

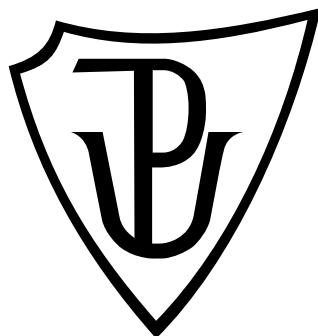
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Terézia Kurová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Produkce a purifikace rekombinantního specifického
imunoglobulinu za použití eukaryotního expresního
systému.**

Diplomová práce

Bc. Terézia Kurová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019 *19/20*

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Terézia KUROVÁ
Osobní číslo: R180457
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Produkce a purifikace rekombinantního specifického imunoglobulinu za použití eukaryotního expresního systému.
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na význam protilátek v patogenezi IgA nefropatie. 2. Praktická část zaměřena na optimalizaci metody ko-transfekce buněk HEK 293F plazmidy pro lehký a těžký imunoglobulinový řetězec. 3. Optimalizace purifikace produktů za využití afinitní chromatografie. 4. Charakterizace produktů- koncentrace, čistota, vazba antigenu.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Mestecky J, Raska M. (2012) IgA nephropathy: Molecular mechanisms of the disease. *The annual review of pathology: Mechanisms of disease*. 8:217-40

Tomana M, Novak J, Julian B. (1999) Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and anti-glycan antibodies. *The journal of clinical investigation*. Volume 4. Number 1.

Mestecky J, Tomana M. (2008) Role of Aberrant Glycosylation of IgA1 Molecules in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Kidney blood press*. 31:29-37

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

Ústav imunologie



Datum zadání diplomové práce: 12. října 2018¹⁹
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2020²¹

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIENECNÍ SPALNICE A GENETIKY
Šteklův 3, 787 01 Olomouc - Holsko
tel. +420 585 637 191

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

5. 8. 19

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Terézia Kurová
Název práce	Produkce a purifikace rekombinantního specifického imunoglobulinu za použití eukaryotního expresního systému.
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Michal Křupka Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	IgA nefropatie, glykoproteiny, rekombinantní proteiny, transfekce
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	český

Souhrn

Tato diplomová práce se zaměřuje na produkci a purifikaci rekombinantního monoklonálního imunoglobulinu za použití eukaryotního expresního systému. Teoretická část této práce se věnuje patogenezí IgA nefropatie, imunoglobulinům a jejich glykosylaci, tvorbě imunokomplexů a možnostem terapie. Použitým expresním systémem byla suspenzní buněčná linie HEK 293F. Byla provedena optimalizace transfekce této buněčné linie plazmidy pro lehký a těžký řetězec IgG. Po transfekci byla provedena optimalizace purifikace rekombinantního IgG a následně byla protilátka charakterizována pomocí ELISA testu. Tato diplomová práce představila metodu produkce rekombinantní velmi specifické molekuly IgG, jejíž sekvence byla získaná od pacienta trpícího IgA nefropatií. Tento rekombinantní protein (IgG 1123) by následně mohl pomoci ve vývoji terapeutického postupu.

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Terézia Kurová
Title	Production and purification of recombinant specific immunoglobulin using a eucaryotic expression system.
Type of thesis	master's
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Michal Křupka Ph.D.
The year of presentation	2020
Keywords	IgA nephropathy, glycoproteins, recombinant proteins, transfection
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	czech

Summary

This thesis focuses on the production and purification of recombinant monoclonal immunoglobulin using a eukaryotic expression system. The theoretical part of this work deals with the pathogenesis of IgA nephropathy, immunoglobulins and their glycosylation, formation of immunocomplexes and possibilities of therapy. The expression system used was the HEK 293F suspension cell line. The transfection of this cell line with plasmids for the light and heavy chains of IgG was optimized. After transfection, recombinant IgG purification was optimized and the antibody was characterized by ELISA. This thesis presented a method of producing a recombinant very specific IgG molecule, whose sequence was obtained from a patient suffering from IgA nephropathy. This recombinant protein (IgG 1123) could subsequently assist in the development of a therapeutic procedure.

Čestně prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci s názvem „Produkce a purifikace rekombinantního specifického imunoglobulinu za použití eukaryotního expresního systému“ zpracovala samostatně pod vedením pana Mgr. Michala Křupky, Ph.D. na Ústavu imunologie LF UP v Olomouci, s využitím literatury uvedené v závěru této práce.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při zpracovávání této bakalářské práce. Moje poděkování dále patří Mgr. Evě Danihlíkové, Ph.D. z Ústavu imunologie LF UP v Olomouci za pomoc zejména při zpracovávání experimentální části této práce, která byla podpořena studentskými grandy IGA_LF_2019_014 a IGA_LF_2020_016.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	IgA nefropatie	3
3.2	Patogeneze IgA nefropatie	4
3.3	Imunoglobuliny	5
3.4	Imunoglobulin A	8
3.5	Cirkulující imunitní komplexy	10
3.6	O-glykosylace	12
3.7	Biosyntéza O-vázaných glykanů na IgA1	14
3.8	Tvorba imunitních komplexů a glomerulární poškození	15
3.9	Faktory podporující ukládání IgA	15
3.10	Biomarkery IgA nefropatie.....	16
3.11	Terapie IgA nefropatie	16
3.12	Savčí expresní systém.....	17
3.13	Možnosti purifikace rekombinantních proteinů	18
4	Materiál a metodika	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	21
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
	• Transformace chemokompetentních bakterií.....	24
	• Příprava buněčné kultury	25
	• Určení životaschopnosti buněk.....	26
	• Optimalizace transfekce buněk HEK 293F v objemu 10 ml	27
	• Transfekce buněk HEK 293F v objemu 80 ml	28
	• Purifikace pomocí proteinu G.....	28
	• Purifikace srážením síranem amonným.....	29
	• Purifikace pomocí proteinu A.....	30
	• Příprava 10% polyakrylamidového gelu.....	30
	• Příprava gradientového polyakrylamidového gelu	31
	• SDS-PAGE elektroforéza	32
	• Western-blot.....	32
	• Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue	33
	• ELISA	33
5	Výsledky.....	37
6	Diskuze	49
7	Závěr.....	52
8	Literatura	53

Seznam použitých zkratek a symbolů

ACE	enzym angiotensin-konvertasa
C1β3GalT1	jádro 1 β-1,3-galaktosyltransferáza
CHO	ovariální buňky čínského křečka
CIC	cirkulující imunokomplexy
EGF	epidermální růstový faktor
Fab	fragment antigen binding
Fc	konstantní oblast těžkého řetězce IgG
Gal	galaktóza
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GalNAcT2	uridine-5'-difosfo-N-acetylgalaktosaminyl transferáza 2
GdIgA1	galaktóza-deficientní IgA1
IL-6	interleukin 6
IgA	imunoglobulin A
IgAN	IgA nefropatie
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor

Seznam obrázků

Obrázek č.1: Renální biopsie u pacienta s IgA nefropatií	4
Obrázek č.2: Schématické znázornění různých tříd imunoglobulinů	6
Obrázek č. 3: Struktura molekuly IgA1: (A) struktura O-vázaných cukrů na serinové nebo threoninové zbytky v pantové oblasti IgA1 (B).....	9
Obrázek č. 4: Struktura O-glykanů lidského IgA1	13
Obrázek č. 5: Schéma domén stafylokokového proteinu A.....	19
Obrázek č. 6: Schéma plazmidu pro těžký řetězec IgG (1123 IgG HCH).....	20
Obrázek č. 7: Schéma plazmidu pro lehký řetězec IgG (1123 Lambda LCH).....	20
Obrázek č. 8: Schéma Bürkerovy komůrky.....	26
Obrázek č. 9: Schéma komponentů ELISA testu	34
Obrázek č. 10: Agarózová elektroforéza transformace chemokompetentních bakterií <i>E. coli</i> , kmen TOP 10, plazmidy pro těžký (HCH) a lehký řetězec (LCH).....	38
Obrázek č. 11: Detekce molekuly IgG po purifikaci pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue.....	39
Obrázek č. 12: Western blot vypurifikovaných molekul IgG.....	40
Obrázek č. 13: Detekce molekuly IgG po purifikaci pomocí srážením síranem amonným barvením Coomassie Brilliant Blue	41
Obrázek č. 14: Detekce molekuly IgG po purifikaci pomocí proteinu A barvením Coomassie Brilliant Blue	42
Obrázek č. 15: Detekce molekuly IgG western blottingem po purifikaci pomocí proteinu A	43
Obrázek č. 16: Detekce molekuly IgG western blottingem po purifikaci pomocí proteinu A v objemu 80 ml za redukujících podmínek	44
Obrázek č. 16: Detekce molekuly IgG western blottingem po purifikaci pomocí proteinu A v objemu 80 ml za redukujících podmínek	45
Graf č.1: Tvorba imunokomplexu IgG (1123) s deglykosylovaným IgA v ELISA testu.....	46
Graf č.2: Tvorba imunokomplexu IgG (1123) s deglykosylovaným IgA v ELISA testu.....	48

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Biologické vlastnosti tříd lidského imunoglobulinu.....	7
Tabulka č. 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti tříd lidského imunoglobulinu.....	8
Tabulka č. 3: Příprava transfekčních reagensů v objemu 10 ml buněčné kultury.....	27
Tabulka č.4: Zásobní koncentrace použitých plazmidů pro transfekci	27
Tabulka č. 5: Příprava transfekčních reagensů v objemu 80 ml buněčné kultury.....	28
Tabulka č. 6: Množství pevného síranu amonného (g), které je potřeba přidat k 1 litru roztoku, aby se dosáhlo žádané změny v procentech nasycení roztoku síranem amonným.	29
Tabulka č. 7: Příprava 10% polyakrylamidového gelu.....	31
Tabulka č. 7: Příprava jednotlivých vzorků pro ELISA test.....	35
Tabulka č. 8: Výsledky měření koncentrace DNA po izolaci	37
Tabulka č. 9: Naměřené absorbance v jednotlivých jamkách na ELISA destičce	46
Tabulka č. 10: Naměřené absorbance v jednotlivých jamkách na ELISA destičce	47

1 Úvod

IgA nefropatie představuje nejčastější primární glomerulonefritidu na světě. Toto onemocnění je charakterizováno hematurií, proteinurií a společným ukládáním IgA a IgG v glomerulárním mesangiu (D'Amico, 2000). Prokázání vzniku IgA nefropatie vyžaduje několik faktorů. Prvním faktorem je prokázání přítomnosti abnormálně glykosylovaného IgA1. Druhým faktorem je přítomnost protilátek (IgG, IgA) specificky rozlišujících abnormálně glykosylovaný IgA1, což má za následek vznik imunitních komplexů. Třetím faktorem je ukládání cirkulujících komplexů do mezangia ledvin, což vede ke stimulaci a proliferaci mezangiálních buněk. Konečným stádiem je ztráta filtrační funkce glomerulů. Přesnější určení struktury a funkce imunitních komplexů, a hlavně jejich biologické aktivity by mohlo poskytnout zásadní informace pro efektivní inhibici imunitních komplexů, které by mohly být specificky použity pro terapeutické postupy (Tomana *et al.*, 1997).

Praktickou náplní diplomové práce je exprimovat v buněčné linii HEK 293F molekulu IgG od pacienta s IgA nefropatií a připravit ji pro další experimenty. Jako pozitivní kontrola byla použita imunoglobulin široce neutralizující protilátka označená jako VRC01, o které je známo, že se dobře exprimuje. K transfekci buněčné linie byly použity plazmidy pro těžký a lehký řetězec IgG, které byly namnoženy a pročištěny transformací bakterií *Escherichia coli*, kmen TOP 10. Na transfekci navazovala optimalizace purifikace rekombinantního imunoglobulinu a charakterizace této protilátky.

2 Cíl práce

Teoretická část této práce se zabývá vypracováním literární rešerše zaměřené na význam protilátek v patogenezi IgA nefropatie.

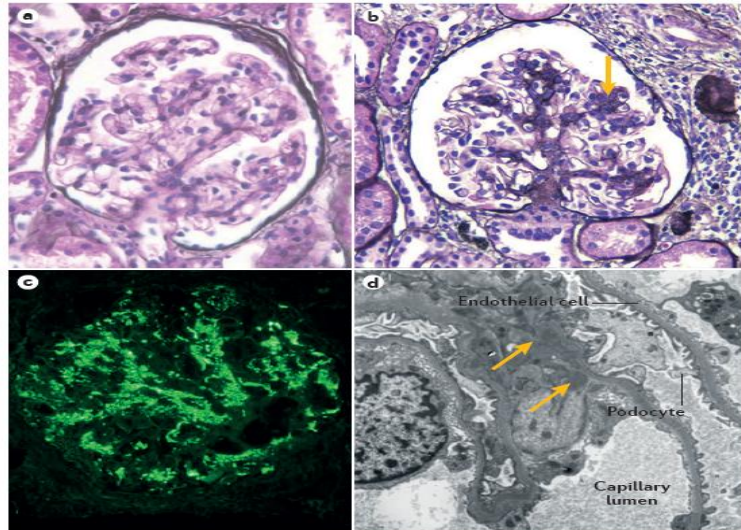
V praktické části je hlavním cílem optimalizace metody transfekce buněk HEK 293F plazmidy pro lehký a těžký imunoglobulinový řetězec, dále optimalizace purifikace produktů za využití afinitní chromatografie a charakterizace produktů (koncentrace, čistota, vazba antigenu).

3 Literární přehled

3.1 IgA nefropatie

IgA nefropatie (IgAN), také nazývána po svém objeviteli jako Bergerova choroba, byla poprvé popsána v roce 1968. IgAN je jednou z nejčastějších příčin glomerulonefritidy na světě a je imunochemicky charakterizována společným ukládáním IgA a IgG v glomerulárním mesangiu. Přibližně 30 až 40 % pacientů s IgAN trpí hematurií, proteinurií a renální dysfunkcí. Patří mezi autoimunitní onemocnění a finální diagnóza vždy vyžaduje renální biopsii (obrázek č.1) pro vyšetření kortikální tkáně ledvin imunohistochemickými technikami (Novak *et al.*, 2001; Tumlin *et al.*, 2004; Barratt *et Feehally*, 2005). U pacientů s tímto onemocněním vedou změny glykanové struktury v jedinečné pantové oblasti těžkých řetězců molekul IgA1 k vystavení antigenních determinant, které jsou rozpoznávány přirozeně se vyskytujícími antiglykanovými protilátkami. Výsledkem je, že se v oběhu tvoří imunitní komplexy. Mezi histologické znaky, které svědčí o méně příznivé diagnóze, patří mezangiální hypercelularita, segmentální glomeruloskleróza, endokapilární hypercelularita a tubulární atrofie (Herzenberg *et al.*, 2011; Mestecky *et al.*, 1999).

IgAN postihuje jedince všech věkových skupin, nejčastěji je však diagnostikován u dětí a mladých dospělých (Galla *et al.*, 1995). Pacienti převyšují počet pacientek až trojnásobně, a i v konečném stádiu je selhání ledvin častější u mužů. Přetrvávající renální poškození vede v konečném stádiu k selhání ledvin u 20–40 % pacientů do 20 let od diagnózy (Donanio *et Grande*, 2002). Výskyt nemoci se v jednotlivých zemích liší (Levy *et Berger*, 1988). Japonsko a Korea mají nejvyšší zaznamenanou incidenci onemocnění pravděpodobně kvůli rozsáhlému screeningu dětí pro močové abnormality (Levy *et Berger*, 1988; Galla *et al.*, 1995). Například přibližně 50 % nových případů glomerulonefritidy v Japonsku je způsobeno IgAN, na rozdíl od Spojených států a západní Evropy, kde IgAN představuje 30% glomerulonefritidy (Galla *et al.*, 1995). Ačkoli tyto rozdíly mohou odrážet rozdíly ve veřejném zdravotnictví, nebo ochotu nefrologů provádět diagnostické biopsie, zdá se, že určité populace mají genetickou predispozici k vývoji IgAN (D'Amico, 2000).



Obrázek č.1: Renální biopsie u pacienta s IgA nefropatií: a-světelný mikroskopický obraz normálního glomerulu (200 × zvětšení), b-světelný mikroskopický snímek glomerulu ukazující mírné zvýšení mezangiální matrice a celularity (200 × zvětšení), c-imunofluorescenční snímek glomerulu ukazující silné zrnité zbarvení IgA v mesangiu (200 × zvětšení) d-transmisní elektronový mikroskop mesangia prokazující elektronově husté mezangiální vklady (5 000 × zvětšení) (převzato od Lai *et al.*, 2016)

Příčina primární IgAN není dosud známa a nebyly zjištěny žádné konzistentní infekční nebo enviromentální vlivy, které by byly za ni odpovědné (Habib, 1994). Předpokládá se, že cirkulující imunokomplexy (CIC) složené z IgA1, C3 a IgG jsou zapojeny do patogeneze onemocnění (Coppo *et al.*, 1982). Analýzy sérového IgA od pacientů s IgAN odhalily významné změny v glykanových postranních řetězcích (Tomana *et al.*, 1997). Narozdíl od IgG, IgM a IgA2 obsahuje lidský IgA1 N- a O-vázané glykany, které jsou vázané na serinové a threoninové zbytky v jedinečné pantové oblasti tohoto izotypu (Mattu *et al.*, 1998). Molekuly IgA1 od pacientů s IgAN vykazují pozměněné glykanové skupiny, obvykle se sníženým obsahem galaktózy (Mestecky *et al.*, 1993).

3.2 Patogeneze IgA nefropatie

Klinická pozorování pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin, prokázala, že IgA je systémovým onemocněním. U části pacientů totiž po transplantaci zdravé ledviny dojde k jejímu opětovnému poškození (Galla *et al.*, 1995). Glomerulární IgA depozity u IgA nefropatie jsou výhradně podtřídy IgA1. Počátek IgAN může být spojen

s infekcemi horních cest dýchacích. Proto se předpokládalo, že IgAN je výsledkem hyperaktivity mukózního imunitního systému (Barratt *et Feehally*, 2005). Protože rysy IgA nefropatie identifikované světelnou mikroskopií jsou nespecifické, jsou nezbytné imunomikroskopické vyšetření pro stanovení definitivní diagnózy IgA nefropatie (Radford *et al.*, 1997). V raných stádiích nemoci mnoho pacientů nemá zjevné příznaky a není si vědomo žádných problémů. U těchto pacientů může být podezření na IgA nefropatii pouze během rutinního screeningu nebo vyšetření z jiných příčin (Donanio *et Grande*, 2002).

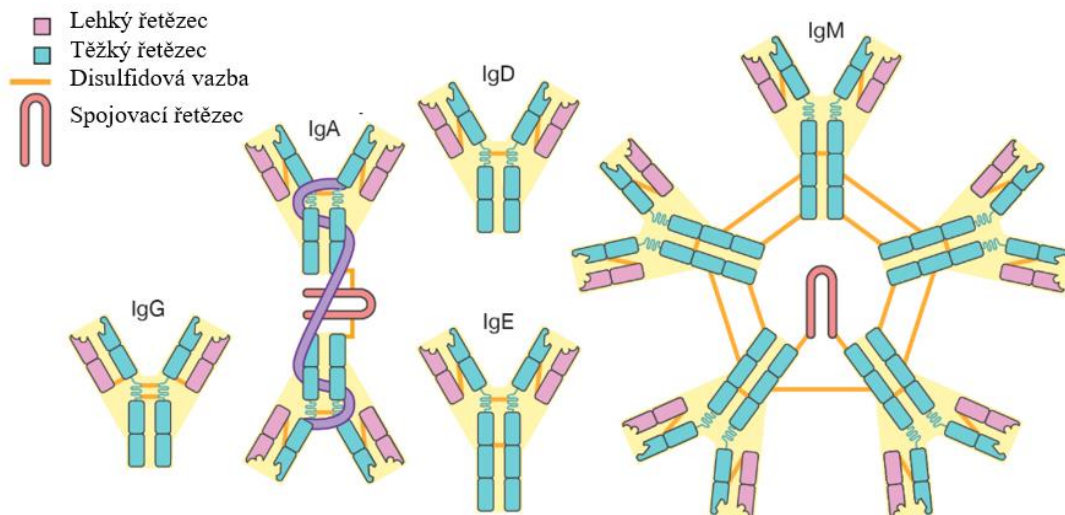
Difuzní mezangiální lokalizace IgA ve vzorcích biopsie ledvin od pacientů s IgAN je nejvýznamnějším rysem onemocnění. Ukázalo se však, že kromě idiopatické IgAN sdílí tento společný imunopatologický rys s několika dalšími nemocemi, jako je Henoch-Schoenleinova purpura, celiakie, alkoholická jaterní cirhóza a dermatitida herpetiforma (Berger, 1968).

3.3 Imunoglobuliny

Posláním imunitního systému je rozpoznat a zničit patogenní mikroorganismy napadající hostitele, případně zničit jeho vlastní pozměněné buňky. Aby byl imunitní systém aktivován, musí cizí látka reagovat s membránovými nebo cirkulujícími receptory, které vyvolávají konečnou odpověď. Tento úkol je realizován dvěma odlišnými, ale spolupracujícími systémy (Cohen, 2002). Krev obsahuje tři typy globulinů (α , β a γ) na základě jejich elektroforetické migrační rychlosti. Protilátky patří do γ -globulinové rodiny (imunoglobuliny) a reagují specificky s antigenem, který stimuluje jejich produkci. Tvoří asi 20 % bílkovin v krevní plazmě a existuje 5 podtříd: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE (Levinson, 2014).

Nejdůležitější funkcí protilátek je neutralizace toxinů a virů, opsonizace mikroorganismů tak, aby byly snadněji fagocytovány, aktivace komplementu a zabránění navázání mikrobů na slizniční povrchy (Levinson, 2014). Spektrum receptorů přítomných na povrchu buněk přirozeného imunitního systému je stanoveno geneticky, ale nemůže odpovídat obrovské variabilitě mikrobiálních antigenních epitopů. Je proto potřeba flexibilnější systém, který by čelil nespočetnému množství činidel a látek, které přicházejí do styku s hostitelem. Tento druhý mechanismus známý jako adaptivní imunita, zahrnuje imunoglobuliny, které jsou schopny vyrovnat se s neustále měnícími antigeny a jsou kódovány geny, které jsou schopné podstoupit somatickou rekombinaci a hypermutaci (Berlot *et al.*, 2015). Označuje se jako

adaptivní, neboť jejich konečný vývoj probíhá až po styku s příslušným antigenem, kdy se aktivují převážně ty složky, které mají antigenně specifické receptory pro daný antigen. K rozvoji specifické imunitní reakce dochází v průběhu několika dnů až týdnů. Charakteristickým rysem těchto reakcí je vznik imunologické paměti. Specifická imunitní reakce se odehrává převážně v sekundárních lymfatických orgánech.



Obrázek č.2: Schématické znázornění různých tříd imunoglobulinů (převzato od Encyclopaedia Britannica)

Humorální složky specifické imunity jsou imunoglobuliny, které jsou produkty plazmocytů diferenciovaných z B lymfocytů, které se vyvíjejí z hematopoetického prekursoru v kostní dřeni etapami, při nichž dochází postupně k přeskupení genů kódujících těžké a lehké řetězce imunoglobulinů (Bartůňková, 2002).

Imunoglobuliny jsou heterodimerní proteiny složené ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců (Schroeder *et Cavacini*, 2010). Pojmy lehký a těžký řetězec se vztahují k molekulové hmotnosti (Levinson, 2014). Dva těžké řetězce jsou kovalentně spojeny pomocí disulfidických můstků, které také připojují lehký řetězec ke každému těžkému řetězci. Molekulová hmotnost lehkých řetězců je přibližně 25 kDa a těžkých řetězců 50-75 kDa (Hořejší *et al.*, 2017). Lehký řetězec je společný pro všechny třídy a má jednu variabilní a jednu konstantní oblast. Lehké řetězce většiny obratlovců existují ve dvou odlišných formách zvaných kappa (κ) a lambda (λ). Jedná se o izotypy a kódují je odlišné geny.

Třídy i podtřídy imunoglobulinové molekuly jsou určeny typem těžkého řetězce. Čtyři lidské IgG podtřídy (IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4) mají těžké řetězce zvané γ_1 , γ_2 , γ_3 a γ_4 , které se od sebe mírně liší. Existují také podtřídy lidského IgA (IgA1 a IgA2). U IgM, IgD a IgE nejsou známy žádné podtřídy. Tento rozsah tříd a podtříd je známý jako izotypová variace. Každá molekula imunoglobulinu je bifunkční. Mohou být funkčně rozděleny do variabilních domén, které vážou antigeny a konstantních domén, které specifikují efektorové funkce, jako je aktivace komplementu nebo vazba na Fc receptory (Roitt *et al.*, 2001). Variabilní domény jsou vytvořeny pomocí komplexní řady událostí genového přeskupení a mohou být poté vystaveny somatické hypermutaci po expozici antigenu (Schroeder *et Cavacini*, 2010).

Tabulka č. 1: Biologické vlastnosti tříd lidského imunoglobulinu (převzato od Bartůňková, 2002)

Izotyp	Lokalizace	Funkce
IgG	sérum, intersticiální tekutina	opsonizace, neutralizace, aktivace komplementu, průnik placentou, sekundární protilátková reakce
IgA	sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, kolostrum, mateřské mléko	ochrana sliznic, opsonizace
IgM	sérum, membrána B lymfocytů	aktivace komplementu, primární protilátková reakce
IgD	sérum, membrána B lymfocytů	receptor pro antigen na B lymfocytech
IgE	sérum, intersticiální tekutina	ochrana proti parazitům, alergické reakce

IgG je hlavním imunoglobulinem v normálním lidském séru, což představuje 70-75 % celkového množství imunoglobulinů. IgG se sestává z jediné γ -řetězové molekuly s molekulovou hmotností 146 000 Da (Roitt *et al.*, 2001). Molekulu imunoglobulinu lze za vhodných podmínek proteolyticky rozštěpit na fragmenty (Hořejší *et al.*, 2017). Enzym papain štěpí IgG na dva fragmenty Fab, nichž každý může vázat antigen a jeden fragment Fc (Schroeder *et Cavacini*, 2010). Pantová oblast představuje místo, kde jsou těžké řetězce spojeny disulfidickými můstky. Imunoglobuliny jsou stejně jako ostatní sekretované proteiny glykoproteiny, protože jsou těžké řetězce v Fc části glykosylovány (Hořejší *et al.*, 2017).

Tabulka č. 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti tříd lidského imunoglobulinu (převzato od Roitt *et al.*, 2001)

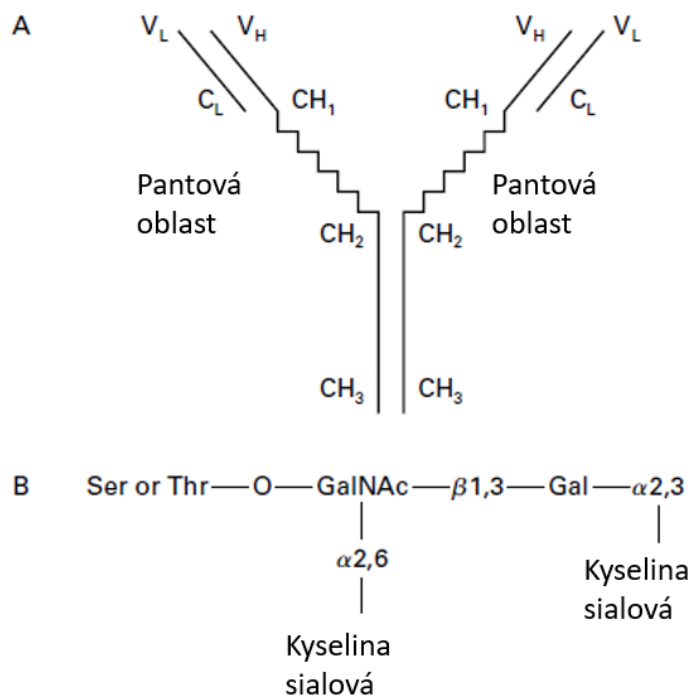
Vlastnost	Typ imunoglobulinu									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	sIgA	IgD	IgE
Těžký řetězec	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	α_1/ α_2	δ	ϵ
Průměrná koncentrace v séru (mg/ml)	9	3	1	0,5	1,5	3	0,5	0,05	0,03	0,00005
Molekulová hmotnost ($\times 10^3$)	146	146	170	146	970	160	160	390 (dimer) 690 (tetramer)	184	180
Intravaskulární distribuce (%)	45	45	45	45	80	42	42	stopová	75	50

3.4 Imunoglobulin A

IgA je běžně uznáván jako nejrozšířenější třída protilátek na sliznicích s důležitou úlohou při jejich obraně. V lidském těle se denně produkuje více IgA než všech ostatních imunoglobulinových izotypů (Woof *et Kerr*, 2006). Kromě toho, že je nejvýznamnější třídou protilátek na mukózních površích, je IgA druhou převažující protilátkou v oběhu (Macpherson *et al.*, 2001). Analýza genetických sekvencí a funkční srovnání ukázaly, že IgA je přítomen u všech savců a ptáků. U savců gen C kóduje konstantní oblast těžkého řetězce, který definuje třídu IgA protilátek. Podobně jako všechny imunoglobuliny, jsou molekuly IgA tvořeny párováním dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců. U lidí je IgA v séru hlavně monomerní obsahující 90 % IgA1 a 10 % IgA2. Základní monomerní jednotka IgA, společná se všemi protilátkami, je uspořádaná do dvou identických oblastí Fab, které vážou antigen, vázané prostřednictvím pantové oblasti na oblast Fc, která zprostředkovává efektorové mechanismy (Woof *et Mestecky*, 2005). Vzhledem k pružnosti obou Fab fragmentů, může mít molekula tvar Y nebo T (Boehm *et al.*, 1999).

IgA je produkován buňkami linie B-lymfocytů, jak v periferní, tak v mukózní lymfoidní tkáni (NcNabb *et Tomasi*, 1981). Specifické buňky produkující IgA v mukózním epitelu poskytují humorální ochranu před patogeny přenášenými

aerosolem, kontaktem a stravou (Underdown *et* Schiff, 1986). IgA v plazmě, mozkomíšním moku a střevní tekutině je přítomen v nižších koncentracích a je převážně ve formě monomerů (mIgA). Na rozdíl od toho, molekulární formy IgA v externích sekretech jsou vysoce heterogenní. Zde mIgA obvykle představuje jen malou část celkového IgA a většina IgA je přítomna ve formě dimerů a tetramerů, ve kterých jsou mIgA monomery spojeny prostřednictvím dalšího malého polypeptidu nazývaného J-řetězec, který je charakteristicky přítomen v polymerním IgA (pIgA) a IgM (Koshland, 1985). J-řetězec je o velikosti 15-16 kDa je přítomný v polymerních imunoglobulinech a vykazuje rychlou elektroforetickou mobilitu a spojuje se s disulfidovými můstky k Fc fragmentu polymerního IgM nebo IgA (Woof *et* Mestecky, 2005).



Obrázek č. 3: Struktura molekuly IgA1: (A) struktura O-vázaných cukrů na serinové nebo threoninové zbytky v pantové oblasti IgA1 (B) CH₁, CH₂, CH₃-konstatní oblasti těžkého řetězce, V_H-variabilní oblast těžkého řetězce, C_L a V_L-označují konstantní a variabilní oblasti lehkého řetězce (převzato od Donanio *et* Grande, 2002)

Distribuce podtříd IgA se značně liší mezi různými vnějšími sekrety. Obecně sekrece horních cest dýchacích a trávicího traktu obsahují více IgA1, zatímco sekrece tlustého střeva obsahují více IgA2 (Brandtzaeg *et* Johansen, 2005). IgA1 a IgA2 se liší v pantové oblasti. IgA1 má delší pantovou oblast se zdvojenými úseky aminokyselin,

kteře u IgA2 chybí. Tato prodloužená pantová oblast těžkého řetězce IgA1 zvyšuje citlivost k selektivnímu proteolytickému štěpení specifickými proteázami, které produkují některé patogenní bakterie jako je *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. Pantová oblast je částečně chráněna glykany (Mestecky *et al.*, 1999). Takto je navázáno 3 až 6 glykanů pomocí O-glykosylové vazby na zbytky serinu nebo threoninu (Tarelli *et al.*, 2004). Glykany jsou tvořeny z N-acetylgalaktosaminu (GalNAc), galaktózy (Gal) a kyseliny sialové. V sérovém IgA se hojně vyskytuje disacharid Gal-GalNAc s jednou nebo dvěma připojenými sialovými kyselinami (Novak *et al.*, 2001).

Zvýšené hladiny IgA a IgA-obsahující cirkulující komplexy se nacházejí v séru většiny pacientů s IgAN (D'Amico, 2000). Přítomnost J-řetězců v glomerulech pacientů s IgAN vedla mnoho vědců k závěru, že polymerní komplexy IgA se sníženou glykosylací v pantové oblasti molekuly vykazují vyšší aviditu pro vazbu na mezangiální buňky (Novak *et al.*, 2008). Snížená glykosylace v pantové oblasti usnadňuje nejen tvorbu polymerního IgA1, ale také přispívá k jeho rozpoznání jako neoantigenu a následně tvorbě IgG autoprotiátěk proti Gal-deficientním IgA1 molekulám. Následně se buď Gal-deficientní IgA1 nebo IgG autoprotiátka proti IgA1 navážou na CD89 receptor, který je exprimovaný na povrchu mezangiálních buněk, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů, náboru cirkulujících buněk a zjevnému zánětu (Floege *et Feehally*, 2000).

3.5 Cirkulující imunitní komplexy

Mezangiální buňky představují primární cíl pro patogenní depozity, které jsou vytvořené cirkulujícími imunitními komplexy nebo depozity aberantně glykosylovaného IgA1, po čemž následuje vazba nově generovaných anti-glykanových protiátěk za vzniku imunitních komplexů (Glassok, 2011). Komplexy u pacientů s Henoch-Schoenleinovou purpurou se sestávají z IgA, ale nikoliv z IgG a mají menší molekulovou hmotnost než komplexy nalezené u pacientů s IgAN. Protože se u těchto osob nevyvíjí zjevné renální onemocnění, lze předpokládat, že tyto komplexy IgA nevytváří nefritidu (Levinsky *et Barratt*, 1979). Analogicky s jinými chorobami způsobenými imunitními komplexy je pravděpodobné, že v IgAN molekulární podíl antigenů (IgA1 s nedostatkem galaktózy) a protiátěk (IgG nebo IgA1) určuje velikost vytvořených imunitních komplexů a následně jejich rychlost odstranění z oběhu, jakož

i biologická aktivita. Patogenní cirkulující imunitní komplexy IgA1-IgG u pacientů s IgAN jsou relativně velké (800 kDa), a proto je lze vyloučit ze vstupu do jaterního prostoru k dosažení asialoglykoproteinového receptoru na hepatocytech, což je normální katabolická cesta pro cirkulující IgA1 (Suzuki *et al.*, 2011).

Biologická aktivita velkých cirkulujících imunitních komplexů s Gal-deficientní IgA1 se zvyšuje u pacientů s IgAN během epizod makroskopické hematurie (Novak *et al.*, 2008). Není však známo, zda je toto zvýšení aktivity způsobeno větší produkcí Gal-deficientního IgA, anti-glykanovými protilátkami nebo jinými nedefinovanými faktory ovlivňující tvorbu těchto komplexů nebo jejich složení (Novak *et al.*, 2001). Glomerulární poškození IgAN se projevuje jako proliferace mezangiálních buněk a expanze složek extracelulární matrix (Lai *et al.*, 2009). Hodnocení biologické aktivity komplexů IgA1 ukázalo, že komplexy IgA1 s velkou molekulovou hmotností stimulovaly buněčnou proliferaci. Naopak frakce zbavené IgA1 neměly stimulační aktivitu (Suzuki *et al.*, 2003).

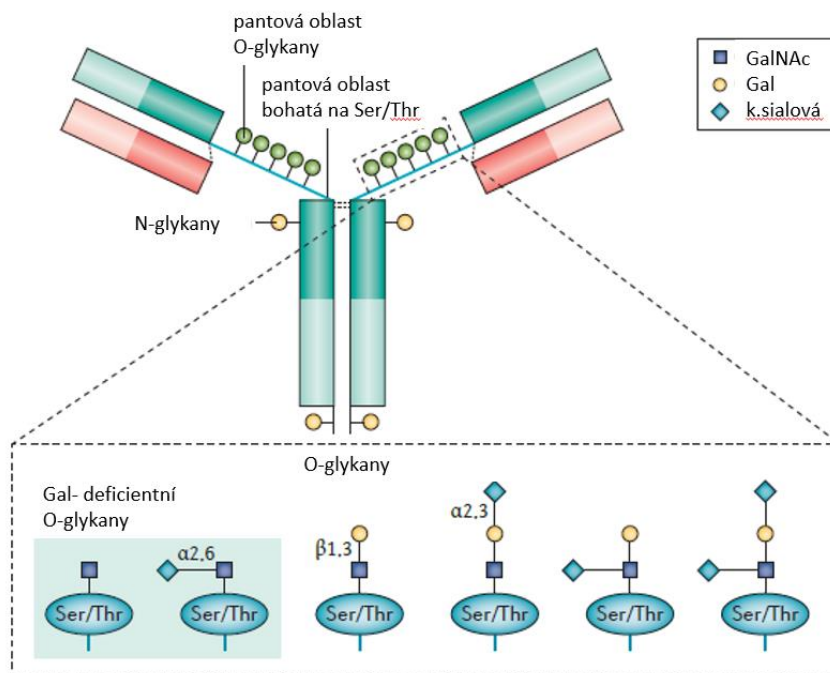
Imunitní komplexy od pacientů s IgAN obsahující IgA1 s nedostatkem galaktózy se vážou na buňky účinněji než nekomplexované IgA1 nebo imunitní komplexy ze zdravých kontrol. Komplexy s IgA1 s nedostatkem galaktózy indukují kultivované lidské mezangiální buňky, aby proliferovaly, vylučovaly komponenty extracelulární matrice a uvolňovaly humorální faktory, jako je TNF, IL-6 a TGF. Tyto faktory mohou změnit expresi genů podocytů a glomerulární permeabilitu (Lai, 2009). Výsledkem je, že tyto imunitní komplexy vstupují do renální cirkulace. Díky jedinečnému umístění mezangia mezi fenestrovanou endoteliární výstelkou kapilár a glomerulární bazální membránou je mezangium náchylné ke ukládání imunitních komplexů (Sterzel *et al.*, 1982). Cirkulující imunitní komplexy, obsahující zejména aberantně glykosylovaný IgA1, hrají klíčovou roli v patogenezi IgA nefropatie (Novak *et al.*, 2008). Aberantně glykosylované molekuly IgA1 mají zvýšenou tendenci jak k agregaci, tak k tvorbě komplexů antigen-protilátka a protilátkami IgG namířeným proti pantové oblasti IgA1 epitopů, což podporuje tvorbu IgA-imunitních komplexů (Van der Boog *et al.*, 2005). Tvorba imunitních komplexů, jejich ukládání do mezangia a iniciace glomerulárního zánětu jsou ovlivněny složením pantové oblasti IgA1 a stupněm glykosylace IgA (Sato *et al.*, 2002). Předpokládá se, že aktivace glomerulárního komplementu zvyšuje zánětlivou kaskádu a zesiluje glomerulární poškození (Barratt *et al.*, 2007).

3.6 O-glykosylace

K rozvoji IgA nefropatie přispívají nejméně čtyři procesy. Mezi procesy, které indukují poškození ledvin patří aberantní glykosylace IgA1, syntéza protilátek proti IgA1 s nedostatkem galaktózy, vazba Gal-deficientní IgA1 s anti-glykan glykopeptidovými protilátkami za vzniku imunitních komplexů a akumulace těchto komplexů v glomerulárním mezangiu iniciující poškození ledvin (Suzuki *et al.*, 2011).

Pacienti s IgAN mají často geneticky stanovené zvýšení cirkulujících hladin IgA1 s O-glykany s nedostatkem galaktózy v pantové oblasti. Tato aberace však nestačí k vyvolání poškození ledvin. Syntéza a vazba protilátek namířených proti Gal-deficientnímu IgA jsou nutné pro tvorbu imunitních komplexů, které se hromadí v glomerulárním mezangiu. Tyto imunitní komplexy aktivují mezangiální buňky, což vyvolává proliferaci a sekreci extracelulární matrice, cytokinů a chemokinů, což vede k poškození ledvin (Coppo *et al.*, 1984).

Glykosylace hraje důležitou roli při produkci, údržbě, manipulaci a funkci všech glykoproteinů a vyskytuje se během a bezprostředně po syntéze proteinů. Společně s jinými imunoglobuliny a mnoha dalšími proteiny z lidského těla je lidský IgA silně glykosylovaný (Ohtsubo *et Marth*, 2006). Cukry jsou připojeny k proteinům prostřednictvím dvou typů vazeb. N-vázané cukry jsou komplexní struktury spojené s asparaginovými zbytky a jsou běžné na cirkulujících proteinech (Allen *et al.*, 2001). Patří mezi nejčastější a obvykle se skládají z komplexních rozvětvených řetězců (Arnold *et al.*, 2007). O-vázané cukry se skládají z N-acetylgalaktosaminu vázaného na serin nebo threonin. Galaktóza je navázaná na N-acetylgalaktosamin prostřednictvím β -1,3 vazeb a kyselina sialová je připojena ke galaktóze nebo N-acetylgalaktosaminu prostřednictvím α -2,3 vazeb (Allen *et al.*, 2001). Jsou jednodušší a rozšířené na buněčných povrchových proteinech, ale neobvyklé na cirkulujících a sérových proteinech (Donatio *et Grande*, 2002). IgA1 je jeden z mála proteinů v séru, který má N-vázané i O-vázané cukry, které leží v pantové oblasti molekuly. Pantová oblast je tvořena 17 aminokyselinami, z nichž alespoň 6 je na O-vázaných glykosylačních místech (Tarelli *et al.*, 2004).



Obrázek č. 4: Struktura O-glykanů lidského IgA1 (převzato od Lai *et al.*, 2016).

O-vázané cukerné řetězce jsou strukturou jádra 1 založené na N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) v O-vazbě se serinem nebo threoninem. Toto jádro GalNAc je obvykle dále rozšířeno o galaktózu v konfiguraci α -2,6 nebo β -1,3 a jednu nebo dvě jednotky kyseliny sialové v konfiguraci α -2,6 nebo β -2,3. Na rozdíl tomu, IgA2 nemá pantovou oblast a nenesou žádné O-vázané cukry (Barratt *et al.*, 2007). Monomer IgA1 se sestává ze dvou těžkých řetězců, z nichž každý má až devět potenciálních míst O-glykosylace (ačkoliv nemusí být všechny obsazeny) a nese v oblasti pantu několik těsně sousedících O-vázaných cukrů, což zajišťuje těsné shlukování kyseliny sialové, galaktózy a GalNAc zbytků, jejichž variace mohou mít významné účinky na celkové fyzikálně-chemické vlastnosti IgA1 molekuly (Barratt *et Feehally*, 2005).

V nepřítomnosti galaktózy je koncovým cukrem N-acetylgalaktosamin. Následně jsou tyto cukerné části pantové oblasti rozpoznány přirozeně se vyskytujícími protilátkami s peptidovými specifitami pro antiglykany a antipantové oblasti a vytváří se cirkulující imunitní komplexy (Novak *et al.*, 2008).

Zkoumání buněk produkujících IgA1 však ukazuje, že aberantní O-glykosylace v IgAN je vedena kombinovanými abnormalitami v expresi nebo aktivitě

glykosyltransferáz zapojených do sekvenční posttranslační modifikace IgA1, což implikuje komplexní regulační defekty (Suzuki *et al.*, 2009). Aberantně glykosylovaný IgA1 v krvi pacientů s IgAN se nachází téměř výhradně v imunitních komplexech navázaných na protilátky IgG nebo IgA (Suzuki *et al.*, 2011).

3.7 Biosyntéza O-vázaných glykanů na IgA1

O-vázané glykany se syntetizují postupně, počínaje připojením N-acetylgalaktosaminu k serinu nebo threoninu a tato reakce je katalyzována uridin-5'-difosfo-N-acetylgalaktosaminyl transferázou 2 (GalNacT2) (Piller *et al.*, 1990). O-glykanový řetězec je pak prodloužen postupným připojením zbytku galaktózy nebo kyseliny sialové k N-acetylgalaktosaminu (Ju *et al.*, 2002). Přidání galaktózy je zprostředkováno jádrem 1 β -1,3-galaktosyltransferázy (C1 β 3GalT1), která přenáší galaktózu z UDP-galaktózy na zbytek N-acetylgalaktosaminu. Stabilita tohoto enzymu závisí na jeho interakci s C1 β 3GalT1-specifickým molekulárním chaperonem (Cosmc). V nepřítomnosti Cosmc je protein C1 β 3GalT1 rychle degradován, což má za následek podgalaktosylaci N-acetylgalaktosaminu v O-vázaných glykanech (Novak *et al.*, 2008).

Glykanová struktura je dokončena sialyltransferázami, které vážou negativně nabitou kyselinu sialovou na galaktózové nebo N-acetylgalaktosaminové zbytky. Sialylace N-acetylgalaktosaminu v buňkách sekretujících IgA1 je zprostředkována N-acetylgalaktosaminem-specifickou α -2,6-sialyltransferasou (Raska *et al.*, 2007). Pokud je kyselina sialová navázána na N-acetylgalaktosamin před připojením galaktózy, tato předčasná sialylace vylučuje následné připojení zbytku galaktózy (Novak *et al.*, 2001).

IgA1 O-glykosylace probíhá v Golgiho aparátu a je prováděna sekvenčním působením vysoce specifických glykosyltransferáz (Iwasaki *et al.*, 2003). Změna v profilu O-glykosylace sérového IgA1 v IgAN má nepochybně zásadní význam pro vývoj IgAN. Nyní je zřejmé, že změny v rozsahu glykosylace a sialylace IgA1 jsou úzce regulovány a závisí na okolnostech setkávání se s antigenem (Barratt *et al.*, 2007).

3.8 Tvorba imunitních komplexů a glomerulární poškození

IgG a IgA1 autoprotilátky rozpoznávají Gal-deficientní IgA1 (GdIgA1) glykanově specifickým způsobem (Tomana *et al.*, 1997). Serinový zbytek je nezbytný pro účinnou vazbu na GdIgA1. Rozpoznání GdIgA1 autoprotilátkami vede k tvorbě nefritogenních imunitních komplexů a k aktivaci komplementu prostřednictvím alternativní nebo lektinové dráhy (Maillard *et al.*, 2015). Biologické aktivity těchto komplexů jsou ovlivněny různými faktory, jako je velikost a složení komplexu (Tomana *et al.*, 1997). Aktivace mezangiálních buněk komplexy obsahujícími GdIgA1 vyžaduje CD89 a transglutaminázu 2 pro vývoj nemoci (Berthelot *et al.*, 2012). Fc fragment IgA receptoru (FCAR) je lidský gen kódující transmembránový glykoproteinový receptor FcαRI, také známý jako CD89. Je exprimovaný na buňkách, jako neutrofilů, eozinofilů a monocytů. CD89 váže obě podtřídy IgA ve všech svých molekulárních formách a hraje roli v protizánětlivých odpovědích v závislosti na stavu navázaného IgA (Kremer *et al.*, 1992; Morton *et al.*, 2001). Bylo prokázáno, že navázání IgA na membránový CD89 je spojeno s masivním mezangiálním ukládáním IgA1 (Hiki *et al.*, 1996).

Poškození podocytů, které obvykle vede k proteinurii, může zahrnovat apoptózu, nekrózu, oddělení od glomerulární bazální membrány a defektní autofagii. Ukládání IgA, IgG a komplementu do glomerulárních kapilárních stěn a přítomnost cytokinů nebo relativních kyslíkových radikálů produkovaných rezidentními glomerulárními buňkami může také vyvolat poškození podocytů (Lai *et al.*, 2016).

3.9 Faktory podporující ukládání IgA

Ne všechna depozice IgA v mezangiálních buňkách je spojena s rozvojem glomerulárního zánětu a ani depozice IgA není nevyhnutelně nezvratná. Mezangiální depozity IgA1 mizí, když jsou ledviny se subklinickým IgAN neúmyslně transplantovány příjemcům, kteří původně IgAN neměli a klinická remise je doprovázena vymizením IgA depozitů (Allen *et al.*, 1999). Makromolekulární imunoglobuliny jsou zvláště náchylné k mezangiálnímu ukládání. Zvýšené hladiny sérových IgA makromolekul v IgAN podporují mezangiální depozici prostřednictvím nescifické velikosti závislého mezangiálního zachycení, zvýšeného defektem O-glykosylace. V IgAN dochází k akumulaci mezangiální IgA, protože rychlost

ukládání IgA překračuje clearanční kapacitu nebo uložený IgA je nějakým způsobem odolný vůči mezangiální clearanci (Barratt *et al.*, 2007).

3.10 Biomarkery IgA nefropatie

Definitivní diagnóza IgA nefropatie vyžaduje renální biopsii, protože neexistuje žádný platný neinvazivní test jako diagnostická alternativa (Julian *et al.*, 1999). Renální biopsie představuje riziko závažných krvácivých komplikací a toto riziko má zásadní negativní dopad na péči o pacienty s IgAN (Eiro *et al.*, 2005). Existuje tedy naléhavá potřeba spolehlivého neinvazivního diagnostického testu, který může být použitelný pro detekci subklinického IgAN, odhad míry aktivity, sledování progresu nebo snížení poškození ledvin a posouzení účinnosti léčby, přičemž se zabrání opakovaným renálním biopsiím (Julian *et al.*, 2007).

Koncentrace několika cytokinů zapojených do proliferace a reparace v moči byla hodnocena jako potenciální biomarker histopatologických změn a prediktor dlouhodobé diagnózy. Hladiny IL-6 v moči byly zvýšené u pacientů s několika typy glomerulonefritidy, výsledky však nebyly specifické pro jednotlivé choroby (Hrvacevic *et al.*, 1996). Bylo také prokázáno, že vylučování IL-6 močí předpovídá dlouhodobý špatné renální parametry u pacientů s IgAN (Harada *et al.*, 2002). Vylučování IL-6 a epidermálního růstového faktoru (EGF) koreluje se stupněm tubulointersticiálního poškození, proto poměr IL-6/EGF byl navržen jako marker progresu poškození ledvin (Ranieri *et al.*, 1996). Vylučování cytokinů/chemokinů však nerozlišovalo specifické typy glomerulonefritidy (Mitsushashi *et al.*, 1993).

Vylučování imunoglobulinů močí představuje slibnou novou možnost při hledání náhradních markerů u pacientů s IgAN. Ukázalo se, že koncentrace IgA a IgG v moči jsou vyšší u pacientů s IgAN, než u zdravých kontrol a u pacientů s jiným onemocněním ledvin. Koncentrace dále korelovaly s koncentrací kreatininu v séru a přítomnosti proteinurie (Galla *et al.*, 1985).

3.11 Terapie IgA nefropatie

Diagnóza IgA nefropatie se opírá o histologické vyšetření renální biopsie, která prokáže dominantní ukládání IgA v renálním mezangiu (Roberts *et al.*, 2009). Při diagnostice bylo prokázáno, že korelace klinicko-patologických parametrů poskytuje určitý vhled do rizika progresu. Mezi ně patří odhadovaná rychlost glomerulární filtrace,

množství proteinurie, krevní tlak a histologie ledvin (Selvaskandan *et al.*, 2019). Až donedávna neexistovala účinná léčba pro pacienty s IgA nefropatií. Existuje však léčba symptomatická, která zpomaluje progres onemocnění. I když IgA nefropatie může ovlivnit jenom 1,3 % populace, existuje potřeba nových terapeutických látek schopných zachovat normální renální funkci (Julian *et al.*, 1999). Bylo dosaženo významného pokroku v prevenci progresivního onemocnění ledvin použitím několika způsobů léčby, které zahrnují inhibitory enzymu angiotensin-konvertasa, kortikosteroidy a omega-3 polynasyčené mastné kyseliny (Donanio *et Grande*, 2002).

V polovině 80. let studie ukázaly, že inhibitory enzymu angiotensin-konvertasa (ACE) byly lepší v porovnání s jinými antihypertenzivy v prevenci strukturálního poškození ledvin. Relativní snížení rizika o 46-56 % inhibitory ACE bylo zjištěno u pacientů s diabetem 1. typu a nefropatií, hypertenzní nefrosklerózou a chronickým onemocněním ledvin (Hilgers *et Mann*, 2002). Celkový přínos inhibitorů ACE je u pacientů s proteinurií vyššího stupně. V případě IgAN však klinické studie ukázaly, že řada inhibitorů ACE mírně snížila vylučování bílkovin v moči bez doprovodného zlepšení renálních funkcí. K dispozici jsou i údaje o účincích kombinované terapie s inhibitory ACE a antagonisty receptoru angiotensinu II typu 1 na proteinurii. Kombinace měla aditivní účinek na snížení vylučování bílkovin v moči, zatímco zdvojnásobení dávky monoterapie nemělo žádný účinek (Russo *et al.*, 1999).

Kortikosteroidy se používají k léčbě IgAN z důvodu jejich protizánětlivých a imunosupresivních vlastností. Léčba steroidy snižuje po 6 měsících proteinurii o 50 %, ale nebyl pozorován žádný účinek na funkci ledvin. Byly také popsány nefrotické relapsy a závislost na steroidech (Lai *et al.*, 1986).

3.12 Savčí expresní systém

Základním požadavkem současnosti je produkce rekombinantních proteinů ve vhodném množství a kvalitě (Khan, 2013). V dnešní době existuje široká nabídka expresních systémů pro produkci rekombinantních proteinů ve velkém měřítku. Tyto expresní systémy zahrnují *E. coli*, bakulovirem zprostředkovanou expresi v hmyzích buňkách, kvasinky a několik savčích systémů (Khan, 2009). Dochází k postupnému zvyšování aplikace savčích buněk pro produkci proteinů, protože expresní systémy využívající savčí buňky pro rekombinantní proteiny jsou schopny zaručit správné složení proteinu, posttranslační modifikace a sestavení produktu, které jsou důležité pro

biologickou aktivitu (Khan, 2013). I když je možné produkovat lidské proteiny v prokaryotických expresních systémech, výsledné proteiny mají často nežádoucí charakteristiky, které ovlivňují účinnost, jako například glykosylace. V současné době prokaryotické systémy nemohou odpovídat výhodám savčích systémů (Hunter *et al.*, 2019).

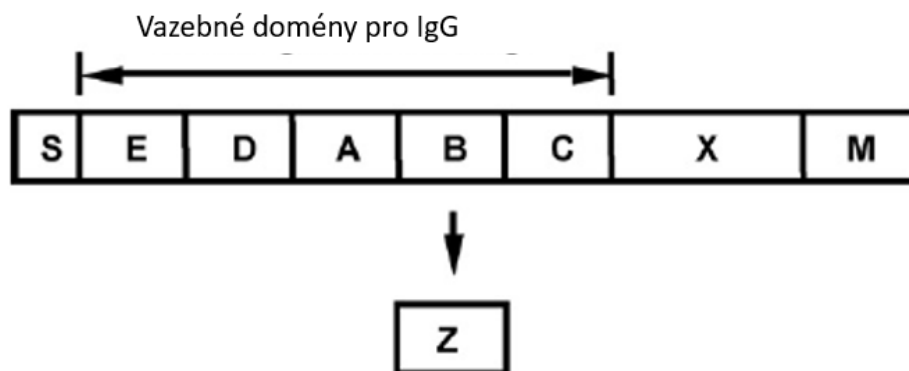
Pro savčí expresní systémy existují určité požadavky. Úroveň exprese genu do značné míry závisí na tom, jak účinně je transkribována. Exprese genu v savčích buňkách vyžaduje vhodnou buněčnou linii a příslušné vektory, které působí jako přenašeče zájmového genu do buněčných linií. Pro expresi proteinů bývá používáno mnoho savčích buněčných linií, přičemž nejčastěji to jsou HEK 293 (lidské embryonální buňky ledvin) a CHO (ovariální buňky čínského křečka). Tyto buněčné linie mohou být následně transfekovány (Huh *et al.*, 2007). Buněčná linie CHO byla kultivována z biopsie ovaríí křečka čínského. Buněčná linie HEK 293 byla vytvořena transformací lidských embryonálních buněk ledvin fragmenty DNA adenovirem typu 5, což vedlo ke vzniku buněčné linie, která se replikovala, tolerovala snížené koncentrace séra v médiu a byla snadno transformovatelná (Graham *et al.*, 1977). Buňky HEK 293 a CHO byly od té doby geneticky modifikovány, aby se zlepšila jejich schopnost reagovat na různé prvky expresního vektoru. HEK 293 a CHO buňky jsou udržovány jako suspenzní nebo adherentní kultury, přičemž suspenzní kultura je zvláště výhodná pro snadnou manipulaci a zvětšování počtu buněk. Suspenze buněk obvykle zdvojnásobují svůj počet buněk za kratší dobu než 24 hodin a mohou růst v hustotě vyšší než 5 milionů buněk na mililitr v závislosti na kultivačních podmínkách (Rio *et al.*, 1985).

3.13 Možnosti purifikace rekombinantních proteinů

V poslední době byl počet terapeutických přípravků založených na obsahu monoklonálních protilátek v klinických studiích i praxi značně zvýšen a při následném zpracování se běžně používá purifikace afinitní chromatografií, která má několik výhod, jelikož se jedná o snadný, rychlý a selektivní postup pro zachycení cílového proteinu (Hober *et al.*, 2007). Afinitní chromatografie se spoléhá na separaci proteinů na základě jejich reverzibilní interakce se specifickým ligandem imobilizovaným na chromatografické matrici (Grodzki *et Berenstein*, 2007). Vzorek se aplikuje za podmínek, které upřednostňují specifickou vazbu na ligand a výsledné interakce jsou výsledkem elektrostatických a hydrofobních interakcí, van der Waalsových nebo

vodíkových vazeb. Nenavázaný materiál se odmyje a navázaný protein se získá změnou podmínek pufru na ty, které podporují desorpci. Vázaný protein může být eluován z matrice kompetičně specifickým ligandem, iontovou silou nebo polaritou elučního pufru (Bauer *et al.*, 1980).

Nejpoužívanějším afinitním systémem pro purifikaci protilátek je stafylokokový protein A a jeho menší fragmenty. Protein A váže konstantní oblast těžkého řetězce (Fc) IgG (oblast CH1-CH3). Nativní protein A je purifikován ze *Staphylococcus aureus* a obsahuje čtyři vazebná místa pro IgG (Hober *et al.*, 2007). Má vysokou afinitu k IgG a skládá se ze tří různých regionů. S-region představuje signální sekvenci, která je zpracována během sekrece, dále pět homologních IgG vazebných domén E, D, A, B, C, a nakonec oblast ukotvení buněčné stěny XM (Guss *et al.*, 1984). Domény jsou schopné nezávisle vázat se na Fc část IgG1, IgG2 a IgG4, ale vykazují slabou interakci s IgG3 (Jendeberg *et al.*, 1997).



Obrázek č. 5: Schéma domén stafylokokového proteinu A (Hober *et al.*, 2007)

Dalším afinitním systémem je rekombinantní protein G, který je exprimovaný v *E. coli* a obsahuje dvě vazebná místa pro IgG a je doporučován pro purifikaci IgG ze séra (Hober *et al.*, 2007).

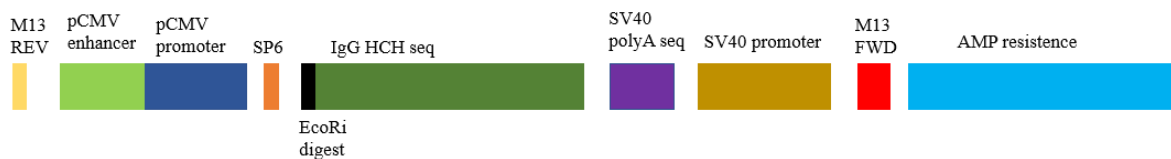
4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

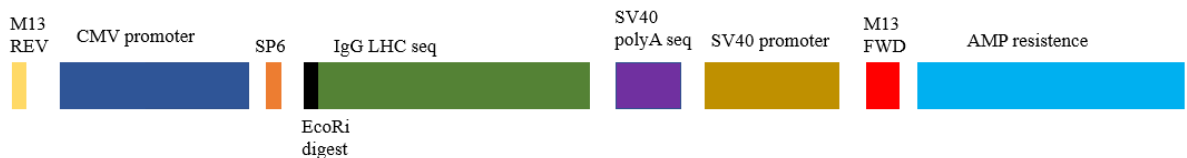
Pro expresi rekombinantních proteinů byly použity savčí expresní buňky linie HEK 293 FreeStyle™ Expression System (ECACC 85120602, THERMO FISHER).

Pro transformaci chemokompetentních bakterií byly použity bakterie *Escherichia coli*, kmen TOP 10.

Použité plazmidy byly konstruovány v laboratoři University of Alabama v Birminghamu, USA. Na základě klonovacího vektoru pBR322, který obsahuje sekvenci pro rezistenci k ampicilinu, pCMV promoter pro expresi v savčích buňkách a sekvenci IgG pro lehký a těžký řetězec získanou od pacienta trpícího IgA nefropatií. Plazmid byl laboratoří sdílen za podmínek nezveřejnění kompletní sekvence plazmidu. Jako pozitivní kontrola byla použita IgG široce neutralizující protilátka označená jako VRC01, o které je známo, že se dobře exprimuje.



Obrázek č. 6: Schéma plazmidu pro těžký řetězec IgG (1123 IgG HCH)



Obrázek č. 7: Schéma plazmidu pro lehký řetězec IgG (1123 Lambda LCH)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 2-Log DNA Ladder 0,1–10 kb (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- 2-merkaptoethanol (LACH-NER)
- 293fectinTM Transfection reagent (THERMO FISHER)
- Agaróza (SERVA)
- Ampicilin (SERVA)
- antibiotikum ampicilin roztok c = 100 mg/ml (SERVA)
- bromfenolová modř sodná sůl (ROTH)
- citrát sodný (LACH-NER)
- deglykosylovaný IgA (pIgA Ale III, laboratoř Dr. Novaka, University of Alabama at Birmingham, USA)
- DNA Gel loading dye 6 × (NEB)
- dodecylsírán sodný – SDS (MERCK)
- ethanol 96% (VWR)
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (BIOTIUM)
- glycerol (SIGMA ALDRICH)
- glycin (LACH-NER)
- HEK293F FreeStyleTM Expression Medium GIBCO (THERMO FISHER)
- HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (THERMO SCIENTIFIC)
- hovězí sérový albumin – BSA (NEW ENGLAND BIOLABS)
- hydroxid sodný (PENTA)
- IgG coat: AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ fragment specific code: 109-006-008 (JACKSON IMMUNO RESEARCH)
- kyselina chlorovodíková (LACH-NER)
- kyselina sírová (LACH-NER)
- methanol (SIGMA ALDRICH)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin – TEMED (SERVA)
- n-butanol (LACH-NER)
- OPD Substrate Tablets (THERMO FISHER)
- opti-MEMTM Reduced Serum Medium GIBCO (THERMO FISHER)
- peroxid vodíku 30% (LACH-NER)

- peroxodisíran amonný (SERVA)
- Pierce™ Recombinant Protein A Agarose (THERMO SCIENTIFIC)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (THERMO SCIENTIFIC)
- Sacharóza (LACH-NER)
- Síran sodný (LACH-NER)
- Soc médium (INVITROGEN)
- Tris (OMNIPUR)
- Trypan Blue Solution 0,4 % (SIGMA, cat. no. T8154)
- Tween-20 0,05% (CALBIOCHEM)

Použité soupravy

- kit: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (THERMO FISHER)
- kit: Plasmid Mini AX (A&A BIOTECHNOLOGY)
- kit: QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN)
- kit: HiTrap Protein G HP antibody purification columns
- kit: Zeba Spin Desalting Column (THERMO FISHER)

Použité roztoky

- 30% roztok akrylamid/bisakrylamidu (SERVA)
- APS: 10% roztok peroxodisíranu amonného (1 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ + 10 ml ddH₂O)
- Coomassie Brilliant Blue (45% methanol + 10% kyselina octová + 0,1% Coomassie Brilliant Blue)
- blokovací roztok (5% BSA v TBS)
- fixační roztok (750 ml izopropanolu + 300 ml kyselina octová + doplněno do 3 l ddH₂O)
- GelRed – pracovní roztok (300 ml ddH₂O + 17,6 g NaCl + 60 µl GelRed Nucleic Acid Gel Stain)
- LB médium (1% pepton, 1% NaCl, 0,5% kvasniční extrakt)
- nanášecí neredukující pufr pro proteiny 2× (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol + 2,3 g SDS + 37,5 ml ddH₂O)
- nanášecí redukující pufr pro proteiny 2× (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol + 2,3 g SDS + 5 ml merkaptoethanol + 37,5 ml ddH₂O)

- odbarvovací roztok (5% methanol + 7,5% kyselina octová + doplnit do 3 l ddH₂O)
- protilátka Anti human IgG Fab fragment, HRP, A6029, ředění 40 000× (SIGMA)
- protilátka Anti human lambda free and bound, HRP, HAF008001, ředění 1000× (SIGMA)
- protilátka: Peroxidase-conjugated affipure F (ab')₂ fragment goat anti-human serum IgA, α chain specific
- PBS promývací pufr pH 7,5 (240 g NaCl + 6 KCl + 40 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O + KH₂PO₄)
- PBST (0,05% Tween v 1× PBS)
- SDS 5× elektrodový pufr (3 l ddH₂O + 45,3 g Tris + 2,6 g glycin + 15 g SDS)
- TAE pufr 50× (1,5 M Tris, 1 mM k. octová, 0,1 M EDTA, pH 8,5)
- Towbinův pufr (9,09 g Tris + 43,2 g glycin + 600 ml methanol)
- Tris pufr 4× pH 6,8 (15,125 g Tris + 1 g SDS + 150 ml ddH₂O)
- Tris pufr 4× pH 8,8 (45,5 g Tris + 1 g SDS + 150 ml ddH₂O)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- automatické mikropipety (THERMO FISHER)
- automatické pipety (THERMO FISHER)
- blotovací zařízení TRANS-6 SEMIDRY TRANSFER CELLS (BIO-RAD)
- centrifuga CR 312 (JOUAN)
- centrifuga MICRO 22R (HETTICH ZENTRIFUGEN)
- centrifuga UNIVERSAL 32R (HETTINCH ZENTRIFUGEN)
- elektrický zdroj pro blotovací zařízení 2197 POWER SUPPLY (LKB BROMMA)
- elektrický zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (BIO-RAD)
- elektrický zdroj pro elektroforézu Power Pac Universal (BIO-RAD)
- elektroforetická komora (BIO-RAD)
- elektroforetická komora Owl Easycast B1 (THERMO FISHER)
- chlazený inkubátor (ELEKTROLUX)
- inkubátor s CO₂ MCO-15AC (SANYO CO₂ INCUBATOR)
- laminární box aura-VF48 (BIO AIR)

- laboratorní váhy 440-33N (KERN)
- mikrocentrifuga E-Centrifuge (WEALTEK)
- mikrovlnná trouba (SHARP)
- měření koncentrace DNA Synergy HTX, software Gen 5 (BIOTEK)
- pipetor FASTPETTE (LABNET)
- promývání ELISA desek: ELx405 (BIOTEK)
- PVDF membrána (BIO-RAD)
- rotátor Multi RS-60 (BIOSAN)
- sérologické pipety 25; 10; 5; 1 ml (SARSTEDT)
- spektrofotometr Synergy XTX, program: Gene5 (BIOTEK)
- termoblok block heater SBH130D (STUART)
- termostat BT 120 M (LABO MS)
- třepačka KS 260 basic (IKA)
- UV transiluminátor GelLogic 212PRO (CARESTREAM HEALTH)
- vortex MS2 Minishaker (IKA)
- vyvolání WB: G-box, program: GeneSys (SYNGENE)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

- **Transformace chemokompetentních bakterií**

Před transformací byly plazmidy rozpuštěny 15 minut při laboratorní teplotě a chemokompetentní bakterie byly inkubovány na ledu až do úplného rozpuštění. Následně bylo k bakteriím přidáno 25 ng DNA v objemu 1 μ l, pro každý plazmid zvlášť. Transformační zkumavka byla protřepána poklepáním a směs byla inkubována na ledě po dobu 30 minut. Poté byla zkumavka přesunuta na 30 sekund do termobloku, který byl předeřhřátý na 42 °C. Po rychlém zahřátí byla přenesena zpět na led a inkubována na něm 5 minut. Do směsi bylo přidáno 250 μ l SOC média a poté byla ponechána na třepačce v inkubátoru po dobu 1 hodiny při 37 °C.

Připravené LB médium s agarem bylo sterilizováno v autoklávu, po zchladnutí na 40 °C bylo přidáno antibiotikum (ampicilin), poté ním byly naplněny Petriho misky, ve kterých bylo médium ponecháno ztuhnout. Transformační směs byla poté nanášena a hokejkou rozetřena na agarové plotny a inkubována přes noc při 37 °C.

Po transformaci byly vybrány z plotny 3 kolonie, které byly přeneseny do 10 ml tekutého LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a byly napěstovány přes noc. Následně byly bakterie zcentrifugovány, zlyzovány a DNA byla izolována pomocí miniprepu Mini AX. Koncentrace DNA byla změřena pomocí readru na mikrodestičce, na kterou bylo nanášeno 2 µl vzorku. Poté byl vybrán jeden klon z každého miniprepu (1 klon lehkého a 1 klon těžkého řetězce). Pro ověření transformace byla provedena agarózová elektroforéza.

Byl připraven 1% agarózový gel . Bylo naváženo 0,7 g agarózového prášku a toto množství bylo rozpuštěno v 70 ml ddH₂O a následně bylo přidáno 1,4 ml 50× TAE puftru. Takto připravený roztok byl přiveden k varu v mikrovlnné troubě. Poté byl roztok přelit do předem připravené elektroforetické komůrky s hřebínkem, který vytvořil jamky. Gel byl ponechán ztuhnout při laboratorní teplotě 30 minut a komůrka byla naplněna 1× TAE pufrem. Do první jamky bylo nanášeno 5 µl standardu o molekulové hmotnosti 0,1 –10 kb a do dalších jamek bylo nanášeno 100 ng DNA od každého vzorku s nanášecím pufrem. Vzorky byly děleny 60 minut při napětí 130 V. Poté byly fragmenty DNA obarveny pomocí fluorescenčního interkalačního barviva GelRed na laboratorní třepačce 30 minut. Po obarvení byl gel umístěn do UV transiluminátoru, kde byl pořízen snímek, který zobrazoval obarvenou DNA. Pro ověření na agarózové elektroforéze byl proveden i midiprep pro získání většího množství DNA.

- **Příprava buněčné kultury**

Před rozmražením buněčné linie HEK 293F, která byla uložena v tekutém dusíku, byla dekontaminována vnější část zkumavky 70% ethanolem. Buňky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Obsah zkumavky byl přenesen do sterilní Erlenmayerovy baňky o objemu 125 ml, která obsahovala 15 ml předehřátého FreeStyle 293 Expression Medium. Toto médium umožňuje transfekci ve velkých objemech. Sterilní podmínky během transfekce byly zajištěny pomocí laminárního boxu. Kultivace buněčné suspenze probíhala v termostatovém inkubátoru na orbitální třepačce při 37 °C a udržovaném obsahu 8% CO₂. Třepačka v inkubátoru se otáčela rychlostí 150 ot/min, dokud buňky nenarostly do požadované hustoty. Buněčná linie HEK 293F je charakteristická tím, že se suspenzí a nevyžaduje tak přichycení k podkladu a buňky jsou volně rozptýlené v médiu. Následně byla určena životaschopnost buněk a jejich počet. Optimální životaschopnost buněk pro transfekci je

100 %. Buňky byly zpasážovány vždy po 2–3 dnech, po dosažení hustoty $2-3 \times 10^6$ buněk/ml.

- **Určení životaschopnosti buněk**

Pravidelně bylo prováděno počítání buněk, aby byl zkontrolován růst. Z buněčné kultury byl vždy po několika dnech odebrán vzorek o objemu 10 μ l, který byl smíchán s 10 μ l trypanové modře, která sloužila jako kontrola vitality buněk. Do Bürkerovy komůrky bylo přeneseno 10 μ l z této směsi a byly spočítány živé i mrtvé buňky. Výpočet probíhal ve čtvercích 1, 3, 7 a 9.

1	2	3
4	5	6
7	8	9

Obrázek č. 8: Schéma Bürkerovy komůrky: buněčná hustota byla určena ze čtverců, které jsou vyznačeny, včetně horních a levých označených hran.

$$\frac{\text{počet živých buněk}}{\text{plocha čtverce [mm}^2\text{]} \times \text{počet čtverců} \times \text{hloubka čtverce [mm}^2\text{]} \times \text{faktor ředění}} = \text{počet živých buněk/}\mu\text{l}$$

Konečná hustota buněčné kultury byla vypočítána na základě vzorce:

Z rovnice stanovíme počet živých buněk na μ l:

$$\text{počet živých buněk} / (1 \times 4 \times 0,1 \times 5) = \text{počet živých buněk/}\mu\text{l}$$

- **Optimalizace transfekce buněk HEK 293F v objemu 10 ml**

Transfekce je metoda sloužící k zavedení DNA do savčích buněk. Přechodná transfekce je charakteristická tím, že zavedená DNA se nachází v buňce pouze po omezenou dobu a není integrována do genomu. Tato DNA také není předávána z generace na generaci a může být ztracena během dělení buněk, což následuje ztráta exprese rekombinantního proteinu. Na druhou stranu vysoké množství kopií transfekovaného materiálu vede k vysokým hladinám exprimovaného proteinu v buňce. Typicky se transfekované buňky sklízí 96 hodin po transfekci. Potřebu získání velkého množství rekombinantního proteinu, bez použití pracného procesu stabilní transfekce, vyřešila přechodná transfekce ve velkém objemu. Den před transfekcí byly buňky zpasážovány na denzitu $600\text{--}700 \times 10^3$ buněk/ml. V den transfekce byly buňky naředěny médiem na denzitu 1×10^6 buněk/ml a bylo ověřeno, zda je životaschopnost větší než 90 %.

Příprava transfekčních reagensů v 10 ml buněčné kultury byla provedena podle tabulky č. 3.

Tabulka č. 3: Příprava transfekčních reagensů v objemu 10 ml buněčné kultury

	Množství plazmidu [μg]	1. zkumavka			2. zkumavka	
		LCH [μl]	HCH [μl]	Opti-MEM TM [μl]	293Fectin TM [μl]	Opti-MEM TM [μl]
1123	20	9,6	10	315	26,6	308,4
VRC01	20	8,0	8,7	318,3	26,6	308,4
VRC01	30	12	13,05	310	39,9	295,1

Tabulka č.4: Zásobní koncentrace použitých plazmidů pro transfekci

1123	LCH	1239 ng/ μl
	HCH	1290 ng/ μl
VRC01	LCH	1000 ng/ μl
	HCH	1148 ng/ μl

1. V jedné zkumavce byl smíchán plazmid pro těžký (HCH) a pro lehký (LCH) řetězec IgG s odpovídajícím množstvím Opti-MEMu™ a ve druhé zkumavce byl smíchán 293Fectin™ a Opti-MEM™.
2. Tyto reagensie byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě.
3. Poté byl obsah jednotlivých zkumavek smíchán dohromady a inkubován 30 minut.
4. Takto připravená transfekční směs byla přidána do buněčné kultury a inkubace probíhala po dobu 3 dnů při 37 °C v inkubátoru s CO₂.
5. Po třech dnech byla buněčná kultura zcentrifugována na 500 g po dobu 5 minut.
6. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a pelet s buňkami byl vyhozen.

- **Transfekce buněk HEK 293F v objemu 80 ml**

Příprava transfekčních reagensií ve větším objemu proběhla podle tabulky.

Tabulka č. 5: Příprava transfekčních reagensií v objemu 80 ml buněčné kultury

	1. zkumavka			2. zkumavka	
1123 [80 µg]	LCH [µl]	HCH [µl]	Opti-MEM™ [µl]	293Fectin™ [µl]	Opti-MEM™ [µl]
	64	61,6	2552	212,8	2467,2

Transfekce proběhla podle stejného postupu jako při transfekci v objemu 10 ml a buněčná kultura byla zcentrifugována na 1000 g po dobu 5 minut.

- **Purifikace pomocí proteinu G**

K purifikaci molekul IgG ze supernatantu byl použit systém HiTrap Protein G HP obsahující kolony pro preparativní čištění monoklonálních a polyklonálních protilátek. Afinity pryskyřice s proteinem G představuje dobrou volbu pro univerzální zachycení protilátek, protože se váže na širší rozmezí IgG z eukaryotických druhů a také se váže na více podtříd IgG než pryskyřice na bázi proteinu A. Kolony poskytují výkonnou purifikaci s vysokým rozlišením, vazebnou kapacitou 25 mg IgG/ml pryskyřice a jsou stabilní v širokém rozmezí pH. Kolony jsou vyrobeny z biokompatibilního polypropylenu, který neinteraguje s biomolekulami. Protein G, buněčný povrchový

protein streptokoků skupiny G, je Fc receptor typu III, který se váže na Fc oblast IgG neimunitním mechanismem. Protein G a protein A se však liší specifitou vazby IgG v závislosti na původu IgG. Purifikace IgG ze supernatantu, získaného z transfekce, na protein G byla provedena podle protokolu, který byl přiložen v kitu.

Výsledné frakce byly zakonzentrovány do 2 ml a byla provedena SDS-PAGE elektroforéza na 2 gelech. První byl obarven barvivem Coomassie Brilliant Blue a s druhým gelem byla provedena detekce pomocí western blottingu.

• Purifikace srážením síranem amonným

Tato metoda umožňuje hrubou purifikaci a rozdělení složité směsi buněčných proteinů, díky schopnosti proteinů precipitovat v roztoku, který obsahuje vysokou koncentraci solí (síranu amonného). Pro purifikaci IgG bylo do 5 ml supernatantu, získaného transfekcí buněk, postupně přidáno 2,58 g síranu amonného, které odpovídalo saturaci 75 % (viz. tabulka č.6). Síran se v supernatantu rozpouštěl 30 minut na třepačce. Imunoglobuliny se během precipitace vysráží, ale albumin ne. Následovala opakovaná centrifugace na 10 000 g po dobu 30 minut při 20 °C. Z peletu i ze supernatantu byl odebrán vzorek.

Tabulka č. 6: Množství pevného síranu amonného (g), které je potřeba přidat k 1 litru roztoku, aby se dosáhlo žádané změny v procentech nasycení roztoku síranem amonným. (převzato od Wingfield, 1998)

	Konečná koncentrace																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
počáteční % saturace																	
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

Se vzorky byla následně provedena SDS-PAGE elektroforéza a proteiny byly následně detekovány barvením Coomassie Brilliant Blue.

• Purifikace pomocí proteinu A

K purifikaci proteinů byl použit přípravek PierceTM Recombinant Protein A Agarose, který obsahuje kovalentně imobilizovanou matici proteinu A. Speciální pufr zvyšují vazbu IgG, což vede k vyšším výtěžkům ve srovnání s konvenčními metodami, jako například precipitace síranem amonným. Tato procedura využívá 50 μ l pryskyřice proteinu A, kdy toto množství je dostatečné pro navázání 25-250 μ g protilátky.

1. K 9 ml supernatantu získaného transfekcí bylo přidáno 50 μ l přípravku PierceTM Recombinant Protein A Agarose a 50ml falkonka byla doplněna do plna 1 \times PBS.
2. Takto připravená směs byla ponechána 2 hodiny na rotátoru při laboratorní teplotě.
3. Následně byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty na 3000 g.
4. Agaróza s navázaným proteinem se nacházela na dně zkumavky.
5. Supernatant byl opatrně odpipetován a agaróza s navázaným proteinem byla nanesena na kolonku.
6. Následovalo promytí kolonky 4 \times pomocí 400 μ l 1 \times PBS.
7. Po promytí byl cílový protein eluován 300 μ l 0,1M citrátu sodného (pH 4).
8. Jednotlivé čtyři eluční frakce byly neutralizovány 81 μ l 1M TRIS/HCl (pH 8,5).
9. Takto připravené eluční frakce byly uchovány v chladícím zařízení pro následnou SDS-PAGE elektroforézu.

• Příprava 10% polyakrylamidového gelu

1. Připravená 1mm skla byla očištěna ddH₂O, odmaštěna ethanolem a vysušena.
2. Podle tabulky byl připraven dělicí a zaostřovací gel.

Tabulka č. 7: Příprava 10% polyakrylamidového gelu

Druh gelu	TRIS pH 8,8 [ml]	TRIS pH 6,8 [ml]	30% akrylamid/bisakrylamid [ml]	ddH ₂ O [ml]	APS [μl]	TEMED [μl]
dělicí	3,75	-	5,0	6,25	75	15
zaostřovací	-	2,5	1,3	6,2	50	10

3. APS a TEMED byly přidány do směsi těsně před nalitím gelu.
4. Jako první byl nanesen dělicí gel do 2/3 skla.
5. Na něj byla nanесena tenká vrstva n-butanolu pro zarovnání gelu a gel byl ponechán polymerizovat 30 minut.
6. Vrstva n-butanolu byla ze ztuhlého gelu vymyta ddH₂O.
7. Zaostřovací gel byl nanесen až po horní okraj skla a do něj byl nasazen elektroforetický hřeben pro vytvoření jamek.

- **Příprava gradientového polyakrylamidového gelu**

1. Nejdříve byla očištěna a nachystána 1,5mm elektroforetická skla.
2. Do tří kádinek byl připraven 12% dělicí gel s 0,25 g sacharózy a pár krystalky bromfenolové modře, 8% dělicí gel a zaostřovací gel.
3. První byl nanесen hustší 12% gel, poté 8% gel a n-butanol pro zarovnání gelu.
4. Po 30 minutách byl n-butanol vymyt ddH₂O a byl nanесen zaostřovací gel s hřebínkem.
5. Cílem přípravy tohoto gelu byla vizualizace celé molekuly IgG o velikosti 160 kDa.

- **SDS-PAGE elektroforéza**

1. Eluční frakce byly smíchány v poměru 1:1 s 2×SDS vzorkovým pufrem za redukčních i neredukčních podmínek a byly povařeny 5 minut v termobloku při 92 °C, aby proběhla kompletní denaturace.
2. Polyakrylamidové gely ve sklech byly umístěny do držáku v elektroforetické vaně tak, aby byly hřebínky směrem nahoru.
3. Elektroforetická komora byla naplněna 5× zředěným zásobním roztokem SDS elektrodoým pufrem a po vytažení hřebenu byly vytvořeny jamky.
4. Do první jamky bylo nanášeno 4 µl standardu molekulových hmotností (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa) a do zbylých jamek byly nanášeny vzorky.
5. Elektroforetická komora byla uzavřena víkem s elektrodami připojenými ke zdroji stejnosměrného proudu.
6. Bromfenolová modř obsažená ve vzorcích sloužila jako indikátor separace.
7. Vzorky byly separovány při konstantním napětí 150 V po dobu 1 hodiny a 15 minut.
8. Po dokončení separace byl elektrodoý pufr z komory vylit a po vyjmutí s gely byl gel pomocí špachtle umístěn buď do fixačního roztoku nebo Towbinova roztoku.

- **Western-blot**

1. PVDF membrána byla namočená v methanolu na několik sekund, aby proběhla její aktivace, poté byla opláchnuta ve vodě a poté ponechána v Towbinově pufru.
2. Blotovací papíry byly také namočeny v Towbinově roztoku přibližně 30 minut před začátkem blotování.
3. Sendvič z jednotlivých komponentů byl v blotovacím zařízení sestaven v tomto pořadí: blotovací papír, membrána, gel a blotovací papír. Mezi jednotlivými vrstvami byly vytlačeny vzduchové bubliny.
4. Blotování přes membránu probíhalo při konstantním proudu 50 mA a 20 V po dobu 1 hodiny.

5. Membrána nesoucí přenesené proteiny byla umístěna do roztoku 1% BSA/PBS. Tento roztok sloužil k tzv. zablokování membrány, což znamenalo snížení nespecifické vazby protilátky. Membrána byla blokována 1 hodinu za třepání.
6. Poté byla na membránu nanesena protilátka v odpovídajícím ředění:
 - Anti-human IgG fragment, HRP, A6029, ředění 40 000×
 - Anti-human lambda free and bound, HRP, HAF 008001, ředění 1000×
7. Inkubace s protilátkou proběhla přes noc při 4°C.
8. Na druhý den byla protilátka odstraněna a membrána promývána v roztoku PBST po dobu 40 minut. Roztok byl vždy po 10 minutách vyměněn za čerstvý.
9. Následně byla membrána ještě dvakrát promyta v PBS po dobu 20 minut.
10. Na promytou membránu byly naneseny 2 ml reagentie ze SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate v poměru 1:1.
11. Po 5 minutách byl vyvolán chemiluminiscenční signál.

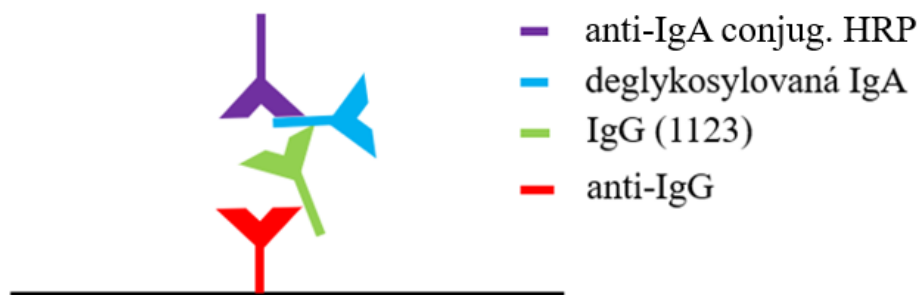
- **Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue**

1. Gel z elektroforézy byl přenesen do fixačního roztoku na 20 minut za mírného třepání. Tento krok sloužil k zafixování proteinů v gelu.
2. Poté byl gel přenesen do barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue po dobu 60 minut za mírného třepání.
3. Po barvení byl gel přenesen do odbarvovacího roztoku.
4. Odbarvovací roztok se měnil do té doby, než se objevily modré zóny proteinů na průhledném pozadí gelu.
5. Poté byl gel vyhodnocen

- **ELISA**

Charakterizaci IgG, který jsme vyrobili transfekcí a následnou purifikací byla vybrána metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA je založena na koncepci reakcí antigen-protilátka a tato specifická imunitní odpověď hraje důležitou roli při ochraně těla před patogeny a toxiny. Využitím této reakce ELISA umožňuje vysoce citlivou a selektivně kvantitativní analýzu antigenů. K detekci těchto molekul se antigen nebo protilátka značí pomocí enzymů jako je alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza (HRP). Antigen je ve fluidní fázi imobilizován na ELISA destičce. Následně

se antigen nechá reagovat se specifickou protilátkou, která je detekována enzymem značenou protilátkou.



Obrázek č. 9: Schéma komponentů ELISA testu

- První den: coating desek

Před začátkem analýzy byly vzorky převedeny do PBS pomocí Zeba Spin Desalting Column, protože se po purifikaci pomocí proteinu A nacházely v citrátu sodném s TRIS/HCl.

1. Zásobní koncentrace anti-IgG coat (1,3 mg/ml) byla naředěna na pracovní koncentraci 2,5 $\mu\text{g}/10$ ml pomocí 1 \times PBS a to smícháním 19 μl zásobního anti-IgG a 10 ml 1 \times PBS.
2. Na ELISA desku bylo nanášeno 100 μl /jamku pracovního roztoku anti-IgG/PBS pomocí multikanálové pipety.
3. Takto připravená deska byla ponechána inkubovat přes noc při 4 $^{\circ}\text{C}$.
4. Pro následující den bylo připraveno 60 ml blokovacího roztoku (1% BSA v 1 \times PBS s 0,05% Tweenem).
5. Jednotlivé vzorky byly připraveny podle tabulky. Zásobní koncentrace pIgA 0,5 mg/ml byla naředěna na pracovní koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tabulka č. 7: Příprava jednotlivých vzorků pro ELISA test.

Vzorek	E1 bez pIgA	E1+0,5 µg pIgA	E1+1 µg pIgA	0,5 µg pIgA v PBS	1 µg pIgA v PBS
E1 (1123) [µl]	50	50	50	×	×
pIgA [µl]	×	1	2	1	2
1× PBS [µl]	×	×	×	50	50

Legenda: E1= první eluce z purifikace IgG získaného z transfekce pIgA= deglykosylovaný IgA

6. Vzorky byly skladovány do druhého dne na ledu přikryté alobalem při 4 °C.

- Druhý den

1. ELISA deska byla vytemperována na pokojovou teplotu.
2. Následně byla 5× promyta 300 µl 1× PBS.
3. Po promytí bylo přidáno 300 µl/jamku blokovacího roztoku BSA a blokování probíhalo po dobu 3 hodin při pokojové teplotě.
4. Po blokování byla deska znovu 5× promyta 300 µl/jamku 1× PBS.
5. Po promytí bylo přidáno 100 µl/jamku blokovacího roztoku BSA.
6. Vzorky, které byly připraveny den předem, byly naředěny v poměru 30 µl vzorku a 170 µl blokovacího roztoku BSA.
7. Vzorky byly nanесeny na destičku v objemu 99,5 µl/jamku do prvního řádku. Z prvního řádku bylo poté multikanálovou pipetou přeneseno 100 µl do druhého řádku a tak dále až do konce destičky. Takto vznikla koncentrační řada jednotlivých vzorků.
8. Inkubace proběhla přes noc při 4 °C.

- Třetí den

1. Deska byla promyta 7× 300 µl/jamku 1× PBS.
2. Poté bylo přidáno 100 µl/jamku protilátky peroxidase-cojugated affipure F(ab')₂ fragment goat anti-human serum IgA, α-chain specific, ředění 10 000×).
3. Inkubace s protilátkou probíhala 3 hodiny při pokojové teplotě.

4. Deska byla po inkubaci 3× promyta 300 μl / jamku PBS + Tween a poté 5× promyta 300 μl 1×PBS.
5. Poté bylo přidáno 100 μl /jamku substrátu, který se skládal z 10 ml OPD pufru, 5 mg OPD substrátu a 10 μl H_2O_2 .
6. Inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě.
7. Reakce byla zastavena přidavkem 100 μl /jamku H_2SO_4 .
8. Poté byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 490 nm.

5 Výsledky

- **Transformace chemokompetentních bakterií**

Účelem transformace a tvorby miniprepu bylo získat čistější plazmid, zároveň bylo potřeba získat větší množství plazmidu pro transfekci buněk, protože nebyly k dispozici zmražené bakteriální konzervy. Transformaci bylo potřeba provést z důvodu namnožení plazmidu pro další práci.

Byla provedena transformace chemokompetentních bakterií *Escherichia coli*, kmen TOP 10, pomocí plazmidů pro těžký řetězec IgG (1123 HCH) a lehký řetězec IgG (1123 LCH). Po transformaci byly vybrány 3 kolonie, které byly napěstovány přes noc v tekutém LB médiu. DNA byla následně izolována pomocí miniprepu a změřena pomocí readru na mikrodestičce.

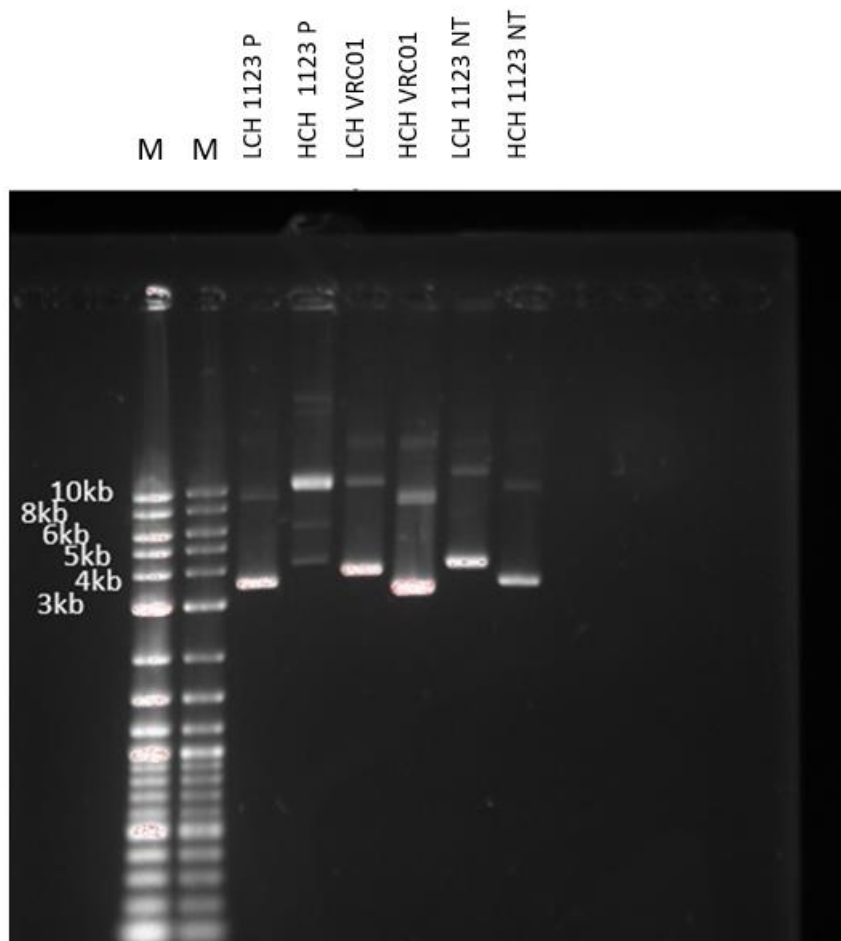
Tabulka č. 8: Výsledky měření koncentrace DNA po izolaci

	koncentrace [ng/μl]	čistota [poměr 260/280]
HCH	1000	1,9
LCH	1040	1,92

Pro ověření transformace byla provedena agarózová elektroforéza.

Na gelu (obrázek č. 10) jsme pozorovali v 8. dráze proužek o velikosti 4 kb, který představoval nový plazmid obsahující informaci pro těžký řetězec, který je oproti původnímu plazmidu výraznější (4. dráha). Transformací a izolací DNA jsme tak získali čistější DNA pro transfekci savčích buněk. Proužek představující lehký řetězec jsme pozorovali ve velikosti 3,5 kb jak v plazmidu před transformací, tak i po transformaci. Plazmidy jsou kruhová DNA, která migruje gelem rychleji než stejně dlouhá lineární DNA. To znamená, že velikost plazmidu je pro těžký řetězec 6118 bp, ale proužek je viditelný jako 4 kb.

Po ověření na agarózové elektroforéze bylo napěstováno přes noc dalších 50 ml kultury a plazmid byl izolován pomocí midiprepu Qiagen Plasmid Plus Midikit.



Obrázek č. 10: Agarózová elektroforéza transformace chemokompetentních bakterií *E. coli*, kmen TOP 10, plazmidy pro těžký (HCH) a lehký řetězec (LCH)

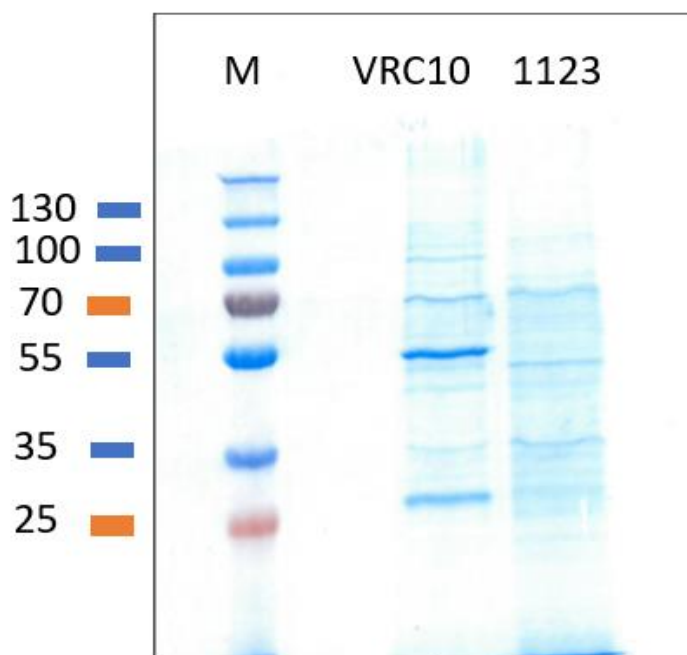
Legenda: M= standard molekulové hmotnosti (0,1–10 kb), LCH 1123 P= původní plazmid pro lehký řetězec, HCH 1123 P= původní plazmid pro těžký řetězec, LCH VRC= kontrola pro lehký řetězec, HCH VRC01= kontrola pro těžký řetězec, LCH 1123 NT= nový plazmid pro lehký řetězec, HCH 1123 NT= nový plazmid pro těžký řetězec

- **Optimalizace transfekce buněk HEK 293F v objemu 10 ml**

Byla provedena optimalizace transfekce buněk HEK 293F v objemu 10 ml buněčné kultury. Transfekce byla provedena plazmidy pro lehký (LCH) a těžký (HCH) řetězec IgG, kdy byla tato DNA vpravena do suspenzních buněk HEK 293F. Takto transfekované buňky produkovaly rekombinantní protein IgG po dobu 3 dnů. Buněčná kultura byla po 3 dnech zcentrifugována a cílový rekombinantní protein byl purifikován různými způsoby.

- **Purifikace pomocí proteinu G**

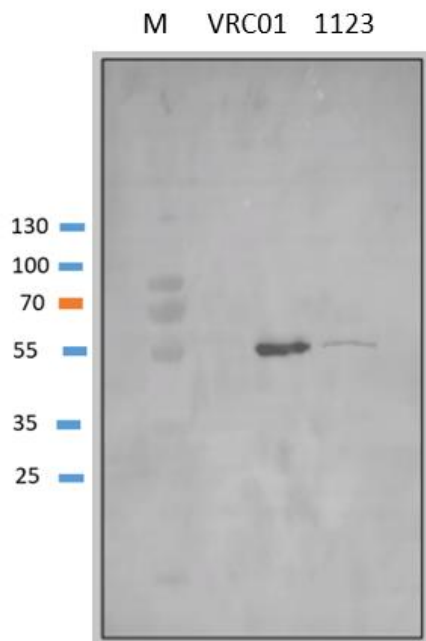
Purifikace molekul IgG ze supernatantu byla provedena pomocí purifikačního systému HiTrap Protein G HP. Na kolonu s proteinem G bylo naneseno 8 ml supernatantu. Eluce proběhla do objemu 20 ml, byla provedena neutralizace a frakce byly zakoncentrovány do objemu 2 ml.



Obrázek č. 11: Detekce molekuly IgG po purifikaci pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue

Legenda: M= standard molekulových hmotností

Na gelu (obrázek č. 11) byly po obarvení slabě viditelné proužky představující těžký řetězec IgG, a to o velikosti 50 kDa a také proužky představující lehký řetězec IgG o velikosti 25 kDa. Na gelu jde také vidět, že kontrola VRC01 se v buňkách exprimovala mnohem více než náš cílový 1123 IgG. Zbylé proužky představovaly fragmenty IgG, které podlely rozpadu a zbytky buněk.



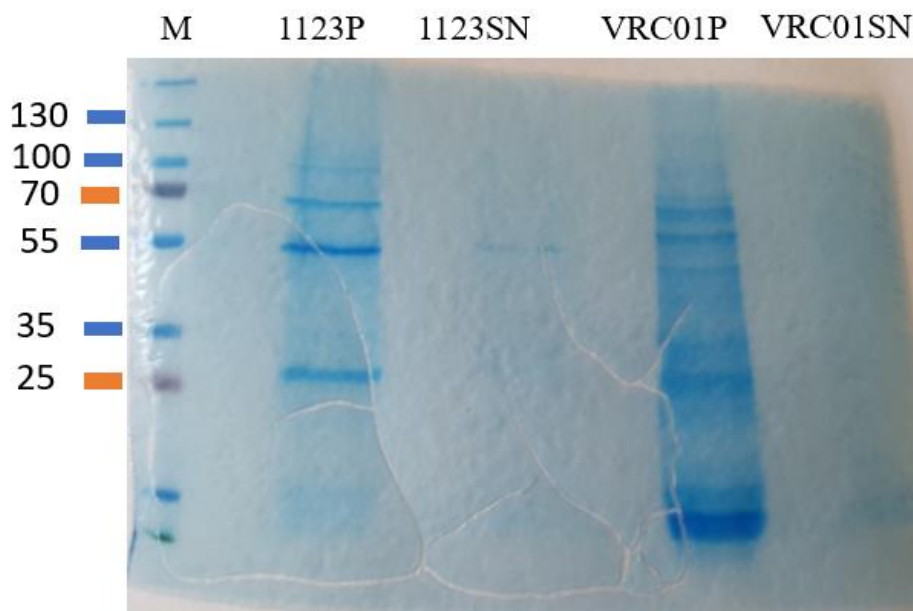
Obrázek č. 12: Western blot vypurifikovaných molekul IgG

Legenda: M= standard molekulových hmotností

Membrána (obrázek č. 12) byla inkubována s protilátkou Anti-human IgG Fab fragment HRP, která je specifická pro těžký řetězec molekuly IgG. Chemiluminiscenční signál je viditelný v oblasti 50 kDa, což odpovídalo velikosti těžkého řetězce. Signál byl ale mnohem silnější u kontroly VRC01 než u cílového proteinu 1123.

- **Purifikace precipitací síranem amonným**

Jako další varianta purifikace rekombinantního proteinu byla zvolena precipitace síranem amonným. Supernatant získaný z transfekce byl satureován síranem amonným na 75 %, precipitace probíhala 30 minut a poté byla provedena centrifugace. Po centrifugaci bylo získáno 13 ml supernatantu a 5 ml bylo precipitováno síranem. Nakonec byly odebrány vzorky, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a proteiny byly detekovány barvením pomocí Coomassie Brilliant Blue.



Obrázek č. 13: Detekce molekuly IgG po purifikaci pomocí srážením síranem amonným barvením Coomassie Brilliant Blue

Legenda: M= standard molekulových hmotností, P= pelet, SN= supernatant

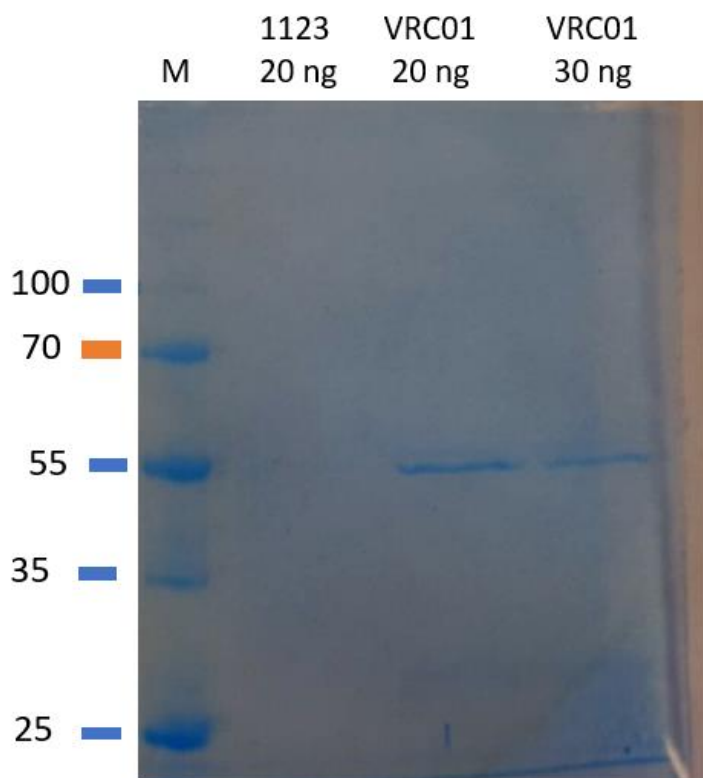
Na gelu (obrázek č. 13) bylo viditelné, že všechny vysrážené proteiny se nacházely v peletu a supernatant sloužil jako ověření, zda v něm nezůstaly nevysrážené proteiny. U vzorku 1123 se těžký řetězec nacházel v oblasti 50 kDa a lehký řetězec v oblasti 25 kDa. U kontroly VRC01 byla koncentrace proteinů mnohem vyšší než u 1123 a v supernatantu se nenacházely žádné proteiny.

Síran amonný je široce využíván z důvodu vyšší rozpustnosti a umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin. Tento postup izolace byl vyhodnocen jako purifikační metoda s nižším rozlišením.

- **Purifikace pomocí proteinu A**

Byla provedena purifikace rekombinantního IgG a výsledné frakce byly naneseny na gradientový gel za redukčních a neredukčních podmínek. Na prvním gelu byly proteiny detekovány barvením pomocí Coomassie Brilliant Blue. S druhým gelem byla provedena detekce proteinů pomocí western blottingu a membrána byla před inkubací s protilátkou rozřezána skalpelem.

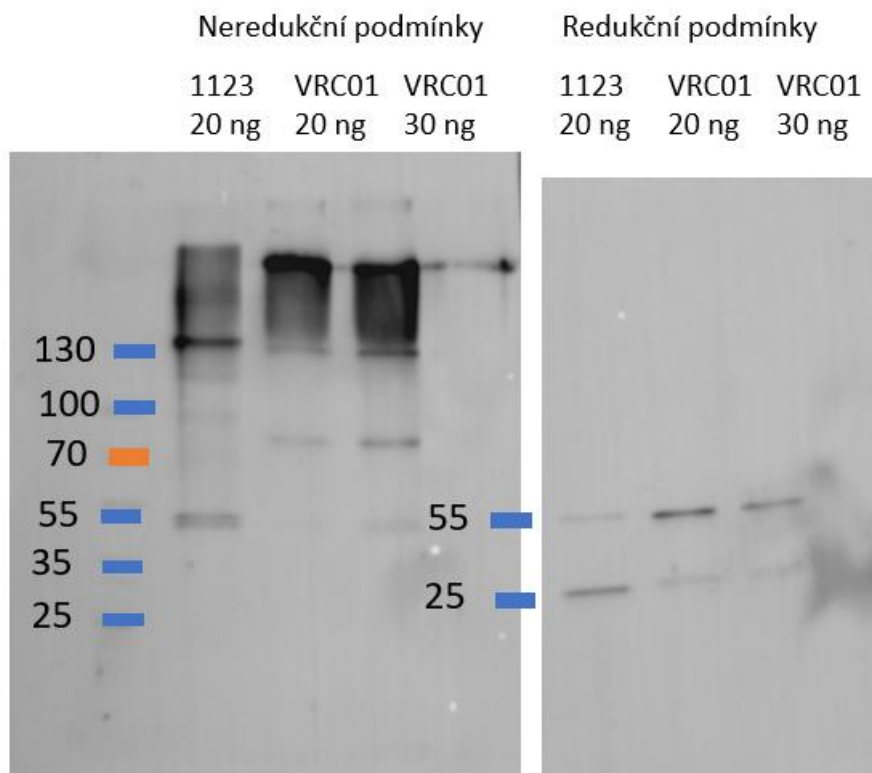
Část membrány obsahující vzorky za neredukčních podmínek byla inkubována s protilátkou anti-human IgG Fab fragment-HRP, abychom detekovali kompletní molekulu rekombinantní IgG. Druhá část membrány obsahující vzorky za redukčních podmínek byla inkubována s protilátkou anti-human lambda free and bound-HRP, abychom detekovali také lehký řetězec molekuly IgG.



Obrázek č. 14: Detekce molekuly IgG po purifikaci pomocí proteinu A barvením Coomassie Brilliant Blue

Legenda: M= standard molekulových hmotností, 20/30 ng= množství plazmidu použitého k transfekci buněk

Na gelu (obrázek č.14) byly detekovány proteiny u obou vzorků VRC01. Větší koncentrace se však nacházela u vzorku VRC01 20 ng, což znamenalo, že větší množství plazmidů použitých pro transfekci neznamená vyšší expresi rekombinantního proteinu. U vzorku 1123 barvením nebylo detekován skoro žádný protein, proto byla ještě provedena detekce pomocí western blottingu.



Obrázek č. 15: Detekce molekuly IgG western blottingem po purifikaci pomocí proteinu A

Legenda: M= standard molekulových hmotností, 20/30 ng= množství plazmidu použitého k transfekci buněk

Levá část membrány byla inkubována s protilátkou anti-human IgG Fab fragment, HRP, která detekovala těžký řetězec molekuly IgG. Pravá část membrány byla inkubována s protilátkou anti-human lambda free and bound, HRP a detekovala lehký řetězec molekuly IgG. Tím, že na pravé straně membrány vidíme lehký i těžký řetězec, ukazuje na to, že použitá protilátka byla částečně nespecifická. Chemiluminiscenční signál na membráně byl detekován za neredukčních podmínek v oblasti 150 kDa, což odpovídalo relativní molekulové hmotnosti celé molekuly IgG. Na této membráně bylo možné také pozorovat v oblasti 50 kDa proužek detekující těžký řetězec molekuly IgG. Proteiny byly detekovány u všech vzorků.

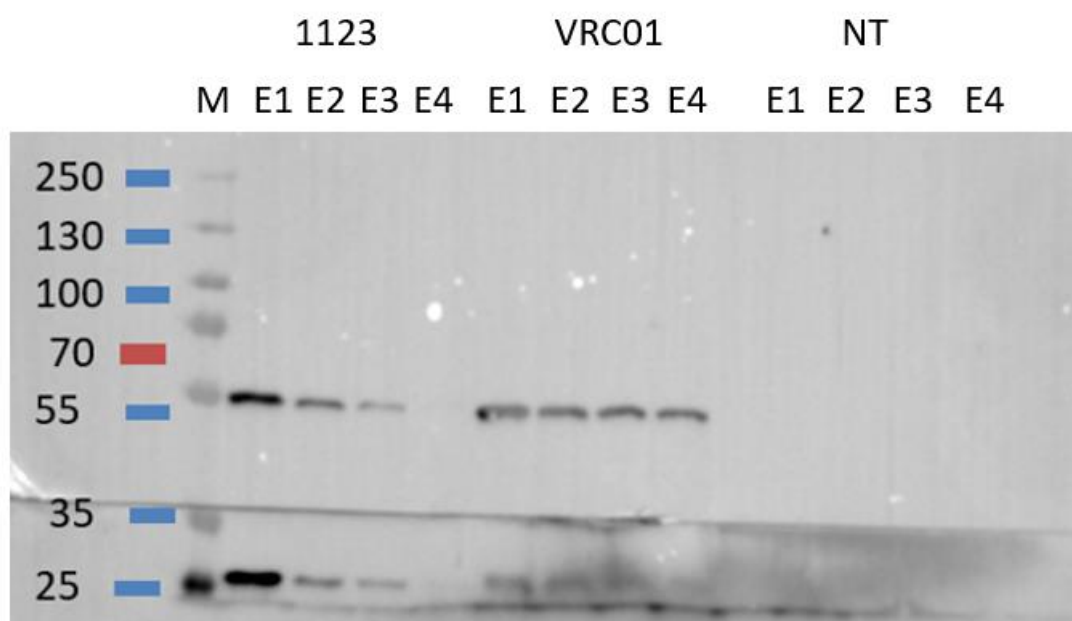
Za redukčních podmínek byl signál detekován v oblasti 50 kDa odpovídající těžkému řetězci a 25 kDa odpovídající lehkému řetězci molekuly IgG. I za těchto podmínek byly proteiny detekovány u všech vzorků.

Bylo zjištěno, že optimální množství plazmidu pro transfekci je 20 ng a jako nejvhodnější purifikace rekombinantního IgG ze supernatantu je purifikace pomocí

proteinu A. Proto byla pro další charakteristiku rekombinantního IgG provedena transfekce ve větším objemu, následná purifikace pomocí proteinu A a ELISA testu.

- **Transfekce buněk HEK 293F v objemu 80 ml**

Byla provedena transfekce buněk HEK 293F v objemu 80 ml s 20 ng plazmidů pro těžký a lehký řetězec. Rekombinantní IgG byl poté purifikován pomocí proteinu A. Byla provedena SDS-PAGE elektroforéza za redukčních a neredukčních podmínek s jednotlivými elucemi a poté western blotting.

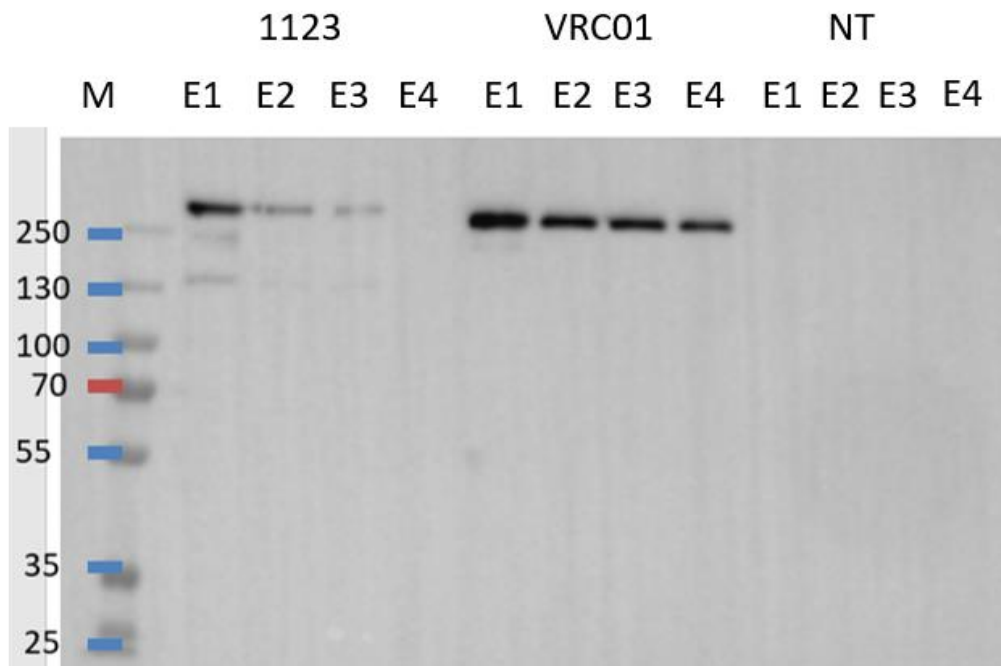


Obrázek č. 16: Detekce molekuly IgG western blottingem po purifikaci pomocí proteinu A v objemu 80 ml za redukujících podmínek

Legenda: M= standard molekulových hmotností, E= eluce, NT= netransfekované buňky (kontrola)

Membrána (obrázek č. 16) byla před inkubací s protilátkou rozřezána horizontálně a každá její část byla inkubována s jinou protilátkou. Vrchní část membrány obsahující těžký řetězec byla inkubována s protilátkou anti-human IgG Fab fragment-HRP a spodní část membrány obsahující lehký řetězec byla inkubována s protilátkou anti-human lambda free and bound-HRP. U frakcí 1123 bylo zřejmé, že nejvíce purifikovaného IgG se elovalo v první frakci, a v dalších frakcích obsah IgG snižoval. U VRC01 (pozitivní kontrola) bylo množství elovaného IgG přibližně stejné

ve všech frakcích. Jako negativní kontrola byla použita netransfekovaná buněčná linie HEK 293F, kdy supernatant byl purifikován také pomocí proteinu A.



Obrázek č. 16: Detekce molekuly IgG western blottingem po purifikaci pomocí proteinu A v objemu 80 ml za redukujících podmínek

Legenda: M= standard molekulových hmotností, E= eluce, NT= netransfekované buňky (kontrola)

Membrána byla inkubována s protilátkou anti-human IgG Fab fragment-HRP a poté byl chemiluminiscenční signál detekován u vzorků 1123 a VRC01 v oblasti kolem 250 kDa. Jednalo se pravděpodobně o oligomerní formy IgG. U první frakce vzorku 1123 byla exprese proteinu mnohem silnější než u ostatních frakcí. Naopak u vzorku VRC01 byla exprese u všech frakcí velmi podobná. Vzorek NT sloužil jako negativní kontrola, který pocházel z netransfekované buněčné linie.

- **ELISA**

Po purifikaci rekombinantního IgG pomocí proteinu A byly eluce jednotlivých vzorků smíchány a převedeny do PBS pro následnou analýzu pomocí ELISA testu. Test byl proveden ve dvou opakováních. První byl proveden bez kontroly v podobě samotné molekuly deglykosylovaného IgA. Ve druhém testu jsme již tuto kontrolu zahrnuli,

abychom jsme se ujistili, zda samotná molekula deglykosylovaného IgA netvoří imunokomplexy.

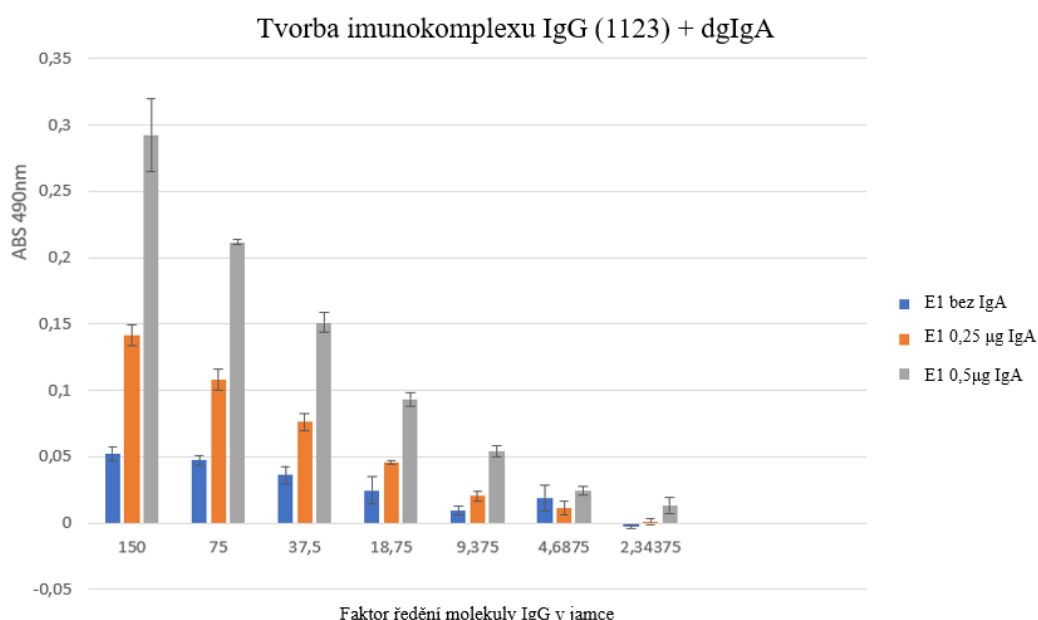
- 1. ELISA test

Tabulka č. 9: Naměřené absorbance v jednotlivých jamkách na ELISA destičce

	B	IgG (1123)	IgG (1123)	IgG+IgA (0,25 µg)	IgG+IgA (0,25 µg)	IgG+IgA (0,5 µg)	IgG+IgA (0,5 µg)	B	B	B	B	B	
Faktor ředění	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
150	A	0,056	0,117	0,11	0,197	0,208	0,334	0,373	0,06	0,066	0,069	0,071	0,078
75	B	0,06	0,106	0,111	0,164	0,175	0,272	0,274	0,052	0,063	0,061	0,072	0,076
35,50	C	0,057	0,102	0,093	0,142	0,133	0,218	0,207	0,058	0,068	0,062	0,063	0,063
18,75	D	0,062	0,079	0,093	0,106	0,108	0,158	0,151	0,058	0,06	0,064	0,065	0,097
9,38	E	0,059	0,068	0,073	0,079	0,084	0,112	0,118	0,058	0,059	0,061	0,06	0,079
4,69	F	0,055	0,073	0,087	0,076	0,069	0,083	0,088	0,059	0,058	0,058	0,063	0,062
2,34	G	0,058	0,06	0,058	0,061	0,064	0,07	0,079	0,06	0,057	0,059	0,062	0,06
0	H	0,057	0,057	0,057	0,057	0,059	0,062	0,065	0,056	0,059	0,056	0,065	0,062

Legenda: B= blank

Absorbance v jednotlivých jamkách (tabulka č.9) byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 490 nm. Tato tabulka byla následně převedena na graf.



Graf č.1: Tvorba imunokomplexu IgG (1123) s deglykosylovaným IgA v ELISA testu

Legenda: E1= eluce č.1 z purifikace IgG (1123), IgA= deglykosylovaná IgA, ABS= absorbance

Vytvořený graf (graf č.1) představoval závislost faktoru ředění molekuly IgG v jamce na absorbanci při vlnové délce 490 nm. V grafu lze vidět, že největší absorbanci, tzn. největší tvorbu imunokomplexů, představoval vzorek IgG (1123) s 0,5 µg deglykosylovaným IgA. Imunokomplexy se také tvořily ve vzorku IgG (1123) s 0,25 µg deglykosylovaným IgA, ale ne až v takové míře. Vzorek samotného purifikovaného IgG měl absorbanci nejnižší a sloužil jako ověření, že samotný IgG nevykazuje falešně pozitivní výsledek.

Jelikož v tomto ELISA testu nebyla zahrnuta kontrola samostatného vzorku deglykosylovaného IgA byl proveden ELISA test znovu.

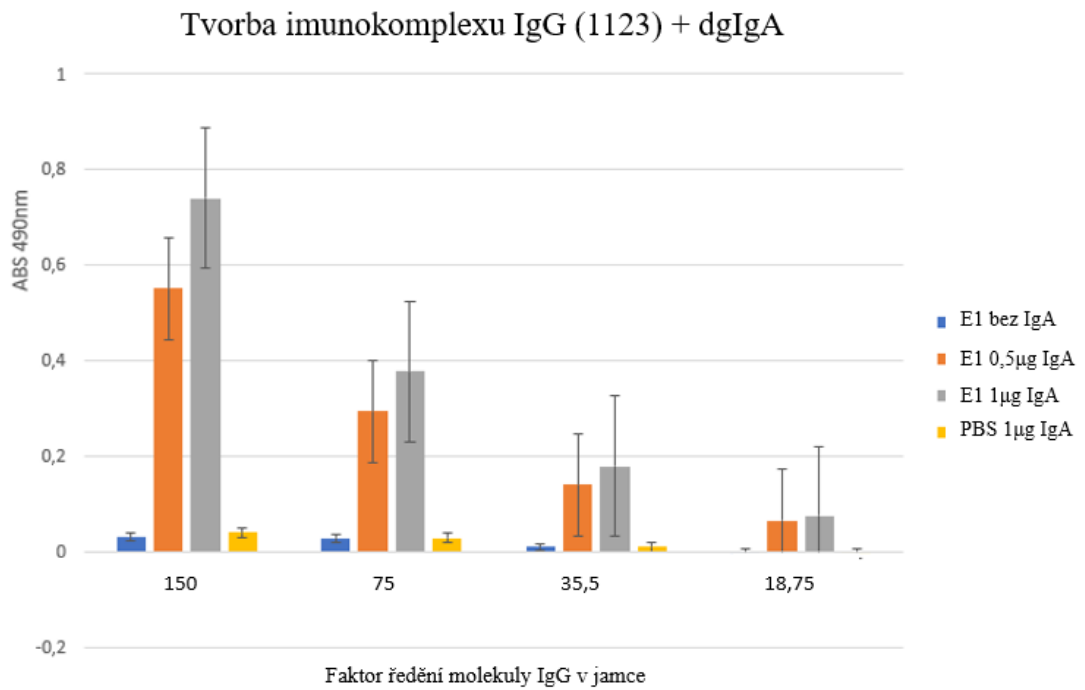
- 2. ELISA test

Tabulka č. 10: Naměřené absorbance v jednotlivých jamkách na ELISA destičce

Faktor ředění	B	IgG	IgG	IgG+IgA	IgG+IgA	IgG+IgA	IgG+IgA	PBS+IgA	PBS+IgA	B	B	B	
		(1123)	(1123)	(0,5 µg)	(0,5 µg)	(1 µg)	(1 µg)	(1 µg)	(1 µg)				
150	A	0,056	0,125	0,144	1,068	1,152	0,99	1,058	0,121	0,12	0,173	0,21	0,106
75	B	0,055	0,108	0,097	0,595	0,591	0,519	0,56	0,085	0,088	0,137	0,181	0,126
35,50	C	0,054	0,084	0,088	0,315	0,314	0,271	0,352	0,117	0,088	0,155	0,2	0,188
18,75	D	0,063	0,068	0,07	0,181	0,188	0,167	0,163	0,073	0,071	0,099	1,104	0,158
9,38	E	0,058	0,061	0,062	0,138	0,129	0,109	0,112	0,063	0,068	0,13	0,16	0,149
4,69	F	0,059	0,073	0,074	0,088	0,101	0,089	0,083	0,062	0,079	0,125	0,168	0,114
2,34	G	0,061	0,063	0,06	0,077	0,074	0,077	0,081	0,062	0,072	0,168	0,116	0,107
0	H	0,089	0,07	0,062	0,075	0,097	0,068	0,058	0,08	0,075	0,103	0,138	0,14

Legenda: B= blank

Absorbance v jednotlivých jamkách (tabulka č.10) byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 490 nm. Tato tabulka byla následně převedena do grafu.



Graf č.2: Tvorba imunokomplexu IgG (1123) s deglykosylovaným IgA v ELISA testu

V grafu (graf č.2) lze pozorovat, že největší absorbance byla přítomna u vzorku E1 s 1 µg IgA, což znamená nejvyšší tvorbu imunokomplexů. O trochu nižší absorbanci měl vzorek E1 s 0,5 µg IgA. Jako kontrola byl použit samotný vzorek IgG (1123) a samotný vzorek deglykosylované molekuly IgA, oba vzorky vykazovaly velmi nízkou absorbanci, což znamená, že nedošlo ke vzniku imunokomplexů.

6 Diskuze

Tato diplomová práce představila metodu produkce rekombinantní monoklonální molekuly IgG, jejíž sekvence byla získaná od pacienta trpícího IgA nefropatií označeného jako 1123. Tato molekula IgG byla specifická proti Gal-deficientní molekule IgA. Jedna z teorií, která se snaží vysvětlit příčiny vzniku IgA nefropatie říká, že na Gal-deficientní IgA se váže specifický IgG a vznikají tak tzv. imunokomplexy. Jsou to poměrně velké struktury a polymerní IgA není odbourávána v játrech, protože nejsou schopny projít póry, za kterými se nachází enzymy, které to dokážou. Jsou tedy zachyceny v mesangiu, kde jsou póry větší a zde se hromadí, protože v ledvinách chybí aparát na jejich odbourávání a následně ledviny poškozují.

Patogeneze IgA nefropatie byla zpočátku hlubokým tajemstvím (Suzuki *et al.*, 2008). Pacienti s IgA nefropatií mají zvýšenou hladinu cirkulujících imunokomplexů obsahujících IgA1, která kolísá v závislosti na aktivitě choroby (Coppo *et al.*, 1984). Tyto cirkulující imunokomplexy se skládají z dimerního IgA1, který představuje antigen a IgG, který představuje autoprotilátku specificky rozlišující IgA1 (Tomana *et al.*, 1997). Experimentálně bylo prokázáno, že nefropatogenní jsou cirkulující imunokomplexy o velikosti nad 800 kDa (Tomana *et al.*, 2005). Tyto komplexy ve tkáňové kultuře mezangiálních buněk stimulují jejich proliferaci a aktivují tvorbu protizánětlivých cytokinů (Allen *et al.*, 1995). Cirkulující imunokomplexy o menší molekulové hmotnosti mají opačnou biologickou aktivitu a proliferaci tlumí. Zásah do velikosti cirkulujících komplexů by tedy mohl být novým terapeutickým přístupem (Julian *et al.*, 2007).

Poslední řada průlomů v našem chápání patogeneze IgA nefropatie se objevila v důsledku klonování a imortalizace B-lymfocytů od subjektů s poruchou, což umožnilo studovat jemné detaily a možné mechanismy odpovědné za vadnou glykosylaci IgA1 a také pro hloubkové zkoumání charakteru autoprotilátek vyvíjejících se proti neepitopům spojených s glykanem na IgA1. V roce 2008 imortalizované lidské B buněčné linie jasně prokázaly, že jedinečné abnormality zahrnující předčasnou enzymatickou sialylaci a sníženou galaktosylaci O-vázaných zbytků serinu v pantové oblasti IgA1 byly základem aberantní glykosylací cirkulujících imunokomplexů u jedinců s IgA nefropatií (Suzuki *et al.*, 2008). Tyto studie se také zabývají molekulární charakterizací autoprotilátek IgG na abnormální molekulu IgA1 vylučovanou imortalizovanými klony B-buněk od subjektů s IgA nefropatií a tyto

autoprotilátky se porovnaly s těmi, které vylučovaly B-buňky z normálních buněk (Suzuki *et al.*, 2009). IgG autoprotilátky vytvořené těmito immortalizovanými B-buňkami se klonově vytvořily specificky s epitopy N-acetylgalaktosaminu na IgA1 molekul.

IgG není obecně uložen v glomerulech všech subjektů s IgA nefropatií. Procento renálních biopsií vykazujících souběžné ukládání IgG vykazuje značné rozdíly, od přibližně 15 % do 80% (Habib, 1994). Jsou-li autoprotilátky IgG k aberantně glykosylovanému IgA1 klíčové pro patogenezi onemocnění, proč nejsou všeobecně nalezeny u klinicky postižených osob? Možná glomerulární depozice autoprotilátek IgG modifikuje závažnost onemocnění, ale sama o sobě není hlavním hybatelem. Suzuki a kol. se pokusili tento problém vyřešit a naznačili, že odchylka v kódepozici IgG pozorovaná u IgA nefropatie může být způsobena rozdíly v metodách, načasováním renální biopsie nebo citlivostí imunofluorescenční mikroskopie použité pro detekci IgG. Podgalaktosylovaný IgA1 má také tendenci se spontánně agregovat a může se nespecificky vázat na složky extracelulární matrice (Kukubo *et al.*, 1998). Bylo také zjištěno, že zjevně zdraví jedinci (umírající na sebevraždu, trauma nebo sloužící jako dárce pro transplantaci ledvin) mají znatelnou prevalenci latentních IgA depozit v glomerulech. Není ale známo, zda tito jedinci také vykazují aberantně glykosylovaný IgA1 v těchto depozitech (Glassock, 2009).

Kultivované lidské mezangiální buňky představují vhodný model pro vyhodnocení biologických aktivit IgA komplexů. Imunitní komplexy ze séra pacientů s IgA nefropatií obsahující IgA1 s nedostatkem galaktózy se vážou na mezangiální buňky efektivněji než nekomplexované IgA1 nebo imunitní komplexy ze zdravých kontrol. Hodnocení biologické aktivity komplexů IgA1 ukázalo, že komplexy IgA1 s velkou molekulovou hmotností stimulovaly buněčnou proliferaci a produkci některých cytokinů. Naopak frakce zbavené IgA1 neměly stimulační aktivitu (Novak *et al.*, 2005). Další důkaz patogenní úlohy komplexů IgA1 pocházela z experimentů suplementace. Přidání malého množství desialylovaného polymerního IgA do séra pacientů s IgA nefropatií vedlo ke vzniku nových imunitních komplexů a množství stimulačních komplexů s molekulovou hmotností 800-900 kDa se zvýšilo. ELISA ukázala, že tyto komplexy obsahovaly IgG a IgA. Naproti tomu nekomplexované IgA1 nezměnil buněčnou proliferaci. Komplexy v nativním séru pacientů s IgAN zvyšovaly buněčnou proliferaci více než komplexy podobné hmotnosti od zdravých dobrovolníků (Novak *et al.*, 2008). Komplexy pacientů s IgAN shromážděné během epizody makroskopické hematurie stimulovaly buněčnou proliferaci více než komplexy získané během pozdější

klidové fáze. IgA1 komplexy s vysokými hladinami IgA1 s nedostatkem galaktózy vyvolaly více proliferace než komplexy s nízkými hladinami IgA1 s nedostatkem galaktózy (Haakenstad *et Mannik*, 1977).

Několik nálezů ukazuje na aktivaci mezangiálních buněk prostřednictvím IgA-specifických receptorů. Žádný ze známých IgA receptorů však není exprimován na lidských mezangiálních buňkách. Mezi nedávno identifikovaný kandidátský receptor, který by mohl zprostředkovat vazbu komplexů IgA1 je transferinový receptor CD71. Exprese CD71 je zejména zvýšena v mezangiu pacientů s IgAN a je lokalizována společně s depozity IgA1. Zapojení CD71 pomocí IgA1 indikuje buněčnou proliferaci a produkci cytokinů. Tato zvýšená buněčná proliferace a produkce cytokinů pomocí IgA1 je zcela inhibována anti-CD71 blokující protilátkou, což ukazuje, že CD71 hraje hlavní roli ve vazbě IgA1 (Novak *et al.*, 2008).

V této diplomové práci byly nejdříve shrnuty nejdůležitější informace o teoretické části a poté proběhla experimentální část, která měla za cíl optimalizaci transfekce buněčné linie HEK 293F plazmidy pro těžký a lehký řetězec molekuly IgG. Po produkci rekombinantního IgG byla provedena optimalizace purifikace těchto proteinů. Následně byl vypurifikovaný rekombinantní IgG testován na tvorbu imunokomplexů *in vitro* ELISA testem. Otázkou bylo, zda jsme schopni tvorbu imunokomplexu zachytit. ELISA byla tedy provedena s exprimovaným rekombinantním IgG a komerčním Gal-deficientním IgA. Výsledkem bylo, že jsme byli schopni tuto tvorbu imunokomplexu *in vitro* zachytit.

Výzkum by v budoucnu mohl pokračovat zkoumáním narušení tvorby imunokomplexu, kdy by se exprimovala pouze část IgA (jen konstantní část CH₁+CH₂ IgA) a ELISA test by ukázal, jestli se patientské IgG váže na tyto fragmenty IgA. Pokud by tomu tak bylo, tak by to znamenalo další možnost k terapeutickému využití. V praxi by to vypadalo tak, že při podání pacientovi by tyto fragmenty soutěžily s Gal-deficientním IgA obsaženým v krvi o vazbu na IgG. Část IgG by tak byla vychytána těmito fragmenty IgA a tím by zbylo méně IgG pro tvorbu velkých imunokomplexů s polymerním Gal-deficientním IgA. Tím, že fragmenty jsou malé, taky by bylo možné jejich odbourání v játrech a mohlo by to vést ke snížení zatížení ledvin pacientů velkými imunokomplexy. V této diplomové práci šlo kompletně o *in vitro* přístup, který byl přínosný v tom smyslu, že byl exprimován pouze jeden specifický typ IgG a nemuseli jsme brát v úvahu variabilitu, kterou přináší studium na lidském séru.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na vypracování literární rešerše na význam protilátek v patogenezi IgA nefropatie. Cílem praktické části bylo exprimovat v buňkách HEK 293F molekulu imunoglobulinu G od pacienta trpícího IgA nefropatií a připravit ji pro další experimenty.

Nejdříve byla provedena transformace chemokompetentních bakterií *Escherichia coli* pomocí plazmidů pro těžký a lehký řetězec molekuly IgG. Účelem této transformace bylo získat čistější plazmid pro transfekce, protože nebyly k dispozici zmražené bakteriální kultury nesoucí plazmid.

Poté byla provedena optimalizace transfekce buněk HEK 293F s různým množstvím plazmidů. Jako nejvhodnější množství plazmidů pro transfekce bylo vyhodnoceno 20 µg. Toto množství bylo použito pro transfekce ve větším objemu.

Exprimovaný protein byl následně purifikován různými metodami. Jako nejlepší metoda byla vyhodnocena purifikace pomocí proteinu A. Právě tato metoda purifikace byla poté použita pro transfekce ve větším objemu.

K charakterizaci molekuly IgG byla použita metoda ELISA. Cílem bylo ověřit *in vitro*, zda jsme schopni tvorbu imunokomplexu zachytit. Tvorbu imunokomplexu s exprimovaným IgG a komerčním Gal-deficientním IgA jsme byli schopni zachytit, což je důležité pro další experimenty a následné terapeutické využití.

Tato diplomová práce byla přínosná v tom, že jsme exprimovali specifický IgG v buněčné kultuře a nebylo potřeba brát v úvahu variabilitu, kterou přináší studium na lidském séru.

8 Literatura

Allen, A. C., Bailey, E. M., Barratt, J., Buck, K. S., Feehally, J. (1999). Analysis of IgA1 O-glycans in IgA nephropathy by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(8), 1763-1771.

Allen, A. C., Bailey, E. M., Brenchley, P. E., Buck, K. S., Barratt, J., Feehally, J. (2001). Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney international*, 60(3), 969-973.

Allen, A. C., Harper, S. J., Feehally, J. (1995). Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy. *Clinical & Experimental Immunology*, 100(3), 470-474.

Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., Dwek, R. A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 21-50.

Barratt, J., Feehally, J. (2005). IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), 2088-2097.

Barratt, J., Smith, A. C., Feehally, J. (2007). The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Nephrology*, 12(3), 275-284.

Bartůnková, J. (2002). *Imunodeficiency*. Grada.

Bauer, K., Bayer, P. M., Deutsch, E., Gabl, F. (1980). Binding of enzyme-IgG complexes in human serum to Protein-A Sepharose CL-4B. *Clinical chemistry*, 26(2), 297-300.

Berger, J. (1968). Les depots intercapillaires d'IgA-IgG. *J Urol Nephrol*, 74, 694-695.

Berlot, G., Rossini, P., Turchet, F. (2015). Biology of immunoglobulins. *Translational Medicine@ UniSa*, 11, 24.

Berthelot, L., Papista, C., Maciel, T. T., Biarnes-Pelicot, M., Tissandie, E., Wang, P. H., Boumediene, A. (2012). Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), 793-806.

Boehm, M. K., Woof, J. M., Kerr, M. A., Perkins, S. J. (1999). The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling. *Journal of molecular biology*, 286(5), 1421-1447.

Brandtzaeg, P., Johansen, F. E. (2005). Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunological reviews*, 206(1), 32-63.

Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917), 885-891.

- Coppo, R., Basolo, B., Martina, G., Rollino, C., De, M. M., Giacchino, F., Piccoli, G. (1982). Circulating immune complexes containing IgA, IgG and IgM in patients with primary IgA nephropathy and with Henoch-Schoenlein nephritis. Correlation with clinical and histologic signs of activity. *Clinical nephrology*, 18(5), 230-239.
- Coppo, R., Basolo, B., Piccoli, G., Mazzucco, G., Bulzomi, M. R., Roccatello, D., Di Belgiojoso, G. B. (1984). IgA1 and IgA2 immune complexes in primary IgA nephropathy and Henoch-Schönlein nephritis. Clinical and experimental immunology, 57(3), 583.
- D'Amico, G. (1987). The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *QJM: An International Journal of Medicine*, 64(3), 709-727.
- 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.
- D'Amico, G. (2004). Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. In *Seminars in nephrology* (Vol. 24, No. 3, pp. 179-196). WB Saunders.
- Donadio, J. V., Grande, J. P. (2002). IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 347(10), 738-748.
- Eiro, M., Katoh, T., Watanabe, T. (2005). Risk factors for bleeding complications in percutaneous renal biopsy. *Clinical and experimental nephrology*, 9(1), 40-45.
- Floege, J., Feehally, J. (2000). IgA nephropathy: recent developments. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(12), 2395-2403.
- Galla, J. H. (1995). IgA nephropathy. *Kidney international*, 47(2), 377-387.
- Galla, J. H., Spotswood, M. F., Harrison, L. A., Mestecky, J. (1985). Urinary IgA in IgA nephropathy and Henoch-Schoenlein purpura. *Journal of clinical immunology*, 5(5), 298-306.
- Glasscock, R. J. (2009). Analyzing antibody activity in IgA nephropathy. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1450-1452.
- Glasscock, R. J. (2011). The pathogenesis of IgA nephropathy. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 20(2), 153-160.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of general virology*, 36(1), 59-72.
- Grodzki, A. C., Berenstein, E. (2010). Antibody purification: affinity chromatography—protein A and protein G Sepharose. In *Immunocytochemical methods and protocols* (pp. 33-41). Humana Press.

- Guss, B., Uhlén, M., Nilsson, B., Lindberg, M., Sjöquist, J., Sjö Dahl, J. (1984). Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *European journal of biochemistry*, 138(2), 413-420.
- Haakenstad, A. O., Mannik, M. (1977). The biology of immune complexes. In *Autoimmunity* (pp. 277-360). Academic Press New York.
- Habib, R. (1994). Schönlein-Henoch purpura nephritis and IgA nephropathy. *Renal pathology with clinical and functional correlations*, 427-523.
- Harada, K., Akai, Y., Kurumatani, N., Iwano, M., Saito, Y. (2002). Prognostic value of urinary interleukin 6 in patients with IgA nephropathy: an 8-year follow-up study. *Nephron*, 92(4), 824-826.
- Herzenberg, A. M., Fogo, A. B., Reich, H. N., Troyanov, S., Bavbek, N., Massat, A. E., Cattran, D. C. (2011). Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy. *Kidney international*, 80(3), 310-317.
- Hiki, Y., Iwase, H., Kokubo, T., Horii, A., Tanaka, A., Nishikido, J., Kobayashi, Y. (1996). Association of asialo-galactosyl beta 1-3N-acetylgalactosamine on the hinge with a conformational instability of Jacalin-reactive immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 7(6), 955-960.
- Hilgers, K. F., Mann, J. F. (2002). ACE inhibitors versus AT1 receptor antagonists in patients with chronic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(4), 1100-1108.
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špíšek, R. (2017). *Základy imunologie*. 6. aktualizované vydání.
- Hrvacević, R., Topalov, D., Stojanović, R., Lilić, D., Dimitrijević, J., Maksić, D., Marić, M. (1996). Serum and urinary interleukin-6 levels in patients with primary glomerulonephritis. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 124, 40-42.
- Huh, S. H., Do, H. J., Lim, H. Y., Kim, D. K., Choi, S. J., Song, H., Kim, J. H. (2007). Optimization of 25 kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery. *Biologicals*, 35(3), 165-171.
- Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., Fox, M. (2019). Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current protocols in protein science*, 95(1), e77.
- Hober, S., Nord, K., Linhult, M. (2007). Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 40-47.
- Iwasaki, H., Zhang, Y., Tachibana, K., Gotoh, M., Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Narimatsu, H. (2003). Initiation of O-Glycan Synthesis in IgA1 Hinge Region Is Determined by a Single Enzyme, UDP-N-Acetyl- α -d-galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5613-5621.

- Jendeberg, L., Nilsson, P., Larsson, A., Denker, P., Uhlén, M., Nilsson, B., Nygren, P. (1997). Engineering of Fc1 and Fc3 from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A. *Journal of immunological methods*, 201(1), 25-34.
- Jennette, J. C. (1988). The immunohistology of IgA nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*, 12(5), 348-352.
- Ju, T., Cummings, R. D., Canfield, W. M. (2002). Purification, characterization, and subunit structure of rat core 1 β 1, 3-galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 169-177.
- Julian, B. A., Tomana, M., Novak, J., Mestecky, J. (1999). Progress in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Advances in nephrology from the Necker Hospital*, 29, 53-72.
- Julian, B. A., Wittke, S., Haubitz, M., Züribig, P., Schiffer, E., McGuire, B. M., Novak, J. (2007). Urinary biomarkers of IgA nephropathy and other IgA-associated renal diseases. *World journal of urology*, 25(5), 467-476.
- Khan, K. H. (2009). Gene transfer technologies in plants: Roles in improving crops. *Recent Research in Science and Technology*, 1(3).
- Khan, K. H. (2013). Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(2), 257.
- Koshland, M. E. (1985). The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annual review of immunology*, 3(1), 425-453.
- Kremer, E. J., Kalatzis, V., Baker, E., Callen, D. F., Sutherland, G. R., Maliszewski, C. R. (1992). The gene for the human IgA Fc receptor maps to 19q13. 4. *Human genetics*, 89(1), 107-108.
- Kokubo, T., Hiki, Y., Iwase, H., Tanaka, A., Toma, K., Hotta, K., Kobayashi, Y. (1998). Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(11), 2048-2054.
- Lai, K. N., Lai, F. M., Ho, C. P., Chan, K. W. (1986). Corticosteroid therapy in IgA nephropathy with nephrotic syndrome: a long-term controlled trial. *Clinical nephrology*, 26(4), 174-180.
- Lai, K. N., Leung, J. C., Chan, L. Y., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Tam, K. Y., Tang, S. C. (2009). Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(1), 62-72.
- Lai, K. N., Tang, S. C., Schena, F. P., Novak, J., Tomino, Y., Fogo, A. B., Glasscock, R. J. (2016). IgA nephropathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1-20.

- Levinsky, R., Barratt, T. M. (1979). IgA immune complexes in Henoch-Schönlein purpura. *The Lancet*, 314(8152), 1100-1103.
- Levinson, W. (2014). *Review of medical microbiology and immunology*. McGraw-Hill Education.
- Levy, M., Berger, J. (1988). Worldwide perspective of IgA nephropathy. *American Journal of kidney diseases*, 12(5), 340-347.
- Maillard, N., Wyatt, R. J., Julian, B. A., Kiryluk, K., Gharavi, A., Fremeaux-Bacchi, V., Novak, J. (2015). Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(7), 1503-1512.
- Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and infection*, 3(12), 1021-1035.
- Mattu, T. S., Pleass, R. J., Willis, A. C., Kilian, M., Wormald, M. R., Lellouch, A. C., Dwek, R. A. (1998). The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc α receptor interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2260-2272.
- McNabb, P. C., Tomasi, T. B. (1981). Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Annual Reviews in Microbiology*, 35(1), 477-496.
- Mestecky, J., Moro, I., Underdown, B. J. (1999). Mucosal immunoglobulins, in: *Mucosal Immunology*, 2nd edn., PL Ogra, J. Mestecky, ME Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and JR McGhee, eds.
- Mestecky, J., Tomana, M., Crowley-Nowick, P. A., Moldoveanu, Z., Julian, B. A., Jackson, S. (1993). Defective Galactosylation and Clearance of IgA1 Molecules as a Possible Etiopathogenic Factor in IgA Nephropathy1. In *IgA Nephropathy: The 25th Year* (Vol. 104, pp. 172-182). Karger Publishers.
- Mitsuhashi, H., Tsukada, Y., Ono, K., Yano, S., Naruse, T. (1993). Urine glycosaminoglycans and heparan sulfate excretions in adult patients with glomerular diseases. *Clinical nephrology*, 39(5), 231-238.
- Morton, H. C., Brandtzaeg, P. (2001). CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS-ENGLISH EDITION-*, 49(3), 217-230.
- Novak, J., Julian, B. A., Tomana, M., Mestecky, J. (2001). Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy. *Journal of clinical immunology*, 21(5), 310-327.
- Novak, J., Julian, B. A., Tomana, M., Mestecky, J. (2008). IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. In *Seminars in nephrology* (Vol. 28, No. 1, pp. 78-87). WB Saunders.

- Novak, J., Tomana, M., Brown, R., Hall, S., Novak, L., Julian, B. A., Matousovic, K. (2005). IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney international*, 67(2), 504-513.
- Ohtsubo, K., Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855-867.
- Piller, V., Piller, F., Fukuda, M. (1990). Biosynthesis of truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9264-9271.
- Radford, M. G., Donadio, J. V., Bergstralh, E. J., Grande, J. P. (1997). Predicting renal outcome in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8(2), 199-207.
- Ranieri, E., Gesualdo, L., Petrarulo, F., Schena, F. P. (1996). Urinary IL-6/EGF ratio: a useful prognostic marker for the progression of renal damage in IgA nephropathy. *Kidney international*, 50(6), 1990-2001.
- Raska, M., Moldoveanu, Z., Suzuki, H., Brown, R., Kulhavy, R., Andradi, J., Tomana, M. (2007). Identification and characterization of CMP-NeuAc: GalNAc-IgA1 α 2, 6-sialyltransferase in IgA1-producing cells. *Journal of molecular biology*, 369(1), 69-78.
- Rio, D. C., Clark, S. G., Tjian, R. (1985). A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science*, 227(4682), 23-28.
- Roberts, I. S., Cook, H. T., Troyanov, S., Alpers, C. E., Bruijn, J. A. (2009). The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney international*, 76(5), 546-556.
- Roitt, I. M., Brostoff, J., Male, D. K. (2001). *Immunology*. Mosby Incorporated.
- Russo, D., Pisani, A., Balletta, M. M., De Nicola, L., Savino, F. A., Andreucci, M., Minutolo, R. (1999). Additive antiproteinuric effect of converting enzyme inhibitor and losartan in normotensive patients with IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases*, 33(5), 851-856.
- Sato, M., Hotta, O., Taguma, Y. (2002). Glomerulo-tubular junction stenosis as a factor contributing to glomerular obsolescence in IgA nephropathy. *The Journal of pathology*, 197(1), 14-19.
- Schroeder Jr, H. W., Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41-S52.
- Selvaskandan, H., Cheung, C. K., Muto, M., Barratt, J. (2019). New strategies and perspectives on managing IgA nephropathy. *Clinical and experimental nephrology*, 23(5), 577-588.

- Sterzel, R. B., Lovett, D. H., Stein, H. D., Kashgarian, M. (1982). The mesangium and glomerulonephritis. *Klinische Wochenschrift*, 60(18), 1077-1094.
- Suzuki, H., Moldoveanu, Z., Hall, S., Brown, R., Vu, H. L., Novak, L., Alarcón, G. S. (2008). IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 629-639.
- Suzuki, H., Fan, R., Zhang, Z., Brown, R., Hall, S., Julian, B. A., Lee, J. Y. (2009). Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1668-1677.
- Suzuki, K., Honda, K., Tanabe, K., Toma, H., Nihei, H., Yamaguchi, Y. (2003). Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney international*, 63(6), 2286-2294.
- Suzuki, H., Kiryluk, K., Novak, J., Moldoveanu, Z., Herr, A. B., Renfrow, M. B., Julian, B. A. (2011). The pathophysiology of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(10), 1795-1803.
- Tarelli, E., Smith, A. C., Hendry, B. M., Challacombe, S. J., Pouria, S. (2004). Human serum IgA1 is substituted with up to six O-glycans as shown by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Carbohydrate research*, 339(13), 2329-2335.
- Tomana, M., Matousovic, K., Julian, B. A., Radl, J., Konecny, K., Mestecky, J. (1997). Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney international*, 52(2), 509-516.
- Tumlin, J. A., Madaio, M. P., Hennigar, R. (2007). Idiopathic IgA nephropathy: pathogenesis, histopathology, and therapeutic options. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2(5), 1054-1061.
- Underdown, B. J., Schiff, J. M. (1986). Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annual review of immunology*, 4(1), 389-417.
- Van Der Boog, P. J., Van Kooten, C., De Fijter, J. W., Daha, M. R. (2005). Role of macromolecular IgA in IgA nephropathy. *Kidney international*, 67(3), 813-821.
- Wingfield, P. (1998). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*, 13(1), A-3F.
- Woof, J. M., Kerr, M. A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 208(2), 270-282.
- Woof, J. M., Mestecky, J. (2005). Mucosal immunoglobulins. *Immunological reviews*, 206(1), 64-82.