

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Studium mechanismů vzniku cirkulujících  
imunokomplexů u IgA nefropatie**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Milada Stuchlová Horynová

Školitel: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav imunologie, Lékařská fakulta, Olomouc

Studijní obor: Lékařská imunologie

Olomouc 2014

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a veškerá použitá literatura je v ní řádně uvedena.

V průběhu studia byla práce podporována granty:

2007-2011

### **Výzkumný záměr MŠMT MSM6198959223**

„Nové možnosti diagnostiky a imunomodulace u infekčních onemocnění a imunopatologických stavů“

2010-2013

### **GA ČR GAP302/10/1055**

„Studium glykosylace imunoglobulinu IgA1 u IgA nefropatie“

2010 – 2014

### **IGA MZ ČR NT11081**

„Molekulární přístupy k eliminaci nebo inaktivaci patogenních cirkulujících imunitních komplexů u IgA nefropatie a Henoch Schoenleinovy purpury“

2011 – 2014

### **MŠMT KONTAKT II LH11046**

„Studium vztahů mezi enzymy glykosylujícími IgA1 imunoglobulin u IgA nefropatie“

.....  
Mgr. Milada Stuchlová Horynová

V Olomouci dne 7. 10. 2014

## **Poděkování**

Moje velké poděkování patří mému školiteli Doc. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a za cenné poznámky, které formulovaly můj vztah a přístup k vědecké práci. Zároveň bych chtěla poděkovat vedoucímu Ústavu imunologie Prof. MUDr. Evženu Weiglovi, CSc. za trvalý zájem o mou práci a všestrannou podporu během celého postgraduálního studia.

Dále bych chtěla poděkovat všem spolupracovníkům z Ústavu imunologie LF UP v Olomouci za pomoc při realizaci jednotlivých úkonů.

Moje nejvřelejší poděkování patří mé rodině a nejbližším za neustálou podporu, lásku a pochopení během mých studií.

## Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod.....  | 7  |
| 1.1   | IgA nefropatie.....  | 7  |
| 1.1.1 | Imunoglobulin A (IgA) .....  | 8  |
| 1.1.2 | IgA1 imunoglobulin .....   | 10 |
| 1.1.3 | IgA1 <i>O</i> -glykosylace .....   | 10 |
| 1.1.4 | Molekulová různorodost <i>O</i> -glykosylace .....   | 14 |
| 1.1.5 | Vznik IgA1 imunokomplexů a jejich biologická aktivita .....  | 15 |
| 1.1.6 | IgA receptory.....   | 17 |
| 1.1.7 | Výhledy terapie IgAN .....   | 17 |
| 1.2   | Bakulovirový expresní systém.....  | 18 |
| 1.2.1 | Biotechnologické a laboratorní využití bakulovirového expresního systému ...                           | 19 |
| 2     | Cíle disertační práce .....  | 21 |
| 3     | Materiál a metody.....   | 22 |
| 3.1   | Buněčné kultury.....   | 23 |
| 3.1.1 | Hmyzí buňky Sf9 .....  | 23 |
| 3.1.2 | Savčí buňky HEK 293T a FreeStyle 293-F.....  | 24 |
| 3.2   | Izolace cDNA glykosyltransferáz (izolace celkové RNA → mRNA → reverzní transkripce do cDNA → PCR)..... | 24 |
| 3.2.1 | Klonování vektorů kódujících celkovou délku jednotlivých glykosyltransferáz                            | 24 |
| 3.3   | Konstrukce vektorů kódujících sekreční formy glykosyltransferáz .....                                  | 27 |
| 3.3.1 | Příprava vektorů pro Bakulovirový expresní systém .....  | 27 |
| 3.3.2 | Příprava vektorů pro savčí expresní systém.....  | 31 |
| 3.4   | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v Sf9 buňkách .....  | 32 |
| 3.4.1 | Transfekce hmyzích buněk Sf9 .....   | 32 |
| 3.4.2 | Množení bakulovirů .....   | 33 |
| 3.4.3 | Virová plaková esej.....   | 33 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.4.4 | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-C1GalT1, Igκ-Cosmc, Igκ-ST6GalNAc I, Igκ-ST6GalNAc II..... | 34 |
| 3.5   | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v HEK 293T a HEK 293FreeStyle buňkách .....   | 34 |
| 3.5.1 | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v buňkách HEK 293T .....  | 34 |
| 3.5.2 | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v buňkách FreeStyle 293-F.....  | 35 |
| 3.6   | Izolace rekombinantních glykosyltransferáz .....  | 35 |
| 3.6.1 | Izolace sekretovaných forem glykosyltransferáz .....  | 35 |
| 3.6.2 | Izolace Igκ-GalNAc-T14, Igκ-C1GalT1, Igκ-Cosmc .....  | 36 |
| 3.6.3 | Potvrzení identity rekombinantních glykosyltransferáz pomocí hmotnostní spektrometrie .....   | 36 |
| 3.6.4 | Potvrzení aktivity rekombinantních glykosyltransferáz.....  | 36 |
| 3.7   | Příprava protilátek pro průkaz jednotlivých glykosyltransferáz v uspořádání Western blot a fluorescenční mikroskopii .....                | 37 |
| 3.7.1 | Imunizace pokusných zvířat.....   | 37 |
| 3.7.2 | Tvorba monoklonálních protilátek .....  | 37 |
| 3.7.3 | Stanovení hladin specifických protilátek .....  | 37 |
| 3.7.4 | Stanovení specificity sérových a monoklonálních protilátek.....   | 38 |
| 3.7.5 | Barvení buněk pomocí specifických protilátek .....  | 38 |
| 4     | Výsledky.....   | 40 |
| 4.1   | Konstrukce vektorů pro produkci rekombinantních glykosyltransferáz .....  | 40 |
| 4.2   | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz .....   | 40 |
| 4.2.1 | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz pomocí Bakulovirového expresního systému .....  | 40 |
| 4.2.2 | Produkce rekombinantních glykosyltransferáz pomocí savčího expresního systému   | 47 |
| 4.3   | Aktivita rekombinantních glykosyltransferáz .....   | 54 |
| 4.4   | Příprava protilátek pro průkaz jednotlivých glykosyltransferáz v uspořádání Western blot a fluorescenční mikroskopii .....                | 58 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.4.1 | Specificita sérových protilátek ve Western blot.....                                   | 58 |
| 4.4.2 | Příprava a charakterizace monoklonálních protilátek .....                              | 59 |
| 4.5   | Lokalizace glykosyltransferáz v Golgiho komplexu pomocí monoklonálních protilátek..... | 61 |
| 4.5.1 | Fluorescenční mikroskop .....  | 61 |
| 4.5.2 | Konfokální mikroskop.....  | 64 |
| 5     | Diskuze.....   | 67 |
| 6     | Závěry.....  | 70 |
| 7     | Souhrn .....   | 72 |
| 8     | Summary .....  | 74 |
| 9     | Seznam zkratk .....  | 76 |
| 10    | Publikace autora .....   | 78 |
| 11    | Literatura .....   | 84 |
| 12    | Přílohy .....  | 88 |

# 1 Úvod

## 1.1 IgA nefropatie

IgA nefropatie (IgAN), Bergerova choroba je nejčastější primární glomerulonefritidu na světě. Jde o autoimunitní onemocnění, při němž jsou ledviny postiženy ukládáním imunitních komplexů (IK). Pacienti s tímto onemocněním mají na unikátní pantové oblasti těžkého řetězce imunoglobulinu A1 (IgA1) změněné glykanové struktury, které jsou rozpoznávány přirozeně se vyskytujícími anti-glykanovými protilátkami typu IgG nebo IgA. Výsledkem je výskyt imunitních komplexů v cirkulaci (CIK) a jejich ukládání do glomerulárního mesangia kde dochází k indukci proliferace mesangiálních buněk a zvýšení produkce extracelulární matrix proteinů a cytokinů, což vede v asi jedné třetině případů ke ztrátě renálních funkcí [1-3].

IgA nefropatie je celosvětově nejčastější primární glomerulonefritida. Incidence tohoto onemocnění se liší napříč světadíly od 40% všech nativních ledvinových biopsií prováděných v Asii přes 20% v Evropě, 5 – 10% v Severní Americe až po méně než 5% v centrální Africe [1-2]. Výskyt v ČR se odhaduje zhruba 11 nových případů za rok na 1.000.000 obyvatel. IgAN bývá diagnostikována mezi 10. až 20. rokem věku kdy se objeví makroskopická hematurie spojená s běžnou infekcí horních cest dýchacích. U dospělých je IgAN často diagnostikována po preventivní prohlídce, při níž je náhodně zjištěna mikroskopická hematurie. Muži bývají postiženi 2 – 3x častěji než ženy a také mnohem častěji u nich nemoc progreduje až do fáze ledvinového selhání a potřeby transplantace ledvin [2, 4]. Časový průběh onemocnění dělíme na časné a pozdní stadium. IgAN prochází rozdílným vývojem, kdy se může klinicky vyhojit, močový nález může přetrvávat bez klesající funkce ledvin, nebo nemoc progreduje k chronickému selhávání ledvin vyžadujícímu dialýzu nebo transplantaci ledvin. Choroba je nejčastěji diagnostikována až ve stádiu snížené glomerulární funkce a nápadné proteinurie, finální diagnózu určí až bioptický nález. Klinickými znaky IgAN jsou tři syndromy: hematurie, proteinurie a hypertenze. Patologické změny na glomerulech se projevují jako buněčná hyperplazie, hypertrofie a expanze extracelulární hmoty. Poškození se liší mezi jednotlivými glomeruly. Pokud v prvních letech onemocnění nedojde k jeho vyhojení, rozvíjí se chronické selhání ledvin spojené s vyšší proteinurií a růstem krevního tlaku. Léčebná opatření směřující ke zpomalení progresu jsou obdobná jako u jiných ledvinových chorob [2, 4].

Při objasňování vzniku IgAN se musí brát na zřetel několik faktorů:

1. Přítomnost frakce abnormálně galaktosylovaného polymerního imunoglobulinu IgA1.
2. Přítomnost protilátek (IgG, IgA tříd) specificky rozlišujících abnormálně galaktosylované polymerní IgA1 což vede ke vzniku imunitních komplexů.
3. Ukládání cirkulujících imunokomplexů do mesangia ledvin vedoucí ke stimulaci a proliferaci mesangiálních buněk [4].

### 1.1.1 Imunoglobulin A (IgA)

Lidský imunoglobulin A (IgA), reprezentován dvěma strukturálně a funkčně odlišnými podtřídami – IgA1 a IgA2, je typickým představitelem specifické humorální slizniční imunity [5]. IgA molekuly jsou druhým nejčastějším izotypem sérových imunoglobulinů. Denní produkce IgA daleko převyšuje produkci všech ostatních izotypů protilátek. Sérová koncentrace je však nižší než koncentrace IgG protože více než polovina produkce je aktivně transportována do externích sekretů a také poločas IgA je podstatně menší než u IgG (5 – 6 dní u IgA oproti 20 – 24 dním u IgG) [2, 6]. V séru převyšuje množství IgA1 nad IgA2 zatímco na mukózních površích je jejich množství poměrně vyrovnáno. V cirkulaci se IgA vyskytuje nejčastěji jako monomer (mIgA). Na sliznicích převažuje IgA sekreční (S-IgA), které je tvořeno nejčastěji dvěma molekulami IgA spojenými J řetězcem (polymerní IgA – pIgA) a sekreční komponentou, která je k pIgA připojována během transportu přes epitelové buňky sliznic do lumenu slizničních orgánů. Sekreční komponenta poskytuje částečnou ochranu před bakteriálními protézami [4-6].

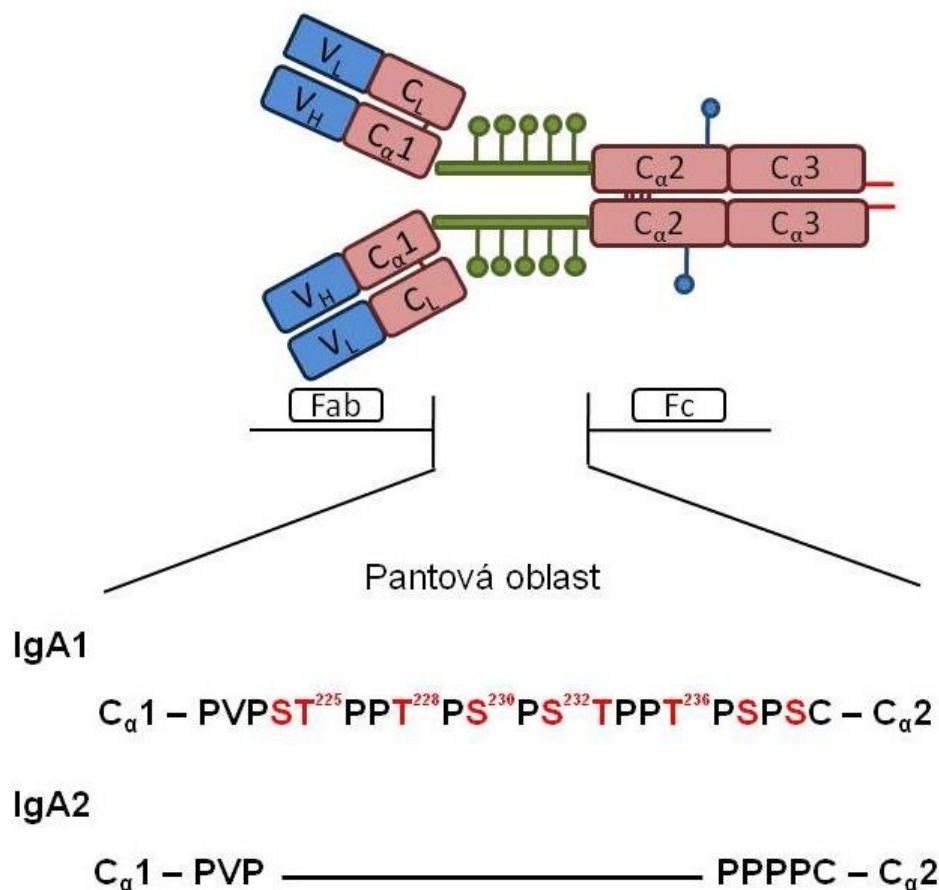
Molekula IgA má dva těžké řetězce, tvořené jednou variabilní (variable; V) a třemi konstantními (constant; C) doménami, a dva lehké řetězce, tvořené jednou V a jednou C doménou. Od ostatních imunoglobulinů se IgA liší unikátní pantovou oblastí dlouhou 19 aminokyselin (hinge region; HR) mezi C1 a C2 doménami těžkých řetězců a 18 aminokyselin dlouhou C' terminální extenzí (podobně jako IgM) důležitou pro navázání J řetězce (**Obrázek 1**). Delší HR poskytuje IgA1 větší flexibilitu domén vázících antigen (Fab) vzhledem ke konstantní doméně. Na pantovou oblast IgA1, která je delší o 13 aminokyselin oproti u HR IgA2, může být připojeno obvykle 3 až 6 O-glykanů. Naopak N-glykany se váží mimo pantovou oblast a jsou dva nebo tři u IgA1 a čtyři u IgA2 [2].

IgA2 molekula je evolučně starší než IgA1. Extrémně dlouhá pantová oblast IgA1 vznikla zřejmě inzercí genového segmentu do pantové oblasti IgA2 [2, 4-5]. Srovnání proteinové a DNA sekvence  $\alpha$  řetězce imunoglobulinů u řady obratlovců odhalilo, že IgA1 s



výše uvedenými atributy tvoří pouze člověk a lidoopi a typická experimentální zvířata jako myši, krysy a králíci jej netvoří [5, 7].

IgA-produkující buňky nalezneme v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slinivce a v mukózní tkáni. Nejdůležitějším zdrojem mIgA je kostní dřeň zatímco S-IgA je produkováno lokálně v mukózní tkáni. V cirkulaci převažuje mIgA1. Naopak v externích sekretech převažuje pIgA (kromě terminální části tlustého střeva a pohlavního traktu, kde převažuje IgA2). Mukózní povrchy horních cest dýchacích obsahují hlavně IgA1-produkující buňky a tento fakt je zajímavý zejména vzhledem ke klinicky pozorované vazbě mezi infekcemi horních cest dýchacích a hematurii jako první příznak IgAN. Bez ohledu na tkáňovou distribuci IgA-produkujících buněk také druh antigenu má vliv na tvorbu IgA1 nebo IgA2. IgA protilátky proti proteinům a glykoproteinům bývají převážně IgA1 podtříd zatímco IgA2 jsou typicky namířené proti bakteriálním polysacharidům a lipopolysacharidům [2].



**Obrázek 1:** Molekulová struktura IgA1 a IgA2, porovnání pantové oblasti lidského IgA1 a IgA2. IgA1 monomer obsahuje *O*-glykany na HR mezi C1 a C2 doménou (zelený kruh). Dva *N*-glykany (modrý kruh) jsou navázány na obou těžkých řetězcích [8]. HR sekvence se skládá ze dvou oktapeptidových opakování. Potenciální *O*-glykosylační místa (POGS) jsou označeny

červeně a šest Ser/Thr residuí, které mohou být u cirkulujících IgA1 *O*-glykosylovány jsou číslovány [9-11].

### 1.1.2 IgA1 imunoglobulin

IgA1 HR má unikátní aminokyselinovou sekvenci obsahující dva oktapeptidy (PVPST<sup>225</sup>PPT<sup>228</sup>PS<sup>230</sup>PS<sup>232</sup>T<sup>233</sup>PPT<sup>236</sup>PSPSC) s devíti potenciálními *O*-glykosylačními místy (POGS) [8-10]. Normální lidský sérový IgA1 obsahuje tři až šest *O*-glykanů, nejčastěji jako disacharid galaktóza - *N*-acetylgalactosamin (Gal - GalNAc; T antigen) a jeho mono- nebo disialylovanou formu (sialyl-T antigen) [9, 11]. U IgAN jsou některé IgA1 *O*-glykany složené pouze z *N*-acetylgalactosaminu (GalNAc) bez galaktózy (Gal) tvořící Tn antigen nebo sialylovaného GalNAc (Sialyl-Tn antigen) [12-16].

IgA1 HR je jedinou známou molekulou která může být selektivně štěpena vybranými proteázami patogenních bakterií jako *Clostridium ramosum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* [1]. Bakteriální proteázy jsou významným faktorem patogenity. Rozštěpené IgA1, přesto, že se váže na mikroorganismus, není schopno aktivovat fagocytózu případně komplement a zároveň poskytuje bakteriím hydrofilní plášť nezbytný k adhezi na epiteliální buňky [5, 17].

Vznik pIgA1 nastává krátce před nebo při samotné sekreci na mukózní povrchy. IgA1-produkující buňky mukózních povrchů primárně exprimují J řetězec na svém povrchu na rozdíl od IgA-produkujících buněk kostní dřeně. J řetězec neinicuje polymeraci, ale určuje, z kolika molekul bude IgA sestaveno (di- případně tri- a tetra- mery). Na vnitřní straně epiteliálních buněk se IgA váže na receptor pro polymerní Ig (poly-IgR) a komplex IgA-poly-IgR je endocytován a transportován na lumenální stranu buněk kde fúzuje s membránou. Část receptorové molekuly zůstane navázána na pIgA a nazývá se sekreční komponenta. Sekreční komponenta chrání IgA před bakteriálními proteázami [5].

### 1.1.3 IgA1 *O*-glykosylace

V poslední době se posttranslační modifikace proteinů, jako je například glykosylace, staly důležitou součástí výzkumu etiologie mnoha onemocnění. Jeden z přístupů studia významu glykosylace u jednotlivých chorob spočívá v popisu odchylek aktivity enzymového aparátu zodpovědného za připojení a formování postranních cukerných řetězců. Takové enzymy patří do skupiny glykosyltransferáz nacházejících se v endoplasmatickém retikulu a Golgiho komplexu.

*O*-glykany pantové oblasti IgA1 jsou tvořeny GalNAc s  $\beta$ 1,3 připojenými Gal. Řetězec je ukončen sialovou kyselinou (NeuAc) připojenou ke Gal pomocí  $\alpha$ 2,3 vazby, k GalNAc pomocí vazby  $\alpha$ 2,6 nebo k oběma cukrům zároveň. Detailní složení cukrů je proměnlivé s převažující formou Gal-GalNAc a jeho mono- či di-sialovanou formou [4, 10-11, 18]. Abnormální *O*-glykany pantové oblasti IgA1 s nepřítomností Gal (Gal-deficientní IgA1), s terminálním GalNAc nebo sialovaným NeuAc-GalNAc, se běžně nacházejí u IgAN a jen zřídka u zdravých jedinců [11].

*O*-glykosylace je komplexní proces, do něž je zapojeno více než 50 glykosyltransferáz. *O*-glykany jsou syntetizovány v Golgiho komplexu, ale nedávné výzkumy odhalily, že aktivace Src proto-onkogenů vede k selektivnímu posunu některých glykosyltransferáz do endoplasmatického retikula [19]. Syntéza Gal-deficientních IgA1 (Gd-IgA1) probíhá pouze v Golgiho komplexu [20]. *O*-glykosylace začíná připojením *N*-acetylgalactosaminu (GalNAc) na serinový (Ser) nebo treoninový (Thr) zbytek proteinového řetězce (**Obrázek 2, 3**), za vzniku Tn antigenu (Tn Ag), pomocí velké rodiny více než dvaceti UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl transferáz (GalNAc-Ts) [21]. Tyto enzymy jsou membránové proteiny typu II s krátkým N-terminálním cytoplasmatickým koncem (4 – 24 aa), transmembránovou kotvou (15 – 25 aa) a C-terminální částí která je lokalizována v lumen Golgiho komplexu. C-terminální část obsahuje katalytickou doménu a specifickou ricinu podobnou lektinovou doménu ( $\geq 450$  aa) [22-23]. Transmembránová kotva určuje lokalizaci glykosyltransferázy v jednotlivých oblastech Golgiho komplexu [24]. Ricin-like lektinová doména na C-terminálním konci je zodpovědná za substrátovou specifitu jednotlivých izoform GalNAc-Ts [25]. Zatím nejsou známy specifické role jednotlivých GalNAc-Ts ani jak tyto enzymy spolupracují, ale jejich výskyt v buňkách určuje místo a vzor *O*-glykanů připojovaných na proteiny [8]. GalNAc-Ts mají různé substrátové specifity, kinetické vlastnosti, tkáňovou distribuci ale některé jejich funkce se překrývají. GalNAc-Ts můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli pro připojení GalNAc vyžadují nebo nevyžadují přítomnost cukru předem připojeného na jiné glykosylační místo akceptorového proteinu [26].

Zahájení *O*-glykosylace pantové oblasti IgA1 bylo donedávna spojováno pouze s aktivitou GalNAc-T2 [26-27]. Pantová oblast IgA1 připomíná sekvenci mucinů a proto může být cílem i jiných GalNAc-Ts, např. GalNAc-T1 nebo -T11, které mohou také *O*-glykosylaci zahájit [25]. Nedávné analýzy ukázaly, že GalNAc-T14 se v IgA1 produkujících buňkách pacientů exprimuje 5x více než v buňkách zdravých kontrol zatímco exprese GalNAc-T2 a dalších GalNAc-T se u pacientů a zdravých kontrol neliší. Zda a do jaké míry se GalNAc-T14

podílí na abnormální glykosylaci IgA1 u IgAN bude nutné dále zkoumat [28]. Spolupráce GalNAc-Ts může být u buněk produkujících IgA1 změněna stimulací prozánětlivých cytokinů v průběhu infekce horních cest dýchacích. Pravděpodobně dochází ke změnám v počtu a místu vazby GalNAc na Ser/Thr pantové oblasti IgA1 u IgAN [1].

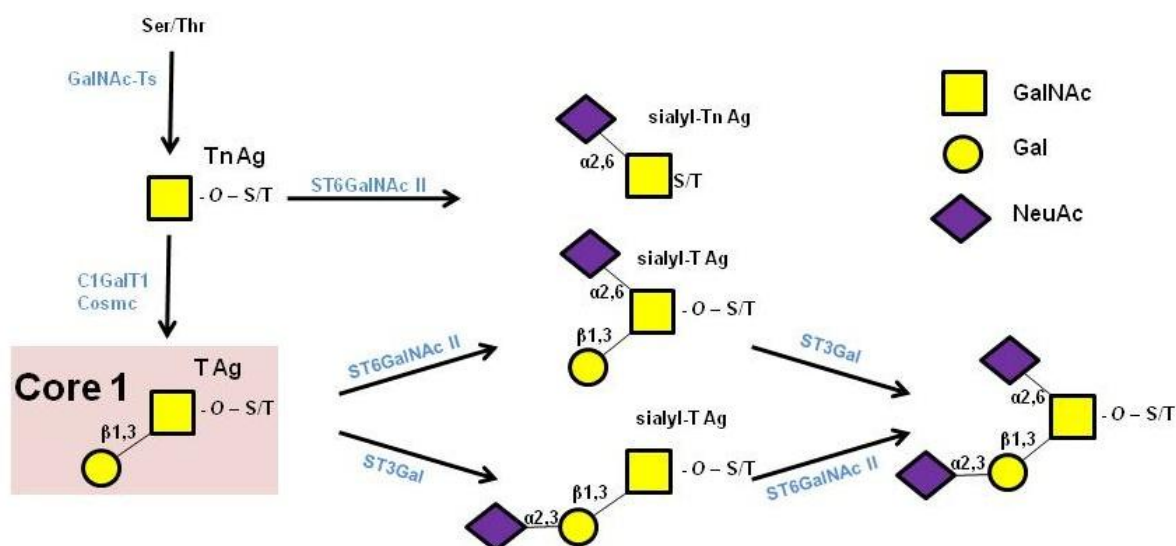
Syntéza *O*-glykanů IgA1 pokračuje připojením Gal na GalNAc za vzniku Core 1 disacharidové struktury, T antigenu (T Ag) (**Obrázek 2, 3**). Prodlužování řetězce je pro buňky specifické, zatímco B lymfocyty vytváří Core 1 struktury tak např. normální prsní epiteliální buňky větvi *O*-glykany až do komplikovanější Core 2 struktury [8]. Připojení Gal katalyzuje jediná Core 1 UDP-Gal:GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr  $\beta$ 1,3-galaktosyltransferáza (C1GalT1) [29]. Nedostatek C1GalT1 vede ke vzniku zkrácených *O*-glykanů [30]. Proteinová stabilita a aktivita C1GalT1 závisí na specifickém chaperonu, Core 1  $\beta$ 3-Gal-T specific molecular chaperone (Cosmc) [31]. U mnoha chorob (Tn syndrom, zhoubné nádory) vede mutace Cosmc k zastavení prodlužování *O*-glykanů (Tn antigen) a vzniku sialylovaného Tn antigenu (STn) [30, 32-33]. Mutace Cosmc nebyla u IgAN pacientů zjištěna ale snížená transkripce byla detekována u klonovaných Gd-IgA1-produkujících buněk [20]. Core 1 struktura IgA1 je, na rozdíl od jiných molekul (např. MUC1), ukončena sialylací [8].

*O*-glykany patové oblasti IgA1 jsou ukončeny připojením NeuAc k Gal nebo GalNAc pomocí některé ze sialyltransferáz. Core 1 struktura je modifikována připojením NeuAc na Gal reakcí katalyzovanou Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferázou (ST3Gal) a/nebo připojením NeuAc na GalNAc pomocí *N*-acetylgalactosaminide  $\alpha$ 2,6-sialyltransferázy (ST6GalNAc) (**Obrázek 2, 3**) [34-35]. Proces připojování NeuAc ke Gal pomocí ST3Gal není u IgA dosud dostatečně zmapován. Naopak real-time PCR (RT-PCR) expresní analýza genů *ST6GalNAc* ukázala, že ST6GalNAc I, enzym účastnící se sialylace Tn Ag, není u IgA1-produkujících buněk exprimován [20]. ST6GalNAc II byla navržena jako kandidát sialylace Tn Ag u IgAN [36], neboť ST6GalNAc II je zvýšeně exprimován plasmatickými buňkami produkujícími aberantně galaktosylované IgA1 izolovanými z periferní krve pacientů s IgAN [20]. Naopak u epiteliálních buněk zvýšená exprese ST6GalNAc II nezpůsobuje vznik sialylovaného Tn Ag [37]. Nedávno publikovaná studie využívající siRNA k potlačení exprese ST6GalNAc II ukázala, že ST6GalNAc II se podílí na sialylaci Tn *O*-glykanů připojených k pantové oblasti IgA1 [38-40].

Princip vzniku Gal-deficientních IgA1 molekul u IgAN pacientů je rozsáhle studován, a ačkoliv byly zaznamenány pokroky k pochopení problému, stále zůstává mnoho nezodpovězených otázek [16, 20, 41]. Při studiu buněčných linií produkujících abnormálně galaktosylované IgA1, které byly izolovány z periferní krve pacientů s IgAN a immortalizovány

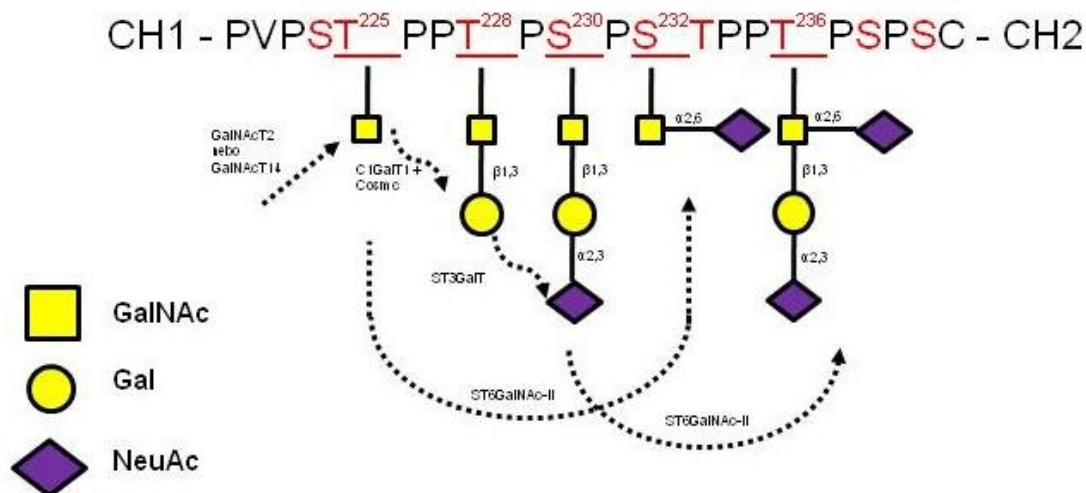
infekcí virem Epstein a Barrové bylo popsáno zvýšené zastoupení *O*-glykanů tvořeným GalNAc bez přítomnosti Gal (Tn antigenů) oproti IgA produkovými stejně připravenými buňkami od zdravých kontrol. Navíc IgAN buňky tvořily převážně polymerní IgA1. Terminální GalNAc je rozpoznáván specifickým lektinem HAA (z *Helix aspersa*) jehož reaktivita s GalNAc je blokována připojením Gal i sialylací GalNAc. Enzymatické odstranění sialové kyseliny vedlo ke zvýšení reaktivity IgA produkovaného buňkami z IgAN pacientů což naznačuje, že GalNAc může být u těchto buněk sialylován a tato sialylace může blokovat připojování Gal, což bylo potvrzeno a nedávno publikováno (**Obrázek 3**) [16, 20, 39-40]. Předčasná sialylace GalNAc je tedy významný etiopatogenetický faktor uplatňující se při tvorbě abnormálně galaktoylovaného IgA1.

Snížené zastoupení Gal v *O*-glykanech pantové oblasti nemůže být vysvětleno pouhými změnami v hladinách uvedených glykosyltransferáz, ale je zřejmě ovlivněno i dalšími faktory jako je abnormální distribuce jednotlivých enzymů v Golgiho komplexu. Snížená exprese genů *C1GalT1* a *Cosmc* spojená se zvýšenou expresí genu *ST6GalNAc II* odpovídají měření enzymových aktivit v buněčných extraktech [20, 31, 40] nicméně tyto studie nepopisovaly možné změny v lokalizaci jednotlivých enzymů. Vzhledem k výše popsané inhibici připojení Gal zapříčiněné předčasnou sialylací GalNAc je možné očekávat, že změna lokalizace zejména *ST6GalNAc II* může vést k předčasně sialylaci a konečně abnormální galaktosylaci IgA [4].



**Obrázek 2:** *O*-glykosylace pantové oblasti těžkého řetězce IgA1. *N*-acetylgalactosaminyl transferázy (GalNAc-Ts): GalNAc-T2 nebo GalNAc-T14 připojují *N*-acetylgalactosamin (GalNAc) na Ser nebo Thr pantové oblasti IgA1. Pomocí Core 1 UDP-Gal:GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr

$\beta$ 1,3-galactosyltransferáza (C1GalT1) se, za vzniku Core 1 struktury (T antigenu), na GalNAc připojuje galaktóza (Gal). Proteinová stabilita C1GalT1 závisí na specifickém chaperonu Cosmc. Syntéza *O*-glykanů je ukončena připojením sialové kyseliny (NeuAc) ke Gal pomocí Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferázou (ST3Gal) nebo GalNAc pomocí  $\alpha$ 2,6-sialyltransferázy II (ST6GalNAc II). Některé *O*-glykany IgA1 pacientů s IgAN jsou ukončeny GalNAc, Tn antigenem (Tn Ag) nebo jeho sialylovanou formou (Sialyl-Tn Ag).



**Obrázek 3:** Různé možnosti *O*-glykosylace IgA1 HR a enzymy zapojené do syntézy *O*-glykanů na IgA1 HR. UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl transferáza (GalNAcT2 nebo GalNAcT14) připojuje GalNAc na Ser/Thr zbytek pantové oblasti IgA1. Core 1 UDP-Gal:GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr  $\beta$ 1,3-galactosyltransferáza (C1GalT1) stabilizovaná Core 1  $\beta$ 3-Gal-T specifickým molekulárním chaperonem (Cosmc) připojuje Gal na GalNAc. Sekvence *O*-glykanů je dokončena připojením NeuAc na Gal pomocí Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferázy (ST3Gal) nebo na GalNAc pomocí  $\alpha$ 2,6-sialyltransferázy II (ST6GalNAc II). U aberantně galaktosylované pantové oblasti IgA1 jsou některé *O*-glykany předčasně ukončeny vazbou NeuAc na GalNAc, vznikají Gal-deficientní IgA1, které mohou být rozpoznány přirozeně se vyskytujícími protilátkami [1-2, 14].

#### 1.1.4 Molekulová různorodost *O*-glykosylace

Díky neustále se rozvíjejícím možnostem hmotnostní spektrometrie se současné studie mohou zaměřit na přesnou charakteristiku *O*-glykanů pantové oblasti IgA1 [42-44]. Různorodost glykosylace spočívá v počtu možných kombinací navázaných GalNAc na potenciální *O*-glykosylační místa HR IgA1 a následné připojení Gal a NeuAc. Heterogenita

*O*-glykosylací IgA1 ovlivňuje jeho odstraňování z cirkulace, odstraňování imunokomplexů, aktivaci komplementu a interakci s bakteriemi [42]. Abnormální glykosylace může, kromě změn v expresi a aktivitě enzymů, být spojena také se změnami v pozicích a struktuře *O*-glykanů připojených k jednotlivým glykosylačním místům HR IgA1 [9-10].

Ke studiu heterogenity glykosylace HR IgA1 se využívají proteázy specifické pro HR IgA1, které štěpí IgA1 na několik překrývajících se fragmentů [9-10, 43]. *O*-glykosylační místa HR IgA1 zdravých jedinců zahrnují Thr<sup>225</sup>, Thr<sup>228</sup>, Ser<sup>230</sup>, Ser<sup>232</sup> a Thr<sup>236</sup>. Thr<sup>225</sup> a Thr<sup>236</sup> nebývají vždy obsazeny [11]. Šestým potvrzeným místem *O*-glykosylace je Thr<sup>233</sup> [9]. Pantová oblast IgA1 obsahuje mono- (GalNAc-O-Ser/Thr) a di-sacharidy (Gal-GalNAc-O-Ser/Thr) a jejich kombinace se liší u zdravých jedinců a pacientů s IgAN. To, na kterou aminokyselinu HR GalNAc-T připojí GalNAc, ovlivňují také již dříve připojené GalNAc a platí to s největší pravděpodobností i pro připojování Gal. Většina HR IgA1 má glykanem obsazen Thr<sup>225</sup>, zatímco Thr<sup>236</sup> bývá často neobsazen [10]. Thr<sup>225</sup>, Thr<sup>228</sup> a Ser<sup>232</sup> jsou nejčastěji obsazeny disacharidem Gal-GalNAc zatímco Ser<sup>230</sup>, Thr<sup>233</sup> a Thr<sup>236</sup> bývají častěji Gal-deficientní nebo nemají žádný *O*-glykan [9]. Detailní analýza, kterou jsme prováděli v předchozích letech, potvrdila, že rekombinantní GalNAc-T2 připojuje GalNAc na všech devět POGS pantové oblasti IgA1 a počet obsazených *O*-glykosylačních míst se zvyšuje s časem. Glykosylační místa se shodují s předpokládanými POGS a GalNAc-T2 připojuje GalNAc v tomto pořadí: první na T<sup>228</sup> a pak na T<sup>236</sup>, následuje S<sup>232</sup>, T<sup>225</sup>, and S<sup>230</sup> a na konec S<sup>238</sup> and S<sup>240</sup> [45-46]. Porovnáním přesných pozic *O*-glykanů pantové oblasti IgA1 zdravých jedinců s přesnými pozicemi Gal-deficientních *O*-glykanů HR patientských IgA1 zřejmě přispěje k objasnění mechanismu rozlišení glykan specifickými protilátkami a vzniku IK [9-10]. U IgA1 zdravých jedinců převažují NeuAc vázané v pozici α2,3, zatímco IgA1 u IgAN pacientů má α2,3 i α2,6 sialylované *O*-glykany [9, 47].

### 1.1.5 Vznik IgA1 imunokomplexů a jejich biologická aktivita

Pro rozvoj IgAN není přítomnost abnormálně galaktosylovaného IgA1 jedinou podmínkou vzniku imunitních komplexů (IK). V případě familiární formy IgAN se přítomnost abnormálně galaktosylovaného IgA1 prokázala nejen u pacientů, ale i u příbuzných bez zřejmých známek onemocnění [41]. Dalším faktorem rozvoje IgAN je přítomnost protilátek reagujících s Gd-IgA1. Protilátky proti Gd-IgA1 se vyskytují u každého jedince ale jejich hladina a afinita není optimální pro tvorbu IK popsanych u IgAN [8]. Protilátky tvořící IK se vyskytují ve větším množství u IgAN pacientů v porovnání se

zdravými jedinci a nejsou přítomny pouze vázané v IK ale také volně v cirkulaci [14-15, 48]. Abnormálně galaktosylované IgA1 tedy představují antigen pro výše uvedené protilátky, které vzhledem k tomu, že reagují s antigenem, který byl v menší míře než u IgAN pacientů, je přítomen i u jedinců bez známek IgAN, můžeme označit jako autoprottilátky. Výše uvedený postup EBV imortalizace lymfocytů izolovaných od pacientů s IgAN umožnil identifikovat buněčné klony produkující IgG rozpoznávající terminální GalNAc na Gd-IgA1. Jestliže byl terminální GalNAc na pantové oblasti IgA1 následně galaktosylován, vazba těchto specifických IgG protilátek byla blokována [15-16]. EBV-imortalizovaných buněk bylo dále využito k sekvenaci variabilních regionů ( $V_H$  a  $V_L$ ) IgG a tyto analýzy odhalily unikátní znak hypervariabilní oblasti 3 (complementarity-determining region 3; CDR3) těžkého řetězce IgA1 od pacientů s IgAN. Na první pozici CDR3 byl u šesti ze sedmi pacientů přítomen Ser místo alaninu (Ala). Pomocí místně specifické mutagenese byl tento Ser opět zaměněn za Ala. U takto změněného rekombinantního IgG nebyla potvrzena schopnost vazby Gd-IgA. Výsledky potvrdily, že Ser ve třetí pozici na CDR3 je nutný pro vazbu specifických protilátek na abnormálně galaktosylované IgA1 [15]. Vznik těchto protilátek může být vyvolán infekcí horních cest dýchacích a u geneticky náchylného organismu mohou zkříženě reagovat s Gal-deficientními IgA1. Hladiny těchto protilátek jsou dále zvýšeny opakující se infekcí horních cest dýchacích. Tento proces pak vede ke vzniku nefritogenních imunitních komplexů [16].

Cirkulující IK, složené z Gd-IgA1 a IgG nebo IgA1 autoprottilátek spolu s C3 složkou komplementu, se ukládají v glomerulárním mesangiu [1-3, 14] a zřejmě stimulují proliferaci mesangiálních buněk, jak bylo potvrzeno v *in vitro* experimentu. Proliferační aktivita CIK závisí na molekulové velikosti CIK. Pouze vysokomolekulární frakce CIK (800 – 900 kDa) působí jako stimulant proliferace zatímco menší CIK (700 – 800 kDa) a volné IgA1 proliferaci tlumí [12-13, 49-50]. CIK izolované ze sér IgAN pacientů v průběhu epizody makroskopické hematurie stimulují buněčnou proliferaci mnohem více, než CIK získané během pozdější klidové fáze onemocnění [13]. Otázkou stále zůstává, proč právě mezangium ledvin je cílem ukládání nefritogenních IK. Jedním z faktorů je již zmiňovaná velikost IK ( $\geq 800$  kDa), která omezuje účinnost přirozené eliminace játry a druhým faktorem je snížená schopnost vazby na hepatocytární receptor pro terminální GalNAc (receptor pro nesialylované glykoproteiny, ASGP-R), který umožňuje transport CIK do hepatocytů k jejich katabolizaci [49].

Aktivované mezangiální buňky proliferují a produkují zvýšeně proteiny zapojené do tvorby extracelulární matrix, a dále produkují cytokiny a chemokiny. Tyto procesy mohou způsobit expanzi mesangia glomerulů, fibrózu a ztrátu glomerulárních funkcí [1].



### 1.1.6 IgA receptory

Otázka, jakým mechanismem patologické nefritogenní IK spouštějí aktivaci a proliferaci mesangiálních buněk, vedla ke snaze identifikovat buněčný receptor [4, 18]. Tento receptor se liší od známých IgA receptorů: poly-IgR, ASGP-R, Fc $\alpha$ R (CD89) a Fc  $\alpha/\mu$  receptor [13, 51] neboť žádný z uvedených není exprimován dostatečně intenzivně na mesangiálních buňkách. Naopak zde byla popsána přítomnost transferinového receptoru (CD71), který váže pIgA1 a IgA1 imunokomplexy. V *in vitro* experimentu bylo prokázáno, že vazba IK obsahujících IgA1 na CD71 receptor indukuje proliferaci mesangiálních buněk a vede zpětnovazebně ke zvýšení exprese CD71. Nicméně nebylo dostatečně objasněno, zda je CD71 jediným receptorem zapojeným do vazby IgA1 obsahujících IK na mezangiální buňky nebo spolupracuje ještě s jiným, dosud nepopsaným receptorem [52-53].

### 1.1.7 Výhledy terapie IgAN

V současnosti je léčba IgAN založena na obecných opatřeních směřujících ke zpomalení úbytku ledvinové funkce. Krevní tlak se normalizuje za použití ACE inhibitorů nebo blokátorů receptoru pro angiotensin II a nověji antagonistů reninu. Dále se snižuje příjem bílkovin úměrně k snížené funkci ledvin a u nejzávažnějších forem se používá imunosupresivní léčba glukokortikoidy [1, 4]. V současnosti není kauzální léčba dostupná, ale z výše uvedených mechanismů patogeneze IgAN je možné doufat, že budoucí terapie bude schopna selektivně zasáhnout do tvorby, plasmatické hladiny nebo nefritogenicity IgA1 IK.

Tvorbu nefrotogenních, velkých CIK lze ovlivnit jak na straně antigenu (Gd-IgA1), tak na straně autoprotilátky (IgG nebo IgA1) narušením molárního poměru obou komponent například vhodnými kompetitory, neboť nízkomolekulární IgA1 IK, volné pIgA1 a samostatné protilátky reagující s *O*-glykany pantové oblasti IgA1 nevykazují nefritogenní aktivitu [12-13, 49]. Jednou z možností je připravit krátké glykopeptidy strukturně podobné pantové oblasti IgA1 s připojenými *O*-glykany nesoucí jedinou antigenní determinantu. Tyto nízkomolekulární antigeny by mohly přispět k vyvázání Gd-IgA1 specifických autoprotilátek a tím zabránit vzniku vysokomolekulárních IK. Druhou možností je připravit různé monovalentní fragmenty autoprotilátek IgG nebo IgA1 a od nich odvozené Fab nebo Fv polypeptidy, vážící se na glykopeptidy pantové oblasti s abnormálními *O*-glykany [1, 4]. Oba přístupy je nutné nejprve otestovat *in vitro*, kde mohou tkáňové kultury mesangiálních buněk sloužit jako modelový indikátor aktivity vzniklých IK [13].

Dalším směrem, kam může kauzální terapie směřovat, je testování nízkomolekulárních látek jako specifických inhibitorů aktivity a proliferace mesangiálních buněk.

## 1.2 Bakulovirový expresní systém

Bakulovirový expresní systém (BES) poskytuje rychlou a účinnou metodu pro tvorbu rekombinantních proteinů posttranslačně modifikovaných podobně jako přirozeně savčí proteiny. BES má výhody eukaryontních, tak částečně i prokaryontních expresních systémů. Tkáňové kultury hmyzích buněk můry *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) nebo *Trichoplusia ni* (Píďalka zelená) jsou při jejich biotechnologickém využití infikovány rekombinantním bakulovirem s cílem získat virem kódovaný rekombinantní protein (**Obrázek 4**). BES je velmi výkonný expresní systém s vysokou výtěžností rekombinantních proteinů, nepřítomností endotoxinu, s posttranslační modifikací, jako jsou glykosylace, kyselá acylace nebo fosforylace, podobnou savčím buňkám. Další nespornou výhodou je efektivní sekrece proteinů a možnost kultivovat hmyzí buňky ve velkých objemech v bezsérových médiích usnadňujících purifikaci sekretovaných rekombinantních proteinů. Nevýhodami tohoto systému je časová náročnost přípravy rekombinantního bakuloviru (několikafázová příprava, nutnost titrovat bakulovirus, plakový esej). Kultivace hmyzích buněk vyžaduje pravidelnou péči. V neposlední řadě je pro experimentální laboratoř zavedení bakulovirového expresního systému finančně náročná záležitost [54-55].



**Obrázek 4:** Hmyzí buňky Sf9, larva a můra *Spodoptera frugiperda*.

BES využívá vnesení cizího genu, za vzniku rekombinantního bakuloviru, do neesenčních regionů virového genomu *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis viru (AcMNPV) nebo *Bombyx mori* silkworm nuclear polyhedrosis virus (BmNPV), hmyzích dvouvláknových DNA virů. Bakuloviry jsou hmyzí patogeny, které v přírodě regulují hmyzí populaci. Typická vlastnost bakulovirů, vysoká úroveň velmi pozdní

genové exprese, je čini vhodným vektor pro *in vitro* expresi cizích genů v tkáňové kultuře larvárních buněk [56].

Bakuloviry jsou velké DNA viry tyčkovitého tvaru, které se replikují v jádru infikované hmyzí buňky. Virový dvouvláknový kruhový genom velký 80 – 180 kbp v závislosti na druhu viru kóduje proteiny zajišťující důležité procesy jako je DNA replikace a genová exprese, strukturní uspořádání virionu, jeho kompletace a vstup do střevních buněk v primární infekci hostitele [56-57].

Bakulovirová genová exprese probíhá ve čtyřech fázích:

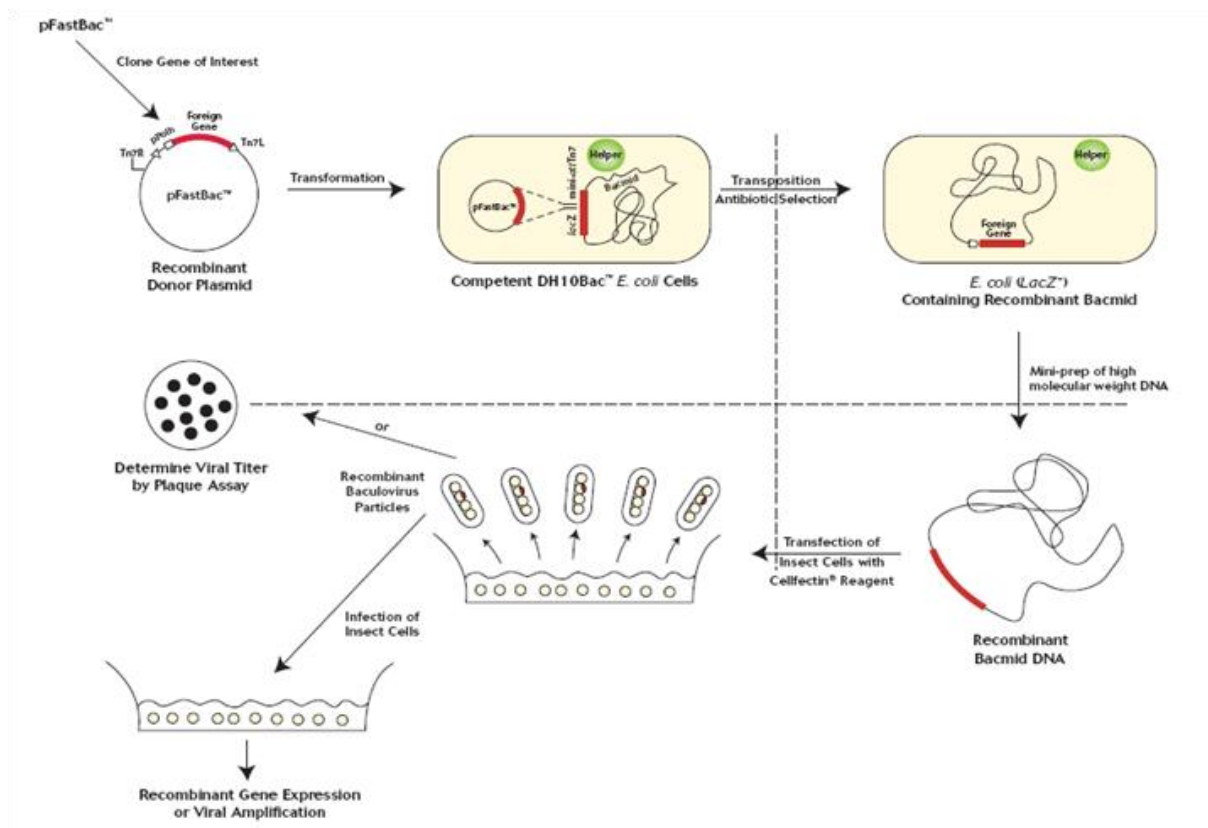
- 1) okamžitá časná infekce – hostitelská RNA polymeráza II přepisuje okamžité časné geny, které aktivují geny opožděné a pozdní infekce
- 2) opožděná časná infekce – jsou přepisovány geny kódující proteiny důležité pro DNA replikaci, pozdní genovou expresi, proteiny chránící před obrannými mechanismy hostitele
- 3) pozdní infekce – tvoří se proteiny potřebné pro pučení viru (nukleokapsida a virové obalové proteiny)
- 4) velmi pozdní infekce – viriony jsou obalovány a vznikají proteiny nutné pro vznik okluzních tělísek (polyhedrin a 10kDa protein P10) [58].

### 1.2.1 Biotechnologické a laboratorní využití bakulovirového expresního systému

BES je široce používán ve výzkumu a průmyslu pro produkci velkých objemů vhodně posttranslačně modifikovaných, biologicky aktivních a funkčních rekombinantních proteinů. Posttranslační modifikací je myšleno správné skládání proteinu, stabilizace struktury disulfidickými můstky, oligomerizace, glykosylace, acylace, proteolytické štěpení. BES je vhodný a všestranný eukaryotický systém pro expresi rekombinantních proteinů.

Bakuloviry mají relativně velký genom, a proto vložení cizího genu přímým klonováním není možné. Proteiny velmi pozdní infekce (polyhedrin a P10) nejsou nutné pro produkci bakulovirů schopných infekce a jejich promotory se využívají pro produkci rekombinantních proteinů. Klasickou cestou vytvoření rekombinantních bakulovirů je homologní rekombinace mezi virovým genomem a nosným vektorem nesoucím cizí gen pod kontrolou *polh* nebo *p10* promotoru. Cizí expresní kazeta je ohraničena po obou stranách pomocí bakulovirového genomového fragmentu lokusu promotorů *polh* nebo *p10*. Originální metoda byla zlepšena linearizací bakulovirové DNA, která zvýšila výtěžnost rekombinantních bakulovirů. Velkým krokem vpřed bylo vytvoření umělého BACMIDU, bakteriálního

chromosomu obsahující genom bakuloviru AcMNPV, umožňující manipulaci virového genomu v buňkách *E. coli* (DH10β-strain). Cizí gen klonovaný do nosného vektoru mezi expresní kazetu obklopenou Tn7 přesmykovým elementem je vnesen do bacmidu pomocí místně specifického přesmyku nosného vektoru do místa cílového Tn7. Jakmile je vytvořen rekombinantní vysokomolekulární bacmid, přítomnost insertu je ověřena PCR, a bacmid je použit pro transfekci hmyzích buněk, které následně začnou tvořit rekombinantní bakuloviry a jimi kódované rekombinantní proteiny (**Obrázek 5**) [59-60].



**Obrázek 5:** Bac-to-Bac expresní systém. Bakulovirový systém je založen na rekombinaci bakmidového vektoru s pomocným (shuttle) vektorem nesoucím cílový gen. Takto vzniklý rekombinantní bakulovirus může být produkován v kultuře hmyzích buněk (Sf9, Sf21, Mimic Sf9). Produkce rekombinantního proteinu je dosaženo infekcí hmyzích buněk bakulovirem nesoucím gen kódující rekombinantní protein. Příprava bakuloviru začíná klonováním cílového genu do pFastBac vektoru, transformací DH10Bac *E. coli* za vzniku bakmidové DNA pokračuje transfekcí hmyzích buněk Sf9 a končí produkcí rekombinantních bakulovirů. Takto namnožený bakulovirus je využit k následné infekci Sf9 buněk s cílem izolovat produkováný rekombinantní protein. Zdrojem obrázku je manuál protokolů Bac-to-Bac expression system (Invitrogen) [59].

## 2 Cíle disertační práce

Disertační práce je zaměřena na studium mechanismů vzniku abnormálně galaktosylovaného pIgA1, tvorby a vlastností CIK a z toho vyplývajících možností budoucí terapie.

Cílem této disertační práce bylo:

1. Seznámit se s metodami molekulární biologie (manipulace s RNA, cDNA a plasmidy), izolovat sekvence cDNA glykosyltransferáz a klonovat je do expresních plasmidů.
2. Připravit plasmidy umožňující expresi jednotlivých glykosyltransferáz v nativní podobě v savčích buňkách.
3. Připravit sekretované formy glykosyltransferáz rekombinantní technologií.
4. Připravit rekombinantní DNA vakcíny kódující glykosyltransferázy a tyto použít k imunizaci experimentálních myší s cílem připravit specifické protilátky.
5. Stanovit aktivitu jednotlivých rekombinantních glykosyltransferáz a využít jednotlivé glykosyltransferázy k přípravě *in-vitro* modelu *O*-glykosylace pantové oblasti IgA1
6. Lokalizovat glykosyltransferázy v Golgiho komplexu pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie.

### 3 Materiál a metody

- Kultivace buněčné kultury hmyzích Sf9 buněk.
- Kultivace buněčných kultur savčích HEK 293T a HEK FreeStyle 293-F buněk.
- Izolace cDNA glykosyltransferáz (izolace celkové RNA → mRNA → reverzní transkripce do cDNA → PCR).
- Příprava savčích expresních vektorů kódujících jednotlivé glykosyltransferázy (GT) v nativní formě (včetně transmembránové domény).
- Sestavení expresních vektorů a rekombinantních bakulovirů umožňujících expresi sekretovaných forem glykosyltransferáz v bakulovirovém expresním systému:
  1. klonování syntetického oligonukleotidu kódujícího sekreční signál odvozený od myšního Ig  $\kappa$  do pFastBac vektorů s cílem připravit akceptorový shuttle plasmid umožňující přípravu sekretovaných forem glykosyltransferáz (Ig $\kappa$ -pFastBac),
  2. klonování cDNA lidských glykosyltransferáz bez transmembránových domén (TM) do Ig $\kappa$ -pFastBac vektoru,
  3. příprava rekombinantních bacmidů.
- Produkce rekombinantních sekretovaných glykosyltransferáz v bakulovirovém expresním systému:
  1. množení rekombinantních bakulovirů,
  2. exprese sekretovaných glykosyltransferáz,
  3. izolace rekombinantních proteinů,
  4. analýza rekombinantních proteinů.
- Klonování a produkce sekretovaných forem glykosyltransferáz v savčím expresním systému s využitím vektoru pcDNA3.1-V5/His.
- Imunizace pokusných myší jednotlivými DNA vakcínami a rekombinantními proteiny, sledování imunologických parametrů, izolace slezin.
- Příprava monoklonálních protilátek.
- Fluorescenčně mikroskopická lokalizace jednotlivých glykosyltransferáz v Golgiho komplexu pomocí specifických protilátek.

Všechny chemikálie, pokud není jinak určeno, byly od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); média pro tkáňové kultury byla od Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primery byly syntetizovány a rekombinantní vektory sekvenovány u komerčního dodavatele Generi Biotech (Hradec Králové, ČR).

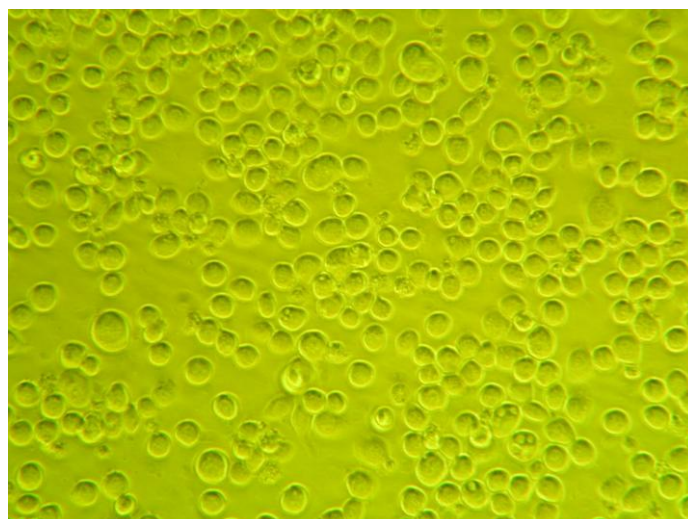
V dalším textu budeme označovat cDNA a v názvech rekombinantních vektorů pro zjednodušení používat zkratky glykosyltransferáz: GalNAc-T2 (T2), GalNAc-T14 (T14), C1GalT1 (C1T1), Cosmc (C1T2), ST6GalNAc I (ST6I) a ST6GalNAc II (ST6II).

### 3.1 Buněčné kultury

Buněčné kultury hmyzích buněk Sf9, savčích buněk HEK 293T (293T) a FreeStyle 293-F (293F) byly skladovány v tekutém dusíku. Před zahájením kultivace byly buňky rozmrazeny ve vodní lázni na 37°C a přeneseny do kultivačních nádob s kultivačním médiem.

#### 3.1.1 Hmyzí buňky Sf9

Sf9 buňky byly kultivovány jako adherentní nebo suspenzní v bez-sérovém médiu Sf900II SFM v inkubátoru při 28°C ± 0,5°C. Adherentní buňky byly pasážovány vždy, když dosáhly více jak 80% porostu kultivační plochy a byly ředěny na 2 až 5.10<sup>4</sup> živých buněk/ml (**Obrázek 6**). Pomocí postupného zrychlování až na otáčení 125 – 150 rpm, byly adherentní Sf9 buňky v průběhu několika dní (3 až 7 dní) adaptovány na suspenzní kulturu. Suspenzní buňky byly pasážovány na množství 3 – 5.10<sup>5</sup> živých buněk/ml vždy, když dosáhly množství více jak 2.10<sup>6</sup> živých buněk/ml.



**Obrázek 6:** Adherentní buňky Sf9.

### 3.1.2 Savčí buňky HEK 293T a FreeStyle 293-F

Savčí buňky 293T byly kultivovány v médiu RPMI1640 s 10% FBS a 1% Penicilin-Streptomycin (PenStrep) ve vlhčeném inkubátoru při  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  a 5%CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány vždy, když dosáhly více jak 80% porostu kultivační plochy a při pasáži byly ředěny na 2 až  $5 \cdot 10^4$  živých buněk/ml.

Savčí buňky 293F byly kultivovány v bez-sérovém médiu 293FreeStyle Expression medium na orbitálním shakeru za stálého míchání 135 rpm ve vlhčeném inkubátoru při  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  a 8% CO<sub>2</sub> [61]. Buňky byly pasážovány na množství 1 -  $2 \cdot 10^5$  živých buněk/ml vždy, když dosáhly množství  $1 \cdot 10^6$  -  $3 \cdot 10^6$  živých buněk/ml.

## 3.2 Izolace cDNA glykosyltransferáz (izolace celkové RNA → mRNA → reverzní transkripce do cDNA → PCR)

Celková RNA jednotlivých glykosyltransferáz byla izolována z kultur savčích buněk kontinuálně kultivovaných v RPMI1640 s 10% FBS a 1% PenStrep ve vlhčeném inkubátoru  $37^{\circ}\text{C}$  a 5% CO<sub>2</sub> (**Tabulka 1**). Z  $1 \cdot 10^7$  buněk bylo podle návodu izolováno maximálně 30 μg celkové RNA pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Pro následnou izolaci mRNA byl využit kit Oligotex mRNA Kit (Qiagen). cDNA byla získána reverzní transkripcí mRNA pomocí SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

**Tabulka 1:** Kultury savčích buněk pro izolaci celkové RNA.

| GT            | Buňky | Popis buněk                                  |
|---------------|-------|--|
| T2, T14, C1T2 | U937  | lidské monocytární buňky                     |
| C1T1          | HepG2 | buňky lidského hepatocelulárního karcinomu   |
| ST6I, ST6II   | HT29  | buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu |

### 3.2.1 Klonování vektorů kódujících celkovou délku jednotlivých glykosyltransferáz

cDNA kódující celkovou délku jednotlivých glykosyltransferáz byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery navrženými dle sekvencí získaných v databázi GenBank (NCBI) v programu Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) (**Tabulka 2**). Pro přímé klonování využívá plasmid pcDNA3.1D-V5/His-TOPO (Invitrogen) přesahující sekvenci GTGG komplementární k CACCATGG (Kozakova sekvence) na začátku klonovaného insertu. PCR amplifikace byla provedena za předem optimalizovaných podmínek uvedených v **Tabulce 3** a **4** pomocí Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). Produkty PCR reakcí byly separovány na 1% agarózovém gelu bez EtBr, proužky odpovídající molekulové hmotnosti jednotlivých glykosyltransferáz byly



vyříznuty, DNA byla izolována pomocí QIAEX II suspenze (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen), eluována do TE pufru a purifikované PCR produkty byly ligovány do savčího expresního vektoru pcDNA3.1D-V5/His-TOPO. TOP10 *E. coli* byly transformovány rekombinantními vektory TM-T2-pcDNA3.1-V5/His, TM-T14-pcDNA3.1-V5/His, TM-C1T1-pcDNA3.1-V5/His, TM-C1T2-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6I-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6II-pcDNA3.1-V5/His a separovány pod selekčním tlakem 100 µg/ml ampicilinu (SERVA). Z transformovaných bakterií byla izolována plasmidová DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) a analyzována pomocí restrikčních enzymů (New England Biolab, Inc.). Podle restrikční analýzy byly vybrány rekombinantní vektory pro další experimenty. Sekvence rekombinantních vektorů (**Obrázek 7**) byly porovnány se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí programu MACAW (NCBI) a jejich otevřený čtecí rámec byl kontrolován pomocí programu ORF finder (NCBI). Pro transfekci HEK 293T buněk byla plasmidová DNA izolována pomocí Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Pro vakcinaci byla plasmidová DNA izolována pomocí Endo-Free Plasmid Mega Kit (Qiagen). Plasmidová DNA byla ředěna na koncentraci 1 µg/µl v ddH<sub>2</sub>O a uchovávána na -20°C.

**Tabulka 2:** Sekvence primerů pro PCR amplifikaci inzertů cDNA kódujících celkovou délku glykosyltransferáz do pcDNA3.1D-V5/His-TOPO.

| GT    | Název primeru        | Sekvence                                 | Velikost PCR produktu (bp) | Optimální teplota (°C) |
|-------|----------------------|--|----------------------------|------------------------|
| T2    | TM-T2-d*             | 5'- CACC ATG CGG CGG CGCT C - 3'         | 1720                       | 63                     |
|       | TM-T2-u <sup>+</sup> | 5'- C TGC TGC AGG TTG AGC GTG - 3'       |                            |                        |
| T14   | TM-T14-d             | 5'- CACC ATG CGG CGC CTG ACT C - 3'      | 1660                       | 58                     |
|       | TM-T14-u             | 5'- AG AGC TCA CCA TGT CCC AGT - 3'      |                            |                        |
| C1T1  | TM-C1T1-d            | 5'- CACC ATG GCC TCT AAA TCC TGG C - 3'  | 1092                       | 55                     |
|       | TM-C1T1-u            | 5'- AG GAT TTC CTA ACT TCA CTT TTG - 3'  |                            |                        |
| C1T2  | TM-C1T1-d            | 5'- CACC ATG CTT TCT GAA AGC AGC T - 3'  | 957                        | 55                     |
|       | TM-C1T1-u            | 5'- GTC ATT GTC AGA ACC ATT TGG - 3'     |                            |                        |
| ST6I  | TM-I-d               | 5'- CACC ATG AGG TCC TGC CTG TGG AG - 3' | 1803                       | 62                     |
|       | TM-I-u               | 5'- GT TCT TGG CTT TGG CAG TTC - 3'      |                            |                        |
| ST6II | TM-II-d              | 5'-CACC ATG GGG CTC CCG CGC GGG T- 3'    | 1117                       | 62                     |
|       | TM-II-u              | 5'- G CGC TGG TAC AGC TGA AGG- 3'        |                            |                        |

\* dopředný primer (forward primer, downstream primer)

<sup>+</sup> zpětný primer (reverse primer, upstream primer)

**Tabulka 3:** Složení reakční směsi PCR amplifikace pomocí Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.

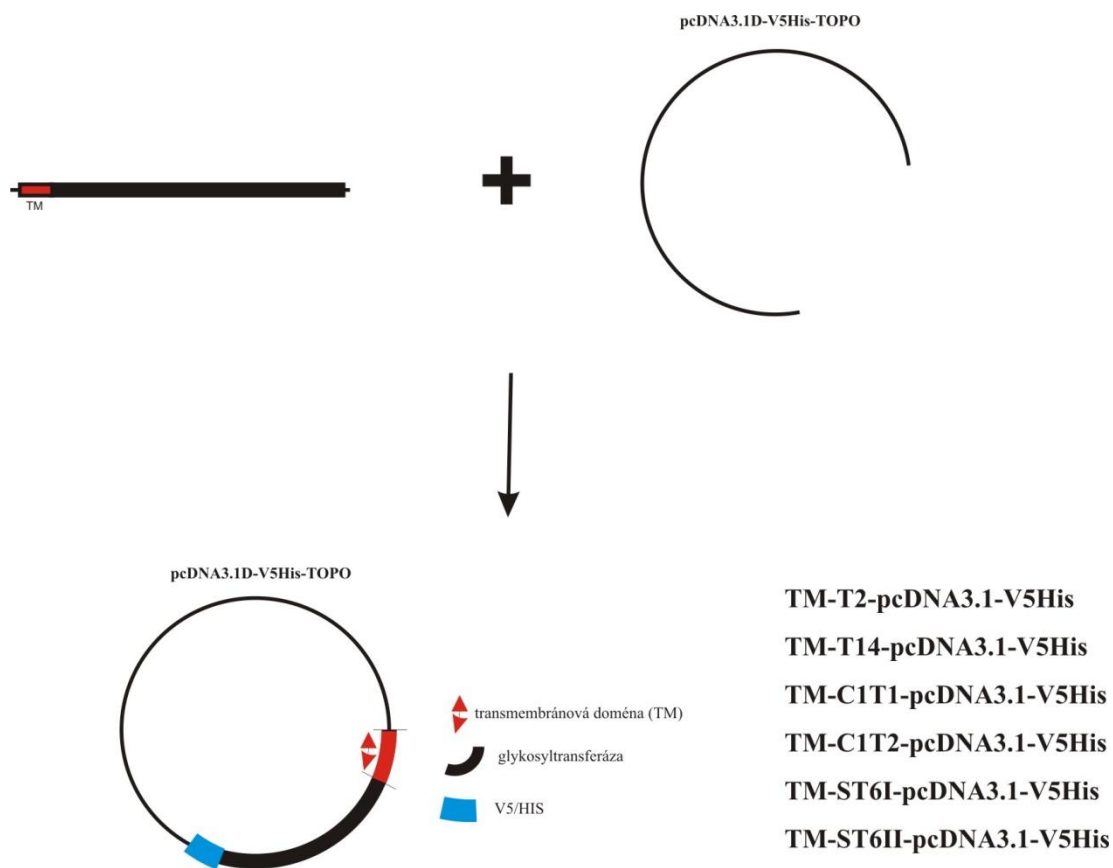
| Reagencie              | Objem na reakci (μl) | Finální koncentrace |
|------------------------|----------------------|---------------------|
| 5x Phusion HF buffer   | 10                   | 1x                  |
| 10 mM dNTPs            | 1                    | 200 μM každý        |
| 10 μM Primer d         | 2,5                  | 0,5 μM              |
| 10 μM Primer u         | 2,5                  | 0,5 μM              |
| DNA                    | ξ                    |                     |
| Phusion DNA Polymerase | 0,5                  | 0,02 U/ μl          |
| ddH <sub>2</sub> O     | doplnit do 50 μl     |                     |

ξ Množství DNA se lišilo dle jednotlivých glykosyltransferáz.

**Tabulka 4:** Podmínky PCR reakce.

| Opakování cyklů | Krok                          | Teplota (°C)   | Čas (min:s) |
|-----------------|-------------------------------|----------------|-------------|
| 1x              | denaturace                    | 98             | 00:30       |
| 30x             | denaturace                    | 98             | 00:10       |
|                 | nasedání primerů              | x <sup>a</sup> | 00:30       |
|                 | prodlužování sekvence         | 72             | 00:30       |
| 1x              | konečné prodlužování sekvence | 72             | 10 min      |

<sup>a</sup> Teplota nasedání primerů se liší u jednotlivých glykosyltransferáz a je uvedena v Tabulce 2.



**Obrázek 7:** Konstrukce vektorů TM-T2-pcDNA3.1-V5/His, TM-T14-pcDNA3.1-V5/His, TM-C1T1-pcDNA3.1-V5/His, TM-C1T2-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6I-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6II-pcDNA3.1-V5/His.

### 3.3 Konstrukce vektorů kódujících sekreční formy glykosyltransferáz

#### 3.3.1 Příprava vektorů pro Bakulovirový expresní systém

Do vektoru pFastBac HT byla klonována signalizační sekvence lehkého řetězce myšího imunoglobulinu kappa (Igκ). Syntetický oligonukleotid odvozený z prvních 21 aminokyselin (AMK) myšího Igκ byl klonován pomocí RsrII klonovacího místa před His tag značku [27]. cDNA jednotlivých glykosyltransferáz zkrácené o transmembránovou doménu byly klonovány do takto modifikovaného vektoru, označeného Igκ-pFastBac (**Tabulka 5**). cDNA kódující jednotlivé glykosyltransferázy byly amplifikovány jako v kapitole 3.2.1 (**Tabulka 6**). PCR produkty byly ligovány do Igκ-pFastBac pomocí restričních míst (**Tabulka 5**) a další postup viz kapitola 3.2.1. Buňky DH 10 Bac *E. coli* byly transformovány rekombinantními vektory Igκ-T2-pFastBac, Igκ-T14-pFastBac, Igκ-C1T1-pFastBac, Igκ-C1T2-pFastBac, Igκ-ST6I-pFastBac a Igκ-ST6II-pFastBac a selektovány na LB agaru s 50 µg/ml kanamycinu 7 µg/ml gentamicinu a 10 µg/ml tetracyklinu (SERVA), 100 µg/ml X-gal (Invitrogen) a 40 µg/ml IPTG (SERVA). Pozitivní klony s rekombinantním bacmidem rostly jako bílé kolonie, na rozdíl od negativních klonů, které rostly jako modré kolonie. Z pozitivně transformovaných bakterií byla izolována bacmidová DNA dle návodu [59] a analyzována pomocí PCR s Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity s primery M13 Forward (M13F) a M13reverse (M13R) v kombinaci s primery nasedajícími uvnitř klonované sekvence glykosyltransferáz (**Tabulky 7 - 10**). Rekombinantní bacmidy (**Obrázek 8**) byly izolovány pomocí Large-Construct Kit (Qiagen), ředěny na koncentraci 1 µg/µl v ddH<sub>2</sub>O a uchovávány při + 4°C.

**Tabulka 5:** Sekvence glykosyltransferáz z GenBank (NCBI).

| GT    | GenBank číslo | AMK sekvence bez TM | restriční místa pro klonování |
|-------|---------------|---------------------|-------------------------------|
| T2    | NP_004472     | 52 – 571            | EcoRI, XhoI                   |
| T14   | NP_078848     | 39 - 552            | EcoRI, XhoI                   |
| C1T1  | NP_064541     | 33 - 363            | BamHI, SalI                   |
| C1T2  | NP_689905     | 44 - 318            | EcoRI                         |
| ST6I  | NP_060884     | 44 - 600            | SalI, NotI                    |
| ST6II | NP_006456     | 31 - 374            | SalI, NotI                    |

**Tabulka 6:** Sekvence primerů pro PCR amplifikaci inzertů cDNA glykosyltransferáz bez TM do pFastBac HT vektorů.

| GT    | Název primeru     | Sekvence                             | Velikost PCR produktu (bp) | Optimální teplota (°C) |
|-------|-------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| T2    | T2-d*             | 5'- AAA AAG AAA GAC CTT CAT CAC - 3' | 1563                       | 59                     |
|       | T2-u <sup>+</sup> | 5'- C TAC TGC TGC AGG TTG AGC - 3'   |                            |                        |
| T14   | T14-d             | 5'- GTG CAG ACC CCT AAG CCT TC- 3'   | 1542                       | 60                     |
|       | T14-u             | 5'- AGA GCT CAC CAT GTC CCA GT- 3'   |                            |                        |
| C1T1  | C1T1-d            | 5'-GAAAAGGTTGACACCCAGCCTA - 3'       | 1280                       | 56                     |
|       | C1T1-u            | 5'-TCAAGGATTCCTAACTTCACTT - 3'       |                            |                        |
| C1T2  | C1T1-d            | 5'-AGGATTGGTCATGGAAATAGAATGCAC - 3'  | 1120                       | 60                     |
|       | C1T1-u            | 5'-TCAGTCATTGTCAGAACCATTG - 3'       |                            |                        |
| ST6I  | I-d               | 5'-CCT CAA ACA AAG CCT TCC AG - 3'   | 1702                       | 59                     |
|       | I-u               | 5'-CTG GCC CCG GTC AGT TCT - 3'      |                            |                        |
| ST6II | II-d              | 5'- GTG CAG CGG TAC CCG GGG CCA - 3' | 1050                       | 60                     |
|       | II-u              | 5'- CG CTG GTA CAG CTG ACG GAT - 3'  |                            |                        |

\* dopředný primer (forward primer, downstream primer)

<sup>+</sup> zpětný primer (reverse primer, upstream primer)

**Tabulka 7:** Primery pro ověření přítomnosti insertu v rekombinantním bacmidu.

| Název primeru         | Sekvence                                   |
|-----------------------|--|
| M13 Forward (M13F)    | 5'- CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG- 3'     |
| M13 Reverse (M13R)    | 5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG- 3'     |
| bac-T2-d*             | 5'- CTA CTG CTG CAG GTT GAG C - 3'         |
| bac-T2-u <sup>+</sup> | 5'- CAC CAA AAA GAA AGA CCT TCA TAC C - 3' |
| bac-T14-d             | 5'- CAC CGA GAG GAA GCG GCA AAG G - 3'     |
| bac-T14-u             | 5'- AGA GCT CAC CAT GTC CCA GT - 3'        |
| bac-C1T1-d            | 5'- CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT C -3'      |
| bac-C1T1-u            | 5'- AGG ATT TCC TAA CTT CAC TTT TG - 3'    |
| bac-C1T1-d            | 5'- CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT C -3'      |
| bac-C1T1-u            | 5'- GTC ATT GTC AGA ACC ATT TGG - 3'       |
| bac-I-d               | 5'- CAC CAA GCC TTC CAG GCA TCA ACG - 3'   |
| bac-I-u               | 5'- TCA GTT CTT GGC TTT GGC AGT T - 3'     |
| bac-II-d              | 5'- CAC CTT CTT CTG GCT GCT GCT CCT- 3'    |
| bac-II-u              | 5'- CGC TGG TAC AGC TGA AGG AT - 3'        |

\* dopředný primer (forward primer, downstream primer)

<sup>+</sup> zpětný primer (reverse primer, upstream primer)

**Tabulka 8:** Analýza rekombinantních bacmidů pomocí PCR.

| Kombinace primerů            | GT                         | Velikost PCR produktu (bp) | Optimální teplota (°C) |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| M13F + M13R                  | T2                         | 3993                       | 55                     |
|                              | T14                        | 4109                       | 55                     |
|                              | C1T1                       | 3740                       | 55                     |
|                              | C1T2                       | 3330                       | 55                     |
|                              | ST6I                       | 3996                       | 55                     |
|                              | ST6II                      | 3530                       | 55                     |
| Kombinace primerů            | Velikost PCR produktu (bp) |                            | Optimální teplota (°C) |
| bac-T2-d* + M13R             | 2106                       |                            | 56                     |
| M13F + bac-T2-u <sup>+</sup> | 3401                       |                            | 56                     |
| bac-T14-d + M13R             | 2276                       |                            | 55                     |
| M13F + bac-T14-u             | 3414                       |                            | 55                     |
| bac-C1T1-d + M13R            | 1737                       |                            | 58                     |
| M13F + bac-C1T1-u            | 2822                       |                            | 58                     |
| bac-C1T1-d + M13R            | 1200                       |                            | 60                     |
| M13F + bac-C1T1-u            | 1684                       |                            | 60                     |
| bac-I-d + M13R               | 2280                       |                            | 55                     |
| M13F + bac-I-u               | 3418                       |                            | 55                     |
| bac-II-d + M13R              | 1697                       |                            | 57                     |
| M13F + bac-II-u              | 2938                       |                            | 57                     |

\* dopředný primer (forward primer, downstream primer)

<sup>+</sup> zpětný primer (reverse primer, upstream primer)

**Tabulka 9:** Složení reakční směsi PCR amplifikace pomocí Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity.

| Reagencie                    | Objem na reakci (μl) | Finální koncentrace |
|------------------------------|----------------------|---------------------|
| 10x High Fidelity PCR buffer | 1,5                  | 1x                  |
| 10 mM dNTPs                  | 0,3                  | 200 μM každý        |
| 50 mM MgSO <sub>4</sub>      | 0,6                  | 2 mM                |
| 10 μM Primer d               | 0,3                  | 0,2 μM              |
| 10 μM Primer u               | 0,3                  | 0,2 μM              |
| DNA                          | 0,15                 |                     |
| Platinum Taq DNA polymerase  | 0,2                  | 1 U                 |
| ddH <sub>2</sub> O           | doplnit do 15 μl     |                     |

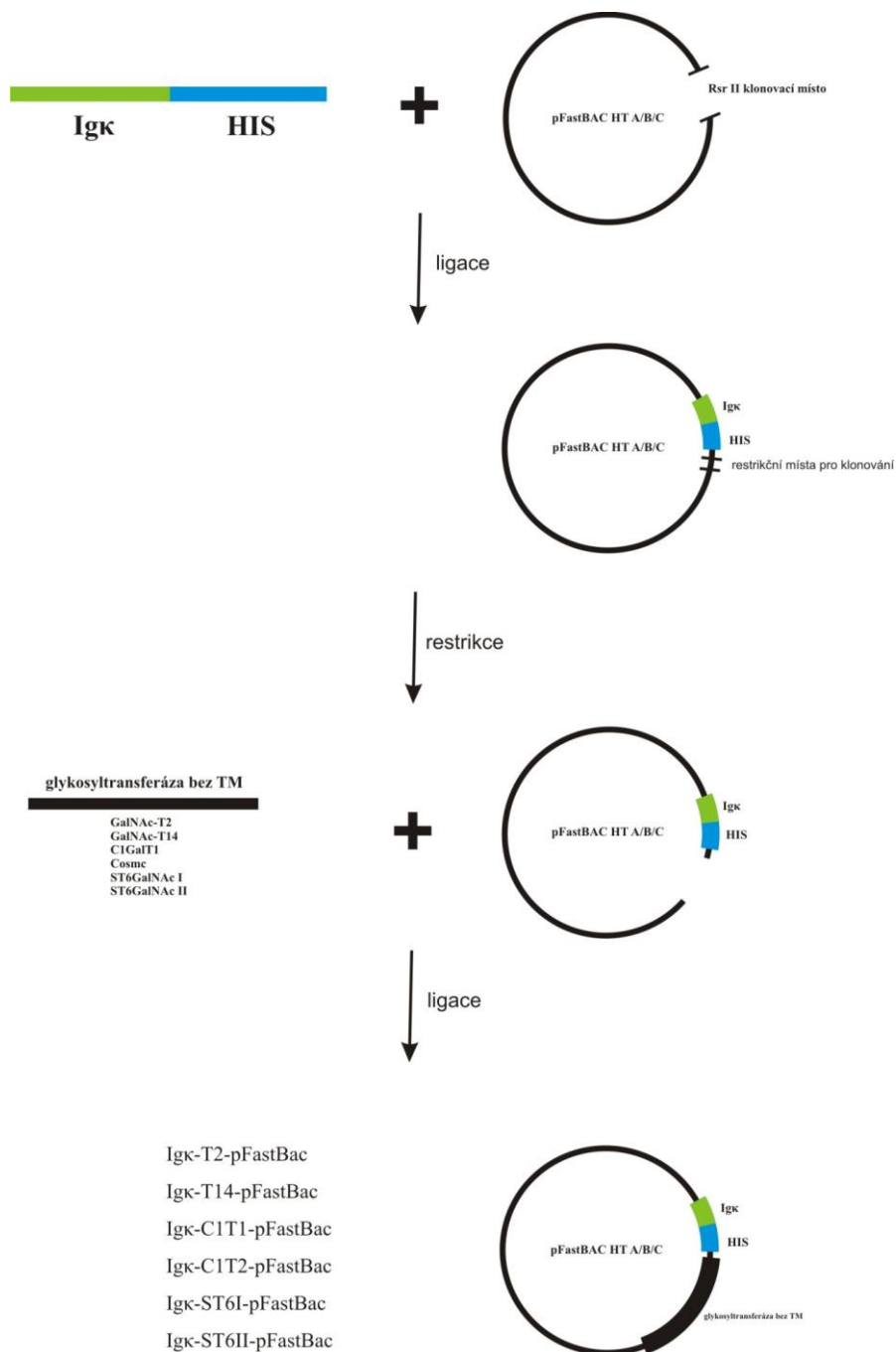
**Tabulka 10:** Podmínky PCR reakce.

| Opakování cyklů | Krok       | Teplota (°C) | Čas (min:s) |
|-----------------|------------|--------------|-------------|
| 1x              | denaturace | 94           | 01:00       |
| 30x             | denaturace | 94           | 00:30       |

|    |                               |                |                      |
|----|-------------------------------|----------------|----------------------|
|    | nasedání primerů              | x <sup>a</sup> | 00:45                |
|    | prodlužování sekvence         | 68             | 1-3 min <sup>b</sup> |
| 1x | konečné prodlužování sekvence | 68             | 10 min               |

<sup>a</sup> Teplota nasedání primerů se liší u jednotlivých glykosyltransferáz a je uvedena v Tabulce 8.

<sup>b</sup> Délka prodlužování sekvence závisí na délce PCR produktu (1 min/kb).



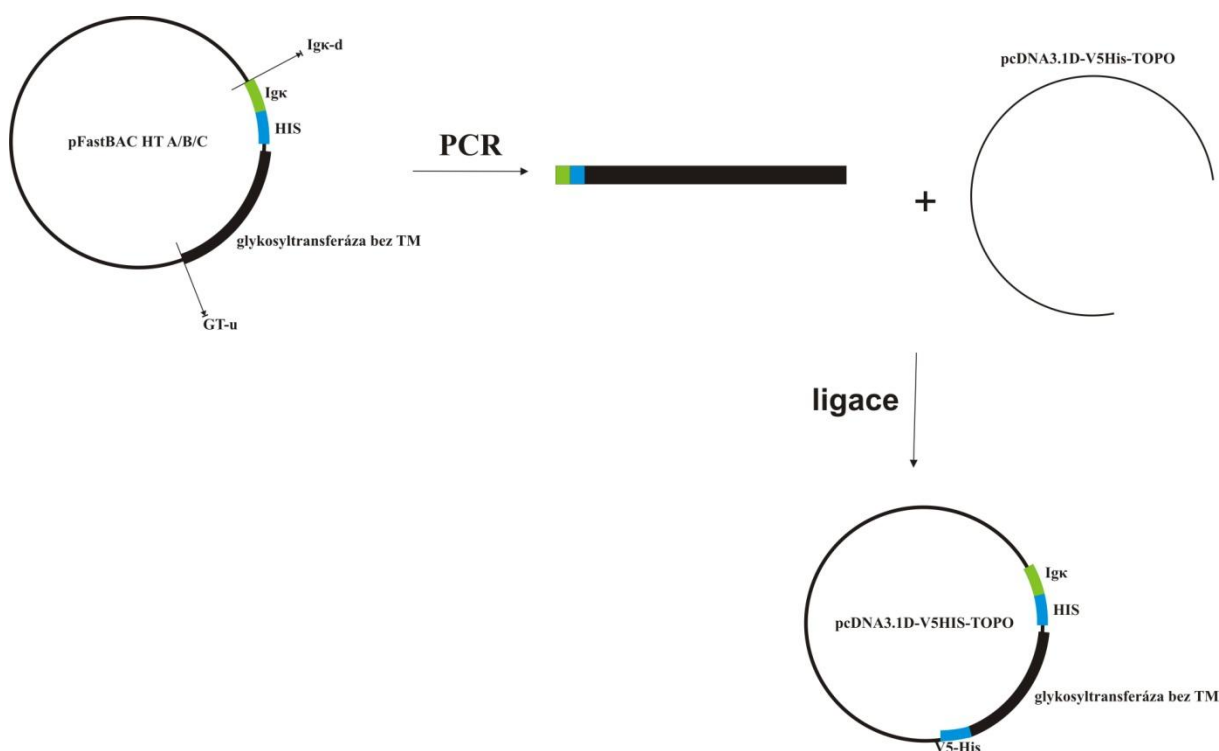
**Obrázek 8:** Konstrukce vektorů **Igκ-T2-pFastBac**, **Igκ-T14-pFastBac**, **Igκ-C1T1-pFastBac**, **Igκ-C1T2-pFastBac**, **Igκ-ST6I-pFastBac** a **Igκ-ST6II-pFastBac**.

### 3.3.2 Příprava vektorů pro savčí expresní systém

Inserty Igκ-glykosyltransferáza bez TM byly ligovány do vektoru pcDNA3.1-V5/His před V5 epitop a His značku dle postupu v kapitole 3.2.1 (**Tabulka 11**). Sekvence rekombinantních vektorů κT2-pcDNA3.1-V5/His, κT14-pcDNA3.1-V5/His, κC1T1-pcDNA3.1-V5/His, κC1T2-pcDNA3.1-V5/His, κST6I-pcDNA3.1-V5/His, κST6II-pcDNA3.1-V5/His (**Obrázek 9**) byly kontrolovány jako v 3.2.1. Plasmidová DNA pro transfekci 293F buněk byla izolována pomocí Plasmid Maxi Kit (Qiagen), ředěna na koncentraci 1 μg/μl v ddH<sub>2</sub>O a uchovávána na -20°C.

**Tabulka 11:** Sekvence primerů pro PCR amplifikaci inzertů Igκ glykosyltransferáz bez TM-pFastBac do vektoru pcDNA3.1D-V5/His-TOPO.

| Společný primer dopředný<br>Igκ-d     | GT    | Sekvence                                | Velikost<br>PCR<br>produktu<br>(bp) | Optimální<br>teplota<br>(°C) |
|---------------------------------------|-------|---|-------------------------------------|------------------------------|
| 5'- CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT C -3' | T2    | 5'- CTG CTG CAG GTT GAG CGT G - 3'      | 1744                                | 60                           |
|                                       | T14   | 5'- AGA GCT CAC CAT GTC CCA GT - 3'     | 1725                                | 55                           |
|                                       | C1T1  | 5'- AGG ATT TCC TAA CTT CAC TTT TG - 3' | 1200                                | 58                           |
|                                       | C1T2  | 5'- GTC ATT GTC AGA ACC ATT TGG - 3'    | 1090                                | 58                           |
|                                       | ST6I  | 5'- GTT CTT GGC TTT GGC AGT TC - 3'     | 1877                                | 61                           |
|                                       | ST6II | 5'- GCG CTG GTA CAG CTG AAG G - 3'      | 1227                                | 61                           |



**Obrázek 9:** Konstrukce vektorů  $\kappa$ T2-pcDNA3.1-V5/His,  $\kappa$ T14-pcDNA3.1-V5/His,  $\kappa$ C1T1-pcDNA3.1-V5/His,  $\kappa$ C1T2-pcDNA3.1-V5/His,  $\kappa$ ST6I-pcDNA3.1-V5/His,  $\kappa$ ST6II-pcDNA3.1-V5/His.

### 3.4 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v Sf9 buňkách

#### 3.4.1 Transfekce hmyzích buněk Sf9

Do 6-ti jamkového panelu bylo nasazeno  $8 \cdot 10^5$  buněk Sf9/jamka v Grace's Insect Medium. Buňky nasedaly na dno jamky 15 min při laboratorní teplotě. Transfekční reakce byly provedeny za předem optimalizovaných podmínek (**Tabulka 12**) pomocí Cellfectin II transfekčního činidla (Invitrogen). Připravené reakční směsi Cellfectinu II a bacmidové DNA byly smíchány a inkubovány 20 min při laboratorní teplotě. Poté byly komplexy cellfectin-bacmidová DNA nakapány k Sf9 buňkám. Transfekce byly inkubovány 5 hod v inkubátoru na 28°C. Reakce byly zastaveny odsátím transfekční směsi z jamky a přidáním kultivačního média Sf900II SFM. Buňky byly inkubovány 72 - 96 hod při 28°C. V průběhu inkubace byly buňky sledovány, zda projevují známky pozdního stádia infekce (**Tabulka 13, Obrázek 10**). Médium obsahující bakuloviry bylo centrifugováno na 3000 rpm/5 min. Zásobní roztoky bakulovirů **P1** (Viral stock, P1) byly skladovány bez přístupu světla při +4°C. Pro dlouhodobé skladování byla do P1 přidána 2% FBS. Zároveň s bakuloviry dochází k produkci rekombinantních proteinů. Z každého P1 bylo odebráno 50  $\mu$ l vzorku, smícháno s 50  $\mu$ l 2xSDS vzorkového pufru, nanášeno na SDS-PAGE gel (Miniprotean II, BIO-RAD, CA, USA) a po rozdělení byly proteiny blotováním přeneseny na PVDF membránu (Millipore, Billerica, MA, USA). Přítomnost rekombinantního proteinu byla detekována pomocí anti-pentaHIS tag protilátky značené HRP (anti-pentaHIS-HRP, Qiagen) v ředění 1:15 000. Pro průkaz přítomnosti protilátky byl použit systém SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL, USA) a emitovaný chemiluminiscenční signál byl zachycen na fotografický papír.

**Tabulka 12:** Podmínky transfekční reakce.

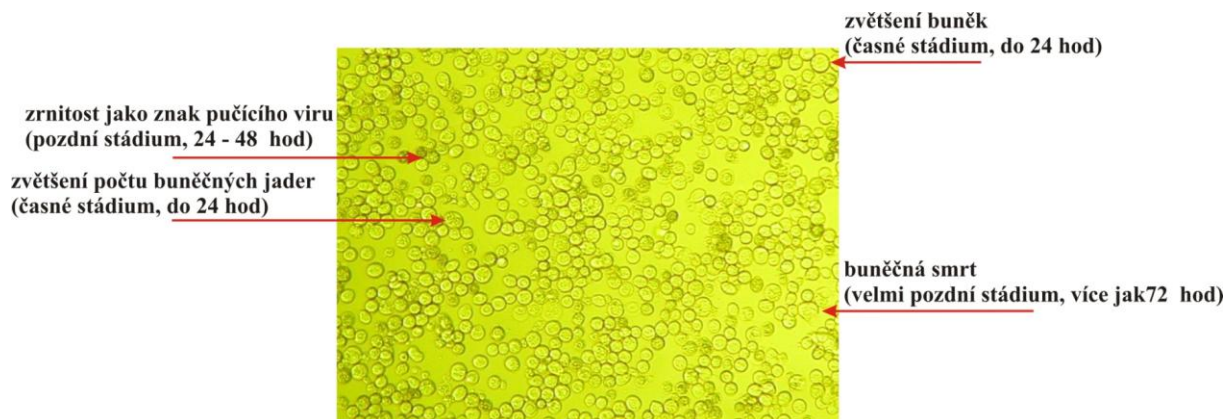
| Reagencie                          | Grace's Insect Medium ( $\mu$ l) | Množství ( $\mu$ l) |
|------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Cellfectin II                      | 100                              | 8                   |
| bacmidová DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) | 100                              | 1                   |

**Tabulka 13:** Vlastnosti infikovaných buněk [59].

| Čas (hod)                | Popis                          |
|--------------------------|--------------------------------|
| časné stadium, do 24 hod | zvětšení velikosti buněk       |
|                          | zvětšení počtu buněčných jader |



|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| pozdní stádium, 24 – 72 hod           | zastavení buněčného dělení               |
|                                       | objeví se zrnitost jako znak pučení viru |
|                                       | odlučování ze dna jamek                  |
| velmi pozdní stádium, více jak 72 hod | buněčná lýza                             |



**Obrázek 10:** Buňky Sf9 infikované bakuloviry.

### 3.4.2 Množení bakulovirů

Pro infekci hmyzích buněk Sf9 byla používána násobnost infekce 0,1 (multiplicity of infection; MOI). MOI se vypočítává podle **rovnice 1**. Násobnost infekce (MOI) vyjadřuje poměr mezi počtem virových částic a počtem cílových (potenciálně infikovaných) buněk. MOI závisí na schopnosti viru infikovat a rychlosti jeho množení. Do 6-ti jamkového panelu bylo v den infekce nasazeno  $2 \cdot 10^6$  buněk/jamka. Po 1 hod inkubace při laboratorní teplotě byly k buňkám přidány P1 zásobní roztoky bakulovirů. Jakmile buňky projevovaly známky pozdního stádia infekce (**Obrázek 10**) bylo médium obsahující bakuloviry centrifugováno na 3000 rpm/5 min a označeno P2 až Pn. Zároveň s bakuloviry docházelo k produkci rekombinantních proteinů. Detekce přítomnosti rekombinantních proteinů jako v kapitole 3.4.1.

**Rovnice 1:** Výpočet násobnosti infekce (multiplicity of infection; MOI).

$$\text{množství inokula} = \left( \frac{\text{MOI (pfu/buněk)} \times \text{počet buněk}}{\text{titr P1 (pfu/ml)}} \right)$$

### 3.4.3 Virová plaková esej

Do 6-ti jamkového panelu bylo v den infekce nasazeno  $2 \cdot 10^6$  buněk/jamka. Buňky nasedaly na dno jamky, při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. V průběhu inkubace byla připravena série ředění zásobního roztoku P2 (8-log serial dilution;  $10^{-1} - 10^{-8}$ ) pomocí postupného ředění 0,5 ml P2 nebo předchozího ředění P2 k 4,5 ml kultivačním média Sf-900

II SFM. Pro virovou plakovou esej byl použit P2 v ředění  $10^{-4} - 10^{-8}$ , vždy po dvou. Médium nad buňkami bylo odsáto a nahrazeno 1 ml ze série ředění P2 nebo negativní kontrolou bez bakulovirů a inkubováno 1 hod při laboratorní teplotě. V průběhu inkubace bylo připraveno plakovací médium obsahující rozpuštěný 4% agarózový gel v 1,3x Sf-900 Medium v poměru 1:3. Po jedné hodině inkubace byly buňky pokryty 2 ml plakovacího média. Plaková virová esej byla inkubována 7 – 10 dní při 27°C. V sedmý den inkubace byly plaky barveny 0,5 ml roztoku 1 mg/ml Neutrální červeně (Invitrogen) v ddH<sub>2</sub>O po dobu 1 hod. Plaky v jednotlivých jamkách byly spočítány a titer bakulovirů byl spočítán podle **rovnice 2**.

**Rovnice 2:** Výpočet titru bakulovirů.

$$\text{titer}(pfu/ml) = \text{počet plaků} \times \text{ředění} \times \frac{1}{\text{ml inokula/jamka}}$$

### 3.4.4 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-C1GalT1, Igκ-Cosmc, Igκ-ST6GalNAc I, Igκ-ST6GalNAc II

Produkce rekombinantních proteinů ve velkém objemu byly provedeny za předem optimalizovaných podmínek MOI (1 – 5), doby infekce (48 – 96 hod) a titru bakulovirů vyšší než  $1 \cdot 10^8$  pfu/ml. Rekombinantní proteiny byly produkovány ve 2 litrech  $2 \cdot 10^6$  suspenzních buněk Sf9/ml v Sf-900 II SFM médiu, na orbitální míchačce při 130 rpm v inkubátoru na 27°C po dobu 72 hod.

## 3.5 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v HEK 293T a HEK 293FreeStyle buňkách

### 3.5.1 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v buňkách HEK 293T

Do 6-ti jamkovém panelu bylo den před transfekcí nasazeno  $2 \cdot 10^5$  živých buněk 293T/jamka. Plasmidová DNA a transfekční činidlo SuperFect (Qiagen) byly připraveny podle optimalizovaných podmínek v **Tabulce 14**. K 100 μl RPMI1640 s 2,5 μg plasmidové DNA bylo pipetováno 12,5 μl SuperFect transfekčního činidla. Reakce byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Transfekční komplex DNA-SuperFect byl přidán k 293T buňkám a reakce byla inkubována 72 hod v inkubátoru na 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Detekce přítomnosti rekombinantních proteinů jako v kapitole 3.4.1.

**Tabulka 14:** Podmínky transfekční reakce.

| Reagencie | RPMI1640 + 1% PenStrep (μl) | Množství (μl) |
|-----------|-----------------------------|---------------|
| SuperFect | -                           | 12,5          |

|                           |     |     |
|---------------------------|-----|-----|
| plasmidová DNA (1 µg/ µl) | 100 | 2,5 |
|---------------------------|-----|-----|

### 3.5.2 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz v buňkách FreeStyle 293-F

Buňky 293F byly 48 hod před transfekcí pasážovány na množství  $3 \cdot 10^5$  živých buněk/ml. V den transfekce byly buňky ředěny na  $1 \cdot 10^6$  živých buněk/ml. Pro jednu transfekční reakci o objemu 30 ml byla připravena plasmidová DNA a transfekční činidlo 293fectin podle optimalizovaných podmínek v **Tabulce 15**. Pro velkoobjemovou produkci rekombinantních proteinů byly použity 3 – 10 objemy transfekční reakce. 293fectin byl 5 min inkubován v Opti-MEM I při laboratorní teplotě, poté byl smíchán s plasmidovou DNA v Opti-MEM I a reakce byla inkubována 25 min při laboratorní teplotě. Transfekční komplex DNA-293fectin byl za stálého kruhového míchání pipetován k 293F buňkám. Transfekční reakce byly inkubovány 72 hod na orbitální míchačce při 135 rpm v inkubátoru na 37°C a 8% CO<sub>2</sub>. Detekce přítomnosti rekombinantních proteinů jako v kapitole 3.4.1.

**Tabulka 15:** Podmínky transfekční reakce.

| Reagencie                 | Opti-MEM I (ml) | Množství (µl) |
|---------------------------|-----------------|---------------|
| 293fectin                 | 1               | 40            |
| plasmidová DNA (1 µg/ µl) | 1               | 20            |

## 3.6 Izolace rekombinantních glykosyltransferáz

### 3.6.1 Izolace sekretovaných forem glykosyltransferáz

Rekombinantní proteiny Igκ-GalNAc-T2, Igκ-ST6GalNAc I, Igκ-ST6GalNAc II byly purifikovány za nativních podmínek pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. Všechny purifikační kroky probíhali na ledu při 4°C. Kultivační médium bylo centrifugováno na 3000 rpm/10 min, k supernatantu byl v poměru 1:9 přidán vázací pufr (VP; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol a 0,1% octyl-β-D-glukopyranoside; OG) a na každých 250 ml supernatantu bylo přidán 1 ml 50% Ni-NTA agarózy (Qiagen). Směs byla za stálého míchání na roller mixeru inkubována při 4°C přes noc. Ni-NTA byla přenesena do skleněné chromatografické kolony a promyta promývacím pufrem s 2mM nebo 20 mM imidazolem (PP; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl a 0,1% OG). Rekombinantní proteiny byly eluovány elučním pufrem (EP; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol a 0,1% OG). Eluční frakce byly koncentrovány na koncentraci  $\geq 1$  mg/ml proteinu do 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl pomocí Amicon Ultracell 10L (Millipore, Billerica, MA) [27]. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí blotování na PVDF membránu a detekovány jako v kapitole 3.4.1. Koncentrace byly stanoveny podle Bradfordové a srovnáním denzit

s kalibrační křivkou standardu sérového bovinního albuminu (BSA; 66,5 kDa) po rozdělení na 10% SDS-PAGE a obarvení Coomassie Blue R-250. K analýze denzit kalibrační křivky BSA a výpočtu koncentrací proteinů jsme použili program ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3.6.2 Izolace Igκ-GalNAc-T14, Igκ-C1GalT1, Igκ-Cosmc**

Rekombinantní proteiny Igκ-GalNAc-T14, Igκ-C1GalT1, Igκ-Cosmc byly purifikovány za nativních podmínek pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. Všechny purifikační kroky probíhali na ledu při 4°C. Buňky Sf9 nebo 293F byly centrifugovány 1000 rpm/10 min. K buněčné peletě byl přidán lyzační pufr (LP; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol a 1% OG), směs byla inkubována za stálého míchání 30 min při laboratorní teplotě a centrifugována 10 000 rpm/10 min. Další kroky jako izolace, analýza koncentrace a čistoty proteinů byly provedeny dle kapitoly 3.6.1. Jednotlivé frakce jsme analyzovali pomocí blotování na PVDF membránu a detekovali jako v kapitole 3.4.1.

### **3.6.3 Potvrzení identity rekombinantních glykosyltransferáz pomocí hmotnostní spektrometrie**

Identita rekombinantních proteinů izolovaných z hmyzích buněk Sf9 a savčích buněk 293F byla potvrzena hmotnostní spektrometrií tryptických štěpů Dr. Kazuo Takahashim na Ústavu mikrobiologie, Universita of Birmingham at Alabama (UAB), Birmingham, Alabama, USA [27, 47]. Získaná peptidová spektra byla porovnávána s proteinovou databází NCBI.

### **3.6.4 Potvrzení aktivity rekombinantních glykosyltransferáz**

Aktivita rekombinantní Igκ-GalNAc-T2 byla stanovena metodou dot-blot. 1 nebo 4 μg rekombinantního Igκ-GalNAc-T2 připojovaly GalNAc z UDP-GalNAc na 0,5 až 0,05 μg syntetického peptidu pantové oblasti IgA1 (Val-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Cys; sHR IgA1). Reakce byla inkubována po dobu 24hod při 37°C. GalNAc vázaný na syntetický peptid pantové oblasti IgA1 byl detekován reakcí s biotinylovaným lektinem *Helix aspersa* (HAA). Pantová oblast IgA1 s navázanými GalNAc byla pozitivní kontrolou. Negativní kontrola byla reakce s Igκ-GalNAc-T2 bez přidání UDP-GalNAc [27].

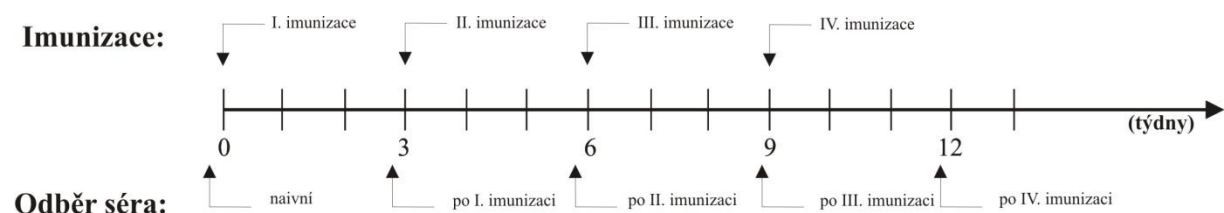
Igκ-GalNAc-T2 připojoval GalNAc na rekombinantní fragment Cα1-HR-Cα2 IgA1. GalNAc-osialylovaný fragment IgA1 byl sialylován rekombinantní Igκ-ST6GalNAc I nebo Igκ-ST6GalNAc II po dobu 36hod při 37°C. Sialylace byla dále potvrzena desialylací pomocí *Arthrobacter ureafaciens* sialidase při 37°C po dobu 8 h. Glykosylované IgA1 fragmenty byly

rozděleny na SDS-PAGE, blotovány na PVDF membránu a detekovány pomocí biotinylovaného lektinu HAA.

### 3.7 Příprava protilátek pro průkaz jednotlivých glykosyltransferáz v uspořádání Western blot a fluorescenční mikroskopii

#### 3.7.1 Imunizace pokusných zvířat

Vakcinační experimenty byly schváleny Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (Odborná komise uživatelského zařízení k projektu pokusů podle Vyhlášky o ochraně pokusných zvířat, podle Předpisu č. 419/2012 Sb.). Samice BALB/c myši (AnLab s.r.o., Praha) byly umístěny na Ústavu pro práci s laboratorními zvířaty, LF UP, Olomouc. Myši byly rozděleny do šesti skupin po pěti a byly vakcinovány 20 µg TM-T2-pcDNA3.1-V5/His, TM-T14-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6I-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6II-pcDNA3.1-V5/His na myš v 2 ml 1xPBS podle vakcinačního schématu (**Obrázek 11**). Po každé aplikaci vakcín byla pokusná zvířata kontrolována. Myši byly vakcinovány i.v. do ocasní žíly což představuje tzv. hydrodynamickou aplikaci, která zajišťuje preferenční přenos DNA do hepatocytů.



**Obrázek 11:** Časové schéma imunizace.

#### 3.7.2 Tvorba monoklonálních protilátek

Sleziny myši, jejichž sérové hladiny specifických protilátek proti rekombinantnímu proteinu Igκ-ST6GalNAc II byly nejvyšší, byly použity pro tvorbu myších monoklonálních protilátek anti-ST6GalNAc II (mAb anti-ST6II) pomocí hybridomů na Oddělení imunologie, Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. (VUVeL, Brno).

#### 3.7.3 Stanovení hladin specifických protilátek

Detekce hladin specifických protilátek byla provedena pomocí ELISA. Rekombinantní proteiny Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-ST6GalNAc I, Igκ-ST6GalNAc II byly navázány na dno jamek (20 ng/jamka). Mikrotitrační destičky s navázaným rekombinantním proteinem byly blokovány pomocí 5% sušeného odtučněného mléka v 1xPBS s 0,1% NaN<sub>3</sub> a

0,05% Tween 20. Séra byla ředěna 1:500 v 1xPBS s 0,1% NaN<sub>3</sub>, 1% BSA a 0,05% Tween 20 a titrována dvojkovou ředící řadou. Jako sekundární protilátka byla použita proti myši polyvalentní protilátka konjugovaná s HRP ředěná 1:2000 ve vzorkovém pufru. Reakce byla vizualizovaná pomocí substrátového pufru OPD (o-Phenylendiamine Dihydrochloride tablet) a zastavena přidáním 0,4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intenzita barevné reakce byla vyhodnocena při 492 nm pomocí ELISA čtečky a programu Genesis (Labsystems Multiscan RC, Finsko).

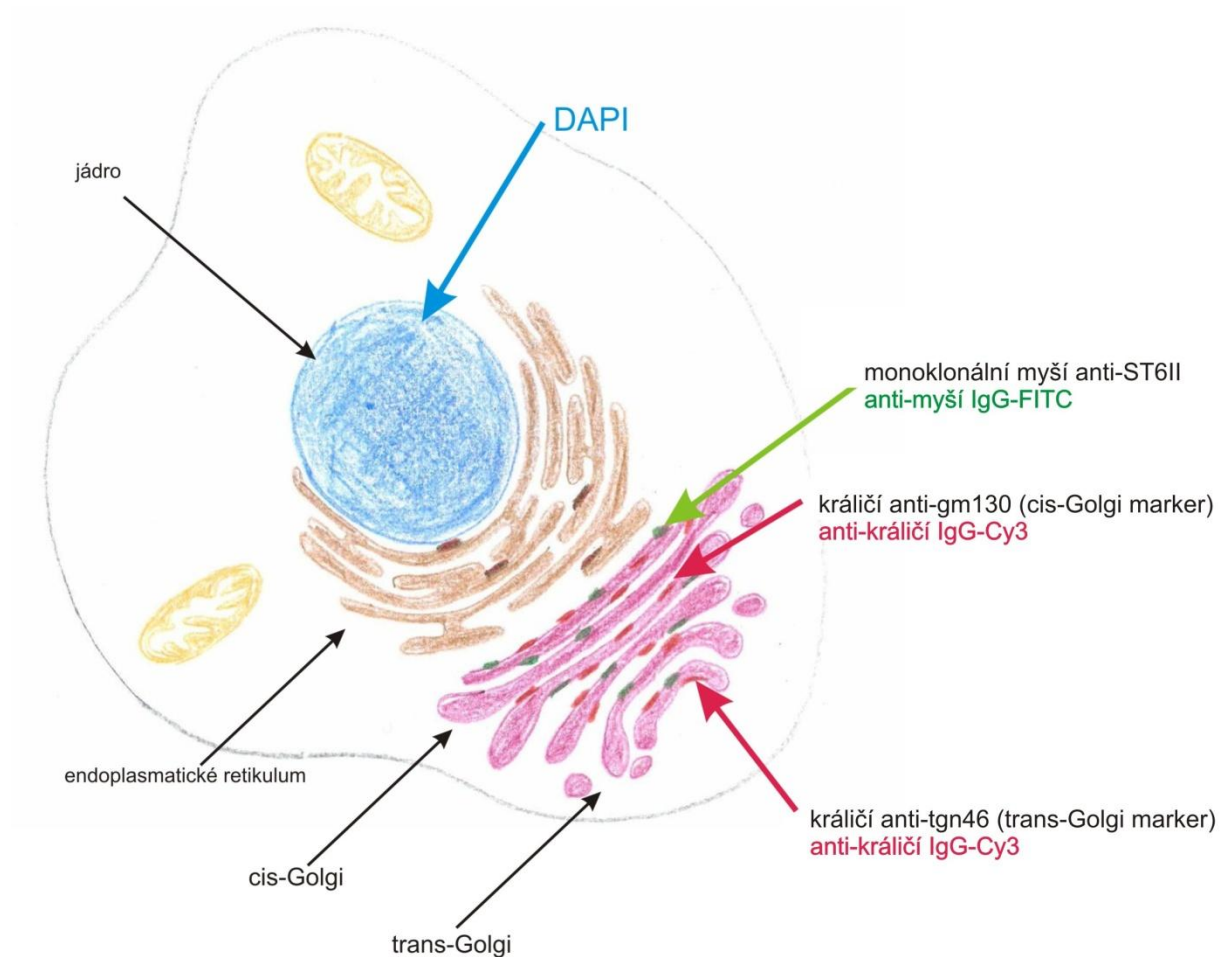
### 3.7.4 Stanovení specifity sérových a monoklonálních protilátek

Rekombinantní proteiny Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-ST6GalNAc I, Igκ-ST6GalNAc II nebo lyzáty buněk IgAN pacientů a zdravých kontrol byly rozděleny na 10% SDS-PAGE gelu a blotovány na PVDF membránu. Membrána byla blokována v SuperBlock s 0,05% Tween 20 přes noc při 4°C. Specifické sérové protilátky proti GalNAc-T2, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II byly ředěny 1:100 v SuperBlock s 0,05% Tween 20. Klony mmAb anti-ST6II byly ředěny 1:100 v RPMI1640 s 10% FBS. Reakce byla inkubována přes noc při 4°C. Přítomnost navázané specifické protilátky byla zjištěna přidáním myši polyvalentní protilátky značené HRP a reakce byla inkubována 3hod při laboratorní teplotě. Pro detekci navázaných protilátek byl použit systém SuperSignal West Pico (Pierce) a emitovaný chemiluminiscenční signál byl zachycen na fotografický papír.

### 3.7.5 Barvení buněk pomocí specifických protilátek

EBV-imortalizované IgA1-produkující buňky pacientů s IgAN a zdravých kontrol byly kultivovány v RPMI1640 s 20% FBS a 1% PenStrep médiu ve vlhčeném inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> [20]. Mikroskopická sklíčka s cytopsiny 1.10<sup>5</sup> buněk byly připraveny centrifugací při 1000 rpm/6 min na Shandon Cytospin II. Buňky byly 10min fixovány 4% paraformaldehydem v 1xPBS, promyty 1xPBS a permeabilizovány 3x 5 min v 0,1% TritonX-100 v 1xPBS. Buňky byly blokovány v RPMI1640 s 10%FBS 1hod při laboratorní teplotě. K 50 μl mmAb anti-ST6II ředěné 1:4 v RPMI1640 s 10%FBS byla přidána komerční králičí protilátka proti *cis*- (anti-gm130) nebo *trans*- (anti-tgn46) Golgi ředěná 1:200 (**Obrázek 12**). Reakce byla inkubována přes noc při 4°C. Následující den byly cytosiny promyty 3x 5min v 1xPBS. Sekundární protilátka anti-myši IgG značená FITC byla ředěna 1:1000 a anti-králičí IgG značená Cy3 byla ředěna 1:2000 v RPMI1640 s 10%FBS. Cytosiny byly inkubovány v tmavé vlhčené komůrce 2 hod při laboratorní teplotě a poté promyty 3x 5 min 1xPBS. Cytosiny byly pokryty montovacím médiem s DAPI, překryty krycím sklíčkem a uchovávány při -20°C. Mikroskopické preparáty cytosinů byly prohlíženy na fluorescenčním

mikroskopu Axioskope microscope (OPTON, West Germany) s CCD kamerou a konfokálním mikroskopu LSM 710 (Zeiss). V trojbarevné kombinaci experimentu bylo DAPI excitováno při 405 nm a detekováno při 410 – 495 nm, FITC bylo excitováno při 488 nm a detekováno při 495 – 550 nm a Cy3 bylo excitováno při 561 nm a detekováno při 560 – 660 nm.

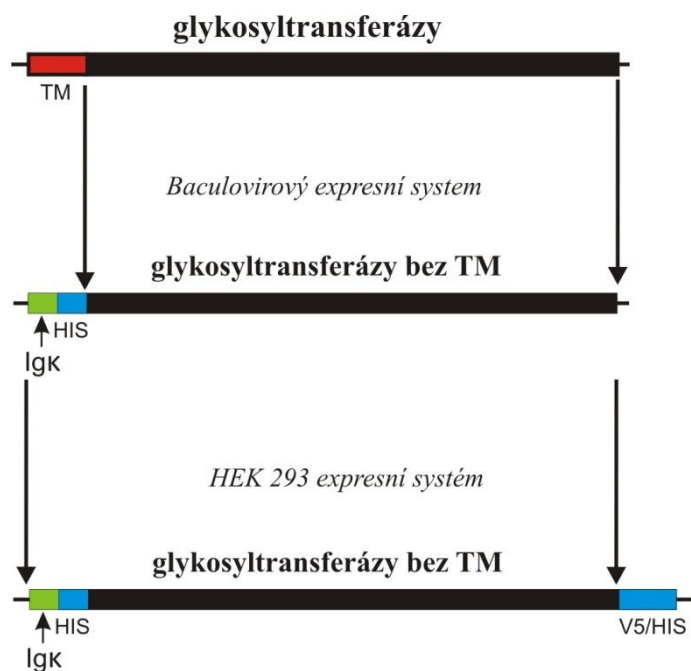


**Obrázek 12:** Schéma barvení buněk.

## 4 Výsledky

### 4.1 Konstrukce vektorů pro produkci rekombinantních glykosyltransferáz

Pro produkci rekombinantních glykosyltransferáz pomocí hmyzího expresního systému byl do vektoru pFastBac vnesen úsek genu kódující sekreční signál myšího imunoglobulinu  $\kappa$  a vzniklý plasmid byl označen Ig $\kappa$ -pFastBac. Do vektoru Ig $\kappa$ -pFastBac byly klonovány cDNA glykosyltransferáz GalNAc-T2, GalNAc-T14, C1GalT1, Cosmc, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II bez transmembránových domén. Z těchto plasmidů byly pomocí PCR přeneseny úseky cDNA kódující fúzní proteiny (Ig $\kappa$ -glykosyltransferázy) do savčího expresního vektoru pcDNA3.1D-V5/His-TOPO (**Obrázek 13**). Všechny plasmidy byly ověřovány restriční analýzou, sekvenováním a identita enzymů byla potvrzena srovnáním s databází GenBank (NCBI).



**Obrázek 13:** Schéma jednotlivých variant rekombinantních glykosyltransferáz.

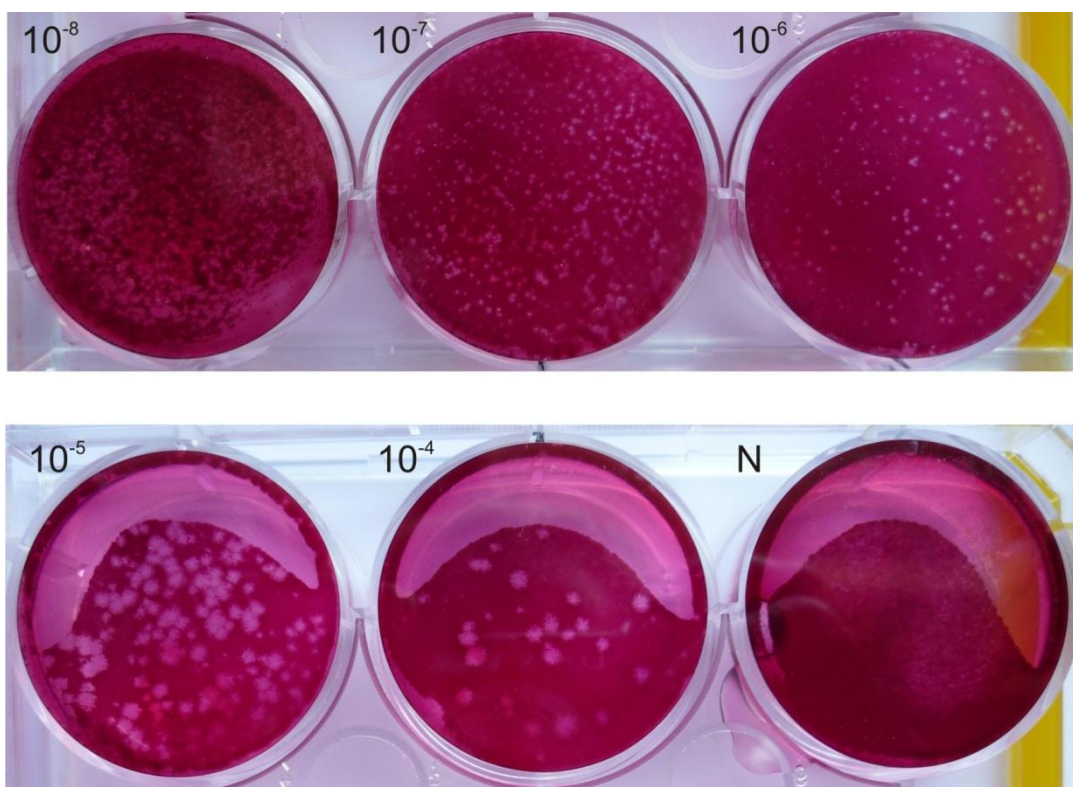
### 4.2 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz

#### 4.2.1 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz pomocí Bakulovirového expresního systému

Hmyzí buňky Sf9 byly transfekovány rekombinantními bacmidy (**Obrázek 13**) a podle účinnosti transfekce byl titer bakulovirů po transfekci  $1.10^6 - 1.10^7$  plak tvořících jednotek/ml (plaque forming units/ml; pfu/ml). Množením bakulovirů a tvorbou virových



zásobních roztoků P2, P3... Pn bylo dosaženo titru  $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$  pfu/ml a zároveň větších zásobních objemů (**Obrázek 14**).

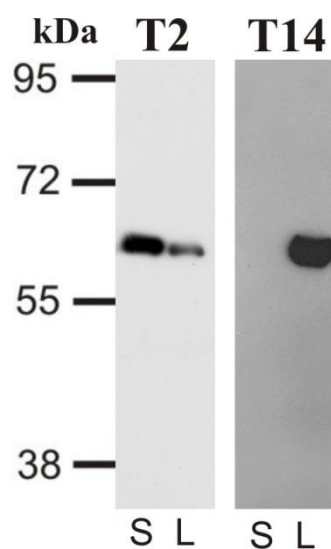


**Obrázek 14:** Virová plaková esej. Supernatanty z buněčné suspenze infikovaných buněk byly ředěny desítkovou titrační řadou, v rozsahu  $10^{-4} - 10^{-8}$  naneseny na vrstvu hmyzích buněk v agaru a po lýze buněk infikovaných v okolí jednotlivých virionů byly kolonie v jednotlivých ředěních počítány.

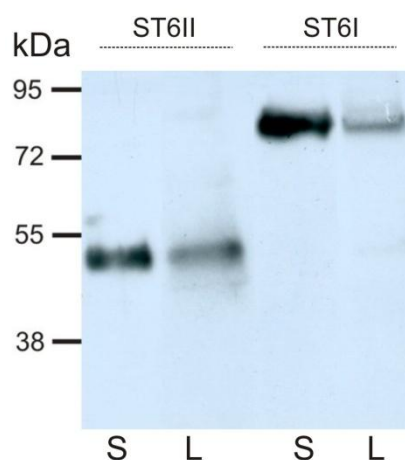
Programem ProtParamTool (<http://web.expasy.org/protparam/>) byly u rekombinantních proteinů Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1, Ig $\kappa$ -Cosmc, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II predikována molekulová hmotnost a pI (**Tabulka 16**). Efektivita sekrece jednotlivých rekombinantních glykosyltransferáz byla vyhodnocena porovnáním množství proteinu v buněčné peletě a v supernatantu Sf9 buněčné kultury 96 hodin po infekci buněk rekombinantními bakuloviry (MOI=5) pomocí western blot. Analýzy ukázaly, že ne všechny námi testované rekombinantní glykosyltransferázy s odstraněnou transmembránovou doménou jsou efektivně sekretovány z hmyzích buněk N' terminální fúzi s myším sekrečním signálem Ig $\kappa$ . Efektivní sekrece byla potvrzena pro Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I a Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II, zatímco Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1, Ig $\kappa$ -Cosmc sekretovány nebyly (**Obrázky 15 – 17**).

**Tabulka 16:** Základní fyzikálně-chemické vlastnosti rekombinantních glykosyltransferáz produkovaných Sf9 buňkami.

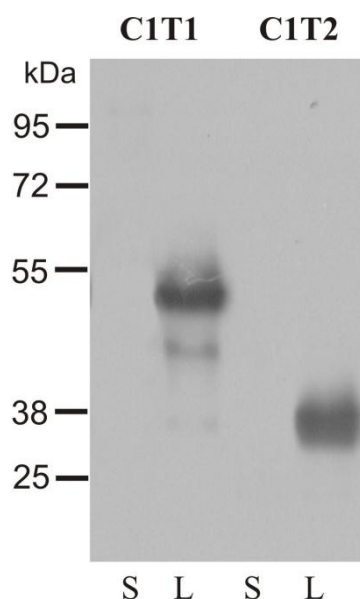
| GT           | Molekulová hmotnost (kDa) | pI   |
|--------------|---------------------------|------|
| GalNAc-T2    | 65,8                      | 6,71 |
| GalNAc-T14   | 66,4                      | 5,94 |
| C1GalT1      | 45,1                      | 5,84 |
| Cosmc        | 38,2                      | 5,40 |
| ST6GalNAc I  | 71,1                      | 9,69 |
| ST6GalNAc II | 49,9                      | 8,83 |



**Obrázek 15:** Srovnání intracelulárního a sekretovaného podílu Igκ-GalNAc-T2 (T2), Igκ-GalNAc-T14 (T14) pomocí Western blot s použitím protilátky anti-pentaHis-HRP. Supernatant kultury (S) a lyzát buněk (L) Sf9.



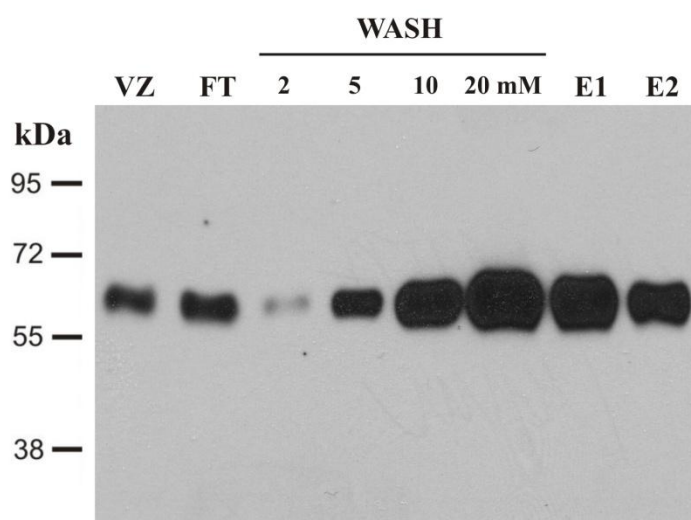
**Obrázek 16:** Srovnání intracelulárního a sekretovaného podílu Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II (ST6II), Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I (ST6I) pomocí Western blot s použitím protilátky anti-pentaHis-HRP. Supernatant kultury (S) a lyzátu buněk (L) Sf9.



**Obrázek 17:** Srovnání intracelulárního a sekretovaného podílu Ig $\kappa$ -C1GalT1 (C1T1), Ig $\kappa$ -Cosmc (C1T2) pomocí Western blot s použitím protilátky anti-pentaHis-HRP. Supernatant kultury (S) a lyzátu buněk (L) Sf9.

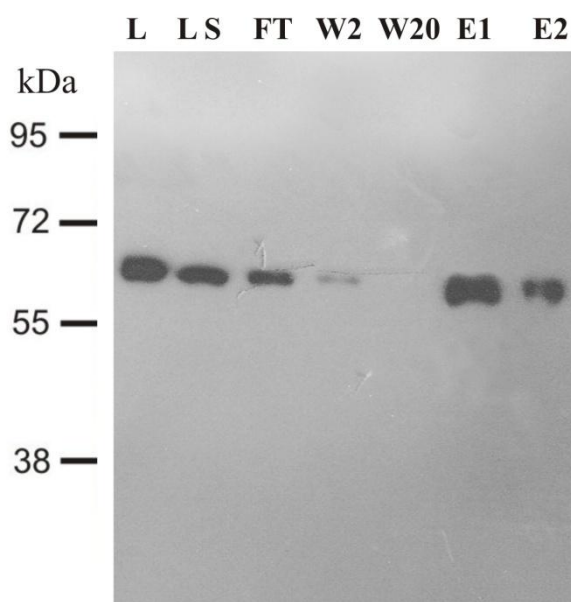
Následně byly jednotlivé rekombinantní glykosyltransferázy exprimovány ve 2l buněčné suspenzi, byly purifikovány pomocí NiNTA agarózy a analyzovány pomocí Western blotu (**Obrázky 18 - 21**). Eluční frakce rekombinantních proteinů byly koncentrovány do 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl. Proteiny byly uloženy při  $-20^{\circ}\text{C}$  a byly stabilní bez známek rozpadu nebo ztráty enzymatické aktivity po dobu minimálně 6 měsíců. Ani při dlouhodobém skladování na ledu nebo při  $+4^{\circ}\text{C}$  nebyl pozorován významný rozpad (**Obrázek 22**). Pro vyhodnocení čistoty byly preparace jednotlivých rekombinantních glykosyltransferáz separovány na 10% SDS-PAGE gelu a obarveny pomocí Brilliant Coomassie Blue. Koncentrace byly stanoveny podle Bradfordové a srovnáním denzit s kalibrační křivkou standardu BSA (**Obrázek 23**). Po koncentraci na ultrafiltračním koncentrátoru byla u všech proteinů dosažena koncentrace vyšší než 1 mg/ml a čistota 85 - 95 %. Z jednoho litru Sf9 kultury byly izolovány 2 mg Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, 1 mg Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I a 0,25 mg Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II.

### Igκ-GalNAc-T2 (Sf9)



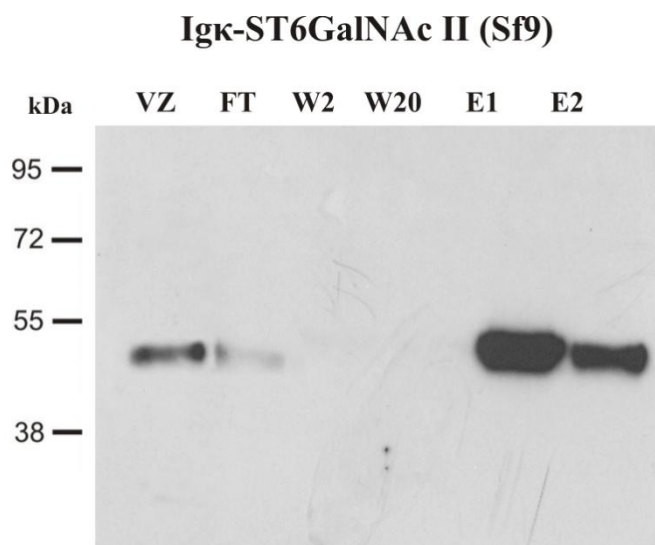
**Obrázek 18:** Optimalizace podmínek afinitní purifikace rekombinantního Igκ-GalNAc-T2 vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony ze supernatantu kultury (VZ). Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly rovněž analyzovány: nenavázaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu WASH (2, 5, 10, a 20 mM imidazol), eluční frakce (E1, E2; pufr obsahoval 150 mM imidazolu) [27].

### Igκ-GalNAc-T14 (Sf9)

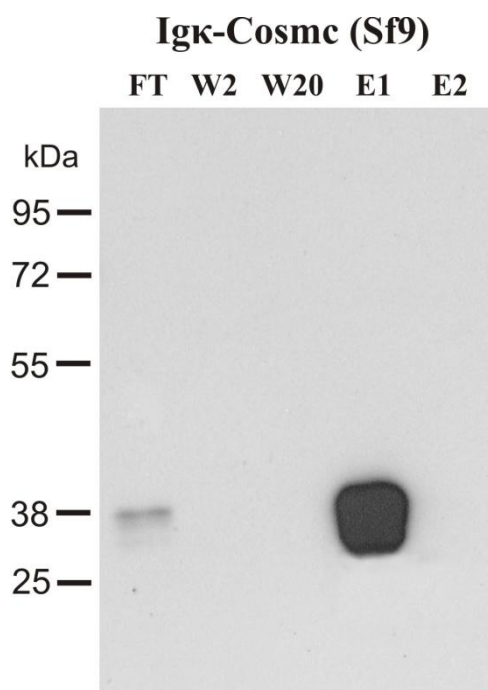


**Obrázek 19:** Afinitní purifikace rekombinantního Igκ-GalNAc-T14 vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony z lyzátu (L) buněk. Alikvot supernatantu lyzátu (LS) po centrifugaci 10 000 rpm/10 min byl nanesen na gel rovněž. Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly rovněž analyzovány:

nenavázaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1, E2; pufr obsahoval 150 mM imidazol).



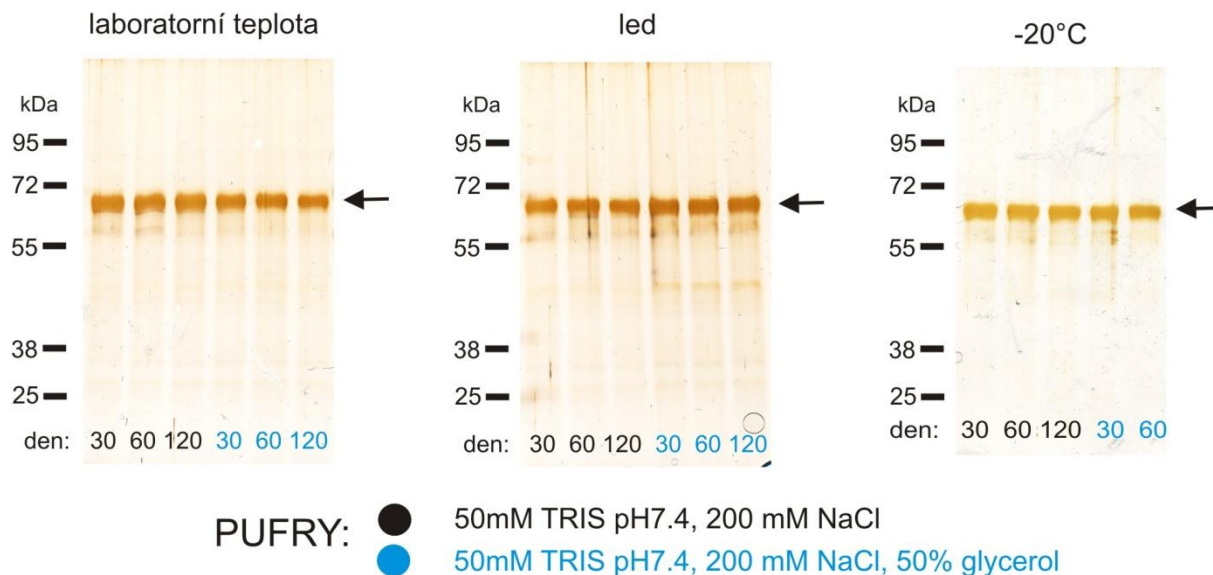
**Obrázek 20:** Afinitní purifikace rekombinantního Igκ-ST6GalNAc II vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony ze supernatantu kultury (VZ). Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly rovněž analyzovány: nenavázaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1, E2; pufr obsahoval 150 mM imidazol).



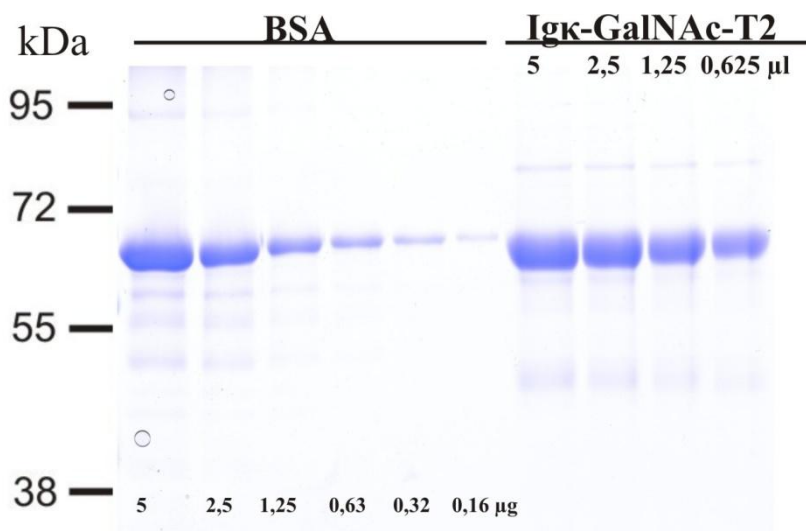
**Obrázek 21:** Afinitní purifikace rekombinantního Igκ-Cosmc vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony ze supernatantu kultury. Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly analyzovány: nenavázaná

frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1, E2; pufr obsahoval 150 mM imidazol).

## Igκ-GalNAc-T2 (Sf9)



**Obrázek 22:** Stanovení stability Igκ-GalNAc-T2. Rekombinantní protein byl po purifikaci na NiNTA koloně koncentrován do 50 mM TRIS pH7.4, 200 mM NaCl. Vzorky proteinu pro stanovení stability v pufru 50 mM TRIS pH7.4, 200 mM NaCl (černé písmo) a 50 mM TRIS pH7.4, 200 mM NaCl s 50% glycerolem (modré písmo) byly uskladněny při laboratorní teplotě, na ledu a při -20°C po dobu 0 až 120 dní. Vzorky Igκ-GalNAc-T2 byly analyzovány na 10% SDS-PAGE gelu a barveny stříbrem.



**Obrázek 23:** Stanovení čistoty a koncentrace Igκ-GalNAc-T2 pomocí SDS-PAGE. Rekombinantní protein byl po purifikaci na NiNTA koloně koncentrován, analyzován na 10%



SDS-PAGE gelu a barven pomocí Brilliant Coomassie Blue. Koncentrace stanovená srovnáním s densitou BSA naneseného v titrační řadě 5 - 0,16 µg na jamku.

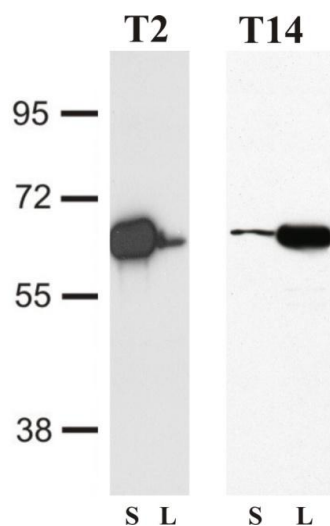
## 4.2.2 Produkce rekombinantních glykosyltransferáz pomocí savčího expresního systému

### 4.2.2.1 Produkce glykosyltransferáz pomocí FreeStyle 293-F buněk

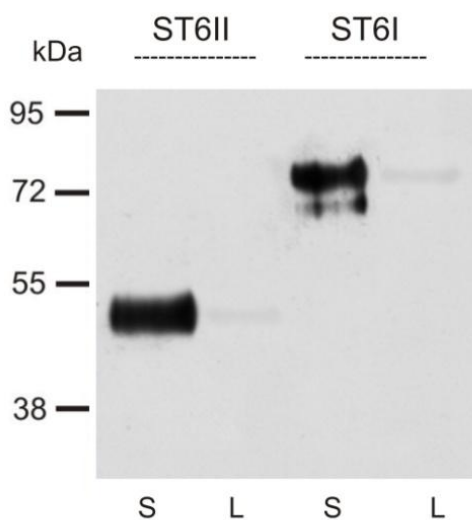
Rekombinantní proteiny Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-ST6GalNAc I, Igκ-ST6GalNAc II byly paralelně exprimovány i v savčím expresním systému. Pro tyto účely byly připraveny expresní vektory, z nichž jsou proteiny exprimovány ve fúzi s C' terminální His značkou a V5 epitopem pro vysoce specifickou detekci pomocí anti-V5-HRP nebo anti-pentaHis-HRP protilátky. Proto proteiny exprimované pomocí bakulovirového a savčího expresního systému mají jinou molekulovou hmotnost (**Obrázek 13**). Programem ProtParamTool byla predikována molekulová hmotnost a pI jednotlivých rekombinantních glykosyltransferáz (**Tabulka 17**). Proteiny byly exprimovány pomocí 293F buněk a přítomnost rekombinantních proteinů v supernatantu kultury byla srovnána s množstvím proteinu v alikvotu buněčné pelety pomocí Western blotu a protilátky anti-pentaHis-HRP Ab (**Obrázky 24 - 26**).

**Tabulka 17:** Základní fyzikálně-chemické vlastnosti rekombinantních glykosyltransferáz produkované 293F.

| GT           | Molekulová hmotnost (kDa) | pI   |
|--------------|---------------------------|------|
| GalNAc-T2    | 70,8                      | 6,82 |
| GalNAc-T14   | 71,5                      | 6,15 |
| C1GalT1      | 50,2                      | 6,07 |
| Cosmc        | 43,3                      | 5,82 |
| ST6GalNAc I  | 76,2                      | 9,67 |
| ST6GalNAc II | 51,1                      | 8,82 |

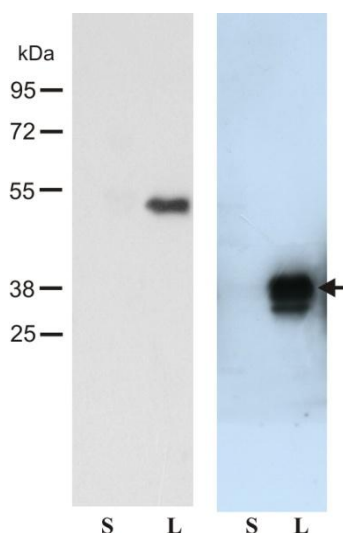


**Obrázek 24:** Srovnání intracelulárního a sekretovaného podílu Igκ-GalNAc-T2 (T2), Igκ-GalNAc-T14 (T14) pomocí Western blot s použitím protilátky anti-pentaHis-HRP. Supernatant kultury (S) a lyzátu buněk (L) 293F.



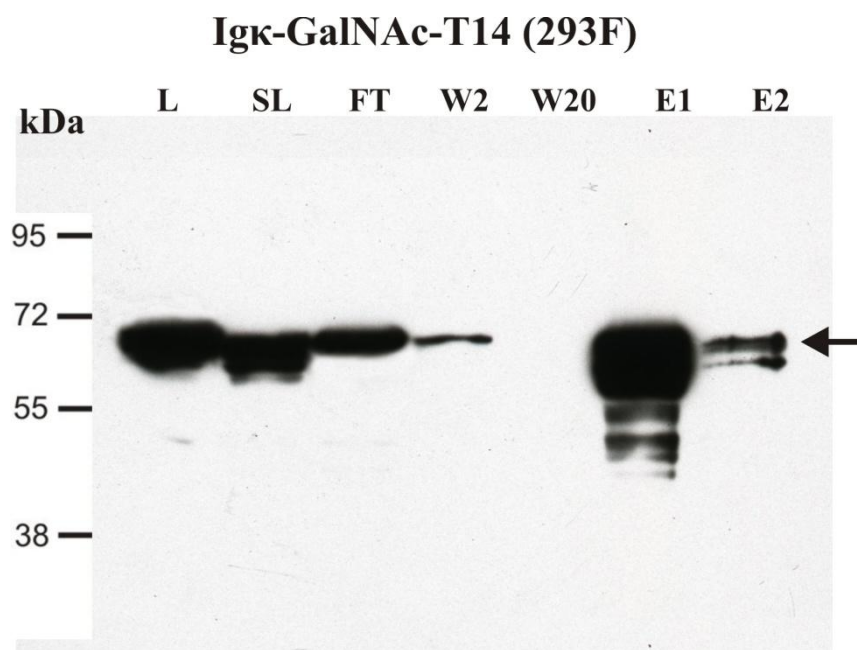
**Obrázek 25:** Srovnání intracelulárního a sekretovaného podílu Igκ-ST6GalNAc II (ST6II), Igκ-ST6GalNAc I (ST6I) pomocí Western blot s použitím protilátky anti-pentaHis-HRP. Supernatant kultury (S) a lyzátu buněk (L) 293F.



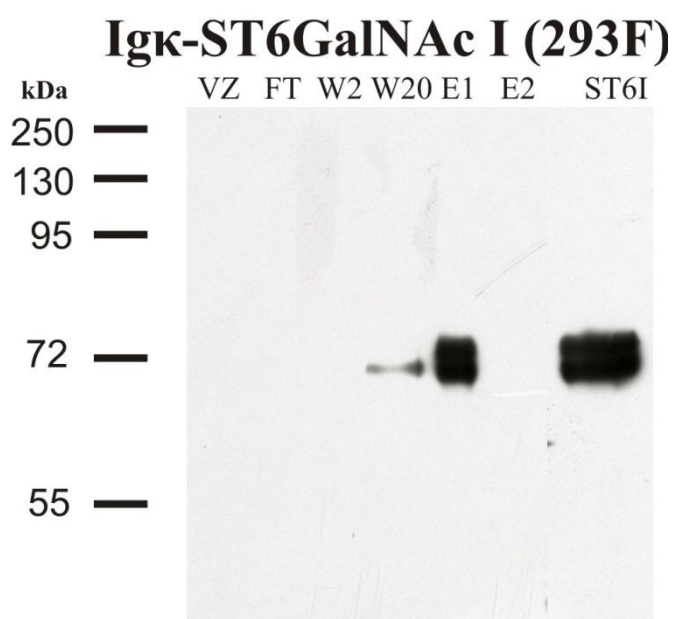


**Obrázek 26:** Srovnání intracelulárního a sekretovaného podílu Ig $\kappa$ -C1GalT1 (C1T1), Ig $\kappa$ -Cosmc (C1T2) pomocí Western blot s použitím protilátky anti-pentaHis-HRP. Supernatant kultury (S) a lyzátu buněk (L) 293F.

Následně byly jednotlivé rekombinantní glykosyltransferázy exprimovány ve 2l buněčné suspenze, byly purifikovány pomocí NiNTA agarózy a analyzovány pomocí Western blotu a anti-pentaHis-HRP protilátky (**Obrázky 27 - 30**). Eluční frakce rekombinantních proteinů byly zkoncentrovány do 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl. Proteiny byly uloženy při  $-20^{\circ}\text{C}$  a byly stabilní bez známek proteinové rozpadu nebo ztráty enzymatické aktivity po dobu minimálně 6 měsíců. Ani při dlouhodobém skladování na ledu nebo při  $+4^{\circ}\text{C}$  nebyl pozorován rozpad (**Obrázek 31**). Pro vyhodnocení čistoty byly preparace jednotlivých rekombinantních glykosyltransferáz separovány na 10% SDS-PAGE gelu a obarveny pomocí Brilliant Coomassie Blue. Koncentrace rekombinantních GT byla stanovena jako pro proteiny exprimované v bakulovirovém systému (**Obrázek 32**). Po koncentraci na ultrafiltračním koncentrátorů byla u všech proteinů dosažena koncentrace vyšší než 1 mg/ml a čistota byla určena 75 % pro Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 a Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II a 95 % pro Ig $\kappa$ -ST6GalNAc srovnáním denzit proužku odpovídajícího proteinu a ostatních přítomných proužků. Z jednoho litru kultury 293F byly izolovány 4 mg Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, 2 mg Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I a 1 mg Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II. Podobně jako v případě exprese v bakulovirovém expresním systému použití lidské expresní linie 293F nevedlo k účinné sekreci glykosyltransferáz Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1, Ig $\kappa$ -Cosmc (**Obrázky 24, 26**). Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1 proto byly purifikovány z buněčné pelety. Afinitní purifikace umožnila připravit vysoce čisté proteiny použitelné pro následující enzymatické analýzy.

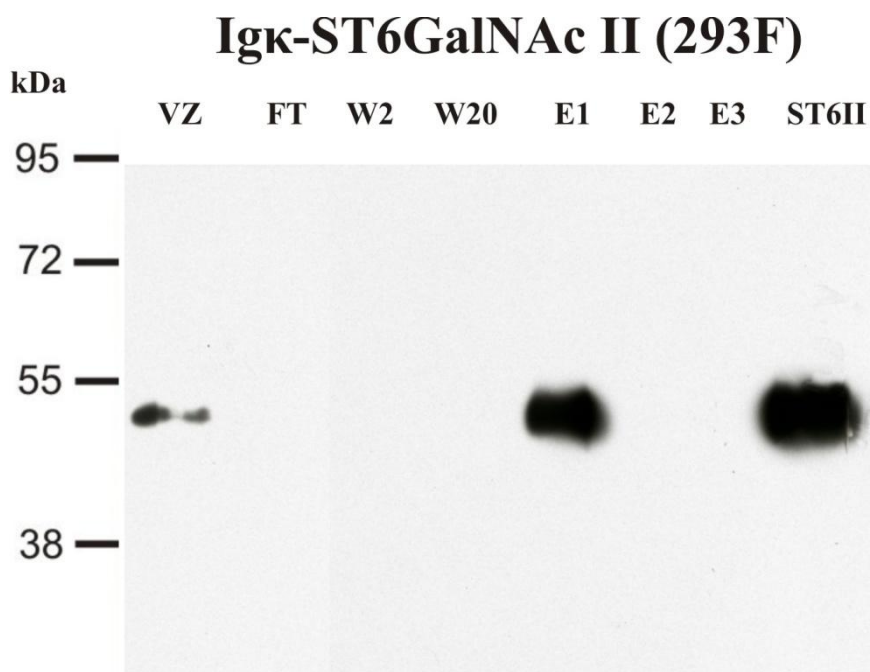


**Obrázek 27:** Optimalizace podmínek afinitní purifikace rekombinantního Igκ-GalNAc-T14 vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony z lyzátu 293F buněk (L). Pro srovnání alikvot supernatantu lyzátu (LS) po centrifugaci 10 000 rpm/10 min byl nanesen na gel rovněž. Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly analyzovány: nenávaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1 a E2; pufr obsahující 150 mM imidazol).



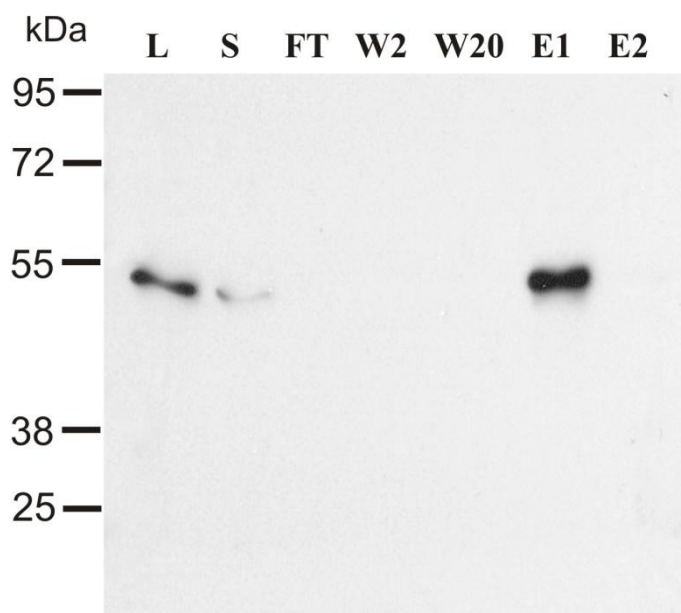
**Obrázek 28:** Optimalizace podmínek afinitní purifikace rekombinantního Igκ-ST6GalNAc I vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován

pomocí NiNTA kolony ze supernatantu kultury (VZ) 293F buněk. Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly rovněž analyzovány: nenavázaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1 a E2; pufr obsahující 150 mM imidazol). ST6I purifikovaný protein po koncentraci.



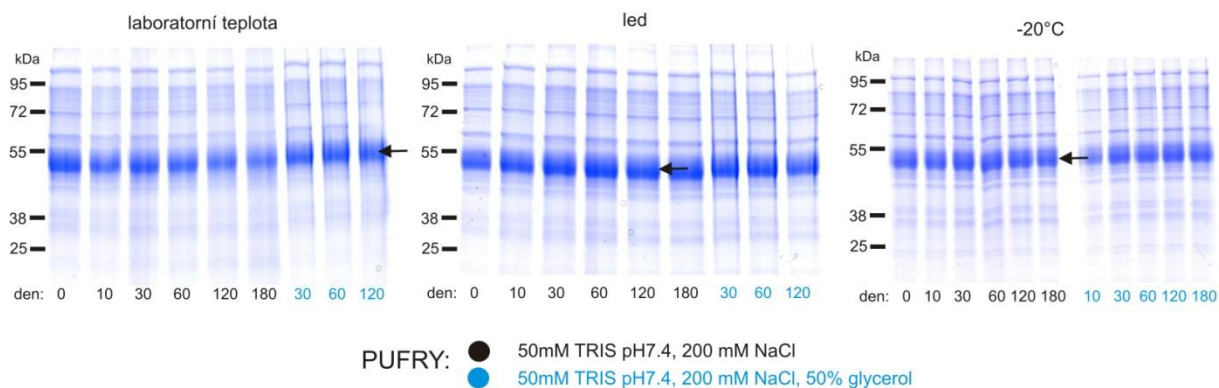
**Obrázek 29:** Optimalizace podmínek afinitní purifikace rekombinantního Igκ-ST6GalNAc II vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony ze supernatantu kultury (VZ) 293F buněk. Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly rovněž analyzovány: nenavázaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1, E2, E3; pufr obsahující 150 mM imidazol). ST6II purifikovaný protein po koncentraci.

## Igκ-C1GalT1 (293F)

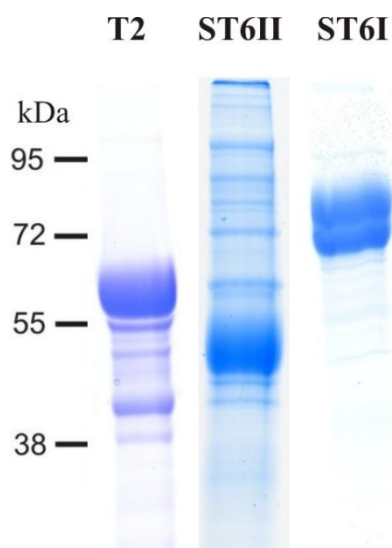


**Obrázek 30:** Optimalizace podmínek afinitní purifikace rekombinantního Igκ-C1GalT1 vyhodnocená pomocí Western blot a anti-pentaHis-HRP protilátky. Protein byl izolován pomocí NiNTA kolony z lyzátu 293F buněk (L). Pro srovnání alikvot supernatantu (S) byl nanesen na gel rovněž. Jednotlivé frakce vycházející z kolony byly analyzovány: nenavázaná frakce (FT), promývací frakce se vzrůstající koncentrací imidazolu 2 a 20 mM (W2, W20), eluční frakce (E1 a E2; pufr obsahující 150 mM imidazol).

## Igκ-ST6GalNAc II (293F)



**Obrázek 31:** Stanovení stability Igκ-ST6GalNAc II. Rekombinantní protein byl po purifikaci na NiNTA koloně koncentrován do 50 mM TRIS pH7.4, 200 mM NaCl. Vzorke proteinu pro stanovení stability v pufru 50 mM TRIS pH7.4, 200 mM NaCl (černé písmo) a 50 mM TRIS pH7.4, 200 mM NaCl s 50% glycerolem (modré písmo) byly uskladněny při laboratorní teplotě, na ledu a při -20°C po dobu 0 až 180 dní. Vzorke Igκ-ST6GalNAc II byly analyzovány na 10% SDS-PAGE gelu a barveny pomocí Brilliant Coomassie Blue.



**Obrázek 32:** Stanovení čistoty purifikovaných rekombinantních proteinů. SDS-PAGE analýza koncentrovaných proteinů Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I a Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II. Rekombinantní protein byly po koncentraci na ultrafiltračním koncentrátoru separovány pomocí 10% SDS-PAGE gelu a barveny pomocí Brilliant Coomassie Blue.

#### 4.2.2.2 *Produkce glykosyltransferáz pomocí HEK 293T buněk*

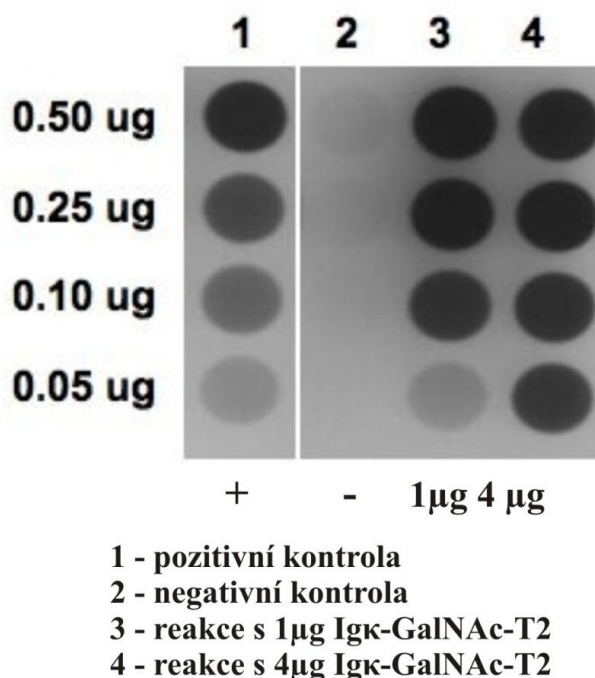
Produkce rekombinantních proteinů TM-GalNAc-T2, TM-GalNAc-T14, TM-ST6GalNAc I, TM-ST6GalNAc II, Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1, Ig $\kappa$ -Cosmc, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II byla ověřena produkcí v HEK 293T buňkách (**Obrázky 8, 13**). Molekulovou hmotnost a pI rekombinantních glykosyltransferáz shrnuje **Tabulka 18**. U vektorů kódujících glykosyltransferázy v plné délce byla potvrzena produkce rekombinantních proteinů. Pozitivita signálu v buněčném lyzátu potvrzuje fixaci v Golgiho komplexu pomocí přítomné transmembránové domény. Při analýze efektivity sekrece sekretovaných forem jednotlivých glykosyltransferáz (bez transmembránové domény a s připojeným sekrečním signálem z myšího lehkého řetězce ( $\kappa$ ) imunoglobulinu byla potvrzena sekrece pouze pro Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II. Podobně jako v případě exprese v bakulovirovém expresním systému a lidské expresní linii 293F, použití linie HEK 293T buněk nevedlo k účinné sekreci glykosyltransferáz Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1, Ig $\kappa$ -Cosmc (data nejsou ukázána).

**Tabulka 18:** Základní fyzikálně-chemické vlastnosti rekombinantních glykosyltransferáz produkované 293T.

| GT           | Molekulová hmotnost (kDa) | pI   |
|--------------|---------------------------|------|
| GalNAc-T2    | 64,7                      | 8,63 |
| GalNAc-T14   | 64,3                      | 7,84 |
| C1GalT1      | 42,2                      | 6,17 |
| Cosmc        | 36,4                      | 6,35 |
| ST6GalNAc I  | 68,6                      | 9,93 |
| ST6GalNAc II | 41,9                      | 9,38 |

### 4.3 Aktivita rekombinantních glykosyltransferáz

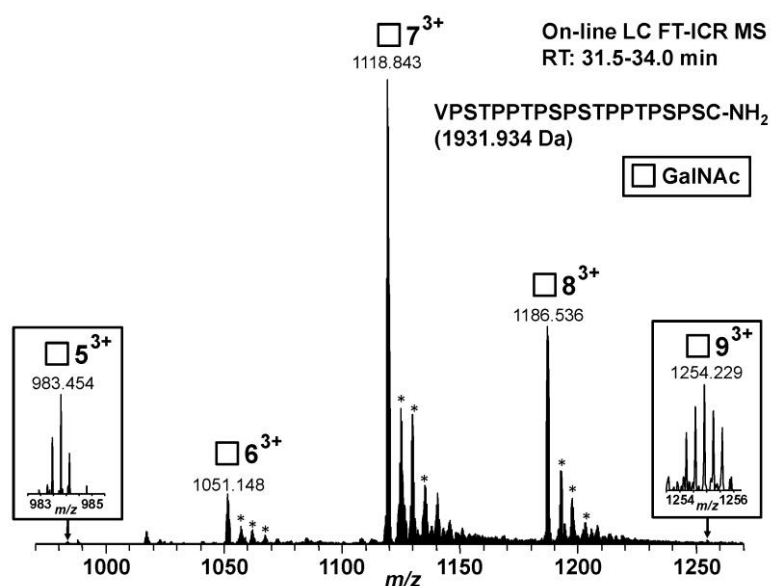
Vzhledem k tomu, že GalNAc-T2 iniciuje *O*-glykosylaci IgA1, byl jako první rekombinantní enzym důkladně charakterizován vzhledem k jeho aktivitě. Cílem bylo potvrzení, že rekombinantní protein je enzymaticky aktivní a následné využití charakterizovaného proteinu pro studium průběhu glykosylace pantové oblasti IgA1 molekuly. Aktivita Igκ-GalNAc-T2 produkované v Sf9 buňkách byla analyzována pomocí vazby lektinu HAA, specificky rozpoznávajícího terminální GalNAc. Jako substrát byl použit syntetický peptid opovídající pantové oblasti IgA1 konjugoavaný s BSA. Tento substrát byl inkubován s rekombinantním Igκ-GalNAc-T2 v přítomnosti UDP-GalNAc jako donor GalNAc (**Obrázek 33**). Lektinový dot-blot potvrdil, že Igκ-GalNAc-T2 je enzymaticky aktivní [27].



**Obrázek 33:** Aktivita Igκ-GalNAc-T2 izolovaná z Sf9 pomocí metody HAA lektinového dot-blotu. 1 nebo 4 μg rekombinantního enzymu byly přidány společně s UDP-GalNAc do reakcí

s postupným ředěním akceptorového peptidu odpovídajícího HR IgA1 (0,5 – 0,05 µg). Pantová oblast IgA1 s navázanými GalNAc byla pozitivní kontrolou. Negativní kontrolou byla reakce bez přidání UDP-GalNAc.

Pro potvrzení enzymatické aktivity Igκ-GalNAc-T2 byla provedena analýza výše ošetřeného peptidu pomocí hmotnostní spektrometrie. Působením připraveného rekombinantního proteinu bylo na syntetický HR IgA1 v závislosti na době inkubace připojeno 5 – 9 GalNAc zbytků. Nejčastější variantou byla varianta se sedmi navázanými GalNAc. Potvrdila se tak aktivita Igκ-GalNAc-T2 a jeho schopnost sekvenčního připojování GalNAc na peptidový akceptor (**Obrázek 34**) [27].

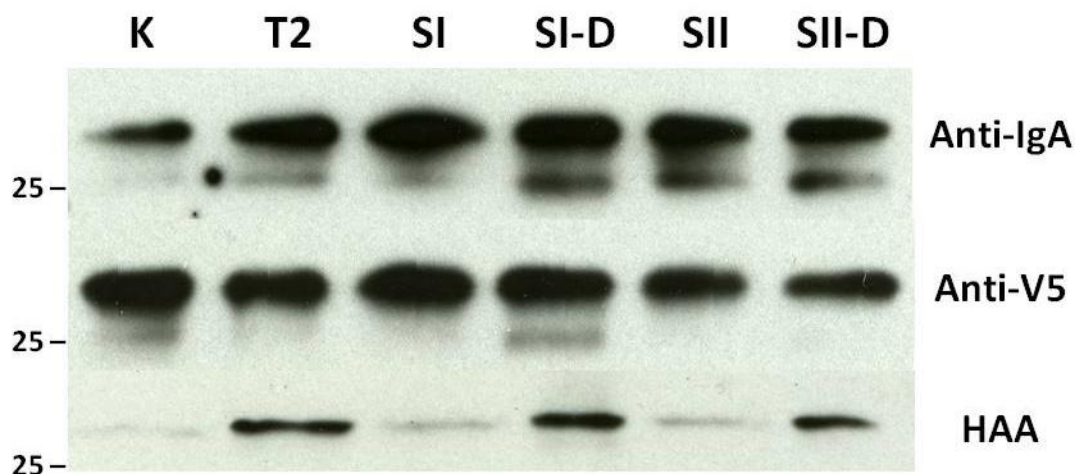


**Obrázek 34:** Hmotnostní spektrometrie LC FT-ICR syntetického HR IgA1 glykosylovaného pomocí Igκ-GalNAc-T2. Po inkubaci IgA1 HR peptidu s Igκ-GalNAc-T2 po dobu 24 hodin při 37°C v přítomnosti donoru GalNAc (UDP-GalNAc) byla provedena hmotnostně spektrometrická analýza počtu připojených GalNAc k HR peptidu pomocí LC FT-ICR (provedl Dr. Kazuo Takahashi, Ústav mikrobiologie, UAB, Birmingham, Alabama, USA).

Rovněž byla detailně charakterizována aktivita rekombinantních Igκ-ST6GalNAc I a zejména Igκ-ST6GalNAc II jako významného patogenetického faktoru IgAN. Aktivita byla hodnocena poklesem reakce HAA s HR IgA1 substrátem s předem připojenými GalNAc po inkubaci s rekombinantními sialyltransferázami Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II v přítomnosti donoru sialové kyseliny CMP-NeuAc v uspořádání Western blot, neboť sialylace GalNAc brání jeho rozlišení HAA lektinem (**Obrázek 35**, sloupce SI a SII). Specifické



potvrzení faktu, že pokles reaktivity HAA byl způsoben sialylací GalNAc bylo prokázáno obnovením reakce HAA s HR peptidem po enzymatickém odstranění sialové kyseliny enzymem sialidázou (**Obrázek 35**, sloupce SI-D a SII-D). Aktivita rekombinantních Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II byla dále potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie spřažené s HPLC chromatografií (LC-FT) s vysokým rozlišením (**Obrázky 36, 37**).

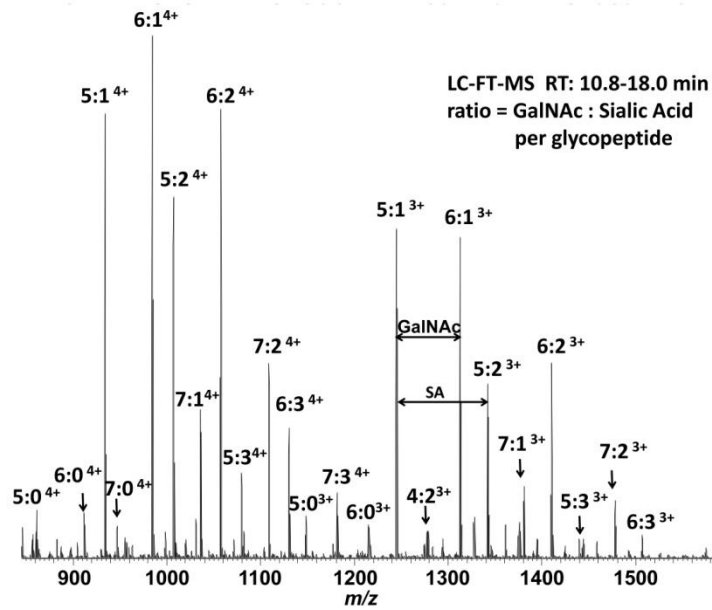


**Obrázek 35:** Průkaz aktivity Igκ-GalNAc-T2, Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II vůči rekombinantnímu proteinu Ca1-HR-Ca2 představujícímu fragment IgA1 odpovídající první konstantní doméně těžkého řetězce IgA1 (Ca1), pantové oblasti (HR) a druhé konstantní doméně IgA1 těžkého řetězce (Ca2) připraveného v *E. coli* expresním systému. Připojení GalNAc a jeho sialylace byla hodnocena pomocí reaktivity s HAA lektinem v uspořádání Western bot. Neglykosylovaný fragment Ca1-HR-Ca2 IgA1 (K) byl galaktosylován pomocí Igκ-GalNAc-T2 (T2) a sialylován Igκ-ST6GalNAc II (SII) nebo Igκ-ST6GalNAc I (SI). Blokování reaktivity HAA způsobené sialylací GalNAc na Ca1-HR-Ca2 bylo potvrzeno obnovením reakce s HAA po enzymatickém odstranění sialové kyseliny sialidázou z *Arthrobacter ureafaciens* (SII-D, SI-D). Průkaz stejného množství Ca1-HR-Ca2 fragmentu použitého na Western blot analýzu byl proveden detekcí Ca1-HR-Ca2 pomocí anti-IgA a pomocí anti-V5 protilátek (panely Anti-V5 a Anti-IgA).

Zajímavé pozorování vyšlo ze srovnání MS analýz počtu připojených sialových kyselin k GalNAc na pantové oblasti IgA1. Zatímco Igκ-ST6GalNAc I připojila po 36 hodinové inkubaci maximálně jednu až dvě sialové kyseliny na všech 9 potvrzených GalNAc na pantové oblasti IgA1, Igκ-ST6GalNAc II byla schopna za stejných podmínek připojit o jednu sialovou kyselinu navíc (**Obrázky 36, 37**).

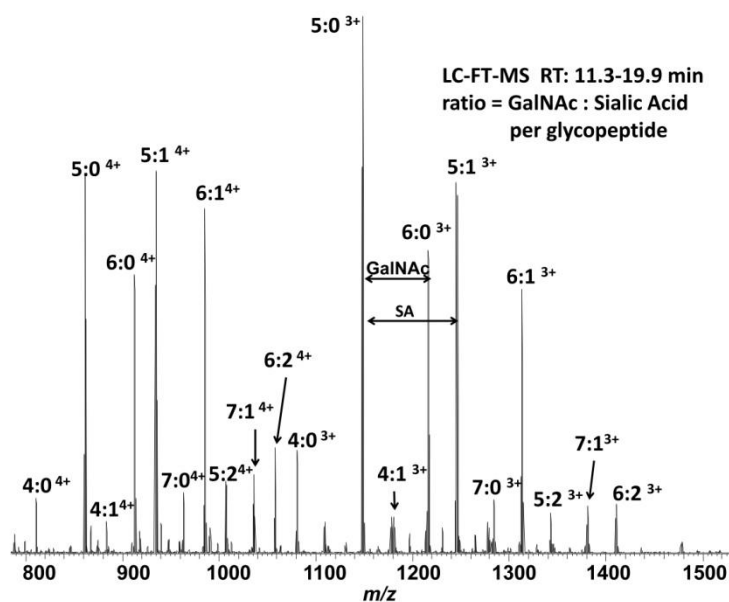


VPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPR + GalNAc-T2 + ST6GalNAc-II



**Obrázek 36:** Hmotnostní spektrometrie LC FT-ICR syntetického HR IgA1 glykosylovaného pomocí Igκ-GalNAc-T2 a sialylovaného pomocí Igκ-ST6GalNAc II. 1 μg syntetického HR IgA1 byl GalNAc-osylován 8 hod a po inaktivaci GalNAc-T2 byly 0,4 μg aliquoty GalNAc-osylovaného syntetického HR IgA1 sialylované 24 hod. Byly detekovány nesialylované i sialylované formy GalNAc-osylovaného HR peptidu s 4 – 7 připojenými GalNAc a 0 – 3 připojenými NeuAc. Jednotlivé glykopeptidy na syntetickém HR IgA1 jsou označeny jako poměr GalNAc : NeuAc.

VPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPR + GalNAc-T2 + ST6GalNAc-I



**Obrázek 37:** Hmotnostní spektrometrie LC FT-ICR syntetického HR IgA1 glykosylovaného pomocí Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 a sialylovaného pomocí Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I. 1  $\mu$ g syntetického HR IgA1 byl GalNAc-osylován 8 hod a po inaktivaci GalNAc-T2 byly 0,4  $\mu$ g aliquoty GalNAc-osylovaného syntetického HR IgA1 sialylované 24 hod. Byly detekovány nesialylované i sialylované formy GalNAc-osylovaného HR peptidu s 4 – 7 připojenými GalNAc a 0 – 3 připojenými NeuAc. Jednotlivé glykopeptidy na syntetickém HR IgA1 jsou označeny jako poměr GalNAc : NeuAc.

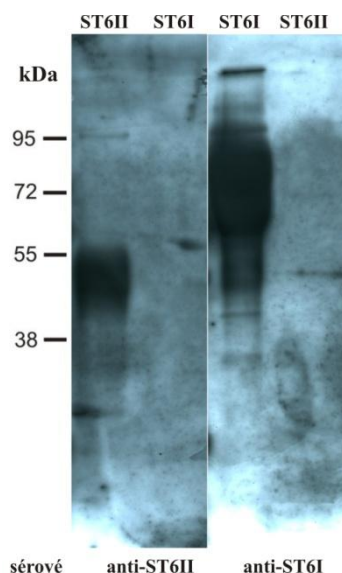
Hodnocení aktivity pomocí LC-FT provedl Dr. Kazuo Takahashi na Ústavu mikrobiologie, UAB, Birmingham, Alabama, USA [27, 45-47].

#### **4.4 Příprava protilátek pro průkaz jednotlivých glykosyltransferáz v uspořádání Western blot a fluorescenční mikroskopii**

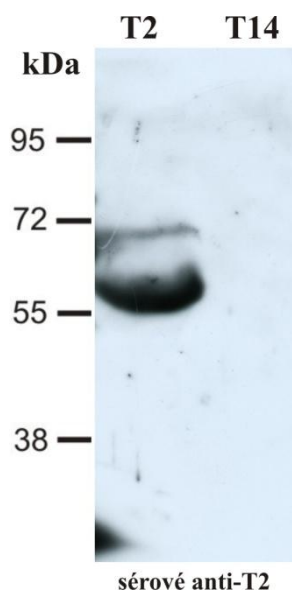
Pro indukci sérových myších protilátek specificky reagujících s glykosyltransferázami GalNAc-T2, ST6GalNAc II a ST6GalNAc I byla použita DNA vakcinace pomocí rekombinovaných plasmidů TM-T2-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6I-pcDNA3.1-V5/His, TM-ST6II-pcDNA3.1-V5/His popsaných výše. Sérové hladiny protilátek po třetí imunizaci, stanovené pomocí ELISA, byly vysoké pro všechny tři testované DNA vakcíny. Hodnoceno pomocí end-point titru sérových protilátek, imunizace myši plasmidem kódujícím GalNAc-T2 indukovala titer 1: 12 000, u myši imunizovaných ST6GalNAc II byl titer 1: 100 000 a u myši imunizovaných ST6GalNAc I byl titer 1: 94 000. Skřížená reaktivita sérových protilátek byla nízká, jak vyplývá z reaktivit s ostatními antigeny použitými k potažení jamek ELISA panelů.

##### **4.4.1 Specificita sérových protilátek ve Western blot**

Hyperimunní séra byla dále testována na specificitu indukovaných protilátek ve Western blot uspořádání srovnáním reaktivity s jednotlivým zejména isomerními rekombinantními glykosyltransferázami. Reaktivita hyperimunních sér specifických k ST6GalNAc I a ST6GalNAc II vykazovala vysokou specificitu při srovnání reaktivit s rekombinantními Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II a Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I (**Obrázek 38**). Podobně reaktivita hyperimunních sér specifických k GalNAc-T2 vykazovala vysokou specificitu k rekombinantnímu Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 kdežto s rekombinantním Ig $\kappa$ -GalNAc-T14 nereagovala (**Obrázek 39**).



**Obrázek 38:** Analýza specificity sérových protilátek indukovaných proti ST6GalNAc I (anti - ST6I), ST6GalNAc II (anti-ST6II) na základě srovnání reaktivit s rekombinantními proteiny Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I (ST6I), Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II (ST6II) v uspořádání Western blot .



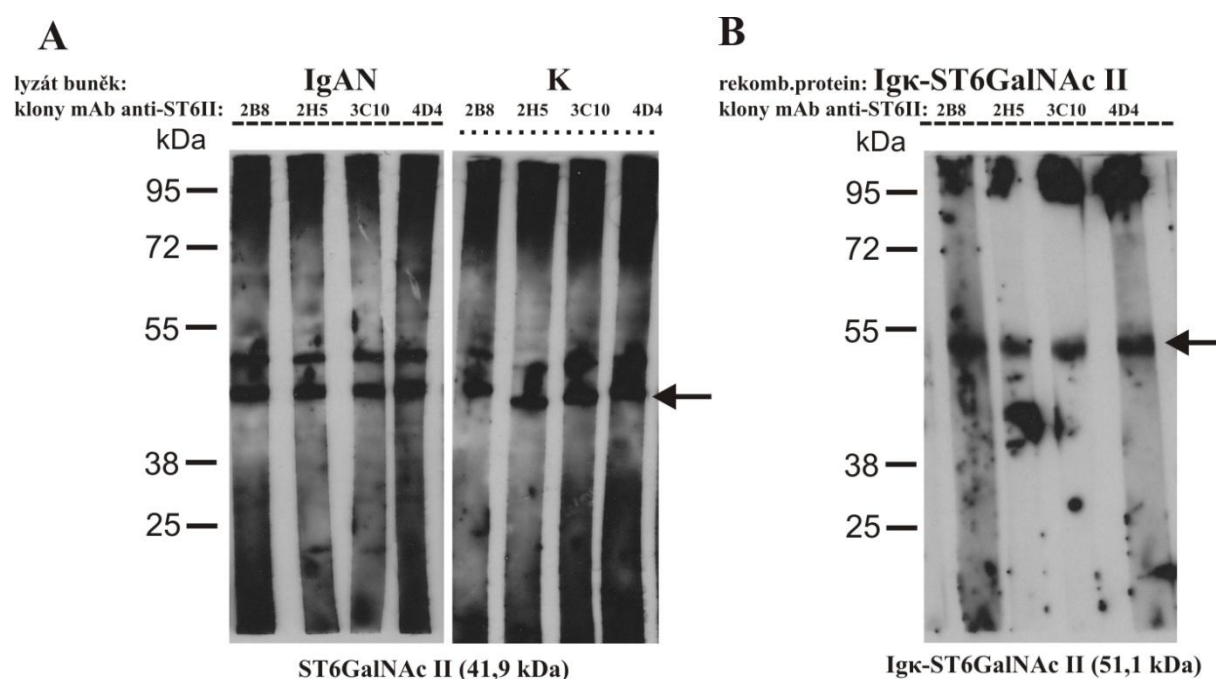
**Obrázek 39:** Analýza specificity sérových protilátek indukovaných proti GalNAc-T2 (sérové anti-T2) na základě srovnání reaktivit s rekombinantními proteiny Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 (T2), a Ig $\kappa$ -GalNAc-T14 (T14) v uspořádání Western blot.

#### 4.4.2 Příprava a charakterizace monoklonálních protilátek

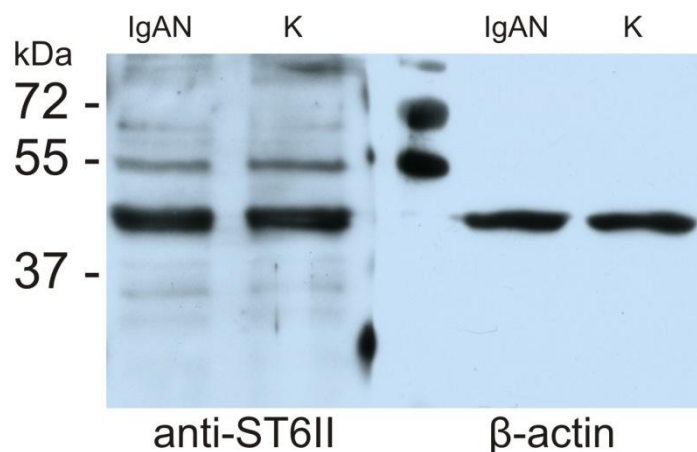
V dalším kroku jsme přistoupili k přípravě monoklonální protilátky proti ST6GalNAc II ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, Brno. Pro přípravu hybridomů byly použity splenocyty od myši imunizované TM-ST6II-pcDNA3.1-V5/His

vykazující nejvyšší titry specifických protilátek. Po skríningu 1000 hybridomů s použitím ELISA byly vybrány 4, jež vykazovaly nejvyšší reaktivitu pro další testování.

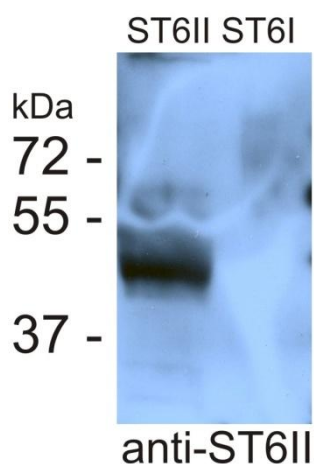
Specifická získaných klonů monoklonálních protilátek specifických k ST6GalNAc II byla testována pomocí imunodetekce lyzátů EBV-immortalizovaných buněk produkujících IgA1 izolovaných od pacientů s IgA nefropatií a od zdravých kontrol. Vazba monoklonálních protilátek byla detekována anti-myší IgG značenou HRP (**Obrázek 40**). Pro Western blot analýzy byla vybrána jako optimální protilátka 2H5. Specifická reakce byla testována ve standardním Western blot vůči buněčnému lyzátu (**Obrázek 41**) a proti rekombinantnímu Igκ-ST6GalNAc II a jako kontrola specifity byl použit rekombinantní Igκ-ST6GalNAc I (**Obrázek 42**).



**Obrázek 40:** Testování specifity 4 připravených klonů monoklonálních protilátek specifických k ST6GalNAc II pomocí Western blot. (A) Lyzát buněk produkujících IgA1 od pacientů s IgA nefropatií (IgAN) a zdravých kontrol (K) byl rozdělen pomocí SDS-PAGE, blotován na PVDF a membrány byly po zablokování inkubovány v uspořádání multiscreen s jednotlivými klony monoklonálních protilátek (2B8, 2H5, 3C10 a 4D4). Vazba byla prokázána anti-myší IgG-HRP protilátkou. ST6GalNAc II má molekulovou hmotnost 41,9 kDa. Výsledkem reakce jsou dva proužky, (dolní) odovídá ST6GalNAc II a horní (těžší) je výsledkem nespecifické reakce, která optimalizací podmínek inkubace byla minimalizována. (B) Reaktivita jednotlivých klonů s rekombinantním Igκ-ST6GalNAc II (51,1 kDa).



**Obrázek 41:** Výsledek detekce ST6GalNAc II z buněčného lyzátu (viz Obr. 38) za optimalizovaných podmínek blokování a detekce anti-ST6II. Lyzát buněk produkujících IgA1 od pacientů s IgA nefropatií (IgAN) a od zdravých kontrol (K) byl detekován protilátkou klon 2H5 (anti-ST6II) a pomocí komerční protilátky proti  $\beta$ -aktinu ( $\beta$ -actin).



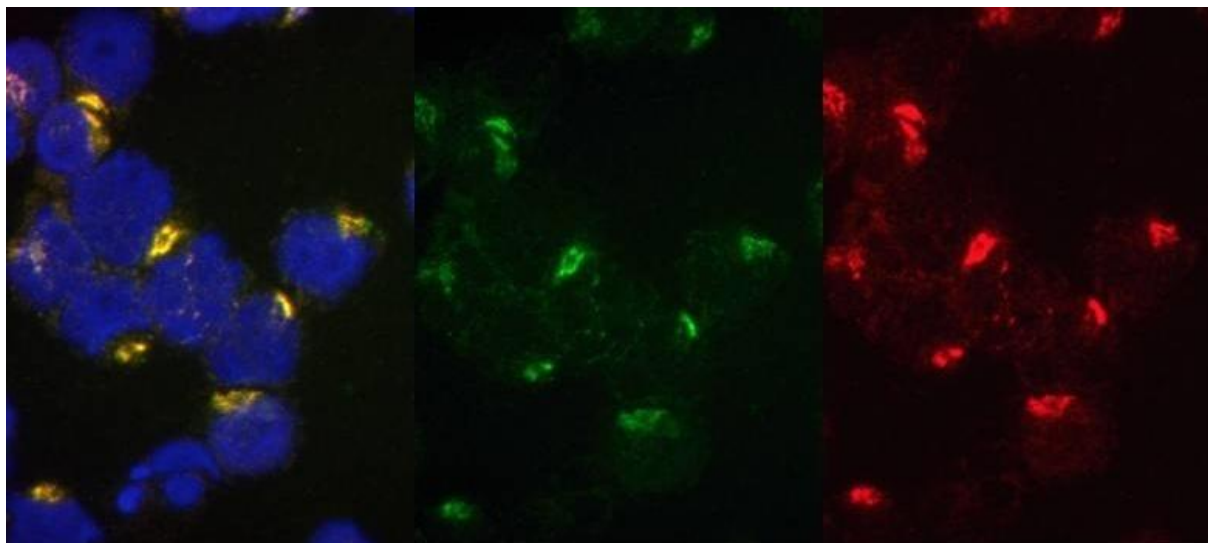
**Obrázek 42:** Analýza specifity monoklonální protilátky proti ST6GalNAc II, klon 2H5 (anti-ST6II) na základě srovnání reaktivit s rekombinantními proteiny Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II (ST6II), Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I (ST6I) v uspořádání Western blot.

## 4.5 Lokalizace glykosyltransferáz v Golgiho komplexu pomocí monoklonálních protilátek

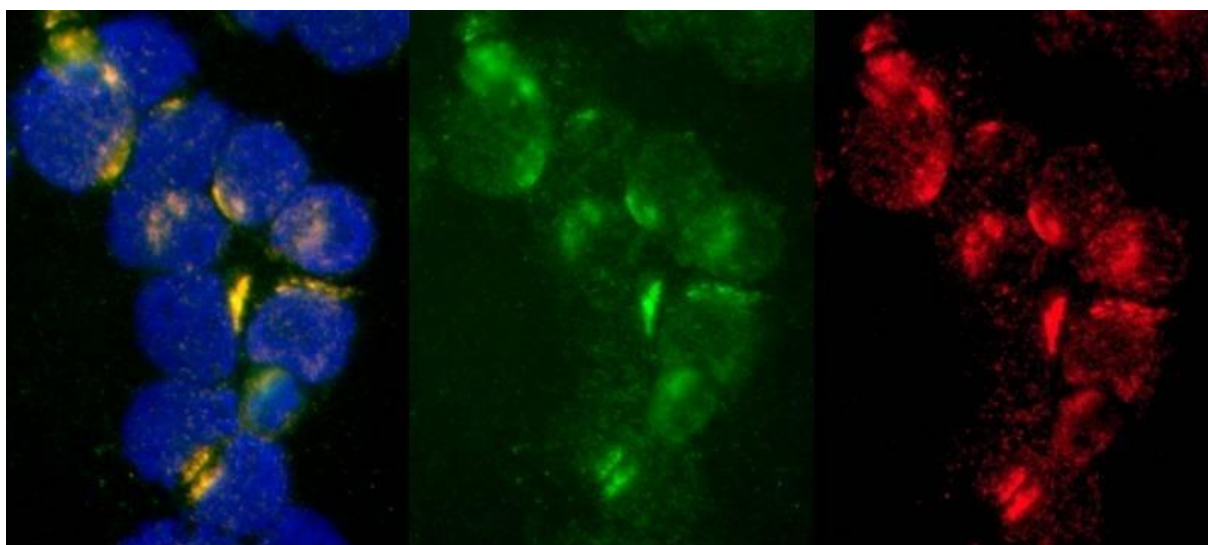
### 4.5.1 Fluorescenční mikroskop

Iniciální série fluorescenčně mikroskopických analýz vedla k identifikaci klonu ST6GalNAc II specifické protilátky s nejvyšším odstupem signálu od pozadí za optimalizovaných podmínek blokování preparátu a ředění protilátky (klon 2B8). **Obrázky 43-46** ukazují mikroskopické preparáty IgA1-produkujících buněk prohlížených na

fluorescenčním mikroskopu. Obrázky byly pořízeny po barvení buněk protilátkami proti *cis*-Golgi, *trans*-Golgi a proti ST6GalNAc II (klon 2B8).

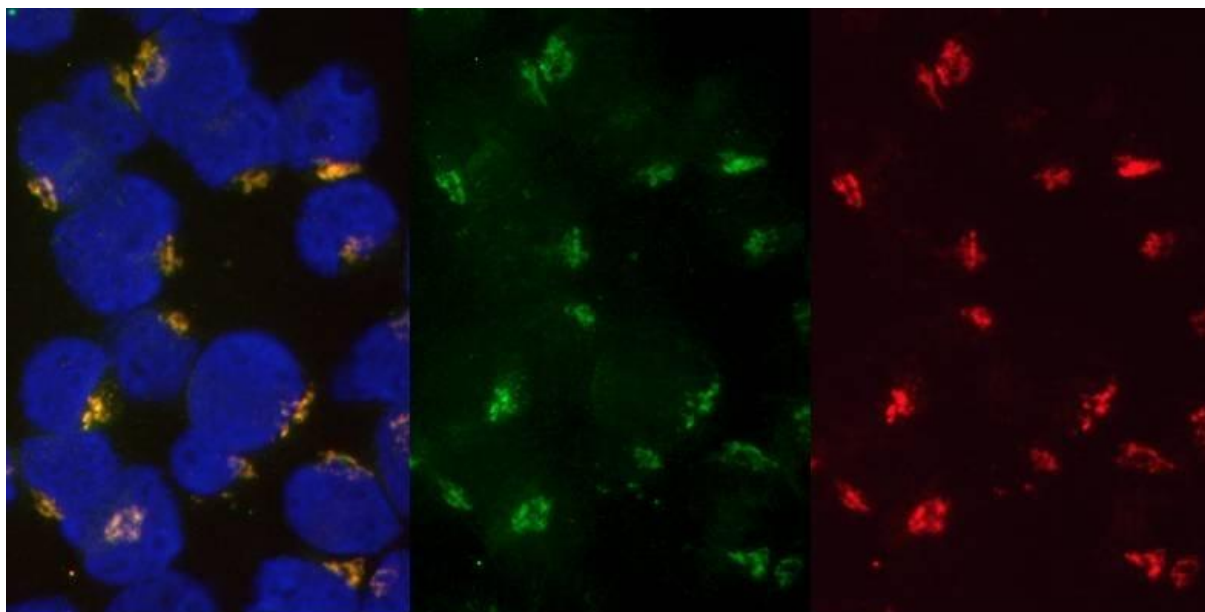


**Obrázek 43:** Fluorescenční mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II a *cis*-Golgi IgA1-produkujících buněk od pacientů s IgA nefropatií pomocí anti-ST6II klon 2B8 detekované anti-myší IgG-FITC (zelená), *cis*-Golgi je značeno králičí anti-gm130 detekovanou anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádru obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.

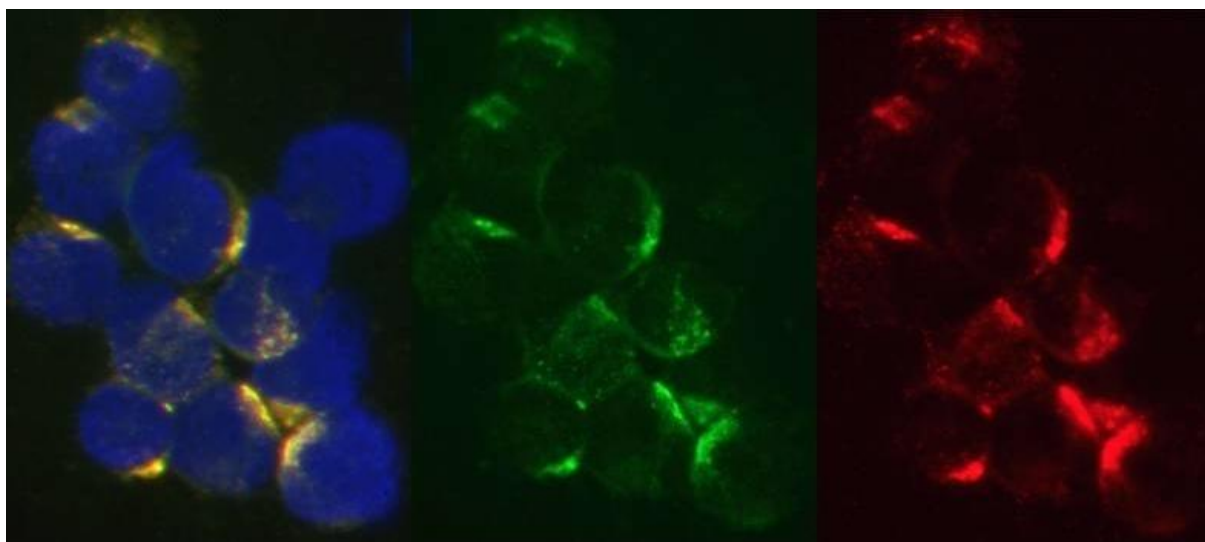


**Obrázek 44:** Fluorescenční mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II a *trans*-Golgi IgA1-produkujících buněk od pacientů s IgA nefropatií pomocí anti-ST6II klon 2B8 detekované anti-myší IgG-FITC (zelená), *trans*-Golgi je značeno králičí anti-tgn46 detekovanou anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádru obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.





**Obrázek 45:** Fluorescenční mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II a *cis*-Golgi IgA1-produkujících buněk od zdravých kontrol pomocí anti-ST6II klon 2B8 detekované anti-myší IgG-FITC (zelená), *cis*-Golgi je značeno králičí anti-gm130 detekovanou anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádro obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.



**Obrázek 46:** Fluorescenční mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II a *trans*-Golgi IgA1-produkujících buněk od zdravých kontrol anti-ST6II klon 2B8 detekované anti-myší IgG-FITC (zelená), *trans*-Golgi je značeno králičí anti-tgn46 detekovanou anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádro obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.

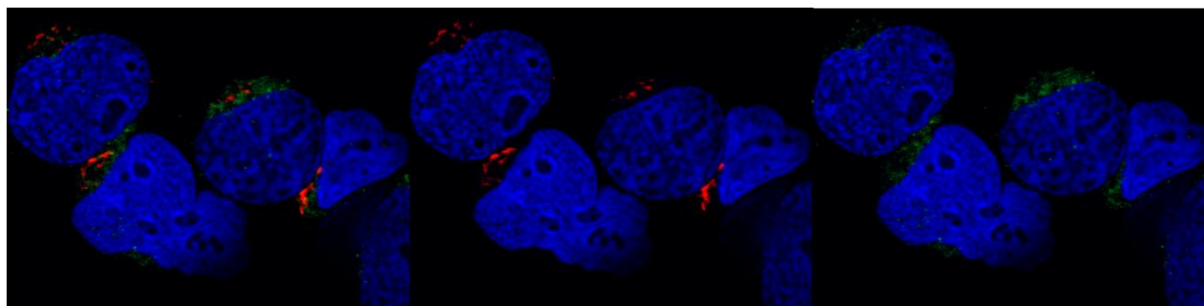
Kolokalizační analýza 10 snímků potvrdila dominantní lokalizaci ST6GalNAc II u skupiny IgAN pacientů a zdravých kontrol v *trans*-Golgi komplexu. U buněk od pacientů s IgAN byla však významně vyšší i kolokalizace s *cis*-Golgi markerem oproti zdravým kontrolám. Toto pozorování bylo dále verifikováno pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie (**Tabulka 19**).

**Tabulka 19:** Kolokalizace ST6GalNAc II v Golgiho komplexu buněk pacientů s IgAN a zdravých kontrol pomocí fluorescenčního mikroskopu.

| kolokalizace v buňkách                               | Pearsonův koeficient | Překryv | %     | Rozdíl |
|--|----------------------|---------|-------|--------|
| zdravých kontrol, ST6II vz <i>cis</i> -Golgi         | 0,7092               | 0,9494  | 70,92 | 10,05  |
| IgAN pacientů, ST6II vz <i>cis</i> -Golgi            | 0,8100               | 0,9600  | 81,00 |        |
| buňky zdravých kontrol, ST6II vz <i>trans</i> -Golgi | 0,8610               | 0,9730  | 86,10 | 2,74   |
| buňky IgAN pacientů, ST6II vz <i>trans</i> -Golgi    | 0,8336               | 0,9725  | 83,36 |        |

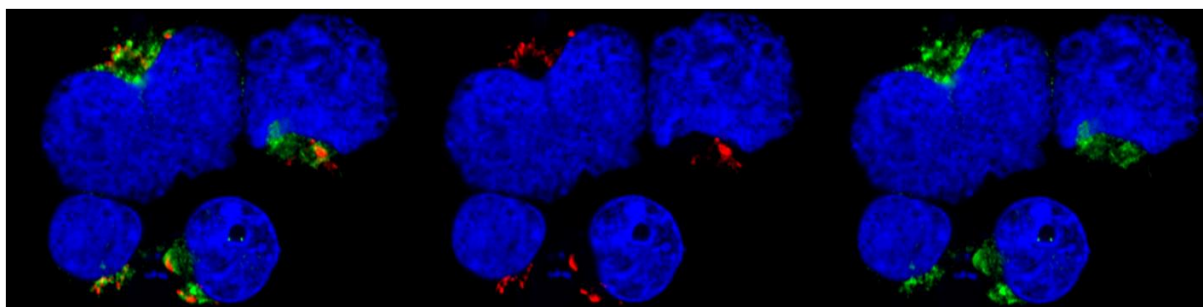
#### 4.5.2 Konfokální mikroskop

V dalším experimentu byly výše popsané preparáty (**Obrázky 42-46**) prohlíženy v konfokálním mikroskopu (**Obrázky 47-50**). **Obrázky 47-50** ukazují mikroskopické preparáty IgA1-produkujících buněk prohlížených na konfokálním mikroskopu.

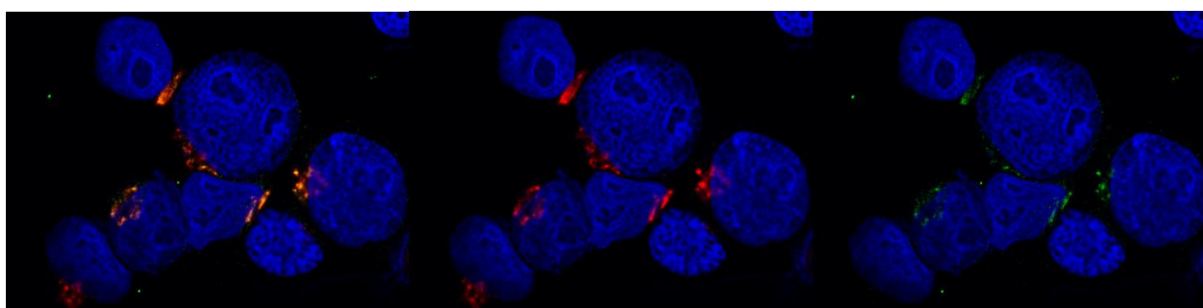


**Obrázek 47:** Konfokálně mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II v *cis*-Golgi EBV-immortalizovaných IgA1-produkujících buněk izolovaných z IgAN pacientů. ST6GalNAc II detekována anti-ST6II protilátkou klon 2B8 a anti-myší IgG-FITC (zelená). *Cis*-Golgi barvené králičí anti-gm130 protilátkou a anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádro obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.

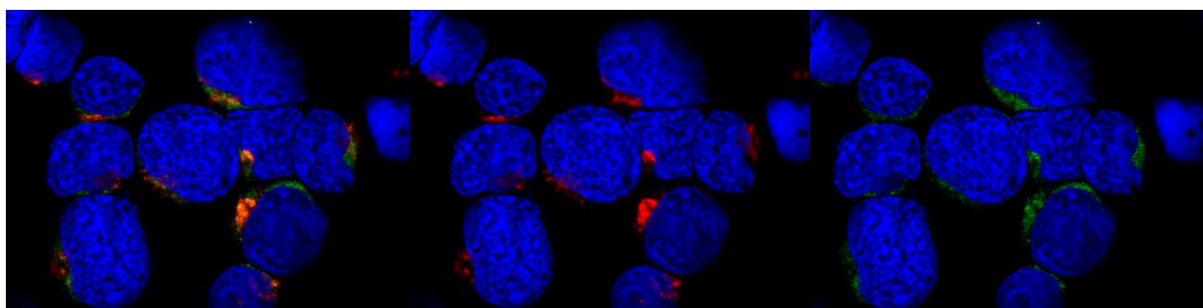




**Obrázek 48:** Konfokálně mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II v *trans*-Golgi EBV-immortalizovaných IgA1-produkujících buněk získaných od IgAN pacientů. ST6GalNAc II detekováno pomocí anti-ST6II klon 2B8 a anti-myší IgG-FITC (zelená). *Trans*-Golgi barvené králičí anti-tgn46 protilátkou a anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádro obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.



**Obrázek 49:** Konfokálně mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II v *cis*-Golgi EBV-immortalizovaných IgA1-produkujících buněk získaných od zdravých kontrol. ST6GalNAc II detekováno pomocí anti-ST6II klon 2B8 a anti-myší IgG-FITC (zelená). *Cis*-Golgi barvené králičí anti-gm130 protilátkou a anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádro obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.



**Obrázek 50:** Konfokálně mikroskopická lokalizace ST6GalNAc II v *trans*-Golgi EBV-immortalizovaných IgA1-produkujících buněk získaných od zdravých jedinců pomocí anti-ST6GalNAc II protilátky (klon 2B8) a anti-myší IgG-FITC (zelená). *Trans*-Golgi barvené králičí anti-gm130 protilátkou a anti-králičí IgG-Cy3 (červená). Jádro obarveno DAPI. Žlutá barva představuje překryv červeného a zeleného signálu.

Kolokalizační analýza 10 snímků potvrdila výsledky standardní fluorescenční mikroskopie, tedy dominantní lokalizaci ST6GalNAc II u skupiny IgAN pacientů a zdravých kontrol v *trans*-Golgi komplexu s významným posuvem směrem k *cis*-Golgi u buněk od pacientů s IgAN (**Tabulka 20**).

**Tabulka 20:** Kolokalizace ST6GalNAc II v Golgiho komplexu buněk pacientů s IgAN a zdravých kontrol pomocí konfokálního mikroskopu.

| kolokalizace v buňkách                               | Pearsonův koeficient | Překryv | %     | Rozdíl |
|--|----------------------|---------|-------|--------|
| zdravých kontrol, ST6II vz <i>cis</i> -Golgi         | 0,7810               | 0,9494  | 78,10 | 13,40  |
| IgAN pacientů, ST6II vz <i>cis</i> -Golgi            | 0,9148               | 0,9600  | 91,48 |        |
| buňky zdravých kontrol, ST6II vz <i>trans</i> -Golgi | 0,8737               | 0,9730  | 87,37 | 2,06   |
| buňky IgAN pacientů, ST6II vz <i>trans</i> -Golgi    | 0,8943               | 0,9725  | 89,43 |        |

## 5 Diskuze

IgA nefropatie (IgAN) je autoimunitní onemocnění charakterizované ukládáním imunokomplexů (IK) IgA-IgG v glomerulárním mezangiu. U IgAN dochází k abnormální O-glykosylaci IgA1 HR charakteristické sníženým množstvím Gal připojené ke koncovému GalNAc a naopak zvýšenou vazbou NeuAc na koncový GalNAc. Abnormálně glykosylované IgA1 je rozlišováno autoprotilátkami (IgG, IgA1), jejichž epitop je konformován za přispění terminálního GalNAc na pantové oblasti IgAN [15].

Bakulovirový expresní systém byl v této práci úspěšně použit k přípravě rekombinantních enzymaticky aktivních sekretovaných variant Ig $\kappa$ -GalNAc-T2, Ig $\kappa$ -ST6GalNAc II a Ig $\kappa$ -ST6GalNAc I glykosyltransferáz s využitím sekreční signalizační sekvence lehkého řetězce myšího imunoglobulinu kappa a krátké His tag značky umožňující afinitní purifikaci proteinu. Další glykosyltransferázy Ig $\kappa$ -GalNAc-T14, Ig $\kappa$ -C1GalT1, Ig $\kappa$ -Cosmc nebyly efektivně sekretovány. V případě GalNAc-T14 jsme testovali příčinu tohoto jevu přípravou konstruktů sestávajících z N' terminální lektinové domény GalNAc-T2 a katalytické domény GalNAc-T14 a naopak. Analýzy ukázaly, že lektinová doména a zejména N' terminální část proteinu bezprostředně za publikovanou transmembránovou doménou významně ovlivňuje efektivitu sekrece enzymy GalNAc-T14. Závěr z těchto studií je, že oproti původně, v této práci uvedenému zkrácení GalNAc-T14 o transmembránovou doménu v pozici 25. aminokyseliny, je třeba zkrátit enzym minimálně po pozici 39. aminokyseliny (data nebyla dosud publikována). V případě dalších enzymů v současnosti testujeme varianty, které by si zachovaly enzymatickou aktivitu a byly přitom efektivně sekretovány. Problém tohoto přístupu s počívá v tom že jedním z hlavních využití rekombinantních proteinů je testování kinetiky a způsoby glykosylace pantové oblasti IgA1 a zkrácení enzymu může vést k změně enzymatické aktivity, jejíž dopad nebude možné jednoznačně posoudit. Na druhou stranu, použití detergentů pro izolaci neseekretovaných forem rekombinantních enzymů může do jisté míry rovněž ovlivnit enzymatickou aktivitu finálního preparátu a tudíž výsledky *in vitro* analýz bude nutné ověřit na vhodně uspořádaném buněčném modelu využívajícím například potlačení exprese nebo naopak zvýšení exprese standardní formy konkrétního enzymu pomocí siRNA nebo transfekce buněk enzym kódujícím plasmidem, což již v současnosti je částečně dosaženo. Kromě Ig $\kappa$  signalizační sekvence lze jako alternativu využít i další sekvence jako bakulovirovou signální sekvenci GP67 atd. [27, 62], jejichž přínos je však nutné experimentálně ověřit. V dalším kroku, zejména z důvodů časové náročnosti

produkce proteinů v hmyzích buňkách jsme se zaměřili na produkci enzymů Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14 a Igκ-ST6GalNAc II. Produkce GalNAc-T2, GalNAc-T14 a ST6GalNAc II byla optimalizována a rekombinantní proteiny byly izolovány ve vysoké čistotě a dostatečné koncentraci požadované pro *in vitro* glykosylační experimenty. V průběhu řešení projektu se jako časově a cenově vhodnější alternativa ukázala exprese rekombinantních glykosyltransferáz v savčích buňkách HEK 293F. Rekombinantní enzymy získané pomocí savčího expresního systému vykazovaly shodné enzymatické aktivity.

*O*-glykosylace IgA1 probíhá výhradně v Golgiho komplexu [20]. Zahájení *O*-glykosylace pantové oblasti IgA1 se donedávna přisuzovalo pouze GalNAc-T2 [26-27]. Naše poslední experimenty ukazují, že GalNAc-T14 se v IgA1 produkujících buňkách od pacientů s IgA nefropatií exprimuje 5x více než v buňkách zdravých kontrol, zatímco exprese GalNAc-T2 a dalších GalNAc-Ts se u pacientů a zdravých kontrol neliší. Zapojení GalNAc-T14 do abnormální glykosylace bylo potvrzeno pomocí siRNA inhibice její aktivity, která vedla k poklesu Gal abnormality IgA1 produkovaných buňkami od pacientů s IgA nefropatií. Vysvětlení spočívá v tom, že zvýšená exprese a aktivita GalNAc-T14 vede k extenzivnímu připojování GalNAc k pantové oblasti nad kapacitu β1,3 Gal transferázy, jehož důsledkem je zvýšené množství terminálních, negalaktosylovaných GalNAc [28]. Rekombinantní GalNAc-T2 a GalNAc-T14 (rGalNAc-T2 a rGalNAc-T14) izolované z hmyzích buněk Sf9 nebo savčích buněk 293F umožňují jednak *in vitro* modelování prvního kroku *O*-glykosylace, tak například přípravu rekombinantního galaktózově deficientního monovalentního IgA1 pro účely studia možností ovlivnění tvorby imunitních komplexů [63]. Rekombinantní GalNAc-T2 a GalNAc-T14 byly již využity pro studium kinetiky připojení GalNAc k peptidu reprezentujícímu pantovou oblast IgA1 a k rekombinantnímu IgA1 jako akceptoru. Práce byly dosud publikovány formou posterů [45-46, 64-65] a po dokončení nezbytných potvrzovacích experimentů budou publikovány časopisecky. Významný závěr je, že oba enzymy se liší v kinetice obsazování jednotlivých potenciálních *O*-glykosylačních míst a postu připojování GalNAc. GalNAc-T14, narozdíl od GalNAc-T2 významně zvyšuje enzymatickou aktivitu, jestliže IgA substrát obsahuje již některé *O*-glykosylační místo obsazené GalNAc, zřejmě za nativních podmínek v důsledku aktivity GalNAc-T2. Většina HR IgA1 má glykanem obsazen Thr<sup>225</sup>, zatímco Thr<sup>236</sup> bývá často neobsazen [10]. Thr<sup>225</sup>, Thr<sup>228</sup> a Ser<sup>232</sup> jsou nejčastěji obsazeny disacharidem Gal-GalNAc zatímco Ser<sup>230</sup>, Thr<sup>233</sup> a Thr<sup>236</sup> bývají častěji Gal-deficientní nebo nemají žádný *O*-glykan [9]. Detailní analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila, že rekombinantní rGalNAc-T2 připojuje GalNAc na všech devět POGS IgA1 HR a počet obsazených *O*-glykosylačních míst se zvyšuje s časem.

Glykosylační místa se shodují s předpokládanými POGS a rGalNAc-T2 připojuje GalNAc v tomto pořadí: první na T<sup>228</sup> a pak na T<sup>236</sup>, následuje S<sup>232</sup>, T<sup>225</sup> a S<sup>230</sup> a na konec S<sup>238</sup> a S<sup>240</sup> [45-46]. Porovnáním přesných pozic O-glykanů HR IgA1 zdravých jedinců s přesnými pozicemi Gal-deficientních O-glykanů HR IgA1 pacientů s IgAN dále přispěje k objasnění vzniku IK [9-10].

Další fáze glykosylace pantové oblasti IgA1 spočívá v připojení Gal k terminálnímu GalNAc nebo připojení NeuAc k terminálnímu GalNAc je proces, v němž předčasná sialylace může blokovat aktivitu  $\beta$ 1,3 Gal transferázy. V tomto procesu hraje významnou roli ST6GalNAc II [39] a dosud ne zcela jasně definovanou roli zřejmě i některá z  $\alpha$ 2,3 sialyl transferáz. U IgA1 zdravých jedinců převažují NeuAc vázané v pozici  $\alpha$ 2,3 zatímco IgA1 u IgAN pacientů má  $\alpha$ 2,3 i  $\alpha$ 2,6 sialylované O-glykany [9, 47]. Real-time PCR expresní analýza ukázala, že ST6GalNAc II je zvýšeně exprimována buňkami tvořícími abnormálně galaktosylované IgA1 izolovanými od pacientů s IgAN, zatímco u epitelálních buněk zvýšená exprese ST6GalNAc II nezpůsobuje vznik sialylovaného Tn Ag [37]. Na potvrzení, že ST6GalNAc II připojuje NeuAc na terminální GalNAc byl zaměřen jeden z cílů předložené disertační práce - připravit rekombinantní ST6GalNAc II a ST6GalNAc I a testovat kinetiku sialylace pantové oblasti IgA1. Srovnání aktivity obou rekombinantních proteinů potvrdilo, že ST6GalNAc II je schopna připojit více molekul NeuAc než ST6GalNAc I [66]. Společně s siRNA inhibicí aktivity ST6GalNAc II potvrdily enzymatické essey, že ST6GalNAc II hraje významnou etiopatogenetickou roli při tvorbě abnormálně galaktosylovaného IgA1.

DNA vakcinace umožnila připravit monoklonální protilátky specificky detekující ST6GalNAc II uvnitř Golgiho komplexu a umožnila potvrdit abnormality v lokalizaci ST6GalNAc II spočívající v přesunu významného množství ST6GalNAc II směrem do *cis* Golgi komplexu, kde mechanismem předčasné sialylace dále přispívá k produkci IgA1 se sníženým množstvím galaktóz připojených ke GalNAc na pantvé oblasti IgA1.

Dosavadní výsledky ukazují, že strategie rekombinantních glykosyltransferáz přispěla k popisu mechanismu vzniku abnormálně glykosylovaného IgA1 u IgA nefropatie a rovněž poskytla nástroj pro přípravu monovalentních abnormálně glykosylovaných IgA1 nebo jejich fragmentů jako potencialních inhibitorů tvorby cirkulujících imunitních komplexů.

## 6 Závěry

Ve shodě s cíli disertační práce byly připraveny vektory kódující rozpustné formy rekombinantních enzymaticky aktivních lidských glykosyltransferáz. Rekombinantní enzymy Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-C1GalT1, Igκ-Cosmc, Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II byly produkovány pomocí bakulovirového expresního systému (v Sf9 buňkách) a pomocí savčího expresního systému (v 293F buňkách). Identita rekombinantních glykosyltransferáz byla potvrzena hmotnostní spektrometrií. Enzymové aktivity Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II byly ověřeny *in vitro* glykosylací syntetického peptidu odpovídajícího těžkému řetězci IgA1 nebo glykosylací rekombinantního fragmentu IgA1 Cα1-HR-Cα2. Myši byly vakcinovány DNA vakcínou kódující lidské glykosyltransferázy pomocí hydrodynamické metody, což nám umožnilo indukovat tvorbu specifických sérových protilátek. Následně byly připraveny myši monoklonální protilátky rozpoznávající ST6GalNAc II (mAb anti-ST6II), které umožnily specificky barvit ST6GalNAc II enzym v IgA1-produkujících buňkách immortalizovaných infekcí virem Epsteinova a Barrova od pacientů s IgA nefropatií a od zdravých kontrol a určit jeho lokalizaci vzhledem k *cis*- a *trans*-Golgi markerům (gm130 a tgn46).

Reakce s HAA lektinem potvrdila, že enzymy Igκ-GalNAc-T2 a Igκ-GalNAc-T14 připojují GalNAc na syntetický peptid kódující HR IgA1 nebo na rekombinantní fragment Cα1-HR-Cα2 IgA1. Oba enzymy připojují GalNAc na jednotlivé POGS s odlišnou kinetikou reakce. Enzymy Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II jsou schopny sialylovat specifické GalNAc připojené k pantové oblasti rekombinantního fragmentu Cα1-HR-Cα2 IgA1. Jejich aktivita se liší jednak rychlostí připojování jednotlivých sialových kyselin, tak maximálním počtem sialovou kyselinou obsazených GalNAc, kde Igκ-ST6GalNAc I připojuje maximálně jednu až dvě sialové kyseliny na všech 9 potvrzených GalNAc na pantové oblasti IgA1, Igκ-ST6GalNAc II byla schopna za stejných podmínek připojit o jednu sialovou kyselinu navíc.

Fluorescenční a konfokální mikroskopie potvrdila, že v IgA1-produkujících buňkách izolovaných od pacientů s IgA nefropatií dochází k částečné relokizaci ST6GalNAc II směrem k *cis*-Golgi oproti kontrolám, což může přispět, nedávno potvrzeným mechanismem předčasné sialylace, k tvorbě IgA se zvýšeným množstvím terminálního GalNAc na pantové oblasti.

Rekombinantní enzymy Igκ-GalNAc-T2, Igκ-GalNAc-T14, Igκ-ST6GalNAc I a Igκ-ST6GalNAc II produkované pomocí bakulovirového expresního systému a savčího

expresního systému umožňují *in vitro* modelování průběhu glykosylace IgA1 a mohou tak přispět k poznání molekulární podstaty tvorby abnormálně glykosylovaného IgA1 u IgAN.

## 7 Souhrn

IgA nefropatie (IgAN) je autoimunitní onemocnění charakterizované ukládáním imunokomplexů (IK) v glomerulárním mezangiu. IK jsou tvořeny polymerními IgA1 molekulami, které mají abnormální strukturu *O*-vázaných glykanů na pantové oblasti. Pantová oblast IgA1 obsahuje devět potenciálních míst pro *O*-glykosylaci, ale obvykle jen 3 až 6 míst je obsazených. *O*-vázané glykany pantové oblasti IgA1 jsou syntetizovány v jasně definovaném sledu enzymatických reakcí: nejprve je připojen *N*-acetylgalactosamin (GalNAc) na Ser nebo Thr pomocí *N*-acetylgalactosaminyltransferázy 2 (GalNAc-T2). Vzniklý *O*-glykan je dále prodloužen připojením galaktosy (Gal) pomocí core 1  $\beta$ 1,3-galaktosyltransferázy (C1GalT1), jejíž stabilita závisí na C1GalT1-specifickém molekulárním chaperonu (Cosmc). Nakonec je pomocí  $\alpha$ 2,6-sialyltransferázy II (ST6GalNAc II) připojena sialová kyselina (NeuAc) na GalNAc nebo pomocí  $\alpha$ 2,3-sialyltransferázy na Gal. U IgAN dochází k abnormální glykosylaci pantové oblasti IgA1 spočívající ve sníženém množství Gal připojené ke GalNAc. Abnormální glykosylace je příčinou vazby některých protilátek třídy IgG, IgA1, které reagují s abnormálními cukry na pantové oblasti IgA1. Tyto protilátky se uplatňují jako autoprotilátky.

Hlavním cílem práce byla produkce rekombinantních enzymaticky aktivních lidských glykosyltransferáz - GalNAc-T2 a -T14, C1GalT1, Cosmc, ST6GalNAc I a II pomocí bakulovirového nebo savčího expresního systému. Expresní kazeta kódující vlastní protein byla vnesena do vektoru, kterým byly transfekovány hmyzí buňky Sf9. Nově vytvořený rekombinantní bakulovirus dále zajišťuje produkci rekombinantního proteinu v Sf9. Sekvence každého proteinu byla zkrácena o N terminální transmembránovou doménu, na jejíž místo byla vnesena sekreční signální sekvence z lehkého řetězce myšího imunoglobulinu kappa. Na C-konec byla vnesena krátká His tag značka umožňující afinitní purifikaci proteinu. Produkce GalNAc-T2 a -T14, C1GalT1, Cosmc, ST6GalNAc I a II byla optimalizována a rekombinantní proteiny byly izolovány pomocí afinitní NiNTA chromatografie. Proteiny byly identifikovány pomocí SDS-PAGE a western blotu. Aminokyselinová sekvence rekombinantních proteinů byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie. Aktivity glykosyltransferáz byly charakterizovány určením počtu GalNAc, Gal a NeuAc připojených jednotlivými enzymy k potenciálním *O*-glykosylačním (POGS) místům syntetického HR peptidu IgA1 nebo rekombinantního IgA1 proteinu a určením pořadí obsazovaných POGS.

Detailní analýza potvrdila, že rekombinantní Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 připojuje GalNAc na všech devět POGS IgA1 HR v časově definovaném pořadí. Glykosylační místa obsazená Ig $\kappa$ -



GalNAc-T2 odpovídají místům popsaným u sérového IgA1. Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 připojuje GalNAc v tomto pořadí: první na T<sup>228</sup> a pak na T<sup>236</sup>, následuje S<sup>232</sup>, T<sup>225</sup> a S<sup>230</sup> a na konec S<sup>238</sup> a S<sup>240</sup>. Nedávné *in vitro* studie naznačují, že GalNAc-T2 není jedinou GalNAc-T glykosylující IgA1 HR. Významným kandidátem je GalNAc-T14, která se v IgA1-produkujících buňkách exprimuje 5 krát více u pacientů s IgAN, než u zdravých kontrol, zatímco exprese GalNAc-T2 se u obou skupin výrazně neliší.

Hydrodynamická vakcinace umožnila indukovat tvorbu specifických protilátek proti studovaným glykosyltransferázám. Byly připraveny hybridomy produkující protilátky proti ST6GalNAc II. Získané protilátky byly použity pro mikroskopické analýzy lokalizace ST6GalNAc II. Pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie byla lokalizována ST6GalNAc II v Golgi komplexu a pomocí kolokalizace s *cis*- a *trans*-Golgi specifickými markery bylo potvrzeno, že IgA1-produkující buňky od pacientů s IgA nefropatií mají ST6GalNAc II více lokalizovanou v *cis*-Golgi oproti IgA1-produkujícím buňkám od zdravých kontrol. Částečné přesunutí ST6GalNAc II z *trans*-Golgi může představovat nový mechanismus přispívající k tvorbě Gal-deficientních IgA1 mechanismem předčasné sialylace O-vázaných glykanů na IgA1.

Rekombinantní glykosyltransferázy umožňují modelovat *in vitro* průběh glykosylace IgA1 a přispívají tak k poznání molekulární podstaty tvorby abnormálně glykosylovaného IgA1 u IgAN.

## 8 Summary

IgA nephropathy (IgAN) is associated with abnormal *O*-glycosylation of immunoglobulin A1 (IgA1), characterized by the presence of galactose (Gal)-deficient *O*-glycans in the IgA1 hinge region (HR). The terminal *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) of IgA1 *O*-glycans is often modified by addition of sialic acid (NeuAc). IgA1 with terminal GalNAc is recognized by naturally occurring antibodies, thus leading to the formation of pathogenic IgA1-containing circulating immune complexes (CIC) which after glomerular deposition induce mesangial cell proliferation and expansion of extracellular matrix. The aim of this thesis was to study enzymes involved in *O*-glycosylation of IgA1 hinge region.

*O*-glycosylation of IgA1 takes place in the Golgi apparatus of IgA1-producing cells. *O*-glycosylation is initiated by attachment of GalNAc to Ser/Thr residues on IgA1 HR by *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-T2 or GalNAc-T14) followed by addition of Gal to the GalNAc catalyzed by  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase 1 (C1GalT1) with specific chaperone Cosmc. This structure can be modified by attachment of NeuAc to the Gal residues in a reaction catalyzed by a  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase (ST3Gal) and/or to the GalNAc residues catalyzed by  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase II (ST6GalNAc II). Gal deficiency observed on IgA1 could be attributed to the changes in level of any involved glycosyltransferases, aberrant structure of involved enzymes, abnormal distribution of enzymes in Golgi apparatus where *O*-glycosylation takes place, competition between GalNAc-T2, C1GalT1, and ST6GalNAc II and mean monosaccharides levels.

Recombinant enzymes involved in *O*-glycosylation of IgA1 hinge region were expressed by the Baculovirus Expression System and/or in HEK 293 cells, isolated by affinity NiNTA chromatography, identified by Western blotting with anti-His-tag antibody and their identities were validated by mass-spectrometry-based sequencing. Activity of recombinant glycosyltransferases were measured based on the rate and sites of the attachment of GalNAc, Gal and NeuAc to the synthetic IgA1 HR peptide or recombinant IgA1 HR-containing protein.

Detail analyses confirmed that recombinant Ig $\kappa$ -GalNAc-T2 could add GalNAc to all nine glycosylation sites in IgA1 hinge region peptide. Time-course analyses showed that the number of added GalNAc residues increased with time and GalNAc-T2 adds GalNAc residues in an ordered fashion: to T<sup>228</sup> first and then to T<sup>236</sup>, followed by S<sup>232</sup>, T<sup>225</sup>, and S<sup>230</sup>, and finally to S<sup>238</sup> and S<sup>240</sup>. Recent *in vitro* studies suggested involvement of another GalNAc-T, GalNAc-T14 which is among the major GalNAc-Ts transcribed in IgA1-producing cells and

its expression is 5-fold greater in IgA1-producing cells from the patients vs. the cells from healthy controls. In contrast, the expression of GalNAc-T2 did not differ between patients and healthy controls.

Hydrodynamic DNA vaccination was used to induce high titers of specific antibodies to respective recombinant enzymes. In case of ST6GalNAc II, hybridoma cells producing ST6GalNAc II-specific monoclonal Ab were isolated. Selected ST6II-specific mAb were used for cell staining and microscopic analysis of the ST6GalNAc II localization within Golgi apparatus. Using co-localization with *cis*- and *trans*-Golgi markers-specific antibodies fluorescence and confocal microscopy revealed that IgA1-producing cells from IgAN patients had more ST6GalNAc II localized in *cis*-Golgi compared to cells from healthy controls. Described relocation of ST6GalNAc II from *trans*- toward *cis*-Golgi in IgA1-producing cells may represent a new mechanism contributing to production of Gal-deficient IgA1 caused by premature sialylation of IgA1 *O*-linked glycans, which in accordance with recent results could prevent attachment of Gal to GalNAc.

Recombinant glycosyltransferases provide valuable tool for elucidation of mechanisms involved in production of aberrantly *O*-glycosylated IgA1 in IgAN. We hope that this work will contribute to the elucidation of mechanisms involved in generation of aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy.

## 9 Seznam zkratek

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| 293F                           | HEK 293 FreeStyle  |
| 293T                           | HEK 293T   |
| Ag                             | antigen  |
| AMK                            | aminokyselina  |
| BSA                            | bovinní séroví albumin   |
| C                              | konstantní doména Ig   |
| C1GalT1                        | Core 1 UDP-Gal:GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr $\beta$ 1,3-galactosyltransferáza |
| C1T1                           | C1GalT1  |
| C1T2                           | Cosmc  |
| cDNA                           | complementary DNA  |
| CIK                            | cirkulující imunokomplexy  |
| Cosmc                          | Core 1 $\beta$ 3-Gal-T specific molecular chaperone                        |
| DMSO                           | dimethylsulfoxid   |
| <i>E. coli</i>                 | <i>Escherichia coli</i>  |
| ELISA                          | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  |
| EtBr                           | ethidium bromid  |
| FBS                            | fetální bovinní sérum  |
| Gal                            | galaktóza  |
| GalNAc                         | <i>N</i> -acetylgalactosamin   |
| GalNAc-T2                      | UDP-GalNAc: polypeptide <i>N</i> -acetylgalactosaminyl transferáza 2       |
| GalNAc-T14                     | UDP-GalNAc: polypeptide <i>N</i> -acetylgalactosaminyl transferáza 14      |
| Gd-IgA                         | Gal deficientní IgA  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | kyselina sírová  |
| HAA                            | <i>Helix aspersa</i>   |
| Ig                             | imunoglobulin  |
| IgA                            | imunoglobulin A  |
| IgA1                           | imunoglobulin A1   |
| IgA2                           | imunoglobulin A2   |
| IgAN                           | IgA nefropatie   |
| kDa                            | kilodalton   |
| mIgA                           | monomerní IgA  |
| NeuAc                          | sialová kyselina   |
| NiNTA                          | Nickel-Nitrilotriacetic Acid   |
| ORF finder                     | Open Reading Frame finder  |
| PenStrep                       | penicilin-streptomycin   |
| pfu                            | plaque forming units   |
| pIgA                           | polymerní IgA  |
| PVDF                           | polyvinylidene difluoride  |
| RT-PCR                         | Real-time polymerázová řetězova reakce                                     |
| Sialyl-Tn                      | sialylovaný Tn Ag  |
| s-IgA                          | IgA sekrečního typu  |
| ST6I                           | ST6GalNAc I  |
| ST6II                          | ST6GalNAc II   |
| ST6GalNAc I                    | <i>N</i> -acetylgalactosaminide $\alpha$ 2,6-sialyltransferáza I           |
| ST6GalNAc II                   | <i>N</i> -acetylgalactosaminide $\alpha$ 2,6-sialyltransferáza II          |
| T2                             | GalNAc-T2  |
| T14                            | GalNAc-T14   |

T Ag  
Tn Ag  
V

Gal-GalNAc-O-Ser/Thr (Core 1 struktura)  
GalNAc-O-Ser/Thr  
variabilní doména Ig

## 10 Publikace autora

### Původní a souborné práce související s tématem

1. **Stuchlova Horynova M.**, Vrablikova A., Stewart TJ., Takahashi K., Czernekova L., Yamada K., Suzuki H., Julian BA., Renfrow MB., Novak J., Raska M. (2014) - *N*-acetylgalactosaminide  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of galaktose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant (NDT)* 0: 1–6, doi: 10.1093/ndt/gfu308. **IF (2013) 3,488**
2. Takahashi K, Raska M, **Stuchlova Horynova M**, Hall SD, Poulsen K, Kilian M, Hiki Y, Yuzawa Y, Moldoveanu Z, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. (2014) - Enzymatic sialylation of IgA1 o-glycans: implications for studies of IgA nephropathy. *PLoS One*. Jun 11;9(2):e99026., **IF (2013) 3,534**
3. **Stuchlova Horynova M.**, Raska M., Clausen H., Novak J. (2013) - Aberrant *O*-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma. *Cellular and Molecular Life Sciences, Cell Mol Life Sci*. 2013 Mar;70(5):829-39. **IF 5,615**
4. **Horynová M.**, Takahashi K., Hall S., Renfrow M., Novak J., Raška M. (2012) Production of *N*-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Ig $\kappa$  in insect cells. *Protein Expression and Purification* 81: pp.175–180. **IF 1,644**

### Abstrakta prezentací související s tématem – hlavní autor

1. **Stuchlova Horynova M.**, Smrzova Z., Ovecka M., Moldoveanu Z., Julian BA., Suzuki H., Mestecky J., Novak J., Raska M. (2013) Production of Aberrantly Glycosylated IgA1 in IgA Nephropathy is Associated with Abnormal Distribution of ST6GalNAc-II in Golgi Apparatus, *Kidney Week 2013, Atlanta, USA, J Am Soc Nephrol* 23, p. 492A.
2. **Stuchlova Horynova M.**, Kasperova A., Smrzova Z., Weigl E., Novak J., Raska M. (2013) Hydrodynamic DNA vaccination – process to specific mouse monoclonal antibodies detection of *N*-acetylgalactosaminide  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase II (ST6GalNAc II), 15<sup>th</sup> International congress of immunology, Milan, Italy, Abstract book, p. 525.
3. **Stuchlova Horynova M.**, Takahashi K., Zachova K., Kasperova A., Mestecky JF., Novak J., Raska M. (2012) DNA Vaccination with Plasmids Encoding Different Human Glycosyltransferases Induces High Titers of Specific Serum Antibodies in Mice, *Kidney Week 2012, San Diego, USA, J Am Soc Nephrol* 23, p. 854A.
4. **Stuchlová Horynová M.**, Weigl E., Městecký J., Novák J., Raška M. (2012) DNA vaccination of different glycosyltransferases induced immune response after hydrodynamic DNA vaccination of mice, 2. Česká lipidomická conference a Workshop ICCTI a INER, Znojmo, Abstract book, p.62.

5. **Horynová M.**, Takahashi K., Renfrow M., Weigl E., Mestecky J., Novak J., Raska M. (2011) Production of Enzymatically Active GalNAc-T2 and Studies of Aberrant O-glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy, 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France, Abstract book, p. 148.
6. **Horynová M.**, Takahashi K., Hall S., Renfrow M.B., Weigl E., Novák J., Raška M. (2010) IgA nefropatie – normální a patologická cesta biosyntézy IgA1, XXVII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Olomouc, Alergie 12 Suppl. 1, str. 81 .
7. **Horynová M.**, Takahashi K., Renfrow M., Novak J., Weigl E., Raška M. (2010) The role of IgA1 O-glycans heterogeneity in mucosal immunity, 1st International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3rd Workshop on Immunotherapy, Mikulov, Abstract book, p. 35.
8. **Horynová M.**, Takahashi K., Hall S., Renfrow M.B., Novak J., Raška M. (2010) Baculovirus expression system: Production of enzymatically active N-acetylgalactosaminyl-transferase2 (GalNAc-T2) in Sf9 insect cells, The Student Scientific Conference on GMO, Brno, Czech Republic, Abstract book, p. 84.

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

1. Kasperova A., Ueda H., **Stuchlova-Horynova M.**, Julian B.A., Novak J., Raska M. (2013) Preventing of formation of IgA1- Containing Immune Complexes in IgA 1 Nephropathy, Kidney Week 2013, Atlanta, USA, J Am Soc Nephrol 23, p. 490A.
2. Takahashi K., Raska M., **Stuchlova Horynova M.**, Kasperova A., Hall S., Hiki Y., Yuzawa Y., Moldoveanu Z., Julian BA., Renfrow MB., Novak J. (2013) Enzymatic Sialylation of IgA1 Hinge-region: Pathogenic Role of Sialic Acid in IgA Nephropathy (IgAN), Kidney Week 2013, Atlanta, USA, J Am Soc Nephrol 23, p. 490A.
3. Stewart TJ., Suzuki H., Raska M., Takahashi K., Yamada K., **Stuchlova Horynova M.**, Renfrow MB., Novak J. (2013) Aberrant O-glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy (IgAN) and the Role of Sialyl-Tn Antigen, Kidney Week 2013, Atlanta, USA, J Am Soc Nephrol 23, p. 491A.
4. Kasperova A., Ueda H., **Stuchlova Horynova M.**, Julian BA., Novak J., Raska M.(2013) Inhibition of formation of IgA1-containing immune complexes in IgA1 nephropathy, 15<sup>th</sup> International congress of immunology, Milan, Italy, Abstract book, p. 521.
5. Raska M, Yamada K., Stewart TJ., **Stuchlova Horynova M.**, Qiang Huang Z., Suzuki H., Moldoveanu Z., Julian BA., Wyatt RJ., Mestecky J., Renfrow MB., Gharavi AG., Novak J. (2012) Role of N-Acetylgalactosaminyl Transferases in the Synthesis of Aberrant IgA1 O-Glycans in IgA Nephropathy, Kidney Week 2012, San Diego, USA, J Am Soc Nephrol 23, p. 519A.
6. Stewart TJ., Takahashi K., Yamada A., Raska M., **Stuchlova Horynova M.**, Renfrow M.B., Novak J. (2012) Abberant O-glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy (IgAN)

and the Role of Initiating Enzymes, Kidney Week 2012, San Diego, USA, J Am Soc Nephrol 23, p. 852A.

7. Takahashi K., Raska M., **Horynova Stuchlova M.**, Kasperova A., Hall S., Hiki Y., Yuzawa Y., Julian BA., Moldoveanu Z., Renfrow MB., Novak J. (2012) Synthesis of Galactose-deficient IgA1 *O*-glycans by GalNAc-transferases Expressed in IgA1-producing Cells: Implications for The Pathogenesis of IgA Nephropathy, Kidney Week 2012, San Diego, USA, J Am Soc Nephrol 23, p. 853A.
8. Raska M., Yamada K., **Horynova M.**, Takahashi K., Suzuki H., Moldoveanu Z., Novakova J., Kasperova A., Kiryluk K., Mestecky J., Renfrow MB., Gharavi AG., Novak J. (2011) Role of GalNAc-transferases in the Synthesis of Aberrant IgA1 *O*-glycans in IgA Nephropathy, Kidney Week 2011, Philadelphia, USA, J Am Soc Nephrol 22, p. 625A.
9. Takahashi K., **Horynova M.**, Raska M., Hall S., Julian BA., Moldoveanu Z., Mestecky J., Renfrow MB., Novak J.(2011) Pathogenesis of IgA Nephropathy (IgAN): Characterization of the Kinetics and Site-specificity of GalNAc-transferase 2 (GalNAc-T2), the Enzyme Initiating *O*-glycosylation of IgA1, Kidney Week 2011, Philadelphia, USA, J Am Soc Nephrol 22, p. 624A.
10. Kasperova A, Czernekova L, Zachova K., **Horynova M.**, Novak J., Mestecky J., Sterzl I., Raska M (2011) Construction and production of synthetic competitors for suppression of the activity of immune complexes causing IgA nephropathy, 10<sup>th</sup> Dresden Symposium on Autoantibodies, Abstract book, p. 22.
11. Novak J., Suzuki H., Raska M., Takahashi K., Yamada K., Moldoveanu Z., **Horynova M.**, Novakova J., Julian BA., Novak L., Poulsen K., Kilian M., Herr AB., Gharavi AG., Renfrow MB., Mestecky J. (2011) Glycosylation pathways of *O*-glycans in the hinge region of monomeric and polymeric circulatory IgA1, 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France, Abstract book, p. 148.
12. Novak J., Suzuki H., Yamada K., Moldoveanu Z., Takahashi K., **Horynova M.**, Novakova J., Julian BA., Novak L., Poulsen K., Kilian M., Gharavi AG., Renfrow MB., Mestecky J., Raska M. (2011) Pathways of aberrant *O*-glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy, ERA-EDTA, Praha, NDT Plus 4, Suppl. 2
13. Takahashi K., **Horynova M.**, Raska M., Hall S., Smith IV AD. , Julian BA., Moldoveanu Z., Mestecky J., Renfrow MB., Novak J. (2010) Synthesis of Galactose-deficient IgA1 *O*-glycans by GalNAc-transferase 2 and Pathogenesis of IgA Nephropathy, Renal Week 2010, Denver, USA, J Am Soc Nephrol 21., p. 760A.

### **Přednášky související s tématem**

1. **Horynová M**, Takahashi K, Weigl E, Novák J, Raška M. (2011) Bakulovirový expresní systém - exprese rozpustných forem rekombinantních glykosyltransferáz Konference mladých biologů a chemiků, Žďár nad Sázavou, Chem. Listy 105., str. 395.



2. **Horynová M.**, Raška M. (31.3.2009) HMYZÍ EXPRESNÍ SYSTÉMY Semináře Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc, České imunologické společnosti, České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii

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

1. Krupka M., Masek J., Bartheldyova E., Knötigova P., Plockova J., Korvasova Z., Skrabalova M., Koudelka S., Kulich P., Zachova K., Czernekova L, Strouhal O., **Horynova M.**, Sebela M., Ledvina M., Miller A.D., Raska M., Turanek J. (2012) Enhancement of immune response towards non-lipidised *Borrelia burgdorferi* recombinant OspC antigen by binding onto the surface of metallochelating nanoliposomes with entrapped lipophilic derivatives of norAbuMDP. *J Control Release*, 2012 Jun 10;160(2): pp.374-381. **IF 7,633**
2. Mašek J., Bartheldyová E., Turánek-Knotigová P., Skrabalová M., Korvasová Z., Plocková J., Koudelka S., Skodová P., Kulich P., Křupka M., Zachová K., Czerneková L., **Horynová M.**, Kratochvílová I., Miller A.D., Zýka D., Michálek J., Vrbková J., Sebela M., Ledvina M., Raška M., Turánek J. (2011) Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *J Control Release*, 2011 Apr 30;151(2): pp.193-201. **IF 7,164**
3. Kasperova A., Turanek J., **Horynová M.**, Weigl E., Sebela M., Lenobel R., Raska M. (2010) Isolation of recombinant cysteine dioxygenase protein from Trichophyton mentagrophytes. *Mycoses*. 2011 Sep;54(5): e456-62. **IF 1,667**
4. Zachova K., Krupka M., Chamrad I., Belakova J., **Horynova M.**, Weigl E., Sebela M., Raska M. (2008) Novel modification of growth medium enables efficient *E. coli* expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine hsp70 protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(7): pp.727-733. **IF 2,062**
5. Raska M., Běláková J., **Horynová M.**, Křupka M., Novotný J., Šebestová M., Weigl E. (2008) Systemic and mucosal immunization with *Candida albicans* hsp90 elicits hsp90-specific humoral response in vaginal mucosa which is further enhanced during experimental vaginal candidiasis. *Medical Mycology* Aug;46(5) pp.411-20. **IF 2,156**
6. Běláková J., **Horynová M.**, Křupka M., Weigl E., Raska M. (2007) DNA vaccines - are they still just a powerful tool for the future? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55(6) pp.378-398. **IF 1,689**
7. Křupka M., Raska M., Běláková J., **Horynová M.**, Weigl. E., Novotný R. (2007) Biological aspects of Lyme disease pirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 151(2) pp.175-186.

### **Abstrakta prezentací přímo nesouvisející s tématem**

1. Kašperová A., Křupka M., Zachová K., **Horynová M.**, Čerovský V., Turánek J., Raška M. (2010) Screening of syntetic nukleotide-analogs and peptides as inhibitors

of *Candida albicans* proliferation and morphotype changes, Mikroskopie 2010, Nové město na Moravě, Abstract book, p. 39.

2. Křupka M., Zachová K., Bari L., **Horynová M.**, Weigl E., Raška M. (2009) Hsp 70 – p24 fusion DNA vaccines as a new candidates for HIV vaccines, The Pediatric Infectious Disease Journal 28 (6), p. 181.
3. Křupka M., Raška M., **Horynová M.**, Mašek J., Turánek J., Weigl E. (2008) Příprava rekombinantního nelipidovaného apyrogenního Outer Surface Proteinu C *Borrelia burgdorferi*, Alergie 10, Suppl. 2, str. 88.
4. Zachová (Kolaříková) K., Křupka M., Běláková J., **Horynová M.**, Raška (2008) Příprava fúzních antigenů vyvolávajících specifickou buněčnou imunitní odpověď, XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice, Sborník přednášek a posterů, str. 55.
5. Horynová M., Běláková J., Weigl E., Raška M. (2007) Vliv imunizace antigenem hsp90 *Candida albicans* na hladinu protilátek v průběhu následné kandidové infekce, Konferencia slovenskej mykopatologickej spoločnosti s medzinárodnou účasťou, Nový Smokovec, Slovensko, DERMA 7(3), str. 33
6. Běláková J., **Horynová M.**, Weigl E., Raška M. (2007) Monitorování počtu živých *Candida albicans* v průběhu experimentální infekce, Konferencia slovenskej mykopatologickej spoločnosti s medzinárodnou účasťou, Nový Smokovec, Slovensko, DERMA 7(3), str. 35.
7. **M. Horynová**, J. Běláková, E. Weigl, M. Raška (2007) Význam protilátek proti hsp90 *C. albicans* u systémové a vaginální infekce, 4. Česko-Slovenská mezioborová konference lékařské mykologie, Pardubice, Sborník abstrakt, strana 81-82.
8. J. Běláková, **M. Horynová**, E. Weigl, M. Raška (2007) Variabilita průběhu experimentální kandidové infekce u inbredních myších kmenů, 4. Česko- Slovenská mezioborová konference lékařské mykologie, Pardubice, Sborník abstrakt, str. 83-84.
9. **M. Horynová**, J. Běláková, M. Křupka, E. Weigl, M. Raška (2006) Identifikace fragmentů hsp90 *Candida albicans* indukujících silnou imunitní odpověď po hydrodynamické DNA vakcinaci myši, XXIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XI. Kongres českých a slovenských imunologů v Hradci Králové, ALERGIE, Ročník 8, Supplementum 2, strana 37.
10. J. Běláková, **M. Horynová**, E. Weigl, M. Raška (2006) Vakcinace kandidovým hsp90 antigenem u experimentálně navozené vaginální kandidózy, XXIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XI. Kongres českých a slovenských imunologů v Hradci Králové, ALERGIE, Ročník 8, Supplementum 2, strana 37.

### **Přednášky nesouvisející s tématem**

1. Raska M., Belakova J., **Horynova M.**, Krupka M., Weigl E. (2011) HSP90 protein during *Candida albicans* versus mammalian host interaction, 39<sup>th</sup> Annual conference of yeast, Abstract book, p. 43.

2. Raska M., Krupka M., **Horynova M.**, Weigl E., Mestecky J. (2010) The targeting of DNA vaccines and mucosal immune response, 1st International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3rd Workshop on Immunotherapy, Mikulov, Abstract book, p. 18.
3. Raška M., Běláková J., **Horynová M.**, Křupka M., Weigl E. (2007) Kandidóza – imunitní obrana a tolerance, Konferencia slovenskej mykopatologickej spoločnosti s medzinárodnou účasťou, Nový Smokovec, Slovensko, DERMA 7(3), str. 31.
4. **M. Horynová**, J. Běláková, E. Weigl, M. Raška (2007) Vliv imunizace antigenem hsp90 *Candida albicans* na hladinu specifických protilátek v průběhu experimentální vaginální kandidózy, Konference vědeckých prací studentů DSP na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, Abstrakta Konference vědeckých prací studentů DSP, str. 23-24.
5. **M. Horynová**, M. Raška (31.10.2006) Selektuje intermitentní androgenní blokáda mutace androgenního receptoru u pacientů s metastatickou formou karcinomu prostaty?, Semináře Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc, České imunologické společnosti, České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii.
6. **M. Horynová**, M. Raška (26.6.2006) Transfekce - první krok k získání rekombinantního proteinu, Semináře Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc, České imunologické společnosti, České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii.

## 11 Literatura

1. Mestecky, J., et al., *IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 217-40.
2. Novak, J., et al., *Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy*. J Clin Immunol, 2001. **21**(5): p. 310-27.
3. Novak, J., et al., *Aberrant glycosylation of IgA1 and anti-glycan antibodies in IgA nephropathy: role of mucosal immune system*. Adv Otorhinolaryngol, 2011. **72**: p. 60-3.
4. Milan Raška, K.M., Alena Kašperová, Jan Novák, Ivan Šterzl, Jiří Městecký, *Současný pohled na etiopatogenezi IgA nefropatie a výhledy kauzální terapie*. Alergie, 2001. **4**: p. 263 - 269.
5. Mestecky, J., et al., *Mucosal immunoglobulins*, in *Mucosal Immunology*, J. Mestecky, et al., Editors. 2005, Elsevier Acad.: Amsterdam/Boston. p. 153 - 181.
6. Novak, J., et al., *IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy*. Semin Nephrol, 2008. **28**(1): p. 78-87.
7. Peppard, J.V., C.S. Kaetzel, and M.W. Russell, *Phylogeny and Comparative Physiology of IgA*, in *Mucosal immunology*, J. Mestecky, et al., Editors. 2005, Elsevier Acad.: Amsterdam/Boston. p. 195 - 210.
8. Stuchlova Horynova, M., et al., *Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(5): p. 829-39.
9. Takahashi, K., et al., *Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 o-glycosylation*. Journal of Proteome Research, 2012. **11**(2): p. 692-702.
10. Takahashi, K., et al., *Clustered O-glycans of IgA1: defining macro- and microheterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(11): p. 2545-57.
11. Mattu, T.S., et al., *The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fcα receptor interactions*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2260-72.
12. Novak, J., et al., *IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(11): p. 3451-7.
13. Novak, J., et al., *IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 504-13.
14. Tomana, M., et al., *Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 73-81.
15. Suzuki, H., et al., *Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1668-77.
16. Suzuki, H., et al., *The pathophysiology of IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(10): p. 1795-803.
17. Raška, M., et al., *Současný pohled na etiopatogenezi IgA nefropatie a výhledy kauzální terapie*. Alergie, 2001. **4**: p. 263 - 269.
18. Julian, B.A. and J. Novak, *IgA nephropathy: an update*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004. **13**(2): p. 171-9.
19. Gill, D.J., et al., *Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes*. J Cell Biol, 2010. **189**(5): p. 843-58.

20. Suzuki, H., et al., *IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 629-39.
21. Gerken, T.A., et al., *Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14493-507.
22. Ten Hagen, K.G., T.A. Fritz, and L.A. Tabak, *All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. Glycobiology, 2003. **13**(1): p. 1R-16R.
23. Bennett, E.P., et al., *Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family*. Glycobiology, 2012. **22**(6): p. 736-56.
24. Rottger, S., et al., *Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus*. J Cell Sci, 1998. **111** ( Pt 1): p. 45-60.
25. Wandall, H.H., et al., *The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation*. Glycobiology, 2007. **17**(4): p. 374-87.
26. Iwasaki, H., et al., *Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5613-21.
27. Horynova, M., et al., *Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Igkappa in insect cells*. Protein Expr Purif, 2012. **81**(2): p. 175-80.
28. Raska, M., *Role of GalNAc-transferases in the synthesis of aberrant IgA1 O-glycans in IgA nephropathy.*, in *Kidney week*. 2011, J Am Soc Nephrol: Philadelphia. p. 625A.
29. Ju, T., et al., *Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 178-86.
30. Wang, Y., et al., *Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9228-33.
31. Ju, T. and R.D. Cummings, *A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16613-8.
32. Ju, T. and R.D. Cummings, *Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1252.
33. Ju, T., et al., *Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc*. Cancer Res, 2008. **68**(6): p. 1636-46.
34. Dall'Olio, F. and M. Chiricolo, *Sialyltransferases in cancer*. Glycoconj J, 2001. **18**(11-12): p. 841-50.
35. Harduin-Lepers, A., et al., *The human sialyltransferase family*. Biochimie, 2001. **83**(8): p. 727-37.
36. Samyn-Petit, B., et al., *Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1474**(2): p. 201-11.
37. Marcos, N.T., et al., *Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7050-7.
38. Suzuki, H. *Mechanisms of aberrant glycosylation of IgA1 in patients with IgA nephropathy*. 2009: J Am Soc Nephrol.
39. Suzuki, H., et al., *Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes*. J Biol Chem, 2014. **289**(8): p. 5330-9.

40. Raska, M., et al., *Identification and characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1 alpha2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells*. J Mol Biol, 2007. **369**(1): p. 69-78.
41. Gharavi, A.G., et al., *Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 1008-14.
42. Novak, J., et al., *Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1*. Mol Immunol, 2000. **37**(17): p. 1047-56.
43. Renfrow, M.B., et al., *Analysis of O-glycan heterogeneity in IgA1 myeloma proteins by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: implications for IgA nephropathy*. Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(5): p. 1397-407.
44. Takahashi, K., et al., *Structural analyses of O-glycan sugar chains on IgA1 hinge region using SELDI-TOFMS with various lectins*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(3): p. 580-7.
45. Takahashi, K., et al., *Pathogenesis of IgA Nephropathy (IgAN): Characterization of the Kinetics and Site-specificity of GalNAc-transferase 2 (GalNAc-T2), the Enzyme Initiating O-glycosylation of IgA1*, in *Kidney week*. 2011, J Am Soc Nephrol Philadelphia, USA. p. 624A.
46. Takahashi, K., et al., *Synthesis of Galactose-deficient IgA1 O-glycans by GalNAc-transferases Expressed in IgA1-producing Cells: Implications for The Pathogenesis of IgA Nephropathy*, in *Kidney week*. 2012, J Am Soc Nephrol San Diego, USA. p. 853A.
47. Takahashi, K., et al., *Enzymatic sialylation of IgA1 o-glycans: implications for studies of IgA nephropathy*. Plos One, 2014. **9**(2): p. e99026.
48. Tomana, M., et al., *Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG*. Kidney Int, 1997. **52**(2): p. 509-16.
49. Novak, J., et al., *Interactions of human mesangial cells with IgA and IgA-containing immune complexes*. Kidney Int, 2002. **62**(2): p. 465-75.
50. Mestecky, J., et al., *Role of aberrant glycosylation of IgA1 molecules in the pathogenesis of IgA nephropathy*. Kidney Blood Press Res, 2008. **31**(1): p. 29-37.
51. Leung, J.C., et al., *Absence of CD89, polymeric immunoglobulin receptor, and asialoglycoprotein receptor on human mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(2): p. 241-9.
52. Moura, I.C., et al., *Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(3): p. 622-34.
53. Moura, I.C., et al., *Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 417-25.
54. Richardson, C.D., ed. *Baculovirus expression protocols*. Method in Molecular Biology. Vol. 39. 1995, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
55. Vialard, J.E., B.M. Arif, and C.D. Richardson, *Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses*, in *Baculovirus expression protocols (Methods in Molecular Biology)*, C.D. Richardson, Editor. 1995, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. p. 1 - 24.
56. van Oers, M.M., *Opportunities and challenges for the baculovirus expression system*. J Invertebr Pathol, 2011. **107 Suppl**: p. S3-15.
57. Hitchman, R.B., et al., *Optimizing the baculovirus expression vector system*. Methods, 2011. **55**(1): p. 52-7.
58. Invitrogen. *Baculovirus guide*. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?resultPage=1&res>

- [ultsPerPage=15&query=bac+to+bac&autocomplete=&personaFilterTerm=Support+%26+Troubleshoot&firstSearch=false&e71complete=false](http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?resultPage=1&resultsPerPage=15&query=bac+to+bac&autocomplete=&personaFilterTerm=Support+%26+Troubleshoot&firstSearch=false&e71complete=false).
59. Invitrogen. *Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System* 2002; Available from: <http://www.lifetechnologies.com>.
  60. Invitrogen. *Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System* 2013; Available from: <http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?resultPage=1&resultsPerPage=15&query=bac+to+bac&autocomplete=&personaFilterTerm=Support+%26+Troubleshoot&firstSearch=false&e71complete=false>.
  61. Invitrogen. *FreeStyle™ 293-F Cells*. 2007.
  62. Kretzschmar, T., et al., *High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies*. *J Immunol Methods*, 1996. **195**(1-2): p. 93-101.
  63. Kasperova, A., et al., *Prevention of Formation of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA1 Nephropathy*. , in *Kidney weeks*. 2013, J Am Soc Nephrol. p. 490A.
  64. Stewart, T.J., et al., *Aberrant O-Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy (IgAN) and the Role of Initiating Enzymes.*, in *Kidney weeks*. 2012, J Am Soc Nephrol. p. 852A.
  65. Takahashi, K., et al., *Synthesis of Galactose (Gal)-Deficient IgA1 O-Glycans by GalNAc-Transferase 2 and Pathogenesis of IgA Nephropathy (IgAN)*. in *Kidney weeks*. 2010, J Am Soc Nephrol. p. 760A.
  66. Stuchlova Horynova, M., et al., *N-Acetylgalactosaminide alpha2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of galactose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2014.

## 12 Přílohy



## Original Article

# *N*-Acetylgalactosaminide $\alpha$ 2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of galactose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy

Milada Stuchlova Horynova<sup>1,2</sup>, Alena Vrablikova<sup>1,2</sup>, Tyler J. Stewart<sup>2</sup>, Kazuo Takahashi<sup>2,3</sup>, Lydie Czernekova<sup>1,2</sup>, Koshi Yamada<sup>2,4</sup>, Hitoshi Suzuki<sup>2,4</sup>, Bruce A. Julian<sup>5,2</sup>, Matthew B. Renfrow<sup>6</sup>, Jan Novak<sup>2</sup> and Milan Raska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc 77515, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA, <sup>3</sup>Department of Nephrology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan, <sup>4</sup>Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University Faculty of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan, <sup>5</sup>Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA and <sup>6</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

Correspondence and offprint requests to: Milan Raska; E-mail: raskamil@uab.edu; Jan Novak; E-mail: jannovak@uab.edu

## ABSTRACT

**Background.** Galactose-deficient *O*-glycans in the hinge region (HR) of immunoglobulin A1 (IgA1) play a key role in the pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN). *O*-Glycans of circulatory IgA1 consist of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) with a  $\beta$ 1,3-linked galactose; both sugars may be sialylated. In patients with IgAN,  $\alpha$ 2,6-sialylated GalNAc is a frequent form of the galactose-deficient *O*-glycans. Prior analyses of IgA1-producing cells had indicated that  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase II (ST6GalNAc-II) is likely responsible for sialylation of GalNAc of galactose-deficient IgA1, but direct evidence is missing.

**Methods.** We produced a secreted variant of recombinant human ST6GalNAc-II and an IgA1 fragment comprised of C $\alpha$ 1-HR-C $\alpha$ 2. This IgA1 fragment and a synthetic HR peptide with enzymatically attached GalNAc residues served as acceptors. ST6GalNAc-II activity was assessed *in vitro* and the attachment of sialic acid to these acceptors was detected by lectin blot and mass spectrometry.

**Results.** ST6GalNAc-II was active with both acceptors. High-resolution mass spectrometry analysis revealed that up to three sialic acid residues were added to the GalNAc residues of the HR glycopeptide.

**Conclusions.** Our data provide direct evidence that ST6GalNAc-II can sialylate GalNAc of galactose-deficient IgA1. As serum levels of galactose-deficient IgA1 with sialylated glycoforms are increased in IgAN patients, our data explain the corresponding part of the biosynthetic pathway.

**Keywords:** aberrant *O*-glycosylation, galactose-deficient IgA1, IgA nephropathy, immunoglobulin A1,  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase ST6GalNAc-II

## INTRODUCTION

Immunoglobulin A (IgA) nephropathy (IgAN) is associated with alterations of hinge region (HR) *O*-glycans of IgA1 [1–3]. *O*-glycans on circulatory IgA1 are Core 1 glycans consisting of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) attached to HR serine or threonine (GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr, also called Tn antigen) with a  $\beta$ 1,3-linked galactose; both sugars may be sialylated. Galactose-GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr disaccharide (also called T antigen) represents a prevailing glycoform on normal circulatory IgA1 [4–8]. In patients with IgAN, an elevated fraction of IgA1 has some *O*-glycans without galactose, leaving terminal GalNAc residue(s) (GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr) accessible for recognition by

IgG and/or IgA1 autoantibodies. The consequence is formation of nephritogenic immune complexes [9] that may deposit in the glomeruli, activate mesangial cells [3, 10, 11] and induce renal injury. This process culminates in end-stage renal failure within 20 years after diagnosis in 20–40% of patients [12]. The IgA1 HR, located between C $\alpha$ 1 and C $\alpha$ 2, consists of two octapeptide repeats [13] with nine potential O-glycosylation sites (POGSs) of which three to six are glycosylated (PVPST<sup>225</sup>PPPT<sup>228</sup>PS<sup>230</sup>PS<sup>232</sup>T<sup>233</sup>PPPT<sup>236</sup>PSPSC; POGSs are in bold and the six commonly glycosylated sites are numbered) [14–16].

O-Glycosylation of IgA1 is initiated by attachment of GalNAc to Ser/Thr residues by a polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T) [1, 17]. Attachment of galactose by a  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (ClGalT1) follows, leading to formation of galactose-GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr disaccharides [18, 19]. IgA1-producing cells from patients with IgAN secrete IgA1 with several galactose-deficient O-glycans. While some glycans have a terminal GalNAc residue, in other glycans the GalNAc residue is capped with sialic acid, forming sialyl-Tn (STn) antigens [20]. The addition of sialic acid is mediated by an  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc) [20–22]. Sialylation of GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr prevents further galactosylation of this structure on IgA1 HR [23]. Therefore, the elevated activity of an ST6GalNAc may play an important role in the pathogenesis of IgAN, by enhancing production of IgA1 with some of the clustered O-glycans deficient in galactose [23, 24].

We found that IgA1-producing cells from IgAN patients exhibited elevated transcription of the *ST6GALNAC2* gene encoding an ST6GalNAc, ST6GalNAc-II [20, 22]. This observation is consistent with elevated enzymatic activity of ST6GalNAc in these cells [20, 22], leading to the hypothesis that ST6GalNAc-II is involved in pathogenesis of IgAN. Recently, we provided indirect evidence for the role of ST6GalNAc-II in the synthesis of sialylated GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr on IgA1 HR by using siRNA knockdown [23]. Here, we provide direct evidence that ST6GalNAc-II can sialylate GalNAc in the IgA1 HR. This process produces a glycoform of IgA1 that is secreted by IgA1-producing cells of IgAN patients of which the serum level is increased. These data further define the pathway for synthesis of galactose-deficient IgA1. This new information may provide leads for development of potential biomarkers and targets for future disease-specific therapy.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines and primary cells

We isolated IgA1-producing cell lines by subcloning EBV-immortalized cells derived from peripheral blood mononuclear cells of IgAN patients and healthy controls [20].

### Production of secreted recombinant ST6GalNAc-II in mammalian HEK293 cells

Human *ST6GALNAC2* cDNA without transmembrane domain (corresponding to 31–374 amino acids, NCBI Acc. No. NM\_006456) was amplified by RT-PCR from human colorectal adenocarcinoma cell line HT29 using gene-specific

primers (forward-primer 5'-GTGCAGCGGTACCCGGGGC CA-3'; reverse-primer 5'-CGCTGGTACAGCTGAAGGAT-3'). PCR product was in-frame blunt-cloned into mammalian expression plasmid pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) ahead of sequence encoding V5 and His tags. This vector was first modified by adding in-frame murine Ig kappa secretion signal-encoding cDNA (corresponding to amino acids MET DTLLLWVLLLVWPGSTGDAA) at the 5'-end [25]. Recombinant ST6GalNAc-II protein was isolated from the supernatant of transiently transfected HEK293 FreeStyle suspension cells (293F).

### Purification of recombinant ST6GalNAc-II

The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography under native conditions performed at 4°C, as described for GalNAc-T2 [25], with minor modifications. The culture supernatant was mixed with 1/9 of supernatant volume of binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole and 0.1% octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; OG) and 1/250 supernatant volume of 50% Ni-NTA agarose (Qiagen) and incubated overnight. Ni-NTA agarose was washed with 10 volumes of washing buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM imidazole and 0.1% OG). Bound protein was eluted with 6 column-volumes of elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole and 0.1% OG) and concentrated on Amicon Ultracell 10K (Millipore) into 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl buffer to reach concentration  $\sim$ 0.5 mg/mL (BCA Assay, Thermo Fisher Scientific). Protein was separated by 10% SDS-PAGE and stained with Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific). Densitometric evaluation of protein bands was performed with ImageJ software (NIH). Identification of the recombinant protein was confirmed by liquid chromatography (LC)-mass spectrometry (MS), as described for GalNAc-T2 [25].

### Preparation of recombinant IgA1 fragment in *Escherichia coli*

cDNA encoding C $\alpha$ 1-HR-C $\alpha$ 2 (NCBI Acc. No. AY647978.1) was codon-optimized for *E. coli* expression and synthesized (Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic). cDNA was cloned into pET101/D-TOPO vector in-frame with 3'-sequences encoding V5 and His tags (Thermo Fisher Scientific). C $\alpha$ 1-HR-C $\alpha$ 2 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) grown for 5 h at 30°C after the induction by 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside and purified from the bacterial pellet lysed with 6 mL of denaturation lysis buffer added per 1 g of cell pellet (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 6 M guanidine-HCl, pH 8.0). After 24 h, the centrifugation-cleared supernatant was mixed at ratio 24 : 1 with 50% Co-NTA agarose (Qiagen), washed with 12 column-volumes of 6 M urea, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl buffer, pH 8.0, then eluted with the same buffer adjusted to pH 6.0. Protein was dialyzed against 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.3 M arginine buffer, pH 7.0 and concentrated by Amicon Ultracell 10K (Millipore) to reach  $\sim$ 1 mg/mL. The identity of the C $\alpha$ 1-HR-C $\alpha$ 2 protein was confirmed by MALDI-TOF MS, as described [26].

### Determination of enzymatic activity of ST6GalNAc-II

IgA1 fragment was GalNAcosylated *in vitro* with GalNAc-T2 [25]; GalNAc-T2 was inactivated (5 min, 96°C). Six micrograms of GalNAcosylated IgA1 fragment were then sialylated for 36 h at 37°C with 1 µg of recombinant ST6GalNAc-II in the reaction mixture consisting of 50 mM MES (pH 6.0), 100 mM CMP-NeuAc, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> in a total volume of 25 µL. Recombinant ST6GalNAc-I was used in a control reaction [24]. Three micrograms of sialylated IgA1 fragment were then desialylated (2 U of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase; 37°C, 8 h) [8]. Glycosylated IgA1 fragments were SDS-PAGE western blotted onto PVDF membrane (Millipore), blocked with SuperBlock (Thermo Fisher Scientific) and developed with biotinylated lectin from *Helix aspersa* (HAA), a lectin specific for terminal GalNAc [9, 20, 22, 27–29] (Sigma-Aldrich) diluted 1 : 1000 in SuperBlock, followed by HRP-conjugated avidin diluted 1:50 000 (Sigma-Aldrich). Protein load of IgA1 fragments was assessed with anti-V5-tag antibody HRP-conjugated (Sigma-Aldrich) diluted 1 : 10 000 in SuperBlock.

### Assessment of the activity of ST6GalNAc-II by MS

One microgram of the acceptor peptide VPSTPPTSPST PPTPSPSCCHPR was first GalNAcosylated using GalNAc-T2 (8 h, 37°C) in 25 µL of a reaction buffer consisting of 25 mM Tris-HCl (pH 6.64), 5 mM MnCl<sub>2</sub> and 250 µM UDP-GalNAc using 0.05 µg of GalNAc-T2. Reaction was terminated by heat inactivation (95°C for 8 min). Sialylation was performed at 37°C for 24 h in 10 µL (~0.4 µg of GalNAcosylated acceptor) of previous reaction with the addition of 2.5 µL ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µL 500 mM MES buffer (pH 6.0), 2.5 µL 200 mM CMP-NeuAc and 1.25 µg of purified recombinant ST6GalNAc-II protein in 2.5 µL of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl buffer. Five microliters of the sialylation reaction were diluted in 75 µL of 0.1% formic acid. Ten microliters of sample were loaded onto Jupiter reverse-phase C18 beads with a 4-µm particle diameter and 90-Å pore size and reaction products were eluted using solvents A (97.4% water, 0.1% FA and 2.5% ACN) and B (2.5% water, 0.1% FA and 97.4% ACN) to form a non-linear gradient from 8 to 30% B over 40 min. LC was directly coupled to and analyzed by Orbitrap Velos high-resolution mass spectrometer with MS1 full scans (*m/z* 200–2000) and MS2 collision-induced dissociation activation on the top 3 ions from each MS1 scan. Spectra were manually analyzed in Thermo XcaliberQual Browser software, wherein MS1 peak averages were assigned glycoforms based on *m/z* data alone.

## RESULTS

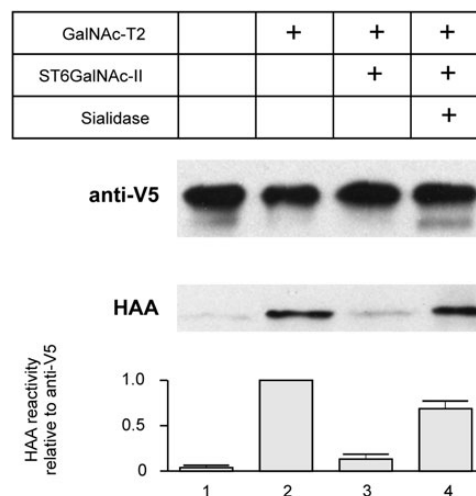
### Production of secreted recombinant human ST6GalNAc-II and recombinant Cα1-HR-Cα2 fragment of IgA1

To assess whether ST6GalNAc-II can attach sialic acid to GalNAc-α-Ser/Thr on IgA1 HR, we produced recombinant, secreted version of ST6GalNAc-II in 293F cells and Cα1-HR-Cα2 IgA1 fragment in *E. coli*. Purified proteins were separated on SDS-PAGE and detected by silver staining

(Supplementary data, Figure S1A and B). The bands representing ST6GalNAc-II (panel A) and Cα1-HR-Cα2 (panel B) corresponded to the apparent molecular masses of proteins of 54 and 27 kDa, respectively. Densitometric analysis indicated ~93% purity of ST6GalNAc-II and Cα1-HR-Cα2. Two potential *N*-glycosylation sites on ST6GalNAc-II were predicted by NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Glycosylation of recombinant ST6GalNAc-II expressed in 293F cells was confirmed by mobility-shift assay using SDS-PAGE immunoblot before and after enzymatic deglycosylation with PNGase F [30]. The results showed a reduction of apparent molecular mass from ~54 to 51 kDa (Supplementary data, Figure S1C). Identity of both ST6GalNAc-II and Cα1-HR-Cα2 proteins was confirmed by mass spectrometry.

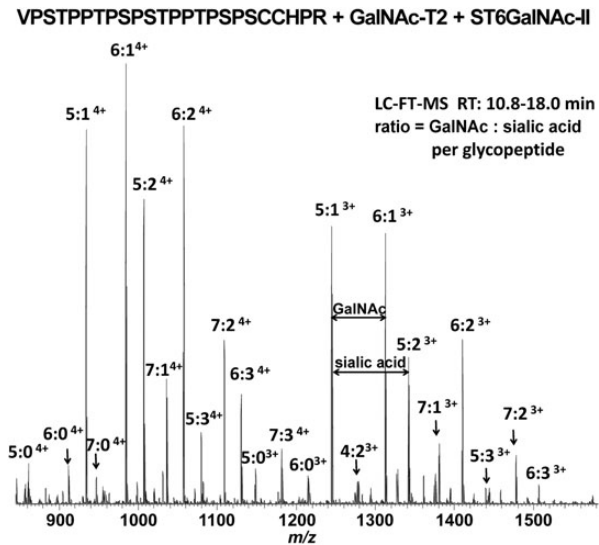
### Assessment of ST6GalNAc-II enzymatic activity

To determine whether ST6GalNAc-II can effectively sialylate GalNAc on IgA1 HR, we used a Cα1-HR-Cα2 fragment of IgA1, produced in *E. coli*, purified, and subsequently GalNAcosylated with recombinant GalNAc-T2 [1, 25]. GalNAc additions and subsequent sialylation were monitored on western blot with HAA lectin (reacts with GalNAc but not with galactose-GalNAc) [20, 22]. HAA did not react with non-glycosylated Cα1-HR-Cα2 (Figure 1, column 1), but recognized GalNAcosylated Cα1-HR-Cα2 (Figure 1, column 2). Sialylation with recombinant ST6GalNAc-II reduced the reactivity with HAA by ~80% (Figure 1, column 3); the full reactivity was restored by treatment with sialidase (Figure 1, column 4). Anti-V5 antibody reactivity confirmed equal loads of Cα1-HR-Cα2.



**FIGURE 1:** Determination of ST6GalNAc-II activity on IgA1 Cα1-HR-Cα2 using lectin blot. Cα1-HR-Cα2 was GalNAcosylated by GalNAc-T2 and then sialylated for 36 h at 37°C with ST6GalNAc-II. Half of the protein was desialylated by sialidase from *Arthrobacter ureafaciens*. Glycosylated proteins were analyzed by western blot with HAA lectin. Anti-V5 antibody was used as load control. (1) Recombinant Cα1-HR-Cα2, (2) Cα1-HR-Cα2 glycosylated with GalNAc-T2, (3) sample 2 sialylated by ST6GalNAc-II, and (4) sample 3 after desialylation. Bar graph expresses densitometric data as means + SD from two independent experiments.





**FIGURE 2:** Determination of ST6GalNAc-II activity using mass spectrometry. IgA1 HR peptide VPSTPPTSPSTPPTSPSCCHPR was GalNAcosylated with GalNAc-T2 and then sialylated using ST6GalNAc-II. MS1 spectra were averaged over glycopeptide-elution retention times; the glycopeptides were observed in 3<sup>+</sup> and 4<sup>+</sup> charge states. Both the non-sialylated and sialylated forms of the GalNAcosylated HR glycopeptide were detected, ranging from 4 to 7 additions of GalNAc with 0 to 3 additions of sialic acid. Major glycopeptide ion species are labeled to show the number of GalNAc and sialic acid additions to the acceptor HR peptide.

Next, we tested ST6GalNAc-II activity by MS using GalNAcosylated HR peptide as substrate. Figure 2 shows high-resolution Fourier transform (FT) MS analysis of enzyme reaction performed for 24 h. LC-FT-MS spectra revealed most of the GalNAcosylated HR peptide was sialylated, corresponding to glycopeptides with 4–7 GalNAc additions to the synthetic HR peptide in the 3<sup>+</sup> and 4<sup>+</sup> charge states with additions of one to three sialic acid residues (peaks labeled with 4:X, 5:X, 6:X, and 7:X show number of GalNAc and sialic acid residues; Figure 2, Supplementary data, Table S1). The distance between adjacent ion species reflected the exact masses of GalNAc and/or sialic acid residues. These data directly demonstrated that ST6GalNAc-II can attach sialic acid residues to GalNAc residues of IgA1 HR glycopeptide.

## DISCUSSION

IgAN is associated with production of IgA1 with galactose-deficient O-glycans recognized by IgG and/or IgA1 autoantibodies, leading to formation of immune complexes that deposit in the glomerular mesangium and incite glomerular injury [31, 32]. Galactose-deficiency of IgA1 clustered O-glycans is associated with elevated levels of sialylated GalNAc, a feature that prevents subsequent galactosylation [20, 23, 24]. The human colon-cancer cell line HCT15 over-expresses ST6GalNAc-I and thereby produces an increased amount of STn [33]. This finding suggests a key role for ST6GalNAc-I in production of sialylated GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr structure on glycoproteins in some types of cancer.

The origin of sialylated GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr in the IgA1 HR in patients with IgAN was puzzling, as IgA1-producing cells from peripheral blood of IgAN patients do not express *ST6GALNAC1* [20, 22]. However, abundant transcription of *ST6GALNAC2*, the gene encoding another sialyltransferase, ST6GalNAc-II, was detected [20, 22]. Based on the overexpression of *ST6GALNAC2* in the cells from IgAN patients versus those of healthy controls and the elevated ST6GalNAc enzymatic activity, we suspected that the candidate enzyme responsible for the sialylation of GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr antigens of IgA1 is ST6GalNAc-II [20, 22].

Humans have four additional enzymes with ST6GalNAc activity, ST6GalNAc-III to ST6GalNAc-VI, but their contribution to oversialylation of IgA1 in IgAN is likely negligible. The transcriptional levels of *ST6GALNAC4* and *ST6GALNAC6* in IgA1-producing cells from IgAN patients versus healthy controls are similar [20, 22]. mRNA for *ST6GALNAC3* is present at low levels in IgA1-producing cells from IgAN patients and healthy controls. *ST6GALNAC5* mRNA is not detectable in IgA1-producing cells (M. Raska, unpublished observations).

To confirm that ST6GalNAc-II can attach sialic acid to GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr on the IgA1 HR, we produced recombinant human ST6GalNAc-II. Other investigators have shown that ST6GalNAc-II isolated from cells attached sialic acid to terminal GalNAc on a variety of mucins [34, 35]. In cell lines transfected by human ST6GalNAc-I- and ST6GalNAc-II-encoding plasmids, sialylation activity of ST6GalNAc-II toward GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr antigen was less than that of ST6GalNAc-I [34]. Limited activity of ST6GalNAc-II in STn synthesis was shown also for some commonly used breast-cancer cell lines that are STn-negative but express ST6GalNAc-II mRNA [35]. These reports confirmed that human ST6GalNAc-II generally prefers galactose-GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr over GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr and less effectively sialylates GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr than does ST6GalNAc-I [34]. Here, we produced recombinant ST6GalNAc-II in eukaryotic cells and used a recombinant IgA1 fragment expressed in *E. coli* that was GalNAcosylated by GalNAc-T2 [25]. To test the ability of the recombinant enzyme to sialylate Tn antigen(s) on IgA1, we used HAA lectin western blot, taking advantage of the fact that sialylation of GalNAc blocks HAA binding to GalNAc-containing IgA1 [24]. HAA binding to GalNAcosylated IgA1 fragment was reduced after incubation with ST6GalNAc-II enzyme and restored by enzymatic desialylation. Thus, ST6GalNAc-II enzyme sialylated terminal GalNAc of the IgA1 HR. ST6GalNAc-I, used as a control, also sialylated IgA1, the GalNAcosylated C $\alpha$ 1-HR-C $\alpha$ 2 fragment, and HR peptide [24]. To better characterize the sialylation products of ST6GalNAc-II enzyme, we used mass spectrometry and GalNAcosylated HR peptide as the substrate. ST6GalNAc-II added up to three sialic acid residues to the HR glycopeptide, suggesting that ST6GalNAc-II can effectively sialylate galactose-deficient IgA1 HR glycans. It is to be noted, however, that these experiments used C $\alpha$ 1-HR-C $\alpha$ 2 fragment of IgA1 or HR glycopeptide and, thus, it is not necessarily straightforward to extrapolate an identical function for this enzyme in a complex environment of the Golgi apparatus and the IgA1 molecule as substrate.

Our previous data indicated that elevated activity of ST6GalNAc-II in IgA1-producing cells of patients with IgAN enhanced synthesis of IgA1 with some of the clustered O-glycans deficient in galactose [23, 24]. However, it is not clear whether sialylated GalNAc is a precursor for the epitope recognized by the autoantibodies or whether sialylation of some GalNAc residues blocks galactosylation of neighboring GalNAc residue(s) and, thus, directly increases the number of glycans in the IgA1 HR with terminal GalNAc.

In summary, we confirmed that ST6GalNAc-II can sialylate GalNAc in the clustered O-glycans of IgA1. As the enzyme is overexpressed in IgA1-producing cells from IgAN patients, its activity may contribute to production of galactose-deficient IgA1 [23], the key autoantigen in the pathogenesis of IgAN.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://ndt.oxfordjournals.org>.

## FUNDING

This work was supported by Ministry of School, Youth, and Sport (CZ.1.07/2.3.00/20.0164, LH11046 to M.R.) and Grant Agency of the Ministry of the Health (NT11081 to M.R.) Czech Republic; and by the National Institutes of Health (DK082753, DK078244 and GM098539 to J.N., M.B.R. and B.A.J.) and by a gift from the IGA Nephropathy Foundation of America (to B.A.J. and J.N.).

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

## REFERENCES

1. Stuchlova Horynova M, Raska M, Clausen H *et al*. Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 829–839
2. Mestecky J, Raska M, Julian BA *et al*. IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 217–240
3. Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy. *N Engl J Med* 2013; 368: 2402–2414
4. Baenziger J, Kornfeld S. Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. *J Biol Chem* 1974; 249: 7270–7281
5. Field MC, Dwek RA, Edge CJ *et al*. O-linked oligosaccharides from human serum immunoglobulin A1. *Biochem Soc Trans* 1989; 17: 1034–1035
6. Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC *et al*. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc  $\alpha$  receptor interactions. *J Biol Chem* 1998; 273: 2260–2272
7. Wada Y, Dell A, Haslam SM *et al*. Comparison of methods for profiling O-glycosylation: human proteome organisation human disease glycomics/proteome initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 719–727
8. Takahashi K, Wall SB, Suzuki H *et al*. Clustered O-glycans of IgA1: defining macro- and micro-heterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 2545–2557
9. Tomana M, Novak J, Julian BA *et al*. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 1999; 104: 73–81
10. Suzuki H, Fan R, Zhang Z *et al*. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 2009; 119: 1668–1677
11. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J *et al*. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1795–1803
12. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. *Semin Nephrol* 2004; 24: 179–196
13. Frangione B, Wolfenstein-Todel C. Partial duplication in the "hinge" region of IgA1 myeloma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 3673–3676
14. Takahashi K, Smith AD, Poulsen K *et al*. Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 O-glycosylation. *J Proteome Res* 2012; 11: 692–702
15. Novak J, Renfrow MB, Gharavi AG *et al*. Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; 22: 287–294
16. Franc V, Rehulka P, Raus M *et al*. Elucidating heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycosylation by use of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry: role of cysteine alkylation during sample processing. *J Proteom* 2013; 92: 299–312
17. Iwasaki H, Zhang Y, Tachibana K *et al*. Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. *J Biol Chem* 2003; 278: 5613–5621
18. Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$  3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16613–16618
19. Ju T, Brewer K, D'Souza A *et al*. Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 2002; 277: 178–186
20. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S *et al*. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest* 2008; 118: 629–639
21. Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J* 2001; 18: 841–850
22. Raska M, Moldoveanu Z, Suzuki H *et al*. Identification and characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells. *J Mol Biol* 2007; 369: 69–78
23. Suzuki H, Raska M, Yamada K *et al*. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem* 2014; 289: 5330–5339
24. Takahashi K, Raska M, Stuchlova Horynova M *et al*. Enzymatic sialylation of IgA1 O-glycans: implications for studies of IgA nephropathy. *PLoS ONE* 2014; 9: e99026
25. Horynova M, Takahashi K, Hall S *et al*. Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Igkappa in insect cells. *Protein Expr Purif* 2012; 81: 175–180
26. Stosova T, Sebel M, Rehulka P *et al*. Evaluation of the possible proteomic application of trypsin from *Streptomyces griseus*. *Anal Biochem* 2008; 376: 94–102
27. Tomana M, Matousovic K, Julian BA *et al*. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int* 1997; 52: 509–516
28. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY *et al*. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney Int* 2007; 71: 1148–1154
29. Novak J, Julian BA, Tomana M *et al*. Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy. *J Clin Immunol* 2001; 21: 310–327
30. Raska M, Takahashi K, Czernekova L *et al*. Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *J Biol Chem* 2010; 285: 20860–20869
31. Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE *et al*. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney Int* 2001; 60: 969–973
32. Hiki Y, Odani H, Takahashi M *et al*. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59: 1077–1085

33. Ikehara Y, Kojima N, Kurosawa N *et al.* Cloning and expression of a human gene encoding an *N*-acetylgalactosamine- $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* 1999; 9: 1213–1224
34. Marcos NT, Pinho S, Grandela C *et al.* Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res* 2004; 64: 7050–7057
35. Samyn-Petit B, Krzewinski-Recchi MA, Steelant WF *et al.* Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1474: 201–211

*Received for publication: 28.7.2014; Accepted in revised form: 30.8.2014*



# Enzymatic Sialylation of IgA1 O-Glycans: Implications for Studies of IgA Nephropathy

Kazuo Takahashi<sup>1,4</sup>, Milan Raska<sup>1,5</sup>, Milada Stuchlova Horynova<sup>1,5</sup>, Stacy D. Hall<sup>1</sup>, Knud Poulsen<sup>6</sup>, Mogens Kilian<sup>6</sup>, Yoshiyuki Hiki<sup>7</sup>, Yukio Yuzawa<sup>4</sup>, Zina Moldoveanu<sup>1</sup>, Bruce A. Julian<sup>1,2</sup>, Matthew B. Renfrow<sup>3\*</sup>, Jan Novak<sup>1\*</sup>

**1** Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, United States of America, **2** Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, United States of America, **3** UAB Biomedical FT-ICR MS Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, United States of America, **4** Department of Nephrology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan, **5** Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Immunology, Palacky University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic, **6** Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark, **7** Fujita Health University School of Health Sciences, Toyoake, Japan

## Abstract

Patients with IgA nephropathy (IgAN) have elevated circulating levels of IgA1 with some O-glycans consisting of galactose (Gal)-deficient N-acetylgalactosamine (GalNAc) with or without N-acetylneuraminic acid (NeuAc). We have analyzed O-glycosylation heterogeneity of naturally asialo-IgA1 (Ale) myeloma protein that mimics Gal-deficient IgA1 (Gd-IgA1) of patients with IgAN, except that IgA1 O-glycans of IgAN patients are frequently sialylated. Specifically, serum IgA1 of healthy controls has more  $\alpha$ 2,3-sialylated O-glycans (NeuAc attached to Gal) than  $\alpha$ 2,6-sialylated O-glycans (NeuAc attached to GalNAc). As IgA1-producing cells from IgAN patients have an increased activity of  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc), we hypothesize that such activity may promote premature sialylation of GalNAc and, thus, production of Gd-IgA1, as sialylation of GalNAc prevents subsequent Gal attachment. Distribution of NeuAc in IgA1 O-glycans may play an important role in the pathogenesis of IgAN. To better understand biological functions of NeuAc in IgA1, we established protocols for enzymatic sialylation leading to  $\alpha$ 2,3- or  $\alpha$ 2,6-sialylation of IgA1 O-glycans. Sialylation of Gal-deficient asialo-IgA1 (Ale) myeloma protein by an ST6GalNAc enzyme generated sialylated IgA1 that mimics the Gal-deficient IgA1 glycoforms in patients with IgAN, characterized by  $\alpha$ 2,6-sialylated Gal-deficient GalNAc. In contrast, sialylation of the same myeloma protein by an  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase yielded IgA1 typical for healthy controls, characterized by  $\alpha$ 2,3-sialylated Gal. The GalNAc-specific lectin from *Helix aspersa* (HAA) is used to measure levels of Gd-IgA1. We assessed HAA binding to IgA1 sialylated at Gal or GalNAc. As expected,  $\alpha$ 2,6-sialylation of IgA1 markedly decreased reactivity with HAA. Notably,  $\alpha$ 2,3-sialylation also decreased reactivity with HAA. Neuraminidase treatment recovered the original HAA reactivity in both instances. These results suggest that binding of a GalNAc-specific lectin is modulated by sialylation of GalNAc as well as Gal in the clustered IgA1 O-glycans. Thus, enzymatic sialylation offers a useful model to test the role of NeuAc in reactivities of the clustered O-glycans with lectins.

**Citation:** Takahashi K, Raska M, Stuchlova Horynova M, Hall SD, Poulsen K, et al. (2014) Enzymatic Sialylation of IgA1 O-Glycans: Implications for Studies of IgA Nephropathy. PLoS ONE 9(6): e99026. doi:10.1371/journal.pone.0099026

**Editor:** Ivan Cruz Moura, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), France

**Received:** March 13, 2014; **Accepted:** April 23, 2014; **Published:** June 11, 2014

**Copyright:** © 2014 Takahashi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All data are included within the manuscript and supplemental information.

**Funding:** This study was supported in part by the NIH grants DK078244, GM098539, and DK082753, and by a gift from the IGA Nephropathy Foundation of America. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: renfrow@uab.edu (MR); jannovak@uab.edu (JN)

## Introduction

Glycosylation is one of the most common post-translational modifications of proteins; about half of mammalian proteins are glycosylated. Notably, immunoglobulins and other glycoproteins may be abnormally glycosylated in patients with autoimmune and chronic inflammatory disorders, infectious diseases, or cancer [1–10]. Consequently, biological functions of differentially glycosylated glycoproteins in health and disease are of growing interest in biomedical research [11].

Some glycoproteins have clustered sites of O-glycosylation in the segments rich in serine (Ser) and threonine (Thr). Mucins, such as membrane-associated MUC1 or secreted mucins, are prototypes of heavily O-glycosylated proteins. The initial step in mucin-type

O-glycosylation is the transfer of N-acetylgalactosamine (GalNAc) to Ser/Thr residues catalyzed by UDP-GalNAc-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts). The attached GalNAc, also called Tn antigen, can be extended by core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (C1GalT1) that adds galactose (Gal) to GalNAc to form the core 1 structure (GalNAc-Gal disaccharide, called T antigen). An  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc; in human B cells it is exclusively ST6GalNAcII that has similar specificity as the ST6GalNAcI isoform) can produce sialylated GalNAc, called sialyl-Tn antigen, by adding N-acetylneuraminic acid (NeuAc) residue to GalNAc, whereas Gal can be sialylated by  $\alpha$ 2,3-sialyltransferases (e.g., ST3Gal1) to form sialyl-T antigen. Sialic acids occupy the terminal positions of many glycan chains of

glycoproteins and contribute to a wide variety of biological functions and disease states [12,13]. Abnormalities in mucin O-glycosylation, including terminal sialylation, are common in some types of cancer [10]. Increased amounts of sialyl-Tn and sialyl-T antigens have been reported in cancer cells [10,14–19], with sialylated O-glycans being associated with higher growth rates [20] and the metastatic process [21,22] and interactions with cell-surface receptors [23].

Human IgA is represented by two structurally and functionally distinct subclasses, IgA1 and IgA2 [24]. Notably, IgA1, but not IgA2, possesses a 19-amino-acid hinge region (HR) with 9 potential O-glycosylation sites; 3 to 6 core 1 O-glycans are attached per HR [25–31] (Figure 1A,B). Primary IgA nephropathy (IgAN), the most common type of primary glomerulonephritis worldwide, is an immune-complex-mediated disease characterized by the presence of glomerular IgA-containing immunodeposits [32–36]. These deposits may be derived from IgA1-containing circulating immune complexes (CIC), often present at increased levels in patients with IgAN [37–43]. IgA1-containing CIC in patients with IgAN are characterized by Gal-deficient HR O-linked glycans of IgA1 (Gd-IgA1) [40,41,43]. These Gal-deficient O-glycans with terminal or sialylated GalNAc are recognized by anti-glycan antibodies, resulting in production of nephritogenic immune complexes that may deposit in the glomeruli, activate mesangial cells, and induce tissue injury [41,43–45]. It has been shown that IgA1-producing cells from IgAN patients are responsible for the production of Gd-IgA1 due to the altered expression and activity of specific glycosyltransferases: decreased for C1GalT1 and elevated for ST6GalNAcII. Consequently, in IgAN patients the circulating levels of Gd-IgA1 with sialylated and terminal GalNAc are elevated. There are two possible mechanisms for the increased amount of sialyl-Tn antigen in IgA1 HR O-glycans in IgAN. In the first, augmented addition of NeuAc to GalNAc prevents further a later addition of Gal (premature sialylation); we have shown that greater activity of ST6GalNAcII is critical for the production of Gd-IgA1 [46–48]. Alternatively, Gal-deficient GalNAc residues may be due only to decreased C1GalT1 activity and the oversialylation of GalNAc residues would thus be a consequence of inefficient galactosylation.

Studies of sialylation of the IgA1 O-glycans in IgAN reported variable findings, ranging from increased [40,41,47,49–51] to decreased [52–56] sialylation. Several groups have examined the role of sialylated IgA1 O-glycans in mesangial deposition; however, results of these studies have been inconclusive. Some studies suggested that oversialylation of IgA1 increased the negative charge of the molecule and thus increased the affinity of such IgA1 to bind mesangial cells [49,51,57]. In contrast, others reported that the decreased amount of NeuAc and Gal in IgA1-HR O-glycans enhanced affinity to extracellular matrix proteins in the mesangium [58–61]. Notably, two studies of IgA1 eluted from isolated glomeruli have identified less NeuAc in the mesangial IgA1 that was enriched for Gd-IgA1 [62,63]. Furthermore, serum IgA1 from healthy controls has more  $\alpha$ 2,3-sialylated O-glycans than  $\alpha$ 2,6-sialylated O-glycans [31]. Thus, we speculate that distribution and sites of attachment of NeuAc in IgA1 O-glycans may play an important role in the pathogenesis of IgAN, as IgA1-HR O-glycans may have both  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-linked NeuAc.

To better assess the biological importance of NeuAc in the IgA1 HR, we established protocols for enzymatic sialylation leading to  $\alpha$ 2,6- or  $\alpha$ 2,3-sialylation of GalNAc and Gal, respectively. Enzymatic sialylation of terminal GalNAc of Gal-deficient asialo-IgA1 (Ale) myeloma protein generated sialylated IgA1 that mimics the Gal-deficient IgA1 glycoforms in patients with IgAN, characterized by  $\alpha$ 2,6-sialylated GalNAc. We also used the same

IgA1 myeloma protein, as it has some of the clustered O-glycans with Gal [30], as an acceptor for  $\alpha$ 2,3-sialylation of Gal residues and generated IgA1 with  $\alpha$ 2,3-sialylated Gal typical for healthy controls. Surprisingly, reactivity with *Helix aspersa* agglutinin (HAA), which is specific for terminal GalNAc and is used in ELISA to measure levels of Gd-IgA1 [40,41,64], markedly decreased not only after  $\alpha$ 2,6-sialylation of GalNAc but also after  $\alpha$ 2,3-sialylation of Gal in IgA1 HR O-glycans. This finding is, we believe, the first demonstration that binding of GalNAc-specific lectin is modulated by sialylation of Gal-containing glycans in the clustered O-glycans of IgA1 with terminal GalNAc. Thus, this experimental approach is useful for testing the effects of NeuAc in clustered IgA1 O-glycans on lectin recognition.

## Materials and Methods

### Recombinant Glycosyltransferases

Soluble forms of recombinant human GalNAc-T2 and ST6GalNAcI were produced in insect cells Sf9 or human HEK 293T cells [65]. Recombinant ST3GalI was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA).

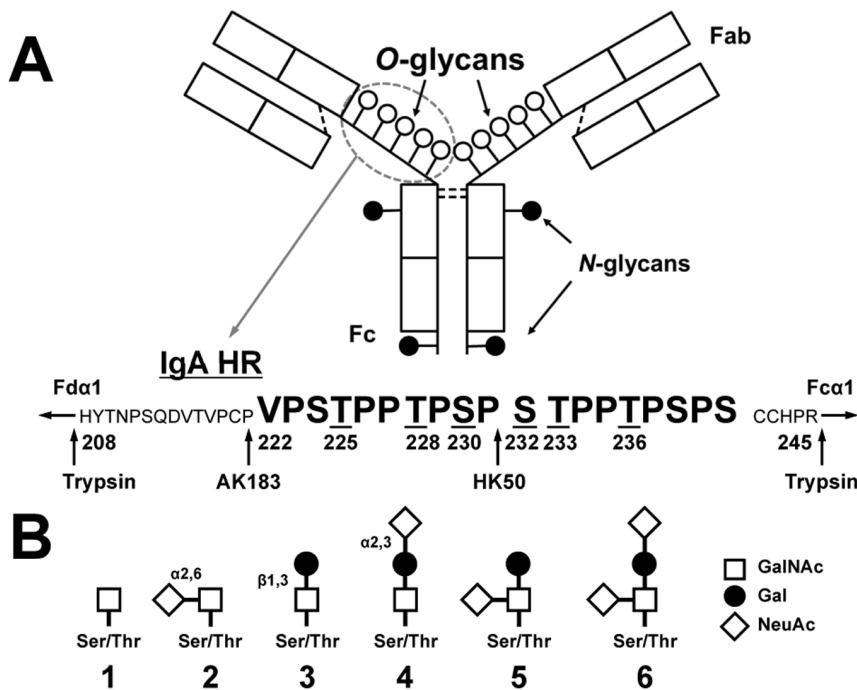
### Acceptors for Enzyme Reactions

A panel of synthetic HR (sHR) (glyco)peptides with no GalNAc, a single GalNAc residue at five different sites, or five GalNAc residues [28] was used as enzyme acceptors for GalNAc-T2. We confirmed that preexisting sites of glycosylation on the sHR glycopeptides did not affect kinetics of the GalNAc-T2 reactions (Figure S1). Thus, sHR peptide, corresponding to the amino-acid sequence of the human IgA1 HR, was synthesized by and purchased from Bachem (Torrance, CA). The following sHR peptide was used as the acceptor for GalNAc-T2: VPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPR-OH. The enzyme reaction mixture contained 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M UDP-GalNAc (Sigma, St. Louis, MO), 15  $\mu$ M acceptor sHR substrate or sHR glycopeptides, and the purified enzyme in a final volume of 25  $\mu$ L. The reaction mixture was incubated at 37°C, samples were collected at different time points, and the reactions were stopped by boiling. Recombinant GalNAc-T2 added 3 to 7 GalNAc residues to sHR in 15 min. The polymeric form of IgA1 (Ale) myeloma protein had been previously isolated from plasma of a patient with multiple myeloma [47]. Briefly, the plasma sample was precipitated with ammonium sulfate (50% saturation) and dissolved in phosphate buffer, and IgG and IgM were removed by affinity chromatography with protein G and anti-human IgM antibodies, respectively [66]. Next, size-exclusion chromatography on a column of Ultrogel AcA22 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) was used to isolate polymeric IgA1. The final purification step included FPLC separation of the polymeric form of IgA1 on a column of Sephacryl 300. We previously reported that the IgA1 (Ale) myeloma protein used in this study was naturally without sialic acid on O-glycans [30].

### Sialyltransferase Reactions

sHR (15  $\mu$ M) with 3 to 7 GalNAc residues or 2  $\mu$ g of purified IgA1 (Ale) myeloma protein was incubated with 2  $\mu$ l of ST3GalI or ST6GalNAcI overnight at 37°C in a total volume of 20  $\mu$ l reaction buffer (50 mM MES buffer, pH 6.5, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CMP-NeuAc). The sialyltransferase reaction with the sHR acceptor with 3 to 7 GalNAc residues was terminated by boiling. The enzyme reaction with IgA1 myeloma protein as acceptor was terminated by snap-freezing the samples at  $-80^{\circ}\text{C}$  [67].





**Figure 1. Structure of IgA1 and the hinge-region (HR) amino-acid sequence.** (A) Monomeric IgA1 and its HR with nine possible sites of O-glycan attachment and the Fc portion of heavy chain with two N-glycans. Underlined serine (S) and threonine (T) residues in HR are frequently glycosylated [26,30,31]. Arrows show cleavage sites of trypsin and two IgA-specific proteases (from *Clostridium ramosum* AK183 and *Haemophilus influenzae* HK50). (B) O-glycan variants of circulatory IgA1:1, Tn antigen; 2, sialyl-Tn antigen; 3, T antigen; 4,  $\alpha$ 3-sialyl-T antigen; 5,  $\alpha$ 6-sialyl-T antigen; 6, disialyl-T antigen. Abbreviations: GalNAc, N-acetylgalactosamine; Gal, galactose; NeuAc, N-acetylneuraminic acid. doi:10.1371/journal.pone.0099026.g001

## SDS-PAGE

IgA1 (Ale) myeloma protein starting samples and enzymatically sialylated IgA1 samples were cleaved with IgA-specific protease from *Clostridium ramosum* AK183 (recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*) and were separated by SDS-PAGE using 4–15% gradient slab gels (Bio-Rad, Hercules, CA) under reducing conditions; the proteins were detected by silver staining.

## HAA Lectin-ELISA

F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-human IgA (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) at a concentration of 3  $\mu$ g/ml was coated onto the wells of Costar 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY). Plates were blocked overnight at 4°C with 2% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PBS containing 0.05% Tween 20 (v/v). Samples of IgA1 diluted in the blocking buffer were added to each well and incubated overnight at 4°C. For neuraminidase treatment, the captured IgA was subsequently desialylated by treatment for 3 h at 37°C with 10 mU/ml neuraminidase from *Vibrio cholerae* (Roche, Basel, Switzerland) in 10 mM sodium acetate buffer, pH 5 [40]. Samples were analyzed with and without neuraminidase treatment. Samples were then incubated for 3 h at 37°C with GalNAc-specific biotinylated HAA lectin (Sigma-Aldrich) diluted 1:500 in blocking buffer [45,47,64,66]. The bound lectin was detected with avidin-horseradish peroxidase conjugate, and the reaction was developed. HAA binding to IgA1 was expressed relative to the standard IgA1 (Ale) myeloma protein [45,47].

## Proteolytic Release of IgA-HR Glycopeptides

IgA1 proteins were treated with an IgA-specific protease (from *Clostridium ramosum* AK183 or from *Haemophilus influenzae* HK50

that differ in the cleavage site; see Figure 1A), followed by trypsin cleavage, to release IgA1 HR glycopeptides [30,31]. The digests were desalted by use of a C18 spin column (Pierce, Rockford, IL) before mass spectrometric (MS) analyses.

## High-resolution MS Analysis

On-line LC was performed by use of an Eksigent MicroAS autosampler and 2D LC nanopump (Eksigent, Dublin, CA). One-hundred-fifty nanograms of digested IgA1 were loaded onto a 100- $\mu$ m-diameter, 11-cm column pulled tip packed with Jupiter 5- $\mu$ m C18 reversed-phase beads (Phenomenex, Torrance, CA). The digests were then eluted with an acetonitrile gradient from 5 to 30% in 0.1% formic acid over 50 min at 650 nL min<sup>-1</sup>. Linear quadrupole ion trap Orbitrap Velos (Orbitrap) mass spectrometry (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) parameters were as described previously [30,31]. Briefly, Orbitrap parameters were set to normal mass range (MS1, 300 < m/z < 1800) with a 50,000 resolution scan followed by five data-dependent collision-induced dissociation tandem MS scans per cycle in profile mode. Dynamic exclusion was set to exclude ions for 2 min after a repeat count of three within a 45-sec duration. All spectra were analyzed by use of Xcalibur Qual Browser 2.1 (Thermo Fisher Scientific) software. Identified IgA1 HR O-glycopeptides were checked against theoretical values by use of GlycoMod tool (<http://www.expasy.org>). Known IgA1 HR amino-acid sequences produced by the combination of IgA-specific protease+trypsin digestions were inputted with trypsin enzyme and 0 missed cleavage sites. Hexose, N-acetylhexosamine (HexNAc) and NeuAc monosaccharide residues were all selected as possible (variable) additions to the IgA HR peptides with a mass tolerance of 10 ppm.

## Results

### Enzymatic $\alpha$ 2,6 Sialylation of Synthetic HR (sHR) with GalNAc Residues

We successfully produced a recombinant soluble form of enzymatically active ST6GalNAcI. This enzyme can sialylate GalNAc of glycoproteins, similarly as does the ST6GalNAcII isoform expressed in human IgA1-producing cells. sHR glycopeptide with 3 to 7 GalNAc residues, generated from sHR in GalNAc-T2 reaction for 15 min, was used as an acceptor substrate for ST6GalNAcI (Figure 2A). ST6GalNAcI added three to six NeuAc residues to sHR peptides with three to seven GalNAc residues, with at least one GalNAc remaining without NeuAc (Figure 2B).

### Enzymatic $\alpha$ 2,3 Sialylation of Native IgA1 Protein

ST3GalI adds sialic acid to the Gal residue of T antigen (GalNAc-Gal). To determine whether recombinant ST3GalI adds NeuAc residues to clustered O-glycans of IgA1, we used naturally sialic-acid-deficient IgA1 (Ale) myeloma protein, with three to six O-glycans with up to five T antigens, as an acceptor substrate (Figure 3A). Our analysis showed that ST3GalI added NeuAc residues to all five T antigens in the clustered HR O-glycans (Figure 3B). IgA-specific protease from *Haemophilus influenzae* HK50 and trypsin produced N-terminal 24-mer glycopeptides (His<sup>208</sup>-Pro<sup>231</sup>) and C-terminal 14-mer glycopeptides (Ser<sup>232</sup>-Arg<sup>245</sup>) (Figure 1A). To determine whether ST3GalI added NeuAc residue to only Gal residues, Ser<sup>232</sup>-Arg<sup>245</sup> HR glycopeptide with GalNAc<sub>1</sub>Gal<sub>1</sub>NeuAc<sub>1</sub> was subjected to online liquid chromatography (LC) collision-induced dissociation (CID) tandem mass spectrometry (MS/MS) (Figure 4A,B). Primary absence of NeuAc in the precursor ion indicated that NeuAc was attached to Gal to form a linear trisaccharide (GalNAc-Gal-NeuAc) (Figure 4B). Additionally, the presence of a Gal-NeuAc oxonium ion further confirmed that the addition was the linear trisaccharide. We have

previously analyzed IgA1-HR O-glycoforms of normal human serum IgA1 and found that most T antigens was  $\alpha$ 2,3-sialylated [31]. Thus, such an enzymatically  $\alpha$ 2,3-sialylated IgA1 mimics IgA1 from normal human serum.

### Model of Distinct $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-sialylated IgA1 HR O-glycoforms

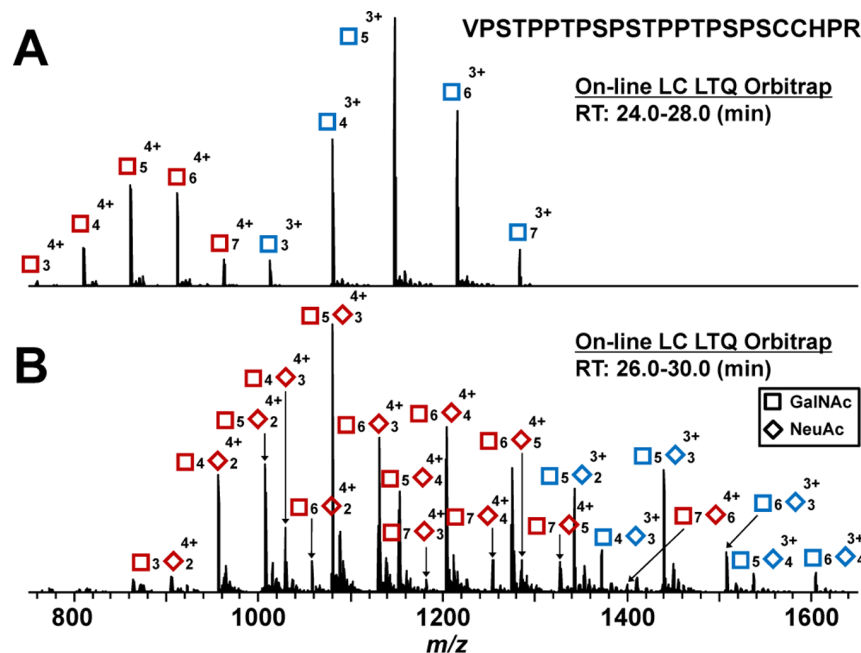
To establish protocols for enzymatic sialylation of either Gal or GalNAc in IgA1-HR clustered O-glycans, asialo-IgA1 (Ale) myeloma protein was sialylated using ST3GalI or ST6GalNAcI, respectively. Significant changes in SDS-PAGE mobility after sialyltransferase reactions of IgA1 Fc fragment produced by IgA-specific protease from *Clostridium ramosum* AK183 indicated that both ST3GalI and ST6GalNAcI added NeuAc to IgA1 HR O-glycans (Figure 5). Enzymatic sialylation of Gal-deficient asialo-IgA1 (Ale) myeloma protein thus generated sialylated IgA1 that mimics the Gal-deficient IgA1 glycoforms in patients with IgAN, characterized by  $\alpha$ 2,6-sialylated GalNAc, or the IgA1 typical for healthy controls, characterized by  $\alpha$ 2,3-sialylated Gal.

### Lectin Binding to Sialylated IgA1

A GalNAc-specific lectin, HAA, is used in ELISA to measure levels of Gd-IgA1. Notably,  $\alpha$ 2,6- as well as  $\alpha$ 2,3-sialylation of IgA1 HR O-glycans markedly decreased reactivity with HAA (Figure 6). Neuraminidase treatment recovered the original HAA reactivity. These results thus suggest that binding of GalNAc-specific lectin is affected not only by sialylation of GalNAc but also by sialylation of Gal in the clustered O-glycans of Gal-deficient IgA1.

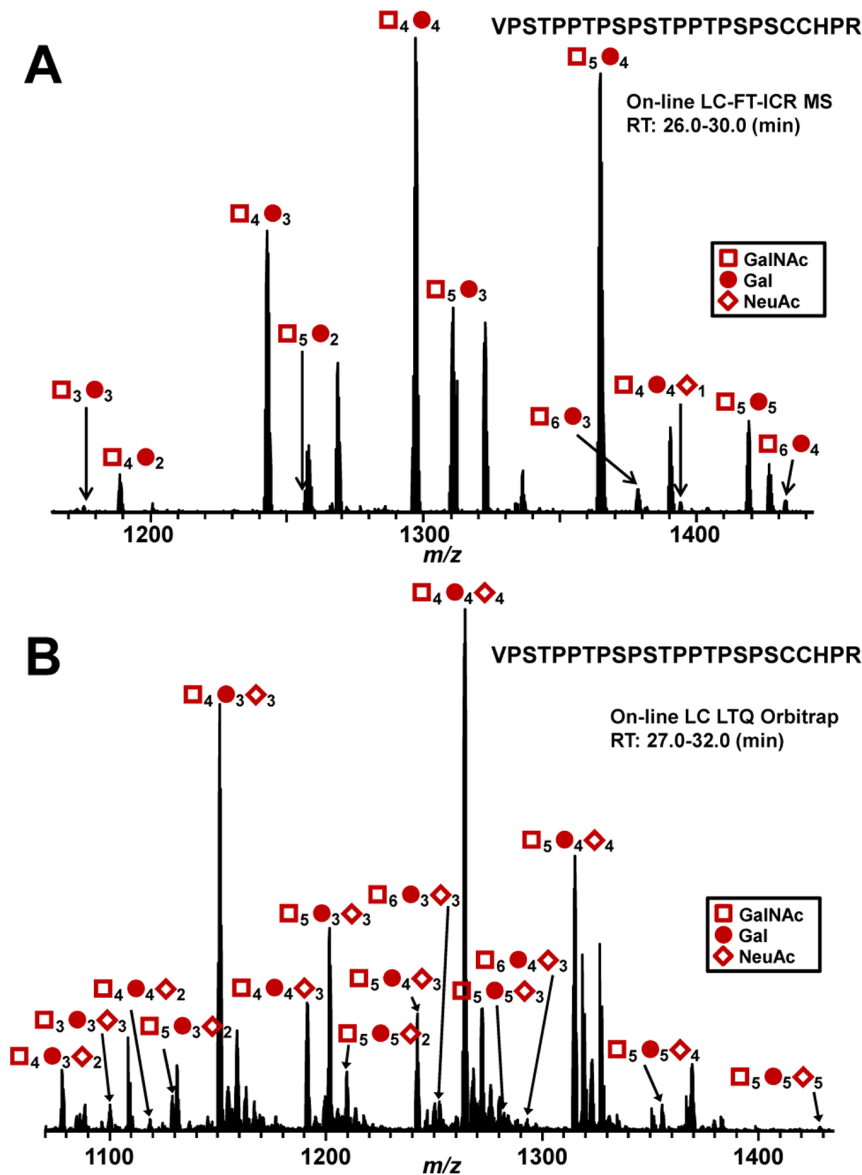
## Discussion

Patients with IgAN have elevated circulating levels of IgA1 with some O-glycans consisting of terminal or sialylated GalNAc. We



**Figure 2. MS analysis of sialylation of GalNAcosylated synthetic HR glycopeptides (sHR) by ST6GalNAcI.** (A) Acceptor sHR glycopeptides for ST6GalNAcI with 3 to 7 GalNAc residues were generated by recombinant GalNAc-T2 after a 15-min reaction. (B) sHR glycopeptides produced after over-night reaction with ST6GalNAcI. Symbols: GalNAc, square; NeuAc, diamond. Red symbols: glycopeptides ionized as 4+ ions; Blue symbols: glycopeptides ionized as 3+ ions.

doi:10.1371/journal.pone.0099026.g002

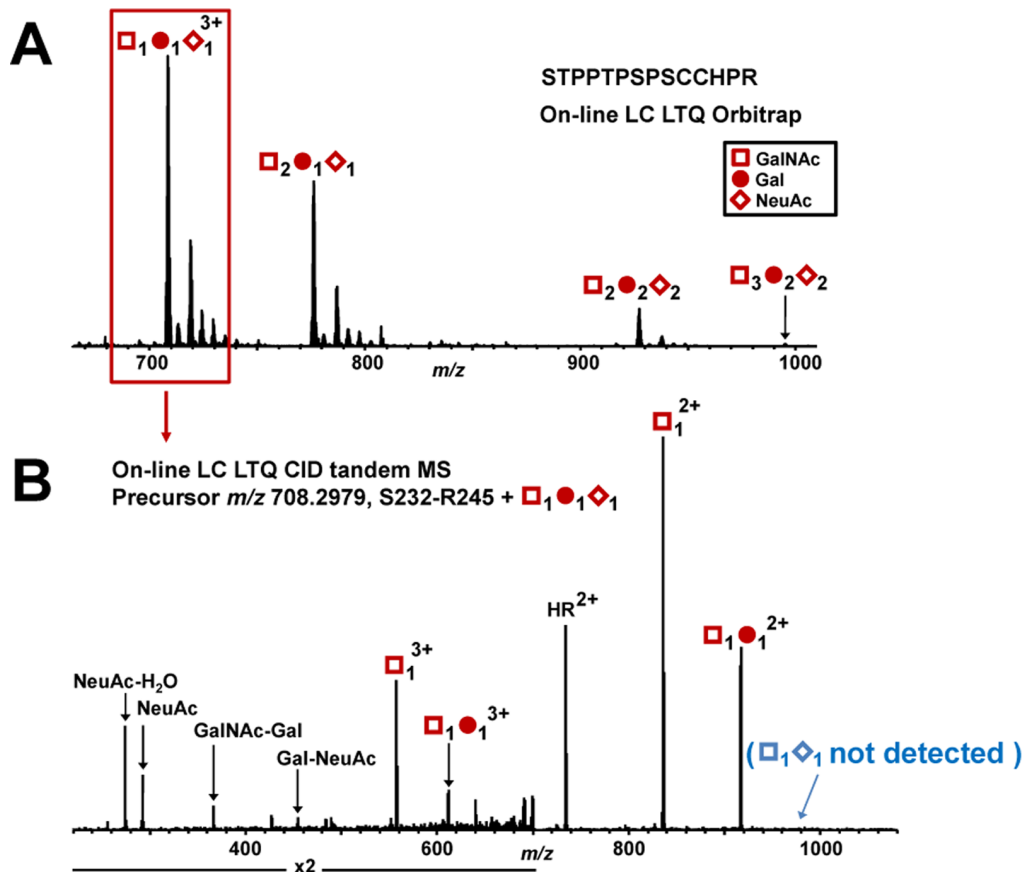


**Figure 3. MS analysis of sialylation by ST3Gal1 of IgA1 myeloma protein that is naturally sialic-acid-deficient.** (A) HR O-glycan profile of IgA1 (Ale) myeloma protein. The number of O-glycans was assigned based on the masses of the amino-acid sequence, GalNAc (empty squares), Gal (full circles), and NeuAc (full diamonds). The O-glycans of the protein are minimally sialylated. All HR O-glycoforms are ionized as triply charged ions. (B) HR O-glycan profile of IgA1 (Ale) myeloma protein after over-night sialylation reaction with ST3Gal1. The enzyme added NeuAc residues to the O-glycans of Ale myeloma protein. All HR O-glycoforms are ionized as quadruply charged ions. doi:10.1371/journal.pone.0099026.g003

have previously analyzed O-glycosylation of naturally sialic-acid-deficient IgA1 (Ale) myeloma protein that mimics the aberrant (*i.e.*, Gal-deficient) IgA1 in patients with IgAN, although HR O-glycans of circulatory IgA1 are frequently sialylated. It has been suggested that the anionic nature of IgA1 may promote mesangial IgA1 deposition [68,69] and the anionic character of IgA1 is in agreement with less NeuAc in IgA1 HR O-glycans [47,49–51]. However, IgA1 eluted from isolated glomeruli has decreased level of NeuAc compared to IgA1 in the circulation of the corresponding IgAN patients [62,63]. These observations of altered sialylation of IgA1 O-glycans have become a significant area of interest in the pathogenesis of IgAN. We have reported that IgA1-producing cells from IgAN patients have increased expression of ST6GalNAcII, an isoform closely related to ST6GalNAcI, and that IgA1 secreted

by IgA1-producing cells from IgAN patients contained terminal and sialylated GalNAc [47]. Furthermore, our high-resolution MS analysis showed that IgA1 from healthy controls had more  $\alpha$ 2,3-sialylated O-glycans than  $\alpha$ 2,6-sialylated O-glycans [31]. We speculate that distribution of NeuAc in IgA1 O-glycans may play an important role in the pathogenesis of IgAN, as IgA1-HR O-glycans have  $\alpha$ 2,3- as well as  $\alpha$ 2,6-linked NeuAc. To study the effect of NeuAc in the IgA1 HR on lectin binding, we established protocols for enzymatic sialylation leading to  $\alpha$ 2,3- or  $\alpha$ 2,6-sialylation of Gal and GalNAc, respectively. These protocols allow linkage-specific sialylation to assess the effect of the respective type of sialylation on IgA1 lectin recognition.

Biological roles of NeuAc in clustered O-glycans of IgA1 are not fully understood. NeuAc residues in IgA1 HR O-glycans influence

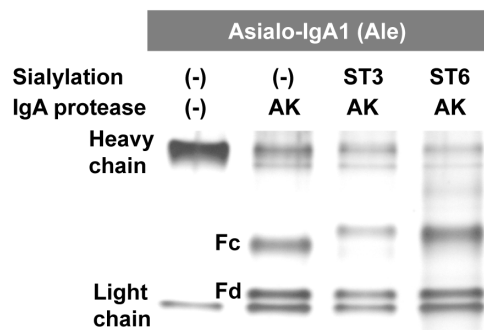


**Figure 4. LC-CID fragmentation of IgA1 Ser<sup>232</sup>-Arg<sup>245</sup> (HR) with GalNAc<sub>1</sub>Gal<sub>1</sub>NeuAc<sub>1</sub>.** (A) Ser<sup>232</sup>-Arg<sup>245</sup> HR O-glycan profile of IgA1 (Ale) myeloma protein enzymatically sialylated with ST3Gal1. (B) LC-CID tandem MS spectrum of Ser<sup>232</sup>-Arg<sup>245</sup> with GalNAc<sub>1</sub>Gal<sub>1</sub>NeuAc<sub>1</sub>. Absence of sialylated GalNAc (shown in blue parenthesis) indicates that NeuAc is attached to Gal (by an  $\alpha$ 2,3-linkage) in the precursor ion. Additionally, the presence of the Gal-NeuAc oxonium ion confirms the attachment of the NeuAc to Gal. doi:10.1371/journal.pone.0099026.g004

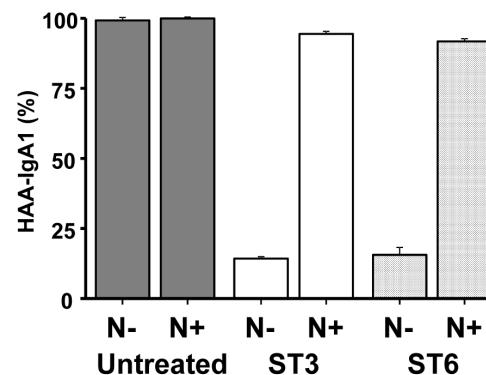
the affinity of IgA1 to some receptors. For example, binding of IgA1 to asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) is reduced by sialylation of IgA1 [70–75]. It also has been suggested that

enhanced sialylation of IgA1 extended its half-life in the circulation due to reduced clearance [1,49,51].

The association of recurrent macroscopic hematuria with upper-respiratory-tract infections in IgAN patients led to the suggestion that the production of pathogenic IgA1 may be related



**Figure 5. SDS-PAGE of IgA1 (Ale) myeloma protein.** IgA1 proteins were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and the protein bands were silver stained. IgA1 was untreated or sialylated with ST3Gal1 (ST3) or ST6GalNAc1 (ST6) sialyltransferases and the Fc and Fd fragments of the heavy chains were generated using IgA-specific protease from *Clostridium ramosum* AK183 (see Fig. 1). Mobility change of Fc fragments after sialyltransferase reactions confirmed sialylation of HR O-glycans. doi:10.1371/journal.pone.0099026.g005



**Figure 6. HAA reactivity of IgA1 (Ale) myeloma protein with (N+) or without (N-) neuraminidase treatment.** HAA lectin binding to Gal-deficient IgA1 (Ale) in ELISA is reduced by sialylation of GalNAc as well as of Gal by specific sialyltransferases. HAA binding to an untreated IgA1 protein is set to 100%. doi:10.1371/journal.pone.0099026.g006

to abnormal handling of mucosal antigens. Gd-IgA1 in the patients with IgAN is found almost exclusively in CIC bound to IgG or IgA1 antiglycan antibodies [37–41]. We recently have shown that these IgG antibodies recognize GalNAc-containing epitopes on the Gal-deficient HR O-glycans of IgA1 [43]. As to the origin of these antibodies, it has been suggested that they may primarily recognize GalNAc-containing epitopes on viruses (e.g., Epstein-Barr virus) or bacteria (streptococci) and that they happen to cross-react with glycans on Gd-IgA1 [76]. As surfaces of microbes can be sialylated [77], NeuAc in IgA1-HR O-glycans may play an important role in the recognition by specific antibodies against the HR of Gd-IgA1. Our enzymatic sialylation protocol in conjunction with MS/MS analyses of the resultant products will be useful for the molecular studies of the glycoprotein or glycopeptide structures that may exhibit strong affinity to glycan-specific antibodies recognizing Gd-IgA1.

IgA-specific proteases are proteolytic enzymes that cleave specific peptide bonds in the human IgA HR [78]. Several species of pathogenic bacteria secrete IgA-specific proteases at mucosal sites of infection that neutralize effector functions of human IgA1 and thereby eliminate an important aspect of host defense. Thus, IgA-specific proteases are considered virulence factors, as they prevent effective IgA-mediated immune defense that requires intact IgA [78–80]. Importantly, some of these bacteria (e.g., *Streptococcus pneumoniae*) also secrete neuraminidase [80–84] that removes sialic acid in the first step of the breakdown of soluble mucins as well as cell-surface glycoconjugates [13]. It is thus conceivable that structural changes by desialylation of IgA1 may facilitate the recognition of Gd-IgA1 HR O-glycans by antiglycan IgG. This hypothesis may explain the association of macroscopic hematuria with upper-respiratory-tract infections. In this setting, the amount of circulating antiglycan autoantibodies presumably increases due to the infection. The antibodies bind to Gd-IgA1, resulting in formation of IgA1-IgG complexes, with subsequent renal deposition, mesangial cell activation, and glomerular injury (for review, see [36]).

We have developed a new model for sugar-specific sialylation of IgA1 O-glycans and showed that GalNAc recognition by HAA

lectin is modulated by sialylation of not only GalNAc but also of Gal in the clustered IgA1 O-glycans. We envision that our enzymatic sialylation protocol will be useful for the study the biological roles of sialic acid in IgA1-HR O-glycans. Moreover, characterizing IgA1-HR glycoforms, including sialylation, is important for understanding the pathogenesis of IgAN and developing disease-specific biomarkers [85].

## Supporting Information

**Figure S1 The amount of GalNAc residues attached to HR acceptor substrates in the time-course study with GalNAc-T2.** The amount of GalNAc attached to acceptor substrates was calculated based on the relative abundance of each glycoform. The following HR glycopeptides with a single GalNAc residue at different sites were used as enzyme acceptors: 4-HP: VPST(GalNAc)PPTPSPSTPPTPSPS, 7-HP: VPSTPPT(GalNAc)PSPSTPPTPSPS, 9-HP: VPSTPPTPS(GalNAc)PSTPPTPSPS, 11-HP: VPSTPPTPSPS(GalNAc)TPPTPSPS, 15-HP: VPSTPPTPSPSTPPT(GalNAc)PSPS. A synthetic HR peptide and HR glycopeptide with five GalNAc residues attached were also used: HP: VPSTPPTPSPSTPPTPSPS; All-HP:VPST(GalNAc)PPT(GalNAc)PS(GalNAc)PS(GalNAc)TPPT(GalNAc)PSPS. (TIF)

## Acknowledgments

We appreciate the assistance of Ms. Rhubell Brown with purification of IgA1 (Ale) myeloma protein.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KT MR MSH SDH KP MK YH YY ZM BAJ MBR JN. Performed the experiments: KT MR MSH SDH ZM. Analyzed the data: KT BAJ MBR JN. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR MSH KP MK YH YY. Wrote the paper: KT MR MSH SDH KP MK YH YY ZM BAJ MBR JN.

## References

- Mestecky J, Tomana M, Crowley-Nowick PA, Moldoveanu Z, Julian BA, et al. (1993) Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy. *Contrib Nephrol* 104: 172–182.
- Moore JS, Wu X, Kulhavy R, Tomana M, Novak J, et al. (2005) Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *AIDS* 19: 381–389.
- Rademacher TW, Williams P, Dwek RA (1994) Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6123–6127.
- Springer GF (1984) T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 224: 1198–1206.
- Troelsen LN, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S (2007) Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 21–29.
- Mestecky J, Raska M, Julian BA, Gharavi AG, Renfrow MB, et al. (2013) IgA Nephropathy: Molecular Mechanisms of the Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 8: 217–240.
- Xue J, Zhu LP, Wei Q (2013) IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconj J* 30: 735–745.
- Novak J, Renfrow MB, Gharavi AG, Julian BA (2013) Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 287–294.
- Scott DW, Patel RP (2013) Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* 23: 622–633.
- Stuchlova Horynova M, Raska M, Clausen H, Novak J (2013) Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci* 70: 829–839.
- Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* 291: 2370–2376.
- Varki A (2008) Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 14: 351–360.
- Varki A and Gagneux P (2012) Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1253: 16–36.
- Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M (1995) Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) in breast carcinogenesis. *Virchows Archiv* 427: 251–258.
- Sewell R, Backstrom M, Dalziel M, Gschmeissner S, Karlsson H, et al. (2006) The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem* 281: 3586–3594.
- Brockhausen I (2006) Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 7: 599–604.
- Pinho S, Marcos NT, Ferreira B, Carvalho AS, Oliveira MJ, et al. (2007) Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* 249: 157–170.
- Storr SJ, Royle L, Chapman CJ, Hamid UM, Robertson JF, et al. (2008) The O-linked glycosylation of secretory/shed MUC1 from an advanced breast cancer patient's serum. *Glycobiology* 18: 456–462.
- Picco G, Julien S, Brockhausen I, Beatson R, Antonopoulos A, et al. (2010) Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. *Glycobiology* 20: 1241–1250.
- Mungul A, Cooper L, Brockhausen I, Ryder K, Mandel U, et al. (2004) Sialylated core 1 based O-linked glycans enhance the growth rate of mammary carcinoma cells in MUC1 transgenic mice. *Int J Oncol* 25: 937–943.
- Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, et al. (1996) Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* 110: 1354–1367.
- Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S, Karsten U, Janni W, et al. (2005) Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen. *Histochem Cell Biol* 123: 631–637.

23. Julien S, Lagadec C, Krzewinski-Recchi MA, Courtand G, Le Bourhis X, et al. (2005) Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 90: 77–84.
24. Mestecky J, Russell MW (1986) IgA subclasses. *Monogr Allergy* 19: 277–301.
25. Baenziger J, Kornfeld S (1974) Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. *J Biol Chem* 249: 7270–7281.
26. Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, et al. (1998) The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc $\alpha$  receptor interactions. *J Biol Chem* 273: 2260–2272.
27. Tarelli E, Smith AC, Hendry BM, Challacombe SJ, 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. *Carbohydr Res* 339: 2329–2335.
28. Renfrow MB, Cooper HJ, Tomana M, Kulhavy R, Hiki Y, et al. (2005) Determination of aberrant O-glycosylation in the IgA1 hinge region by electron capture dissociation Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Biol Chem* 280: 19136–19145.
29. Renfrow MB, Mackay CL, Chalmers MJ, Julian BA, Mestecky J, et al. (2007) Analysis of O-glycan heterogeneity in IgA1 myeloma proteins by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: implications for IgA nephropathy. *Anal Bioanal Chem* 389: 1397–1407.
30. Takahashi K, Wall SB, Suzuki H, Smith AD, Hall S, et al. (2010) Clustered O-glycans of IgA1: Defining macro- and micro-heterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation. *Mol Cell Proteomics* 9: 2545–2557.
31. Takahashi K, Smith AD, Poulsen K, Kilian M, Julian BA, et al. (2012) Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 O-glycosylation. *J Proteome Res* 11: 692–702.
32. Berger J and Hinglais N (1968) [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *Urol Nephrol (Paris)* 74: 694–695.
33. Conley ME, Cooper MD, Michael AF (1980) Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 66: 1432–1436.
34. Julian BA, Waldo FB, Rifai A, Mestecky J (1988) IgA nephropathy, the most common glomerulonephritis worldwide. A neglected disease in the United States? *Am J Med* 84: 129–132.
35. Donadio JV, Grande JP (2002) IgA nephropathy. *N Engl J Med* 347: 738–748.
36. Wyatt RJ, Julian BA (2013) IgA nephropathy. *N Engl J Med* 368: 2402–2414.
37. Czerkinsky C, Koopman WJ, Jackson S, Collins JE, Crago SS, et al. (1986) Circulating immune complexes and immunoglobulin A rheumatoid factor in patients with mesangial immunoglobulin A nephropathies. *J Clin Invest* 77: 1931–1938.
38. Coppo R, Basolo B, Piccoli G, Mazzucco G, Bulzomi MR, et al. (1984) IgA1 and IgA2 immune complexes in primary IgA nephropathy and Henoch-Schonlein nephritis. *Clin Exp Immunol* 57: 583–590.
39. Schena FP, Pastore A, Ludovico N, Sinico RA, Benuzzi S, et al. (1989) Increased serum levels of IgA1-IgG immune complexes and anti-F(ab) $_2$  antibodies in patients with primary IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 77: 15–20.
40. Tomana M, Matousov K, Julian BA, Radl J, Konecny K, et al. (1997) Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int* 52: 509–516.
41. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousov K, Konecny K, et al. (1999) Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 104: 73–81.
42. Novak J, Tomana M, Matousov K, Brown R, Hall S, et al. (2005) IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney Int* 67: 504–513.
43. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, et al. (2009) Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 119: 1668–1677.
44. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, et al. (2011) The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22: 1795–1803.
45. Berthou F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, et al. (2012) Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23: 1579–1587.
46. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J (2001) Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy. *J Clin Immunol* 21: 310–327.
47. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, et al. (2008) IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest* 118: 629–639.
48. Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, Julian BA, et al. (2014) Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem* 289: 5330–5339.
49. Leung JC, Poon PY, Lai KN (1999) Increased sialylation of polymeric immunoglobulin A1: mechanism of selective glomerular deposition in immunoglobulin A nephropathy? *J Lab Clin Med* 133: 152–160.
50. Amore A, Cirina P, Conti G, Brusa P, Peruzzi L, et al. (2001) Glycosylation of circulating IgA in patients with IgA nephropathy modulates proliferation and apoptosis of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 12: 1862–1871.
51. Leung JC, Tang SC, Chan DT, Lui SL, Lai KN (2002) Increased sialylation of polymeric lambda-IgA1 in patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal* 16: 11–19.
52. Odani H, Hiki Y, Takahashi M, Nishimoto A, Yasuda Y, et al. (2000) Direct evidence for decreased sialylation and galactosylation of human serum IgA1 Fc O-glycosylated hinge peptides in IgA nephropathy by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 268–274.
53. Horie A, Hiki Y, Odani H, Yasuda Y, Takahashi M, et al. (2003) IgA1 molecules produced by tonsillar lymphocytes are under-O-glycosylated in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 42: 486–496.
54. Xu LX, Zhao MH (2005) Aberrantly glycosylated serum IgA1 are closely associated with pathologic phenotypes of IgA nephropathy. *Kidney Int* 68: 167–172.
55. Ding JX, Xu LX, Lv JC, Zhao MH, Zhang H, et al. (2007) Aberrant sialylation of serum IgA1 was associated with prognosis of patients with IgA nephropathy. *Clin Immunol* 125: 268–274.
56. Maenuma K, Yim M, Komatsu K, Hoshino M, Tachiki-Fujioka A, et al. (2009) A library of mutated *Maackia amurensis* hemagglutinin distinguishes putative glycoforms of immunoglobulin A1 from IgA nephropathy patients. *J Proteome Res* 8: 3617–3624.
57. Leung JC, Tang SC, Lam MF, Chan TM, Lai KN (2001) Charge-dependent binding of polymeric IgA1 to human mesangial cells in IgA nephropathy. *Kidney Int* 59: 277–285.
58. Coppo R, Amore A, Gianoglio B, Reyna A, Peruzzi L, et al. (1993) Serum IgA and macromolecular IgA reacting with mesangial matrix components. *Contrib Nephrol* 104: 162–171.
59. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Tanaka A, Toma K, et al. (1998) Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. *J Am Soc Nephrol* 9: 2048–2054.
60. Sano T, Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, Shigematsu H, et al. (2002) Enzymatically deglycosylated human IgA1 molecules accumulate and induce inflammatory cell reaction in rat glomeruli. *Nephrol Dial Transplant* 17: 50–56.
61. Hiki Y (2009) O-linked oligosaccharides of the IgA1 hinge region: roles of its aberrant structure in the occurrence and/or progression of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 13: 415–423.
62. Hiki Y, Odani H, Takahashi M, Yasuda Y, Nishimoto A, et al. (2001) Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int* 59: 1077–1085.
63. Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE, Buck KS, Barratt J, et al. (2001) Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney Int* 60: 969–973.
64. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY, Tomana M, Julian BA, et al. (2007) Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney Int* 71: 1148–1154.
65. Horynova M, Takahashi K, Hall S, Renfrow MB, Novak J, et al. (2012) Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Igk in insect cells. *Protein Expr Purif* 81: 175–180.
66. Moore JS, Kulhavy R, Tomana M, Moldoveanu Z, Suzuki H, et al. (2007) Reactivities of N-acetylgalactosamine-specific lectins with human IgA1 proteins. *Mol Immunol* 44: 2598–2604.
67. Raska M, Moldoveanu Z, Suzuki H, Brown R, Kulhavy R, et al. (2007) Identification and characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells. *J Mol Biol* 369: 69–78.
68. Monteiro RC, Halbwegs-Mecarelli L, Roque-Barreira MC, Noel LH, Berger J, et al. (1985) Charge and size of mesangial IgA in IgA nephropathy. *Kidney Int* 28: 666–671.
69. Lai KN, Chui SH, Lewis WH, Poon AS, Lam CW (1994) Charge distribution of IgA-lambda in IgA nephropathy. *Nephron* 66: 38–44.
70. Tomana M, Kulhavy R, Mestecky J (1988) Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology* 94: 762–770.
71. Stockert RJ (1995) The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev* 75: 591–609.
72. Basset C, Devauchelle V, Durand V, Jamin C, Pennec YL, et al. (1999) Glycosylation of immunoglobulin A influences its receptor binding. *Scand J Immunol* 50: 572–579.
73. Steirer LM, Park EI, Townsend RR, Baenziger JU (2009) The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid  $\alpha$ 2,6-galactose. *J Biol Chem* 284: 3777–3783.
74. Moldoveanu Z, Epps JM, Thorpe SR, Mestecky J (1988) The sites of catabolism of murine monomeric IgA. *J Immunol* 141: 208–213.
75. Mestecky J, Moldoveanu Z, Tomana M, Epps JM, Thorpe SR, et al. (1989) The role of the liver in catabolism of mouse and human IgA. *Immunol Invest* 18: 313–324.
76. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J (2008) IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol* 28: 78–87.
77. Stephenson AE, Wu H, Novak J, Tomana M, Mintz K, et al. (2002) The Fap1 fibrial adhesion is a glycoprotein: antibodies specific for the glycan moiety block the adhesion of *Streptococcus parasanguis* in an *in vitro* tooth model. *Mol Microbiol* 43: 147–157.
78. Mistry D, Stockley RA (2006) IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1244–1248.
79. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K and Frandsen EV (1996) Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and

- pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 104: 321–338.
80. Reinholdt J, Tomana M, Mortensen SB, Kilian M (1990) Molecular aspects of immunoglobulin A1 degradation by oral streptococci. *Infect Immun* 58: 1186–1194.
  81. Corfield T (1992) Bacterial sialidases—roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* 2: 509–521.
  82. Severi E, Hood DW, Thomas GH (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* 153: 2817–2822.
  83. King SJ (2010) Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol Oral Microbiol* 25: 15–24.
  84. Lewis AL, Lewis WG (2012) Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cell Microbiol* 14: 1174–1182.
  85. Hastings MC, Moldoveanu Z, Suzuki H, Berthoux F, Julian BA, et al. (2013) Biomarkers in IgA nephropathy: relationship to pathogenetic hits. *Expert Opin Med Diagn* 7: 615–627.

# Aberrant *O*-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma

Milada Stuchlová Horynová · Milan Raška ·  
Henrik Clausen · Jan Novak

Received: 22 May 2012 / Revised: 3 July 2012 / Accepted: 3 July 2012  
© Springer Basel AG 2012

**Abstract** Glycosylation abnormalities have been observed in autoimmune diseases and cancer. Here, we compare mechanisms of aberrant *O*-glycosylation, i.e., formation of Tn and sialyl-Tn structures, on MUC1 in breast cancer, and on IgA1 in an autoimmune disease, IgA nephropathy. The pathways of aberrant *O*-glycosylation, although different for MUC1 and IgA1, include dysregulation in glycosyltransferase expression, stability, and/or intracellular localization. Moreover, these aberrant glycoproteins are recognized by antibodies, although with different consequences. In breast cancer, elevated levels of antibodies recognizing aberrant MUC1 are associated with better outcome, whereas in IgA nephropathy, the antibodies recognizing aberrant IgA1 are part of the pathogenetic process.

**Keywords** IgA nephropathy · *O*-glycosylation · IgA · MUC1 · Anti-glycan antibodies

## Introduction

Alterations in glycan moieties of cell-surface or secreted glycoproteins are now recognized as a factor that can cause, or contribute to, defects in the development and function of cells and organs, leading in some instances to autoimmune diseases as well as cancers (for review see [1–6]).

Autoimmune disease immunoglobulin A (IgA) nephropathy (IgAN) is associated with alterations in mucin-type *O*-glycans [7–9]. In patients with IgAN, a fraction of IgA1 molecules has some *O*-glycans deficient in galactose (Gal) leading to exposition of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues attached to serine or threonine (Tn antigen, also called CD175). These Tn-antigen-containing IgA1 molecules are recognized by IgG and/or IgA1 antibodies, resulting in the formation of nephritogenic immune complexes [7, 9, 10].

Some cancer cells, on the other hand, produce similar immature truncated aberrant *O*-glycans on various cellular glycoproteins. For example, adenocarcinoma cells of breast and other tissues over-express the cell-membrane mucin MUC1 with truncated non-branched *O*-glycans consisting of Tn and sialyl-Tn (STn, CD175s) antigens as well as of Core 1 glycans such as T (GalNAc–Gal disaccharide, also called CD176) and sialyl-T antigens (ST, CD176s), whereas branched *O*-glycans of Core 2 and, to a lesser degree Core 3, are typical for the glycoproteins in the normal counterpart cells [1, 11, 12]. The aberrant *O*-glycosylation appears to play functional roles for the malignant phenotype of cancer cells. Truncation of *O*-glycans to STn on the surface glycoproteins of cancer cell

---

M. Stuchlová Horynová · M. Raška (✉)  
Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry,  
Palacky University, Hněvotínská 3,  
77515 Olomouc, Czech Republic  
e-mail: raskamil@uab.edu

M. Stuchlová Horynová · M. Raška  
Department of Microbiology, University of Alabama  
at Birmingham, 845 19th St. S., BBRB 762, Birmingham,  
AL 35294, USA

H. Clausen  
Center for Glycomics, Departments of Cellular and Molecular  
Medicine, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3,  
2200 Copenhagen N, Denmark

J. Novak (✉)  
Department of Microbiology, University of Alabama  
at Birmingham, 845 19th St. S., BBRB 761A,  
Birmingham, AL 35294, USA  
e-mail: jannovak@uab.edu



lines changes growth morphology and adhesiveness important for metastatic behavior [13, 14]. These aberrant glycoproteins are recognized by antibodies recognizing Tn, STn and T *O*-glycopeptide-associated neopeptides or the core peptides [15–17]. Such antibodies, primarily those specific for aberrantly glycosylated glycoproteins, seem to be protective in cancer [18], in contrast to those recognizing IgA1 *O*-glycans in IgAN.

The *O*-glycosylation pathways leading to expression of the immature truncated Tn, STn, and T *O*-glycans on glycoproteins are diverse and not fully clarified. In this review, we will discuss molecular mechanisms leading to the glycosylation changes in *O*-glycans on IgA1 in patients with IgAN and on MUC1 in patients with breast cancer. We will also discuss characteristics of antibodies in both types of diseases that target these neo-glycoproteins through their truncated *O*-glycans and *O*-glycopeptide neopeptides (i.e., neopeptides involving glycan(s) or glycan(s) in the context of the amino-acid sequence) and their potential for use in diagnostic and prognostic applications.

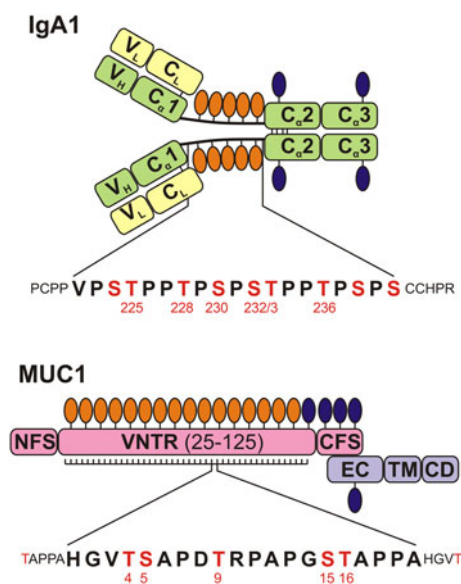
### Molecular structure of human IgA1

Monomeric human IgA1 has two heavy chains and two light chains connected by disulphidic bridges. The heavy chains are composed of three constant ( $C_x$ ) domains and one variable (V) domain, and light chains of one C domain and one V domain. A hinge region of IgA1, located between  $C_{x1}$  and  $C_{x2}$ , has a unique amino acid sequence containing two octapeptide repeats (Fig. 1) with nine potential *O*-glycosylation sites (POGSs) of which three to six are glycosylated (PVPST<sup>225</sup>PPT<sup>228</sup>PS<sup>230</sup>PS<sup>232</sup>T<sup>233</sup>PPT<sup>236</sup>PSPSC; POGSs are in bold and the six sites utilized on circulatory IgA1 are numbered; Fig. 1) [19, 20]. There are also two *N*-glycosylation sites per heavy chain. Monomers of IgA1 can be covalently associated during the production in plasma cells with a 17-kDa J-chain and thus be present as dimers and higher oligomers, called collectively polymeric IgA1. In serum, most of IgA1 (80–99 %) is monomeric [21].

The carbohydrate composition of the *O*-linked glycans on normal serum IgA1 is variable but the prevailing form is the GalNAc with a  $\beta$ 1,3-linked Gal (Core 1), and its mono- and di-sialylated forms [22].

### Aberrant *O*-glycosylation of IgA1 in patients with IgAN

IgAN, the most common primary glomerulonephritis, is characterized by IgA1 immune deposits in glomerular mesangium usually with complement C3, and frequently with co-deposits of IgG and/or IgM (for review see [9]).



**Fig. 1** Molecular structures of human IgA1 and MUC1. IgA1 monomer (top) is composed of two light chains (L) and two heavy chains (H), with *O*-glycans (orange oval symbols) attached in the hinge region between the first ( $C_{x1}$ ) and second ( $C_{x2}$ ) constant domains of the heavy chain. Two *N*-glycans (blue oval symbols) are attached to each heavy chain. The hinge-region sequence is composed of two octapeptide repeats with up to six *O*-glycans attached (numbered S/T residues in the hinge-region amino-acid sequence) [19, 20]. Constant and variable domains of light chains ( $C_L$ ,  $V_L$ ) and heavy chains ( $C_{x1-3}$ ,  $V_H$ ) are in yellow and green color, respectively. Potential *O*-glycosylation sites (POGS) are in red and the six residues that had been shown to be glycosylated on circulatory IgA1 are numbered [19, 20, 22]. MUC1 (bottom) is a transmembrane glycoprotein composed of two noncovalently associated subunits. The N-terminal extracellular subunit contains variable number of tandem repeats (VNTR) of 20 amino acids that may carry up to five *O*-glycans (orange oval symbols) [24]. *N*-glycans are shown by blue oval symbols. The extracellular subunit is in pink color and contains N-terminal flanking sequence (NFS), VNTR, and C-terminal flanking sequence (CFS). The transmembrane subunit is in blue color and contains extracellular segment (EC), transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain (CD). POGS in VNTR amino-acid sequence are in red color. The numbers are used for orientation in reference to a single VNTR

Serum of patients with IgAN exhibits elevated levels of IgA1 molecules that have some *O*-glycans aberrantly glycosylated, i.e., deficient in Gal [7]. Furthermore, IgA1 in the mesangial deposits is enriched for this aberrantly glycosylated IgA1 form (for review see [9]). IgA1 with Gal-deficient hinge-region glycans are recognized by IgG and/or IgA1 antibodies [7, 10], resulting in the formation of circulating immune complexes. These complexes are relatively large, are not efficiently cleared from the circulation, and tend to deposit in the renal mesangium where they bind to the resident mesangial cells and activate them. This activation results in cellular proliferation, production of cytokines, and overproduction of extracellular matrix proteins leading to glomerular fibrosis and, ultimately, to renal failure [9].

## Molecular structure of human MUC1

MUC1 is a large type I transmembrane mucin glycoprotein that consists of two non-covalently-linked subunits released from a precursor polypeptide by proteolytic cleavage (Fig. 1). The large N-terminal extracellular subunit contains a domain with variable number of tandem repeats (VNTRs) of 20 highly conserved amino acids with dense *O*-glycosylation (HGVT<sup>4</sup>S<sup>5</sup>APDT<sup>9</sup>RPAPGS<sup>15</sup>T<sup>16</sup>APPA; POGSs are in bold; Fig. 1); MUC1 is polymorphic with variable number of VNTRs from 25 to 125. Notably, carriers of alleles with a low number of VNTRs may exhibit increased susceptibility to cancer. The N-terminal subunit associates with the C-terminal transmembrane subunit consisting of short extracellular domain, membrane-spanning domain, and C-terminal cytoplasmic tail [23]. MUC1 is one of the most extensively studied cancer-associated mucins and serves as a model of aberrant *O*-glycosylation and cancer-associated *O*-glycoprotein immunogenicity.

The MUC1 VNTRs contain five POGSs, all of which can be *O*-glycosylated [24], although MUC1 isolated from normal human milk contains only 2–3 *O*-glycans per VNTR. MUC1 also contains potential *N*-glycosylation sites, one of which is located in the membrane-associated subunit and four near the C-terminal end of the extracellular subunit. MUC1 expressed by normal mammary gland epithelial cells is generally glycosylated with larger branched Core 2 *O*-glycans extended by poly-lactosamine and, to a lesser extent, capped Core 1 *O*-glycans, whereas the truncated Tn, STn, and T structures are absent [12].

## Aberrant glycosylation of MUC1 in breast cancer

MUC1 is characteristically overexpressed in breast adenocarcinomas as well as adenocarcinomas of other organs, including ovary, lung, pancreas, and prostate. The *O*-glycosylation of MUC1 VNTRs produced by cancer cells is altered in density and core structures and elongation/capping of the *O*-glycans. In breast cancer, MUC1 is greatly overexpressed and has lost in polarized expression on the apical surface of the cell. The aberrant *O*-glycosylation of MUC1 includes an increase in the density of *O*-glycans (average POGS occupancy 4.2–4.8 per one VNTR in breast cancer T47D cell line compared to 2.6 in normal human milk) and a switch from branched Core 2 to truncated Core 1 *O*-glycans [23–26]. MUC1 is shed from cancer cells and patients with late-stage breast cancer have elevated levels of MUC1 in the circulation [17, 27]. Circulating MUC1 in these patients is glycosylated mainly with the Core 1 ST structures [28], which suggests that truncated glycoforms with T, Tn, and STn structures shed from cancer cells are cleared from the circulation by lectin

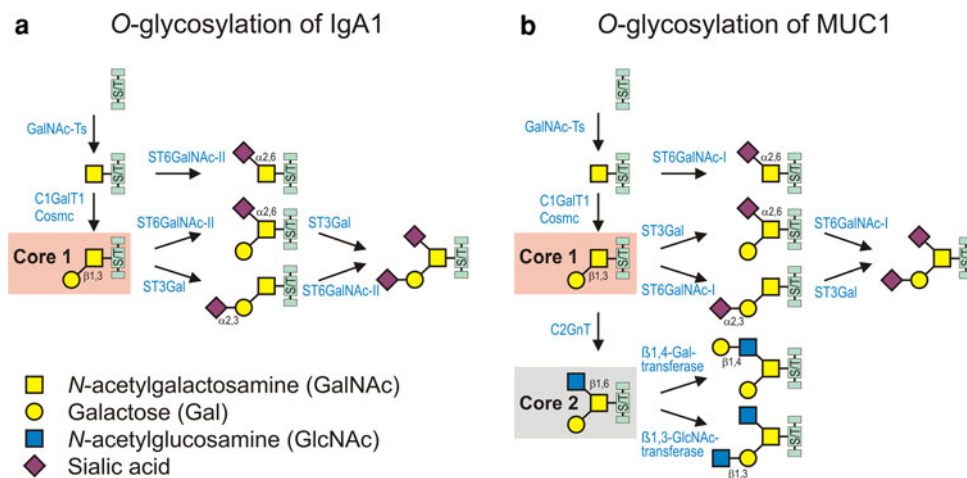
receptors and antibodies [15, 29, 30]. In this respect, it has been found that dendritic cells selectively take up Tn-containing MUC1 glycoforms via their macrophage Gal-recognizing C-type lectin (MGL) receptor that exhibits significant affinity for  $\alpha$ GalNAc. It is likely that this process is involved in the induction of Tn-MUC1 glycopeptide autoantibodies found in some cancer patients [15, 29].

## The biosynthetic pathways for *O*-glycans on IgA1 and MUC1

Mucin-type *O*-glycosylation is a highly complex process potentially involving more than 50 glycosyltransferases, enzymes that add one monosaccharide to a growing *O*-glycan. *O*-glycosylation is initiated by attachment of GalNAc to Ser/Thr residues by a large family of at least 20 UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts) with different but partly overlapping functions (for review see [31, 32]). The repertoire of GalNAc-Ts in a particular cell determines sites and patterns of *O*-glycan attachments to proteins, but the specific roles of individual GalNAc-T isoforms and how these enzymes cooperate is not fully understood. Initiation of *O*-glycosylation generally occurs in Golgi apparatus [33]. However, a recent report revealed that activation of Src proto-oncogene leads to selective relocation of some GalNAc-Ts to the ER, resulting in the early initiation of *O*-glycosylation characterized by Tn structures on target proteins and, consequently, leading to presence of more dense *O*-glycans on glycoproteins such as MUC1 [34]. Although it is tempting to speculate that such a mechanism may play a role in the generation of malignant glycophenotype in cancer, further studies are needed to address this issue and elucidate the mechanisms directing relocation of GalNAc-Ts, but not other glycosyltransferases.

### Initiation of IgA1 *O*-glycosylation

Initiation of *O*-glycosylation of the hinge region of IgA1 has been originally attributed to the ubiquitously expressed GalNAc-T2 [35]. However, the IgA1 hinge region resembles mucin-type sequence that can be an excellent acceptor for many different GalNAc-Ts. Indeed, a more recent report has shown that other GalNAc-Ts, including GalNAc-T1 and GalNAc-T11 can also initiate *O*-glycosylation of IgA1 hinge-region peptide (Fig. 2a) [36]. In fact, so far, all GalNAc-Ts analyzed for the peptide specificity can *O*-glycosylate one or more of the six POGS in hinge-region peptide (Clausen, pers. comm.). Supporting this hypothesis, our recent data indicated that not only GalNAc-T2 [8]



**Fig. 2** Biosynthetic pathways of *O*-linked glycans on human circulatory IgA1 (**a**) and MUC1 on mammary epithelial cells (**b**). *O*-glycosylation is initiated by a family of enzymes known as the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts); these enzymes catalyze the transfer of GalNAc from UDP-GalNAc to the hydroxyl group on Ser or Thr residues (S/T). **a** Biosynthesis of *O*-linked glycans of circulatory IgA1 can be initiated by GalNAc-T1, 2, 11, and possibly by other GalNAc-Ts and followed by addition of Gal from UDP-Gal catalyzed by the Core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase 1 (C1GalT1). Synthesis of the stable enzyme C1GalT1 depends on Core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase-specific chaperone (Cosmc). The Core 1 disaccharide can be elongated with sialic acid residue(s) transferred from CMP-*N*-acetylneuraminic acid (CMP-NeuAc) by sialyltransferases to either Gal or GalNAc or both. The reactions are catalyzed by a Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase (ST3Gal) and a  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc), respectively. In IgA1-producing cells, sialylation of GalNAc is catalyzed exclusively by ST6GalNAc-II [8, 64]. Patients with IgAN have elevated serum levels of aberrantly glycosylated IgA1, with some of their *O*-glycans Gal-deficient and, thus, consisting of GalNAc or sialylated GalNAc [8]. This aberrancy is a result of changes in the activities of two glycosyltransferases, decreased C1GalT1 and increased ST6GalNAc-II, in the

IgA1-producing cells in the patients with IgAN [8]. Sialylated GalNAc represents a terminal step of the *O*-glycosylation pathway, as it cannot be further modified (for review see [9]). **b** Biosynthesis of *O*-linked glycans of MUC1 on mammary epithelial cells is initiated by GalNAc-T1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, and followed by addition of Gal from UDP-Gal catalyzed by C1GalT1. The Core 1 disaccharide can be elongated with sialic acid residue(s) transferred from CMP-NeuAc by sialyltransferases to either Gal or GalNAc or both. The reactions are catalyzed by a Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase (ST3Gal) and a  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc-I). The Core 1 can be branched by addition of GlcNAc, catalyzed by Core 2  $\beta$ 1,6-GlcNAc transferase (C2GnT), and further elongated by  $\beta$ 1,4-Gal-transferase and  $\beta$ 1,3-GlcNAc-transferase. In breast cancer epithelial cells, MUC1 is aberrantly expressed, and it contains less Core 2 glycans, more Core 1 glycans, and elevated level of sialylated Core 1 glycans and sialylated GalNAc. The aberrant glycosylation stems from decreased activity of C2GnT and increased activity of sialyltransferases, ST3Gal, and ST6GalNAc-I [12, 61, 68–70]. Furthermore, ST6GalNAc-I, C1GalT1, and C2GnT compete for the same acceptor, GalNAc [1, 59, 68]. Biosynthetic pathway of Core 3 *O*-glycans is not shown for simplicity, as these glycans are relatively uncommon on MUC1

but also other GalNAc-Ts are abundantly expressed in IgA1-producing cells derived from peripheral blood of IgAN patients and healthy controls [37]. Specifically, GalNAc-T14 was among the major GalNAc-Ts transcribed in IgA1-producing cells and its expression was fivefold greater in the cells from the patients versus the cells from healthy controls. The expression of GalNAc-T2, and other GalNAc-Ts, did not differ between patients and healthy controls. It remains to be determined whether the overexpression of GalNAc-T14 may contribute to the aberrant glycosylation of IgA1 in IgAN. Synthesis of Tn structures on Gal-deficient IgA1 produced by the cells from patients with IgAN appears to occur in the Golgi apparatus, but not in the ER, suggesting that the above-mentioned ER-based initiation of *O*-glycosylation may be specific for epithelial cells producing membrane-associated MUC1 and other glycoproteins [8].

#### Initiation of MUC1 *O*-glycosylation

The initiation of *O*-glycosylation of MUC1 VNTR with its five POGSS (HGVT<sup>4</sup>S<sup>5</sup>APDT<sup>9</sup>RPAPGS<sup>15</sup>T<sup>16</sup>APPA) has been studied in a great detail. Many GalNAc-Ts, including GalNAc-T1, 2, 3, and 6, can *O*-glycosylate Thr<sup>4</sup> in the VTSA sequence and Ser<sup>15</sup> and Thr<sup>16</sup> in the GSTA sequence of the MUC1 VNTR (Fig. 2b) [25, 38, 39]. GalNAc-T11 only glycosylates Thr<sup>4</sup> and Thr<sup>16</sup> [40]. Other GalNAc-Ts appear to have similar activities toward MUC1, but detailed analyses of GalNAc attachment sites in MUC1 need to be performed [41–43]. Only GalNAc-T4 has so far been shown to be able to glycosylate the remaining two residues in the MUC1 VNTR, Ser<sup>5</sup> and Thr<sup>9</sup>. This reaction is rather unique in that GalNAc-T4 requires prior GalNAc attachment at any of the other sites in order to initiate glycosylation [44]. GalNAc-T4 is

therefore predicated to play a major role in the higher density of *O*-glycan attachments to the MUC1 VNTR in cancer cells, likely due to the lectin domain that directs the glycopeptide specificity [44]. Although overexpression of GalNAc-T4 in breast cancer cell lines has been observed [45], further studies of breast tissues are needed.

The expression of the GalNAc-Ts controlling the initiation glycosylation step is differentially regulated during maturation and differentiation of cells [46] and markedly altered in cancer [47–49]. This is especially evident for the GalNAc-T3 and GalNAc-T6 isoforms, which constitute a subfamily of GalNAc-Ts with similar functions. GalNAc-T6 has been reported to be a biomarker of breast cancer [49, 50], and recently, it was discovered that GalNAc-T6 plays a direct role in *O*-glycosylation of MUC1 in breast cancer and expression of GalNAc-T6 in breast-cancer cell lines reduces cell adhesion and enhances growth properties [51]. Another enzyme, GalNAc-T14, is overexpressed in breast cancer [52]. This GalNAc-T isoform is highly similar to GalNAc-T2 and, could contribute to increase in the *O*-glycan density of MUC1 observed in breast cancer. Further studies are clearly needed to address the importance of individual GalNAc-Ts in cancer, namely using strategies that would directly link expression of individual enzymes with altered glycosylation and functions of particular glycoproteins in cells and tissues. Genome-wide association studies (GWAS) support direct functions of GalNAc-Ts in carcinogenesis [53, 54] and germline and somatic mutations in GalNAc-T12 have been found in patients with colon cancer [55].

In summary, the first step of *O*-glycosylation—the attachment of GalNAc to multiple Ser and Thr residues in IgA1 and MUC1 involves the coordinated function of multiple GalNAc-Ts and changes in expression of the repertoire of GalNAc-Ts and, in at least some instances, changes in GalNAc-Ts localization. These changes likely affect the density and pattern of *O*-glycans attached to these molecules, i.e., how many Ser/Thr residues and which ones will receive GalNAc. One of the major research challenges is to correlate differential expression of various GalNAc-Ts with detailed structural determination of sites of *O*-glycan attachments in *O*-glycoproteins. Although modern mass spectrometric methods can identify specific *O*-glycosylation sites in glycoproteins, there are still considerable hurdles to overcome to make screening the sites of mucin-type dense *O*-glycans in glycoproteins a routine protocol [20, 56]. Also, further studies are needed to decipher the specific molecular changes occurring in disease and the underlying changes in GalNAc-Ts repertoire.

#### Extension of Tn structures

After GalNAc had been attached, the biosynthesis of *O*-glycans continues. Additional monosaccharides are

attached to the GalNAc residues in a stepwise manner. The processing/extension step is cell specific; for example, B cells produce glycoproteins with sialylated Core 1 *O*-glycans (Fig. 2), whereas normal epithelial breast cells produce glycoproteins with branched Core 2 structures.

In both B cells and mammary gland epithelial cells, the processing starts with formation of the Core 1 disaccharide structure. This reaction is catalyzed by a single UDP-Gal:GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (C1GalT1) [57], and this step is therefore without genetic back-up; a lack of C1GalT1 results in truncated *O*-glycans [58]. Interestingly, expression of active C1GalT1 in the Golgi apparatus depends on a specific chaperone (Cosmc) [59]. Cosmc is mutated in several cell lines (LSC and Jurkat) and in several diseases (for review see [58]) and Cosmc mutation is one of the mechanisms that lead to expression of the truncated Tn and STn cancer antigens. Surprisingly, the Jurkat cell line with Cosmc mutation was shown to revert to Core 1 and 2 synthesis by expression of SHIP-1 (Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase-1), suggesting that the requirement of Cosmc for the production of active C1GalT1 can be bypassed by another, yet unknown mechanism [60].

Subsequently, the Core 1 structures are either capped by sialylation (IgA1) or further modified toward Core 2 structures (MUC1).

#### Extension of Tn structures on IgA1

In normal IgA1, Core 1 structures are modified by attaching the sialic acid from CMP-*N*-acetylneuraminic acid (CMP-NeuAc) to the Gal residues in a reaction catalyzed by a Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase (ST3Gal) and/or attaching the sialic acid to the GalNAc residues catalyzed by an  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc) (for review see [61, 62]). The biosynthetic basis for deficient *O*-glycosylation of IgA1 in IgAN patients has been extensively studied, and although substantial progress has been made there are still many open questions [8, 9, 63]. Studies with IgA1-producing cell lines from patients with IgAN [8, 64] showed that the cells secreted polymeric IgA1 with Gal-deficient *O*-glycans with exposed terminal GalNAc, i.e., Tn. Neuraminidase treatment of the secreted IgA1 markedly enhanced reactivity with GalNAc-specific lectin HAA, suggesting that some Tn *O*-glycans are likely capped with sialic acids, i.e., STn antigens. Real-time RT-PCR showed that these aberrancies were associated with altered expression of specific glycosyltransferases: elevated expression of *ST6GalNAc-II* and decreased expression of *C1GalT1* and the *Cosmc* [8]. These results were consistent with the measured enzyme activities in cell extracts. Observed decrease in expression of *Cosmc* would potentially further reduce the amount of intact C1GalT1 enzyme



due to the C1GalT1 degradation in the absence of the protein chaperone [59]. Another factor that may affect *O*-glycosylation of IgA1 is relative localization of the specific glycosyltransferases within the Golgi apparatus and/or their turnover, although no data are available on this aspect.

Surprisingly, ST6GalNAc-I, the enzyme responsible for sialylation of Tn antigen in man, is not expressed in the IgA1-producing cells from IgAN patients [8, 64], and the candidate enzyme for biosynthesis of STn in IgAN is therefore ST6GalNAc-II. Overexpression of ST6GalNAc-II in epithelial cells does not result in production of STn *O*-glycans [65], but preliminary siRNA studies in IgA1-producing cells suggest that ST6GalNAc-II may participate in synthesis of STn *O*-glycans on IgA1 [66]. Analysis of IgA1 *O*-glycans by mass spectrometry did not provide a clear answer to the presence of STn [19, 20, 56], but these studies did not address IgA1 from patients with IgAN. Premature sialylation of GalNAc blocks further modifications and the observation that Gal-deficient sialylated GalNAc-containing IgA1 is present throughout the entire Golgi [8] would lend support to the notion of possible abnormal localization of the sialyltransferases. However, studies of subcellular localization of individual enzymes will be needed to support such hypotheses. Moreover, future studies of ST6GalNAc-II and C1GalT1 enzymes and their substrate specificities and kinetics for various hinge-region glycoforms may uncover additional mechanisms potentially involved in the generation of Tn and STn antigens on IgA1 in IgAN.

#### Extension of Tn structures on MUC1

In normal breast glandular epithelial cells, the Core 1 glycans on MUC1 are extended to generate the branched Core 2 structure (Fig. 2b) by addition of GlcNAc catalyzed mainly by Core 2  $\beta$ 1,6-GlcNAc-transferase1 (C2GnT1) which is down-regulated in 50 % of breast cancers [67]. The Core 2 glycans are further elongated by adding Gal or GlcNAc in reactions catalyzed by  $\beta$ 1,4-Gal-transferase and  $\beta$ 1,3-GlcNAc-transferase, respectively, forming Core 2 polylectosamine protrusions [1].

In breast adenocarcinoma cells, the characteristic shift from Core 2 to Core 1 on MUC1 has been associated with reduction in expression of the Core 2 enzyme, C2GnT1, and increased expression of the sialyltransferase ST3Gal-I [67]. C2GnT1 and ST3Gal-I competes for the same Core 1 substrate and premature sialylation of Core 1 blocks Core 2 formation [12, 68, 69], so increased ST3Gal-I expression and perhaps alteration in its topology blocks the Core 2 glycosylation pathway. Data on expression of T, Tn, and STn in breast cancer varies greatly among different studies, presumably because of differences in specificity and sensitivity of different lectin and monoclonal-antibody

reagents used for detection. STn is generally believed to be present in 30 % of breast cancers, and it appears to be due to overexpression of ST6GalNAc-I [70], which utilizes Tn on MUC1 VNTR as substrate and produces the STn structures in vitro [1, 65]. Overexpression of ST6GalNAc-I may override the function of other glycosyltransferases, including C1GalT1, but mutations in *Cosmc* and, thus, lack of C1GalT1 enzyme could also result in truncation of *O*-glycans and expression of the Tn and STn structures [71], but further studies are needed to evaluate whether this mechanism is more widely involved in breast cancer. In summary, in breast cancer, aberrant glycosylation of MUC1 with increased proportion of STn and ST antigens is consequence of aberrant expression and localization of GalNAc-Ts, increased expression of both  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-specific sialyltransferases, and reduced expression of C2GnT. The action of sialyltransferases is further enhanced by the recycling, up ten cycles, of the overexpressed MUC1 between the cell membrane and trans-Golgi network in breast-cancer cells, thus further increasing the extent of MUC1 sialylation [72].

#### Antibodies targeting aberrantly glycosylated IgA1 and MUC1

Tumor-associated oligosaccharides are recognized predominantly by naturally occurring IgM antibodies

Immune response to normal and modified autoantigens, including those appearing during cancer development (aberrantly glycosylated MUC1) or those generated in association with autoimmune conditions (aberrantly *O*-glycosylated glycoproteins in IgA nephropathy or in Tn syndrome), is covered in human and other animals by natural polyreactive antibodies, which bind a broad spectrum of different antigens [10, 73, 74]. These polyreactive antibodies are mostly of IgM isotype, followed by IgG and IgA isotypes (for review see [75]). Natural antibodies contain predominantly germ-line-encoded variable domains of H and L chains (VH and VL) recognizing carbohydrate-containing epitopes on various surface molecules; these antibodies play a role in the elimination of bacteria, viruses, and other pathogenic agents, regulation of B and T cells activities, cytokine production, and inflammation, presentation of antigens to T cells, development of autoimmunity, removal of apoptotic cells, including tumor and senescent cells, as well as many other functions [75–79]. Brandlein et al. analyzed more than 18,000 B cell hybridomas from over 60 cancer patients. Tumor-specific monoclonal antibodies detected in this cohort were exclusively of IgM isotype without signs of affinity-maturation. All of the IgM antibodies were germ-line coded and

belonged to distinct VH and VL gene families. In addition, most of them bound to carbohydrates on cell surfaces and induced cellular apoptosis *in vitro* [78]. In human cancer, the appearance of T epitope on cancer cells is accompanied by an increase in the titer of T-specific IgM antibodies [80]. However, during the progression of cancer, these T-specific IgM antibodies tend to decrease in most patients [81]. These changes are not mirrored by changes in the levels of other natural antibodies, indicating specificity of such downregulation [81]. In conclusion, natural antibodies are responding to cancer carbohydrate antigens preferentially in the incipient stages, but their increase is modest and not sufficient to prevent further cancer progression, probably because of tumor-associated immune suppression. In contrast, the level of natural antibodies against ABO blood group system could rapidly increase in response to presence of xenoantigen ( $\alpha$ -Gal epitope expressed on xenotransplantates from pigs). Nevertheless, such B cells are probably selected by very unique mechanisms, although sharing some steps with other antibody-producing B cells, as their levels are affected by the presence of autoantigens [82, 83]. Although B cells producing these natural antibodies respond to tumor antigens and immunization by antibody production, they have only a limited isotype switching and do not produce high-affinity antibodies [84].

Antibodies against aberrantly glycosylated IgA1 are of IgG and IgA1 isotypes

Whereas antibodies against aberrantly glycosylated MUC1 in patients with adenocarcinoma have potentially protective function [18], the antibodies against Gal-deficient IgA1 play a key role in the pathogenesis of IgAN. In IgAN patients, the aberrantly glycosylated IgA1 is recognized by IgG and IgA1 antibodies. This interaction is glycan-specific and can be blocked by GalNAc-binding reagents, such as lectins [10], suggesting a direct participation of Tn structure in the antibody binding. Conversely, IgA1 molecules with GalNAc modified by Gal or sialic acid are not recognized by these antibodies. Sequence analysis of the cloned heavy-chain antigen-binding domains ( $V_H$ ) of IgG antibodies reactive with Gal-deficient IgA1 identified unique features in complementarity-determining region 3 (CDR3). Specifically, the motif YCSR/K with S in the third position plays a prominent role in binding to Gal-deficient IgA1 [10], and, thus, promotes formation of pathogenic immune complexes. The antibody binding to the aberrantly glycosylated IgA1 may be based on a unique genetic background (i.e., variable heavy-chain genes encoding for or driving the somatic mutation to YCSR/K motif) [85]. These antibodies may be induced by an infection of upper respiratory tract and may just happen to be cross-reacting with the aberrantly glycosylated IgA1 in a genetically susceptible

organisms. Levels of these antibodies may be further enhanced by recurrent upper-respiratory tract infection or, in some individuals, by mounting immune response to the cross-reactive aberrantly glycosylated IgA1. Irrespective of the mechanism(s), these processes would thus lead to increased formation of nephritogenic immune complexes (see for review [9]). At present, there are no experimental approaches for specific suppression of production of such autoantibodies and therefore interference with the formation of the pathogenic immune complexes seems to be the only possible causative therapeutic approach.

Experimental efforts to induce high-affinity antibodies recognizing antigens containing T, Tn, and STn epitopes in adenocarcinoma patients

Two types of antibodies specific for MUC1 are found in cancer patients. The first type is directed to the MUC1 VNTR peptide sequence [16, 17], whereas the second type recognizes aberrant glycopeptides in the VNTR containing truncated Tn, STn, and T O-glycans [15]. It has been speculated that the shorter glycans (T, Tn, and STn antigens) allow better access of peptide-specific antibodies to the amino-acid backbone (first type). Accordingly, several experiments attempted to elicit MUC1-specific antibody responses by immunizing cancer patients with nonglycosylated MUC1 VNTR variants. Although a few studies showed that this kind of immunization extended significantly the survival of patients with breast cancer (for review see [16, 25]), it is questionable whether this vaccine-driven elicitation represents a broadly acceptable approach as such antibodies likely react also with MUC1 on normal cells. Therefore, parallel efforts were focused on elicitation of antibodies targeting cancer-specific MUC1 glycans or glycoproteins. For example, immunization of colorectal cancer patients with partially desialylated ovine submaxillary mucin (with about equal amounts of Tn and STn) resulted in production of Tn- and STn-specific IgM and IgG antibodies [86]. Immunization of patients with various preparation of STn-KLH with or without adjuvant induced production of STn-specific IgG and IgM or only IgG [87, 88]. In general, STn- or Tn-specific immune responses elicited by natural antigens expressing STn epitopes, such as ovine submaxillary mucin, were much lower than those elicited by synthetic immunogens, suggesting a significant contribution of non-sugar epitope moieties. Synthetic vaccine based on STn-KLH (Theratope) was tested in combination with adjuvant Detox in more than 1,200 patients with breast cancer, with or without concurrent use of cyclophosphamide to inhibit CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-regulatory T cells [88–90]. Although IgM and IgG antibodies, including complement-dependent cytotoxic isotypes, were induced, there were no statistically significant

clinical benefits [91]. Similarly, attempts to use vaccines mimicking clustered glycan patterns typical for MUC1 in cancer pattern have failed to provide a significant clinical impact [92]. One of the reasons for these disappointing results may be related to the fact that IgM antibodies were predominantly induced by these vaccines without significant IgG responses. Moreover, the induced antibodies showed minimal reactivity with MUC1 on cancer cells [93, 94]. These observations suggest that the immune responses occurred probably mostly through activation of natural antibody producing B1 cells without substantial affinity maturation and class switching and likely in T cell-independent fashion. B1 cells are naturally resistant to induction of somatic hypermutation and therefore to the development of high-affinity isotype switched glycan-specific IgG or IgA. Genetic models associated with autoimmune diseases revealed that autoantibodies can be stimulated by excessive antigenic drive from antigens associated with fragments of dead cells, as well as by enhanced responses associated with intrinsic abnormalities in B or T lymphocytes [95]. In contrast, classical B2 cells, which easily undergo somatic hypermutation and isotype switch, do not respond to glycan antigen probably because of their “self-nature” leading to tolerance. This mechanism may be related to negative selection of specifically reacting B2 cells, because the naturally weak interactions of B-cell receptor with glycans may not be strong enough to reach the necessary threshold. Therefore, alternative efforts currently tested in experimental animals are focused on the development of peptide glycoconjugates, i.e., glycopeptides, instead of clustered glycans conjugated to a protein carrier, to elicit glycan- or glycoprotein-specific high-affinity IgG antibodies. These efforts are based on the considerations that formerly used carrier proteins are highly immunogenic in themselves and could inevitably elicit strong B cell responses associated with carrier-induced carbohydrate epitope suppression [96], which in particular is a problem when “self-antigens”, such as tumor-associated glycans, are used. Several fully synthetic vaccines were tested. For example: (a) MUC-1 derived glycopeptide carrying a single STn moiety linked to a ovalbumin-derived CD4<sup>+</sup> T cell epitope coupled together by polar non-immunogenic linker [97]; (b) nonglycosylated, Tn-, and TF-modified MUC-1 as a B cell epitope linked to universal PADRE peptide helper T-epitope [98]; (c) CD4<sup>+</sup> peptide Th epitopes derived from Polio virus or the PADRE linked each to trimeric Tn as B cell epitope coupled on four-arm lysine core [99]; and (d) linear polypeptide consisting of MUC1-derived single Tn glycopeptide as a B cell epitope, T cell epitope derived from Polio virus and Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub> or Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> as built-in TLR ligand as an adjuvant [100]. All these constructs induced specific IgG recognizing glycosylated MUC1 or

Tn. In case of construct (b), antibodies recognized selectively the native tumor epitopes expressed by human mammary adenocarcinoma cells. These experiments thus provide a promising strategy to develop well-defined vaccines capable of eliciting tumor glycan-specific IgG antibodies that could potentially control especially minimal residual disease.

Characterization of antibodies specific for IgA1- or MUC1-associated antigens in diseases such as IgAN or breast cancer revealed their distinct heterogeneity, specificity, and clinical and pathophysiological significance. Suppression of such antibodies may be of therapeutic significance in IgAN, whereas induction of antibodies specific to cancer-associated aberrantly glycosylated MUC1 is a therapeutic approach being tested for the treatment of various MUC1-expressing cancers. These examples illustrate that the same simple glycan structure (i.e., Tn antigen) expressed in different pathophysiological conditions on different glycoproteins through different molecular mechanisms may have diverse biological and immunological responses. Recent progress in our understanding of the glycobiology and immunology of IgAN and breast cancer provides justification for a guarded optimism that effective and specific therapies for these diseases may be indeed developed and introduced in the clinical practice.

### Future directions

- Explore the relative roles of natural carbohydrate antibodies to Tn, STn, and T and IgG and IgA1 antibodies with glycopeptide specificity that target specific aberrantly glycosylated molecules, such as IgA1 in IgAN and MUC1 in breast cancer;
- Explore the mechanism for induction and clinical significance of the glycopeptide-specific autoantibodies;
- Further explore the biochemical, genetic, and epigenetic mechanisms leading to aberrant *O*-glycosylation in IgAN and cancer;
- Develop potential diagnostic, prognostic, and therapeutic applications based on the understanding of mechanisms of aberrant *O*-glycosylation and functions of autoantibodies recognizing the aberrant glycoproteins in different diseases.

**Acknowledgments** This work was supported in part by grants from the National Institutes of Health DK082753, DK078244, DK083663, DK075868, DK077279, and GM098539, a grant from the IGA Nephropathy Foundation of America, and by grants and LH11046 Ministry of School, Youth, and Sport, GAP302/10/1055 Czech Science Foundation, NT11081 Grant Agency of the Ministry of the Health, Czech Republic.

## References

- Brockhausen I (2006) Mucin-type *O*-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 7:599–604
- Chui D et al (2001) Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1142–1147
- Kobata A (1998) A retrospective and prospective view of glycopathology. *Glycoconj J* 15:323–331
- Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* 291:2370–2376
- Ju T, Cummings RD (2005) Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* 437:1252
- Tabak LA (2010) The role of mucin-type *O*-glycans in eukaryotic development. *Semin Cell Dev Biol* 6:616–621
- Tomana M et al (1999) Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 104:73–81
- Suzuki H et al (2008) IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest* 118:629–639
- Suzuki H et al (2011) The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22:1795–1803
- Suzuki H et al (2009) Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 119:1668–1677
- Singh R, Bandyopadhyay D (2007) MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6:481–486
- Lloyd KO, Burchell J, Kudryashov V, Yin BW, Taylor-Papadimitriou J (1996) Comparison of *O*-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem* 271:33325–33334
- Julien S et al (2005) Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 90:77–84
- Pinho S et al (2007) Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* 249:157–170
- Wandall HH et al (2010) Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant *O*-glycopeptide epitopes. *Cancer Res* 70:1306–1313
- Finn OJ (2008) Cancer immunology. *N Engl J Med* 358:2704–2715
- von Mensdorff-Pouilly S et al (1996) Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer* 32A:1325–1331
- Blixt O et al (2011) Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res* 13:R25
- Takahashi K et al (2012) Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 *O*-glycosylation. *J Proteome Res* 11:692–702
- Takahashi K et al (2010) Clustered *O*-glycans of IgA1: defining macro- and microheterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation. *Mol Cell Proteomics* 9:2545–2557
- Novak J, Mestecky J (2009) IgA immune-complex. In: Lai KN (ed) *Recent advances in IgA nephropathy*, Imperial College Press and the World Scientific Publisher, Hong Kong, p 177–191
- Mattu TS et al (1998) The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of *N*-glycosylation on Fc $\gamma$  receptor interactions. *J Biol Chem* 273:2260–2272
- Sihlbom C et al (2009) Localization of *O*-glycans in MUC1 glycoproteins using electron-capture dissociation fragmentation mass spectrometry. *Glycobiology* 19:375–381
- Muller S, Hanisch FG (2002) Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific *O*-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation. *J Biol Chem* 277:26103–26112
- Tarp MA, Clausen H (2008) Mucin-type *O*-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim Biophys Acta* 1780:546–563
- Backstrom M et al (2003) Recombinant MUC1 mucin with a breast cancer-like *O*-glycosylation produced in large amounts in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem J* 376:677–686
- Mall AS (2008) Analysis of mucins: role in laboratory diagnosis. *J Clin Pathol* 61:1018–1024
- Storr SJ et al (2008) The *O*-linked glycosylation of secretory/shed MUC1 from an advanced breast cancer patient's serum. *Glycobiology* 18:456–462
- Napoletano C et al (2007) Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells. *Cancer Res* 67:8358–8367
- Wahrenbrock MG, Varki A (2006) Multiple hepatic receptors cooperate to eliminate secretory mucins aberrantly entering the bloodstream: are circulating cancer mucins the “tip of the iceberg”? *Cancer Res* 66:2433–2441
- Bennett EP et al. (2012) Control of mucin-type *O*-glycosylation—a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 22:736–756
- Gerken TA et al (2011) Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein *O*-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases. *J Biol Chem* 286:14493–14507
- Rottger S et al (1998) Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of *O*-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 111(Pt 1):45–60
- Gill DJ, Chia J, Senewiratne J, Bard F (2010) Regulation of *O*-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *J Cell Biol* 189:843–858
- Iwasaki H et al (2003) Initiation of *O*-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 2. *J Biol Chem* 278:5613–5621
- Wandall HH et al (2007) The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-*O*-glycosylation. *Glycobiology* 17:374–387
- Raska M et al (2011) Role of GalNAc-transferases in the synthesis of aberrant IgA1 *O*-glycans in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22:625A
- Bennett EP et al (1999) Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy. *J Biol Chem* 274:25362–25370
- Wandall HH et al (1997) Substrate specificities of three members of the human UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. *J Biol Chem* 272:23503–23514
- Schwientek T et al (2002) Functional conservation of subfamilies of putative UDP-*N*-acetylgalactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals. One subfamily composed of



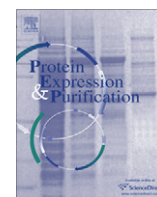
- I(2)35Aa is essential in *Drosophila*. *J Biol Chem* 277:22623–22638
41. Cheng L et al (2004) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. *FEBS Lett* 566:17–24
  42. Zhang Y et al (2003) Cloning and characterization of a new human UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc  $\alpha$ -serine/threonine antigen. *J Biol Chem* 278:573–584
  43. Wang H et al (2003) Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14. *Biochem Biophys Res Commun* 300:738–744
  44. Hassan H et al (2000) The lectin domain of UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase-T4 directs its glycopeptide specificities. *J Biol Chem* 275:38197–38205
  45. Brooks SA, Carter TM, Bennett EP, Clausen H, Mandel U (2007) Immunolocalisation of members of the polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl transferase (ppGalNAc-T) family is consistent with biologically relevant altered cell surface glycosylation in breast cancer. *Acta Histochem* 109:273–284
  46. Mandel U et al (1999) Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology* 9:43–52
  47. Marcos NT et al (2003) Polypeptide GalNAc-transferases, ST6GalNAc-transferase I, and ST3Gal-transferase I expression in gastric carcinoma cell lines. *J Histochem Cytochem* 51:761–771
  48. Cooper LS et al (1999) Expression of GalNAc transferases in breast tissues and cell lines. *J Pathol* 187:26A–26A
  49. Berois N et al (2006) UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem* 54:317–328
  50. Freire T et al (2006) UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. *Int J Cancer* 119:1383–1388
  51. Park JH et al (2010) Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 70:2759–2769
  52. Wu C et al (2010) *N*-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *BMC Cancer* 10:123
  53. Wagner KW et al (2007) Death-receptor *O*-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13:1070–1077
  54. Gray-McGuire C et al (2010) Confirmation of linkage to and localization of familial colon cancer risk haplotype on chromosome 9q22. *Cancer Res* 70:5409–5418
  55. Guda K et al (2009) Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12921–12925
  56. Wada Y et al (2010) Comparison of methods for profiling *O*-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics* 9:719–727
  57. Ju T, Brewer K, D'Souza A, Cummings RD, Canfield WM (2002) Cloning and expression of human core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 277:178–186
  58. Wang Y et al (2010) Cosmc is an essential chaperone for correct protein *O*-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:9228–9233
  59. Ju T, Cummings RD (2002) A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$ 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16613–16618
  60. Charlier E et al (2010) SHIP-1 inhibits CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis in primary T lymphocytes and T leukemic cells by promoting CD95 glycosylation independently of its phosphatase activity. *Leukemia* 24:821–832
  61. Dall'Olio F, Chiricolo M (2001) Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J* 18:841–850
  62. Harduin-Lepers A et al (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83:727–737
  63. Gharavi AG et al (2008) Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19:1008–1014
  64. Raska M et al (2007) Identification and characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells. *J Mol Biol* 369:69–78
  65. Marcos NT et al (2004) Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res* 64:7050–7057
  66. Suzuki H et al (2009) Mechanisms of aberrant glycosylation of IgA1 in patients with IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 20:301A
  67. Dalziel M et al (2001) The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine *O*-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem* 276:11007–11015
  68. Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J (1995) Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 233:607–617
  69. Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Peter-Katalinic J (1996) MUC1 glycoforms in breast cancer—cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of *O*-glycosylation. *Eur J Biochem* 236:318–327
  70. Sewell R et al (2006) The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn *O*-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem* 281:3586–3594
  71. Ju T et al (2008) Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res* 68:1636–1646
  72. Litvinov SV, Hilkens J (1993) The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem* 268:21364–21371
  73. Avrameas S, Ternynck T (1998) Natural antibodies. In: Delves PJ, Roitt IM (eds) *Encyclopedia of immunology*. Academic Press, San Diego, p 1806–1809
  74. Brandlein S et al (2003) Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res* 63:2052–2061
  75. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S (1995) Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7:812–818
  76. Avrameas S, Ternynck T, Tsonis IA, Lymberi P (2007) Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *J Autoimmun* 29:213–218
  77. Vollmers HP, Brandlein S (2007) Natural antibodies and cancer. *J Autoimmun* 29:295–302
  78. Brandlein S et al (2003) Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 63:7995–8005
  79. Mouthon L et al (1995) Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol* 154:5769–5778
  80. Springer GF (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med* 75:594–602

81. Bray J, MacLean GD, Dusel FJ, McPherson TA (1982) Decreased levels of circulating lytic anti-T in the serum of patients with metastatic gastrointestinal cancer: a correlation with disease burden. *Clin Exp Immunol* 47:176–182
82. Macher BA, Galili U (2008) The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 1780:75–88
83. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM (1988) Interaction between human natural anti- $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 56:1730–1737
84. Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA (2005) Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 26:347–362
85. Gharavi AG et al (2011) Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet* 43:321–327
86. O'Boyle KP et al (1992) Immunization of colorectal cancer patients with modified ovine submaxillary gland mucin and adjuvants induces IgM and IgG antibodies to sialylated Tn. *Cancer Res* 52:5663–5667
87. MacLean GD et al (1993) Immunization of breast cancer patients using a synthetic sialyl-Tn glycoconjugate plus Detox adjuvant. *Cancer Immunol Immunother* 36:215–222
88. Longenecker BM, Reddish M, Koganty R, MacLean GD (1993) Immune responses of mice and human breast cancer patients following immunization with synthetic sialyl-Tn conjugated to KLH plus detox adjuvant. *Ann N Y Acad Sci* 690:276–291
89. Longenecker BM, Reddish M, Koganty R, MacLean GD (1994) Specificity of the IgG response in mice and human breast cancer patients following immunization against synthetic sialyl-Tn, an epitope with possible functional significance in metastasis. *Adv Exp Med Biol* 353:105–124
90. MacLean GD, Miles DW, Rubens RD, Reddish MA, Longenecker BM (1996) Enhancing the effect of THERATOPE STn-KLH cancer vaccine in patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19:309–316
91. Guo Z, Wang Q (2009) Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines. *Curr Opin Chem Biol* 13:608–617
92. Gilewski TA et al (2007) Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered STn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 13:2977–2985
93. Slovin SF et al (2003) Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. *J Clin Oncol* 21:4292–4298
94. Slovin SF et al (2005) A bivalent conjugate vaccine in the treatment of biochemically relapsed prostate cancer: a study of glycosylated MUC-2-KLH and Globo H-KLH conjugate vaccines given with the new semi-synthetic saponin immunological adjuvant GPI-0100 OR QS-21. *Vaccine* 23:3114–3122
95. Elkouk K, Casali P (2008) Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:491–498
96. Ni J, Song H, Wang Y, Stamatou NM, Wang LX (2006) Toward a carbohydrate-based HIV-1 vaccine: synthesis and immunological studies of oligomannose-containing glycoconjugates. *Bioconjug Chem* 17:493–500
97. Dziadek S, Hobel A, Schmitt E, Kunz H (2005) A fully synthetic vaccine consisting of a tumor-associated glycopeptide antigen and a T-cell epitope for the induction of a highly specific humoral immune response. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:7630–7635
98. Cremer GA et al (2006) Synthesis and biological evaluation of a multiantigenic Tn/TF-containing glycopeptide mimic of the tumor-related MUC1 glycoprotein. *ChemMedChem* 1:965–968
99. Lo-Man R et al (2004) A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates. *Cancer Res* 64:4987–4994
100. Ingale S, Wolfert MA, Gaekwad J, Buskas T, Boons GJ (2007) Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nat Chem Biol* 3:663–667



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Protein Expression and Purification

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yprep](http://www.elsevier.com/locate/yprep)Production of *N*-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Igκ in insect cellsMilada Horynová<sup>a,b</sup>, Kazuo Takahashi<sup>b</sup>, Stacy Hall<sup>b</sup>, Matthew B. Renfrow<sup>c</sup>, Jan Novak<sup>b,\*</sup>, Milan Raška<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 July 2011

and in revised form 12 October 2011

Available online 19 October 2011

## Keywords:

UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -*D*-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2)

Immunoglobulin A1 (IgA1)

Baculovirus expression system

Immunoglobulin light chain  $\kappa$  secretory signal

## ABSTRACT

The human UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -*D*-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) is one of the key enzymes that initiate synthesis of hinge-region *O*-linked glycans of human immunoglobulin A1 (IgA1). We designed secreted soluble form of human GalNAc-T2 as a fusion protein containing mouse immunoglobulin light chain kappa secretory signal and expressed it using baculovirus and mammalian expression vectors. The recombinant protein was secreted by insect cells Sf9 and human HEK 293T cells in the culture medium. The protein was purified from the media using affinity Ni-NTA chromatography followed by stabilization of purified protein in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4. Although the purity of recombinant GalNAc-T2 was comparable in both expression systems, the yield was higher in Sf9 insect expression system (2.5 mg of GalNAc-T2 protein per 1 L culture medium). The purified soluble recombinant GalNAc-T2 had an estimated molecular mass of 65.8 kDa and its amino-acid sequence was confirmed by mass-spectrometric analysis. The enzymatic activity of Sf9-produced recombinant GalNAc-T2 was determined by the quantification of enzyme-mediated attachment of GalNAc to synthetic IgA1 hinge-region peptide as the acceptor and UDP-GalNAc as the donor. In conclusion, murine immunoglobulin kappa secretory signal was used for production of secreted enzymatically active GalNAc-T2 in insect baculovirus expression system.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Alterations in glycan moieties of cell-surface or secreted glycoproteins are now recognized as factors that can cause, or contribute to, defects in organs or cell development and function, autoimmune diseases as well as some types of cancer [1–5]. Human UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2) is member of the large GalNAc-transferases family of at least 20 different enzymes that initiate *O*-glycosylation. Each member differs in the tissue expression, transcriptional regulation, and substrate specificity, especially amino-acid motifs surrounding the Ser/Thr, protein folding, and the sensitivity to the already glycosylated neighboring sites. Human GalNAc-T2 was initially purified from human placenta [6]. The full-length GalNAc-T2 cDNA encodes a 571 amino-acid long protein with estimated molecular mass of 64.7 kDa. GalNAc-T2 is a type II transmembrane protein with a hydrophobic, transmembrane domain (amino acids 7–24)

[6]. GalNAc-T2 initiates the first step of mucin-type *O*-glycan biosynthesis by attaching the *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) to the hydroxyl groups of target Ser/Thr residues in glycoproteins such as mucins and immunoglobulin A1 (IgA1) [7].

Here, we report purification and analysis of recombinant GalNAc-T2 fused with mouse immunoglobulin kappa secretory signal that mediates efficient secretion of enzymatically active soluble human GalNAc-T2 by the insect Sf9 cells.

## Materials and methods

All chemicals, unless otherwise specified, were from Sigma (St. Louis, MO, USA); tissue culture media and reagents were from Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

## Sf9 cells

The Sf9 insect cell line is a clonal isolate derived from the parental *Spodoptera frugiperda* cell line. Sf9 cells were grown as adherent cells or in suspension in serum-free Sf-900 II SFM at 28 °C ± 0.5 °C in non-humidified, ambient-air incubator.

\* Corresponding authors. Address: Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Hněvotínská 3, Olomouc 77515, Czech Republic (M. Raška), Department of Microbiology, 845 19th St. S., BBRB 734, UAB, Birmingham, AL 35294, USA. Fax: +1 205 934 3894 (J. Novak).

E-mail addresses: [jannovak@uab.edu](mailto:jannovak@uab.edu) (J. Novak), [raskamil@uab.edu](mailto:raskamil@uab.edu) (M. Raška).

### Preparation of recombinant baculovirus Igκ-T2

Recombinant bacmid coding for secreted form of human GalNAc-T2 was cloned in two steps. First, the synthetic oligonucleotide coding for murine Ig kappa secretory signal (derived from first 21 amino acids METDTLLLVWLLLVWPGSTGDAA) was cloned into pFastBacHT A vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) in front of His tag-encoding sequence using RsrII restriction site. Next, human GalNAc-T2 cDNA without the transmembrane domain-encoding sequence (corresponding to amino acids 52–571, NCBI Acc. No. NP\_004472) was isolated from human monocyte cell line U937 by PCR (downstream primer 5'-AAAAGAAAGACCTTCATCAC-3' and upstream primer 5'-CTACTGCTGCAGTTGAGC-3') and further PCR modified by adding EcoRI and XhoI sites on 5' and 3' ends, respectively. Furthermore, the modified GalNAc-T2 cDNA was cloned in frame behind the His tag and Tobacco Etch Virus protease (TEV) recognition sites of pFastBacHT A using EcoRI and XhoI restriction enzymes and the recombinant vector was designed plgκ-T2-FastBac (Fig. 1). Then, the construct was transformed into DH10Bac *E. coli* (Invitrogen) where the Igκ-T2 insert was spontaneously transposed into bacmid. The resultant recombinant bacmid designated BacIgκ-T2 was purified by Large-Construct Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and transfected into Sf9 cells using Cellfectin reagents (Invitrogen). Infectious recombinant baculoviruses designated BaculoIgκ-T2 driving expression of secreted soluble GalNAc-T2 designated κGalNAc-T2 were amplified to reach at least  $1 \times 10^8$  plaque-forming units (PFU)/ml of the viral stock and subsequently used for production and isolation of κGalNAc-T2 using Sf9 cells.

### Production of recombinant κGalNAc-T2 in Sf9 cells

After optimizing the growth conditions, recombinant κGalNAc-T2 was produced in 2-L culture with  $2 \times 10^6$  Sf9 cell/ml infected with recombinant BaculoIgκ-T2 at the multiplicity of infection (MOI) 2–5 PFU per one Sf9 cell using SF-900 serum-free culture medium (Invitrogen). The cells were grown at 27 °C on the orbital shaker (130 RPM) for 72 h.

### Production of recombinant κGalNAc-T2 in HEK 293T cells

The cDNA coding for κGalNAc-T2 was PCR cloned from plgκ-T2-FastBac into mammalian expression plasmid pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen) and designated pcDNAIgκ-T2. The recombinant κGalNAc-T2 protein was produced in 293T cells transfected with

pcDNAIgκ-T2 plasmid using Superfect transfection reagent (Qiagen). The cells were grown in RPMI 1640 with L-glutamine, 10% fetal bovine serum, penicillin, streptomycin [8].

### Purification of recombinant κGalNAc-T2 on Ni-NTA agarose column

The recombinant κGalNAc-T2 was purified by Ni-NTA affinity chromatography under native conditions. All purification steps were performed on ice or at 4 °C. The Sf9 culture-medium (SF-900 SFM) supernatant was depleted of cells and debris by centrifugation at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was mixed with binding buffer (1:9 v:v; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 0.05% Tween 20) and the pH was adjusted to 6.8 using 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0. Next, 1 ml of 50% Ni-NTA agarose (Qiagen) was added per 250 ml of culture-medium supernatant and gently mixed on a roller mixer overnight at 4 °C. The Ni-NTA agarose was transferred to a glass chromatographic column and washed with 10 volumes of washing buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.8, 300 mM NaCl, 2 mM imidazole, and 0.05% Tween 20). The recombinant κGalNAc-T2 was eluted with the six column volumes of elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, and 0.05% Tween 20). Elution fraction was transferred to 50 mM Tris-HCl pH 7.4 and concentrated using Amicon Ultracell 10 K (Millipore, Billerica, MA) to reach the κGalNAc-T2 protein concentration >1 mg/ml, as determined by BCA assay (Pierce, Rockford, IL).

The concentration of the protein was determined by BCA method and by densitometry of bands after SDS-PAGE separation of various loads of the κGalNAc-T2 and BSA (BSA served as the standard) followed by staining with Coomassie Blue R-250. Densitometric analysis was performed using the Image J 1.41a software and BSA standard curve was used to calculate κGalNAc-T2 protein concentrations.

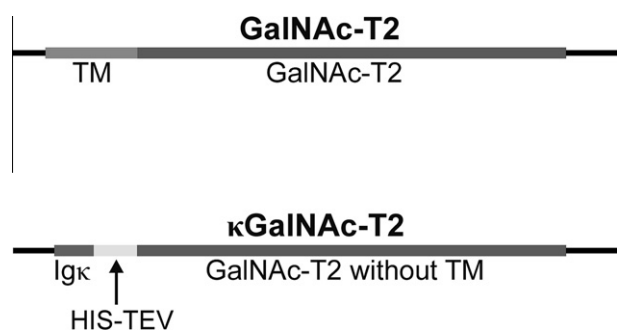
To assess the purity of the κGalNAc-T2, the protein preparation was separated by 10% SDS-PAGE and stained with Silver Stain Kit (Pierce), or blotted on PVDF membrane (BioRad, Hercules, CA), developed with anti-His tag HRP-conjugated antibody (Qiagen), and detected with SuperSignal West Pico reagents (Pierce) followed by visualization using a cooled CCD camera (Roche, Indianapolis, IN).

### Identification of isolated κGalNAc-T2 preparation by high-resolution tandem mass spectrometry (MS)

The identity of purified protein was confirmed by use of LC coupled to a high-resolution linear quadrupole ion trap Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (LTQ FT, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) using BioWorks 3.2 software (Thermo Fisher Scientific) with the NCBI database (Acc. No. NP\_004472). Protein bands from Coomassie-stained SDS-PAGE gels were excised, cut into small pieces and in-gel digested with trypsin at 37 °C for 12 h [9]. On-line LC was performed by use of an Eksigent MicroAS autosampler and 2D LC nanopump (Eksigent, Dublin, CA). In-gel digested sample was loaded onto a 100-μm-diameter, 11-cm-long column pulled tip packed with Jupiter 5-μm C18 reversed phase beads (Phenomenex, Torrance, CA). The digests were then eluted with an acetonitrile gradient from 5% to 30% in 0.1% formic acid over 50 min at 650 nl min<sup>-1</sup>. LTQ FT parameters were set as described previously [10]. The mass spectrometer alternated between a full FT MS scan (*m/z* 400–2000) and four subsequent tandem MS scans of the four most abundant precursor ions.

### Assessing the enzymatic activity of κGalNAc-T2

The activity of purified κGalNAc-T2 was determined based on the addition of GalNAc to the acceptor synthetic peptide



**Fig. 1.** Structure of inserts in vectors encoding native and secreted GalNAc-T2 proteins. Human GalNAc-T2 cDNA (NCBI Acc. No. NP\_004472) isolated by RT-PCR from monocyte cell line U937 was cloned into pCRII-Blunt TOPO cloning vector and subcloned into expression vectors together with Igκ secretory signal. The comparison of full length GalNAc-T2 and recombinant secreted form of κGalNAc-T2 is shown. Igκ secretory signal, GalNAc-T2 transmembrane domain, GalNAc-T2, His tag and Tobacco Etch Virus protease (HIC-TEV) recognition sites are marked.

Val-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> (1931.934 Da), corresponding to the IgA1 hinge-region amino-acid sequence, designated HR. The peptide was synthesized by Bachem and covalently linked to BSA, to facilitate subsequent analyses [11]. About 20 mol of HR peptide was linked to 1 mol of BSA. UDP-GalNAc served as a GalNAc donor. The attachment of GalNAc was determined by the reactivity with biotin-labeled lectin from *Helix aspersa* (HAA, specific for GalNAc) [12–13] in a dot-blot assay and in parallel by on-line LC FT-ICR MS analysis. The reaction was performed for 24 h at 37 °C with 1 or 4 µg of recombinant κGalNAc-T2 and serial dilution of the acceptor HR peptide (0.5, 0.25, 0.1, and 0.05 µg per reaction) in the reaction buffer (250 µM uridine 5'-diphospho-N-acetylgalactosamine, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MnCl<sub>2</sub>) in total volume of 25 µl. As a positive control for HAA dot-blot assay, a glycosylated HR synthesized by Bachem with three attached GalNAc residues (asterisks mark the sites with GalNAc: Val-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-\*Thr-Pro-\*Ser-Pro-\*Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Cys-NH<sub>2</sub>) and cross-linked to BSA was used [11]. About 20 mol of HR glycopeptide was linked to 1 mol of BSA. The HR incubated with recombinant κGalNAc-T2 without addition of UDP-GalNAc served as a negative control. Mass spectra were analyzed by use of the Xcalibur Qual Browser 2.0 software (Thermo Fisher Scientific). The number of GalNAc residues was assigned manually based on the masses of the HR (1931.934 Da) and GalNAc (203.079 Da), as described previously for IgA1 [10,14–15]. The minimal threshold for HR glycopeptide identification was a signal to noise ratio of at least 5:1 with >3 isotopic peaks. The mass tolerance of peak assignment is within 10 ppm.

One unit of the enzyme was defined as the amount of κGalNAc-T2 protein that catalyzed transfer of 1 nmol of GalNAc to HR peptide in 15 min in the standard reaction using 250 µM UDP-GalNAc as donor and 15 µM HR peptide as acceptor. The reactions were performed with serial dilutions of enzyme and the amounts of glycopeptides were determined by high-resolution mass spectrometry as described above.

## Results

### Construction of vectors for production of recombinant GalNAc-T2

Recombinant baculovirus and mammalian expression plasmids coding for secreted soluble form of GalNAc-T2 protein (devoid of transmembrane domain, amino acids 1–51) N-terminally fused with immunoglobulin kappa chain secretory signal (amino acids 1–21) were constructed by cloning GalNAc-T2 cDNA without the transmembrane domain-coding sequence behind the synthetic mouse immunoglobulin κ secretory signal cDNA and His tag-coding sequence and designated κGalNAc-T2. The identity of cDNA constructs was confirmed by sequencing (the GalNAc-T2 moiety is identical to NCBI Acc. No. NM\_004481). Expected molecular mass of the fusion recombinant protein κGalNAc-T2 was calculated by ProtParam tool to be 65.8 kDa, whereas the native GalNAc-T2 has 64.7 kDa (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

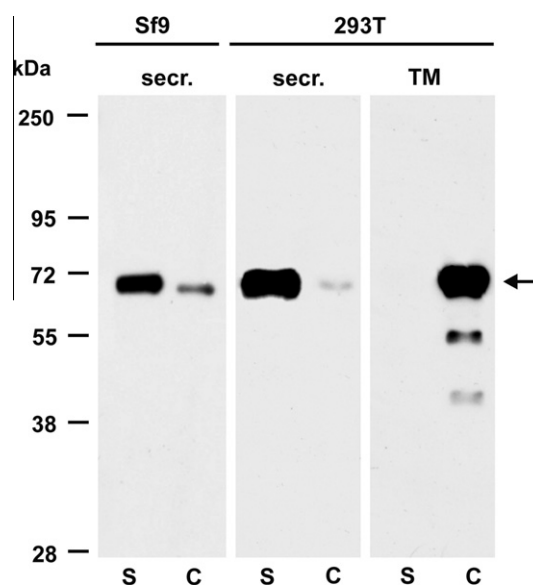
### Production of recombinant κGalNAc-T2 by Sf9 and 293 cells

Transfection of both the mammalian cell line HEK 293T with pcDNA1gκ-T2 and insect cells Sf9 with Baculo1gκ-T2 lead to efficient secretion of recombinant κGalNAc-T2 into culture medium, with only weak accumulation of the recombinant protein in cells. This was evident from comparison of protein-band densities on western blot of supernatant and cellular pellet from centrifuged aliquots of the suspension of Sf9 or trypsinized 293T cultures.

Recombinant κGalNAc-T2 was detected using anti-His tag HRP-conjugated antibody (Fig. 2). The full length GalNAc-T2 cDNA was cloned in parallel into pcDNA3.1D/V5-His-TOPO plasmid and the protein GalNAc-T2 was expressed in 293T cells for comparison. In contrast to the secreted κGalNAc-T2 form, the native GalNAc-T2 protein remained exclusively within the 293T cells, as expected (Fig. 2).

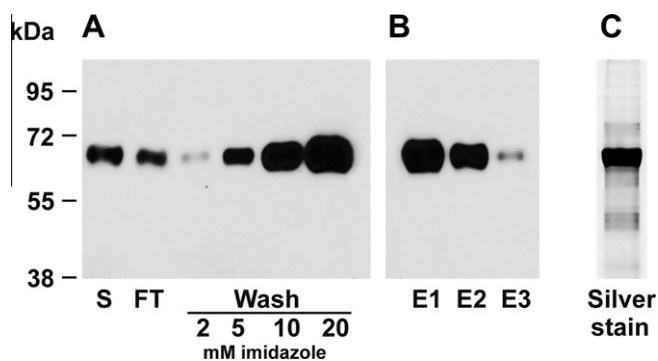
After baculovirus-driven expression, the recombinant protein was purified from Sf9 supernatant using affinity Ni-NTA agarose column under various conditions. The recombinant κGalNAc-T2 binds the Ni-NTA column with relatively poor affinity, as was demonstrated by the release of the κGalNAc-T2 when the imidazole concentration in washing buffer exceeded 2 mM (Fig. 3). Similarly, we tested effect of pH (pH 6.0–8.0) on the binding to Ni-NTA agarose. We found that optimal pH value (6.8) was lower than expected and that pH values >6.8 resulted in less binding, based on western blotting with anti-His tag antibody (data not shown). Therefore, for large-scale purification of κGalNAc-T2 the washing buffer was adjusted to 2 mM imidazole, pH 6.8, which ensured maximum yield and purity of the protein preparation. The elution buffer was adjusted to 200 mM imidazole, which resulted in quantitative protein elution with minimum four column volumes (Fig. 3). Purity of the resultant preparation was assessed by SDS-PAGE with silver staining (Fig. 3).

For further experiments, the baculovirus Sf9 expression system was scaled up to 2 L of Sf9 culture (2 × 10<sup>6</sup> cells/ml) followed by affinity purification, as described in Section 2. In total, 4 mg of κGalNAc-T2 were isolated from 2 L of Sf9 culture, as determined by the BCA method and confirmed by densitometry of κGalNAc-



**Fig. 2.** Recombinant κGalNAc-T2 protein is secreted by Sf9 cells and 293T cells. Recombinant protein κGalNAc-T2 was expressed in human HEK 293T cells and in insect Sf9 cells. Cell-culture medium supernatants (S) and cell lysates (C) were analyzed by SDS-PAGE followed by western blotting with anti-His tag HRP-conjugated antibody. For comparison, native GalNAc-T2 (TM) containing transmembrane domain was expressed in 293T cells and analyzed in parallel. κGalNAc-T2 was secreted by both cell types, whereas the full length, transmembrane domain-containing form remained in 293T cells as expected. Predicted molecular mass of κGalNAc-T2 is 65.8 kDa and that of GalNAc-T2 is 64.7 kDa. For analyses of GalNAc-T2 from insect cells (Sf9), 50-µl aliquots of cell suspension were centrifuged and the supernatant and cell pellet were separated and mixed with SDS-PAGE sample buffer. For analysis of GalNAc-T2 from adherent cells, cell-culture supernatant was removed, adherent cells were trypsinized and then resuspended in the original volume of fresh culture medium. Equal aliquots of supernatant and trypsinized cells were mixed with SDS-PAGE sample buffer and equal volumes were used for western blot analysis.





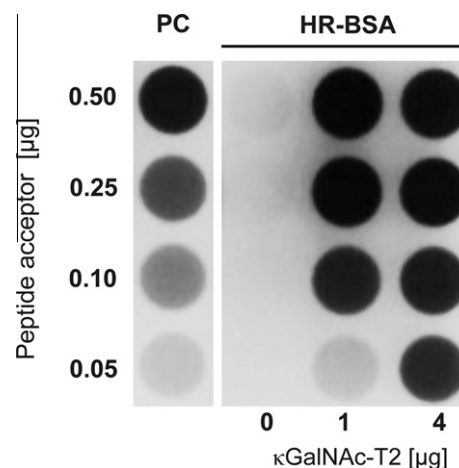
**Fig. 3.** Optimizing the conditions for  $\kappa$ GalNAc-T2 isolation using Ni-NTA affinity chromatography. Recombinant  $\kappa$ GalNAc-T2 was expressed in Sf9 cells and purified by Ni-NTA affinity chromatography under native conditions. Binding buffer (1/9, v/v) was added to the cell-culture supernatant (S) and incubated with Ni-NTA agarose (1 ml of 50% slurry per 250 ml) over night at 4 °C on roller. The suspension was loaded in a glass column and the flow-through (FT) was collected. Ni-NTA column was washed successively with 10-column volumes of washing buffer with increasing imidazole concentrations (2, 5, 10, and 20 mM). Aliquots corresponding to 5  $\mu$ l from each fraction were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-His tag HRP-conjugated antibody. Washing with buffers containing 5, 10, and 20 mM imidazole lead to significant losses of  $\kappa$ GalNAc-T2 protein (A). To optimize elution conditions, the purification was optimized, using 2 mM imidazole washing buffer followed by elution with six-column volumes of 200 mM imidazole elution buffer and two-column-volume samples were collected and aliquots corresponding to 5  $\mu$ l of each fraction were analyzed (E1, E2, and E3); the results showed that four-column volumes (E2) of elution buffer released most  $\kappa$ GalNAc-T2 protein (B). Elution fractions E1–E3 were pooled and concentrated into 50 mM Tris-HCl pH 7.4 to >1 mg protein/ml. Purity of the final  $\kappa$ GalNAc-T2 preparation under conditions specified in (B) was assessed by SDS-PAGE analysis of sample corresponding to 1  $\mu$ l of final  $\kappa$ GalNAc-T2 preparation followed by silver staining (C).

T2 and BSA bands in Coomassie Blue R-250 stained SDS-PAGE gels (data not shown). Furthermore, the protein was identified by SDS-PAGE separation followed by silver staining and by western blotting with anti-His-tag HRP-conjugated antibody (Fig. 3). The identity of recombinant  $\kappa$ GalNAc-T2 was confirmed by use of high-resolution LTQ FT tandem mass spectrometry with a tryptic digest of the excised SDS-PAGE band. Twenty-two unique peptides representing 41.9% of the amino-acid sequence of the human GalNAc-T2 (NCBI database Acc. No. NP\_004472) were confirmed with the mass error for all peptides  $\leq$  5 ppm.

$\kappa$ GalNAc-T2 was stored at –20 °C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 30% glycerol. The protein was stable without any evidence of protein degradation or loss of enzyme activity. Also, no signs of protein degradation were observed after storage on ice or at +4 °C for up to a month in Tris-HCl buffer (7.4).

#### Assessment of $\kappa$ GalNAc-T2 enzyme activity

The activity of  $\kappa$ GalNAc-T2 preparation was measured by dot-blot assay based on binding of HAA, a GalNAc-specific lectin, to HR peptide linked to BSA (HR-BSA) after the incubation with  $\kappa$ GalNAc-T2 in the presence UDP-GalNAc. Synthetic HR glycopeptide with three GalNAc residues was linked to BSA and served as a positive control for lectin dot-blot assay (PC). Lectin dot-blot assay revealed that  $\kappa$ GalNAc-T2 was enzymatically active (Fig. 4). To confirm and extend these observations, a high-resolution mass spectrometry analysis of the HR acceptor (substrate) was performed. Five glycopeptides corresponding to HR peptide with 5–9 GalNAc residues were observed; the variant with seven GalNAc residues was predominant ion species (Fig. 5). The number of GalNAc residues was assigned based on the masses of the HR peptide (1931.934 Da) and GalNAc (203.079 Da) and confirmed the activity of the  $\kappa$ GalNAc-T2.

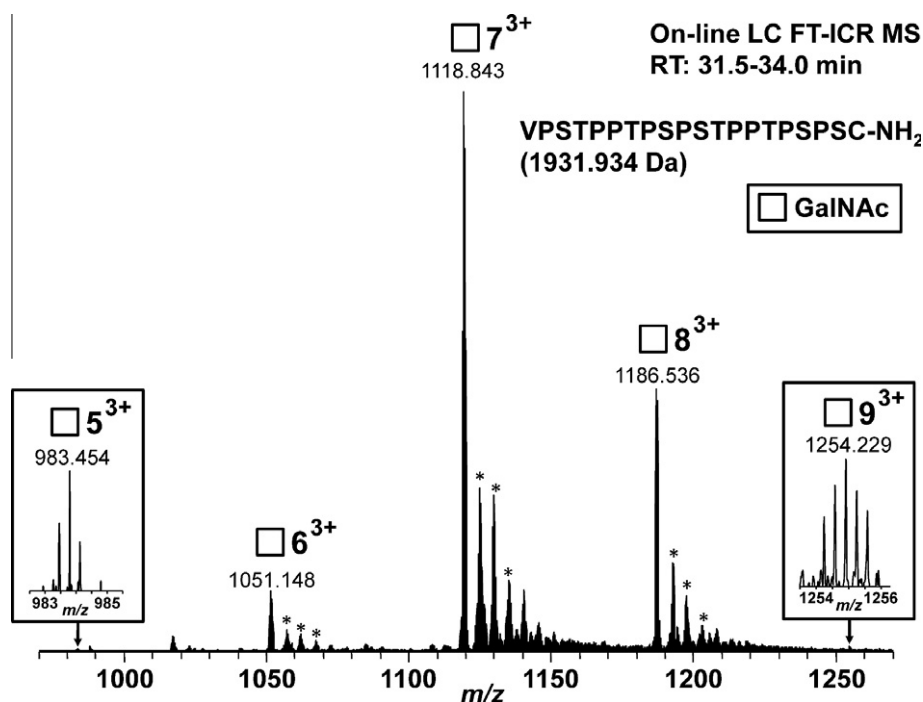


**Fig. 4.** Detection of  $\kappa$ GalNAc-T2 enzyme activity. The enzymatic activity of  $\kappa$ GalNAc-T2 was determined using a synthetic IgA1 hinge-region peptide covalently linked to BSA as acceptor (HR-BSA, 0.05, 0.10, 0.25 and 0.50  $\mu$ g per reaction) and UDP-GalNAc as the donor in the reaction performed for 24 h at 37 °C. Two different amounts of  $\kappa$ GalNAc-T2 (1 or 4  $\mu$ g protein per reaction, i.e., 1.85 or 3.7 units of enzyme) were tested. Negative control had all components except  $\kappa$ GalNAc-T2 (0  $\mu$ g). The IgA1 hinge-region glycopeptide with three attached GalNAc residues and linked to BSA served as a positive control (PC) [11]. Addition of GalNAc after the enzyme reaction was analyzed by dot blot with biotin-labeled HAA lectin followed by neutravidine-HRP and chemiluminescence detection [11].

#### Discussion

Mechanisms involved in the formation of aberrant O-glycans involve abnormal expression of glycosyltransferases, their abnormal localization, or mutation of the respective genes [16]. In IgA nephropathy, aberrant O-glycosylation in the hinge region of IgA1 is directly involved in the pathogenesis of this autoimmune disease [17–19]. This aberrant glycosylation consists of a truncation of mono- or di-sialylated Core 1 structure (GalNAc with a  $\beta$ 1,3-linked Gal) and formation of Tn antigen (GalNAc linked to Ser or Thr) or its sialylated form (sialyl-Tn antigen) [14,18–19]. Mechanisms and pathways involved in the synthesis of Tn antigen on IgA1 are not completely understood. Preparations of recombinant, enzymatically active glycosyltransferases likely involved in the formation of IgA1 hinge-region O-glycans could thus provide an important tool for *in vitro* studies of the IgA1 O-glycan formation. GalNAc-T2 has been identified among the first twelve described GalNAc-transferases (GalNAc-T1 to T12) as the enzyme responsible for the initiation of O-glycosylation of IgA1 [7]. More recently, it was shown that other GalNAc-transferases may also participate in the IgA1 hinge-region glycosylation [20].

Human GalNAc-T2 has been produced previously using *Pichia* expression system for structural studies [21]. This construct was based on amino-acid residues 75–571 of GalNAc-T2 fused with  $\alpha$ -factor secretion signal sequence, His tag, and TEV protease cleavage site. Consequently, GalNAc-T2 was purified from culture medium as a fusion protein and, after TEV protease cleavage, pure GalNAc-T2 was isolated and crystallized. However, *Pichia* expression system requires selection of stable transfectants and, thus requires experience with this time-consuming analysis and screening of multiple clones. Here, we demonstrated that the N-terminal fusion of soluble form of GalNAc-T2 (lacking the transmembrane N-terminal domain) with secretion signal peptide from murine immunoglobulin  $\kappa$  light chain leads to efficient secretion of the recombinant  $\kappa$ GalNAc-T2 in the culture medium both in insect (Sf9) and mammalian (HEK 293T) cells. Notably, using our vector in mammalian cells allowed transient transfection resulting in an ample protein production in the medium. As GalNAc-T2 is not



**Fig. 5.** FT-ICR MS spectrum of the products of GalNAc-T2 reaction after overnight incubation. Hinge-region peptide was used as acceptor with 1  $\mu$ g protein, corresponding to 1.85 units of enzyme. The reaction products were purified from the mixture by LC coupled on-line with LTQ FT-ICR MS. Predominant ion species corresponded to hinge-region glycopeptides with 6, 7, and 8 GalNAc residues. Minor species with five and nine residues are shown in the insets. The number next to square symbol indicates number of GalNAc residues attached. All glycopeptides were detected at LC retention time of 31.5–34.0 min. All glycopeptides were detected as 3<sup>+</sup> charged ions. \*Adducts with NH<sub>3</sub> that matched the theoretical mass values for the expected hinge-region glycopeptides within 2 ppm or less.

glycosylated, all three systems, *i.e.*, *Pichia*, insect cells, and mammalian cells are suitable for the production of active enzyme.

Ig $\kappa$  secretion signal-driven secretion of recombinant immunoglobulins was demonstrated in baculovirus expression systems more than 20 years ago. Since then, several secretory signals have been used for secretion of recombinant proteins: N-terminal sequence of the gene encoding the insulin-like peptide bombyxin [22], baculovirus GP67 signal sequence [23], mouse V47 VH signal sequence [24], and honeybee melittin (HBM) secretion signal [25]. Murine immunoglobulin  $\kappa$  and V47 VH signals were successfully used for secretion of immunoglobulin molecules. An advantage of this signal peptide is that this peptide is not recognized as a foreign sequence by the mammalian hosts. The construction of secreted  $\kappa$ GalNAc-T2 protein confirmed applicability of such signals for effective secretion of nonhomologous proteins from insect cells for biotechnology application. It needs to be stressed that secretion of such fusion proteins must be experimentally confirmed for each construct because even strong insect secretory signals like HBM are not efficiently mediating production and secretion of every construct [26]. Expression of recombinant  $\kappa$ GalNAc-T2 from insect cells Sf9 followed by purification on NiNTA column we described here provides an easy and fast approach for high-yield production of active enzyme. After establishing optimal parameters for infection, cultivation, and purification conditions, yields can reach 2.5 mg protein from 1 L of the culture medium.

#### Acknowledgment

This work was supported by Grants: MSM6198959223 and LH11046 Ministry of School, Youth, and Sport, GAP302/10/1055 Czech Science Foundation, NT11081 Grant Agency of the Ministry of the Health Czech Republic, and by grants from the National Institutes of Health DK082753, DK078244, DK083663, DK075868, DK077279, and GM098539.

#### References

- [1] I. Brockhausen, Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions, *EMBO Rep.* 7 (2006) 599–604.
- [2] D. Chui, G. Sellakumar, R. Green, M. Sutton-Smith, T. McQuistan, K. Marek, H. Morris, A. Dell, J. Marth, Genetic remodeling of protein glycosylation *in vivo* induces autoimmune disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 1142–1147.
- [3] T. Ju, R.D. Cummings, Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome, *Nature* 437 (2005) 1252.
- [4] A. Kobata, A retrospective and prospective view of glycopathology, *Glycoconj. J.* 15 (1998) 323–331.
- [5] P.M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I.A. Wilson, R.A. Dwek, Glycosylation and the immune system, *Science* 291 (2001) 2370–2376.
- [6] T. White, E.P. Bennett, K. Takio, T. Sorensen, N. Bonding, H. Clausen, Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24156–24165.
- [7] H. Iwasaki, Y. Zhang, K. Tachibana, M. Gotoh, N. Kikuchi, Y.D. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, T. Kubota, H. Narimatsu, Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5613–5621.
- [8] M. Raska, K. Takahashi, L. Czernekova, K. Zachova, S. Hall, Z. Moldoveanu, M.C. Elliott, L. Wilson, R. Brown, D. Jancova, S. Barnes, J. Vrbkova, M. Tomana, P.D. Smith, J. Mestecky, M.B. Renfrow, J. Novak, Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 20860–20869.
- [9] H.Y. Joo, A. Jones, C. Yang, L. Zhai, A.D.t. Smith, Z. Zhang, M.B. Chandrasekharan, Z.W. Sun, M.B. Renfrow, Y. Wang, C. Chang, H. Wang, Regulation of histone H2A and H2B deubiquitination and *Xenopus* development by USP12 and USP46, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 7190–7201.
- [10] M.B. Renfrow, C.L. Mackay, M.J. Chalmers, B.A. Julian, J. Mestecky, M. Kilian, K. Poulsen, M.R. Emmett, A.G. Marshall, J. Novak, Analysis of O-glycan heterogeneity in IgA1 myeloma proteins by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: implications for IgA nephropathy, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1397–1407.
- [11] H. Suzuki, R. Fan, Z. Zhang, R. Brown, S. Hall, B.A. Julian, W.W. Chatham, Y. Suzuki, R.J. Wyatt, Z. Moldoveanu, J.Y. Lee, J. Robinson, M. Tomana, Y. Tomino, J. Mestecky, J. Novak, Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1668–1677.
- [12] J.S. Moore, R. Kulhavy, M. Tomana, Z. Moldoveanu, H. Suzuki, R. Brown, S. Hall, M. Kilian, K. Poulsen, J. Mestecky, B.A. Julian, J. Novak, Reactivities of N-acetylgalactosamine-specific lectins with human IgA1 proteins, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 2598–2604.

- [13] M.M. Gomes, H. Suzuki, M.T. Brooks, M. Tomana, Z. Moldoveanu, J. Mestecky, B.A. Julian, J. Novak, A.B. Herr, Recognition of galactose-deficient O-glycans in the hinge region of IgA1 by N-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study, *Biochemistry* 49 (2010) 5671–5682.
- [14] M.B. Renfrow, H.J. Cooper, M. Tomana, R. Kulhavy, Y. Hiki, K. Toma, M.R. Emmett, J. Mestecky, A.G. Marshall, J. Novak, Determination of aberrant O-glycosylation in the IgA1 hinge region by electron capture dissociation fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19136–19145.
- [15] K. Takahashi, S.B. Wall, H. Suzuki, A.D.t. Smith, S. Hall, K. Poulsen, M. Kilian, J.A. Mobley, B.A. Julian, J. Mestecky, J. Novak, M.B. Renfrow, Clustered O-glycans of IgA1: defining macro- and microheterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation, *Mol. Cell Proteom.* 9 (2010) 2545–2557.
- [16] D.J. Gill, H. Clausen, F. Bard, Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 149–158.
- [17] M. Tomana, J. Novak, B.A. Julian, K. Matousovic, K. Konecny, J. Mestecky, Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies, *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 73–81.
- [18] Z. Moldoveanu, R.J. Wyatt, J.Y. Lee, M. Tomana, B.A. Julian, J. Mestecky, W.Q. Huang, S.R. Anreddy, S. Hall, M.C. Hastings, K.K. Lau, W.J. Cook, J. Novak, Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels, *Kidney Int.* 71 (2007) 1148–1154.
- [19] H. Suzuki, Z. Moldoveanu, S. Hall, R. Brown, H.L. Vu, L. Novak, B.A. Julian, M. Tomana, R.J. Wyatt, J.C. Edberg, G.S. Alarcon, R.P. Kimberly, Y. Tomino, J. Mestecky, J. Novak, IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 629–639.
- [20] H.H. Wandall, F. Irazoqui, M.A. Tarp, E.P. Bennett, U. Mandel, H. Takeuchi, K. Kato, T. Irimura, G. Suryanarayanan, M.A. Hollingsworth, H. Clausen, The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation, *Glycobiology* 17 (2007) 374–387.
- [21] T.A. Fritz, J. Raman, L.A. Tabak, Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferase-2, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8613–8619.
- [22] L.F. Congote, Q. Li, Accurate processing and secretion in the baculovirus expression system of an erythroid-cell-stimulating factor consisting of a chimaera of insulin-like growth factor II and an insect insulin-like peptide, *Biochem. J.* 299 (Pt 1) (1994) 101–107.
- [23] T. Kretzschmar, L. Aoustin, O. Zingel, M. Marangi, B. Vonach, H. Towbin, M. Geiser, High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies, *J. Immunol. Methods* 195 (1996) 93–101.
- [24] C. Lemeulle, T. Chardes, C. Montavon, H. Chaabihi, J.C. Mani, M. Pugniere, M. Cerutti, G. Devauchelle, B. Pau, M. Biard-Piechaczyk, Anti-digoxin scFv fragments expressed in bacteria and in insect cells have different antigen binding properties, *FEBS Lett.* 423 (1998) 159–166.
- [25] D.C. Tessier, D.Y. Thomas, H.E. Khouri, F. Laliberte, T. Vernet, Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide, *Gene* 98 (1991) 177–183.
- [26] B. Reavy, A. Ziegler, J. Diplexcito, S.M. Macintosh, L. Torrance, M. Mayo, Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems, *Protein Exp. Purif.* 18 (2000) 221–228.