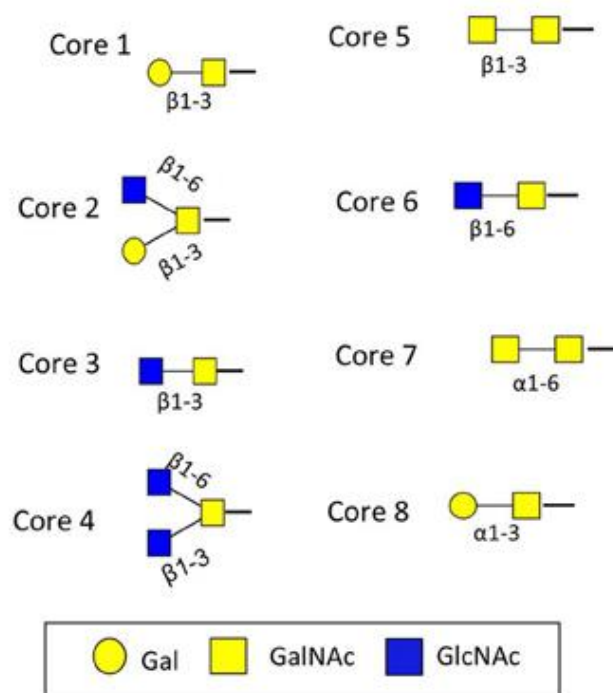
Glykoproteiny obsahují glykanové řetězce složené až z 20 sacharidových jednotek. (Tabasum *et al.*, 2017). Běžně může být v polysacharidovém řetězci glykoproteinů vázáno 9 typů sacharidových jednotek: N-acetyl-D-galaktosamin, N-acetyl-D-glukosamin, D-glukosa, D-manosa, ramnosa, L-fukosa, xylosa, D-galaktosa a kyselina sialylová. Jejich zastoupení je variabilní napříč různými typy glykoproteinů (Tabasum *et al.*, 2017).

Podle typu glykosidové vazby můžeme rozlišit glykoproteiny na dvě základní skupiny: O-glykoproteiny (vzniklé O-glykosylací) a N-glykoproteiny (vzniklé N-glykosylací) (Ferguson *et al.*, 2009).

2.2.1 Glykosylace

2.2.1.1 O-glykosylace

O-vázané glykany jsou krátké oligosacharidové řetězce, které jsou na protein připojeny v Golgiho aparátu. O-glykosidové vazby se účastní OH skupina hydroxyaminokyselin, a to nejčastěji serinu a threoninu. Nejčastěji je O-glykosylace zahájena připojením N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) za účasti enzymu z rodiny GalNAc transferas. Takto vznikající O-glykoproteiny označujeme jako O-glykoproteiny mucinového typu. Glykoproteiny s navázaným GalNAc mohou být prodlouženy přidáním molekuly galaktosy nebo N-acetylgalaktosaminu. Takto vzniká 8 základních struktur (struktury core 1–8, znázorněny na Obrázku 3), které mohou být v dalších krocích prodlužovány a větveny. Těchto kroků se účastní molekuly galaktosy, GalNAc, GlcNAc, glukosy, kyseliny sialylové a estery sulfátů a jejich příslušné transferasy (Ernst, *et al.*, 2008).



Obrázek 3: Core struktury O-glykanů. Na molekulu N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) je navázána molekula galaktosy (Gal) nebo N-acetylglukosy (GlcNAc). Typ navázané jednotky a její vazby dává vzniku 8 rozlišným strukturám. Převzato a upraveno z Tailford et al., 2015.

2.2.1.2 N-glykosylace

N-glykosylací vznikají robustnější a rozvětvenější glykany, než tomu bylo u O-glykoproteinů. Je zahájena v endoplasmatickém retikulu na amidové skupině asparaginu, který se vyskytuje v sekvenčním motivu N–X–S/T. X může být kterákoliv aminokyselina kromě prolinu. Serin a threonin mohou být v sekvenci výjimečně nahrazeny i cysteinem (Satomi Shimonishi 2004). Sacharidové jednotky nejsou na protein připojovány postupně, ale v podobě 14sacharidového řetězce. Tento prekurzor obsahuje 3 molekuly glukosy, 9 molekul manosy a 2 molekuly N-acetylglukosaminu. Řetězec se formuje na lipidové membránové kotvě, dolicholu. První připojovanou jednotkou je N-acetylglukosamin. Část sacharidů se k dolicholu připojí na cytosolové straně endoplasmatického retikula a tvorba glykanového řetězce je dokončena po překlopení dolicholu v lumen endoplasmatického retikula. Glykan je z dolicholu přenesen na asparaginové reziduum proteinu v reakci katalyzované enzymem oligosacharyltransferasou (EC 2.4.1.119) (Trombetta, 2013).

V endoplasmatickém retikulu je vzniklý glykoprotein ještě upraven za účasti glukosidasy I (EC 3.2.1.106), glukosidasy II (EC 3.2.1.84) a manosidas. Odštěpením poslední vázané glukosy je glykoprotein uvolněn z endoplasmatického retikula do

Golgiho aparátu (Trombetta, 2013). Zde dochází k dalším modifikacím a rozvětvení N-glykanu.

2.2.2 Funkce glykanových řetězců

Glykanové řetězce navázané na proteiny chrání před proteasomální degradací, napomáhají v procesu správného složení proteinu v ER, vystupují jako transportní signál při vezikulárním směřování proteinu do cílové organely. V podobě mucinů obsažených ve sliznicích plní protektivní účinek. Glykoproteiny vystupují jako markery buněčné identity na povrchu buněk (Alberts *et al.*, 2008).

Glykoproteiny tvoří velkou část sérových proteinů. Významným zástupcem glykosylovaných proteinů jsou imunoglobuliny účastníci se reakcí imunitní odpovědi. Glykany nalezneme u všech tříd imunoglobulinů a plní řadu funkcí: Podílejí se na struktuře imunoglobulinů, ovlivňují rozpustnost a konformaci molekuly, jsou důležité pro sekreci imunoglobulinů a stojí za zprostředkování vazeb s patogeny a receptory (Arnold *et al.*, 2007).

2.3 Imunoglobulin A

2.3.1 Struktura IgA

Jednou z klíčových složek specifické imunity jsou imunoglobuliny. Jedná se o glykoproteiny s typickou globulární strukturou, která se skládá ze 2 těžkých a 2 lehkých řetězců vzájemně propojených disulfidickými vazbami. Těžké řetězce se skládají ze 4-5 imunoglobulinových domén, lehké řetězce ze 2 domén. Místo propojení domén těžkého řetězce se označuje jako pantová oblast. Na N-koncích těžkého i lehkého řetězce se nachází variabilní domény, které jsou zodpovědné za specifitu vůči antigenům. Ostatní domény jsou konstantní a v rámci jednoho izotypu imunoglobulinů se nikterak neliší. (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Imunoglobulin A obsahuje těžké řetězce typu α . Rozlišujeme u něj dva typy lehkého řetězce, κ a λ .

IgA se vyskytuje v různých formách v závislosti na lokalitě ve které je stanovován. Monomerní forma IgA je predominantní formou, kterou nalezneme v cirkulaci. Místem její tvorby je kostní dřeň. (Woof, 2013).

Dimery IgA (dIgA) s menším příspěvkem dalších polymerů (pIgA) dominují ve sliznicích, respektive v jejich externích sekretech jako tzv. sekreční forma dIgA. dIgA a

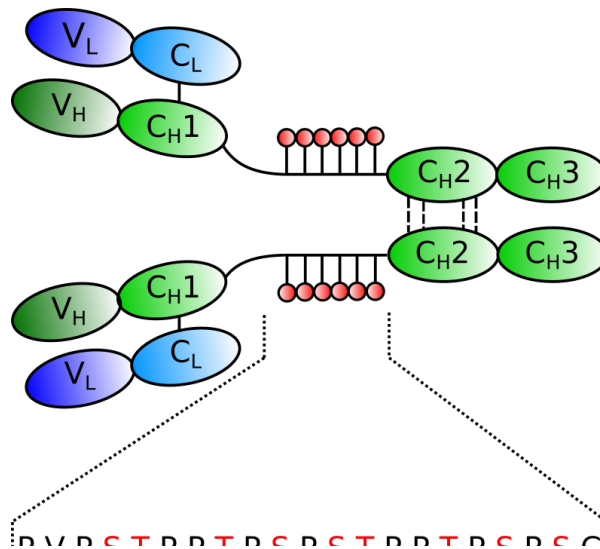
pIgA jsou souhrně označovány jako polymerní IgA. dIgA tvoří dvě molekuly IgA, které jsou na Fc konci propojeny polypeptidem označovaným jako J řetězec (Krugmann *et al.*, 1997). dIgA je přenášen do extracelulárního prostoru pomocí vazby na membránový receptor (pIgR). pIgR je po navázání IgA rozštěpen a jedna jeho část zůstává na IgA navázaná. Tento pozůstatek označujeme jako sekreční komponenta (S komponenta) a je charakteristickým znakem sekrečních forem dIgA (Woof, 2013). Tyto polymerní formy jsou produkovány plazmatickými buňkami slizničního epitelu (Brandtzaeg a Johansen, 2005).

U člověka nalezneme IgA ve dvou formách, IgA1 a IgA2 (Woof a Russell, 2011). Oba izotypy vykazují značnou homologii s výjimkou úseku pantové oblasti, která je u IgA1 prodloužena. Rozdílné je jejich zastoupení v systému. V sekrečních produktech horních cest dýchacích a horního zažívacího traktu dominuje forma IgA1, v sekretech tlustého střeva a ženského pohlavního ústrojí mírně převažuje izotyp IgA2. V séru je z 84% zastoupena forma IgA1 (Woof a Mestecky, 2015).

2.3.2 Funkce IgA

IgA zastává úlohu nejen v reakcích adaptativní imunity, ke kterým přispívá svými hypervariabilními smyčkami (CDR) specificky vážící antigen, ale také v mechanismech imunity vrozené.

Prostředníky nespecifické imunity, která představuje první linii obrany proti bakteriálním patogenům, jsou cukerné řetězce na povrchu molekul IgA. Povrchy bakterií nesou proteiny lektiny, které s cukry reagují. Cukry jsou nedílnou součástí IgA1 i IgA2. Vyskytují se jako O-glykany v pantové oblasti IgA1 a jako N-glykany na těžkém řetězci u IgA1 a IgA2. Bakterie jsou tedy rozpoznávány IgA pomocí nespecifické vazby lektin-cukr (Ruhl *et al.*, 1996).



Obrázek 4 Struktura IgA1 s charakteristickou aminokyselinovou sekvencí prodloužené pantové oblasti. Červeně označená rezidua serinu a theroninu jsou místy potenciální O-galaktosylače IgA1. Upraveno podle Knoppova *et al.*, 2016.

Specifické protilátky typu IgA vystupují například v reakci na přítomnost cholera toxinu patogenu *Vibrio cholerae* (Apter *et al.*, 1993), jsou namířeny proti reoviru typu 1 Lang (Helander *et al.*, 2004) či rotavirálnímu proteinu V6P (Corthesy *et al.*, 2006).

2.3.3 IgA1

IgA1 je sérovým dominantním izotypem imunoglobulinu A. Nejsignifikantnější rozdíl mezi oběma izotypy pozorujeme v pantové oblasti, která je u izotypu IgA1 významně prodloužena, a to díky inzerci 16 aminokyselin s úsekem opakujících se prolinových, threoninových a serinových reziduí (Obrázek 4 4) (Woof a Mestecky, 2015).

Povaha vložené aminokyselinové sekvence se odráží i v odlišné glykosylaci IgA1, který tak na rozdíl od IgA2 nabízí unikátní místa pro O-glykosylaci. Pantová oblast IgA1 nese obvykle 3-6 O-glykanů. Cukerné řetězce obsahují N-acetylgalaktosamin (GalNAc), galaktosu a kyselinu sialylovou a vykazují mikroheterogenitu (Tarelli *et al.*, 2004). Díky prodloužené pantové oblasti je IgA1 náchylný ke štěpení bakteriálními proteasami. Jejich působením vznikají z molekuly 2 fragmenty: Fab nesoucí vazebnou doménou pro antigen a fragment Fc, tvořen doménami těžkého řetězce (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Na těžkém řetězci IgA1 se potom nacházejí místa pro N-glykosylaci, která může tvořit 6-7 % hmotnosti molekuly (Tomana *et al.*, 1976).

2.3.3.1 *O-glykosylace imunoglobulinu A1*

U imunoglobulinu A1 nabízí vhodná místa pro O-glykosylaci pantová oblast spojující Fab a Fc regiony molekuly. V této oblasti bohaté na prolin se nachází 9 potenciálních míst O-glykosylace. U 6 aminokyselinových reziduí byla místa výskytu O-glykanů potvrzena: Thr²²⁸, Ser²³⁰, Ser²³², Thr²²⁵, Thr²³⁶ a Thr²³³ (Mattu *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2012). O-glykosylace pantové oblasti IgA1 má v rámci imunitního systému své opodstatnění. Přes O-glykany jsou navazovány patogenní mikroorganismy, sekreční IgA v mateřském mléce takto napomáhá čelit novorozencům s nezralým imunitním systémem infekčním agens (Arnold *et al.*, 2007).

O-glykosylace pantové oblasti IgA1 probíhá v Golgiho aparátu a je do ní zapojeno hned několik enzymů, které se podílí na postupném přidávání komponentů na vznikající O-glykan. Přidávané sacharidy jsou ve své aktivní formě, tj. ve vazbě na nosič uridindifosfát (UDP). Počátkem procesu tvorby sacharidového řetězce je navázání N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) na serinové či threoninové reziduum pantové oblasti. Tento úvodní krok je katalyzován enzymem UDP-N-acetylgalaktosaminyltransferasou (GalNAcTII) (Iwasaki *et al.*, 2003). Řetězec je v dalším kroku prodloužen přidáním galaktosy k molekule GalNAc. Přenos probíhá za účasti enzymu core 1 β -1,3-galaktosyltransferasy (C1 β 3GalTI), která je stabilizována chaperonem Cosmc (Ju *et al.*, 2002). Syntéza cukerného řetězce je ukončena navázáním terminální kyseliny sialylové (SA). Negativně nabitá molekula SA může být navázána jak na galaktosu, tak přímo na GalNAc. Sialylaci zprostředkovávají enzymy ze skupiny sialyltransferas, konkrétně α -2,3-Gal specifická sialyltransferasa a α -2,6-GalNAc specifická sialyltransferasa (ST6GalNAcII) (Raška *et al.*, 2007).

2.3.3.2 *Katabolismus IgA1*

K odbourávání oběhového IgA1 dochází převážně v játrech (Tomana *et al.*, 1988). Vstup monomerní i polymerní formy IgA1 do jater je zprostředkován glykan-specifickými receptory exprimovanými na povrchu hepatocytů. Tyto receptory jsou známé jako asialoglykoprotein receptory (ASGP-R) (Moldoveanu *et al.*, 1990). Ligandy ASGP receptorů jsou desialylované glykoproteiny, mezi nimi i IgA. Proteiny se váží na ASGP receptory přes svá terminální galaktosová či GalNAc rezidua. Vyvázané glykoproteiny jsou v hepatocytech uzavřeny do vezikul a po fúzi s lysozomem enzymaticky degradovány. Zároveň dochází k obnově exprese ASGP receptoru na povrchu hepatocytů (Ashwell a Harford, 1982).

2.3.4 IgA2

IgA2 je v séru zastoupen asi jen z 10 %, jeho hladina je vyšší v sekretech (Woof a Kerr, 2006). Hlavním rozdílem mezi IgA1 a IgA2 je povaha pantové oblasti. IgA2 má pantovou oblast zkrácenou o 16 aminokyselin oproti IgA1 a postrádá tak unikátní místa pro vazbu O-glykanů. Jedinou variantou glykosylace IgA2 je N-glykosylace na těžkém řetězci. Molekula IgA2 bývá N-glykosylována z 8-10 % (Tomana *et al.*, 1976).

V systému se IgA2 vyskytuje ve dvou allotypech, které nesou označení IgA2m(1) a IgA2m(2). Sekvence těžkých řetězců obou variant se po celé délce na mnoha místech liší. Největším rozdílem je ve spojení těžkého a lehkého řetězce molekul. U IgA2m(2) jsou těžký a lehký řetězec spojeny disulfidickými můstky, vazbou charakteristickou pro obecnou strukturu imunoglobulinů. IgA2m(1) tento kovalentní typ vazby postrádá a řetězce jsou vázány nekovalentními interakcemi (Woof a Kerr, 2006).

2.4 IgA nefropatie

IgA nefropatie, známá též jako Bergerova nemoc, je nejčastější známou glomerulonefritidou. Jedná se o ledvinové onemocnění, které vzniká v důsledku ukládání IgA protilátek v glomerulech. Tato deposita vyvolávají lokální zánět, který vede ke snížené schopnosti ledvin filtrovat odpadní látky.

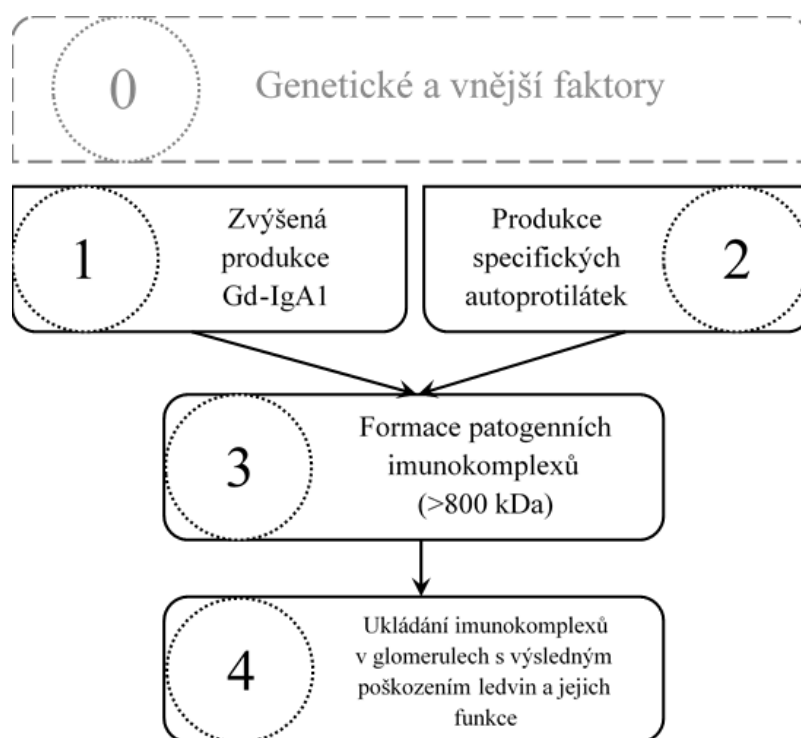
Nemoc byla ve spojitosti s rolí IgA1 poprvé popsána v roce 1968 francouzskými nefrology Jeanem Bergerem a Nicole Hinglaisem.

2.4.1 Projevy a progresse

Epidemiologie nemoci se v rámci světové populace liší. V centrální Africe je prevalence nejnižší, zatímco největší výskyt nalezneme ve východní Africe. V rozdílech prevalence napříč světadily hraje z velké části roli lokální variabilita infekčních patogenů a distribuce alel spjatých s rizikem vzniku nemoci (Kirylyuk *et al.*, 2014). Podle registru renálních biopsií z let 1994-2011 (Maixnerova *et al.*, 2015) se incidence nemoci v České republice pohybuje okolo 11,6 případů na milion obyvatel.

IgAN je glomerulonefritidou primární, zasaženy jsou pouze ledviny bez dalšího systémového poškození. Základem pro rozvoj nefropatie je mesangiální ukládání imunokomplexů obsahujících IgA1 s charakteristickou aberantní glykosylací (galaktosadeficientní IgA1, Gd-IgA1). Vývoj a nástup nemoci má pomalý průběh a rané příznaky nemoci mohou být subklinické. Nemoc nastupuje často během 20. až 30. roku života a postihuje ve větší míře mužskou populaci (Donadio a Grande, 2002).

Průběh nemoci může být zpočátku asymptomatický, doprovázený mikroskopickou hematurií s malou proteinurií a mírně zvýšeným krevním tlakem. K záchytu nemoci dochází až u 40 % pacientů při probíhajících infekčních onemocněních horních cest dýchacích či trávicího traktu, kdy je u pacientů odhalena makroskopická hematurie. Řada pacientů je diagnostikována až v pozdějších stádiích choroby, při kterých je již patrná proteinurie a snížená funkce glomerulární filtrace. Průběh mnoha renálních zánětlivých chorob je totožný a specifická diagnóza IgAN se proto stanoví na základě biopsie ledvin a následného histopatologického nálezu (Raška *et al.*, 2016). Průběh nemoci vede po 20 letech od diagnózy u 14 – 39% pacientů k selhání ledvin (Berthoux *et al.*, 2008).



Obrázek 5: Schéma multifaktoriální teorie vzniku IgA nefropatie. Rozvoj onemocnění je často spuštěn vlivem vnějších faktorů (infekce horních cest dýchacích/GIT) u geneticky predisponovaných jedinců (Faktor 0), které aktivují IgA1-produkující buňky k tvorbě Gd-IgA1 (Faktor 1). V oběhu jsou přítomny specifické anti-Gd-IgA1 protilátky (Faktor 2), které interagují s deficientně galaktosylovanými IgA1 za tvorby patogenních vysokomolekulárních imunokomplexů (Faktor 3). Ty díky přítomnosti autoprotilátek a své velikosti obcházejí jaterní odbourávání a ukládají se v mesangiu ledvin. Tam indukují proliferaci buněk, produkci prozánětlivých cytokinů a extracelulární matrix (Faktor 4). Dochází ke snížení glomerulární filtrace a celkovému poškození ledvin. Upraveno podle Knoppova *et al.*, 2016.

2.4.2 Etiopatogeneze

Hlavní roli v rozvoji onemocnění hrají molekuly IgA1 s galaktosovou deficiencí v pantové oblasti. Patogeneze IgAN byla v mnoha přehledných článcích (Mestecky *et al.*, 2013; Novak *et al.*, 2015) popsána multifaktoriálním modelem se čtyřmi hlavními faktory přispívajícími k nástupu nemoci (Obrázek 5). Jsou jimi zvýšená hladina Gd-IgA1 v oběhu pacienta, produkce specifických autoprotilátek, formace patogenních imunokomplexů obsahujících Gd-IgA1 a ukládání těchto imunokomplexů v mesangiu glomerulů s následnou proliferací buněk a rozvojem zánětu ledvin (Knoppova *et al.*, 2016)

2.4.2.1 Galaktosadeficientní IgA1

Za tvorbou aberantně galaktosylovaných IgA1 stojí změny v enzymatické dráze glykosylace. Specifické glykosyltransferasy vykazují u IgAN pacientů defektní chování oproti zdravým jedincům. Ve výzkumu Qina *et al.* (2005) byla zaznamenána výrazně nižší exprese genu *Cosmc* v B-lymfocytech pacientů, než je tomu u zdravých jedinců. S menší produkcí *Cosmc* chaperonu, který stabilizuje β -1,3-galaktosyltransferasu, je negativně ovlivněna aktivita tohoto enzymu. U pacientů se taktéž objevuje snížená exprese samotného enzymu β -1,3-galaktosyltransferasy (Suzuki *et al.*, 2009).

Ke vzniku podgalaktosylovaných proteinů přispívá i předčasná sialylace cukerného řetězce. Následuje-li přidání kyseliny sialylové ihned po navázání základní stavební molekuly O-glykanu, GalNAcu, další prodlužování řetězce zprostředkované transferasou C1 β GalTI je omezeno. V buněčných liniích pacientů byla prokázána zvýšená hladina exprese specifické sialyltransferasy ST6GalNAcII (Raska *et al.*, 2007).

Suzuki *et al.* (2014) navíc odhalili i roli zapojení cytokinů, především IL-6, jehož produkce je u pacientů zvýšená. Výsledky výzkumu ukázaly, že exprese C1 β GalTI a chaperonu *Cosmc* jsou za působení cytokinů IL-4 a IL-6 sniženy. IL-6 kromě toho působí i na expresi ST6GalNAcII, kterou naopak zvyšuje.

2.4.2.2 Imunokomplexy

Depozita v mesangiu

Biopsií pacientů s IgAN byla odhalena depozita imunitních komplexů v mesangiu ledvin. Imunofluorescenčními a MS studii byla v těchto imunodepozitech potvrzena převládající galaktosadeficientní forma imunoglobulinu A1 (Conley *et al.*, 1980; Hiki *et al.*, 2001). Predominantní forma těchto aberantních IgA1 v komplexech je polymerní (Tomana *et al.*, 1997), což naznačuje jejich pravděpodobný slizniční původ. Mesangiální

buňky v glomerulu svými kontraktilními vlastnostmi přispívají k regulaci toku krve v kapilárách a potažmo se tak podílejí na správném chodu glomerulární filtrace. Přítomnost imunokomplexů s IgA1, které nebyly metabolizovány hepatocyty, vede k patologické proliferaci mesangiálních buněk, nadprodukcii extracelulární matrix a produkci prozánětlivých cytokinů.

Na povrchu mesangiálních buněk byl identifikován transferrinový receptor CD71 a v experimentech *in vitro* byla prokázána proliferace buněk mesangia po navázání imunokomplexů na receptor (Moura *et al.*, 2001). Avšak zatímco predominantní formou IgA1 v mesangiu jsou polymerní IgA1, CD71 preferenčně váže monomery. Předpokladem je tedy spolupráce a existence dalších receptorů, které by více objasnily vstup Gd-IgA1 a jeho imunokomplexů do mesangia.

Vznik imunokomplexů

Galaktosadeficientní IgA1 se v cirkulaci nevyskytují ve volné formě. Jsou vyvazovány do vysokomolekulárních imunitních komplexů, ve kterých vystupují jako antigen pro protilátky specificky cílené na pantovou oblast Gd-IgA1 (Tomana *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2009). K závěru, že klíčovou částí molekuly Gd-IgA1 pro vazbu protilátek je pantová oblast, přispěly četné experimenty v čele s výzkumem Tomany *et al.* (1999). Odstraněním O-glykanového řetězce z pantové oblasti byla reaktivita IgA1 se sérovými protilátkami potlačena.

Přítomnost protilátek typu IgG (a částečně IgM) specifických proti IgA1 byla potvrzena i u zdravých jedinců (Jackson *et al.*, 1987). U pacientů s IgAN jsou hladiny těchto protilátek vyšší a nachází se v průměře nejen ve formě patogenních imunologických komplexů s Gd-IgA1, ale i volně v séru (Tomana *et al.*, 1997, 1999).

Aktivita těchto imunokomplexů byla *in vitro* zkoumána na modelu primárních lidských mesangiálních buněk (Chen *et al.*, 1994). Během experimentů bylo zjištěno, že Gd-IgA1 obsahující imunokomplexy získané od pacientů se váží k mesangiálním buňkám efektivněji než volné molekuly Gd-IgA1 či imunokomplexy zdravých jedinců a jsou schopny navodit proliferaci buněk mesangiu a zánětlivou reakci (Novak *et al.*, 2007). Zajímavým zjištěním byl fakt, že takto patologicky na mesangiální buňky působí pouze imunokomplexy o velikosti 800–900 kDa. Komplexy menších velikostí (700-800 kDa) naopak v experimentech *in vitro* vykazují inhibiční vlastnosti a potlačují proliferaci

mesangia (Novak *et al.*, 2005). Proliferační aktivitu nevykazují ani volné Gd-IgA1, ani imunokomplexy, které Gd-IgA1 neobsahují (Novak *et al.*, 2007).

Odbourávání Gd-IgA1 a imunokomplexů

Katabolismus IgA1 probíhá za účasti ASGP receptoru vážícího desialylované glykoproteiny přes jejich terminální Gal či GalNac. Ačkoliv jsou O-glykanové řetězce patogenních podgalaktosylovaných IgA1 v mnoha případech zakončeny molekulou GalNac potřebnou pro vstup IgA1 do jater, jejich odbourávání touto cestou je omezeno. Interakce Gd-IgA1 s ASGP receptory je oslabena přítomností Gd-IgA1 specifických autoprotilátek, které aberantní IgA1 vyváží a zabrání jejich vazbě na hepatocytární receptory (Novak *et al.*, 2002).

Stejně tak nejsou katabolizovány ani vznikající patogenní imunokomplexy. Kvůli své vysoké molekulární hmotnosti a rozměru neprojdou Disseho subendoteliálním prostorem, který se nachází mezi hepatocyty a kapilárami v játrech. Je tak zabráněno jejich interakci s ASGP receptory na hepatocytech (Mestecky *et al.*, 2013).

2.4.3 Léčba IgA nefropatie

2.4.3.1 Současný trend terapie

Specifická léčba nemoci nebyla do současné doby zavedena. Pacienti podstupují léčbu terapiemi cílenými na chronická onemocnění ledvin. Míru poškození ledvin a funkci glomerulární filtrace odráží proteinurie. Její monitoring je zásadní pro zhodnocení stavu a progresu onemocnění (Raška *et al.*, 2016). Terapie jsou proto především zaměřeny na udržování proteinurie a krevního tlaku ve fyziologických hodnotách. K potlačení proteinurie a snížení krevního tlaku slouží v léčbě nejúčinněji blokátory renin-angiotenzin-aldosteronového systému – inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE) a blokátory receptoru pro angiotenzin II (ARB) (Reid *et al.*, 2011).

Pro pacienty s přetrvávající proteinurií nad 1 g/24 h je doporučena podpůrná léčba podáváním rybího oleje (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group., 2012).

Další možností léčby je imunosupresivní terapie s podáváním glukokortikoidů. Zavádí se u pacientů s přetrvávajícími příznaky hematurie a hodnotami proteinurie vyššími než 1 g/24 h při současné léčbě inhibitory ACE či ARB. Podnětem pro imunosupresivní terapii jsou také histologické nálezy v biopsii ledvin (Raška *et al.*, 2016).

Podle japonských studií Wanga *et al.* (2011) a později Yuzawa *et al.* (2016) má pozitivní vliv na zpomalení progresu onemocnění tonzilektomie za současného podávání glukokortikosteroidů.

2.4.3.2 Vyhledky kauzální terapie

Inhibice tvorby podgalaktosylovaných IgA

Jednou z nejschůdnějších cest léčby by mohla být eliminace buněk tvořících Gd-IgA1. Vzhledem k prozatím neznámému původu či fenotypovým znakům těchto buněk nelze však terapii na jejich eliminaci zaměřit (Raška *et al.*, 2016).

Více je však známo o podstatě tvorby galaktosové deficiencie u molekul IgA1. Byly popsány konkrétní enzymy zapojené do galaktosylace IgA1 a s nimi i defekty v jejich expresi a regulaci vyskytující se u IgAN pacientů. Ve zmiňované dysregulaci glykosyltransferas u IgAN jsou podle Suzuki *et al.* (2014) zapojeny i cytokiny IL-6 a IL-4. Nabízí se tak terapie zaměřená na ovlivnění míry exprese glykosyltransferas a cytokinové modulace (Raška *et al.*, 2016).

Inhibice tvorby patologických imunokomplexů obsahujících Gd-IgA1

Za iniciací zánětlivých reakcí v ledvinách stojí Gd-IgA1 obsahující imunitní komplexy o velikosti 800–900 kDa. Komplexy o menších molekulových hmotnostech (700–800 kDa) proliferaci mesangia neaktivují a prokazují *in vitro* účinek inhibiční (Novak *et al.*, 2005). Možná specifická léčba by mohla využívat zásahu do regulace rovnováhy tvorby patologických a nepatologických imunokomplexů.

Navrhnuty jsou dva potenciální přístupy, oba využívající technologií rekombinantní DNA. První přístup počítá s přípravou krátkých analog patientských Gd-IgA1 (rekombinantní krátké úseky obsahující klíčovou pantovou oblast IgA1) kompetující o vazbu s autoprotilátkami. V druhém přístupu je využito monovalentních autoprotilátek odvozených od patientských. Rekombinantně lze připravit imunoglobulinový fragment Fab nebo scFv, oba obsahující klíčové variabilní domény těžkého a lehkého řetězce (Raška *et al.*, 2016). S výhodou může být taktéž využito imunizace zvířat přirozeně tvořících imunoglobuliny složené pouze z těžkých řetězců (velbloud či lama) k produkci tzv. nanobodies.

Inhibice proliferace buněk mesangia

Imunokomplexy přítomné u pacientů indukují aktivitu fosforylační dráhy MAPK/ERK. Aktivace dráhy má za následek tvorbu prozánětlivých cytokinů. K omezení

zánětlivé a proliferační reakce by mohly proto být využity inhibitory proteinkinas zapojených do MAPK/ERK dráhy (Tamouza *et al.*, 2012).

Kim *et al.* (2012) odhalili u lidských mesangiálních buněk přítomnost kinasy SYK (spleen tyrosine kinas), která je zapojena do signalizace zprostředkované imunoreceptory. V experimentech demonstrovali i roli SYK v patogenezi IgAN. Proliferace a cytokiny indukovaná zánětlivá reakce byla potlačena při aplikaci R406, inhibitoru SYK, a souhlasně i při umlčení *SYK* genu. Inhibice kinasy SYK tak nabízí další léčebnou strategii.

Štěpení IgA1 v glomerulárních depozitech

Na rozdíl od IgA2, IgA1 je díky své pantové oblasti náchylný ke štěpení bakteriálními proteasami (např. bakterie rodu *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*) (Senior a Woof, 2005). Štěpit lze jak volné molekuly, tak i ty uložené v depozitech v mesangiu ledvin. Přístup proteolytického štěpení IgA1 byl s úspěchem aplikován na myším modelu. Po injekci IgA1 proteas došlo k redukci depozit a zánětlivé reakce a ke snížení hematurie (Lechner *et al.*, 2016). U lidských pacientů však s sebou tento přístup přináší nemalé problémy. Zatímco u myšího modelu pro IgAN jsou IgA1 přítomny pouze v uměle vpravených imunokomplexech, u člověka se IgA1 nachází ve volné formě v oběhu. IgA1 proteasy by masivním štěpením IgA1 v oběhu natropily více škody než užitku při štěpení patogenních depozit v mesangiu. Proteolýzou krevního IgA1 by vznikalo velké množství Fab a Fc fragmentů, což by se neobešlo bez systémových následků. Opakované podání proteas by navíc mohlo vést k produkci protilátek (Raška *et al.*, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

- 2-merkaptoethanol (LACH-NER, ČR)
- Antibiotika:
 - Carbenicilin (SIGMA ALDRICH, USA)
 - Kanamycin K4000 (SIGMA ALDRICH, USA)
- Aprotinin (SERVA, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (SERVA, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LACH-NER, ČR)
- Dihydrogen fosforečnan sodný dihydrát (LACH-NER, ČR)
- Dodecylsírán sodný – SDS (MERCK, Německo)
- Ethanol 96% (VWR, USA)
- Fenylmethylsulfonyl PMSF (SERVA, Německo)
- Glycin (LACH-NER, ČR)
- HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Hovězí sérový albumin – BSA (NEB, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (LACH-NER, ČR)
- Chlorid draselný (LACH-NER, ČR)
- Chlorid sodný (LACH-NER, ČR)
- Imidazol (SIGMA ALDRICH, USA)
- Isopropanol (LACH-NER, ČR)
- Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid IPTG (MERCK, Německo)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (SIGMA ALDRICH, USA)
- Kyselina chlorovodíková 36% (LACH-NER, ČR)
- Ledová kyselina octová 99,8% ((LACH-NER, ČR)
- Leupeptin (SERVA, Německo)
- Methanol (SIGMA ALDRICH, USA)
- Močovina (SERVA, Německo)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (SERVA, Německo)
- n-butanol (LACH-NER, ČR)
- Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Peroxodisírán amonný (MERCK, Německo)
- Protilátky:
 - AffiniPure F(ab')₂ fragment goat-anti human IgG, Fcγ fragment specific (JACKSON IMMUNORESEARCH, USA)
 - HRP-anti-V5 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
 - HRP-anti-IgA (SIGMA ALDRICH, USA)
 - HRP-streptavidin (PIERCE, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MERCK, Německo)
- TrisHCl (MERCK, Německo)

- Triton X-100 (SIGMA ALDRICH, USA)
- Tween-20 (CALBIOCHEM, Německo)
- Ustalořač Manual Fixing Bath G354 (AGFA, Belgie)
- Vývojka – Developer G150 (AGFA, Belgie)
- Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)

3.1.2 Pufry a roztoky

3.1.2.1 *Expresa proteinů*

LB médium	1% pepton, 1% NaCl, 0,5% kvasničný extrakt, ddH ₂ O
IPTG	100 mM IPTG, ddH ₂ O
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,7 mM Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , ddH ₂ O; pH 7,4

3.1.2.2 *Purifikace CH1-P-CH2*

6M GuHCl pufr (pH 8)	6M GuHCl, 0,1M NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, ddH ₂ O; pH 8
Wash 1 promývací roztok (pH 8)	8M močovina, TrisHCl, NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, ddH ₂ O; pH 8
Wash 2 promývací roztok pH (6,3)	8M močovina, TrisHCl, NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, ddH ₂ O; pH 6,3
Eluční roztok pH (4,5)	8M močovina, TrisHCl, NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, ddH ₂ O; pH 4,5

3.1.2.3 *Purifikace těžkého řetězce IgA1*

Tris lyzační pufr	8M močovina, 0,1 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, ddH ₂ O; pH 8
Wash 1 promývací roztok (pH 8)	8M močovina, TrisHCl, NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, 0,01 imidazol, ddH ₂ O; pH 8
Wash 2 promývací roztok pH (6,3)	8M močovina, TrisHCl, NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, 0,01 imidazol, ddH ₂ O; pH 6,3
Eluční roztok pH (4,5)	8M močovina, TrisHCl, NaH ₂ PO ₄ , 0,01M TrisHCl, 0,01 imidazol, ddH ₂ O; pH 4,5

3.1.2.4 Nativní purifikace CH1-P-CH2 a těžkého řetězce IgA1

Tris lyzační pufr pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, ddH ₂ O, pH 8 + inhibitory proteas (na 10 ml roztoku 250 mM PMSF, 4 µl leupeptin, 5,25 µl aprotinin, 10 µl triton X100, 10 µl EDTA (0,1 M))
Wash promývací roztok pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, ddH ₂ O, pH 8 + inhibitory proteas
Eluční roztok pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, ddH ₂ O, pH 8 + inhibitory proteas

3.1.2.5 Dialýza CH1-P-CH2

Dialyzační pufr 1	4M močovina, 150 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, ddH ₂ O, upravit na pH 7
Dialyzační pufr 2	1M močovina, 150 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, ddH ₂ O, upravit na pH 7
Dialyzační pufr 3	150 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0,2M arginin, ddH ₂ O, upravit na pH 7
Dialyzační pufr 4	150 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0,2M arginin, ddH ₂ O, upravit na pH 7

3.1.2.6 Dialýza těžkého řetězce IgA1

Dialyzační pufr 1	4M močovina, 500 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, ddH ₂ O, pH 8
Dialyzační pufr 2	1M močovina, 500 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, ddH ₂ O, pH 8
Dialyzační pufr 3	0,5 M močovina, 500 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, ddH ₂ O, pH 8
Dialyzační pufr 4	500 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, ddH ₂ O, pH 8
Dialyzační pufr 5	500 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, ddH ₂ O, pH 8

3.1.2.7 SDS-PAGE

30% A/B	300 g akrylamid, 8 g bisakrylamid, doplnit na 1 l ddH ₂ O
4x TrisHCl pufr (pH 6,8)	0,5M TrisHCl, 12mM SDS, ddH ₂ O; pH 6,8
4x TrisHCl pufr (pH 8,8)	1,5M TrisHCl, 12mM SDS, ddH ₂ O; pH 8,8
10% APS	10% vodný roztok peroxodisíranu amonného
SDS elektrodový pufr	25 mM Tris, 190 mM glycin, 3 mM SDS, ddH ₂ O
2x SDS nanášecí pufr	125 mM Tris, pH 6,8, 15,9% glycerol, 160 mM SDS, 10% merkptoetanol, 0,01% bromfenolova modř
Fixační pufr	25% isopropanol, 10% ledová kyselina octová, ddH ₂ O
Barvicí roztok Coomassie brilliant blue	10% ledová kyselina octová, 70mM Coomassie Brilliant Blue R-250, ddH ₂ O
Odbarvovací pufr	5% methanol, 7% ledová kyselina octová, ddH ₂ O

3.1.2.8 Western blot

Towbinův pufr	75 mM Tris, 0,58 mM glycin, 60% methanol, ddH ₂ O
Superblokovací pufr	1% BSA, 0,05% Tween, 1xPBS
PBST	1xPBS, 0,05% Tween

3.1.2.9 ELISA

Blokovací pufr	1% BSA, 0,05% Tween, 1xPBS
Coating pufr	0,05% azid sodný, 2,5μg coating protilátka, 1x PBS
OPD pufr	50 mM Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 25 mM kyselina citronová, ddH ₂ O, pH 5

3.1.3 Přístrojové vybavení

- Automatické mikropipety (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Automatické pipety 1–5 ml (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Blotovací jednotka TRANS-6 SEMIDRY TRANSFER CELL (BIO-RAD, USA)
- Centrifuga CR 312 JOUAN (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Centrifuga MIKRO 22R (HETTICH ZENTRIFUGEN, Německo)
- Centrifugační zkumavka pro zakoncentrování – Amicon Ultra-4, 50K (Merck, Německo)
- Elektrický zdroj pro blotovací zařízení 2197 POWER SUPPLY (LKB BROMMA, Švédsko)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPac Universal (BIO-RAD, Německo)
- Elektroforetická komora a příslušející víko s elektrodami (BIO-RAD, Německo)
- ELISA reader spektrofotometr (Labsystems)
- Kazeta pro expozici chemiluminiscenčního signálu na film (EASTMAN KODAK, USA)
- Laboratorní váhy 440-33N (KERN, Německo)
- Mikrocentrifuga E-Centrifuge (WEALTEK, USA)
- Míchadlo magnetické – IKA big squid (IKA, Německo)
- pH metr Jenway 3310 (COLE PARMER, USA)
- Promývačka 96-ti jamkových panelů, ELx405 Microplate Washer (BioTek, USA)
- Sonikátor UP2005 (Hielscher)
- Spektrofotometr UV/VIS Boeco S-30 (BOECO, Německo)
- Termoblok - block heater SBH130D STUART (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Třepačka KS 130 basic (IKA, Německo)
- Třepačka rolovací rollermixer STR6D STUART (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Třepačka s inkubátorem TH 30 (Edmund Bühler GmbH, Německo)
- PVDF membrána (BIO-RAD, USA)
- Fotografický papír CL-XPosure Film (THERMO FISHER, USA)
- Mikrotirační deska 96 jamkova Nunc Maxisorp (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)

3.1.4 Biologický materiál

Vzorky pupečnickové krve (Ústav imunologie LF UP)

3.2 Metody

3.2.1 Exprese proteinu v prokaryotním systému

K produkci proteinů byly využity transformované *E. Coli* nesoucí plazmid pET101 se zaklonovanou sekvencí pro expresi proteinu CH1-P-CH2 nebo plazmid pET28a se sekvencí pro těžký řetězec IgA1. Exprese proteinů probíhala následovně:

První den byla připravena startovací kultura. Příprava a veškerá práce s médiem a bakteriemi probíhala v laminárním boxu. Do 200 ml sterilizovaného LB média v Erlenmayerově baňce bylo přidáno příslušné antibiotikum (carbenicilin pro CH1-P-CH2 v koncentraci 50 µg/ml média, kanamycin pro těžký řetězec IgA1 v koncentraci 100 µg/ml). Nad plamenem vyžíhanou kličkou bylo médium zaočkováno příslušnou kulturou ze stocku uchovávaného při -80°C. Takto připravené kultury byly ponechány přes noc v inkubátoru s třepačkou při 37 °C a 120 rpm.

Druhý den byla napěstovaná kultura 10x naředěna do 1 l sterilního LB média. Média byla opět doplněna antibiotikem v jeho výsledné koncentraci 50 µg/ml, respektive 100 µg/ml. Kultury se nechaly v inkubátoru s třepačkou při 37 °C po dobu 1,5 – 2 hodin do doby, než byla naměřena OD hodnota kultury $\pm 0,6$. Při dosažení optimálního OD bylo ke kulturám přidáno indukční činidlo IPTG (1 mmol/l). Kultury s přidavkem IPTG se dále inkubovaly na třepačce za při 30 °C nebo 37 °C po dobu 4 hodin.

Pro analýzu exprese pomocí imunodetekce byly odebrány 1 ml vzorky kultury v době před indukcí IPTG a poté 1, 2 a 4 hodiny po indukcí. Vzorky byly stočeny na stolní centrifuze (3000 rpm, 2 minuty). Pelety byly rozpuštěny ve 150 µl 2x SDS nanášecího pufru. Po 15 minutách odstavení při laboratorní teplotě se vzorky 10 minut inkubovaly v termostatu při teplotě 96 °C. Takto upravené vzorky byly připraveny k SDS-PAGE a následné imunodetekci.

Po ukončení exprese se bakterie sklídily. Média s kulturami se přelila do 250 ml centrifugačních nádob a v chlazené centrifuze se stočila při 10 000 rpm za 4 °C po dobu 10 minut. Supernatanty se z lahví vylily a pelety byly opětovně doplněny dalším objemem média s kulturou a stočeny, než byl takto sklizen celý objem médií s kulturami. Pelety byly následně rozpuštěny v 15 ml vychlazeného PBS. Suspenze byly přepipetovány do 50 ml falkon, ve kterých se centrifugovaly na stolní centrifuze při 10 000 rpm, 4 °C po dobu 10 minut. Po odlití supernatantu byly takto zpracované bakteriální pelety jsou uschovány k purifikacím v mrazáku při -4 °C.

3.2.2 Denaturační purifikace proteinů

Rekombinantní proteiny IgA1 CH1-P-CH2 i těžký řetězec IgA1 obsahují koncovou polyhistidinovou značku. Histidinový tag může být s výhodou použit pro purifikaci fúzního proteinu metodou afinitní chromatografie IMAC. Při využití matrice s nikelnatými ionty dochází k interakci mezi histidinovými rezidui a kovovými ionty a protein je zachycen na chromatografické koloně. Jeho eluci z kolony je možno provádět na základě změny pH, kdy dochází k oslabení vazby histidinu s niklem, nebo imidazolem, který jakožto strukturní analog histidinu kompetuje o vazbu s nikelnatými ionty.

Pro afinitní purifikaci CH1-P-CH2 a těžkého řetězce IgA1 byla využita Ni-NTA agarosová matrice.

Samotné purifikaci předcházela lýza bakteriálních buněk. Kultury, se kterými se v průběhu purifikace pracovalo, byly minimálně 24 hodin staré.

3.2.2.1 Lýza buněk a purifikace těžkého řetězce IgA1

K 1 g peletu bylo přidáno 10 ml Tris lyzačního pufru doplněného o inhibitory proteas (aprotinin, PMSF, leupeptin). Následovala homogenizace metodou sonikace. Sonikace probíhala po dobu 15 sekund s následnou 15minutovou pauzou, kdy byl vzorek chlazen na ledu. Celý postup se opakoval po dobu cca 4 hodin. Po sonikaci byl vzorek centrifugován (11 000 rpm, 4 °C, 30 minut). K lyzátu vycházejícímu z 1 g bakterií bylo přidání 10 ml GuHCl lyzačního pufru. Vzorek se ponechal v pufru přes noc na rotátoru při laboratorní teplotě. Druhý den se lyzát zcentrifugoval (11 000 rpm, 21 °C, 30 minut). Supernatant byl převeden do čisté 50 ml falkony. Na 10 ml supernatantu byl přidán 1 ml Ni-NTA agarosy. Vzorek se s agarosou ponechal míchat 2 hodiny při laboratorní teplotě na rotátoru. Vzorek s matricí byl poté nanesen na prázdnou kolonu, kde došlo k sedimentaci agarosové matrice. Kolona byla k vymytí nevyvázaných proteinů promyta promývacími roztoky wash 1 (15 ml) a wash 2 (12 ml). Proteiny byly nakonec z kolony vyloučeny elučním puftrem. Odebráno až 6 elucí po 2 ml.

3.2.2.2 Lýza buněk a purifikace IgA1 CH1-P-CH2

K 1 g peletu bylo přidáno 20 ml lyzačního GuHCl pufru. Vzorek se ponechal přes noc na rotátoru při laboratorní teplotě. Druhý den se lyzát homogenizoval krátkou sonikací. Sonikace se prováděla po dobu 10 vteřin s 5minutovou pauzou, kdy se lyzát chladil na ledu. Sonikace se opakovala 5krát. Takto sonikovaný lyzát se poté zcentrifugoval (11 000 rpm, 21 °C, 30 minut). K 20 ml získaného supernatantu byl přidán 1 ml Ni-NTA agarosy.

Další postup purifikace už odpovídal výše popsané purifikaci těžkého řetězce IgA1 (viz 3.2.2.1). Použité objemy promývacích roztoků wash 1 a wash 2 byly 20 ml, respektive 15 ml. Odebrány bylo až 6 elucí po 2 ml.

3.2.3 Nativní purifikace proteinů

K 1 g peletu bylo přidáno 10 ml Tris lyzačního pufru doplněného o inhibitory proteas (aprotinin, PMSF, leupeptin). Následovala homogenizace metodou sonikace. Sonikace probíhala 1 hodinu po dobu 15 sekund s následnou 15minutovou pauzou, kdy byl vzorek chlazen na ledu. Po sonikaci byl vzorek centrifugován (11 000 rpm, 4 °C, 30 minut). Supernatant byl převeden do čisté 50 ml falkony. Na 10 ml supernatantu byl přidán 1 ml Ni-NTA agarosy. Vzorek se s agarosou ponechal míchat 2 hodiny při 4 °C na rotátoru. Vzorek s matricí byl poté nanesen na prázdnou kolonu. Purifikace probíhala stejně jako za podmínek denaturačních, eluce bylo dosaženo změnou pH roztoků.

3.2.4 Dialýza proteinů

Přebytečný imidazol byl z roztoků proteinů odstraněn dialýzou do roztoku obsahujícím 4 M močoviny. Pro protein IgA1 CH1-P-CH2 byly použity 4 dialyzační roztoky (vždy v objemu 0,5 l), v každém byl vzorek ponechán přes noc na magnetické míchače v chladové místnosti do druhého dne, kdy se roztok vyměnil na následující. Dialýza těžkého řetězce IgA1 probíhala stejně v 5 dialyzačního pufrch.

3.2.5 Zakoncentrování proteinů

Dialyzované proteiny byly zakoncentrovány za využití centrifugačních zkumavek Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units. Vzorky proteinů byly napipetovány na kolonku s filtrem. Kolonky se centrifugovaly při 4 °C 3500 g do doby zakoncentrování proteinu na požadující objem (100-200 µl).

3.2.6 Kvantifikace proteinů

Kvantifikace zakoncentrovaných proteinů probíhala s pomocí vytvoření kalibrační křivky BSA. Ta byla získána analýzou SDS-PAGE. Na gel byly spolu s vzorky proteinů nanесeny standardy BSA o koncentracích 0,125 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,5 µg/µl, 1 µg/µl a 2 µg/µl. Vzorky proteinů byly nanесeny v objemu 1 a 2 µl na jamku, vzorky BSA v objemu 4 µl na jamku. Gel byl obarven barvicím roztokem CBB a odbarven přes noc v odbarvovacím roztoku. Následovala denzitometrická analýza gelu v programu ImageJ, jehož výstupem byly hodnoty AUC (area under curve). Výpočet koncentrací CH1-P-CH2

a těžkého řetězce IgA1 se provedl pomocí rovnice lineární regrese získané kalibrační křivky BSA v programu MS Excel 2016.

3.2.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE byla v experimentech využita ke kontrole exprese proteinu, jeho čistoty po purifikaci a dialýze, a ke kontrole a stanovení zakoncentrování vzorků.

Pro elektroforetickou analýzu byly použity gely o tloušťce 0,75 mm. Mezi formovací skla o požadované tloušťce gelu umístěné v nalévací aparatuře byla napipetována vrstva 10% separačního gelu připraveného podle Tabulky 3. Nalévání gelu probíhalo bez prostojů, aby připravený gel nezačal polymerovat díky přidavku 10% peroxidisíranu amonného (APS) a polymeračního činidla TEMED již v kádince. Vrstva gelu se převrstvila n-isobutanolem k vyrovnaní a odstranění vzduchových bublin z gelu. Po cca 20minutové polymeraci se n-isobutanol slil a na separační gel byl navrstven 4% gel zaostřovací připravený podle Tabulky 4. Mezi skla se vložil 15jamkový plastový hřebínek a gel se ponechal polymerovat dalších 20 minut. Připravený gel byl umístěn do elektroforetické aparatury, která byla zalita elektrodoým SDS pufrém.

Tabulka 3: Složení 10% separačního gelu. Objemy pro přípravu 4 gelů.

	10% separační gel
ddH ₂ O	6,25 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	5 ml
4x TrisHCl pufr pH 6,8	3,75 ml
10% APS	75 µl
TEMED	15 µl

Tabulka 4: Složení zaostřovacího gelu. Objemy pro přípravu 4 gelů.

	4% zaostřovací gel
ddH ₂ O	6,2 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	1,3 ml
4x TrisHCl pufr pH 8,8	2,5 ml
10% APS	50 µl
TEMED	10 µl

Vzorky pro SDS-PAGE se připravily smícháním s 2x SDS nanášecím redukčním pufrem v poměru 1:1 (vzorky z kapitoly 3.2.1 již byly s nanášecím pufrem smíchány a jejich příprava proto takto odpadla.). Vzorky byly 5 minut povařeny na termostatu vytemperovaném na 96°C. Nanáška na gel byla 8 µl směsi proteinu a nanášecího pufru. Vzorky proteinů byly vždy doplněny o vzorek komerčního proteinového standardu nanášeného v první jamce. Elektroforéza trvala zhruba 1 hodinu při nastavení konstantního napětí 160 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut ze skel a promyt ve fixačním pufru. Gely byly barveny barvicím roztokem Coomassie brilliant blue, ve kterém byly inkubovány 30 minut. Následovalo odbarvení gelů v odbarvovacím roztoku. Odbarvování gelů probíhalo až do druhého dne.

Následoval-li po SDS-PAGE transfer na PVDF membránu k imunodetekci, gely byly ihned po skončení elektroforézy přeneseny na blotovací aparaturu.

3.2.8 Semi-dry western blot

Pro identifikaci cílových proteinů byla využita imunochemická detekce metodou western blot.

PVDF membrána byla aktivována 5minutovou inkubací s methanolem. Poté se promyla destilovanou vodou a namočila do Towbinova roztoku, stejně tak jako filtrační papíry. Do blotovacího zařízení se vše naskládalo v následujícím pořadí: filtrační papír, PVDF membrána, gel a filtrační papír. Transfer probíhal po dobu 1 hodiny při 200 mA. Po skončení transferu se membrána převrstvila 15 ml blokovacího pufru a blokovala se při 4 °C přes noc. Druhý den byla přidána peroxidasou značená protilátka v doporučeném ředění (Tabulka 5) a následovala hodinová inkubace při laboratorní teplotě. Poté byla membrána promývána roztoky PBST a PBS po dobu 2 hodin. Detekce se provedla přidávkem 1-2 ml chemiluminiscenčního substrátu z kitu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermofisher). K vyvolání signálu bylo využito metody vyvolání na fotografický papír v temné komoře. Film byl přiložen na PVDF membránu v kazetě pro vyvolávání po požadovanou dobu expozice. Následně byl film vyvolán pomocí roztoků vývojky a ustalovače.

Tabulka 5: Použité protilátky a jejich ředění.

HRP-značená protilátka	Ředění	Protein
anti-V5	1:15 000	CH1-P-CH2
anti-IgA1	1:30 000	Těžký řetězec IgA1

3.2.9 Glykosylace *in vitro*

Při práci s prokaryotním systémem pro produkci eukaryotních proteinů se setkáváme se zásadním problémem: neschopnost prokaryotické buňky modifikovat proteiny. Veškeré post-translační úpravy eukaryotních proteinů musí být řešeny *in vitro* metodami. Glykosylace proteinu připravených fragmentů IgA1 je jednou z nich.

Pro vlastní reakci bylo použito 3 μg proteinu. Reakce probíhala v objemu 25 μl a byla připravena podle Tabulka 6. Inkubace vzorku s enzymem probíhala po dobu 4 hodin při laboratorní teplotě.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro glykosylaci (objem jedné reakce = 25 μl)

	Ředění/koncentrace	V 25 μl
ddH₂O		Doplnit do 25 μl
OG (5%)	10x	0,25 μl
Kakodylát (250mM)	10x	2,5 μl
MnCl₂ (50 mM)	10x	2,5 μl
UPD-GalNAc (2,5 mM)	10x	2,5 μl
Peptid	3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	3-4 μl
GalNAc transferasa II		0,1 μl

3.2.10 ELISA detekce *de novo* tvorby imunokomplexů

Tvorba imunokomplexů *in vitro* byla analyzována metodou ELISA v sandwichovém uspořádání. Vzorky pro analýzu byly smíchány s Gd-IgA1 (galaktosadeficitní IgA1 myelomový protein) v poměru 2 μg Gd-IgA1 na 10 μl vzorku a inkubovány přes noc při 4°C. Maxisorp nunc-immuno desky (Sigma Aldrich) byly pokryty F(ab')₂ fragmentem kozího anti-lidského IgG (ve výsledné koncentraci 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) v coating puffru v objemu 100 μl na jamku a inkubovány přes noc při 4 °C. Desky byly poté promyty 5x PBS a inkubovány 3 hodiny při laboratorní teplotě s blokovacím puffrem (270 μl na jamku). Následovalo promytí desek (5x PBS). Séra s Gd-IgA1 se ředila dvojkovou řadou v

dubletu do blokovacího pufru přímo v jamkách desky (100 µl pufru s vzorkem na jamku). Ředící řad začínaly na hodnotě ředění 50x. Takto naředěná séra se nechala inkubovat při 4 °C přes noc. Druhý den po promytí desky (3x PBST, 5x PBS) byla přidána anti-IgA protilátka značená peroxidasou (ředění 1:10 000 v blokovacím pufru) k detekci navázaných IgG–GdIgA1 komplexů. Po 3hodinové inkubaci při laboratorní teplotě a promytí desky (3x PBST, 5x PBS) následovalo vyvolání signálu přidavkem substrátu (o-fenylendiamin) v OPD pufru s H₂O₂. Reakce byla zastavena 1M kyselinou sírovou. Absorbance byla měřena při 490 nm.

Tabulka 7: Složení pufrů pro ELISA protokol.

Na 1 desku:	
Coating pufr	10 ml 1x PBS, 50 µl 10% azid sodný (0,05%), 25 µg protilátky
Blokovací pufr	60 ml 1x PBS, 0,6 mg BSA (1%), 30 µl Tween (0,05%)
Vyvolávací směs	10 ml OPD, 5 mg o-fenylendiamin, 10 µl H ₂ O ₂

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení velikosti proteinů

K teoretickému stanovení velikostí proteinů byly využity výpočtové nástroje databáze ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003) a Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000).

SMS Translate tool byl využit pro přepis DNA sekvence genu do aminokyselinové sekvence proteinu. Pro výpočet molekulární hmotnosti byla aminokyselinová sekvence analyzována nástrojem ExPASy ProtParam tool. Sekvence pro část těžkého řetězce CH1-P-CH2 je na Obrázku 6, sekvence pro celý těžký IgA1 je na Obrázku 7.

CH1-P-CH2 (26 830 Da)

```
      10      20      30      40      50      60
MASPTSPKVF PLSLCSTQPD GNVVIACLVQ GFFPQEPLSV TWSESGQGVV ARNFPPSQDA
      70      80      90     100     110     120
SGDLYTSSQ LTLPATQCLA GKSVTCHVKH YTNPSQDVTV PCPVPSTPPT PSPSTPPTPS
     130     140     150     160     170     180
PSCCHPRLSL HRPALDLLL GSEANLTCTL TGLRDASGVT FTWTPSSGKS AVQGPPDRDL
     190     200     210     220     230     240
CGCYSVSSVL PGCAEPWNHG KTFTCTAAYP ESKTPLTATL SKSKGELNSK LEGKPIPKNPL
     250
LGLDSTRIGH HHHHH
```

Obrázek 6: Sekvence proteinu CH1-P-CH2 získaná z ExPASy ProtParam tool. Vypočtená molekulová hmotnost: 26 830 Da.

IgA1 heavy chain (57 117 Da)

```
      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSEFGLSW VFLVAILKGV QCEVQLVESG
      70      80      90     100     110     120
GGVVRPGGSL RLSCATSGFT FDDSGASWVR QAPGKGLEWV SSINWNGGST NYADSVKGRF
      130     140     150     160     170     180
TISRDNAKNS LYLQMNSLRV EDTALYYCAR DPTKYCSGGS CLGYMDVWG KGTTVTVSSA
      190     200     210     220     230     240
SPTSPKVPFL SLCSTQPDGN VVIACLVQGF FPQEPLSVTW SESGQGVTA RNFPPSQDASG
      250     260     270     280     290     300
DLYTSSQLT LPATQCLAGK SVTCHVKHYT NPSQDVTVPC PVPSTPPTPS PSTPPTPSPS
      310     320     330     340     350     360
CCHPRLSLHR PALEDLLLGS EANLTCTLTG LRDASGVIFT WTPSSGKSAV QGPPDRDLCG
      370     380     390     400     410     420
CYSVSSVLPG CAEPWNHGKT FTCTAAYPES KTPLTATLSK SGNTFRPEVH LLPPPSEELA
      430     440     450     460     470     480
LNELVILTCL ARGFSPKDV LVRWLQGSQEL PREKYLWAS RQEPSQGTT FAVTSILRVA
      490     500     510     520     530
AEDWKKGDTF SCMVGHEALP LAFTQKTIDR LAGKPTHVNV SVVMAEVDGT CYTRA
```

Obrázek 7: Sekvence těžkého řetězce IgA1 z ExPASy ProtParam tool. Vypočtená molekulová hmotnost: 57 117 Da.

4.2 Expres proteinů

Sekvence kódující CH1-P-CH2 protein byla vnesena do plazmidu pET101, sekvence pro těžký řetězec do plazmidu pET28a. Expres proteinů CH1-P-CH2 a těžkého řetězce IgA1 byla indukována IPTG.

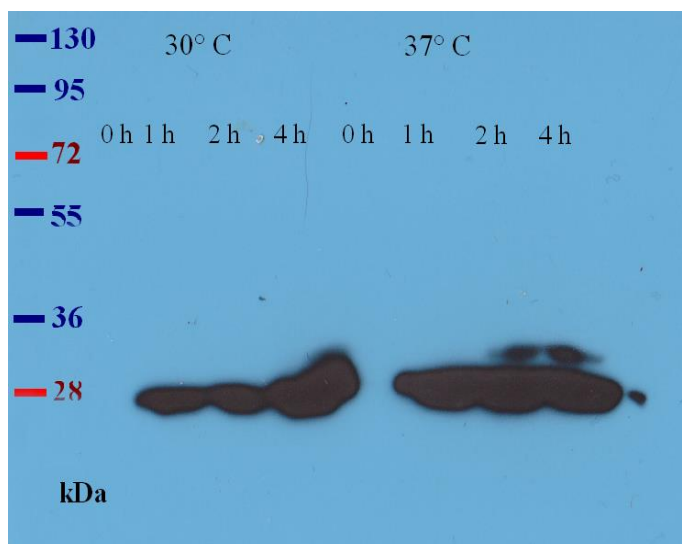
Hodnocení exprese proteinů bylo provedeno imunodetekcí pomocí metody western blot.

Expres CH1-P-CH2 byla prováděna při 30 °C a 37 °C (Obrázek 8) a míra exprese byla vyhodnocována pomocí western blotu detekcí V5 tagu fúzovaného s CH1-P-CH2 proteinem pomocí anti V5 protilátky značené křenovou peroxidasou (HRP). U CH1-P-CH2 byla zaznamenána exprese již po 1 hodině kultivace při 37 °C oproti kultivaci při 30 °C (Obrázek 8). Teplota 37 °C byla při expresích dále využívána.

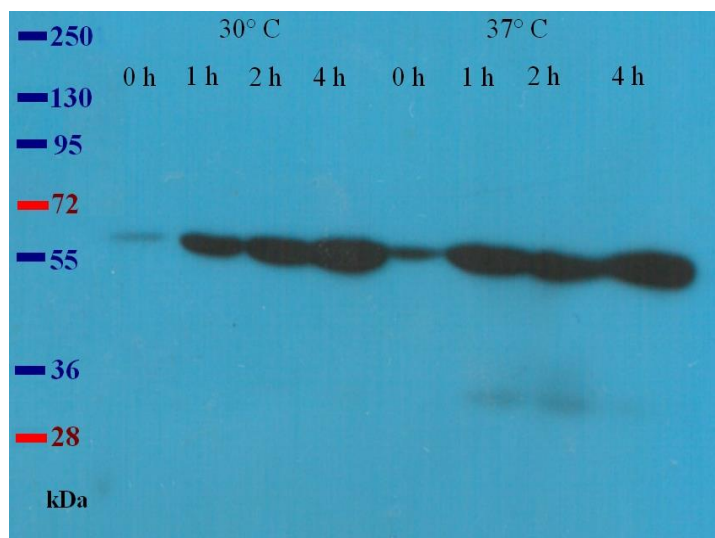
U těžkého řetězce IgA1 byla pro vyhodnocení pomocí western blotu využita peroxidasou značená protilátka HRP-anti-IgA. Optimální teplota a délka exprese na

základě výsledků imunodetekce byla teplota 30 °C po dobu 4 hodin inkubace. Při 37 °C docházelo k částečné degradaci (Obrázek 9).

Bez přídavku IPTG u CH1-P-CH2 neprobíhala žádná exprese proteinu (Obrázek 8). U těžkého řetězce IgA1 docházelo k bazální expresi (Obrázek 9).



Obrázek 8: Exprese CH1-P-CH2 – western blot. 0, 1, 2 a 4 hodiny po indukci IPTG. Protilátka HRP-antiV5 (ředění 1:10 000). Expoziční čas 1 minuta.



Obrázek 9: Exprese těžkého řetězce IgA1 – western blot. 0, 1, 2 a 4 hodiny po indukci IPTG. Protilátka HRP-anti-IgA (ředění 1:30 000). Expoziční čas 30 s. V čase 0 h je vidět míra bazální exprese. Při 37 °C dochází k částečné degradaci.

4.3 Optimalizace purifikační metody pro CH1-P-CH2 a těžký řetězec IgA1

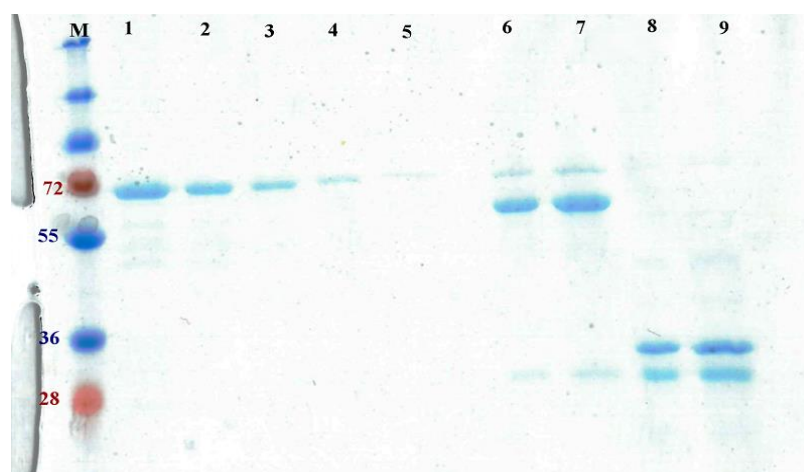
4.3.1 Purifikace za denaturačních podmínek

Denaturační purifikace probíhala v prostředí 8M močoviny. Díky His peptidové značce připojené k oběma proteinům bylo možné využít k purifikaci agarosovou matici s Ni²⁺ ionty navázanými přes NTA. Proteiny vázané NiNTA maticí přes His značky byly po odmytí kontaminujících nečistot z kolony eluovány poklesem pH elučního pufru (z 8 na 6,3 a 4,5).

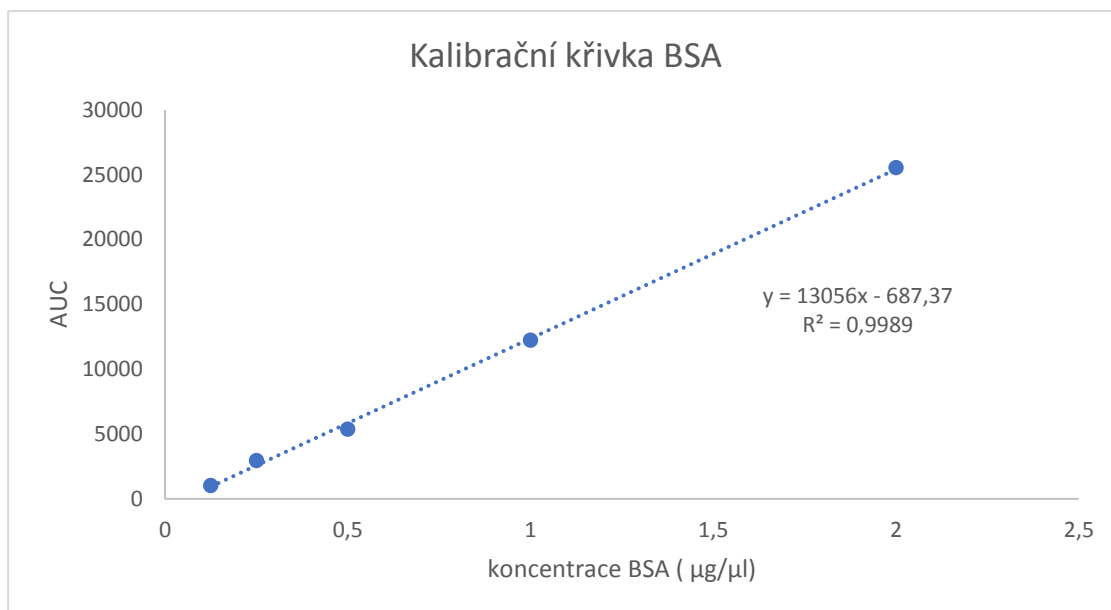
U CH1-P-CH2 i těžkého řetězce IgA1 bylo celkem odebráno 6 frakcí po 2 ml, které byly následně analyzovány na gelu a western blotu (Obrázek 11, 12, 13, 14). Pozitivní frakce byly spojeny.

Eluční frakce CH1-P-CH2 a frakce těžkého řetězce IgA1 byly dialyzovány do roztoku 4M močoviny a následně zakoncentrovány pomocí centrifugačních zkumavek Amicon Ultra 4 50K. K následné kvantifikaci proteinů bylo použito densitometrického stanovení na SDS-PAGE gelu. Jako standard byla použita kalibrační křivka BSA (Graf 1). K densitometrickému vyhodnocení byly použity programy ImageJ a MS Excel 2016 (Obrázek 10).

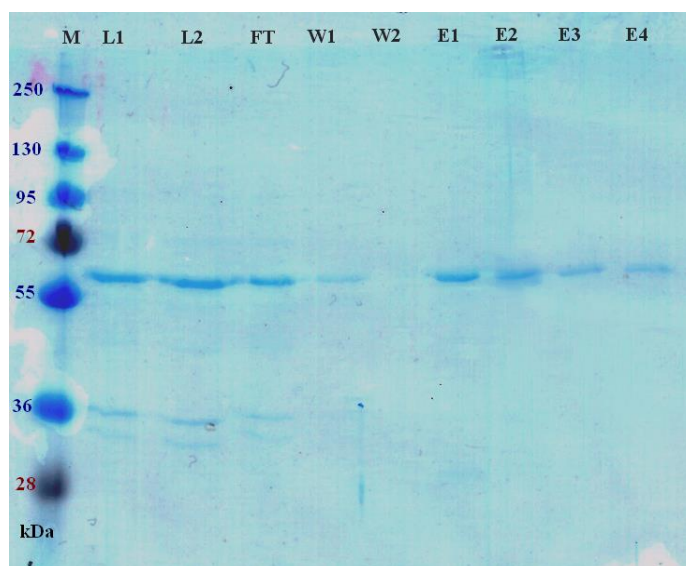
Výsledkem exprese s následnou purifikací byl zisk 120 μ l těžkého řetězce IgA1 v koncentraci 1,22 μ g/ μ l a 150 μ l CH1-P-CH2 v koncentraci 0,96 μ g/ μ l.



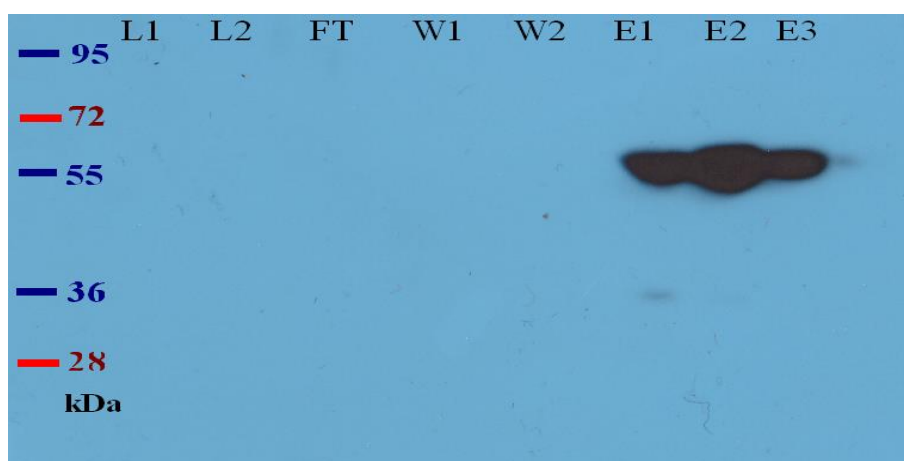
Obrázek 10: Kvantifikace CH1-P-CH2 a těžkého řetězce IgA1 na gelu. M – standard; 1 – 2 μ g/ μ l BSA; 2 – 1 μ g/ μ l BSA; 3 – 0,5 μ g/ μ l BSA; 4 – 0,25 μ g/ μ l BSA; 5 – 0,125 μ g/ μ l BSA; 6 – těžký řetězec IgA1 v nanášce 2 μ l; 7 – těžký řetězec v nanášce 1 μ l; 8 – CH1-P-CH2 v nanášce 2 μ l; 9 – CH1-P-CH2 v nanášce 1 μ l.



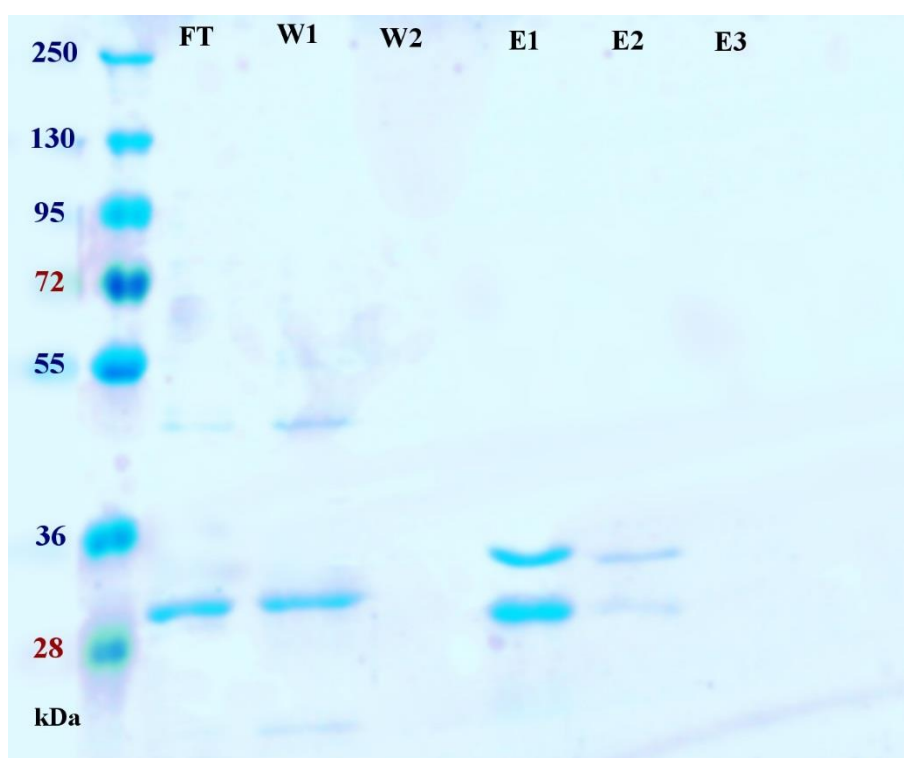
Graf 1: Kalibrační křivka BSA. Hodnoty AUC (area under curve) byly získány zpracováním SDS-PAGE gelu v programu ImageJ.



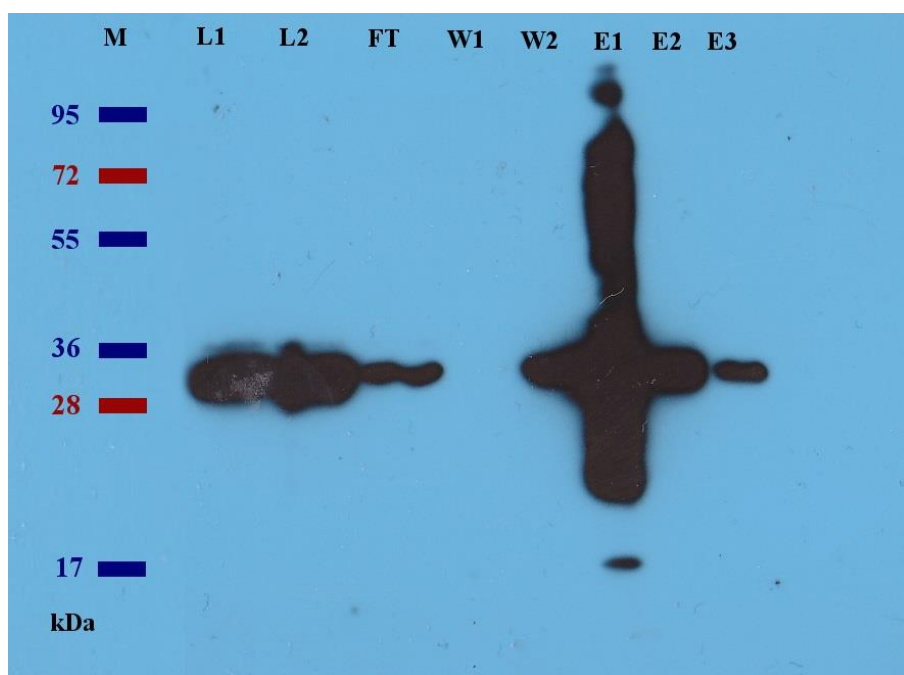
Obrázek 11: Denaturační purifikace těžkého řetězce IgA1–SDS-PAGE. Bakteriální lyzáty byly smíchány s Ni-NTA agarosou. Vzorek byl nanesen na prázdnou kolonu. Vzorek odebraný po sedimentaci agarosy v koloně je označen jako FT (flow through) a obsahuje nenavázaný těžký řetězec. M-standard; L1-L2 – bakteriální lyzáty před navázáním na agarosu; FT-nenavázaný vzorek; W1, W2 - promývací kroky; E1 – E4 - eluce.



Obrázek 12: Denaturační purifikace těžkého řetězce IgA1. – western blot. L1, L2 - bakteriální lyzáty před navázáním na agarosu; FT-nenavázaný vzorek; W1, W2 - promývání; E1, E2, E3 – eluce. WB detekce, protilátka HRP-anti-IgA (ředění 1:30 000). Expoziční čas 30 s.



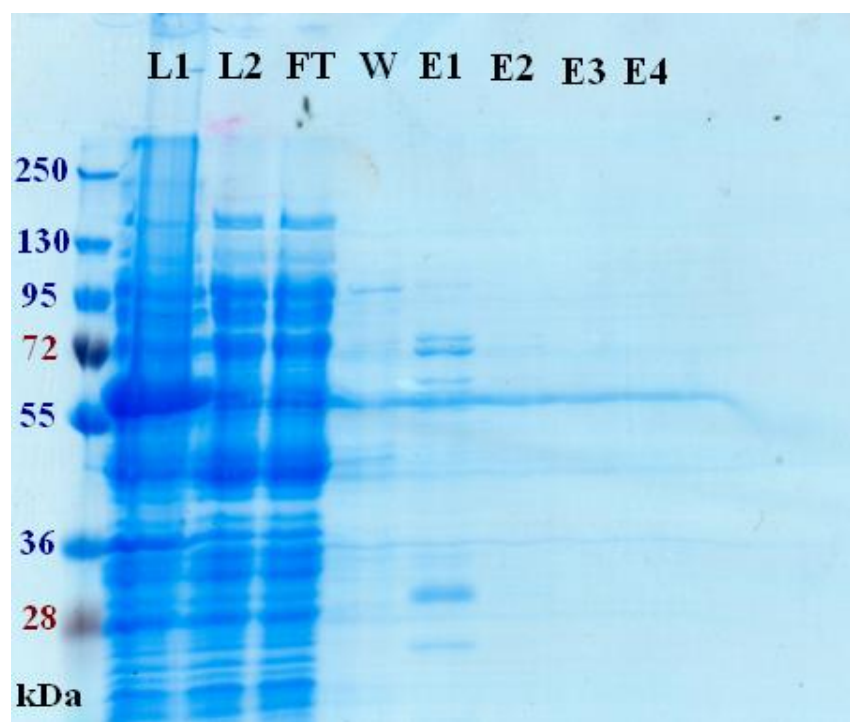
Obrázek 13: Denaturační purifikace CHI-P-CH2 – SDS-PAGE. Vzorky získány stejným způsobem jako je popsáno u Obrázku 11. M-standard; FT-nenavázaný vzorek; W1, W2 - promývací kroky; E1 – E3 - eluce.



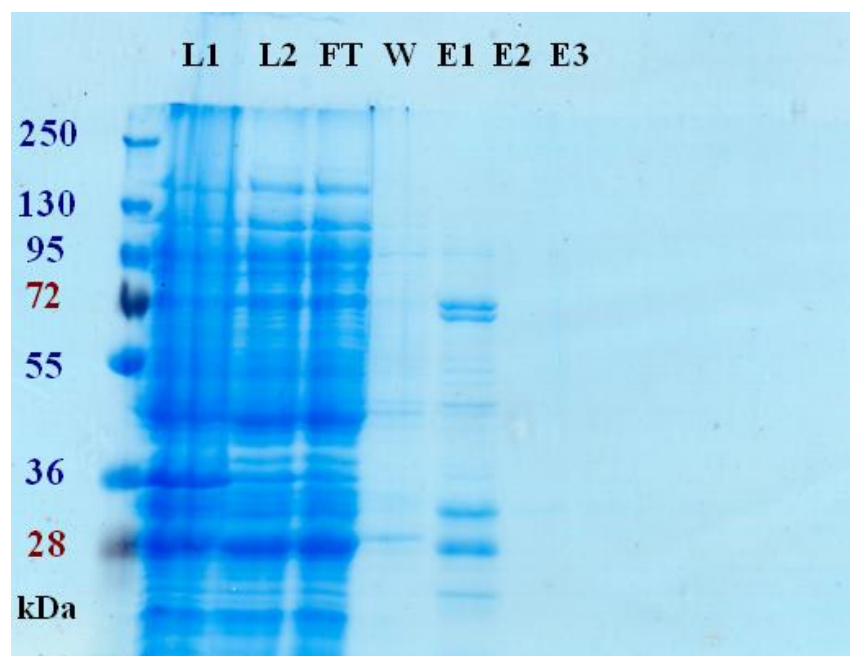
Obrázek 14: Denaturační purifikace CHI-P-CH2 – western blot. M-standard; L1-L2 – bakteriální lyzáty před navázáním na agarosu; FT-nenavázaný vzorek; W1, W2 - promývací kroky; E1 – E3 - eluce. Protilátka HRP-anti-IgA (ředění 1:30 000). Expoziční čas 30 s

4.3.2 Purifikace za nativních podmínek

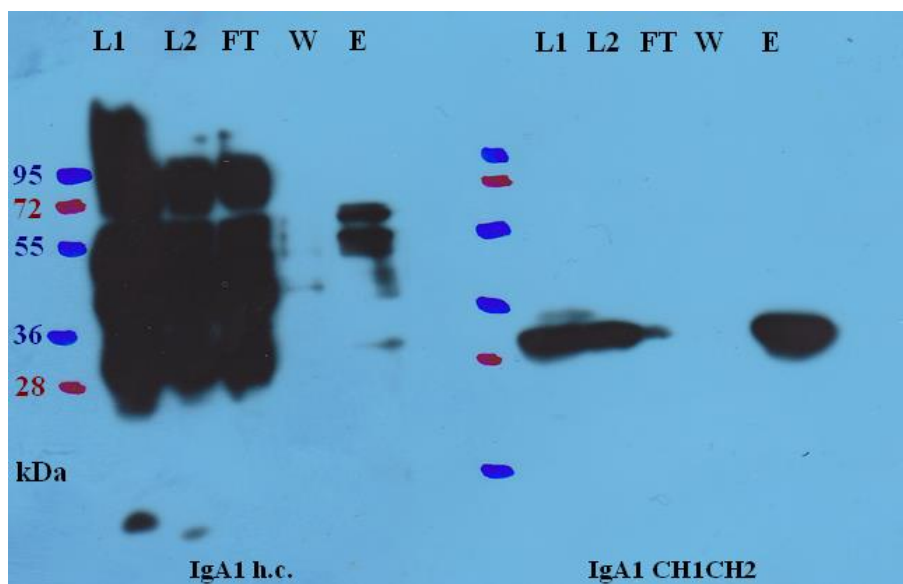
Proteiny byly homogenizovány v lyzačním pufru s Tris-Cl pufrém za nativních podmínek. Eluce z kolony byla realizována změnou koncentrace imidazolu v elučním pufru. V E1 byly zaznamenány fragmenty bakteriálního původu (okolo 72 a 28 kDa), které snižují čistotu získaných eluátů (Obrázek 15, 16, 17). Vzhledem k nižší čistotě elučních frakcí nebyly tyto podmínky dále používány a byla dána přednost purifikaci za denaturačních podmínek.



Obrázek 15: Nativní purifikace CHI-P-CH2 – SDS-PAGE. Postup získání vzorků popsán u Obrázku 11. L1, L2 – bakteriální lyzáty před navázáním na agarosu; FT – nenavázaný vzorek; W – promývání; E1-E3 – eluce.



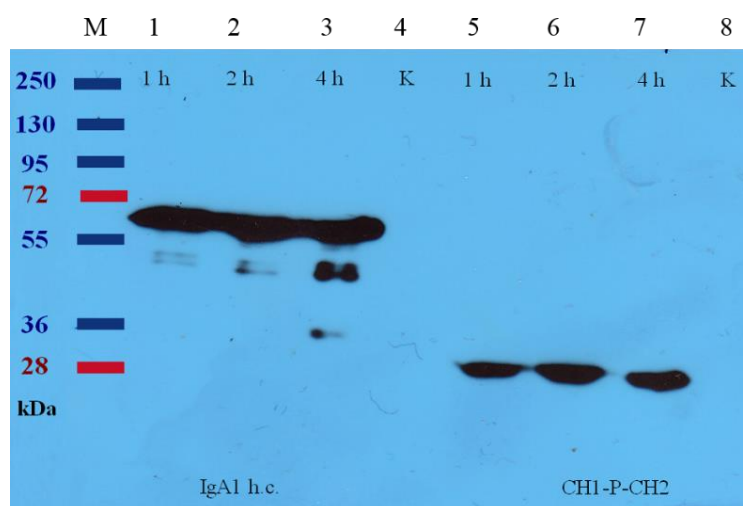
Obrázek 16: Nativní purifikace těžkého řetězce IgA1 – SDS-PAGE. Postup získání vzorků popsán u Obrázku 11. L1, L2 – bakteriální lyzáty před navázáním na agarosu; FT – nenavázaný vzorek; W – promývání; E1-E3 – eluce.



Obrázek 17: Nativní purifikace těžkého řetězce IgA1 a CH1-P-CH2 – western blot. L1, L2 - bakteriální lysáty před navázáním na agarosu; FT – nenavázaný vzorek; W - promývání; E – eluce. WB detekce: pro těžký řetězec IgA1 použita protilátka HRP-anti-IgA (ředění 1:30 000), pro CH1-P-CH2 HRP-anti-V5 (1:10 000). Expoziční čas 60 s.

4.4 Glykosylace *in vitro*

Připravený těžký řetězec IgA a CH1-P-CH2 byly po purifikaci glykosylovány rekombinantní GalNAc transferasou II *in vitro*. Glykosylovány byly 3 µg purifikovaného CH1-P-CH2 a těžkého řetězce IgA1. Efektivita reakce byla ověřena metodou western blot využívající vazby biotinilovaného lektinu HPA (*Helix pomatia*) specifického ke GalNAc (připojeného k oběma rekombinantním proteinům během *in vitro* glykosylace). Detekce vazby HPA byla provedena streptavidinem značeným peroxidasou. K detekci byl použit kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermofisher) s následným vyvoláním na fotografický papír (Obrázek 18).



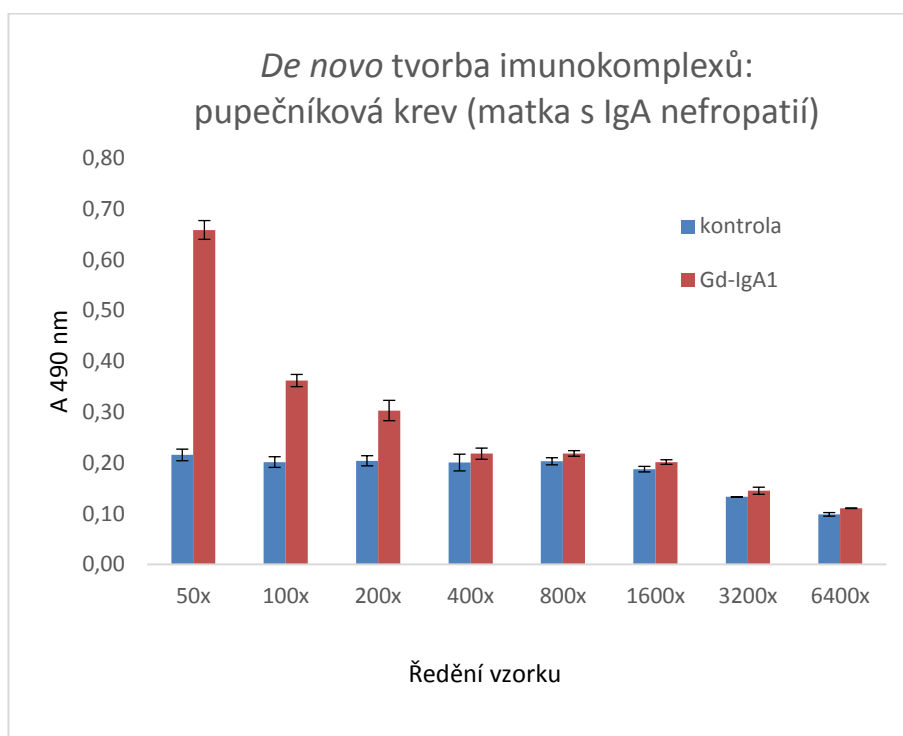
Obrázek 18: Glykosylace těžkého řetězce IgA1 a CH1-P-CH2 – western blot. Inkubace IgA1 (jamky 1-4) a CH1-P-CH2 (jamky 5-8) s GalNAcT2 1, 2 nebo 4 hodiny. K – kontrolní vzorek proteinu bez GalNAcT2. Po o/n inkubaci s lektinem HPA (1:500) detekce HRP-streptavidinem (1:5000). Expoziční čas 15 minut.

4.5 De novo tvorba imunokomplexů

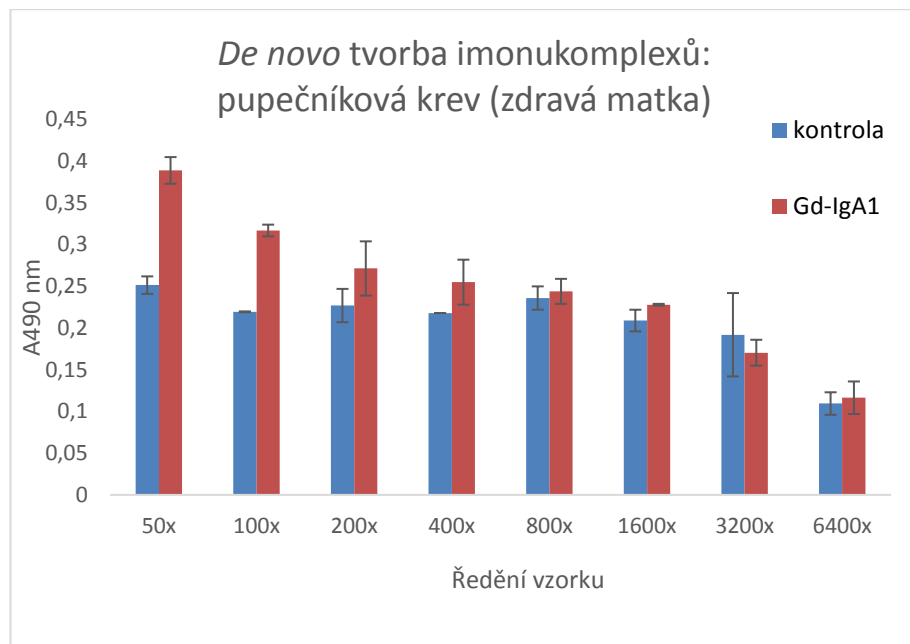
Připravené rekombinantní proteiny CH1-P-CH2 a těžký řetězec IgA1 budou použity ve studii sledující jejich kompetici s Gd-IgA1 o vazbu k IgG a následný vznik Gd-IgA-IgG imunokomplexů a finálně schopnost ovlivnit proliferační odpověď tkáňové kultury mesangiálních buněk *in vitro*. Proto závěr výsledkové části představuje výsledky přípravného experimentu optimalizujícího podmínky kompetiční reakce.

Pro optimalizaci bylo použito myelomové Gd-IgA1, které bylo inkubováno s pupečnickovou krví sloužící jako zdroj anti-Gd-IgA1 protilátek. Interakce byla sledována pomocí sendvičové ELISA.

Pro účely diplomové práce byly použity vzorky pupečnickové krve získané od dítěte matky s diagnózou IgA nefropatie a od dítěte zdravé matky. Výsledky interakce pupečnickového IgG s Gd-IgA1 jsou znázorněny v Graf 2 a Graf 3. Za optimalizovaných podmínek reakce vede přidavek Gd-IgA1 k pupečnickové krvi k nárůstu množství detekovatelných Gd-IgA1-IgG imunokomplexů. Tento nárůst je dvojnásobně vyšší u pacientky s IgA nefropatií v porovnání se zdravou kontrolou.



Graf 2: De novo tvorba imunokomplexů. Vzorek pupečnickové krve, dítě matky s IgA nefropatií. Krev (10 μ l) byla inkubovaná s 2 μ g Gd-IgA při 4 °C přes noc. Analýza tvorby imunokomplexů byla provedena metodou ELISA s jamkami potaženými kozí F(ab')₂ protilátkou anti-human IgG a protilátkou HRP-anti-IgA použitou k detekci imunokomplexů.



Graf 3: De novo tvorba imunokomplexů. Vzorek pupečnické krve, dítě zdravé matka. Krev (10 μ l) byla inkubovaná s 2 μ g Gd-IgA při 4 °C přes noc. Analýza tvorby imunokomplexů byla provedena metodou ELISA s jamkami potaženými kozí F(ab')₂ protilátkou anti-human IgG a protilátkou HRP-anti-IgA použitou k detekci imunokomplexů.

5 DISKUZE

Deposita komplexů Gd-IgA1-IgG v mesangiu ledvin u pacientů s IgA nefropatií způsobují proliferaci mesangiálních buněk, fibroprodukcí a u asi 40 % pacientů selhání ledvin. Vhodné kompetitory, které by zabránily tvorbě a ukládání těchto komplexů v mesangiu či proliferaci mesangiálních buněk, by mohly předcházet rozvoji ledvinového postižení.

Pro experimenty v diplomové práci byly zvoleny části molekuly IgA1, které jsou potenciálními kandidáty ke kompetici tvorby imunokomplexů mezi Gd-IgA1 a specifickými autoprotilátkami IgG u pacientů s IgAN. Byl vybrán fragment těžkého řetězce obsahující dvě CH domény a pantovou oblast (CH1-P-CH2), a dále celý těžký řetězec IgA1. Tyto fragmenty byly zvoleny tak, aby naplňovaly potřeby ideálního kompetitoru Gd-IgA1: Jejich molekulová hmotnost je menší než u Gd-IgA1, vzniklé imunokomplexy kompetitoru a IgG autoprotilátky mají nižší molekulovou hmotnost.

Klíčovým krokem experimentální práce byla exprese navržených proteinových fragmentů v bakteriích *E. coli*. Testována byla různá doba indukované exprese (IPTG) a různé teploty inkubace. Při expresi CH1-P-CH2 za teploty 37 °C neměla doba indukce významný vliv na množství vyprodukovaného proteinu počínaje dobou indukce delší než 1 hodina. Od druhé hodiny se začala zvyšovat koncentrace neidentifikovaného kontaminujícího proteinu s vyšší molekulovou hmotností. Při teplotě 30 °C byla míra exprese mírně nižší než při 37 °C. Docházelo k akumulaci produktu od 1 hodiny až do 4 hodin bez významného nárůstu kontaminujícího proteinu. U exprese těžkého řetězce IgA1 byla zaznamenána stejná dynamika genové exprese jako u CH1-P-CH2. Při 37 °C však již po 1 hodině indukované exprese byla detekována degradace cílového produktu. Protein CH1-P-CH2 se exprimoval s vyšší výtěžností, což je nejspíš dáno jeho menší velikostí (26,8 kDa) ve srovnání s těžkým řetězcem IgA1 (57,1 kDa).

Exprimované proteiny byly purifikovány jak za nativních, tak za denaturačních podmínek. Purifikace za nativních podmínek byla spojena s významnou degradací cílových proteinů, což může být vysvětleno faktem, že nativní podmínky zachovávají enzymatickou aktivitu všech enzymů v bakteriálním lyzátu, z nichž část může přispět ke štěpení produktu. Proteasy schopné štěpit IgA1 v pantové oblasti (nejčastěji různé metaloproteasy) byly identifikovány u mnoha bakterií *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *H. parahaemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*,

S. sanguinis, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. infantis*, *Gemella haemolysans*, *Ureaplasma urealyticum*, *Clostridium ramosum* a dalších, dosud však nikoliv u *E. coli*. Identifikace možné proteasy však nebyla cílem předložené diplomové práce. Upřednostněna byla denaturační varianta purifikačního protokolu, což minimalizovalo degradaci produkovaného rekombinantního proteinu. Z western blot analýzy je zřejmé, že bylo použito příliš velké množství bakteriálního lyzátu v poměru k Ni-NTA agarose, neboť nenavázaná (FT) frakce obsahovala velké množství cílových proteinů. Na druhou stranu, zvýšení množství Ni-NTA agarosy vede k nárůstu množství kontaminujících proteinů, což by nebylo vhodné pro následující experimenty, a proto jako optimální byla použita metoda prezentována v této diplomové práci.

Detekce *in vitro* glykosylace připravených rekombinantních proteinů pomocí western blot a GalNAc-specifického lektinu ukázala mnohem efektivnější glykosylaci těžkého řetězce IgA1 oproti CH1-P-CH2 fragmentu. Vzhledem k tomu, že GalNAc transferasa II je schopna připojovat GalNAc i k peptidu pokrývajícímú pantovou oblast IgA1 s N' a C' přilehlými dvěma až čtyřmi aminokyselinami, je možné spekulovat o významu absence vzdálenějších úseků těžkého řetězce IgA1. Pro exaktní posouzení míry glykosylace obou rekombinantních proteinů by bylo vhodné provést *in vitro* eseje s proteinovými substráty za stejného molárního množství a rovněž normalizovat nanášku proteinů na SDS-PAGE na molární množství připraveného glykoproteinu, což by umožnilo lépe srovnat densitometrické analýzy.

Poslední částí předložené diplomové práce byla příprava komplexů IgG s podgalaktosylovaným IgA1. Jako zdroj IgG byla použita pupečnicková krev dítěte pacientky s IgA nefropatií. Tato pacientka má IgG protilátky rozpoznávající podgalaktosylované IgA1 (Gd-IgA1), které se transplacentárně přenáší do pupečnickové krve dítěte společně s přirozenými GalNAc-specifickými protilátkami, což umožní dosáhnout maximální míry novotvorby imunitních komplexů s Gd-IgA1. U pupečnickové krve z pacientky s IgA nefropatií docházelo k tvorbě komplexů Gd-IgA-IgG s dvojnásobnou četností oproti zdravé kontrole. Tyto eseje by však bylo třeba zopakovat s vzorky od více pacientek a zdravých kontrol i s odpovídajícími vzorky sér. V rámci diplomové práce však byl hlavní cíl optimalizovat podmínky novotvorby imunitních komplexů, což bylo splněno. Postup bude použit pro následující studie interakce IgG – Gd-IgA1 za kompetice připravenými glykoproteiny.

6 ZÁVĚR

Práce je zaměřena na expresi, purifikaci a *in vitro* glykosylaci glykoproteinů IgA1 CH1-P-CH2 a těžkého řetězce IgA1. V rámci diplomové práce se podařilo zoptimalizovat podmínky exprese a purifikace a připravit *in vitro* glykosylované varianty IgA1 CH1-P-CH2 a těžký řetězec IgA1. Práce optimalizovala také podmínky pro *in vitro* tvorbu IgG-Gd-IgA1 imunokomplexů a jejich detekci pomocí ELISA. Připravené glykoproteiny budou v dalším výzkumu použity v esejích studujících jejich inhibičními vlastnostmi na formaci patologických imunokomplexů jako model potenciální terapie IgA nefropatie.

Cíle práce byly splněny.

7 LITERATURA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008): Molecular biology of the cell. 5. vydání. Garland Science, New York. 1616 s.
- Apter, F. M., Lencer, W. I., Finkelstein, R. A., Mekalanos, J. J. a Neutra, M. R. (1993) 'Monoclonal immunoglobulin A antibodies directed against cholera toxin prevent the toxin-induced chloride secretory response and block toxin binding to intestinal epithelial cells in vitro', *Infection and Immunity*, 61(12), 5271–5278.
- Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. a Dwek, R. A. (2007) 'The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins', *Annual Review of Immunology*, 25(1), 21–50.
- Ashwell, G. and Harford, J. (1982) 'Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver', *Annual Review of Biochemistry*, 51(1), 531–554.
- Berthoux, F. C., Mohey, H. a Afiani, A. (2008) 'Natural History of Primary IgA Nephropathy', *Seminars in Nephrology*, 28(1), 4–9.
- Brandtzaeg, P. a Johansen, F. E. (2005) 'Mucosal B cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties', *Immunological Reviews*, 32–63.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. a Helling, R. B. (1973) 'Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240–3244.
- Conley, M. E., Cooper, M. D. a Michael, A. F. (1980) 'Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus.', *Journal of Clinical Investigation*, 66(6), 1432–1436.
- Corthesy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Parez, N., Greenberg, H. a Schwartz-Cornil, I. (2006) 'Rotavirus Anti-VP6 Secretory Immunoglobulin A Contributes to Protection via Intracellular Neutralization but Not via Immune Exclusion', *Journal of Virology*, 80(21), 10692–10699.
- Donadio, J. V a Grande, J. P. (2002) 'IgA nephropathy.', *The New England journal of medicine*, 347(10), 738–48.
- Ernst, B., Hart, G. W. a Sinay, P. (2008) Carbohydrates in chemistry and biology. WILEY-VCH Verlag GmbH. 2578 stran.
- Ferguson, M. A., Kinoshita, T. a Hart, G. W. (2009) *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition, *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 11. Figure 11.6.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. a Bairoch, A. (2003) 'ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis', *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788.
- Gomes, A. R., Byregowda, S. M., Veeregowda, B. M. a Balamurugan, V. (2016) 'An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins', *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7), 346–356.
- Helander, A., Miller, C. L., Myers, K. S., Neutra, M. R. a Nibert, M. L. (2004) 'Protective immunoglobulin A and G antibodies bind to overlapping intersubunit epitopes in the head domain of type 1 reovirus adhesin sigma 1', *Journal of Virology*, 78(19), 10695–10705.

- Hiki, Y., Odani, H., Takahashi, M., Yasuda, Y., Nishimoto, A., Iwase, H., Shinzato, T., Kobayashi, Y. a Maeda, K. (2001) 'Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy', *Kidney International*, 59(3), 1077–1085.
- Hořejší V., Bartůňková J. (2009): *Základy imunologie*. 4. vydání, Triton, Praha, 307 stran.
- Chen, A., Chen, W. -P, Sheu, L. -F a Lin, C. -Y (1994) 'Pathogenesis of IgA nephropathy: In vitro activation of human mesangial cells by IgA immune complex leads to cytokine secretion', *The Journal of Pathology*, 173(2), 119–126.
- Iwasaki, H., Zhang, Y., Tachibana, K., Gotoh, M., Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Togayachi, A., Kudo, T., Kubota, T. a Narimatsu, H. (2003) 'Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2', *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5613–5621.
- Jackson, S., Montgomery, R. I., Julian, B. A., Galla, J. H. a Czerkinsky, C. (1987) 'Aberrant synthesis of antibodies directed at the Fab fragment of IgA in patients with IgA nephropathies', *Clinical Immunology and Immunopathology*, 45(2), 208–213.
- Ju, T., Brewer, K., Souza, A. D., Cummings, R. D. a Canfield, W. M. (2002) 'Cloning and expression of human core 1 β 1,3-galactosyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 178–186.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. (2012) 'KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury.', *Kidney international supplements*, 2(1), 1–138.
- Kim, M. J., McDaid, J. P., McAdoo, S. P., Barratt, J., Molyneux, K., Masuda, E. S., Pusey, C. D. a Tam, F. W. K. (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(7), 3751–8.
- Kiryluk, K., Li, Y., Scolari, F., Sanna-Cherchi, S., Choi, M., Verbitsky, M., Fasel, D., Lata, S., Prakash, S., Shapiro, S., Fischman, C., Snyder, H. J., Appel, G., Izzi, C., Viola, B. F., Dallera, N., Del Vecchio, L., Barlassina, C., Salvi, E., Bertinetto, F. E., Amoroso, A., Savoldi, S., Rocchietti, M., Amore, A., Peruzzi, L., Coppo, R., Salvadori, M., Ravani, P., Magistroni, R., Ghiggeri, G. M., Caridi, G., Bodria, M., Lugani, F., Allegri, L., Delsante, M., Maiorana, M., Magnano, A., Frasca, G., Boer, E., Boscutti, G., Ponticelli, C., Mignani, R., Marcantoni, C., Di Landro, D., Santoro, D., Pani, A., Polci, R., Feriozzi, S., Chicca, S., Galliani, M., Gigante, M., Gesualdo, L., Zamboli, P., Battaglia, G. G., Garozzo, M., Maixnerová, D., Tesar, V., Eitner, F., Rauen, T., Floege, J., Kovacs, T., Nagy, J., Mucha, K., Pazek, L., Zaniew, M., Mizerska-Wasiak, M., Roszkowska-Blaim, M., Pawlaczyk, K., Gale, D., Barratt, J., Thibaudin, L., Berthoux, F., Canaud, G., Boland, A., Metzger, M., Panzer, U., Suzuki, H., Goto, S., Narita, I., Caliskan, Y., Xie, J., Hou, P., Chen, N., Zhang, H., Wyatt, R. J., Novak, J., Julian, B. A., Feehally, J., Stengel, B., Cusi, D., Lifton, R. P. a Gharavi, A. G. (2014) 'Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens', *Nature Genetics*, 1187–1196.
- Knoppova, B., Reily, C., Maillard, N., Rizk, D. V, Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Raska, M., Renfrow, M. B., Julian, B. A. a Novak, J. (2016) 'The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy', *Frontiers in Immunology*, 7, p. 117.
- Krugmann, S., Pleass, R. J., Atkin, J. D. a Woof, J. M. (1997) 'Structural requirements for assembly of dimeric IgA probed by site-directed mutagenesis of J chain and a cysteine residue of the alpha-chain CH2 domain', *Journal of Immunology*, 159(1), 244–249.
- LabGuide.cz: Průvodce laboratoří. <http://labguide.cz/metody/klonovani/> (10.3.2018)
- Lechner, S. M., Abbad, L., Boedec, E., Papista, C., Le Stang, M.-B., Moal, C., Maillard, J., Jamin, A., Bex-Coudrat, J., Wang, Y., Li, A., Martini, P. G. V., Monteiro, R. C. a Berthelot, L. (2016)

- ‘IgA1 Protease Treatment Reverses Mesangial Deposits and Hematuria in a Model of IgA Nephropathy’, *Journal of the American Society of Nephrology*, 10.
- Lundblad, V. (2001) ‘Yeast cloning vectors and genes.’, in *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.], Chapter 13(1992), p. Unit 13.4.
- Maixnerova, D., Jancova, E., Skibova, J., Rysava, R., Rychlik, I., Viklicky, O., Merta, M., Kolsky, A., Reiterova, J., Neprasova, M., Kidorova, J., Honsova, E. a Tesar, V. (2015) ‘Nationwide biopsy survey of renal diseases in the Czech Republic during the years 1994--2011’, *Journal of Nephrology*, 28(1), 39–49. doi: 10.1007/s40620-014-0090-z.
- Mattu, T. S., Pleass, R. J., Willis, A. C., Kilian, M., Wormald, M. R., Lellouch, A. C., Rudd, P. M., Woof, J. M. a Dwek, R. A. (1998) ‘The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc α receptor interactions’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2260–2272.
- Mestecky, J., Raska, M., Julian, B. A., Gharavi, A. G., Renfrow, M. B., Moldoveanu, Z., Novak, L., Matousovic, K. a Novak, J. (2013) ‘IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease.’, *Annual review of pathology*, 8, 217–40.
- Moldoveanu, Z., Moro, I., Radl, J., Thorpe, S. R., Komiyama, K. a Mestecky, J. (1990) ‘Site of Catabolism of Autologous and Heterologous IgA in Non-Human *Primates*’, *Scandinavian Journal of Immunology*, 32(6), 577-83.
- Moura, I. C., Centelles, M. N., Arcos-Fajardo, M., Malheiros, D. M., Collawn, J. F., Cooper, M. D. a Monteiro, R. C. (2001) ‘Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)a1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in Iga Nephropathy’, *Journal of Experimental Medicine*, 194(4), 417–426.
- Novak, J., Moldoveanu, Z., Renfrow, M. B., Yanagihara, T., Suzuki, H., Raska, M., Hall, S., Brown, R., Huang, W. Q., Goepfert, A., Kilian, M., Poulsen, K., Tomana, M., Wyatt, R. J., Julian, B. A. a Mestecky, J. (2007) ‘IgA nephropathy and henoch-schoenlein purpura nephritis: Aberrant glycosylation of IgA1, formation of IgA1-containing immune complexes, and activation of mesangial cells’, in *Contributions to Nephrology*, 134–138.
- Novak, J., Rizk, D., Takahashi, K., Zhang, X., Bian, Q., Ueda, H., Ueda, Y., Reily, C., Lai, L.-Y., Hao, C., Novak, L., Huang, Z.-Q., Renfrow, M. B., Suzuki, H. a Julian, B. A. (2015) ‘New Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy’, *Kidney Diseases*, 1(1), 8–18
- Novak, J., Tomana, M., Matousovic, K., Brown, R., Hall, S., Novak, L., Julian, B. A., Wyatt, R. J. a Mestecky, J. (2005) ‘IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells’, *Kidney International*, 67(2), 504–513.
- Novak, J., Vu, H. L., Novak, L., Julian, B. A., Mestecky, J. a Tomana, M. (2002) ‘Interactions of human mesangial cells with IgA and IgA-containing immune complexes’, *Kidney International*, 62(2), 465–475.
- Qin, W., Zhou, Q., Yang, L. C., Li, Z., Su, B. H., Luo, H. a Fan, J. M. (2005) ‘Peripheral B lymphocyte beta1,3-galactosyltransferase and chaperone expression in immunoglobulin A nephropathy’, *Journal of Internal Medicine*, 258(5), 467–477.
- Raska, M., Moldoveanu, Z., Suzuki, H., Brown, R., Kulhavy, R., Andrasi, J., Hall, S., Vu, H. L., Carlsson, F., Lindahl, G., Tomana, M., Julian, B. A., Wyatt, R. J., Mestecky, J. a Novak, J. (2007) ‘Identification and Characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1 α 2,6-Sialyltransferase in IgA1-producing Cells’, *Journal of Molecular Biology*, 369(1), 69–78.
- Reid, S., Cawthon, P. M., Craig, J. C., Samuels, J. A., Molony, D. A. a Strippoli, G. F. (2011) ‘Non-immunosuppressive treatment for IgA nephropathy’, in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 16 (3).

- Růčková, E., Müller, P. a Vojtěšek, B. (2014) 'Expres a purifikace proteinů', *Klinická Onkologie*.
- Ruhl, S., Sandberg, A. L., Cole, M. F. a Cisar, J. O. (1996) 'Recognition of immunoglobulin A1 by oral actinomyces and streptococcal lectins', *Infection and Immunity*, 64(12), 5421–5424.
- Saraswat, M., Musante, L., Ravidá, A., Shortt, B., Byrne, B. a Holthofer, H. (2013) 'Preparative purification of recombinant proteins: Current status and future trends', *BioMed Research International*, 2013, 1–18.
- Stothard, P. (2000) 'The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences.', *BioTechniques*, 28(6).
- Suzuki, H., Fan, R., Zhang, Z., Brown, R., Hall, S., Julian, B. A., Chatham, W. W., Suzuki, Y., Wyatt, R. J., Moldoveanu, Z., Lee, J. Y., Robinson, J., Tomana, M., Tomino, Y., Mestecky, J. a Novak, J. (2009) 'Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity', *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1668–1677.
- Suzuki, H., Raska, M., Yamada, K., Moldoveanu, Z., Julian, B. A., Wyatt, R. J., Tomino, Y., Gharavi, A. G. a Novak, J. (2014) 'Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes', *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 5330–5339.
- Tabasum, S., Noreen, A., Kanwal, A., Zuber, M., Anjum, M. N. a Zia, K. M. (2017) 'Glycoproteins functionalized natural and synthetic polymers for prospective biomedical applications: A review', *International Journal of Biological Macromolecules*, 748–776.
- Takahashi, K., Smith, A. D., Poulsen, K., Kilian, M., Julian, B. A., Mestecky, J., Novak, J. a Renfrow, M. B. (2012) 'Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 O-glycosylation', *Journal of Proteome Research*, 11(2), 692–702.
- Tamouza, H., Chemouny, J. M., Raskova Kafkova, L., Berthelot, L., Flamant, M., Demion, M., Mesnard, L., Paubelle, E., Walker, F., Julian, B. A., Tissandié, E., Tiwari, M. K., Camara, N. O. S., Vrtovsnik, F., Benhamou, M., Novak, J., Monteiro, R. C. a Moura, I. C. (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(12), 1284–1296.
- Tarelli, E., Smith, A. C., Hendry, B. M., Challacombe, S. J. a Pouria, S. (2004) 'Human serum IgA1 is substituted with up to six O-glycans as shown by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry', *Carbohydrate Research*, 339(13), 2329–2335.
- Tomana, M., Kulhavy, R. a Mestecky, J. (1988) 'Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin a by human liver', *Gastroenterology*.
- Tomana, M., Matousovic, K., Julian, B. A., Radl, J., Konecny, K. d Mestecky, J. (1997) 'Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG', *Kidney International*, 52(2), 509–516.
- Tomana, M., Niedermeier, W., Mestecky, J. a Skvaril, F. (1976) 'The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins', *Immunochemistry*, 13(4), 325–328.
- Tomana, M., Novak, J., Julian, B. A., Matousovic, K., Konecny, K. a Mestecky, J. (1999) 'Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies', *Journal of Clinical Investigation*, 104(1), 73–81.
- Tripathi, N. K. (2016) 'Production and Purification of Recombinant Proteins from Escherichia coli', *ChemBioEng Reviews*, 3(3), 116–133.

- Usmani, S. S., Bedi, G., Samuel, J. S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., Ahuja, A. A., Sharma, M., Gautam, A. a Raghava, G. P. S. (2017) 'THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics', *PLoS ONE*, 12(7).
- Wang, Y. Y. Y., Chen, J., Chen, Y., Wang, L. a Lv, Y. (2011) 'A meta-analysis of the clinical remission rate and long-term efficacy of tonsillectomy in patients with IgA nephropathy.', *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(6), 1923–31.
- Wong, J. W., Albright, R. L. a Wang, N. H. L. (1991) 'Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications', *Separation & Purification Reviews*, 20(1), 49–106.
- Woof, J. M. (2013) 'Immunoglobulin A: Molecular mechanism of function and role in immune defence', in Nimmerjahn, F. (ed.) *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity*. Springer Science+ Business Media, 31–60.
- Woof, J. M. a Kerr, M. A. (2006) 'The function of immunoglobulin A in immunity', *Journal of Pathology*, 270–282.
- Woof, J. M. a Mestecky, J. (2015) 'Mucosal Immunoglobulins', *Mucosal Immunology: Fourth Edition*, 1–2, 287–324.
- Woof, J. M. a Russell, M. W. (2011) 'Structure and function relationships in IgA', *Mucosal Immunology*, 4(6), 590–597.
- Yuzawa, Y., Yamamoto, R., Takahashi, K., Katafuchi, R., Tomita, M., Fujigaki, Y., Kitamura, H., Goto, M., Yasuda, T., Sato, M., Urushihara, M., Kondo, S., Kagami, S., Yasuda, Y., Komatsu, H., Takahara, M., Harabuchi, Y., Kimura, K. a Matsuo, S. (2016) 'Evidence-based clinical practice guidelines for IgA nephropathy 2014', *Clinical and Experimental Nephrology*, 511–535.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACE	angiotenzin konvertující enzym
ARB	receptor pro angiotenzin II
ASGP-R	asialoglykoprotein receptor
Cosmc	core 1 β 3-Gal-T-specific molecular chaperone
FDA	Food and Drug Administration (USA)
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GalNAcT2	UDP- <i>N</i> -acetylgalaktosaminyltransferasa
Gd-IgA1	galaktosa-deficientní imunoglobulin A1
IgA1 h.c.	imunoglobulin A 1 heavy chain (těžký řetězec)
IgAN	imunoglobulin A nefropatie
IK	imunokomplex
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
NTA	nitriloacetát
pIgR	polymerní imunoglobulinový receptor
ST6GalNAc2	α -2,6-GalNAc specifická sialyltransferasa
SYK	spleen tyrosine kinase
UDP	uridindifosfát