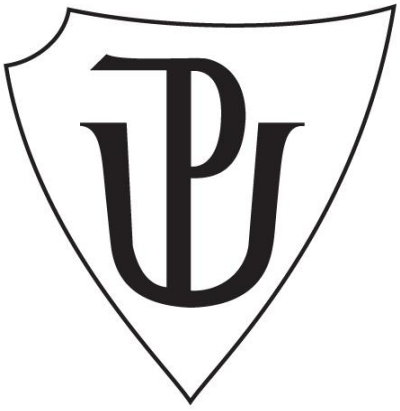
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



De novo tvorba imunitních komplexů u IgA nefropatie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Markéta Vajdíková**
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.**
Rok:	2020

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

V Olomouci dne .....

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce, Mgr. Petru Kosztyu, Ph. D., za neskutečnou trpělivost, podporu, pohotovost, dobrou náladu a cenné rady a připomínky. Ráda bych také poděkovala svým nejbližším, kteří jsou mi velkou oporou.

Zpracování této bakalářské práce bylo podpořeno projektem IGA_LF_2019_014 a IGA_LF_2020_016.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Vajdíková
Název práce	*De novo* tvorba imunitních komplexů u IgA nefropatie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

IgA nefropatie je celosvětově nejrozšířenější primární glomerulonefritidou. Nejčastější výskyt je v prvních dvaceti letech života, avšak objevuje se i u dětí a lidí starších 60 let. Dochází zde k tvorbě cirkulujících imunitních komplexů, které následně tvoří mesangiální depozita. Imunitní komplexy jsou tvořeny galaktosově deficientním polymerním IgA1, které je rozpoznáváno autoprotilátkami IgG jako autoantigen. Tyto imunitní komplexy v mesangiu způsobují proliferaci mesangiálních buněk, nadprodukci extracelulárního matrix, produkci zánětlivých cytokinů a buněčných faktorů. V současné době neexistuje žádná léčba, která by se zaměřovala na příčiny IgA nefropatie, pouze se léčí příznaky. Poznání příčin vzniku onemocnění vedlo k navržení různých možností kauzální terapie, které jsou nyní ve fázi výzkumu. Uvažuje se o inaktivaci buněk produkující galaktosově deficientní IgA1, zmenšení imunitních komplexů pomocí modifikovaných protilátek, štěpení již uložených imunitních komplexů v depozitech nebo zastavení aktivace mesangiálních buněk. V této bakalářské práci bylo vytvořeno polymerní degalaktosylované IgA1, které bylo následně inkubováno s pacientskými séry pro *de novo* tvorbu imunitních komplexů. Séra, ve kterých byl pozorován nárůst množství imunitních komplexů, budou použita pro výzkum malých rekombinantních inhibitorů imunitních komplexů, jako možnost kauzální terapie IgA nefropatie.

Klíčová slova	IgA nefropatie, autoimunitní onemocnění, IgA1, galaktosově deficientní IgA1, imunitní komplexy, kauzální léčba IgA
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Markéta Vajdíková
Title	*De novo* formation of immune complexes in IgA nephropathy
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
The year of presentation	2020

IgA nephropathy is the most common primary glomerulonephritis worldwide. The most common occurrence is in the first twenty years of life, but it also occurs even in children and elders over 60 years. The disease is characterized by formation of circulating immune complexes, which subsequently form mesangial deposits. These immune complexes are made of galactose deficient IgA1 and autoantibody IgG, which recognizes IgA1 as an autoantigen. These immune complexes in mesangium cause proliferation of mesangial cells, overproduction of extracellular matrix, inflammatory cytokines and cellular factors. There is no causal treatment available. The only treatment is focused on the symptom reduction. Based on knowledge of the disease origin, various causal treatment options were suggested. It is thought of a possibility of inactivation cells, that produce galactose deficient IgA1, reducing the size of immune complexes using smaller antibodies, cleavage of immune complexes, which already formed mesangial deposits or stopping of mesangial cells activation. This bachelor thesis was focused on production of degalactosylated polymeric IgA1, which was then used to *de novo* formation of immune complexes in the serum of patients with IgA nephropathy. The sera with increased level of de novo immune complexes will be chosen for the research of recombinant inhibitors of immune complexes, as a possible causal therapy of IgA nephropathy.

Keywords	IgA nephropathy, autoimmmune disease, IgA1, galactose deficient IgA1, immune complexes, causal treatment of IgAN
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD 1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 3
2.1 IgA nefropatie 3
2.1.1 Zásah populace 4
2.2 Imunoglobuliny A 5
2.2.1 Struktura 5
2.2.2 Formy IgA 7
2.3 Glykosylace 8
2.3.1 Glykosylace IgA1 9
2.3.2 Glykosylace u IgAN 10
2.4 Protilátky proti gd-IgA 12
2.5 Tvorba imunitních komplexů 13
2.5.1 Biologické aktivity imunitních komplexů 15
2.6 Strategie léčby IgA nefropatie 17
2.6.1 Blokáda renin-angiotensin 18
2.6.2 Rybí olej 18
2.6.3 Tonsilektomie 18
2.6.4 Kortikosteroidy 19
2.7 Kauzální terapie 20
2.7.1 Inhibice tvorby gd-IgA1 20
2.7.2 Ovlivnění tvorby imunitních komplexů 20
2.7.3 Inhibice aktivace mesangiálních buněk 21
2.7.4 Štěpení IgA1 v mesangiálních depozitech 21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 23
3.1 Materiál a chemikálie 23
3.1.1 Chemikálie 23
3.1.2 Protilátky 24
3.1.3 Pufry a roztoky 24
3.1.4 Přístrojové vybavení 25
3.1.5 Spotřební materiál 26
3.1.6 Biologický materiál 26
3.2 Metody 26
3.2.1 Tvorba degalaktosylovaného IgA1 26
3.2.2 Detekce gd IgA1 metodou ELISA 28
3.2.3 SDS-PAGE 29
3.2.4 Semi dry-western blot 30

3.2.5 *De novo* tvorba imunitních komplexů v sérech pacientů 30
3.2.6 Detekce imunitních komplexů metodou ELISA 31
3.3 Statistická analýza 31
4 VÝSLEDKY 32
4.1 Degalaktosylace IgA1 32
4.1.1 Detekce metodou Western blot 33
4.1.2 Detekce metodou ELISA 34
4.2 *De novo* tvorba imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN 35
5 DISKUZE 38
6 ZÁVĚR 40
7 LITERATURA 41
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 51

Cíle práce

Teoretická část: Vypracování literární rešerše na téma IgA nefropatie, molekulární mechanismy vzniku, vliv imunitních komplexů, současná léčba a možnosti kauzální terapie v budoucnu.

Praktická část: Produkce abnormálně galaktosylovaného IgA, ověření lectinovou ELISA metodou, *de novo* tvorba imunitních komplexů v sérech pacientů s IgA nefropatií a jejich detekce metodou ELISA.

1 ÚVOD

Lidské imunoglobuliny A1 (IgA1) jsou produkovány při imunitní odpovědi B lymfocyty. Mohou se vyskytovat jak v polymerní, tak v monomerní formě, avšak monomerní je častější v séru, polymerní se vyskytuje převážně jako slizniční (Hořejší, 2017). Na rozdíl od IgA2 jsou výjimečné svou rozsáhlou pantovou oblastí, která nabízí unikátní místa pro glykosylaci, ale také pro štěpení bakteriálními proteasami (Kilian, 2005).

Při glykosylaci jsou na molekulu imunoglobulinu navázány N-acetyl galaktosamin, galaktosa a kyselina sialová. Pokud glykosylace neproběhne v pořádku, je vytvořen aberantně glykosylovaný IgA1. Tento je vyhodnocován jako antigen a rozpoznávána dalšími protilátkami, většinou imunoglobuliny G (Suzuki, 2009a). Po vazbě dojde k tvorbě velkých imunitních komplexů (800-900 kDa), které se ukládají v ledvinách. Tyto depozity imunitních komplexů v mesangiích poté vyvolávají proliferaci mesangiálních buněk, tvorbu cytokinů, chemokinů a nekrotizujících faktorů (například TNF) (Novak, 2011a).

Nemoc, která vykazuje tyto příznaky, se nazývá IgA nefropatie. Je nejčastější primární glomerulonefritidou a příčinou hematurie na světě (Julian, 1988). Zatím neexistuje žádná kauzální léčba, léčeny jsou pouze příznaky, tudíž je léčba podobná jako u ostatních renálních onemocnění. Léčba je zaměřena na snížení proteinurie, kontrolu krevního tlaku a zachování, či zpomalení úbytku ledvinové funkce, což je prováděno modulací nepříznivých imunitních a zánětlivých jevů v glomerulu a tubulointersticiu (Boyd, 2012). Nejčastějším způsobem léčby je blokáda renin-angiotenzin, která je schopna snížit proteinurii a kontrolovat hypertenzi, avšak nemá žádný vliv na konečné zachování renálních funkcí (Coppo, 2010a).

Do budoucna se však vyskytují zajímavé možnosti kauzální terapie, jejichž výzkum se ubírá několika možnými směry. Například je zkoumáno, zda by bylo možné inhibovat buňky, které tvoří aberantně glykosylované IgA1, tudíž by nedocházelo k vytvoření imunitních komplexů. Další možností by mohlo být snížení molekulové hmotnosti imunitních komplexů vytvořením pouze části IgA, nebo autoprotilátky, jelikož menší imunitní komplexy dokonce proliferaci mesangiálních buněk inhibují. V neposlední řadě je zde možnost pokusit se inhibovat proliferaci mesangiálních buněk, nebo štěpit IgA1, které je již uloženo v mesangiálních depozitech. Žádný

z těchto postupů ještě není úplně prozkoumán, avšak v blízké budoucnosti se počítá s vytvořením plně funkční kauzální terapie (Raška, 2016).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 IgA nefropatie

Imunoglobulin A nefropatie (IgAN) je nejčastější primární glomerulonefritidou a příčinou hematurie ve světě (Julian, 1988). Poprvé byla popsána v roce 1968 ve Francii Jeanem Bergerem a Nicole Hinglaisem za použití imunofluorescenčních technik pro vyšetřování vzorků renální biopsie od pacientů s perzistentní mikroskopickou hematurií (Berger, 1968).

Její příčinou je tvorba cirkulujících imunitních komplexů IgA-IgG, které se hromadí v glomerulárním mesangiu ledvin, což vede v proliferaci mesangiálních buněk a poškození funkce ledvin. Toto primárně imunitní onemocnění dospívá ke konečnému stádiu, renálnímu selhání, u 30 % - 40 % pacientů do 20 let od předpokládaného vypuknutí choroby (D'Amico, 2000a).

Pro diagnostiku je stále potřeba využití renální biopsie. IgA je predominantní nebo kodominantní imunoglobulin v mesangiálních depozitech, avšak je často doprovázen IgG, IgM, případně oběma najednou (Jennette, 1988). Mesangiální IgA je výhradně podtřídy IgA1 a jeho specifické biochemické vlastnosti hrají roli v patogenezi IgAN (Conley, 1980).

Typicky se IgAN projeví během adolescence a rané dospělosti, avšak první náznaky renálního onemocnění mohou být pozorovány jak u dětí okolo 4 let, tak u dospělých starších 60 let. Stupně hematurie a proteinurie mohou být velmi rozsáhlé. Makroskopická hematurie, která je velmi často konkurenční s infekcí horních dýchacích cest nebo gastrointestinálního traktu, může být první znak renálního onemocnění, který je běžný u dětí, avšak vzácný u pacientů starších 40 let (D'Amico, 2000b). Hodnoceno podle oxfordské klasifikace, histologické funkce, které naznačují méně příznivou prognózu zahrnují mezangiální hypercelularitu, segmentální glomerulosklerózu, endokapilární hyparcelularitu a tubulární atrofii nebo intersticiální fibrózu (Herzenberg, 2011).

Pro pacienty se zachovanou funkcí clearance, hypertenzí a proteinurií existují dva klíčové modifikovatelné prognostické faktory. Nepříznivý vliv proteinurie začíná při vylučování 500 mg za den (Bartosik, 2001). Naproti tomu se u 20 až 25 % pacientů vyskytuje klinická remise, kdy mají normální koncentraci sérového kreatininu i normální výsledky z vyšetření moči, avšak opakovaná biopsie obecně poukazuje na přetrvávající glomerulární depozici IgA (Yoshikawa, 1990). Další pacienti vykazují

indolentní asymptomatický průběh, který se projevuje jako přetrvávající nebo občasná mikroskopická hematurie a mírná proteinurie. Difuzní mesangiální depozity IgA také byly zdokumentovány u překvapivě vysoké části zdravé populace. Tento charakteristický znak IgAN byl nalezen u 2 až 4 % případů v pitevních zprávách, přestože velký počet jedinců nevykazoval žádný klinický důkaz renálního onemocnění před smrtí (Waldherr, 1989). Studie prováděná na dárcích ledvin v Japonsku dokázala, že 82 z 510 (16 %) aloštěpů, u kterých byla provedena biopsie v době implantace, byly ovlivněny a 19 vykazovalo skrytou mesangiální proliferativní glomerulonefritidu (Suzuki, 2003).

Henoch-Schönleinova purpura s nefritidou (HSPN) může představovat nejzevnější projev spektra nemocí: autoimunitní proces, který vede k IgAN. HSPN pacienti mají vaskulitidu indukovanou IgA, která může postihovat kromě ledvin také kůži a střeva. Renální imunopatologické nálezy jsou podobné s nálezy u IgAN. Biopsie kožních lézí u purpury vykazuje leukocytoklastickou vaskulitidu s IgA ve stěnách dermálních kapilár a biopsie klinicky normálního stavu kůže některých pacientů s IgAN vykazuje patologii, která je identická (Thompson, 1980). U pacientů s hematurií nebo proteinurií po transpantaci při konečném stádiu HSPN ukázala renální biopsie IgAN (Weiss, 1978).

2.1.1 Zásah populace

IgAN se vyskytuje ve všech věkových skupinách, s obvyklým věkem klinického nástupu ve druhé a třetí dekádě života, častěji jsou zasaženi muži (Tumlin, 2007).

Pro toto onemocnění je typická frekvence výskytu v různých etnických skupinách. Nejvíce se vyskytuje v Japonsku, kde tvoří až 50 % případů všech nových glomerulonefritid, v kontrastu k Evropě nebo USA, kde tato čísla tvoří 30 % a 10 % všech diagnostikovaných glomerulonefritid (Tumlin, 2007). V USA však činí výjimku populace indiánů Navajo v Novém Mexiku, kteří mají incidenci této choroby 38 % (Julian, 1988). Incidence v centrální Africe je menší než 5 %, přestože frekvence pro Afroameričany je stejná jako pro Kavkazy v určitých regionech USA (Wyatt, 1998). Tato variabilita v incidenci může být dána rozdíly v ochotě podstoupit invazivní diagnostickou proceduru při relativně mírných urinálních abnormalitách, nebo v geneticky určených vlivech na patogenezi nemoci (Gharavi, 2011b). Geografické znázornění na obrázku (Obr. 1).

Obr. 1 Geografické znázornění celosvětového výskytu IgAN. Procentuální vyjádření frekvence s ohledem k ostatním glomerulonefritidám. Upraveno podle Cheung, 2016.

Dle Českého registru renálních biopsií v České republice tvořila IgAN 34 % z diagnostikovaných glomerulonefritid mezi lety 1994-2011 (Maixnerova, 2015).

2.2 Imunoglobuliny A

Imunoglobuliny A (IgA) tvoří část humorální složky specifické imunity. Patří mezi pět základních tříd lidských imunoglobulinů, které se navzájem odlišují typem těžkého řetězce. Jsou produkovány během imunitní odpovědi B lymfocyty, které se po aktivaci transformují na plazmatické buňky v lymfoidních tkáních (Hořejší, 2017).

2.2.1 Struktura

Všechny typy imunoglobulinů obsahují nejméně dva stejné lehké (L) řetězce s molekulovou hmotností 23 kDa a dva shodné těžké (H) řetězce s molekulovou hmotností 35-75 kDa. Tyto řetězce jsou spojeny disulfidovými vazbami a tvoří tetramer. L- a H- řetězce jsou nejprve syntetizovány odděleně, jejich spojení do kompletních molekul nastává teprve až uvnitř B-lymfocytů nebo plazmatických buněk. Oba typy řetězců mohou být rozděleny na specifické domény (regiony) podle funkce (Murray, 2012).

Na rozdíl od lidských imunoglobulinových isotypů, které se vyskytují pouze v monomerní formě, jako jsou IgG, IgD a IgE, nebo pouze v polymerní formě, jako je IgM. IgA se mohou vyskytovat v obou formách: mohou vytvářet polymery dvou nebo tří tetramerních základních jednotek, v monomerní formě se vyskytují pouze v séru.

Forma vyskytující se v séru je predominantní a je syntetizována v kostní dřeni (Woof, 2013).

Do dimerní formy (dIgA) jsou spojovány na Fc konci pomocí proteinu, který je označován jako J (joining) řetězec (Brandtzaeg, 1985). Spolu s dalšími polymery IgA (pIgA) se nachází v sekretech sliznic jako sekreční forma dIgA a jsou souhrnně označovány jako polymerní IgA. Pro přenos dIgA do extracelulárního prostoru je potřeba vazba na membránový receptor (pIgR) (Ballieux, 1968). Po navázání na IgA je receptor rozštěpen a jedna jeho část zůstává navázána na IgA. Tato část je nazývána sekreční komponenta (S komponenta), která chrání imunoglobulin před štěpením proteolytickými enzymy na sliznicích (Asofski, 1969).

Sekreční IgA (S-IgA) je převládajícím imunoglobulinem v mléku, kolostru, slzách, slinách a sekretech slizničních povrchů, kterými jsou například dýchací, gastrointestinální a genitourinární cesty (Russell, 1986).

Lehký řetězec se dělí na dvě domény. Polovina řetězce na karboxylovém konci se nazývá konstantní oblast (C_L), druhá polovina, na aminokonci, je variabilní oblast (V_L).

Mezi lehkými řetězci rozlišujeme dva typy, kappa (κ) a lambda (λ). Toto rozdělení je určováno na základě rozdílné struktury C_L oblastí. Molekula imunoglobulinu vždy obsahuje buď dva κ-řetězce, nebo dva λ-řetězce, nikdy však jejich kombinaci. U lidských imunoglobulinů se vyskytuje řetězec κ mnohem častěji než řetězec λ (Schaller, 2008), přesněji v poměru 63:37 (Mul, 1975).

Težký řetězec se skládá z čtyřech až pěti domén. Část těžkého řetězce nacházející se na aminokonci, je označována jako variabilní oblast (V_H). Zbytek řetězce tvoří konstantní oblasti (C_H1, C_H2, C_H3, C_H4). Mezi konstantní a variabilní oblastí se nachází oblast pantová (Kirkham, 1994).

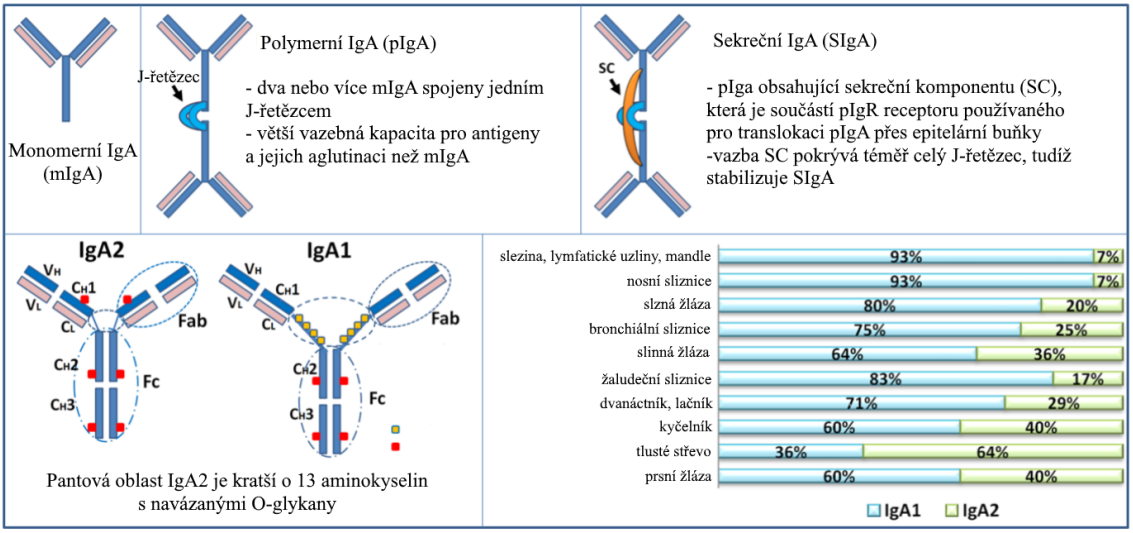
Imunoglobuliny A mají typ těžkého řetězce α. Typ řetězce určuje kromě názvu imunoglobulinu i jeho funkci (Schaller, 2008).

Variabilní oblasti, které tvoří domény V_L a V_H jsou pro každého člověka specifické sekvencí aminokyselin. Bylo však dokázáno pomocí analýzy aminokyselinových sekvencí, že variabilní oblasti jsou složeny z téměř neměnných oblastí a z hypervariabilních regionů. Tyto regiony tvoří místo vázající antigen a určují specifitu protilátek, tudíž jsou také nazývány jako oblasti určující komplementaritu (complementarity-determining regions, CDRs) (Capra, 1975).

2.2.2 Formy IgA

U člověka, stejně jako u šimpanzů, goril a gibonů se vyskytují dvě podtřídy IgA, IgA1 a IgA2 (Kawamura, 1992). Podtřída IgA1 převládá v dýchacím traktu, kdežto v zažívacím převládá naopak IgA2 (Hořejší, 2017).

IgA1 je sekretován B buňkami v různých slizničních a systémových kompartmentech (Macpherson, 2008) s charakteristickým místně specifickým fenotypem (Pakkanen, 2010). Obecně je slizniční IgA typicky polymerní a s malou afinitou, systémový pak hlavně s vysokou afinitou a monomerní. IgA1, který je specifický pro antigeny vyskytující se ve sliznicích, je relativně špatně galaktosylovaný. Všechny tyto vlastnosti slizničního IgA1 jsou charakteristické pro sérový a mesangiální IgA1 u IgAN (Conley, 1980). Vlastnosti sérového a slizničního IgA shrnuty na obrázku (Obr. 2).



Obr. 2 Schématické znázornění forem imunoglobulinu A (IgA), jeho podtřídy a distribuce u člověka. Distribuce podtříd IgA (IgA1, IgA2) ve vnějších sekretech zdravých dospělých. Upraveno podle Perše, 2019.

Molekuly IgA1 jsou význačné délkou své pantové oblasti, flexibilními úseky polypeptidu v jádru protilátky, které oddělují regiony odpovědné za vazbu na antigen a efektorovou kapabilitu a nachází se mezi C_H1 a C_H2 (Wolfenstein, 1971). Prodloužená pantová oblast, která se nachází u IgA1, chybí jak u molekul IgA2, tak u monomerů IgA vyskytujících se u většiny savců (Wolfenstein-Todel, 1972). V lidském séru se vyskytuje IgA1 častěji, tvoří zhruba 90 % všech IgA, zbylých 10 % tvoří IgA2 (Crago, 1984).

Pantová oblast IgA1 obsahuje inzerci 17 aminokyselin, která u IgA2 chybí. Tato část nabízí jedinečná místa pro O-glykosylaci. Zahrnuje opakujících se 8 aminokyselin bohatých na prolinová, serinová a threoninová residua, na které je připojeno 3-6 O-vázaných oligosacharidů. Molekuly těchto sacharidů jsou většinou malé a heterogenní a jsou složeny převážně z N-acetylgalaktosaminu, galaktosy a kyseliny sialové. Obě podtřídy IgA taktéž obsahují N-vázané oligosacharidy (Wolfenstein, 1971).

Prodloužená pantová oblast však poskytuje i vhodné místo pro štěpení bakteriálními proteasami. Jejich působením je molekula imunoglobulinu rozdělena na dva fragmenty, Fab a Fc. Fab fragment nese vazebnou doménu pro antigen a Fc fragment je tvořen doménami těžkého řetězce (Hořejší, 2017). Bakterie schopné produkovat tyto proteasy jsou například *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorboeae, Neisseria meningitidis* a další (Kilian, 2005). Přestože tato pantová oblast je přítomna v IgA i u jiných druhů obratlovců (například u krav, prasat, psů, myší a králíků), vykazuje v porovnání s lidským IgA1 nízký stupeň sekvenční homologie, glykosylace a citlivosti na bakteriální IgA1 specifické proteasy (Woof, 2005).

2.3 Glykosylace

Glykosylace hraje významnou roli při produkci, manipulaci a funkci všech glykoproteinů. Probíhá převážně během a bezprostředně po syntéze proteinu (Ohtsubo, 2006). Stejně jako ostatní imunoglobuliny a velké množství dalších sérových proteinů, jsou lidské IgA glykosylované. Rozlišujeme 2 formy glykosylací, N-vázané a O-vázané.

N-vázané oligosacharidy připojené na asparaginová residua se při glykosylaci tvoří nejčastěji a obvykle obsahují komplexní, rozvětvené řetězce (Arnold, 2007). O-vázané oligosacharidy jsou více přítomny u membránových proteinů, méně častěji se

nacházejí u sérových proteinů. Tvoří je obvykle jednodušší sacharidové skupiny připojené ke zbytkům serinu nebo threoninu (Bezinger, 1974).

Oba typy sacharidů mohou nést terminální kyselinu sialovou, což je vysoce záporně nabitá molekula, která je mnohem labilnější, než zbytek proteinu a je velmi důležitá při určování clearance mnoha proteinů (Klenk, 1941).

2.3.1 Glykosylace IgA1

IgA1 je jeden z mála sérových proteinů, které obsahují jak N-vázané, tak O-vázané oligosacharidy. Tyto se nachází v pantové oblasti imunoglobulinu mezi C_H1 a C_H2 doménami těžkého řetězce (Tarelli, 2004). O-vázané sacharidové řetězce začínají vazbou N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) na serinovou nebo threoninovou hydroxylovou skupinu v prodloužené pantové oblasti. Tento N-acetylgalaktosamin je poté většinou dále rozšířen galaktosou (Gal) v konfiguraci β-1,3 a jednou nebo dvěma molekulami kyseliny sialové (N-acetylneuraminová kyselina, NeuNAc) v konfiguraci α-2,6 a/nebo α-2,3. Tudíž se každý O-glykan může vyskytovat ve čtyřech různých formách, A-D (Mattu, 1998).

IgA1 monomer, který obsahuje dva α_1 těžké řetězce, každý s devíti potenciálními místy pro O-glykosylaci (i když nejsou všechna obsazena), tedy nese několik těsně sousedících O-vázaných sacharidů v pantové oblasti, což zajišťuje těsné shlukování zbytků NeuNAc, Gal a GalNAc. Různé složení těchto oligosacharidových řetězců může mít významné účinky na celkové fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly IgA1. V normálním séru se nachází směs IgA1 O-glykoforem díky heterogenitě dané jak různým obsazením vazebných míst, tak výskytem směsi struktur GalNAc-Gal-NeuNAc na každém z O-glykosylačních míst (Lai, 2012).

O-glykosylace IgA1 probíhá v Golgiho aparátu a je ovlivněna činností vysoce specifických glykosyltransferas, které připojují jednotlivé sacharidy k polysacharidovému řetězci. Iniciačním krokem je navázání GalNAc na threonin nebo serin molekuly proteinu pomocí rodiny enzymů UDP-N-acetyl-α-D--galaktosamin:polypeptid N-acetylgalaktosaminyltransferas (pp-GalNAc-T) (Iwasaki, 2003). Specifická role individuálních GalNAc-T isoforem a jak tyto enzymy kooperují, ještě není plně prozkoumána, avšak dominantní roli může hrát nejčastěji exprimovaný GalNAc-T2 (Stewart, 2019). Studie *in vitro,* kde byl jako akceptor použitý syntetický peptid, ukázala, že iniciovat O-glykosylaci může i GalNAc-T1

nebo GalNAc-T11 (Wandall, 2007). Je možné, že koordinovaná funkce více druhů GalNAc-Ts může být pozměněna v IgA1 produkujících buňkách během infekce horních cest dýchacích, spolu se stimulací protizánětlivých cytokinů. Tento proces pravděpodobně ovlivňuje hustotu a strukturu připojených O-glykanů (Mestecky, 2013).

Galaktosylace je dokončena core 1 β-1,3 galaktosyltransferasou (C1Gal-T1, 2.4.1.122), která se nachází v lidských B buňkách a přenáší Gal z UDP-Gal na GalNAC přes vazbu β-1,3 (Kudo, 2002). Funkce C1Gal-T1 závisí na přítomnosti molekulárního chaperonu Cosmc (Ju, 2002), který jako jediný galaktosyluje Tn antigen (GalNAc bez připojené Gal) za formace T antigenu (Wang, 2010). Nakonec může nastat O-sialyzace, která je katalyzována enzymy z rodiny sialyltransferas (Szabo, 2017).

Je známo jen velmi málo o faktorech kontrolujících IgA1 O-glykosylaci. Díky hmotnostní spektrofotometrické analýze pantové oblasti bylo zjištěno, že každý ze vzorků séra obsahoval mezi 10-20 různě glykosylovanými peptidy (Tarelli, 2004). To naznačuje, že plazmatické buňky IgA1 jsou schopny produkovat protilátky s výrazně odlišnými profily O-glykanů. Studie *in vitro* na zvířecích systémech ukázaly, že glykosylace IgA může být ovlivněna lokálně syntetizovanými cytokiny, zejména cytokiny Th2 (Kobayashi, 2002). Kromě toho mají sekreční IgA odlišné N-vázané a O-vázané oligosacharidové jednotky než sérové IgA, což naznačuje, že syntéza IgA ve sliznicích může být spojena s místně specifickou glykosylací IgA (Smith, 2006).

2.3.2 Glykosylace u IgAN

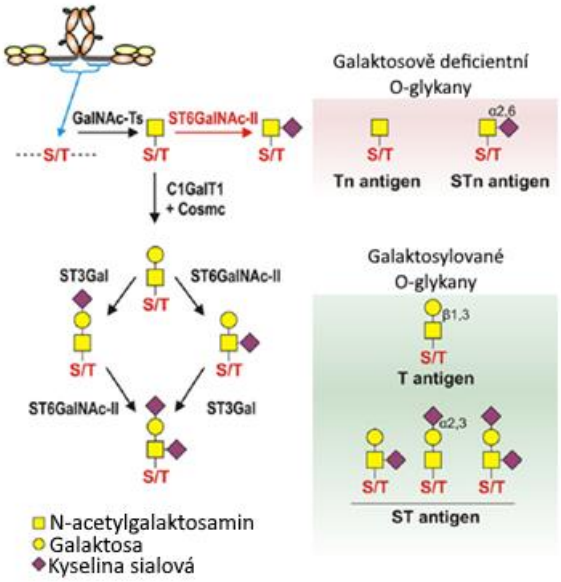
U pacientů s IgAN obsahuje zvýšená frakce cirkulujících IgA1 O-glykany v pantové oblasti, které jsou složena z GalNAc bez připojené Gal (Tn antigen), s nebo bez připojené kyseliny sialové; tato struktura je známa jako sialyl-Tn (STn) antigen. Tn antigen je částí epitopu, který je rozpoznáván pomocí IgG a IgA1, které se váží na galaktosově deficientní IgA1 (Gd-IgA1), což způsobuje tvorbu nefritogenních imunitních komplexů (Suzuki, 2009a). Schéma glykosylace u IgAN zobrazeno na obrázku (Obr. 3).

Ke studii O-glykosylace u IgAN bylo použito mnoho experimentálních přístupů: vazba lektinu na O-glykany *in situ* na IgA1 (Tomana, 1997), hmotnostní spektroskopie kompletní izolované pantové oblasti IgA1 (Odani, 2000) a chromatografická separace

uvolněných O-glykanů v jejich neporušené formě i jako volných monosacharidů (Iwase, 1992). Všechny tyto přístupy dokázaly abnormální IgA1 u IgA nefropatie.

První studie abnormálně galaktosylovaného IgA1 byly omezeny pouze na sérové IgA1 (Mestecky, 1993), avšak pozdější studie identifikovaly stejné abnormality O-galaktosylace i v mesangiálním IgA1 (Allen, 2001).

Mechanismy odpovědné za aberantně glykosylovaný IgA1 nejsou známy, ale mohou zahrnovat abnormální expresi nebo aktivitu enzymů, které přidávají jednotlivé monosacharidy do pantové oblasti IgA1. Například snížená aktivita C1GalT1, enzymu, který připojuje Gal, nebo jeho chaperonu, Cosmc, by mohla vést k nadbytku připojené kyseliny sialové přímo na GalNAc (Allen, 1997). Také by k tomuto mohla vést zvýšená aktivita α-N-acetylgalaktosaminid α-2,6-sialyltransferasy 2 (ST6GALNAC2, 2.4.99.3), která připojuje kyselinu sialovou k GalNAc (Marcos, 2004). Pokud nastane předčasná sialyzace, brání navázání Gal, tudíž vzniká aberantně glykosylovaný IgA1 (Schachter, 1971). Je možné i zapojení obou mechanismů najednou.



Obr. 3 Možné cesty O-glykosylace pantové oblasti IgA1 zahrnující galaktosově deficientní a galaktosylované O-glykany. V levém sloupci: O-glykosylace pantové oblasti IgA1 začínající připojením N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) na Ser nebo Thr. U pacientů s IgAN mohou být některé IgA1 předčasně sializovány (červená šipka), tudíž se nemůže připojit galaktosa. U zdravých jedinců je následné připojení galaktosy možné. Pravý sloupec: galaktosově deficientní O-glykany obsahují terminální GalNAc (Tn antigen) nebo GalNAc a kyselinu sialovou (STn antigen). Upraveno podle Knoppova, 2016.

2.4 Protilátky proti gd-IgA

Přítomnost protilátek proti IgA1 byla prokázána v sérech u pacientů s IgA deficiencí (Nadorp, 1973), avšak protilátky IgG a IgM, které jsou specifické pro myelomové IgA, byly také detekovány v sérech zdravých jedinců (Jackson, 1987a). Tyto protilátky byly přítomny dokonce v daleko větším množství, když byly jako antigen použity Fab fragmenty spojené s pantovou oblastí IgA. Následně byly analogické experimenty rozšířeny o vyšetření séra, imunitních komplexů a buněk periferální krve od pacientů s IgAN (Suzuki, 2009a). Hladiny sérových IgG a IgA1, protilátek, které jsou specifické proti Gd-IgA1, a jejich Fab fragmenty obsahující variabilní oblast, byly větší u pacientů s IgAN, než u zdravých kontrol (Jackson, 1987b). Tyto Gd-IgA1 specifické protilátky byly však přítomny v séru pacientů s IgAN v nadbytku, ne pouze v imunitních komplexech, avšak i ve volné formě (Tomana, 1999). Rozšiřující studie *in vitro* a *in vivo* vedly k závěru, že v cirkulujících imunitních komplexech Gd-IgA1 vystupuje jako antigen rozpoznáván protilátkami, které jsou specifické pro pantovou oblast Gd-IgA1 (Suzuki, 2009b).

Tn struktura (terminální GalNAc) pantové oblasti IgA1 reprezentuje neoepitop rozpoznávaný IgG a IgA1 protilátkami, jejichž vazba vede k tvorbě imunitních komplexů. Pro identifikaci autoprotilátek na molekulární úrovni byly naklonovány EBV-imortalizované lymfocyty, které vylučovaly IgG specifické pro gd-IgA1 (Suzuki, 2011). Tyto studie odhalily, že IgG produkován buňkami pacientů s IgAN váže gd-IgA1 glykanově specificky, stejně jako polyklonální IgG ze sér pacientů s IgAN. Blokovací experimenty s lektinem Helix aspersa aglutininem (HAA) potvrdily, že vazba na IgG byla zprostředkována přes glykany. Navíc experimenty, které využívaly enzymaticky modifikované IgA1 odhalily, že pro vazbu s IgG je potřeba terminální GalNAc, zatímco přidání Gal nebo SA k terminálnímu GalNAc vazbu blokovalo (Suzuki, 2009b).

K charakterizaci klíčových strukturálních prvků byly EBV-imortalizované buňky subklonovány jako jednobuněčné klony, následně amplifikovány pomocí PCR a nasekvencovány variabilní regiony těžkých a lehkých řetězců. Tyto analýzy identifikovaly jedinečné vlastnosti v CDR3 na V_H u IgG pacientů s IgAN. Na třetí pozici se nacházel Ser u šesti ze sedmi pacientů s IgAN, zatímco u všech zdravých kontrol se na tomtéž místě nacházel Ala. Studie prokázala, že Ser na třetí pozici CDR3

na V_H je nezbytný pro efektivní vazbu na pantovou oblast IgA1 s Tn antigenem (Suzuki, 2009a).

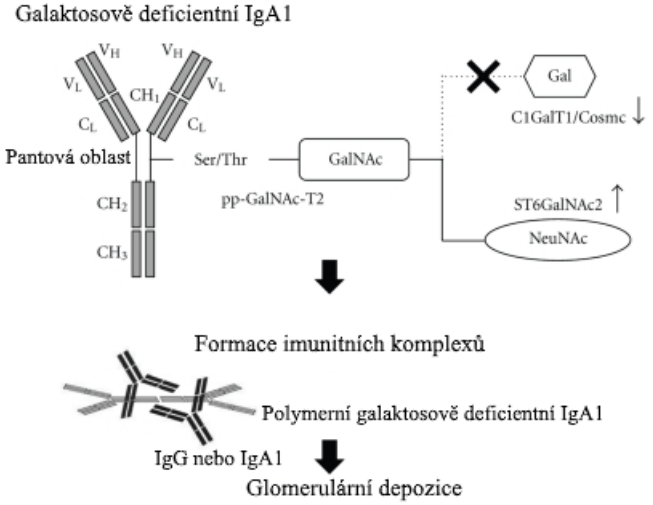
Zejména sérové hladiny protilátek IgG, které jsou specifické pro gd-IgA1 mohou být určeny pomocí dot-blot testu, nebo metodou ELISA. Analýzy prokázaly, že sérová hladina IgG je zvýšená u IgAN pacientů a koreluje s proteinurií stejně jako s hladinou imunitních komplexů IgA1-IgG v moči. Tato pozorování naznačují, že hladiny sérových protilátek specifických pro gd-IgA1 mohou představovat marker aktivity onemocnění, a proto mohou být užitečné při hodnocení reakce na léčbu (Mestecky, 2013).

Možnou hypotézou je, že autoprotilátky reagující v pantové oblasti, jsou mikrobiálně specifické slizniční protilátky, které jsou generovány proti sacharidovým řetězcům na mikrobiálních buněčných stěnách. Tyto mikrobiálně specifické protilátky reagují zkříženě s aberantně glykosylovanou pantovou oblastí IgA1. Během infekcí sliznic je tudíž podporována tvorba imunitních komplexů zvýšenou hladinou autoprotilátek, která může být dále vystupňována přechodem na imunoproteosom a zvýšenou prezentací mikrobiálního antigenu (Feehally, 1986). Možnost podobnosti molekul může pomoci vysvětlit souvislost viditelné hematurie s epizodami mukózní infekce v IgAN (Praga, 1985).

2.5 Tvorba imunitních komplexů

IgAN je považována za nemoc, při které jsou zadržovány imunitní komplexy v těle pacienta (Novak, 2008). Tyto imunitní komplexy vždy obsahují IgA1 buď jako dominantní nebo kodominantní protilátku a dále obsahují protilátky z jiných tříd. Změna ve složení sacharidových jednotek v pantové oblasti IgA1 vede ke změně konformace molekuly IgA1, která odkrývá nové epitopy v pantové oblasti, kvůli kterým jsou poté rozpoznávány jako antigenní částice (Suzuki, 2009a).

Aberantně galaktosylované molekuly IgA1 mají zvýšenou tendenci k vlastní agregaci (Hiki, 2004) a vytváření komplexů antigen-protilátka s protilátkami IgG zaměřenými proti epitopům pantových oblastí IgA1 (Tomana, 1999), díky čemuž se vytváří imunitní komplexy (Van Der Boog, 2005). Tvorba imunitních komplexů zobrazena na obrázku (Obr. 4).



Obr. 4 Molekula galaktosově deficientního IgA1 a tvorba imunitních komplexů v patogenezi IgAN. Pokud nenastane připojení Gal, utvoří se neoepitop, který následně napadají autoprotilátky IgG nebo IgA1 a dojde k vytvoření imunitního komplexu, který se ukládá v glomerulu. Upraveno podle Tanaka, 2011.

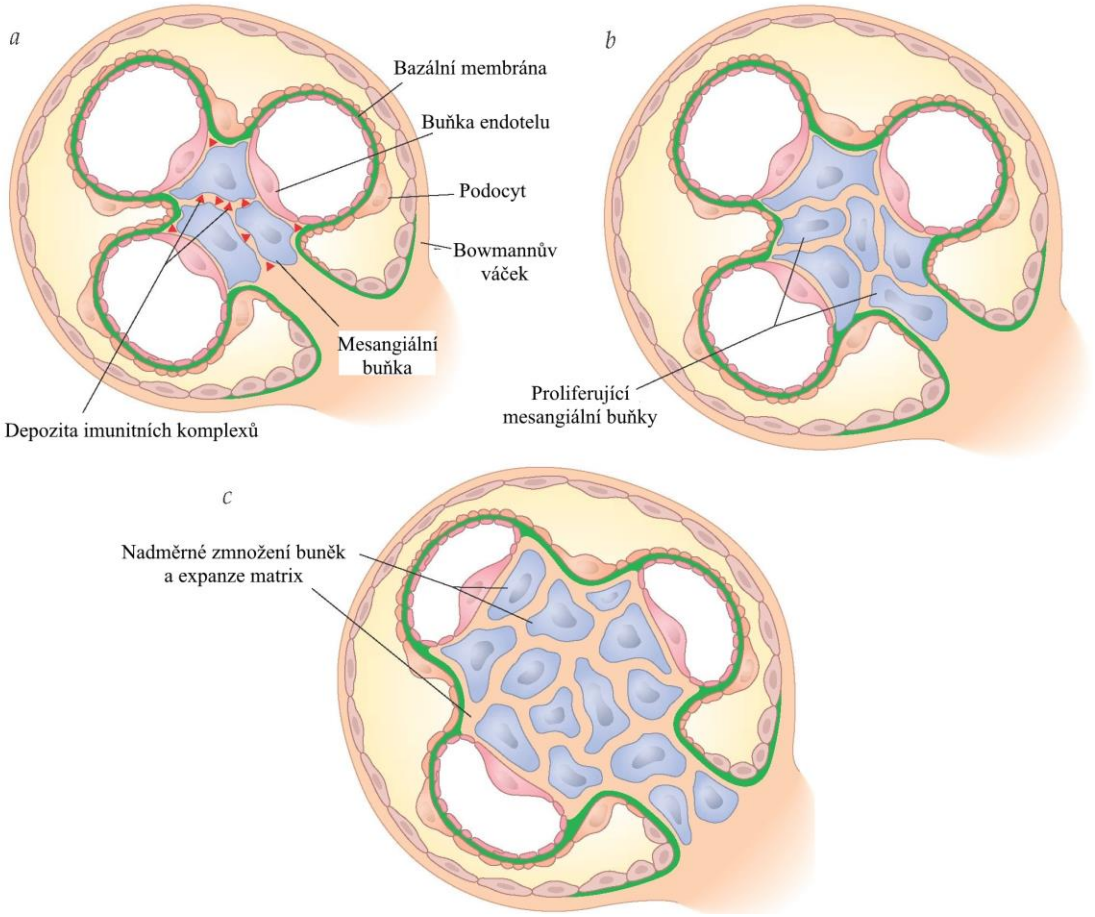
Spouštěč k vytváření autoprotilátek a následné tvorby imunitních komplexů u IgAN není znám, avšak v asociačních studiích genomu u sporadického IgA uvádějí, že oblast lidského leukocytového antigenu obsahuje alely, které predisponují k IgAN (Gharavi, 2011a). Tato asociace s lidským leukocytovým antigenem koreluje s tím, že pacienti preferenčně prezentují specifické autoantigeny, které zahajují tvorbu glykanově specifických protilátek. Dále bylo dokázáno, že IgAN souvisí se specifickým přechodem z proteasomu k expresi imunoproteosomu v mononukleárních buňkách periferální krve (Coppo, 2009). Tento fenotypový přechod na více katalytický proteasom naznačuje zvýšenou účinnost prezentace antigenu v IgAN. Za spouštěče této reakce je považována imunitní odpověď hostitele, pravděpodobně na virovou infekci, která spouští uvolňování interferonu γ (Boyd, 2012).

Dalším možným faktorem, který přispívá k formaci imunitních komplexů u IgAN je myeloidní Fc receptor pro IgA, CD89. Tento receptor je přítomen v myeloidních buňkách, buď vázaný na membránu, nebo v rozpustné formě (sCD89). *In vitro* byly popsány tři isoformy sCD89, avšak pouze dvě z nich byly objeveny *in vivo*. Obě tyto formy hrají roli v tvorbě imunitních komplexů při IgAN. Větší isoforma sCD89, s velikostí 50-70 kDa, byla nalezena pouze v sérech pacientů s IgAN. Předpokládá se, že při vazbě polymerního IgA na membránově vázaný CD89 dochází k uvolňování této větší isoformy, což vyúsťuje v tvorbu cirkulujících komplexů, které jsou náchylné k mesangiální depozici (Launay, 2000). Naopak menší rozpustná isoforma o velikosti 30 kDa je přítomna v sérech jak pacientů, tak zdravých subjektů. Vysoké hladiny IgA

v komplexu s touto menší isoformou se ukázaly jako ochrana proti rozvoji renálního onemocnění (Van der Boog, 2003).

2.5.1 Biologické aktivity imunitních komplexů

Biologická aktivita imunitních komplexů obsahujících gd-IgA1 byla zkoumána na kultivovaných lidských mesangiálních buňkách. Tento přístup dokázal, že cirkulující imunitní komplexy od pacientů s IgAN se na tyto buňky váží daleko efektivněji, než volné IgA1 nebo imunitní komplexy zdravých kontrol (Novak, 2002). Navíc frakcionace cirkulujících imunitních komplexů ze sér pacientů s IgAN spolu s modely mesangiálních buněk odhalily, že imunitní komplexy s molekulovou hmotností 800-900 kDa stimulují proliferaci buněk a produkci cytokinů a komponent extracelulární matrix. Skutečnost, že frakce zbavené IgA1 nemají takové stimulační aktivity, potvrzuje roli IgA1 v těchto imunitních komplexech. S tímto zjištěním je v souladu pozorování, že po doplnění sér pacientů s IgAN malým množstvím polymerních galaktosově deficientních IgA1 (gd-pIgA1), byly vytvořeny další imunitní komplexy. Naopak gd-pIgA1, které nebylo v imunitních komplexech, nebo imunitní komplexy hmotností 700-800 kDa nevyvolaly proliferaci kultivovaných lidských mesangiálních buněk, dokonce proliferaci inhibovaly (Novak, 2011a). Imunitní komplexy ze sér pacientů s IgAN, které byly odebrané během epizod makroskopické hematurie, stimulovaly buněčnou proliferaci mnohem více, než imunitní komplexy, které byly získané později, v klidové fázi nemoci. Imunitní komplexy, které obsahovaly vyšší hladiny sérového gd-IgA1, indukovaly proliferaci mesangiálních buněk v daleko větší míře, než imunitní komplexy s nižším obsahem gd-IgA1. Tato data podtrhují klíčovou roli imunitních komplexů obsahujících gd-IgA1 v aktivaci mesangiálních buněk, tedy význam antigenu (gd-IgA1) a protilátek (IgG, IgA1 specifické pro gd-IgA) při formaci těchto patogenních imunitních komplexů (Novak, 2005). Proliferující buňky jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 5)



Obr. 5 Vliv imunitních komplexů na mesangiální buňky glomerulů ledvin. **A.** glomerulus se třemi kapilárními smyčkami. Bazální membrána zobrazena zeleně, podocyty se nachází vně, zatímco endotelární buňky uvnitř smyček. Mesangiální buňky tvoří centrální nosnou strukturu. Dále jsou zde vyznačena depozita imunitních komplexů. **B.** začínající proliferace buněk. **C.** intenzivní proliferace mesangiálních buněk spolu s nadprodukcí extracelulárního matrix, která se vyskytuje u IgAN. Upraveno podle Luft, 2017.

Aktivované mesangiální buňky proliferují a nadprodukují extracelulární matrix, proteiny, cytokiny a chemokiny. Tyto procesy mohou způsobit expanzi glomerulárního mesangia, fibrózu a ztrátu funkce glomerulární filtrace. Dále se z mesangiálních buněk aktivovaných imunitními komplexy uvolňují humorální faktory jako je tumor nekrotizující faktor (TNF)-α a transformující růstový faktor (TGF)-β a mohou způsobit změnu glomerulární propustnosti. To může vysvětlovat výskyt proteinurie a tubulointersticiálního poškození u IgAN (Lai, 2008).

Receptory mesangiálních buněk, které se zapojují do vazby s imunitními komplexy, ještě nebyly plně charakterizovány, avšak existuje několik znaků ukazujících na konkrétní IgA receptor exprimovaný mesangiálními buňkami. Tento receptor se liší od klasických IgA receptorů (ASGP-R, pIgR, FcαR – CD89 a Fcα/μ receptor) (Novak, 2005). Transferinový receptor (CD71) může vázat pIgA1 a IgA1 obsahující imunitní

komplexy. Proliferující lidské mesangiální buňky vylučují tento receptor na povrchu (Moura, 2001). CD71 však nemusí být jediný receptor pro imunitní komplexy, ač se v současnosti předpokládá, že je hlavním receptorem. Studie, ve kterých byly používány myši exprimující lidský těžký řetězec IgA1 a lidský CD89 naznačují, že by komplexy IgA1-sCD89 mohly iniciovat autoamplifikační proces zahrnující nadměrnou expresi transferinového receptoru 1 (TFR1) a transglutaminasy 2 (TGasa2). Účast komplexů IgA1-sCD89 a účast TFR a TGasy2 může fungovat jako alternativní mechanismus aktivace mesangiálních buněk (Berthelot, 2012). Jsou zde však další možnosti, například že receptory z rodiny integrinů (integrin α1/β1 a integrin α2/β1) mohou také vázat molekuly IgA1 na mesangiálních buňkách (Kaneko, 2012).

Cirkulující imunitní komplexy obsahující IgA1 indukují změnu fosfotyrosinového vzorce buněčných proteinů. Signalizační kapacita dvou typů imunitních komplexů se však liší: velké stimulační komplexy přechodně zvyšují fosforylaci 37 kDa proteinu a snižují fosforylaci dalších dvou hlavních fosfoproteinů 60 kDa a 115 kDa, zatímco menší inhibiční komplexy zvyšují fosforylaci všech tří proteinů. Jelikož proteinové tyrosinkinasy se často účastní signalizace buněk po navázání ligandu na jeho receptor, byly tyto výsledky interpretovány jako dodatečný projev rozdílů v biologických vlastnostech mezi těmito dvěma typy imunitních komplexů obsahujících IgA1 (Lai, 2011; Novak, 2011b).

2.6 Strategie léčby IgA nefropatie

I přes všechny poznatky o patogenezi IgAN, není pořád vyvinuta léčba, která by zastavila produkci patogenních IgA imunitních komplexů, nebo zabránila jejich mesangiální depozici. Možnosti léčby jsou tudíž soustředěny na zachování případně zpomalení úbytku ledvinové funkce modulací nepříznivých imunitních a zánětlivých jevů v glomerulu a tubulointersticiu. Mnoho současných léčebných strategií je proto obecných a společných i pro jiné formy glomerulárních onemocnění. Jde např. o blokádu renin-angiotensin, léčbu azathiophrinem, cyklofosfamidem, snížení proteinurie a kontrolu krevního tlaku (Boyd, 2012).

2.6.1 Blokáda renin-angiotensin

Blokáda renin-angiotensinového systému inhibitorem angiotensin konvertujícího enzymu (ACEi) nebo blokátorem receptoru angiotensinu II (ARB) pro kontrolu hypertenze a snížení proteinurie je prospěšná při zpomalení progrese proteinurie u IgAN (Coppo, 2007). Přestože blokáda využívající obou těchto inhibitorů sníží proteinurii u IgAN, nemá dlouhodobější efekt při zachování renální činnosti (Russo, 2001). I přesto významná část pacientů nedosáhne snížení proteinurie na cílovou hranici <0,5-1 g/24 h navzdory maximálním dávkám ACEi nebo ARB, a proto jsou ve zvýšeném riziku progresivního chronického onemocnění ledvin (Coppo, 2010a).

2.6.2 Rybí olej

Role rybího oleje (mastná kyselina omega-3 eikospentanová a kyselina doxosahexanová) zůstává nejistá. Mezi navrhované příznivé protizánětlivé účinky patří snížení produkce eikosanoidů a cytokinů, změny ve fluiditě membrán a snížená agregovatelnost destiček (Grande, 1998). Rybí olej je široce předepisován u IgAN a jeho podávání se zdá být bezpečné, i když u mnohých je hlavním problémem tolerance kvůli „rybímu“ zápachu z úst a potu a gastrointestinálních vedlejších účinků včetně plynatosti. Jedna studie, kde bylo prováděno šestileté sledování této léčby ukázala, že léčba poskytla dlouhodobou ochranu renálních funkcí (Donadio, 1994). Avšak v další samostatné studii, kde byly skupinám pacientů podávány omega-3 mastné kyseliny, prednisolon nebo placebo, nebyly u skupiny přijímající rybí olej po dvou letech sledování pozorovány žádné příznivé účinky (Hogg, 2006). Další menší výzkumy také nedokázaly žádný přínos a metaanalýza naznačila, že dostupné důkazy nejsou dost přesvědčivé pro určení role rybího oleje u IgAN, což přičítá velké variabilitě délky pozorování zjištěné u samostatných studií (Strippoli, 2003).

2.6.3 Tonsilektomie

Zastánci tonsilektomie se domnívají, že mandle jsou významným zdrojem abnormálně galaktosylovaných O-glykoforem IgA1 u IgAN. Tonsilektomie snižuje četnost akutních epizod viditelné hematurie, kde je vyvolávajícím faktorem tonsilitida (Coppo, 2010b) a existují obhájci tonsilektomie jako léčby ke snížení progrese konečného stádia renálního onemocnění. Observační studie poskytly protichůdné údaje o tom, zda tonsilektomie zlepšuje dlouhodobé přežití ledvin, přičemž studie

z Japonska naznačují přínos (Hotta, 2001; Xie, 2003), zatímco evropské studie tvrdí opak (Piccoli, 2010). V nerandomizované studii o 55 pacientech při srovnání léčby tonsilektomií spolu s kortikosteroidy a monoterapií pouze kortikosteroidy došlo po 24 měsících ke snížení proteinurie a epizod viditelné hematurie u více pacientů ve skupině, která podstoupila i tonsilektomi, i když studie nebyla prováděna tak dlouho, aby byla schopna vyvodit závěry o dlouhodobých výsledcích (Komatsu, 2008). Metaanalýza o účinnosti tonsilektomie u IgAN vyvodila, že tonsilektomie sama o sobě nezlepší výsledek, avšak po jejím zkombinování se steroidovou terapií se ukazují ochranné účinky pro ledviny (Wang, 2011).

2.6.4 Kortikosteroidy

Přínos kortikosteroidové terapie oproti maximální podpůrné léčbě blokádou renin-angiotensin zůstává kontroverzní. Největší publikovaná studie z Itálie ukázala, že léčba kortikosteroidy snížila proteinurii a zabránila progresi ke konečnému stádiu ledvinového onemocnění v průběhu 10 let (Pozzi, 2004). Režim vysokých dávek kortikosteroidů – využívající „pulzující“ methylprednisolon (1 g denně po dobu 3 dnů při indukci a na začátku měsíců 2 a 4) a ostatní dny perorální příjem prednisolonu (0,5 mg/kg) po dobu 6 měsíců – je mnohými kliniky považován za možně toxický, přestože v této studii nebyla toxicita hlášena žádná. Blokáda renin-angiotensin byla použita pouze u malé části pacientů, ačkoliv byla rovnoměrně rozdělena mezi léčebná ramena (Boyd, 2012).

Dvě další studie se snažily porovnat léčbu kortikosteroidy spolu s blokádou renin-angiotensin a pouze léčbu blokádou renin-angiotensin u pacientů se zachovanou renální funkcí a poměrně vysokou proteinurií, nehledě na blokádu renin-angiotensin (Manno, 2009; Lv, 2009). V italské studii byla kombinace ACEi a 6měsíčního příjmu prednisolonu perorálně vyhodnocena jako výhodná při redukci počtu pacientů dosahujících koncového bodu zdvojnásobení kreatininu v séru nebo konečné fáze renálního onemocnění (Manno, 2009), zatímco u čínské studie byl podíl pacientů, kteří dosáhli primárního konečného stádia – 50% zvýšení sérového kreatininu, byl snížen z 24 % na 3 % ve skupině léčené kombinací ACEi a kortikosteroidy (Lv, 2009). Obě studie však byly kritizovány, jelikož ACEi i ARB by musely být zastaveny před oběma pokusy a během pokusů nebyla blokáda renin-angiotensin maximalizována před zahájením imunosuprese, a proto pacienti, kteří do těchto studií vstoupili, mohli kladně

reagovat na samotnou léčbu ACEi/ARB (Eitner, 2010). Metaanalýza terapie steroidy, která zahrnovala tyto dvě studie, potvrdila, že tato terapie byla spojována s poklesem proteinurie a statisticky významnou redukcí rizika konečného stádia renálního onemocnění (Zhou, 2011).

Česká studie z roku 2018 potvrdila snížení proteinurie po prednisonové terapii. Také bylo dosaženo signifikantní redukce hladiny jak normálně, tak i galaktosově deficientního IgA (Kosztyu, 2018).

2.7 Kauzální terapie

V současnosti jsou studovány možnosti léčby, která bude zaměřena na původ nemoci, ne pouze na její příznaky. Tato léčba by se mohla rozvíjet více různými směry, v závislosti na tom, kterou z příčin onemocnění by mohla ovlivňovat (Novak, 2015). Byly navrženy přístupy k omezení produkce gd-IgA1, zabránění tvorby patogenních imunitních komplexů a k omezení proliferace mesangiálních buněk (Mestecky, 2016).

2.7.1 Inhibice tvorby gd-IgA1

Nejlepší způsob léčby IgAN by mohla být selektivní eliminace buněk, které gd-IgA1 produkují. Jelikož se tyto buňky vyskytují minoritně, je zde tedy pouze malé riziko, že by byl vytvořen imunodeficit. Nejprve je však potřeba znát původ a specifické povrchové fenotypové znaky buněk, které gd-IgA1 produkují. Jelikož tyto znalosti ještě nejsou k dispozici, nelze s touto terapií zatím počítat (Raška, 2016).

O čem ale existuje relativně velké množství informací, je proces intracelulární tvorby gd-IgA1, funkce a regulace enzymů glykosyltransferas, které připojují jednotlivé cukry k molekule imunoglobulinu, které přispívají ke vzniku IgAN. Je tedy možné najít způsob, který by ovlivňoval přímo tvorbu gd-IgA1 (Reily, 2014). Ke špatné funkci glykosyltransferas také přispívají k cytokiny IL-6 a IL-4 (Suzuki, 2014). V budoucnu by se tedy mohla vyskytnout terapie zaměřená na modulaci těchto cytokinů a regulaci exprese glykosyltransferas (Raška, 2016).

2.7.2 Ovlivnění tvorby imunitních komplexů

V patogenezi IgAN hrají roli cirkulující imunitní komplexy, které mají velikost 800-900 kDa, jelikož aktivují mesangiální buňky. Menší komplexy tyto buňky naopak inhibují (Novak, 2005). Další z možností kauzální terapie je tedy změna velikosti

těchto imunitních komplexů, která může nastat už při narušení poměru antigenu a autoprotilátky (Raška, 2016).

Toho může být dosáhnuto dvěma různými přístupy. Zaprvé by se mohly pomocí technologie rekombinantní DNA připravit kratší glykopeptidy obsahující cukernou složku analogickou struktuře pantové oblasti gd-IgA1, který se vyskytuje u daného pacienta (Suzuki, 2008). Tyto peptidy se poté budou kompetitivně vázat s autoprotilátkami. Druhý pohled je zaměřen na samotné autoprotilátky. Je možné opět pomocí technologie rekombinantní DNA vytvořit jejich monovalentní analog, který se bude vázat na gd-IgA1. Pro tuto variantu se může používat Fab fragment, který obsahuje lehký řetězec a polovinu těžkého, případně scFv fragment, který obsahuje pouze variabilní domény obou řetězců a jejich propojení. Pro přípravu monovalentních protilátek může být použita i imunizace zvířat, které vytváří protilátky bez lehkých řetězců s vysokou afinitou. Těmito zvířaty jsou například velbloud nebo lama (Raška, 2016).

2.7.3 Inhibice aktivace mesangiálních buněk

Při ukládání imunitních komplexů dochází k aktivaci mesangiálních buněk, které začnou proliferovat, produkovat větší množství extracelulární matrix a tvořit protizánětlivé cytokiny (Suzuki, 2011). Tvorba cytokinů je způsobena fosforylační dráhou MAPK/ERK, jejíž spuštění vyvolají právě imunitní komplexy. Pokud by se využily inhibitory proteinkinas, které jsou zapojeny do této dráhy, mohly by být signifikantně omezeny zánětlivé a proliferační reakce (Tamouza, 2012).

Jeden z enzymů, který se zapojuje do signalizace zprostředkované imunoreceptory, je SYK (spleen tyrosine kinase), a je doložena její role v patogenezi IgAN (Kim, 2012). Použití inhibitoru tohoto enzymu, R406, vedlo k potlačení mesangiální proliferace a tvorby cytokinů, které indukovaly zánětlivou reakci u IgAN pacientů. Je tedy možné vést léčbu IgAN i tímto směrem (Kim, 2012).

2.7.4 Štěpení IgA1 v mesangiálních depozitech

Další přístup poukazuje na štěpení již vytvořených depozit. Toho lze dosáhnout pomocí bakteriálních proteas, které štěpí IgA1 díky jeho rozsáhlé pantové oblasti. Tento přístup byl experimentálně vyzkoušen u myšího modelu IgAN, kdy se po intravenózní injekci bakteriálních proteas imunitní komplexy v depozitech

zredukovaly, také došlo ke snížení proteinurie a tvorby zánětlivých cytokinů (Lechner, 2016).

Tento přístup však má i svá úskalí. Jelikož bakteriální proteasy štěpí veškeré IgA1, než by se dostaly k mesangiálním depozitům, rozštěpily by i velké množství systémového IgA1, což by mělo velmi špatné systémové dopady (Raška, 2016). Také by se mohly vytvořit protilátky, které by způsobily neutralizaci proteas v další dávce podávaného léku (Eitner, 2008).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

- Akrylamid/bisakrylamid (Serva, Německo)
- Avidin konjugovaný HRP (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrofosforečnan sodný dihydrát (Lach-Ner, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- Glycin (Lach-Ner, ČR)
- Glycobuffer 1 (NEB, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (NEB, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid sodný (mikroCHEM, ČR)
- Isopropanol (Lach-Ner, ČR)
- Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kyselina chlorovodíková 36% (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina sírová 95% (VWR Chemicals BDH®, USA)
- Ledová kyselina octová 99,8% (Lach-Ner, ČR)
- Lektin Helix pomatia konjugovaný s biotinem (Sigma Aldrich, USA)
- Methanol (Sigma A, USA)
- N.N.N´,N´-Tetramethylethylendiamin – TEMED (Serva, Německo)
- N-butanol (Lach-Ner, ČR)
- Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Peroxid vodíku (Sigma Aldrich, USA)
- Persíran amonný (MERCK, Německo)
- Prozyme (Agilent) pufr (Agilent, USA)
- SDS Pellets (Carl Roth, Německo)
- Sialidasa A (Agilent, USA)
- Streptavidin konjugovaný HRP (Pierce, USA)

- TRIS (Amreco, Polsko)
- Tween-20 (Calbiochem, Německo)
- β-1,3-galaktosidasa (NEB, USA)
- β-merkaptoethanol (Calbiochem, Německo)

3.1.2 Protilátky

- AffiniPure F(ab')$_2$ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific (Jackson Immunoresearch, USA)
- Anti-Human IgG (γ-chain specific)−Peroxidase antibody produced in goat (MERCK, Německo)
- Peroxidase AffiniPure F(ab')$_2$ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific (Jackson Immunoresearch, USA)

3.1.3 Pufry a roztoky

3.1.3.1 SDS-PAGE

30% A/B	300 g akrylamid, 8 g bisakrylamid, do 1 l doplnit ddH_2O
4x Tris HCl pufr (pH 6,8)	15,125 g TRIS, 1 g SDS, doplnit do 250 ml ddH_2O
4x TrisHCl pufr (pH 8,8)	45,5 g TRIS, 1 g SDS, doplnit do 250 ml ddH_2O
10% APS	10% vodný roztok persíranu amonného
Dělicí gel	2,5 ml 30% A/B, 3,75 ml 4x Tris pufr (pH = 8,8), 8,75 ml dd H_2O, 75 µl 10% H_2O roztok persíranu amonného, 15 µl TEMED
Zaostřovací gel	1,3 ml 30% A/B, 2,5 ml 4x Tris pufr (pH = 6,8), 6,2 ml dd H_2O, 50 µl 10% H_2O roztok persíranu amonného, 10 µl TEMED
SDS elektrodový pufr	25 mM Tris, 190 mM glycin, 3 mM SDS, ddH_2O
2x SDS nanášecí pufr, redukční	125 M Tris, pH 6,8, 15,9% glycerol, 160 mM SDS, 10% merkaptoethanol, 0,01% bromfenolová modř
2x SDS nanášecí pufr, neredukční	125 M Tris, pH 6,8, 15,9% glycerol, 160 mM SDS, 0,01% bromfenolová modř
Fixační pufr	25% isopropanol, 10% ledová kyselina octová, ddH_2O

3.1.3.2 Western blot

Towbinův transfer pufr	75 mM Tris, 0,58 mM glycin, 60% methanol, ddH_2O
Superblokovací pufr	1% BSA, 0,05% Tween, 1xPBS
10 x PBS, pH = 7,5	240 g NaCl, 6 g KCl, 40,08 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 6 g KH_2PO_4, doplnit na objem 3 l ddH_2O
PBS/T	1xPBS, 0,05% Tween

3.1.3.3 ELISA

Blokovací pufr	1% BSA, 0,05% Tween, 1x PBS
OPD pufr	50 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$, 25 mM kyselina citronová, ddH_2O, pH 5

3.1.4 Přístrojové vybavení

- Automatické pipety 1-5 ml, 20-200 µl, 1-10 µl, 0,2-1 µl (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Blotovací jednotka TRANS-6 SEMIDRY TRANSFER CELL (Bio-Rad, USA)
- Detekční zařízení pro Western Blot Syngene G:BOX ChemiXX9 (Trigon-Plus, ČR)
- Elektrický zdroj pro blotovací zařízení 2197 POWER SUPPLY (LKB Bromma, Švédsko)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPac Universal (Bio-Rad, Německo)
- Elektroforetická komora a víko s elektrodami (Bio-Rad, Německo)
- ELISA reader spektrofotometr (Labsystems)
- Laboratorní váhy 440-33N (KERN, Německo)
- Mikrocentrifuga E-Centrifuge (Wealtek, USA)
- Multikanálová pipeta (Thermo Fisher Scientific, USA)
- pH metr Jenway 3310 (Cole Parmer, USA)
- Promývačka ELISA desek, ELx405 Microplate Washer (Biotek, USA)
- PVDF membrána (Bio-Rad, USA)
- Termoblok – block heater SBH130D STUART (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Třepačka (Edmund Bühler GmbH, Německo)

3.1.5 Spotřební materiál

- 1,5 ml mikrozkumavky (Eppendorftubes ®, Německo)
- 15 ml propylenové zkumavky (TPP, Švýcarsko)
- 50 ml propylenové zkumavky (SPL Life Sciences co., Ltd., Korea)
- ELISA Maxisorp 96 jamkové desky (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Pipetovací špičky
    - 1 ml (Neptune Scientific, USA)
    - 10 µl (AHN/iBioTech, ČR)
    - 200 µl (Alpha Laboratories ltd., Velká Británie)

3.1.6 Biologický materiál

- Polymerní myelomové IgA1 (laskavě poskytnuto prof. Městeckým, Ústav mikrobiologie, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA)
- Séra pacientů s IgAN (Ústav imunologie LF UP)

3.2 Metody

3.2.1 Vzorky sér pacientů s IgAN

Vzorky krve pacientů s IgAN byly získány z Oddělení nefrologie III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Pacientům byla odebrána srážlivá krev. Krev byla nechána se 30 minut srážet při pokojové teplotě a následně byla na Ústavu imunologie LF UP zpracována. Krev byla centrifugována 10 minut při 3000 g. Oddělené sérum bylo rozpipetováno po 1 ml do mikrozkumavek a zamrazeno při -80 °C do dalšího použití.

Všichni pacienti před odběrem krve podepsali informovaný souhlas. Studie, jejíž součástí byla i tato bakalářská práce, byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

3.2.2 Tvorba degalaktosylovaného IgA1

K tvorbě degalaktosylovaného IgA1 bylo použito polymerní myelomové IgA1 purifikované ze séra pacienta s mnohočetným myelomem (Gou). (Moore, 2007; Yanagihara, 2012)

Ve dvou různých dodaných pufrech bylo vytvořeno degalaktosylované IgA1. Použity byly pufry Prozyme a Glycobuffer. Byly vytvořeny 4 vzorky po 10 µl. Dva vzorky tvořila kontrola, kdy se k pufru přidalo pouze IgA1, dd H_2O a BSA. Pro vytvoření degalaktosylovaného IgA byly následně použity dva enzymy, β-1,3-D galaktosidasa (3.2.1.23, Beta-gal) a Sialidasa A (3.2.1.18, Neu1), dle tabulky (Tab. 1). Vzorky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

Tab. 1: degalaktosylace IgA1 ve dvou různých pufrech

		Prozyme pufr		Glycobuffer	
		Kontrola 1	Vzorek 1	Kontrola 2	Vzorek 2
IgA1	[µl]	1,5	1,5	1,5	1,5
dd H_2O	[µl]	5,5	3,5	6,5	4,5
BSA	[µl]	1	1	1	1
Pufr	[µl]	2	2	1	1
β-1,3D-galaktosidasa	[µl]	-	1	-	1
Sialidasa A	[µl]	-	1	-	1

3.2.3 Detekce gd IgA1 metodou ELISA

Detekce degalaktosylovaného IgA byla provedena metodou ELISA v sandwichovém uspořádání. ELISA desky byly coatovány kozí protilátkou proti lidskému sérovému IgA1 (AffiniPure F(ab')$_2$ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific). Protilátka byla naředěna v PBS obsahující 0,05% azid sodný na výslednou koncentraci 2 µg/ml a 100 µl bylo napipetováno do každé jamky. Desky byly inkubovány přes noc při 4°C.

Druhý den byly desky vytemperovány na laboratorní teplotu a 5x promyty 300 µl PBS. Do každé jamky bylo napipetováno 300 µl blokovacího pufru a desky byly inkubovány 3 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly desky opět 5x promyty PBS. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl blokovacího pufru. Následně byly vzorky naředěny tak, aby jejich výsledné množství IgA1 na jamku bylo 100 ng. Všechny vzorky byly pipetovány v dubletu do první řady jamek a následně byly ředěny tak, že po propipetování bylo přeneseno 100 µl do následujících jamek, které byly opět propipetovány. Takto bylo pokračováno až do poslední řady jamek, ze kterých bylo posledních 100 µl odpipetováno do odpadu. Poté byly desky inkubovány přes noc při 4°C.

Třetí den byly desky vytemperovány na laboratorní teplotu a promyty 3krát 300 µl PBS/T a 5krát 300 µl PBS. Na první desku bylo přidáno 100 µl lektinu helix pomatia konjugovaného s biotinem, ředěno 1:3000, do všech jamek a deska byla inkubována při 37 °C 2,5 h. Tento lektin se specificky váže na GalNAc u desialyzovaného a degalaktosylovaného IgA1 (Tomana, 1997). Poté byla deska promyta 3x PBS/T, 5x PBS. Pro detekci byl využit avidin konjugovaný HRP, ředěný 1:20000, 100 µl do všech jamek desky. Následovala inkubace hodinu při 37 °C.

Do všech jamek druhé desky bylo napipetováno 100 µl protilátky 35A12 a tato deska byla inkubována při pokojové teplotě 2,5 h. Tato myší monoklonální protilátka má schopnost se vázat na GalNAc u degalaktosylovaného a desialyzovaného IgA1 a je používána pro neinvazivní screening u IgAN (Hiki, 2015). Po promytí 3x PBS/T a 5x PBS následovalo přidání protilátek značených křenovou peroxidasou. Na desku bylo napipetováno 100 µl anti-mouse protilátky ředěné 1:2000 a deska byla inkubována hodinu při pokojové teplotě. Všechna ředění byla prováděna v blokovacím pufru.

Po inkubaci byly obě desky promyty 3x PBS/T, 5x PBS a do všech jamek bylo napipetováno 100 µl OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H_2O_2 (10 µl na 10 ml OPD pufru). Po vyvinutí signálu byla reakce zastavena přidáním 100 µl 1 M H_2SO_4 a absorbance byla kvantifikována pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

3.2.4 SDS-PAGE

Pro kontrolu degalaktosylace IgA byla použita ještě metoda SDS-PAGE. Nejprve byl vytvořen separační gel podle tabulky (Tab. 2). Ihned poté, aby nedošlo ke ztuhnutí gelu, byl napipetován mezi formovací skla, které umožňovaly tloušťku gelu 0,75 mm. Poté byla hladina gelu převrstvena n-isobutanolem, aby došlo k odstranění bublin. Gel byl nechán polymerovat a po 20 minutách byl isobutanol slit a již tuhý gel byl omyt vodou a vysušen. Následně byl na tento gel napipetován zaostřovací gel podle tabulky (Tab. 3) a mezi skla byl vložen 15jamkový hřebínek. Po dalších 20 minutách byl gel vložen do aparatury pro elektroforézu a zalit elektrodovým SDS pufrem.

Tab. 2: Složení 10% separačního gelu (objemy pro 4 gely)

	10% separační gel
dd H_2O	6,25 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	5 ml
4x TrisHCl pufr pH 6,8	3,75 ml
10% APS	75 µl
TEMED	15 µl

Tab. 3 Složení 4% zaostřovacího gelu (objemy pro 4 gely)

	4% zaostřovací gel
dd H_2O	6,2 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	1,3 ml
4x TrisHCl pufr pH 8,8	2,5 ml
10% APS	50 µl
TEMED	10 µl

Vzorky byly připraveny smícháním 1 µl vzorku (1 µg IgA1) s 10 µl redukčního nebo neredukčního nanášecího SDS pufru. Poté byly vloženy do termostatu, kde byly ponechány 5 minut při teplotě 95 °C. Následně bylo na gel naneseno 5 µl takto připraveného vzorku. Vedle vzorků IgA bylo do první jamky napipetováno 5 µl komerčního proteinového standardu. Aparatura byla připojena ke zdroji konstantního napětí 120 V po dobu jedné hodiny.

3.2.5 Semi dry-western blot

Pro zobrazení degalaktosylovaného IgA byla zvolena detekce metodou western blot.

Nejprve byla aktivována PVDF membrána ponořením do methanolu na 5 minut. Následně byla promyta destilovanou vodou a ponořena do Towbinova transfer pufru spolu s filtračními papíry. Do blotovacího zařízení byl nejprve položen filtrační papír, poté PVDF membrána, gel, a nakonec poslední filtrační papír. Transfer probíhal hodinu při konstantním proudu 100 mA. Následně byla membrána přenesena do 20 ml blokovacího pufru s 0,05% Tweenem a blokována po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Degalaktosylované a kontrolní IgA bylo detekováno inkubací membrány s lektinem Helix pomatia konjugovaného s biotinem. Lektin byl naředěn 1:300 v blokovacím pufru a inkubován s membránou přes noc při 4°C.

Následující den byla membrána promyta PBS 15 minut 4x a navázaný lektin byl detekován přidáním streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidasou, ředěného 1:10000 v blokovacím pufru. Po hodině byla membrána opět promyta PBS 15 minut 4x. Detekce navázaného streptavidinu byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu SuperSignal West Pico. Světelný signál byl detekován detekčním zařízením.

3.2.6 *De novo* tvorba imunitních komplexů v sérech pacientů

Pro *de novo* tvorbu imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN bylo použito vytvořené degalaktosylované polymerní myelomové IgA. Vzorky byly připraveny podle tabulky (Tab. 4) a následně inkubovány přes noc při 4°C.

Tab. 4 Přidání degalaktosylovaného IgA1 k séru pacienta s IgAN pro *de novo* tvorbu imunitních komplexů

Sérum samotné		Tvorba imunitních komplexů	
Sérum	PBS	Sérum	gd-IgA
20 µl	3 µl	20 µl	3 µl

3.2.7 Detekce imunitních komplexů metodou ELISA

Detekce *de novo* vytvořených imunitních komplexů byla provedena metodou ELISA v sandwichovém uspořádání. ELISA desky byly coatovány protilátkou proti lidskému sérovému IgG v PBS s azidem sodným. Protilátka byla ředěna tak, aby její koncentrace v pufru činila 2 µg/ml. Poté byla naředěná protilátka napipetována do jamek, 100 µl na jamku a desky inkubovány přes noc při 4 °C.

Druhý den byly desky 5x promyty 300 µl PBS a blokovány s 275 µl blokovacího pufru 3 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly desky opět 5x promyty PBS. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl blokovacího pufru. Následně byly kontrola i sérum, ve kterém bylo přidané degalaktosylované IgA, naředěny 1:20 do blokovacího pufru. 100 µl všech vzorků bylo pipetováno v dubletu do první řady jamek a následně byly ředěny tak, že po propipetování bylo přeneseno 100 µl do následujících jamek, které byly opět propipetovány. Bylo provedeny čtyři řady ředění. Poté byly desky inkubovány přes noc při 4°C.

Třetí den byly desky vytemperovány na laboratorní teplotu a promyty 3krát 300 µl PBS/T a 5krát 300 µl PBS. Následně bylo přidáno 100 µl na jamku protilátky proti lidskému IgA značené křenovou peroxidasou ředěné v blokovacím pufru 1:10000 a desky byly inkubovány při pokojové teplotě 3 hodiny.

Po inkubaci byly desky promyty 3x PBS/T, 5x PBS a do všech jamek bylo napipetováno 100 µl OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H_2O_2 (10 ul na 10 ml OPD pufru). Po vyvinutí signálu byla reakce ukončena přidáním 100 µl 1 M H_2SO_4 a absorbance byla kvantifikována ELISA readerem při vlnové délce 490 nm.

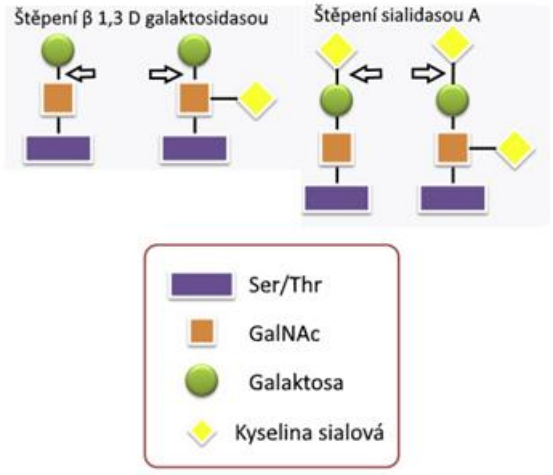
3.3 Statistická analýza

Prezentovaná data *de novo* tvorby imunitních komplexů představují průměrnou hodnotu ze dvou měření se standardní odchylkou. Rozdíly mezi séry s degalaktosylovaným IgA a bez jeho použití byly vyhodnoceny pomocí Studentova *t*-testu. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

4 VÝSLEDKY

4.1 Degalaktosylace IgA1

Pro *de novo* tvorbu imunitních komplexů bylo nejprve potřeba vytvořit galaktosově deficientní IgA1, které bude dále aplikováno do sér pacientů s IgAN. Vytvoření této protilátky bylo docíleno degalaktosylací lidského polymerního myelomového IgA1. K degalaktosylaci bylo použito dvou enzymů, které působí v pantové oblasti lidského IgA1, β-1,3-D galaktosidasy a Sialidasy A. Oba tyto enzymy jsou exoglykosidasy, což znamená, že působí na konci glykanového řetězce. Aby mohla být odstraněna galaktosa, musela být tedy nejprve odstraněna kyselina sialová, která se nachází v glykanovém řetězci v pantové oblasti IgA1 za galaktosou. Toho bylo docíleno použitím Sialidasy A. Znázorněno na obrázku (Obr. 7).



Obr. 6 Štěpení cukrů glykosylovaného IgA1 enzymy β-1,3-D galaktosidasy a sialidasy A. Znázorněno vytváření degalaktosylovaného IgA1 pomocí enzymů β-1,3-D galaktosidasy a sialidasy A. β-1,3-D galaktosidasa štěpí vazbu mezi GalNAc a Gal, sialidasa A štěpí vazbu mezi kyselinou sialovou a Gal. Upraveno podle Han, 2016.

Degalaktosylace byla prováděna ve dvou různých poskytnutých pufrech, Prozyme a Glycobuffer, aby se zjistilo, zda složení pufrů bude nějak ovlivňovat činnost daných enzymů. Následně byla provedena detekce metodami western blot (Obr. 8) a ELISA (Obr. 9 a 10).

4.1.1 Detekce metodou western blot

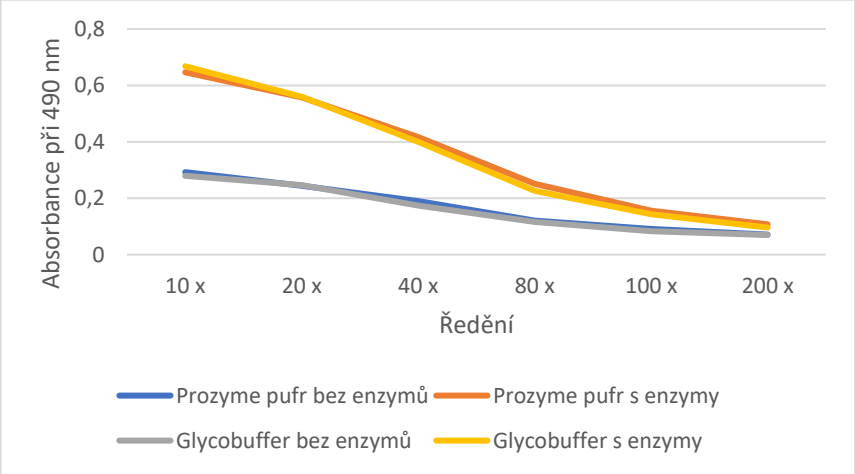
Detekce degalaktosylovaného IgA byla provedena metodou western blot pomocí lektinu Helix pomatia. Tento lektin rozpoznává GalNAc v pantové oblasti IgA1 po té, co je odstraněna kyselina sialová a galaktosa. Po vyhodnocení této detekce došlo k nárůstu signálu u obou degalaktosylovaných IgA1 (Obr. 8).

Obr. 7 Detekce degalaktosylovaného IgA1 metodou Western blot za neredukčních podmínek lektinem Helix pomatia konjugovaným biotinem. Navázaný lektin byl detekován avidinem konjugovaným HRP.

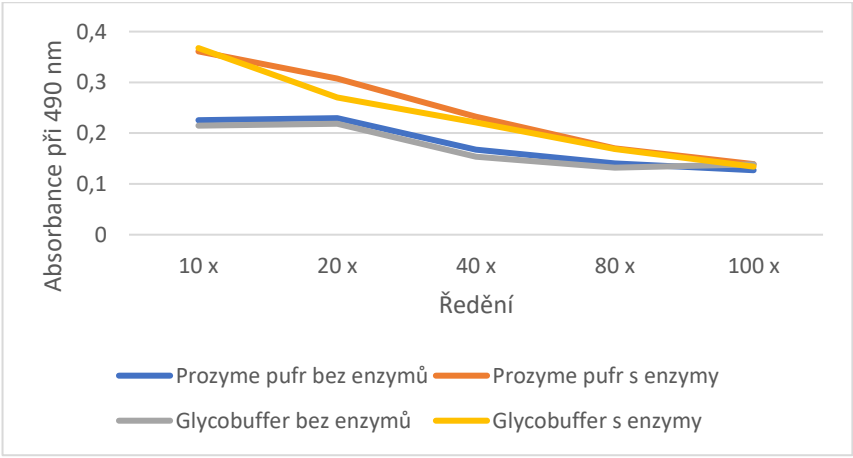
4.1.2 Detekce metodou ELISA

Efektivita degalaktosylace v obou pufrech byla ověřena také metodou ELISA. Pro detekci byly vybrány lektin Helix pomatia (Obr. 10), který se váže do pantové oblasti degalaktosylovaného a desialyzovaného IgA1, kde rozpoznává nově odkrytý GalNAc (Tomana, 1997), a protilátka proti lidskému galaktosově deficientnímu IgA1, 35A12 (Hiki, 2015) (Obr. 11).

Po degalaktosylaci došlo k větší vazbě jak na lektin Helix pomatia, tak na protilátku 35A12, což se projevilo větší absorbancí. Detekce tudíž ukázala, že pro budoucí degalaktosylaci IgA1 je možno použít jakéhokoliv z otestovaných pufrů a aktivita enzymů použitých pro výzkum nebude ovlivněna, protože absorbance při daném ředění je téměř stejná.



Obr. 8 Analýza tvorby degalaktosylovaného IgA1 (pomocí enzymů β-1,3-D galaktosidasy a Sialidasy A) metodou ELISA lektinem Helix pomatia konjugovaným biotinem. Navázaný helix pomatia byl detekován avidinem konjugovaným HRP.

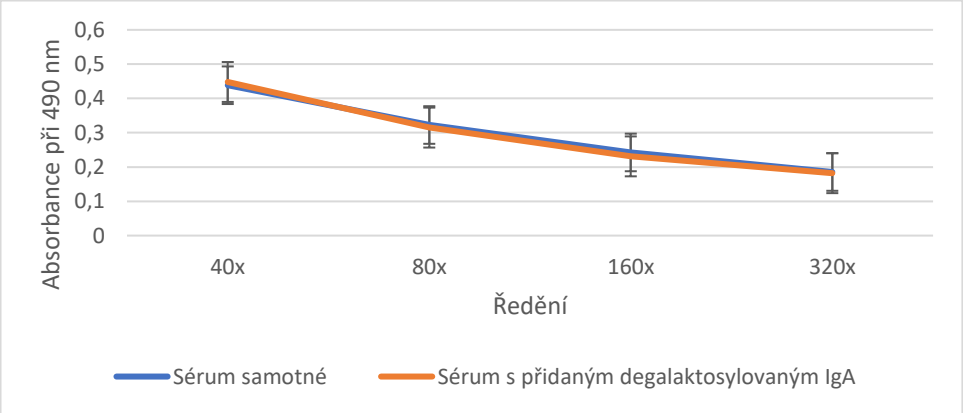


Obr. 9 Analýza tvorby degalaktosylovaného IgA1 (pomocí enzymů β-1,3-D galaktosidasy a Sialidasy A) metodou ELISA, myší protilátkou proti lidskému galaktosově deficientnímu IgA1. Tato navázaná protilátka byla detekována sekundární anti-myší protilátkou konjugovanou HRP.

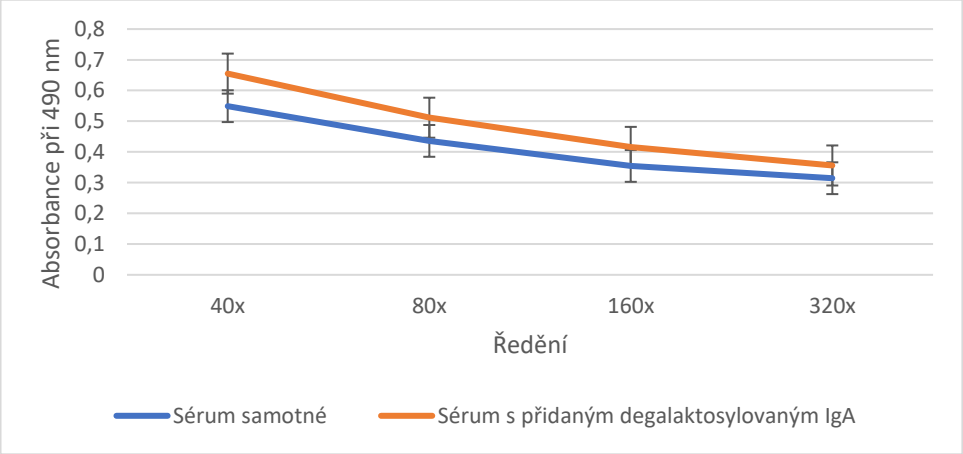
4.2 *De novo* tvorba imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN

Pro *de novo* tvorbu imunitních komplexů bylo použito vytvořené degalaktosylované IgA1. Vybrána séra pacientů s IgAN byla inkubována s 1 µg degalaktosylovaného IgA1. Vzniklé imunitní komplexy byly detekovány metodou ELISA.

Tvorba imunitních komplexů v sérech po inkubaci s degalaktosylovaným IgA se mezi jednotlivými pacienty značně lišila. Na obrázcích 12 a 13 jsou ukázány výsledky dvou vybraných pacientských sér, u kterých k de novo tvorbě imunitních komplexů nedocházelo (Obr.12) a kde byla de novo tvorba imunitních komplexů detekovatelná (Obr. 13).



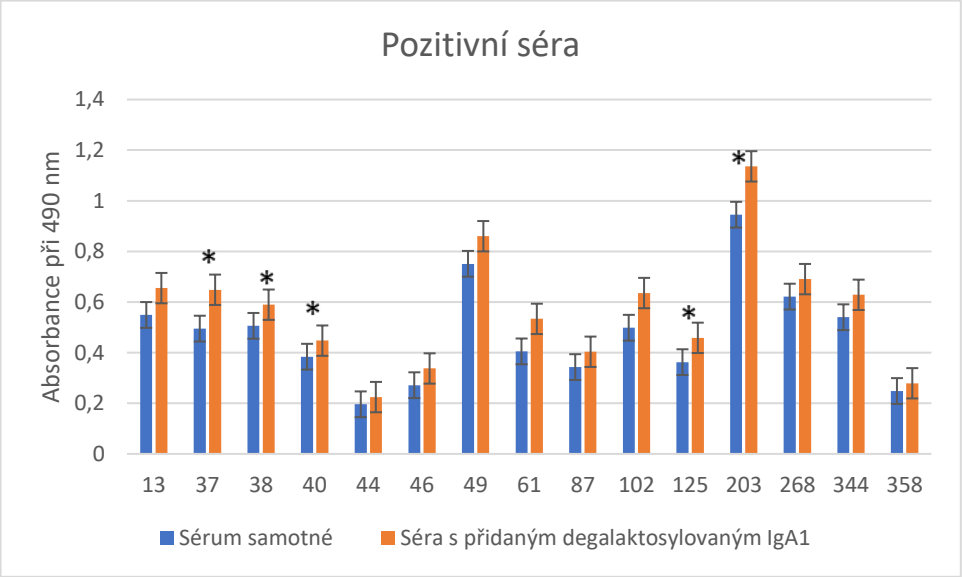
Obr. 10 Analýza tvorby imunitních komplexů metodou ELISA. Serum inkubováno s 1 µg gd-IgA a inkubováno přes noc při 4 °C. ELISA deska coatována anti-IgG, detekce navázaných imunitních komplexů anti-IgA-HRP. Sérum bez *de novo* tvorby imunitních komplexů.



Obr. 11 Analýza tvorby imunitních komplexů metodou ELISA. Sérum inkubováno s 1 µg gd-IgA a inkubováno přes noc při 4 °C. ELISA deska coatována anti-IgG, detekce navázaných imunitních komplexů anti-IgA-Hrp. Sérum s *de novo* tvorbou imunitních komplexů.

Cílem této práce bylo najít séra, ve kterých se imunitní komplexy tvoří ve větší míře, aby mohly být použity k dalšímu výzkumu. Do vybraných sér bylo přidáno degalaktosylované IgA1 a poté byla detekována tvorba imunitních komplexů metodou ELISA. Následně byla z těchto sér vybrána séra, která vykazovala zvýšenou tvorbu imunitních komplexů (Obr. 14).

Nárůst sér byl pozorován o 11 – 32 %, přičemž průměrný nárůst činil 20 %. Bylo otestováno celkem 40 sér. Z těchto sér byl u 15 pozorován nárůst, který je znázorněn v tabulce (Tab. 5). U zbylých 25 sér se hladina imunitních komplexů nezvýšila. Procento sér, ve kterých bylo potvrzeno zvýšení množství imunitních komplexů je ukázáno v tabulce (Tab. 6). Tato séra byla vybrána k dalšímu výzkumu.



Obr. 12 Analýza tvorby imunitních komplexů metodou ELISA. Sérům inkubováno s 1 µg degalaktosylovaného IgA1 přes noc při 4 °C. ELISA deska coatována anti-lidským IgG, detekce navázaných imunitních komplexů anti-IgA-HRP. Výsledky jsou prezentovány jako absorbance při určitém ředení séra. Zobrazeny jsou výsledky sér, u nichž byla detekovatelná tvorba imunitních komplexů po přidání degal. IgA. * značí signifikantní rozdíl v hladině imunitních komplexů v séru bez a s přidáním degalaktosylovaného IgA. $p<0,05$.

Tab. 5 Procentuální nárůst imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN po přidání degalaktosylovaného IgA1

Číslo zkoumaného séra	Nárůst imunitních komplexů
13	19 %
37	31 %
38	17 %
40	17 %
44	15 %
46	24 %
49	15 %
61	32 %
87	18 %
102	27 %
125	26 %
203	20 %
268	11 %
344	16 %
358	12 %

Tab. 6 Procentuální zastoupení sér, u kterých byl pozorován nárůst množství imunitních komplexů po přidání degal.IgA, a procentuální zastoupení sér, u kterých přidání degal.IgA nevedlo k tvorbě imunitních komplexů.

Sér celkem otestováno	Nárůst tvorby IK	Bez nárůstu tvorby IK
40 (100 %)	15 (37,5 %)	25 (62,5 %)

5 DISKUZE

IgA nefropatie je nemoc charakteristická tvorbou cirkulujících imunitních komplexů v séru pacientů, které se poté ukládají v mesangiálních depozitech (D'Amico, 2000a). Imunitní komplexy jsou tvořeny z galaktosově deficientního IgA1 a IgG, které toto gd-IgA1 rozpoznává jako antigen (Suzuki, 2009a). Není však úplně jasná původní příčina; zda dochází ke změnám buňky např. působením viru, které pak začnou produkovat gd-IgA1, nebo je spouštěčem exogenní antigen, proti kterému se v těle vytvoří IgG, které poté napadnou aberantně galaktosylované IgA1, jenž se však v lidském těle již vyskytovalo před výskytem exogenního antigenu (Boyd, 2012). V různých stádiích tohoto onemocnění může být tvorba imunitních komplexů různá. Zdá se ovšem, že horší klinický stav je spojen s vyšší hladinou gd-IgA1 a autoprotilátek IgG, které právě imunitní komplexy tvoří (Berthoux, 2013)

Bakalářská práce byla zaměřena na *de novo* tvorbu imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN po přidání degalaktosylovaného polymerního IgA1. Bylo zjištěno, že po přidání stejného množství degalaktosylovaného IgA1 k náhodně vybraným sérům nedošlo vždy k *de novo* tvorbě imunitních komplexů, což by naznačovalo, že přítomnost autoprotilátky IgG rozpoznávající galaktosově deficientní IgA jako autoantigen není u pacientů s IgAN konstatní. Nárůst hladiny imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN bychom očekávali tam, kde je toto onemocnění v progresi a kde je také vyšší hladina autoprotilátek IgG (Berthoux, 2013).

Nárůst hladiny imunitních komplexů, který byl zpozorován u méně než poloviny náhodně vybraných sér, (Tab. 6) není příliš vysoký (Tab. 5), což se dá očekávat vzhledem k povaze onemocnění. Momentální, časově omezené nárůsty hladiny cirkulujících imunitních komplexů u pacientů se pravděpodobně objevují při infekcích horních cest dýchacích, což vede k makroskopické hematurii. Po odeznění infekce makrohematurie mizí a klesá hladina imunitních komplexů (Novak, 2005).

K sérům bylo přidáváno stejné množství degalaktosylovaného IgA1. Nebylo zkoušeno přidávání různých koncentrací z toho důvodu, že nebylo jisté, která séra budou produkovat imunitní komplexy. Je možné, že u některých ze sér, u kterých byl pozorován narůst tvorby imunitních komplexů, by po přidání většího množství degalaktosylovaného IgA1 byla *de novo* tvorba imunitních komplexů ještě větší. Rovněž nebylo doposud provedeno porovnání se zdravými kontrolami. Avšak i u sér zdravých kontrol by bylo očekáváno, že po přidání degalaktosylovaného IgA1 dojde

k *de novo* tvorbě imunitních komplexů, jak bylo ukázáno na zvýšené proliferaci mesangiálních buněk po stimulaci séry zdravých kontrol doplněných galaktosově deficientním IgA1 (Yanagihara, 2012). Původ autoprotilátek IgG u zdravých kontrol je nicméně zatím nejasný. Můžeme ovšem spekulovat, že infekce způsobené viry nebo bakteriemi, které často exprimují povrchové molekuly obsahující N-acetylgalaktosamin strukturně podobné O-glykanům pantové oblasti gd-IgA1, může vést k produkci IgG zkříženě reagující s gd-IgA1 (Suzuki, 2009b; Novak, 2008).

Přestože je publikováno stále více randomizovaných kontrolovaných studií terapií pro IgAN, existuje řada otázek, které je třeba vzít v úvahu při plánování a interpretaci klinických studií. Není například jasné, zda úplně všichni pacienti s mesangiální depozicí IgA mají společný běžný proces onemocnění. Také reakce na ukládání IgA se může lišit mezi jednotlivci a jednotlivými etnickými skupinami (Boyd, 2012).

Rozdíly v patogenních mechanismech a náchylnosti ke glomerulárnímu zranění pak vyžadují rozdílné terapeutické strategie. Dále je IgAN velmi často pomalu progresivní; přestože více než 20 % pacientů dospěje do konečného stádia renálního onemocnění, trvá to 20 let a více (Schena, 2001). V potaz je třeba také brát to, že většina starších studií byla vytvořena, když ještě nebyly využívány metody pro genetický přistup k nefropatiím s proteinurií.

Další výzkum s použitím otestovaných sér z této studie bude zaměřen na možnosti kauzální léčby IgAN. Takovou léčbu je možné směrovat několika možnými cestami. Je zde možnost se zaměřit na buňky, které tvoří gd-IgA1 a zablokovat jeho tvorbu hned na počátku. Další možností je zmenšit velikost imunitních komplexů použitím fragmentů protilátek. Zbylé přístupy se už zaměřují na imunitní komplexy poté, co byla vytvořena mesangiální depozita. Je uvažováno o inhibici aktivace mesangiálních buněk, či štěpení uložených imunitních komplexů (Raška, 2016). Ač je nalinkováno mnoho přístupů, u všech se nachází určité úskalí, které je potřeba překonat. Séra z této práce budou v dalším výzkumu použita pro výzkum malých rekombinantních inhibitorů imunitních komplexů.

6 ZÁVĚR

V první části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma IgA nefropatie, molekulární mechanismy vzniku, její současná léčba a možnost její kauzální terapie v budoucnu.

V praktické části bakalářské práce bylo vytvořené degalaktosylované polymerní IgA1. Efektivita degalaktosylace ve dvou komerčně dostupných pufrech byla ověřena metodou western blot a ELISA. Degalaktosylované IgA bylo následně použito k *de novo* tvorbě imunitních komplexů v sérech pacientů s IgAN. Detekce tvorby imunitních komplexů proběhla metodou ELISA. Bylo otestováno 40 pacientských sér, přičemž u 15 byl pozorován nárůst imunitních komplexů o 11-33 % po přidání degalaktosylovaného IgA. Data byla následně statisticky zpracována. Séra, u kterých byl pozorován narůst hladiny imunitních komplexů, nadále poslouží k výzkumu inhibitorů imunitních komplexů, což je jedna z možností kauzální léčby IgAN.

7 LITERATURA

ALLEN, A. C., P. S. TOPHAM, S. J. HARPER a J. FEEHALLY, 1997. Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **12**(4), 701-706. DOI: 10.1093/ndt/12.4.701. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/12.4.701

ALLEN, A. C., E. M. BAILEY, P. E.C. BRENCHLEY, K. S. BUCK, J. BARRATT a J. FEEHALLY, 2001. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: Observations in three patients. *Kidney International*. **60**(3), 969-973. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.060003969.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815479517

ARNOLD, J. N., M. R. WORMALD, R. B. SIM, P. M. RUDD a R. A. DWEK, 2007. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*. **25**(1), 21-50. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702. ISSN 0732-0582. Dostupné také z: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702

ASOFSKI, R., R. A. BINAGHI a G. M. EDELMAN, 1969. An extension of the nomenclature for immunoglobulins. *Immunochemistry*. **7**(5), 497-500. DOI: 10.1016/0019-2791(70)90232-6. ISSN 00192791. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0019279170902326

BALLIEUX, R. E., J. W. STOOP a B. J. M. ZEGERS, 1968. Comparative Studies on Polymer-Type Serum and Exocrine IgA. *Scandinavian Journal of Haematology*. **5**(3), 179-190. DOI: 10.1111/j.1600-0609.1968.tb01736.x. ISSN 0036553X. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0609.1968.tb01736.x

BARTOSIK, L. P., G. LAJOIE, L. SUGAR a D. C. CATTRAN, 2001. Predicting progression in IgA nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. **38**(4), 728-735. DOI: 10.1053/ajkd.2001.27689. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638601420440

BERGER, J. a N. HINGLAIS, 1968. Intercapillary deposits of IgA-IgG. *Journal d'urologie et de nephrologie*. **74**(9), 694-695. ISSN 00218200.

BERTHELOT, L., CH. PAPISTA a T. T. MACIEL, 2012. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *The Journal of Experimental Medicine*. **209**(4), 793-806. DOI: 10.1084/jem.20112005. ISSN 1540-9538. Dostupné také z: https://rupress.org/jem/article/209/4/793/41358/Transglutaminase-is-essential-for-IgA-nephropathy

BERTHOUX, F., H. SUZUKI a L. THIBAUDIN, 2013. Autoantibodies Targeting Galactose-Deficient IgA1 Associate with Progression of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. **23**(9), 1579-1587. DOI: 10.1681/ASN.2012010053. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2012010053

BEZINGER, J. a S. CORNFIELD, 1974. Structure of the Carbohydrate Units of IgA1 Immunoglobulin. *The Journal of Biological Chemistry*. **249**(22), 7270-7261.

BOYD, J. K., CH. K. CHEUNG, K. MOLYNEUX, J. FEEHALLY a J. BARRATT, 2012. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney International*. **81**(9), 833-843. DOI: 10.1038/ki.2011.501. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815554100

BRANDTZAEG, P., 1985. Role of J Chain and Secretory Component in Receptor-Mediated Glandular and Hepatic Transport of Immunoglobulins in Man. *Scandinavian Journal of Immunology*. **22**(2), 111-146. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1985.tb01866.x. ISSN 0300-9475. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.1985.tb01866.x

CAPRA, J. D. a J. M. KEHOE, 1975. Hypervariable Regions, Idiotypy, and the Antibody-Combining Site. *Advances in Immunology Volume 20*. Elsevier, **20**(), 1-40. Advances in Immunology. DOI: 10.1016/S0065-2776(08)60205-9. ISBN 9780120224203. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277608602059

CONLEY, M. E., M. D. COOPER a A. F, MICHAEL, 1980. Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*. **66**(6), 1432-1436. DOI: 10.1172/JCI109998. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: http://www.jci.org/articles/view/109998

COPPO, R., 2010b. Can a dysregulated mucosal immune system in IgA nephropathy be controlled by tonsillectomy?. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **25**(8), 2395-2397. DOI: 10.1093/ndt/gfq266. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq266

COPPO, R., R. CAMILLA a A. ALFARANO, 2009. Upregulation of the immunoproteasome in peripheral blood mononuclear cells of patients with IgA nephropathy. *Kidney International*. **75**(5), 536-541. DOI: 10.1038/ki.2008.579. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815537307

COPPO, R., J. FEEHALLY a R. J. GLASSOCK, 2010. IgA nephropathy at two score and one. *Kidney International*. **77**(3), 181-186. DOI: 10.1038/ki.2009.427. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815542221

COPPO, R., L. PERUZZI, A. AMORE, A. PICCOLI, P. COCHAT, R. STONE, M. KIRSCHSTEIN a T. LINNÉ, 2007. IgACE: A Placebo-Controlled, Randomized Trial of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Children and Young People with IgA Nephropathy and Moderate Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*. **18**(6), 1880-1888. DOI: 10.1681/ASN.2006040347. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2006040347

CRAGO, S. S., W. H. KUTTEH, I. MORO, M .R. ALLANSMITH, J. RADL, J. J. HAAIJMAN a J. MESTECKY, 1984. Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *Journal of Immunology*. **132**(1), 16-18. ISSN 00221767.

D'AMICO, G., 2000. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: Role of clinical and histological prognostic factors. *American Journal of Kidney Diseases*. **36**(2), 227-237. DOI: 10.1053/ajkd.2000.8966. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638600632961

DONADIO, J. V., E. J. BERGSTRALH, K. P. OFFORD, D. C. SPENCER a K. E. HOLLEY, 1994. A Controlled Trial of Fish Oil in IgA Nephropathy. *New England Journal of Medicine*. **331**(18), 1194-1199. DOI: 10.1056/NEJM199411033311804. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199411033311804

EITNER, F. a J. FLOEGE, 2008. Bacterial protease for the treatment of IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **23**(7), 2173-2175. DOI: 10.1093/ndt/gfn155. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfn155

EITNER, F. a J. FLOEGE, 2010. ACEIs with or without corticosteroids in IgA nephropathy?. *Nature Reviews Nephrology*. **6**(5), 252-254. DOI: 10.1038/nrneph.2010.31. ISSN 1759-5061. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nrneph.2010.31

FEEHALLY, J., T. J. BEATTIE, P. E.C. BRENCHLEY, B. M. COUPES, N. P. MALLICK a R. J. POSTLETHWAITE, 1986. Sequential study of the IgA system in relapsing IgA nephropathy. *Kidney International*. **30**(6), 924-931. DOI: 10.1038/ki.1986.274. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815338576

GHARAVI, A. G, K. KIRYLUK a M. CHOI, 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature Genetics*. **43**(4), 321-327. DOI: 10.1038/ng.787. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ng.787

GRANDE, J. P. a J. V. DONADIO, 1998. Dietary fish oil supplementation in IgA nephropathy: A therapy in search of a mechanism?. *Nutrition*. **14**(2), 240-242. DOI: 10.1016/S0899-9007(97)00437-1. ISSN 08999007. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900797004371

HAN, L., X. FANG, Y. HE a X. Z. RUAN, 2016. ISN Forefronts Symposium 2015: IgA Nephropathy, the Gut Microbiota, and Gut−Kidney Crosstalk. *Kidney International Reports*. **1**(3), 189-196. DOI: 10.1016/j.ekir.2016.08.002. ISSN 24680249. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468024916300535

HERZENBERG, A. M., A. B. FOGO a H. N. REICH, 2011. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy. *Kidney International*. **80**(3), 310-317. DOI: 10.1038/ki.2011.126. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815550266

HIKI, Y., H. HORI, K. YAMAMOTO, Y. YAMAMOTO, Y. YUZAWA, N. KITAGUCHI a K. TAKAHASHI, 2015. Specificity of two monoclonal antibodies against a synthetic glycopeptide, an analogue to the hypo-galactosylated IgA1 hinge region. *Journal of Nephrology*. **28**(2), 181-186. DOI: 10.1007/s40620-014-0118-4. ISSN 1121-8428. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s40620-014-0118-4

HIKI, Y., M. SAITOH a Y. KOBAYASHI, 2004. Serum IgA Class Anti-IgA Antibody in IgA Nephropathy. *Nephron*. **59**(4), 552-560. DOI: 10.1159/000186643. ISSN 1660-8151. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/186643

HOGG, R. J., J. LEE a N. NARDELLI, 2006. Clinical Trial to Evaluate Omega-3 Fatty Acids and Alternate Day Prednisone in Patients with IgA Nephropathy: Report from the Southwest Pediatric Nephrology Study Group. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. **1**(3), 467-474. DOI: 10.2215/CJN.01020905. ISSN 1555-9041. Dostupné také z: http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.01020905

HOŘEJŠÍ, V., J. BARTŮŇKOVÁ, T. BRDIČKA a R. ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.

HOTTA, O., M. MIYAZAKI, T. FURUTA, S. TOMIOKA, S. CHIBA, I. HORIGOME, K. ABE a Y. TAGUMA, 2001. Tonsillectomy and steroid pulse therapy significantly impact on clinical remission in patients with IgA nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. **38**(4), 736-743. DOI: 10.1053/ajkd.2001.27690. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638601772423

CHEUNG, CH. K. a J. BARRATT, 2016. Is IgA Nephropathy a Single Disease?. *Pathogenesis and Treatment in IgA Nephropathy*. Tokyo: Springer Japan, 3-17. DOI: 10.1007/978-4-431-55588-9_1. ISBN 978-4-431-55587-2. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55588-9_1

IWASAKI, H., Y. ZHANG, K. TACHIBANA, 2003. Initiation of O -Glycan Synthesis in IgA1 Hinge Region Is Determined by a Single Enzyme, UDP- N -Acetyl-α-d-galactosamine: Polypeptide N -Acetylgalactosaminyltransferase 2. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(8), 5613-5621. DOI: 10.1074/jbc.M211097200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M211097200

IWASE, H., I. ISHII-KARAKASA, E. FUJII, K. HOTTA, Y. HIKI a Y. KOBAYASHI, 1992. Analysis of glycoform of O-glycan from human myeloma immunoglobulin a1 by gas-phase hydrazinolysis following pyridylamination of oligosaccharides. *Analytical Biochemistry*. **206**(1), 202-205. DOI: 10.1016/S0003-2697(05)80034-X. ISSN 00032697. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326970580034X

JACKSON, S., R.I. MONTGOMERY, J. MESTECKY a C. CZERKINSKY, 1987a. Normal human sera contain antibodies directed at Fab of IgA. *Journal of Immunology*. **138**(7), 2244-8.

JACKSON, S., R. I. MONTGOMERY, B. A. JULIAN, J. H. GALLA a C. CZERKINSKY, 1987b. Aberrant synthesis of antibodies directed at the Fab fragment of IgA in patients with IgA nephropathies. *Clinical Immunology and Immunopathology*. **45**(2), 208-213. DOI: 10.1016/0090-1229(87)90035-3. ISSN 00901229. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0090122987900353

JENNETTE, J. CH., 1988. The Immunohistology of IgA Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. **12**(5), 348-352. DOI: 10.1016/S0272-6386(88)80022-2. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638688800222

JULIAN, B. A., F. B. WALDO, A. RIFAI a J. MESTECKY, 1988. IgA nephropathy, the most common glomerulonephritis worldwide. *The American Journal of Medicine*. **84**(1), 129-132. DOI: 10.1016/0002-9343(88)90019-8. ISSN 00029343. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934388900198

JU, T. a R. D. CUMMINGS, 2002. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 3-galactosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences. **99**(26), 16613-16618. DOI: 10.1073/pnas.262438199. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.262438199

KANEKO, Y., T. OTSUKA, Y. TSUCHIDA, F. GEJYO a I. NARITA, 2012. Integrin α1/β1 and α2/β1 as a receptor for IgA1 in human glomerular mesangial cells in IgA nephropathy. *International Immunology*. **24**(4), 219-232. DOI: 10.1093/intimm/dxr125. ISSN 1460-2377. Dostupné také z: https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxr125

KAWAMURA, S., N. SAITOU a S. UEDA, 1992. Concerted evolution of the primate immunoglobulin α-gene through gene conversion. *Journal of Biological Chemistry*. **267**(11), 7359-7367. ISSN 00219258.

KILIAN, M. a M. W. RUSSELL, 2005. Microbial Evasion of IgA Functions. *Mucosal Immunology*. Elsevier, **15**(4), 291-303. DOI: 10.1016/B978-012491543-5/50019-X. ISBN 9780124915435. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012491543550019X

KIM, M. J., J. P. MCDAID, S. P. MCADOO, J. BARRATT, K. MOLYNEUX, E. S. MASUDA, CH. D. PUSEY a F. W. K. TAM, 2012. Spleen Tyrosine Kinase Is Important in the Production of Proinflammatory Cytokines and Cell Proliferation in Human Mesangial Cells following Stimulation with IgA1 Isolated from IgA Nephropathy Patients. *The Journal of Immunology*. **189**(7), 3751-3758. DOI: 10.4049/jimmunol.1102603. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1102603

KIRKHAM, P. M. a H. W. SCHROEDER, 1994. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. *Seminars in Immunology*. **6**(6), 347-360. DOI: 10.1006/smim.1994.1045. ISSN 10445323. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532384710451

KLENK, E., 1941. Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. **268**(1-2), 50-58. DOI: 10.1515/bchm2.1941.268.1-2.50. ISSN 0018-4888. Dostupné také z: https://www.degruyter.com/view/j/bchm2.1941.268.issue-1-2/bchm2.1941.268.1-2.50/bchm2.1941.268.1-2.50.xml

KNOPPOVA, B., C. REILY a N. MAILLARD, 2016. The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Frontiers in Immunology*. **7**. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00117. ISSN 1664-3224. Dostupné také z: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00117/abstract

KOBAYASHI, I., 2002. Interleukin-12 alters the physicochemical characteristics of serum and glomerular IgA and modifies glycosylation in a ddY mouse strain having high IgA levels. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **17**(12), 2108-2116. DOI: 10.1093/ndt/17.12.2108. ISSN 14602385. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/17.12.2108

KOMATSU, H., S. FUJIMOTO, S. HARA, Y. SATO, K. YAMADA a K. KITAMURA, 2008. Effect of Tonsillectomy Plus Steroid Pulse Therapy on Clinical Remission of IgA Nephropathy: A Controlled Study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. **3**(5), 1301-1307. DOI: 10.2215/CJN.00310108. ISSN 1555-9041. Dostupné také z: http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.00310108

KOSZTYU, P., M. HILL, J. JEMELKOVA, L. CZERNEKOVA, L. RASKOVA-KAFKOVA, M. HRUBY, K. MATOUSOVIC, K. VONDRAK, J. ZADRAZIL, I. STERZL, J. MESTECKY A M. RASKA, 2018. Glucocorticoids Reduce Aberrant O-Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy Patients. *Kidney and Blood Pressure Research*. **43**(2), 350-359. DOI: 10.1159/000487903. ISSN 1420-4096. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/487903

KUDO, T., T. IWAI, T. KUBOTA, H. IWASAKI a Y. TAKAYMA, 2002. Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc(alpha) peptide beta 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O-glycan. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(49), 47724-47731. DOI: 10.1074/jbc.M205839200. ISSN 0021-9258.

LAI, K. N., J. C. K. LEUNG a L. Y. Y. CHAN, 2008. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **24**(1), 62-72. DOI: 10.1093/ndt/gfn441. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfn441

LAI, K. N., 2012. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Nature Reviews Nephrology*. **8**(5), 275-283. DOI: 10.1038/nrneph.2012.58. ISSN 1759-5061. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nrneph.2012.58

LAI, K. N., S. C.W. TANG a J. C. K. LEUNG, 2011. Recent Advances in IgA Nephropathy – The Glomerulopodocytic-Tubular Communication. *Recent Advances in Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways*. Basel: KARGER, 40-44. Advances in Oto-Rhino-Laryngology. DOI: 10.1159/000324593. ISBN 978-3-8055-9723-4. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/324593

LAUNAY, P., B. GROSSETêTE a M. ARCOS-FAJARDO, 2000. Fcα Receptor (Cd89) Mediates the Development of Immunoglobulin a (Iga) Nephropathy (Berger's Disease). *The Journal of Experimental Medicine*. **191**(11), 1999-2010. DOI: 10.1084/jem.191.11.1999. ISSN 0022-1007. Dostupné také z: https://rupress.org/jem/article/191/11/1999/20578/Fcα-Receptor-Cd89-Mediates-the-Development-of

LECHNER, S. M., L. ABBAD a E. BOEDEC, 2016. IgA1 Protease Treatment Reverses Mesangial Deposits and Hematuria in a Model of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. **27**(9), 2622-2629. DOI: 10.1681/ASN.2015080856. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2015080856

LUFT, F. C., 2017. Mesangial renal disease, oxygen sensing, and prolyl hydroxylase. *Journal of Molecular Medicine*. **95**(3), 235-237. DOI: 10.1007/s00109-017-1514-8. ISSN 0946-2716. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00109-017-1514-8

LV, J., H. ZHANG, Y. CHEN, G. LI, L. JIANG, A. K. SINGH a H. WANG, 2009. Combination Therapy of Prednisone and ACE Inhibitor Versus ACE-Inhibitor Therapy Alone in Patients With IgA Nephropathy: A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Kidney Diseases*. **53**(1), 26-32. DOI: 10.1053/j.ajkd.2008.07.029. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638608012304

MACPHERSON, A. J., K. D. MCCOY, F-E. JOHANSEN a P. BRANDTZAEG, 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*. **1**(1), 11-22. DOI: 10.1038/mi.2007.6. ISSN 1933-0219. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/mi20076

MAIXNEROVA, D., E. JANCOVA a J. SKIBOVA, 2015. *Journal of Nephrology*. **28**(1). DOI: 10.1007/s40620-014-0090-z. ISSN 1121-8428.

MANNO, C., D. D. TORRES, M. ROSSINI, F. PESCE a F. P. SCHENA, 2009. Randomized controlled clinical trial of corticosteroids plus ACE-inhibitors with long-term follow-up in proteinuric IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **24**(12), 3694-3701. DOI: 10.1093/ndt/gfp356. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfp356

MARCOS, N. T., S. PINHO a C. GRANDELA, 2004. Role of the Human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the Synthesis of the Cancer-Associated Sialyl-Tn Antigen. *Cancer Research*. **64**(19), 7050-7057. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1921. ISSN 0008-5472. Dostupné také z: http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-1921

MATTU, T. S., R. J. PLEASS a A. C. WILLIS, 1998. The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N -Glycosylation on Fcα Receptor Interactions. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(4), 2260-2272. DOI: 10.1074/jbc.273.4.2260. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.4.2260

MESTECKY, J., J. NOVAK, Z. MOLDOVEANU a M. RASKA, 2016. IgA nephropathy enigma. *Clinical Immunology*. **172**, 72-77. DOI: 10.1016/j.clim.2016.07.011. ISSN 15216616. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661616301802

MESTECKY, J., M. RASKA a B. A. JULIAN, 2013. IgA Nephropathy: Molecular Mechanisms of the Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. **8**(1), 217-240. DOI:

10.1146/annurev-pathol-011110-130216. ISSN 1553-4006. Dostupné také z: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011110-130216

MESTECKY, J., M. TOMANA, P. A. CROWLEY-NOWICK, Z. MOLDOVEANU, B. A. JULIAN a S. JACKSON, 1993. Defective Galactosylation and Clearance of IgA1 Molecules as a Possible Etiopathogenic Factor in IgA Nephropathy1. *IgA Nephropathy: The 25th Year*. S. Karger, **104**(25), 172-182. Contributions to Nephrology. DOI: 10.1159/000422410. ISBN 978-3-8055-5720-7. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/422410

MOORE, J. S., R. KULHAVY a M. TOMANA, 2007. Reactivities of N-acetylgalactosamine-specific lectins with human IgA1 proteins. *Molecular Immunology*. **44**(10), 2598-2604. DOI: 10.1016/j.molimm.2006.12.011. ISSN 01615890. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589006007309

MOURA, I. C., M. N. CENTELLES, M. ARCOS-FAJARDO, D. M. MALHEIROS, J. F. COLLAWN, M. D. COOPER a R. C. MONTEIRO, 2001. Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)a1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in Iga Nephropathy. *Journal of Experimental Medicine*. **194**(4), 417-426. DOI: 10.1084/jem.194.4.417. ISSN 0022-1007. Dostupné také z: https://rupress.org/jem/article/194/4/417/53713/Identification-of-the-Transferrin-Receptor-as-a

MUL, N. A. J., L. E. M. BOER, J. A. TAMINIAU a R. E. BALLIEUX, 1975. Light Chain Type Ratio of IgA-Producing Cells in Human Jejunal Biopsies. *European Journal of Clinical Investigation*. **5**(1), 63-67. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1975.tb00429.x. ISSN 0014-2972. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2362.1975.tb00429.x

MURRAY, R., 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-907-7.

NADORP, J. H. S., M. VOSS, W. C. BUYS, P. J. J. MINISTER, J. H. M. TONGEREN, R. C. AALBERSE a Erna LOGHEM, 1973. The Significance of the Presence of Anti-IgA Antibodies in Individuals with an IgA Deficiency*. *European Journal of Clinical Investigation*. **3**(4), 317-323. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1973.tb00357.x. ISSN 0014-2972. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2362.1973.tb00357.x

NOVAK, J., B. A. JULIAN, M. TOMANA a J. MESTECKY, 2008. IgA Glycosylation and IgA Immune Complexes in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Seminars in Nephrology*. **28**(1), 78-87. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2007.10.009. ISSN 02709295. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0270929507001477

NOVAK, J., Z. MOLDOVEANU a B. A. JULIAN, 2011b. Aberrant Glycosylation of IgA1 and Anti-Glycan Antibodies in IgA Nephropathy: Role of Mucosal Immune System. *Recent Advances in Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways*. Basel: KARGER, 60-63. Advances in Oto-Rhino-Laryngology. DOI: 10.1159/000324607. ISBN 978-3-8055-9723-4. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/324607

NOVAK, J., L. RASKOVA-KAFKOVA a H. SUZUKI, 2011a. IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **26**(11), 3451-3457. DOI: 10.1093/ndt/gfr448. ISSN 1460-2385. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfr448

NOVAK, J., D. RIZK a K. TAKAHASHI, 2015. New Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Kidney Diseases*. **1**(1), 8-18. DOI: 10.1159/000382134. ISSN 2296-9381. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/382134

NOVAK, J., M. TOMANA a R. BROWN, 2005. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney International*. **67**(2), 504-513. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.67107.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815504857

NOVAK, J., H. L. VU, L. NOVAK, B. A. JULIAN, J. MESTECKY a M. TOMANA, 2002. Interactions of human mesangial cells with IgA and IgA-containing immune complexes1. *Kidney International*. **62**(2), 465-475. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00477.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815485734

ODANI, H., Y. HIKI, M. TAKAHASHI, A. NISHIMOTO, Y. YASUDA, H. IWASE, T. SHINZATO a K. MAEDA, 2000. Direct Evidence for Decreased Sialylation and

Galactosylation of Human Serum IgA1 Fc O-Glycosylated Hinge Peptides in IgA Nephropathy by Mass Spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **271**(1), 268-274. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2613. ISSN 0006291X. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X00926135

OHTSUBO, K. a J. D. MARTH, 2006. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*. **126**(5), 855-867. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.019. ISSN 00928674. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406010865

PAKKANEN, S. H., J. M. KANTELE, Z. MOLDOVEANU, S. HEDGES, M. HAKKINEN, J. MESTECKY a A. KANTELE, 2010. Expression of Homing Receptors on IgA1 and IgA2 Plasmablasts in Blood Reflects Differential Distribution of IgA1 and IgA2 in Various Body Fluids. *Clinical and Vaccine Immunology*. **17**(3), 393-401. DOI: 10.1128/CVI.00475-09. ISSN 1556-6811. Dostupné také z: http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00475-09

PERŠE, M. a Ž. VEČERIC-HALER, 2019. The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**(24). DOI: 10.3390/ijms20246199. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: https://www.mdpi.com/1422-0067/20/24/6199

PICCOLI, A., M. CODOGNOTTO, M.-G. TABBI, E. FAVARO a B. ROSSI, 2010. Influence of tonsillectomy on the progression of mesangioproliferative glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **25**(8), 2583-2589. DOI: 10.1093/ndt/gfq107. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq107

POZZI, C., 2004. Corticosteroid Effectiveness in IgA Nephropathy: Long-Term Results of a Randomized, Controlled Trial. *Journal of the American Society of Nephrology*. **15**(1), 157-163. DOI: 10.1097/01.ASN.0000103869.08096.4F. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1097/01.ASN.0000103869.08096.4F

PRAGA, M., V. GUTIERREZ-MILLET, J. J. NAVAS, L. M. RUILOPE, J. M. MORALES, J. M. ALCAZAR, I. BELLO a J. L. RODICIO, 1985. Acute worsening of renal function during episodes of macroscopic hematuria in IgA nephropathy. *Kidney International*. **28**(1), 69-74. DOI: 10.1038/ki.1985.120. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815334670

RAŠKA, M., J. ZADRAŽIL, M. STUCHLOVÁ HORYNOVÁ, L. RAŠKOVÁ KAFKOVÁ, A. VRÁBLÍKOVÁ, K. MATOUŠOVIC, J. NOVÁK a J. MĚSTECKÝ, 2016. IgA nefropatie - otázky, které nastolil výzkum. *Vnitřní lékařství*. **62**(6), 67-77.

REILY, C., H. UEDA, Z-Q. HUANG, J. MESTECKY, B. A. JULIAN, C. D. WILLEY a J. NOVAK, 2014. Cellular Signaling and Production of Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy, an Autoimmune Disease. *Journal of Immunology Research*. **2014**, 1-10. DOI: 10.1155/2014/197548. ISSN 2314-8861. Dostupné také z: http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/197548/

RUSSELL, M. W., T. A. BROWN, J. RADL, J. J. HAAIJMAN a J. MESTECKY, 1986. Assay of human IgA subclass antibodies in serum and secretions by means of monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*. **87**(1), 87-93. DOI: 10.1016/0022-1759(86)90347-9. ISSN 00221759. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175986903479

RUSSO, D., R. MINUTOLO, A. PISANI, R. ESPOSITO, G. SIGNORIELLO, M. ANDREUCCI a M. M. BALLETTA, 2001. Coadministration of losartan and enalapril exerts additive antiproteinuric effect in IgA nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. **38**(1), 18-25. DOI: 10.1053/ajkd.2001.25176. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638601115313

SCHACHTER, H., E. J. MCGUIRE a S. ROSEMAN, 1971. Sialic acids. 13. A uridine diphosphate D-galactose: mucin galactosyltransferase from porcine submaxillary gland. *The Journal of Biological Chemistry*. **246**(17), 5321-8.

SCHALLER, J., 2008. *Human blood plasma proteins: structure and function*. Hoboken, NJ: John Wiley. ISBN 978-047001674-9.

SCHENA, F. P., 2001. Immunoglobulin a nephropathy with mild renal lesions: a call in the forest for physicians and nephrologists. *The American Journal of Medicine*. **110**(6), 499-500. DOI:

10.1016/S0002-9343(01)00684-2. ISSN 00029343. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934301006842

SMITH, A. C., K. MOLYNEUX, J. FEEHALLY a J. BARRATT, 2006. O-Glycosylation of Serum IgA1 Antibodies against Mucosal and Systemic Antigens in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. **17**(12), 3520-3528. DOI: 10.1681/ASN.2006060658. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2006060658

STEWART, T. J, K. TAKAHASHI, R. H. WHITAKER, M. RASKA, W. J. PLACZEK, J. NOVAK a M. B. RENFROW, 2019. IgA1 hinge-region clustered glycan fidelity is established early during semi-ordered glycosylation by GalNAc-T2. *Glycobiology*. **29**(7), 543-556. DOI: 10.1093/glycob/cwz007. ISSN 1460-2423. Dostupné také z: https://academic.oup.com/glycob/article/29/7/543/5318693

STRIPPOLI, G. F.M., C. MANNO a F. P. SCHENA, 2003. An "evidence-based" survey of therapeutic options for IgA nephropathy: assessment and criticism. *American Journal of Kidney Diseases*. **41**(6), 1129-1139. DOI: 10.1016/S0272-6386(03)00344-5. ISSN 02726386. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638603003445

SUZUKI, H., R. FAN, a Z. ZHANG, 2009. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *Journal of Clinical Investigation*. **119**(6), 1668-77. DOI: 10.1172/JCI38468. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: http://www.jci.org/articles/view/38468

SUZUKI, H., K. KIRYLUK a J. NOVAK, 2011. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. **22**(10), 1795-1803. DOI: 10.1681/ASN.2011050464. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2011050464

SUZUKI, H., Z. MOLDOVEANU a S. HALL, 2008. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *Journal of Clinical Investigation*. **118**(2), 629-39. DOI: 10.1172/JCI33189. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: http://content.the-jci.org/articles/view/33189

SUZUKI, H., M. RASKA a K. YAMADA, 2014. Cytokines Alter IgA1 O -Glycosylation by Dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(8), 5330-5339. DOI: 10.1074/jbc.M113.512277. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M113.512277

SUZUKI, K., K. HONDA, K. TANABE, H. TOMA, H. NIHEI a Y. YAMAGUCHI, 2003. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney International*. **63**(6), 2286-2294. DOI: 10.1046/j.1523-1755.63.6s.2.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815491501

SZABO, R. a D. SKROPETA, 2017. Advancement of Sialyltransferase Inhibitors: Therapeutic Challenges and Opportunities. *Medicinal Research Reviews*. **37**(2), 219-270. DOI: 10.1002/med.21407. ISSN 01986325. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/med.21407

TAMOUZA, H., J. M. CHEMOUNY a L. RASKOVA KAFKOVA, 2012. The IgA1 immune complex–mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney International*. **82**(12), 1284-1296. DOI: 10.1038/ki.2012.192. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815554835

TANAKA, M., G. SEKI, T. SOMEYA, M. NAGATA a T. FUJITA, 2011. Aberrantly Glycosylated IgA1 as a Factor in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Clinical and Developmental Immunology*. **2011**, 1-7. DOI: 10.1155/2011/470803. ISSN 1740-2522. Dostupné také z: http://www.hindawi.com/journals/jir/2011/470803/

TARELLI, E., A. C. SMITH, B. M. HENDRY, S. J. CHALLACOMBE a S. POURIA, 2004. Human serum IgA1 is substituted with up to six O-glycans as shown by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Carbohydrate Research*. **339**(13), 2329-2335. DOI: 10.1016/j.carres.2004.07.011. ISSN 00086215. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621504003246

THOMPSON, A. J., Y-L. CHAN, A.J. WOODROFFE, A.R. CLARKSON a A.E. SEYMOUR, 1980. Vascular IgA deposits in clinically normal skin of patients with renal disease. *Pathology*. **12**(3), 407-413. DOI: 10.3109/00313028009077104. ISSN 00313025. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516376577

TOMANA, M., K. MATOUSOVIC, B. A. JULIAN, J. RADL, K. KONECNY aj. MESTECKY, 1997. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney International*. **52**(2), 509-516. DOI: 10.1038/ki.1997.361. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815602010

TOMANA, M., J. NOVAK, B. A. JULIAN, K. MATOUSOVIC, K. KONECNY a J. MESTECKY, 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *Journal of Clinical Investigation*. **104**(1), 73-81. DOI: 10.1172/JCI5535. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: http://www.jci.org/articles/view/5535

TUMLIN, J. A., M. P. MADAIO a R. HENNIGAR, 2007. Idiopathic IgA Nephropathy: Pathogenesis, Histopathology, and Therapeutic Options. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. **2**(5), 1054-1061. DOI: 10.2215/CJN.04351206. ISSN 1555-9041. Dostupné také z: http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.04351206

VAN DER BOOG, P. J.M., J. W. DE FIJTER, C. VAN KOOTEN, R. VAN DER HOLST, A. VAN SEGGELEN, L. A. VAN ES a M. R. DAHA, 2003. Complexes of IgA with FcαRI/CD89 are not specific for primary IgA nephropathy. *Kidney International*. **63**(2), 514-521. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00756.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815489045

VAN DER BOOG, P. J.M., C. VAN KOOTEN, J. W. DE FIJTER a M. R. DAHA, 2005. Role of macromolecular IgA in IgA nephropathy. *Kidney International*. **67**(3), 813-821. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00146.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815505279

WALDHERR, R., M. RAMBAUSEK, W. D. DUNCKER a E. RITZ, 1989. Frequency of Mesangial IgA Deposits in a Non-Selected Autopsy Series*. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **4**(11), 943-946. DOI: 10.1093/ndt/4.11.943. ISSN 1460-2385. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/4.11.943

WANDALL, H. H., F. IRAZOQUI a M. A. TARP, 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**(4), 374-387. DOI: 10.1093/glycob/cwl082. ISSN 1460-2423. Dostupné také z: http://academic.oup.com/glycob/article/17/4/374/602073/The-lectin-domains-of-polypeptide

WANG, Y., J. CHEN, Y. WANG, Y. CHEN, L. WANG a Y. LV, 2011. A meta-analysis of the clinical remission rate and long-term efficacy of tonsillectomy in patients with IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **26**(6), 1923-1931. DOI: 10.1093/ndt/gfq674. ISSN 0931-0509. Dostupné také z: https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq674

WANG, Y., T. JU, X. DING, B. XIA, W. WANG, L. XIA, M. HE a R. D. CUMMINGS, 2010. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **107**(20), 9228-9233. DOI: 10.1073/pnas.0914004107. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914004107

WEISS, J. H., D. B. BHATHENA, J. J. CURTIS, B. A. LUCAS a R. G. LUKE, 1978. A Possible Relationship between Henoch-Schonlein Syndrome and IgA Nephropathy (Berger's Disease). *Nephron*. **22**(4-6), 582-591. DOI: 10.1159/000181539. ISSN 1660-8151. Dostupné také z: https://www.karger.com/Article/FullText/181539

WOLFENSTEIN, C., B. FRANGIONE, E. MIHAESCO a E. C. FRANKLIN, 1971. Structure of immunoglobulin A. I. Interchain disulfide bridges of a γAl myeloma protein. *Biochemistry*. **10**(22), 4140-4145. DOI: 10.1021/bi00798a020. ISSN 0006-2960. Dostupné také z: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00798a020

WOLFENSTEIN-TODEL, C., B. FRANGIONE a E. C. FRANKLIN, 1972. Structure of immunoglobulin A. II. Sequence around the hinge region and labile disulfide bonds of an

immunoglobulin A2 myeloma protein. *Biochemistry*. **11**(21), 3971-3975. DOI: 10.1021/bi00771a021. ISSN 0006-2960. Dostupné také z: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00771a021

WOOF, J. M., 2013. Immunoglobulin A: Molecular Mechanisms of Function and Role in Immune Defence. *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity*. New York, NY: Springer New York, 31-60. DOI: 10.1007/978-1-4614-7107-3_2. ISBN 978-1-4614-7106-6. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-7107-3_2

WOOF, J. M. a J. MESTECKY, 2005. Mucosal immunoglobulins. *Immunological Reviews*. **206**(1), 64-82. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x. ISSN 0105-2896. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x

WYATT, R.J., B.A. JULIAN a R.W. BAEHLER, 1998. Epidemiology of IgA nephropathy in central and eastern Kentucky for the period 1975 through 1994. *Journal of the American Society of Nephrology*. **9**(5), 853-858. ISSN 1533-3450.

XIE, Y., S. NISHI a M. UENO, 2003. The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney International*. **63**(5), 1861-1867. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00935.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815490787

YANAGIHARA, T., R. BROWN a S. HALL, 2012. In vitro-generated immune complexes containing galactose-deficient IgA1 stimulate proliferation of mesangial cells. *Results in Immunology*. **2**, 166-172. DOI: 10.1016/j.rinim.2012.08.002. ISSN 22112839. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211283912000214

YOSHIKAWA, N., K. IIJIMA, S. MATSUYAMA, S. SUZUKI, A. KAMEDA, S. OKADA a H. NAKAMURA, 1990. Repeat renal biopsy in children with IgA nephropathy. *Clinical Nephrology*. **33**(4), 160-167.

ZHOU, Y-H., L-G. TANG a S-L. GUO, 2011. Steroids in the Treatment of IgA Nephropathy to the Improvement of Renal Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. **6**(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0018788. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0018788

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ACEi — angiotenzin konvertující enzym
- ARB — receptor pro angiotensin II
- BSA — hovězí sérový albumin
- C1Gal-T1 — core 1 β-1,3 galaktosyltransferasa
- dIgA — dimerní IgA
- GalNAc — N-acetylgalaktosamin
- GalNAcT — N-acetylgalaktosamin transferasa
- gd-IgA1 — galaktosově deficientní IgA1
- gd-pIgA1 — galaktosově deficientní polymerní IgA1
- HAA — Helix aspersa aglutinin
- HSPN — Henoch-Schönleinova purpura
- IgAN — IgA nefropatie
- IL-4 — interleukin 4
- IL-6 — interleukin 6
- NeuNAc — kyselina sialová
- pIgA — polymerní IgA
- pIgR — polymerní imunoglobulinový receptor
- pp-GalNAc-T — polypeptid N-acetylgalaktosaminyltransferasa
- SA — kyselina sialová
- SDS — dodecylsíran sodný
- S-IgA — sekreční forma imunoglobulinu A
- SYK — tyrosyn-protein kinasa
- TFR1 — transferrin receptor 1
- TG — transglutaminasa
- TGasa2 — transglutaminasa 2
- TGF — transformující růstový faktor
- TNF — tumor necrosis factor