

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Studium vlivu inhibitorů ovlivňujících vývoj B lymfocytů na tvorbu galaktosa-deficientního IgA u IgA nefropatie**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Helena Ženožičková</b>
Studijní program:	R20875 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.</b>
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s uvedením citací všech použitých zdrojů literatury a dostupných cizojazyčných článků. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Jsem si vědoma toho, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne: .....

.....

Podpis diplomanta

## **Poděkování**

Tímto je mi velkou ctí poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Kateřině Zachové, Ph.D. za vstřícný a obětavý přístup a podnětné rady. Ráda bych také poděkovala své rodině, která pro mě byla velkou všestrannou oporou. Na závěr bych chtěla poděkovat celému týmu Ústavu Imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, pod jehož záštitou jsem celou výzkumnou část své práce realizovala.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Helena Ženožičková
Název práce	Studium vlivu inhibitorů ovlivňujících vývoj B lymfocytů na tvorbu galaktosa-deficientního IgA u IgA nefropatie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Diplomová práce pojednává o problematice IgA nefropatie, jakožto vážného onemocnění vedoucího k náhodnému nálezu hematurie a v horších případech i k selhání ledvin. Na tento typ onemocnění doposud nebyl vyvinut lék, jsou pouze dostupné metody léčby zpomalující progresivitu nemoci. V rámci diplomové práce byly rozebírány nejnovější poznatky související s projevy IgA nefropatie na imunologické a biochemické úrovni, zejména pokud se jedná o způsob N-glykosylace proteinů ve vztahu k tvorbě aberantně glykosylovaných forem IgA1. Rovněž je rozebrán způsob diferenciací B lymfocytů v lidské krvi se zapojením APRIL, BAFF, BCMA a TACI molekul.

Praktická část byla zaměřena na analýzu B buněčných populací v periferní krvi s použitím povrchového barvení za použití metody spektrální cytometrie. Cílem bylo studium vlivu koncentrací IL-6 a jeho inhibitorů Stattic a AZD 1480 na Gd-IgA1 u pacientů s IgAN léčených a neléčených kortikosteroidy. Z výsledků bylo zjištěno, že účinkem IL-6 se snižuje populace CD19<sup>+</sup> a sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů, zvyšuje se zastoupení Gd-IgA1 B lymfocytů a došlo k vyšší expresi molekul CD19<sup>+</sup> lymfocytů na povrchu buněk u léčených pacientů. Kortikosteroidy jsou tedy díky svému pleiotropnímu efektu schopny tlumit jiné vedlejší příznaky nemoci než je právě exprese Gd-IgA1 B lymfocytů. Inhibitor Stattic neinhiboval CD19<sup>+</sup> buňky, ale sIgA<sup>+</sup> buňky z CD19<sup>+</sup> lymfocytů, což se projevilo jako snížení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 B lymfocytů, proto se nedaly

změřit v porovnání s inhibítozem AZD 1480, který bylo možné analyzovat ve všech zkoumaných populacích B lymfocytů. Získané informace mohou být použity ke studiu způsobů, jak je možné ovlivnit tvorbu Gd-IgA1 pomocí inhibitorů JAK/STAT signálních drah nebo molekul ovlivňujících správný vývoj B lymfocytů.

Klíčová slova	IgA, nefropatie, aberantní IgA, N-glykosylace, průtoková cytometrie, B lymfocyty, IL-6, JAK/STAT signální dráhy, AZD 1480 a Stattic inhibitory
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Helena Ženožičková
Title	The study of the effect of inhibitors on the development of B lymphocytes on the formation of galactose-deficient IgA in IgA nephropathy
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Immunology, Faculty of Medicine, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

The diploma thesis deals with the issue of IgA nephropathy, as a serious disease leading to accidental findings of hematuria and in worse cases to renal failure. A cure for this type of disease has not been developed yet. Treatment available at the moment can only slow down the progressivity of the disease. In the diploma thesis we analyzed the latest findings related to the manifestations of IgA nephropathy at the immunological and biochemical level, which can be caused by the differences of N-glycosylation of proteins and formation of aberrant glycosylated forms of IgA1. Differentiation of B lymphocytes in human blood with the involvement of APRIL, BAFF, BCMA and TACI molecules was also discussed.

The experimental work focused on the analysis of B cell populations in peripheral blood by surface staining using the method of spectral cytometry. The aim of this work is to study the effect of IL-6 concentrations and its Stattic and AZD 1480 inhibitors on Gd-IgA1 in IgAN patients treated and untreated with corticosteroids. The results showed that the effect of IL-6 reduces the population of CD19<sup>+</sup> and sIgA<sup>+</sup> B lymphocytes, increases the representation of Gd-IgA1 B lymphocytes and there was a higher expression of CD19<sup>+</sup> lymphocyte molecules on the cell surface of treated patients. Thanks to their pleiotropic effect, corticosteroids are able to decrease other side effects of the disease than the expression of Gd-IgA1 B lymphocytes. The Stattic inhibitor did not inhibit CD19<sup>+</sup> cells, but sIgA<sup>+</sup> cells from CD19<sup>+</sup> lymphocytes, which manifested

itself as a decrease in the percentage of Gd-IgA1 B lymphocytes, therefore they could not be measured as compared with the AZD 1480 inhibitor, which could be analyzed in all B cell populations mentioned in this work. The acquired information can be used to study the ways in which the production of Gd-IgA1 can be influenced by JAK/STAT signaling pathway inhibitors or molecules influencing the differentiation of B lymphocytes.

Keywords	IgA, nephropathy, aberrant IgA, N-glycosylation, flow cytometry, B lymphocytes, IL-6, JAK/STAT signaling pathways, AZD 1480 and Stattic inhibitors
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....</b>	<b>3</b>
2.1 CHARAKTERISTIKA IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	3
2.1.1 Složky imunity .....	5
2.2 B-LYMFOCYTY .....	6
2.2.1 Diferenciace B-lymfocytů.....	8
2.2.2 Zapojení cytokinů BAFF a APRIL v diferenciaci .....	10
2.3 IMUNOGLOBULINY .....	12
2.3.1 Charakteristika a objev imunoglobulinů .....	12
2.3.2 Imunoglobulin A – funkce a struktura .....	13
2.4 CYTOKINY – HLAVNÍ CHARAKTERISTIKA .....	15
2.4.1 IL-6 .....	15
2.4.1.1 Účinek IL-6 v souvislosti s IgA nefropatií.....	17
2.5 NEFROPATIE.....	19
2.5.1 IgA nefropatie .....	20
2.5.2 Změna charakteru glykosylace IgA1 u pacientů s IgAN za tvorby Gd-IgA1 .....	22
2.5.3 Hypotéza čtyř hitů.....	25
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>28</b>
3.1 MATERIÁL .....	28
3.1.1 Biologický materiál, protilátky a inhibitory.....	28
3.1.2 Chemikálie a roztoky .....	28
3.1.3 Laboratorní pomůcky .....	28
3.1.4 Přístrojové vybavení .....	29
3.1.5 Software .....	29
3.2 METODY .....	30
3.2.1 Příprava vzorků periferní krve pacientů s IgAN.....	30
3.2.2 Izolace PBMC v periferní krvi.....	30
3.2.3 Počítání buněk.....	31
3.2.4 Nastavení reakce pro stimulaci buněk pomocí IL-6 .....	32
3.2.5 Nastavení reakce pro inhibici buněk za použití inhibitorů JAK/STAT dráhy .....	33
3.2.6 Povrchové barvení buněk pomocí markerů B lymfocytů a Gd-IgA1 .....	34
3.2.7 Nastavení knihovny pro použití průtokové cytometrie v experimentu.....	35
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
4.1 STIMULACE IZOLOVANÝCH PBMC POMOCÍ IL-6 .....	38
4.2 KULTIVACE PBMC S INHIBITORY STATTIC A AZD 1480.....	53
<b>5 DISKUZE.....</b>	<b>59</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>61</b>
<b>7 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>62</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>73</b>



## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Vypracovat literární rešerši týkající se aktuálních poznatků v oblasti IgA nefropatie včetně popisu vzniku aberantního IgA a vliv stimulační IL-6 a následné inhibice pomocí Stattic a AZD 1480 inhibitorů. Dále přiblížit možnosti zapojení APRIL, BAFF, BCMA a TACI molekul do diferenciací B lymfocytů.

### **Experimentální část**

Analyzovat základní B buněčné populace v periferní krvi za použití povrchového barvení, stanovit množství Gd-IgA1 pozitivních B lymfocytů v periferní krvi IgA nefropatických pacientů neléčených v porovnání s léčenými kortikosteroidy a studovat způsoby ovlivnění tvorby Gd-IgA1 pomocí IL-6 a jeho inhibitorů JAK/STAT signálních drah jako jsou Stattic a AZD 1480.

# 1 ÚVOD

V předkládané diplomové práci je hlavním tématem IgA nefropatie (dále jen IgAN), což je jedna z nejčastěji se vyskytujících glomerulonefritid ve světě. Proti tomuto onemocnění doposud nejsou známá adekvátní léčiva, která by přispěla ke snížení komplikací u pacientů trpících touto nemocí. Dosti často dochází k rozvoji tohoto onemocnění až do stádia renálního selhání. V současné době jsou lékaři schopni poskytnout pacientům pouze kauzální léčbu s pomocí kortikosteroidní léčby na bázi prednisonu.

Onemocnění IgA nefropatie je charakteristické svým zvýšeným výskytem pozměněného imunoglobulinu A (IgA). Tato protilátka je typická zejména pro slizniční povrchy, a to v oblasti gastrointestinálního traktu nebo dýchacího řetězce. U člověka se může vyskytovat ve třech isoformách – monomerní, dimerní a polymerní. Polymerní imunoglobulin označovaný jako pIgA je hlavní patologickou složkou u onemocnění IgAN.

Příčinou onemocnění IgAN je tedy tvorba galaktosa deficientního IgA1 (Gd-IgA1), který vzniká chybnou glykosylací v pantové oblasti těžkého řetězce IgA1. Deficiencie O-glykanů může být způsobena předčasnou sialylací N-acetylgalaktosaminu (GalNAc), kdy se na GalNAc nejprve naváže kyselina sialová, která zabrání pozdějšímu navázání galaktosy. Takto vzniklý Gd-IgA1 vyvolá imunitní odpověď organismu. V krevním řečišti se Gd-IgA1 naváže na IgG protilátku a vytvoří cirkulující imunitní komplex, který putuje až do ledvin, kde se usazuje v glomerulu a aktivuje tak proliferaci mesangiálních buněk. Tím se aktivuje produkce cytokinů a zánětlivý proces vedoucí k poškození ledvin. Za normálních okolností by se chybně vytvořený Gd-IgA1 odboural v játrech, ovšem to je znemožněno právě vznikem komplexu.

Jedním z hlavních cytokinů, který má zánětlivé i protizánětlivé účinky je interleukin-6 (IL-6). Jedná se o jeden z růstových faktorů zralých B lymfocytů mající vliv na jejich diferenciaci a dozrávání v buňky plazmatické, schopné tvořit protilátky. Tento cytokin je schopen bránit infekcím, ale rovněž jeho aktivita může přispět k prohloubení chronických zánětů.

U pacientů trpících IgAN byla prokázána právě jeho zvýšená hladina v krevním oběhu, a to zejména v ledvinách. Bylo prokázáno, že IL-6 má vliv na aktivitu některých glykosyltransferas podílejících se na O-glykosylaci pantové oblasti těžkého řetězce IgA1

a tudíž by mohl být zodpovědný rovněž za zvýšení produkce Gd-IgA1. Toto chování se ovšem zatím nepotvrdilo.

V návaznosti na výše zmíněné poznatky byl v experimentální části analyzován stimulační účinek IL-6 na buňky z periferní krve IgAN. Zároveň signální dráhy aktivace byly charakterizovány pomocí inhibitorů Stattic a AZD 1480. Vliv IL-6 byl sledován u buněčných populací CD19<sup>+</sup>, sIgA<sup>+</sup> a Gd-IgA1 B lymfocytů.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Charakteristika imunitního systému

Imunitní systém je důležitý prvek obrany organismu vůči vnějším či vnitřním vlivům, tudíž rozeznává mezi škodlivinami a naopak organismu prospěšnými látkami, neboť jeho hlavním cílem je udržet integritu organismu. Projevem vnitřní ochrany je například odstranění již nefungujících nebo mutantních buněk a rovněž zabraňuje negativní imunitní odpovědi vůči vlastním zdravým tkáním. Vnější projevem je takzvaná obranyschopnost organismu, kdy je cílem vůbec zabránit vstupu nežádoucího mikroorganismu a jeho toxických produktů nebo cizorodé látky do organismu (Hořejší et al., 2017).

Aby došlo k imunitní reakci, je potřeba vystavit imunitní systém libovolné chemické struktury, která je odborně nazývána antigen. Jako příklad antigenu se uvádí makromolekulární látky, jako jsou proteiny, lipoproteiny, dále také lipidy a komplexní polysacharidy. Epitopem je velmi malá oblast antigenu zvaná též jako antigenní determinant, rozpoznávaná imunitními receptory na povrchu protilátky. Antigeny, protilátky a komplementové fragmenty utvářejí takzvané imunokomplexy. Imunitní reakce na daný antigen dělíme do dvou skupin na základě jejich původu a projevu na nespecifické a specifické neboli adaptivní (Hořejší et al., 2017).

Nespecifická též vrozená imunitní odpověď je vývojově starší a přítomná ve všech mnohobuněčných organismech. Typickým projevem vrozené imunity je její reakce na funkční či strukturně podobné rysy mnoha odlišných patogenů. Rozlišujeme dvě složky vrozené imunity, a to humorální a buněčnou. Humorální složku tvoří například sérové proteiny, interferony, složky komplementu a lektiny, naopak tu buněčnou charakterizují přirozeně cytotoxické buňky zvané z anglické terminologie jako NK („natural killers“) a zejména také fagocytující buňky. Nejsou schopny opakované reakce na základě předchozího setkání s antigenem, protože nemají imunologickou paměť, ale na rozdíl od specifické imunity dokáží na cizorodou látku zareagovat téměř okamžitě nebo v horizontu několika minut. Existují ale i jiné nespecifické mechanismy, které mají zásadní význam při zachování integrity organismu. Řadíme mezi ně žaludeční (pepsin), pankreatické (trypsin a chymotrypsin) a slinné (lysozym) enzymy, kyselé pH žaludečních šťáv nebo moče, defensiny (antibakteriální peptidy), řasinkovitý pohyb v dýchacích cestách, ale i proud vzduchu nebo tekutiny a v neposlední řadě také přítomnost nepatogenních mikroorganismů, které kompetují s těmi patogenními o

vazebná místa na receptorech, aby mohly umožnit adhezi na epitelní buňky a zajistit tak produkci antibakteriálních látek (Hořejší et al., 2017).

Adaptivní (získaný) mechanismus imunity je vývojově mladší než nespecifický. Reaguje na veškerou nežádoucí strukturu tím, že aktivuje činnost k tomu určených buněčně specifických T lymfocytů, nebo humorálním mechanismem, a to tvorbou protilátek. Podstatná je u těchto reakcí zejména jejich imunologická paměť a poločas reakce v řádech několika dní až týdnů. Pro správnou funkci imunitního systému je nutná kooperace jak adaptivních, tak nespecifických reakcí (Hořejší et al., 2017).

První fází obrany organismu je aktivace nespecifické imunity, protože je nutno rozpoznat struktury charakterizující jednotlivé mikroorganismy, poté mohou být aktivovány odlišné druhy fagocytů, které plní funkci buněk prezentujících antigen T lymfocytům a složky komplementu za cílem likvidace patogenů. Díky glykoproteinům MHC se na povrchu antigen prezentujících buněk soustředují fragmenty proteinů, jež byly jimi předtím pohlceny. Některé buňky nespecifické imunity jsou tak schopny diferenciací a kostimulační signalizace lymfocytům (Hořejší et al., 2017).

Dalším krokem imunitní reakce je klonální princip antigenního působení. V organismu jsou tedy dopředu syntetizovány až desítky milionů T a B lymfocytů se strukturálně odlišnými detaily vazebných míst svých povrchových receptorů specifických pro daný antigen. Po vstupu patogena, který má na svém povrchu příslušný antigen, do organismu, dochází k navázání antigenu na receptor lymfocytu a za adekvátních podmínek dojde k tvorbě buněčných klonů o stejné specifitě s cílem následné likvidace patogena. Klony antigenně specifických lymfocytů musí být schopny rozeznávat molekuly a buňky pro organismus přirozené a nereagovat na ně (pozitivní selekce). Pro správnou aktivaci antigenně specifických lymfocytů je nutná přítomnost ještě vedlejšího signálu zprostředkovaného ostatními buňkami imunitního systému, což se nazývá druhý signál (kostimulace), který zabraňuje potenciálnímu samovolnému nebezpečnému aktivování lymfocytů (Hořejší et al., 2017).

### 2.1.1 Složky imunity

Na celkové imunitní odpovědi se podílí řada buněk a molekul, které zaujímají složitější komplexy nazývané jako lymfatické orgány nebo lymfatická tkáň. Jejich vzájemná kooperace je důležitá. Těmi nejzásadnějšími lymfatickými orgány zodpovědnými za vznik, zrání či diferenciaci imunokompetentních buněk jsou bezesporu brzlík (z latiny thymus) a kostní dřeň. Mezi sekundární lymfatické orgány naopak řadíme lymfatické uzliny, slezinu, dále také Peyerovy plaky střeva, tonzily a červovitý výběžek slepého střeva zvaný též jako appendix. Právě lymfatické orgány a tkáně jsou centrem antigenně specifických reakcí imunitního systému. Lymfatické cévy zajišťují transport lymfy mezi tkáněmi a krevním řečištěm. Aferentními cévy jsou nazývané ty, jež vedou lymfu a v ní obsažené buňky prezentující antigen a samotné antigeny do uzlin. Naopak eferentní cévy odvádějí zralé efektorové lymfocyty spolu s lymfou do krevního oběhu. Výstelku cév tvoří endoteliální buňky, a právě k jejich stimulaci společně s B lymfocyty dochází díky folikulárním dendritickým buňkám (FDC), které rovněž zajišťují transport leukocytů z krevního řečiště do příslušných tkání (Hořejší et al., 2017).

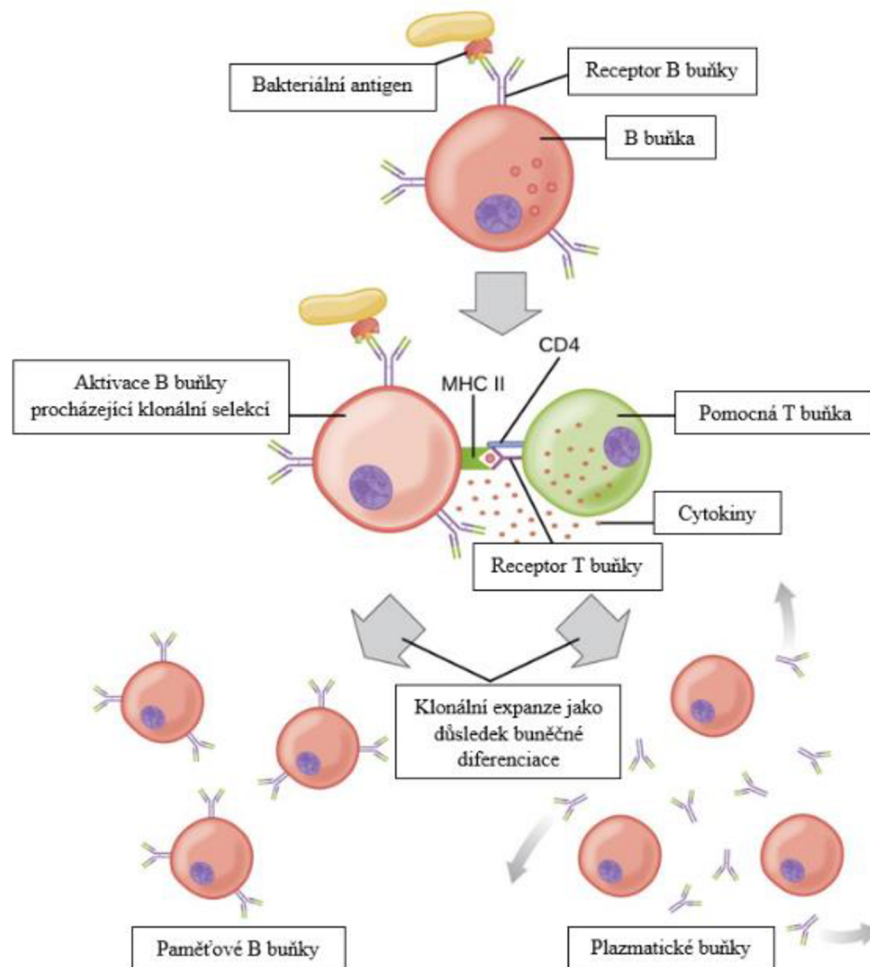
Velmi podstatnými buňkami imunitního systému jsou ty vyvinuté z leukocytů, které vznikají z pluripotentních kmenových buněk zejména kostní dřeně, a právě zde je jejich tvorba v malé míře zachována po zbytek života. Kmenové buňky tak umožňují diferenciaci ve dvě linie, a to lymfoidní a myeloidní (Hořejší et al., 2017).

Myeloidní linie jako projev nespecifické imunity je zodpovědná za tvorbu tří typů granulocytů, kam patří eozinofily, neutrofilie a bazofily, také zde patří monocyty dále diferencující v makrofágy. Patří sem též dendritické buňky a mastocyty takzvané žírné buňky (Hořejší et al., 2017).

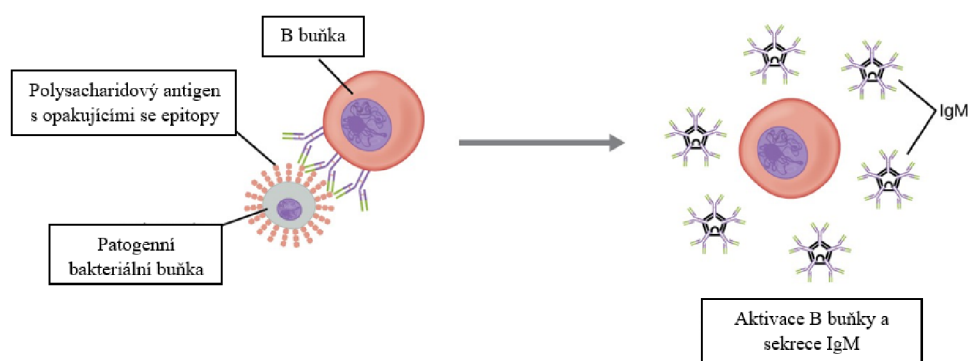
## 2.2 B-lymfocyty

Jedná se o buňky imunitního systému utvářené z kmenových buněk kostní dřeně. Většina B buněk jsou naivní B lymfocyty, mající pool náhodně vytvořených B-buněčných receptorů (dále jen BCR) a čekající na potencionální odpovídající antigen. Periferní krev je tvořena cca ze 70 % naivními B lymfocyty, 29 % paměťovými B lymfocyty a 1 % plazmablastem a plazmocyty. Další část B buněk dozrává v paměťové B lymfocyty. Jak paměťové, tak plazmatické B lymfocyty jsou schopny si pamatovat podněty, které byly příčinou jejich prvotního vzniku, a proto jsou schopny rychlejší imunitní odpovědi. B lymfocyty umožňují na svém povrchu exprimovat protilátky, zvané jako imunoglobuliny. Je známo, že přibližně 85% periferních B lymfocytů je fenotypicky zralých s exponenciální kinetikou prvního řádu definovanou poločasem 5-6 týdnů, zatímco zbytek je krátkodobý a životnost je jen několik dní (Fulcher & Basten, 1997).

Vývoj B lymfocytů probíhá ve dvou krocích, přičemž každý je realizován v jiném typu tkáně. Prekurzory takovýchto lymfocytů jsou diferenciovány z hematopoetické kmenové buňky v kostní dřeni a efektorové (paměťové) B lymfocyty v sekundárních lymfatických tkáních a slezině (McHeyzer-Williams & McHeyzer-Williams, 2005; Allen et al., 2007). Komunikace mezi těmito tkáněmi funguje prostřednictvím periferní krve. B buňky se zralými fenotypovými vlastnostmi a plně funkčními B buněčnými antigenními receptorovými ligandy opouštějí kostní dřeň prostřednictvím krevních cév a dostávají se do periferní krve, kde recirkulují mezi jednotlivými sekundárními lymfoidními tkáněmi a v horizontu několika dní umírají. Ty z B lymfocytů, které rozpoznávají antigen v lymfatických uzlinách nebo slezině, jsou aktivovány a zahájí tak reakci germinálního centra doprovázeného spoluprací s aktivovanými CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Po průběhu afinitního zrání v temné zóně germinálního centra a rovněž i světlé zóně tohoto centra a po vícečetné proliferaci se začnou generovat paměťové a pre-efektorové B lymfocyty (Obr. 1 a 2) (McHeyzer-Williams & McHeyzer-Williams, 2005; Allen et al., 2007).



Obr. 1 Specifická T buněčná aktivace B lymfocytů (Převzato a upraveno dle <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/b-lymphocytes-and-humoral-immunity/>)



Obr. 2 Nespecifická T buněčná aktivace B lymfocytů (Převzato a upraveno dle <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/b-lymphocytes-and-humoral-immunity/>)



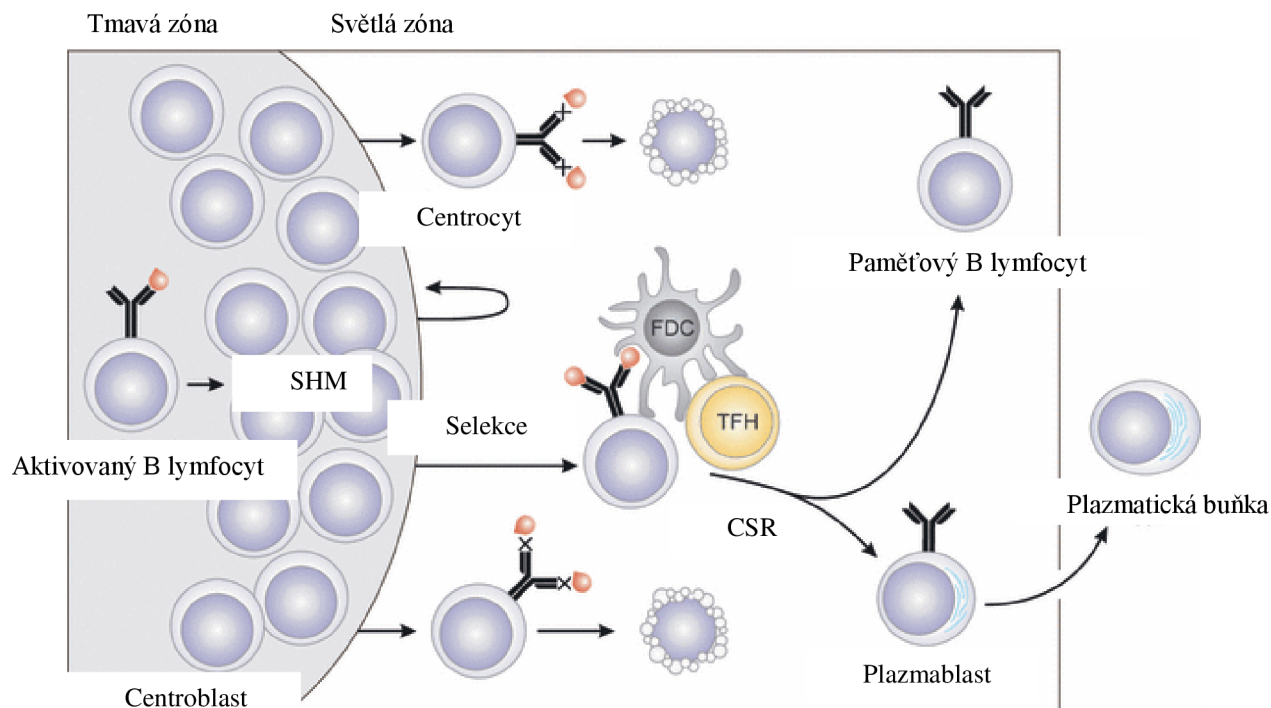
## 2.2.1 Diferenciace B-lymfocytů

Plazmatická buňka vzniklá terminální diferenciací B lymfocytu je jediným typem buňky schopným v našem těle produkce protilátek (Tsai et al., 2019). Cesta vývoje B lymfocytů je zahájena v jaterních buňkách plodu a následně hematopoetických kmenových buňkách (dále jako HSC) kostní dřeně. Stromální buňky lymfatických uzlin jsou pak dále schopny produkovat chemokiny, jako je *CXCL12* nebo *IL-7* a cytokiny potřebné při raném stádiu vývoje B lymfocytů (Nagasawa, 2007). Díky stromálním buňkám jsou HSC schopny diferenciovat na lymfoidní progenitorové buňky označované jako CLP, které umožňují exprimovat receptory pro *IL-7* a *c-kit* čímž zajišťují přenos signálu potřebný pro proliferaci a přežití CLP buněk při jejich setkání s ligandy. Pro-B lymfocyty vznikají z CLP po transkripci k tomu potřebných faktorů například raného B-buněčného označovaného jako EBF a E2A (O'Riordan & Grosschedl, 1999). Jak u B lymfocytů, tak u pro-B lymfocytů probíhá v kostní dřeni genetické přeskupení těžkých a lehkých řetězců imunoglobulinových genů označované jako V(D)J rekombinace za cílem produkce nezralých B lymfocytů umožňujících expresi IgM (Krangel, 2003).

Naivní B lymfocyty putují z kostní dřeně do sleziny, kde dochází k jejich diferenciaci na T1 a T2 formu. Označení T1 a T2 se používá pro přechodné stádium B lymfocytů mezi nezralými B lymfocyty kostní dřeně a zralými naivními B lymfocyty vyskytujícími se v oblasti sekundárních lymfatických tkání a periferní krvi. (Wardemann a kol., 2003). Následně B lymfocyty diferencují za tvorby zralých naivních B lymfocytů, které se od přechodných liší nízkým obsahem tepelně stabilního antigenu (HSA). Přechodné B lymfocyty rovněž exprimují fenotypové povrchové markery AA4 (Allman et al., 1999). Typickou charakteristikou T1 B lymfocytů je přítomnost povrchových markerů jako jsou IgM, IgD, CD21 a CD23 v porovnání s T2 formou, která se vyznačuje zejména vysokou hladinou povrchového IgM (Cuss et al., 2006). Právě ona přechoná forma T2 B lymfocytů následně dokončí svůj proces zrání a slouží k tvorbě zralých naivních B lymfocytů. Zralé B lymfocyty jsou schopny koexprimovat IgM a IgD protilátky a čekají na cizí antigen s cílem jejich aktivace (Chung et al., 2003). Aby došlo k aktivaci a následné diferenciaci zralých B lymfocytů v oblasti periferních lymfatických orgánů na plazmatické buňky, které budou produkovat protilátky je za potřebí dvou signálů, přičemž první je odvozen od antigenem vázaných B buněčných receptorů (BCR) a druhý je zprostředkován na T lymfocytech závisle nebo nezávisle. Protilátky o nízké afinitě jsou produkovány

krátkodobými plazmatickými buňkami, jejichž syntéza probíhá s pomocí na T buňkách nezávislých antigenů, mezi které řadíme například glykolipidy nebo lipopolysacharidy. Ty B lymfocyty, které se diferencovaly do paměťových nebo plazmatických buněk o vyšší afinitě k antigenům vznikly v zárodečném centru díky iniciaci ze strany T závislých buněk po setkání s antigenem a interakci s folikulárními pomocnými T buňkami (označované Tfh) (Nutt et al., 2015). V oblasti zárodečného centra může docházet k polarizaci do tmavé zóny, což je charakterizováno somatickou hypermutací B lymfocytů v proměnných oblastech BCR genů nebo do světelné zóny, kde dochází k afinitnímu zrání po interakci s folikulárními dendritickými buňkami i Tfh buňkami, a tím je umožněna volba klonu B lymfocytů, jimž odpovídá vysoká afinita k BCR receptoru (Manser, 2004). Kvůli zachování buněčné diferenciace a proliferace produkují Tfh buňky IL-21 a pro přežití B lymfocytů ligand CD40 (Bishop & Hostager, 2001). V zárodečném centru u B lymfocytů probíhá celá řada rekombinací na variabilních i konstantních částech BCR receptoru vedoucí k afinitní maturaci BCR a izotypovému přesmyku. B lymfocyty, které nejsou aktivovány folikulárními dendritickými buňkami, podléhají apoptóze. Ostatní diferencují na plazmablasty a následně až na plazmatické buňky. Plazmablasty jsou schopny se rychle dělit a produkovat protilátky. Jsou takovým mezistupněm diferenciace a jsou předurčeny k tvorbě terminálně diferencovaných plazmatických buněk. Následně takto vzniklé plazmatické buňky migrují do kostní dřeně, kde mají vysokou životnost. Pro jejich aktivaci a přežití je nutné, aby přijímaly signály ze stromálních buněk kostní dřeně (Alberts, 2002). Takto vzniklé plazmatické buňky jsou schopny cirkulovat do kostní dřeně a produkovat antigen-specifické imunoglobuliny, čímž se prodlouží jejich životnost a doba protekce proti specifickým antigenům (Kurosaki et al., 2015).

Buněčná imunita, která je trvalá, spočívá v tvorbě vysoce afinitních plazmatických B lymfocytárních buněk a rovněž buněk paměťových, které jsou produktem odpovědi folikulárních B lymfocytů. Folikuly B lymfocytů jsou nejprve obsazeny IgD<sup>+</sup> a IgM<sup>+</sup> naivními B buňkami, a poté jsou schopny rozpoznat přítomnost exogenního antigenu a aktivovat se (Batista & Harwood, 2009). Takto aktivované B lymfocyty migrují do zárodečných center sekundárních lymfatických orgánů, kde probíhá jejich proliferace za pomoci již aktivovaných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Crotty, 2011). Část B lymfocytů tedy diferenciuje na plazmablasty s krátkou dobou života a zbytek umožňuje okamžitou extra-folikulární humorální odpověď (Obr. 3) (MacLennan et al., 2003).



Obr. 3 Proces diferenciacie B lymfocytů (Převzato a upraveno dle Alinikula & Lassila, 2011).

### 2.2.2 Zapojení cytokinů BAFF a APRIL v diferenciaci

Mezi významnou skupinu proteinů o molekulové hmotnosti pod 30 kDa patří cytokiny. Tyto proteiny jsou utvářeny a vylučovány během imunitních odpovědí, a to jak vrozených, tak získaných, jelikož zajišťují celkovou interakci mezi hematopoetickými, lymfoidními a zánětlivými buňkami zejména jako signální systém (Charo & Ransohoff, 2006). Díky navázání na specifické membránové receptory cílových buněk může být zahájena kaskáda intracelulární signalizace. Důvodem je změna vzoru genové exprese, která je potřeba kvůli regulaci biologických procesů buněk, jako je například diferenciaci, růst, adaptace za účelem přežití, aktivace nebo naopak smrt (Charo & Ransohoff, 2006; Zhang et al., 2015).

Jedním z významných cytokinových aktivačních faktorů B buněk je BAFF (B-buněčný aktivační faktor), nazývaný též jako TNFSF13B, BlyS, zTNF4, TALL-1 nebo THANK, který se podílí na maturaci autoreaktivních B lymfocytárních klonů a diferenciacním stádiu B lymfocytů. Jeho objev se datuje do roku 1999, kdy za použití myších modelů jej nezávisle na sobě identifikovalo několik vědeckých skupin, a to je také pravý důvod, proč bývá často označován různými názvy (Hu a kol., 1999; Schneider et al., 1999). Ve své struktuře obsahuje tři receptory nazvané jako TACI (transmembránový

aktivátor, modulátor vápníku a cyklofilinový ligandový interaktor), BAFF-R (BAFF receptor) a BCMA (B buněčný maturační antigen) (Naradikian et al., 2015; Wei et al., 2015). S dalším ligandem nazvaným jako APRIL (ligand indukující proliferaci), který se řadí mezi nadrodinu tumor nekrotizujících faktorů známých též pod zkratkou TNF, má společné dva ze tří receptorů. Díky aktivaci signálního systému pomocí homeostatických cytokinů BAFF může docházet k úplným reakcím mezi hematopoetickými, lymfoidními a zánětlivými buňkami. Ligandy TNF rodiny jsou často produkovány například aktivovanými T buňkami, epiteliálními buňkami slinných žláz, bronchiálními buňkami, monocyty, dendritickými buňkami, makrofágy, neutrofilů či stromálními buňkami ovlivňujícími životnost a funkci plazmatických a B buněk v závislosti na zdravotním stavu pacienta (Lin-Lee a kol., 2006; Fu a kol., 2009).

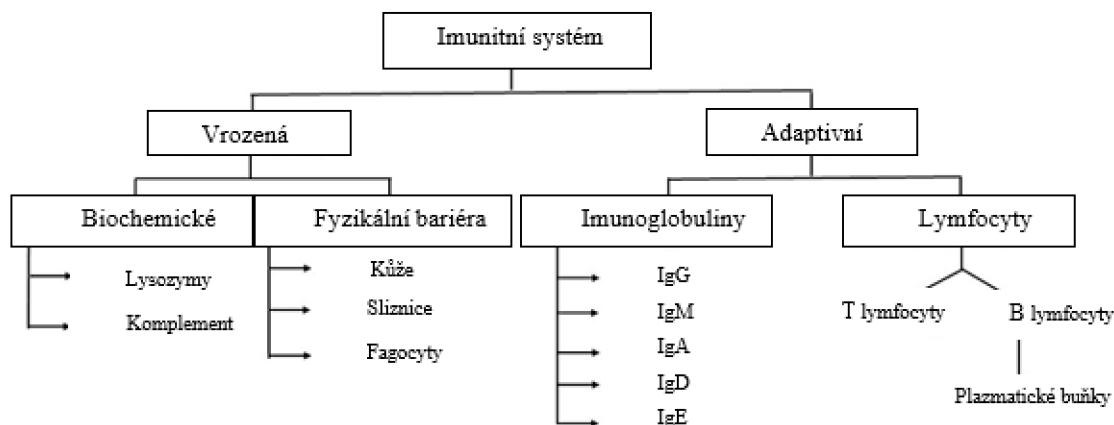
Významným spouštěčem syntézy BAFF cytokinu je jeho reakce na podněty typu interferonů, interleukinu (IL-10), ligandu CD40, který je exprimován při zánětlivých reakcích či chronických infekcích, dále takzvaných Toll-like receptorů (TLR-4 nebo TLR-9) a lipopolysacharidů (Zhou et al., 2009; Hayashi et al., 2010; Ferrer a kol., 2014). Jeho přítomnost v B buňkách je detekována pouze při infekčních stavech, autoimunitních reakcích, při vývoji hematologických novotvarů nebo lymfoproliferativních dějích. Mezi onemocnění, u kterých lze zaznamenat výraznou aktivitu cytokinu BAFF patří chronická lymfoidní leukémie, infekce virem Epstein-Barrové nebo IgA nefropatie (Bossen & Schneider, 2006; Tangye et al., 2006; Mackay & Schneider, 2009; Lied & Berstad, 2011). Z výzkumů na myších a lidských modelech vyplývá, že BAFF cytokin je pro přežití myších a lidských B lymfocytů vysoce esenciální, a to i v různých stádiích diferenciaci a vývoje B lymfocytů (Mackay et al., 1999; Batten et al., 2000).

Výše zmíněný cytokin APRIL umožňuje regulovat inverze mezi třídami imunoglobulinů bez závislosti na ligandu CD40 a prodlužuje tak životnost plazmatických buněk. Jedním z významných BAFF receptorů je právě TACI, který u vrozených B buněk napomáhá humorální imunitní odpovědi na repetující se antigeny a řídí navýšení rezerv B buněk. Receptor BCMA napomáhá udržovat paměťové a plazmatické buňky (Mackay & Schneider, 2009).

## 2.3 Imunoglobuliny

### 2.3.1 Charakteristika a objev imunoglobulinů

Protilátky, nazývané též jako imunoglobuliny jsou glykoproteiny obsahující dva těžké a dva lehké řetězce označované jako H a L z anglických termínů „*heavy*“ a „*light*“. Každý těžký řetězec se sestává ze 4-5 strukturně podobných domén každá o 110-120 aminokyselinách. V pantové oblasti jsou vázány disulfidickými můstky. Každý imunoglobulin má na N-koncích domén těžkých i lehkých řetězců variabilní části o různé sekvenci aminokyselin. Na specifčnosti protilátek závisí uspořádání aminokyselin ve vazebném místě určeném pro navázání antigenu (Ferenčík, 2005; Hořejší et al., 2017). Od prostorového uspořádání protilátky se odvíjí její vaznost pouze se specifickým antigenním determinantem. Molekuly imunoglobulinů podléhají enzymatickému štěpení pepsinem nebo papainem v místě pantové oblasti za tvorby Fab a Fc fragmentů. Při štěpení pepsinem vznikají dva fragmenty (jeden F(ab)<sub>2</sub> a jeden Fc) a u papainu tři fragmenty (dva Fab a jeden Fc) (Ferenčík, 2005). Dělíme je do pěti tříd na IgA, IgD, IgE, IgG a IgM, přičemž v lidském těle nejrozšířenějšími jsou IgA, IgG a IgM (Obr. 4).



Obr. 4 Členění imunitního systému

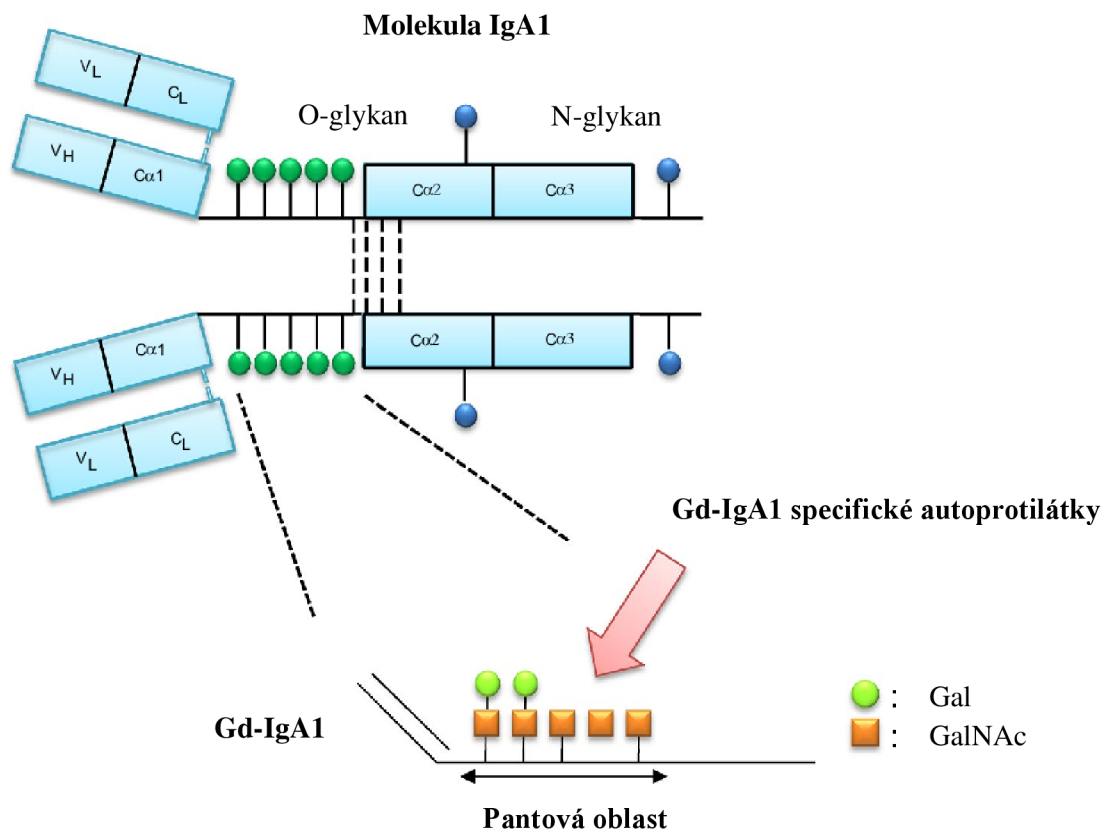
(Převzato a upraveno dle <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/immunology-research/anti-human-antibodies-covid-19-sars-cov-2-immunoglobulin-detection>)

### 2.3.2 Imunoglobulin A – funkce a struktura

V lidském organismu se jedná o jednu z nejčastěji se vyskytujících tříd protilátek. Pro jeho výskyt jsou typické zejména slizniční povrchy, a to v oblasti gastrointestinálního traktu nebo dýchacího řetězce. U člověka se může vyskytovat ve třech isoformách. Nejčastěji je jako monomerní rozšířený v lidském séru (mIgA), dále polymerní, často se vyskytující ve své dimerní formě (pIgA) či sekreční (SIgA). Do dimeru jsou monomerní jednotky IgA spojeny J řetězcem a jejich produkce je lokalizována v plazmablastu a plasmatických buňkách slizničního vaziva, kde se takto vzniklé pIgA naváže na specifický polymerní receptor zvaný jako pIgR vyskytující se na bazolaterální straně sekreční epitelální buňky. Poté co dojde k navázání příslušného imunoglobulinu na receptor, se vzniklý komplex do buňky transportuje ve formě intracelulárních váčků a následně je vyloučen exocytózou. Výsledkem tohoto procesu je, že část pIgR receptoru nazývaná sekreční složka (SC) se štěpí a pIgA ve vazbě na SC se uvolní ve vrstvě hlenu jako SIgA (Brandtzaeg, 2013). Hlavní funkcí sekrečního IgA je neutralizace toxinů, zabránění průniku patogenu přes slizniční epitelární membránu s cílem zachování symbiotického vztahu s komenziálními bakteriemi (Conley & Delacroix, 1987).

Rozlišujeme dvě podtřídy imunoglobulinu A produkované v plazmablastu lidského těla, a to IgA1 a IgA2, které se liší svojí distribucí v závislosti na původu antigenu. IgA1 je nejvíce obsaženo v slzách, nosním hlenu a séru na rozdíl od IgA2, která je stabilnější a vyskytuje se zejména v trávicím traktu (Pakkanen et al., 2010). IgA se vyznačuje strukturou ve tvaru T a je také jednou z nejvíce glykosylovaných tříd protilátek. Obě podtřídy obsahují N- a O-vázané oligosacharidy. U různých IgA se N-vázané glykany podílí na opsonizaci antigenů, fagocytóze IgA imunitních komplexů a vazbě na Fc receptor (Novak et al., 2000).

IgA1 molekuly na rozdíl od IgA2 obsahují prodlouženou pantovou oblast těžkého řetězce tvořenou 13 aminokyselinami, a to nejčastěji residui threoninu a serinu v pantové oblasti mezi doménami C $\alpha$ 1 a C $\alpha$ 2. Na serinová či threoninová residua se může vázat až devět O-glykanů, z nichž až šest jich může být glykosylováno (Obr. 5). O-vázané sacharidy jsou tvořeny N-acetylgalaktosaminem, galaktosou a kyselinou sialovou (kyselina N-acetylneuraminová, NeuNAc) (Novak et al., 2000; Novak et al., 2007; Stuchlova Horynova et al., 2015).



Obr. 5 Struktura IgA1 molekuly (Převzato a upraveno dle Suzuki, 2019).

## 2.4 Cytokiny – hlavní charakteristika

Jedná se o molekuly proteinů schopné regulace imunitního systému. Jsou produkovány lymfocyty nebo jinými buňkami, kdy po navázání na příslušný receptor zprostředkovávají buněčnou odpověď často právě na imunitní úrovni. Kromě volně se vyskytujících cytokinů rozlišujeme i ty, které jsou ukotvené v cytoplasmatické membráně a zprostředkovávají tak lokální působení, a proto dochází méně často k jejich zředění nebo úplnému odplavení účinkem difúze. Stejněho lokálního účinku cytokinů lze u některých buněk dosáhnout i jejich adsorpcí na povrchové proteoglykany. Účinek cytokinů má často kaskádovitý průběh, což znamená, že dokáží ovlivňovat následující kroky reakce a často se mezi sebou mohou i nahrazovat (Hořejší et al., 2017).

### 2.4.1 IL-6

Mezi jeden z velmi dobře známých pleiotropních cytokinů je řazen i interleukin-6 známý též pod zkratkou IL-6. Byl objeven roku 1986 jako faktor určený pro stimulaci B lymfocytů, které produkují IgG (Hirano et al., 1986). Až s odstupem času byla zjištěna jeho funkce jako multifunkčního cytokinu regulujícího mnoho biologických reakcí včetně zánětu, imunitní odpovědi, reakce akutní fáze nebo vývoje orgánů, metabolických abnormalit či různých malignit (Hirano, 2009). Může současně vyvolat i různé protichůdné fyziopatologické reakce. Je známo celkem deset cytokinů patřících do rodiny IL-6, a to IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, onkostatín M, inhibiční faktor leukémie, ciliární neutrotrófní faktor, kardiotropin-1, neuropoetín a cytokin podobný kardiotropínu (Heinrich et al., 2003; Scheller et al., 2006; Costa-Pereira, 2014). V receptorových komplexech mají tyto cytokiny kromě IL-31 společný membránový glykoprotein gp130 jako společnou podjednotku receptoru a převaděče signálu. U každého cytokinu závisí tvorba jeho komplexu přenášejícího signál na specifické asociaci určitého receptoru a ligandu. Pro IL-6 a IL-11 je typické, že podporují v hepatocytech syntézu proteinů akutní fáze (Dorner et al., 1997; Peters et al., 1997; Chodorowska et al., 2004). Na cílové buňky se IL-6 váže ve vazbě na  $\alpha$ -řetězec bez signálu membránově vázaného IL-6R označovaného také jako CD126. Takto vzniklý komplex je dále spojen se dvěma molekulami gp130 a zajistí tak přenos signálu. Signalizace gp130 je zprostředkována pomocí JAK/STAT3 nebo SHP2/Gab/MAPK dráhy (Fukada et al., 1996; Ohtani et al., 2000; Kamimura et al., 2004; Costa-Pereira, 2014). IL-6R jsou schopny exprimovat na svém povrchu buňky typu hepatocytů, CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, makrofágů, neutrofilů či



podocyťů (Moutabarrik et al., 1994; Oberg et al., 2006). V tělesných tekutinách jako například v moči nebo krvi byla detekována rozpustná forma IL-6R označovaná jako sIL-6R, která se váže na IL-6 obdobně jako CD126 a takto vzniklé komplexy, a to IL-6/sIL-6R a IL-6/CD126 aktivují gp130 buď první dráhou – trans-signalizační nebo druhou – klasickou dráhou (Novick et al., 1989; Rose-John & Heinrich, 1994; Atsumi et al., 2002; Scheller & Rose-John, 2006; Rose-John et al., 2007; Ebihara et al., 2011; Malchow et al., 2011; Li et al., 2015; Zhuang et al., 2015). U lidí je sIL-6 produkován dvěma odlišnými mechanismy. Prvním je implikace proteolytického štěpení mbIL-6R účinkem metaloproteasové aktivity a druhým translace diferenciatně sestřižené IL-6R mRNA postrádající transmembránovou a cytosolickou doménu (Lust et al., 1992; Mülberg et al., 1993; Lamas a kol., 2013). Klasická dráha signalizace IL-6 se účastní syntézy proteinů akutní fáze v jaterních buňkách s protizánětlivými vlastnostmi důležitými i pro imunitu (Tilg et al., 1997). Trans-signalizační dráha má funkci prozánětlivou a je podstatná pro koordinaci přechodu neutrofilů na monocyty a rovněž jako prevence proti nadměrnému poškození tkání (Kaplanski, 2003).

Z výzkumu vyplývá, že IL-6 se podílí na diferenciaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů a řadí se mezi významné zprostředkovatele imunitní odpovědi T lymfocytů. Má vliv na diferenciaci Th17 buněk s TGF- $\beta$  a s tím souvisejícím zvýšením exprese ROR-t na úkor snížení tvorby T<sub>reg</sub> buněk za účasti STAT3 dráhy (Chen et al., 2003; Fantini et al., 2004; Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006; Dominitzki et al., 2007; Fujimoto et al., 2010; Kimura & Kishimoto, 2011). IL-6 působí rovněž jako růstový faktor zralých B lymfocytů a podporuje tak jejich dozrávání v plazmatické buňky vylučující protilátky. Má i inhibiční charakter, protože inhibuje tvorbu tumor nekrotizujícího faktoru (TNF), a tím poměrně výrazně ovlivňuje reakce akutního zánětu (Feghali & Wright, 1997). Signalizace pomocí IL-6 hraje klíčovou roli při léčbě právě zánětlivých a autoimunitních onemocnění. IL-6 je schopen modulace monocytů buď na dendritické buňky, nebo na makrofágy, kteří se podílí na vylučování chemokinů a cytokinů (Griendling et al., 2000; Harrison et al., 2003). IL-6 je dokonce schopen vybudit myeloidní leukemické buňky k expresi Fc receptorů společně s markerem zralých makrofágů F4/80 a receptorů komplementu (Krishnaraju et al., 1998; Chomarat et al., 2000; Tanaka et al., 2000). Dále IL-6 aktivuje makrofágy typické pro genovou expresi nevyjímaje geny časné odpovědi, jako jsou *c-Jun*, *Jun B*, *Jun D*, *JAK3*, *Egr-1* a stejně tak i geny pozdní odpovědi, kam patří například ferritinový lehký řetězec nebo lysozym (Krishnaraju et al., 1998; Tanaka et al., 2000). Tubulární epiteliální, mesangiální a endoteliální buňky ledvin i podocyty jsou za

určitých podmínek schopny vylučovat IL-6 a právě podocyty navíc exprimují ještě IL-6R (Coletta et al., 2000). Mezi enzymy, které štěpí CD126 se řadí ADAM10 a ADAM17 (disintegrin metaloproteasa), jejímž produktem je rozpustná forma IL-6R (sIL-6R) (Moutabarrik et al., 1994). Vitamín D a dexamethason jakožto glukokortikoid působí protizánětlivě, a tedy vedou k potlačení exprese IL-6 (Xing et al., 2006; Matsumoto et al., 2010; Sanchez-Niño et al., 2012). Často se hovoří o tom, že IL-6 vystupuje obvykle jako marker než mediátor zánětlivých reakcí (Song & Schindler, 2004). Mnohdy jej mohou vylučovat i mesangiální buňky, čímž by opět došlo k aktivaci zánětlivé reakce u imunitního nebo metabolického poškození ledvin (Pfähflin et al., 2006; Schmitt et al., 2014; Ji et al., 2016). Angiotensin II receptor typu 1 (dále jen ATR1) je exprimován díky IL-6 za cílem indukované vasokonstrikce a produkce reaktivní formy kyslíku (ROS), což se může projevit jako endoteliální dysfunkce, proti které jsou například myši chráněny (Wassmann et al., 2004; Schrader et al., 2007). Funkce endoteliálních buněk je ovlivněna pouze trans-signalizační dráhou (Sironi et al., 1989). Kooperace mezi endoteliálními buňkami a IL-6 má vliv na přítomnost leukocytů a produkci chemokinů (Romano et al., 1997). Některé studie považují IL-6 za faktor přispívající k akutnímu a chronickému poškození ledvin, ale to nebylo zcela potvrzeno (Kielar a kol., 2005; Harcourt et al., 2012).

K proliferaci mesangiálních buněk a uvolnění IL-6 jakožto prozánětlivého cytokinu, může docházet díky v daném místě uloženým vysokomolekulárním pIgA1 (Gomez-Guerrero et al., 1994; Moura a kol., 2005; Schmitt et al., 2014). V případě blokace IL-6 a snížení množství cytokinů Th17 nedochází k takové proliferaci mesangiálních buněk a snižuje se proteinurie (Zhang et al., 2013). U IgAN pacientů díky přítomnosti imunitního komplexu a složky komplementu dochází k uvolnění IL-6 z mesangiálních buněk a aktivaci zánětu.

#### **2.4.1.1 Účinek IL-6 v souvislosti s IgA nefropatií**

U pacientů trpících IgAN byla detekována zvýšená hladina IL-6, cirkulujících imunitních komplexů s Gd-IgA1 a cirkulujícího Gd-IgA1 v krvi (Yamada et al., 2017). Na buněčné linii IgAN pacientů produkující IgA1 má ve velké míře vliv IL-6 a do jisté míry i IL-4, které mohou deficit galaktosy u pacientů ještě více prohloubit. Díky stimulaci IL-6 u IgAN pacientů dochází ke snížení aktivity C1GalT1 a naopak zvýšení aktivity ST6GalNAc. U pacientů trpících IgA nefropatií vede stimulace interleukinem-6 kromě

zvýšení IgA1 i ke zvýšení tvorby Gd-IgA1 (Knoppova et al., 2016) na rozdíl od zdravých pacientů, kdy k ovlivnění glykosylace s pomocí IL-6 nedochází (Yamada et al., 2017).

V tvorbě Gd-IgA1 může důležitou roli sehrát kromě cytokinů i kanonický transkripční faktor IL-6, který má vliv na změnu transkripce a signalizace řízenou pomocí STAT3 dráhy (Knoppova et al., 2016). Z výzkumu vyplývá, že pokud dochází k dlouhodobě přetvárající aktivaci STAT3 fosforylace Y705 pomocí IL-6, tak se jeví tento proces jako patogenický u IgAN populace, což se projevuje zvýšením množství Gd-IgA1, jakožto stěžejní patogenní molekuly pro rozvoj onemocnění IgA nefropatie (Yamada et al., 2017).

## 2.5 Nefropatie

Nefropatie je odborný lékařský termín označující poškození či onemocnění ledvin, které může vyústit až v jejich úplné selhání. Z fyziologie člověka víme, že hlavní funkcí ledvin je regulace acidobazické a vodní rovnováhy v těle a samozřejmě také vylučování odpadních produktů, a proto jakékoliv omezení nebo dokonce úplná ztráta funkce ledvin mohou být pro nás potenciálně smrtelné. Nefropatie se řadí mezi nemoci s výrazně progresivním průběhem. Rozlišujeme několik druhů nefropatie: diabetická, na bázi změn v sacharidovém řetězci imunoglobulinu A (IgA), renální papilární nekróza, analgetická nebo akutní (Barratt & Feehally, 2005; Vujicic et al., 2012; Waddington a kol., 2014).

Diabetická nefropatie se považuje za jednu z hlavních mikrovaskulárních komplikací onemocnění cukrovkou (diabetes mellitus) a postihuje až třetinu pacientů trpících diabetem. Mezi histopatologické projevy diabetické nefropatie řadíme akumulaci extracelulární matrix v glomerulární mezangiální oblasti ledvin, podocytární abnormality nebo glomerulosklerózu se zesílenou bazální membránou glomerulu (Barratt & Feehally, 2005; Vujicic et al., 2012; Waddington a kol., 2014).

Mezi nejběžnější formu vedoucí až k chronickému onemocnění ledvin řadíme IgA nefropatii. Mezi oblasti, ve kterých je tento typ nefropatie nejvíce zastoupen řadíme zejména Asii, Austrálii, ale i jižní Evropu. Velmi podstatným znakem tohoto onemocnění je zvýšené ukládání protilátek typu IgA, IgM nebo IgG do ledvinových glomerulů, proto na závažnost onemocnění má velký vliv do jaké míry jsou pacienti schopni aktivovat vrozenou imunitní odpověď. V závislosti na tom jsou protilátky schopny zaznamenat přítomnost strukturně pozměněného IgA1. Následně dojde k navázání IgG a tvorbě imunitního komplexu. Diagnostika je prováděna s pomocí renální biopsie (Barratt & Feehally, 2005; Vujicic et al., 2012; Waddington a kol., 2014).

Nadměrné nebo dokonce časté užívání analgetik (například paracetamol nebo parazolony) může způsobovat renální papilární nekrózu, která je typickým projevem analgetické nefropatie. V těžkých případech může dojít i ke kalcifikaci nekrotických papil či ke vzniku uroepiteliálních nádorů (Barratt & Feehally, 2005; Vujicic et al., 2012; Waddington a kol., 2014).

Vysokou koncentrací kyseliny močové v krevním séru se projevuje akutní nefropatie. Pramení z ukládání krystalků kyseliny močové a to intratubulárně. K léčbě tohoto typu nefropatie lze předepsat rasburikasu nebo cílenou alkalizaci moči (Barratt & Feehally, 2005; Vujicic et al., 2012; Waddington a kol., 2014).

### 2.5.1 IgA nefropatie

Imunoglobulin A (IgA) se řadí mezi druhý nejčastější typ protilátky v těle. V sekretu se nachází v monomerní formě a jeho množství je vyšší než v krevním séru, kde se vyskytuje v dimerní formě. Nejčastěji se s dimerní formou IgA setkáme v sekretech, jako jsou sliny, slzy, hlen nebo mléko. Jedná se o jednu z významných slizničních protilátek zejména v místech, která jsou nejvíce zranitelná a vystavena možnému vstupu cizorodých látek. Jejich poločas rozpadu je pět dní a obsahuje čtyři vazebná místa pro epitopy, jež jsou součástí cizorodých látek a vyvolávají tak imunitní odpověď organismu. Kvůli přítomnosti IgA ve sliznicích exponovaných řadou enzymů je nutná přítomnost sekreční složky IgA zabraňující právě jeho možné degradaci enzymy (Perše & Večerić-Haler, 2019).

Jedná se o celosvětově nejrozšířenější typ glomerulonefritidy. Častěji se tento typ vyskytuje v tichomořských asijských nebo východoasijských zemích. Riziko progresu je dosti často ovlivněno současně genetickými nebo environmentálními faktory. U pacientů s pozitivním diagnózou IgA nefropatie je prokázána přítomnost cirkulujících a glomerulárních imunitních komplexů obsahujících IgA1 s nedostatkem galaktosy, C3 složky komplementu a v neposlední řadě i IgG autoprotilátky namířené do pantové oblasti O-glykanů. Aberantně glykosylovaný IgA často označovaný jako galaktosa-deficientní IgA1 (Gd-IgA) je jednou z dědičných vlastností přenášených v pokrevní linii pacientů (Rodrigues et al., 2017).

Na relativní hladinu IgA s nedostatkem galaktosy mohou mít vliv mimo jiné i faktory prostředí jako jsou proteasy odvozené od bakterií (Lamm a kol., 2008). Tvorba imunitních komplexů přímo zodpovídá za vznik glomerulárního zánětu a mesangiální proliferaci. Na progresi onemocnění se rovněž mohou podílet i další rizikové faktory jako je hypertenze, obezita nebo kouření (Kataoka et al., 2011). Spouštěče tvorby podgalaktosylovaného IgA stejně jako místo jeho produkce u IgA nefropatie nejsou známy. U pacientů trpících IgA nefropatií je zvýšený cytokin APRIL, který s BAFF sdílí některé signální receptory potřebné pro vývoj B buněk, a koreluje se sérovým kreatininem, věkem a poměrem kreatininu a proteinů v moči (McCarthy et al., 2011).

Co se týká močových a sérových biomarkerů IgA nefropatie (dále jen IgAN), tak sem řadíme anti-Gd-IgA1, což jsou Gd-IgA1 autoprotilátky IgG či IgA izotypu. Častým močovým markerem je interleukin-6/epidermální růstový faktor nebo uromodulin, jehož zvýšená hladina indukuje přítomnost IgAN (Wu a kol., 2010; Peters et al., 2011; Zhao et

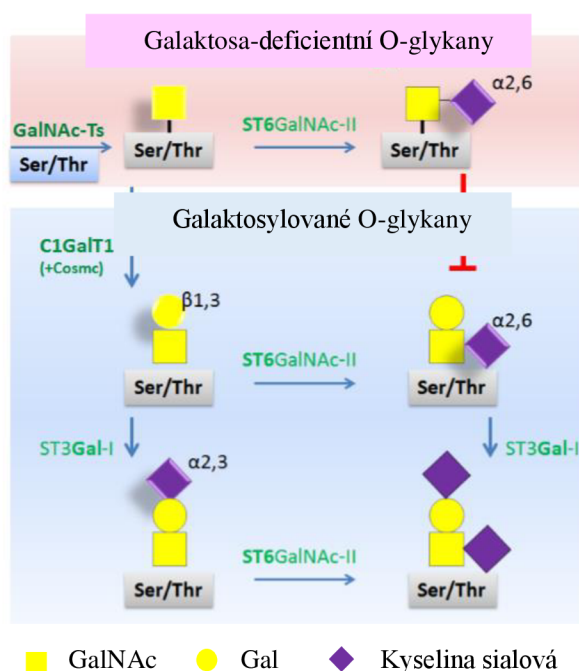
al., 2012; Yanagawa et al., 2014). IgA se v lidském těle vyskytuje ve dvou podtřídách, kterými jsou IgA1, působící v dýchacích cestách, slzních a slinných žlázách a IgA2 vyskytující se více například v tlustém střevě nebo femininím genitálním traktu (Mestecky et al., 2005; Pakkanen et al., 2010). V případě IgAN je u podtřídy IgA1 detekován deficit galaktosy, což je možné stanovit pomocí testu závislém na lektinu hlemýždě *Helix aspersa*, nebo metodou ELISA s použitím specifické monoklonální protilátky rozpoznávající právě onu pantovou oblast Gd-IgA1 a potvrzující tak přítomnost nemoci.

V současnosti se do popředí pro určení patogeneze IgAN dostává tzv. multi-hit hypotéza. Je charakterizována mimo jiné zvýšením hladiny nesprávně O-galaktosylovaných glykoforem IgA označovaných jako galaktosa-deficientních IgA (Gd-IgA), dále tvorbou O-glykan specifických protilátek, imunitních komplexů s IgA1, jejichž přítomnost může vést až ke glomerulonefritidě. V séru byla přítomnost Gd-IgA1 detekována pomocí imunosorbentového testu na přítomnost *Helix aspersa* aglutinin lektinového enzymu, ovšem bylo prokázáno, že tento způsob lze považovat za ne příliš robustní, a proto bylo přistoupeno k použití modernějšího přístupu, a to použití metody ELISA, kdy k detekci deficitu galaktosy v pantové oblasti lidského Gd-IgA1 byla využita specifická monoklonální protilátka KM55, která tedy slouží jako jeden z možných biomarkerů IgAN (Lau et al., 2007; Moldoveanu et al., 2007). Rovněž je tímto způsobem možno s pomocí imunochemických technik v tkáních identifikovat glomerulární Gd-IgA1 depozita, která jsou projevem onemocnění IgAN a IgA vaskulitidy s nefritidou (IgAV-N), což jsou onemocnění typicky se vyskytující zejména u dospělých pacientů (Yasutake et al., 2015; Suzuki et al., 2018). Z tohoto důvodu byl proveden výzkum pojednávající o schopnosti diagnostikovat obě onemocnění, a to jak IgAN, tak i IgAV-N pomocí studie využívající KM55 jako markeru specifčnosti glomerulární depozice Gd-IgA u dětských pacientů. Výsledkem výzkumu bylo prokázání, že u pediatrických pacientů s IgAN, IgAV-N, lupus nefritidou, MGN s přítomností IgA depozit a membranózní nefropatií byla prokázána zvýšená přítomnost Gd-IgA1 na rozdíl od pacientů trpících neimunitní glomerulonefritidou za přítomnosti náhodných glomerulárních ložisek IgA, kde nebyla prokázána žádná přítomnost Gd-IgA1. Rovněž bylo prokázáno, že pomocí KM55 je možno odlišit pacienty s náhodnou a pozitivní depozicí IgA, čímž může taková analýza vést ke správné léčbě a přesné diagnóze. Přítomnost glomerulárních depozit Gd-IgA1 u dětských pacientů není zcela potvrzeno

v případě patogeneze lupusové nefritidy, primární membranózní nefropatie a MPGN (Ishiko et al., 2020).

### **2.5.2 Změna charakteru glykosylace IgA1 u pacientů s IgAN za tvorby Gd-IgA1**

Podstatná při procesu tvorby Gd-IgA1 je v tomto případě O-glykosylace, která se odehrává po transkripci v pantové oblasti imunoglobulinu A1. Jako první je na hydroxylovou skupinu aminokyseliny threoninu (Thr225, Thr228, Thr233 nebo Thr236) nebo serinu (Ser230 či Ser232) navázán N-acetylgalaktosamin (GalNAc) za katalýzy N-acetylgalaktosaminyltransferasami (GalNAc-Ts, EC 2.4.1.41), a to nejčastěji N-acetylgalaktosaminyltransferasou 2 (GalNAc-T2, EC 2.4.1.41) (Iwasaki a kol., 2003). V dalším kroku dochází k navázání galaktosy na GalNAc. Tato reakce je katalyzována pomocí core 1 glykoprotein-N-acetylgalaktosamin-3- $\beta$ -galaktosyltransferasy (C1Gal-T1, EC 2.4.1.122) a tento enzym stabilizujícího chaperonu Cosmc (C1GalT1C1) (Gale et al., 2017). Na každou tímto způsobem navázanou galaktosu nebo GalNAc se váže kyselina sialová a to dvojitým způsobem. Nejprve se může vázat přímo na galaktosu za katalýzy  $\alpha$ -2,3-sialyltransferasou (ST3Gal-1, EC 2.4.99.4) a ve druhém případě se váže na GalNAc s již navázanou galaktosou pomocí enzymu CMP-N-acetylneuraminyl:beta-D-galactosyl-1,4-N-acetyl-beta-D-glucosamin alpha-2,6-N-acetylneuraminyltransferasa (ST6GalNAcII, EC 2.4.99.1). Problém nastává, pokud se kyselina sialová naváže přímo na GalNAc a zabrání tak jeho galaktosylaci, a tím dojde k tvorbě galaktosa-deficientního IgA1 (Gd-IgA1) (Stuchlova Horynova et al., 2015). Schématicky celý proces O-glykosylace za tvorby IgA1 nebo Gd-IgA1 zachycuje Obr. 6.



Obr. 6 Srovnání procesu O-glykosylace na variabilním řetězci IgA1 u zdravého a IgAN pacienta (Převzato a upraveno dle Perše & Večerič-Haler, 2019).

Mimo genetické faktory mohou O-glykosylaci ovlivňovat i epigenetické faktory jako jsou cytokiny, kdy dochází ke zvýšené transkripci enzymu ST6GalNAcII (Raska et al., 2007) nebo snížení aktivity a exprese chaperonu C1Gal-T1, a to vyústí v nadprodukci Gd-IgA. Z cytokinů mají největší vliv na zvýšení tvorby Gd-IgA zejména IL-6 a následně i IL-4, které toho docílí právě modifikací genů pro klíčové enzymy *C1GALT1*, *C1GALT1C1* a *ST6GALNAC2*. Nejdůležitějším cytokinem zvyšujícím aktivitu a expresi ST6GalNAc-II a zároveň snižujícím expresi a aktivitu Cosmc chaperonu a C1GalT1, což se projeví na tvorbě Gd-IgA je IL-6 (Suzuki et al., 2014). Bylo prokázáno, že samotná přítomnost IgA1 nebo Gd-IgA1 klinicky nespouštějí onemocnění jako je IgAN. Jinak je tomu v případě, kdy dojde k vytvoření imunitních komplexů, které způsobují proliferaci mesangiálních buněk.

Jedním z nejvíce zkoumaných receptorů IgA je Fc $\alpha$ RI, který je exprimován v myeloidních buňkách specificky vázajících Fc doménu IgA. Je schopen vázat jak polymerní, tak monomerní IgA, ale i IgA vázané v imunitním komplexu. Pokud bychom se podívali na interakci monomerního sérového IgA, tak to ve vazbě na Fc $\alpha$ RI vykazuje protizánětlivé účinky v porovnání s interakcemi imunitních komplexů IgA ve vazbě na Fc $\alpha$ RI, což způsobuje indukci a zkřížení prozánětlivých reakcí. Za dvojí charakter Fc $\alpha$ RI receptoru je zodpovědný FcR adaptér s aktivačním motivem ve formě aminokyseliny



tyrosinu (ITAM) tudíž dojde k aktivaci nebo inhibici reakce v souvislosti s vhodným typem ligandu (Lechner a kol., 2016). Pokud dojde ke zkříženému propojení Fc $\alpha$ RI vlivem IgA imunitních komplexů, spustí se řady procesů jako je například uvolnění mediátorů zánětu a cytokinů, prezentaci antigenů, uvolnění reaktivních forem kyslíku, fagocytóze, buněčné cytotoxicitě vlivem protilátek nebo uvolnění neutrofilních chemoatrakčních látek leukotrienu B4 (LTB4) (Breedveld & van Egmond, 2019). Pokud nedochází k expresi za přítomnosti FcR adaptéru, monomerní IgA se může recyklovat, a proto je tak tento adaptér podstatný pro mIgA homeostázu (Lechner a kol., 2016).

Vlivem mutací Fc $\alpha$ RI nebo odstranění sialové kyseliny se mění glykosylační schéma Fc $\alpha$ RI, což může mít velký vliv na vazebnou afinitu k IgA. U pacientů s IgAN bylo zjištěno, že zejména změny glykosylace IgA1 a zhoršená sialylace Fc $\alpha$ RI způsobují vyšší vaznost IgA1 do Fc $\alpha$ RI na neutrofilech. Rovněž se u těchto pacientů potvrdilo, že je u nich snížena exprese Fc $\alpha$ RI na fagocytárních buňkách v krevním oběhu (Grossetête et al., 1998).

Fc $\alpha$ RI (CD89) exprimovaný na monocytech, Kupfferových buňkách a neutrofilech je schopen odstranit sérové Gd-IgA1 ve vazbě na imunitní komplexy. Zhoršit onemocnění by mohla snížená přítomnost IgA-sCD89 komplexů, protože by mohly být selektivně zachyceny v mesangiu buněk ve srovnání se zvýšenou hladinou cirkulujících komplexů IgA-IgG přítomných u těžkých forem IgAN (Lechner a kol., 2016). Do depozice IgA se zapojuje CD71transferrinový receptor, na který se s vyšší afinitou váží jak Gd-IgA1, tak IgA imunitní komplexy (Lechner a kol., 2016).

S přihlédnutím k tomu, že v sérech pacientů s IgAN bylo nalezeno velké množství Gd-IgA1 a Gd-IgA1 imunitních komplexů se odvodila hypotéza takzvaných čtyř hitů provedená *in vitro*. Rezidua galaktózy na Gd-IgA1 jsou rozpoznávány pomocí imunoglobulinů specifických pro GalNAc jako jsou IgG2 nebo minoritně i IgA1. Protilátky tak rozpoznají Gd-IgA1 a naváží se na něho za tvorby cirkulujícího imunitního komplexu (CIC). První hit souvisí se zvýšenou produkcí Gd-IgA1, druhý hit představuje vytváření anti-glykanových protilátek specificky rozpoznávajících Gd-IgA1. Třetí hit vysvětluje tvorbu cirkulujících imunitních komplexů mezi IgG2 a Gd-IgA1 za cílem aktivace komplementu. Hit čtvrtý popisuje soustředění takovýchto komplexů v mesangiu glomerulárních buněk, což aktivuje sekreci cytokinů a chemokinů včetně proliferace extracelulární matrix, a to vede k trvalému poškození ledvin (Suzuki a kol., 2011).

### 2.5.3 Hypotéza čtyř hitů

Tato hypotéza byla vyvinuta za účelem pochopení patogeneze IgA nefropatie. První hit se projevuje zvýšením produkce Gd-IgA1, a to tak že dojde k narušení galaktosylačního procesu slizniční IgA1, což lze stanovit s pomocí lektinového vazebného testu, kdy jsou přednostně vázána exponovaná residua GalNAc (Allen et al., 2001; Moldoveanu et al., 2007; Suzuki et al., 2016; Yeo et al., 2018). Výskyt Gd-IgA1 je zapříčiněn dysregulací exprese *C1GALT1* a *Cosmc* v B lymfocytech, na kterou mají vliv jak faktory prostředí, tak i ty genetické. U zvýšených hladin sérového Gd-IgA1 je typický výskyt alel na jediném lokusu obsahujícím gen *C1GALT1* (Gale et al., 2017). Bylo zjištěno, že jediný další u lidí se vyskytující O-glykosylovaný imunoglobulin D je klasicky galaktosylován i u pacientů s IgAN, a proto je možné se domnívat, že ona dysregulace není dána vnitřním defektem B-lymfocytů, nýbrž nastává po izotypové komutaci (Smith et al., 2006). Zvýšená hladina Gd-IgA1 ještě není úplně zodpovědná za vyvolání IgA nefropatie, protože monomerní Gd-IgA1 nemůže *in vitro* vyvolat mesangiální hypercelularitu, která je při tomto typu onemocnění častá (Novak et al., 2005; Lin et al., 2009).

Následující hit pojednává o zvýšené přítomnosti protilátek specifických pro Gd-IgA1 u IgAN pacientů. K tvorbě takovýchto protilátek dochází v reakci autoproti látek na neoepitop exponovaných zbytků GalNAc v pantové oblasti Gd-IgA (Berthouex et al., 2012) nebo jako odpověď na mikrobiální GalNAc, který vlivem molekulárních mimiker chybně cílí na Gd-IgA (Novak et al., 2008). Do jaké míry jsou schopny protilátky anti-Gd-IgA1 způsobovat IgAN není doposud úplně vyjasněno. Je zde ovšem i nízká průkaznost aktivace klasické cesty komplementové dráhy (Maillard et al., 2015; Rizk et al., 2019). Tato fáze hitu tedy nemusí být kritická, ale může se výrazně podílet na závažnosti IgAN u již nemocných pacientů.

Třetí hit vysvětluje přítomnost Gd-IgA1 obsahující cirkulující imunitní komplexy (dále jen CIC), které mohou být tvořeny jako anti-Gd-IgA1 IgG-Gd-IgA1, anti-Gd-IgA1 IgA-Gd-IgA1 (Tomana et al., 1999; Suzuki et al., 2014), Gd-IgA1 autoagregáty (Kokubo et al., 1998) nebo Gd-IgA1-rozpustné CD89 CIC (Lechner et al., 2016), kdy CD89 je glykoprotein vyskytující se na povrchu myeloidních buněk jako Fc receptor IgA (Morton & Brandtzaeg, 2001). Po navázání IgA na receptor se spustí produkce CD89, a to jeho rozpustné formy označující se zkratkou sCD89, která je navázána na Gd-IgA1 a vytváří tak jeden ze čtyř zmíněných CIC (van Zandbergen et al., 1999; Lechner et al., 2016). Je známo, že přítomnost Gd-IgA1 CIC způsobuje proliferaci mesangiálních buněk

glomerulu či tvorbu zánětu *in vitro*, což je považováno za jeden z hlavních projevů IgA nefropatie u pacientů. (Novak a kol., 2005; Tortajada et al., 2019). Pouze depozice CIC tedy není jako projev onemocnění dostačující. Studie potvrzují, že u některých jedinců mohou být přítomny imunitně-komplexní ložiska Gd-IgA1, ale nemusí se nutně projevit jako klinicky významné onemocnění ledvin (Waldherr et al., 1989; Gaber et al., 2020), a proto je nutné se zaměřit na čtvrtý hit, jakožto významný faktor spouštění zánětu.

Posledním tedy čtvrtým hitem je možno poukázat na způsoby interakcí, při kterých dochází k mesangiální depozici IgA1. Často se jedná právě o interakce s sCD89, transglutaminasou-2,  $\beta$ -1,4-galactosyltransferasou-1 nebo transferrinovým receptorem CD71 (Moura et al., 2005; Berthelot et al., 2012; Molyneux et al., 2017). U humanizované transgenní myši bylo prokázáno, že IgA1-sCD89 CIC se byl schopen vázat na mesangiální CD71, a tím byla podpořena exprese jak CD71, tak transglutaminasy-2. Obě jsou následně schopny navázat další IgA1-sCD89 komplexy (Berthelot et al., 2012; Daha et al., 2013). Experiment byl opakován rovněž *in vitro*, kdy byla potvrzena funkce beta-N-acetylglucosaminylglycopeptide beta-1,4-galactosyltransferasa ( $\beta$ -1,4-galaktosyltransferasa, EC 2.4.1.38). Specifické protilátky pro  $\beta$ -1,4-galaktosyltransferasu byly inkubovány s mesangiálními buňkami, a tím došlo k navázání nižšího množství IgA, dále k vyloučení sníženého množství IL-6 a dále také ke snížení IgA-zprostředkované mesangiálně buněčné fosforylace tyrosinkinasy ve slezině (Molyneux et al., 2017). Díky uvolnění cytokinů a aktivaci systému komplementu v reakci na mesangiální depozici CIC Gd-IgA1 může docházet k vyvolání místní zánětlivé reakce. Heterogenita progresu nemoci souvisí s rozsahem, v jakém k zánětlivé reakci dochází (Lai et al., 2009; Tortajada et al., 2019).

S produkcí extracelulární matrix *in vitro* a proliferací mesangiálních buněk souvisí vazba IgG na CIC Gd-IgA1 (Launay et al., 2000; Novak et al., 2005), což vede k tvorbě cytokinů zejména TNF- $\alpha$  narušujícího glomerulární bariéru a tím poškození proteinurických tubulů (Huang et al., 2008; Lai et al., 2009; Trimarchi & Coppo, 2019). Systém komplementu složený z proteinů krevní plazmy a extracelulární tekutiny hraje rovněž důležitou roli při glomerulárním zánětu u IgAN pacientů, k jeho aktivaci dochází kaskádovým způsobem (Vignesh et al., 2017; Tortajada et al., 2019). Způsoby aktivace jsou celkem tři, a to lektinová dráha aktivovaná sacharidovou moietou na mikrobiálních površích, alternativní charakteristická spontánní aktivací za nízké rychlosti nebo moietami na mikrobiálních površích, což je společné i pro dráhu lektinovou a jako poslední možnost klasická dráha aktivovaná komplexem antigen-protilátka. Nejvíce se

na projevech zánětu IgAN pacientů projevují dráhy lektinová a alternativní (Tortajada et al., 2019). U dráhy alternativní dochází k lokálnímu zánětu a glomerulární depozici C3 složky komplementu. Přímou aktivovat tuto cestu může IgA1 v porovnání s Gd-IgA1, který není v tomto kroku stěžejní (Hiemstra et al., 1987; Russell & Mansa, 1989). O účasti lektinové dráhy u IgAN vypovídá přítomnost složek, jako jsou manosu vázající lektin (MBL) a serin proteasy (MASP) propojené s MBL (Jennette, 1988; Roos et al., 2006). Díky této aktivaci dochází ke spuštění systému komplementu a rozštěpení C3 vedoucím až k tvorbě lokálního zánětu a glomerulární depozici C4d (Roos et al., 2006; Nam et al., 2020). U IgAN pacientů může docházet k aktivaci lektinové cesty *in vitro* pomocí pIgA získaného od IgAN pacientů (Roos, et al., 2001; Beltrame et al., 2015).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Biologický materiál, protilátky a inhibitory**

- \* Vzorčky periferní krve od pacientů s IgA nefropatií (Ústav imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci)
- \* Goat anti-human IgA-FITC protilátka (Jacksons ImmunoResearch, USA)
- \* Anti-CD19-PE-eFluor 610 protilátka (eBioscience, USA)
- \* Streptavidin-PE protilátka (eBioscience, USA)
- \* Mouse anti-human Gd-IgA-biotin (35A12) protilátka (Fujita Health University, Nagoya, Aichi, Japonsko)
- \* Stattic 10 mmol/l v DMSO (S7947) inhibitor STAT3 dráhy (Sigma-Aldrich, USA)
- \* AZD 1480 2 mmol/l v DMSO (SML1505) inhibitor JAK1 dráhy (Sigma-Aldrich, USA)

#### **3.1.2 Chemikálie a roztoky**

- \* Fetal bovine serum (Gibco, UK)
- \* Ficoll-Paque PLUS (Merck, USA)
- \* Fosfátový pufr (PBS) 10x (Serana, Německo)
- \* IL-6 (Gibco, USA)
- \* RPMI 1640 médium (10% FBS, 1% P/S) (Gibco, USA)
- \* Subtilisin A (P5380) (Sigma-Aldrich, USA)
- \* Tris/HCl pufr 5 mmol/l, pH = 7,6 (Calbiochem, Německo)
- \* Trypanová modř (Pe-lab, Česká Republika)

#### **3.1.3 Laboratorní pomůcky**

- \* Cytometrické zkušavky – plast (Falcon®, USA)
- \* Mikrozkušavky - plast (Eppendorf, Německo)
- \* Pipetovací špičky 10 µl (AHN/iBioTech, ČR); 200 µl (Alpha Laboratories Ltd., Velká Británie); 1 ml (Neptune Scientific, USA)
- \* Pipety Finnpiette (Thermo Fisher Scientific, USA)
- \* Zkušavky - plast (Eppendorf, Německo)

### **3.1.4 Přístrojové vybavení**

- \* Centrifugy (Hettich, Německo)
- \* CO<sub>2</sub> inkubátor (Panasonic, Japonsko)
- \* Inkubátor (Amersham Biosciences, Německo)
- \* Laminární box – Aura VF48 (BioAir, USA)
- \* Mikroskop na počítání buněk (Leica, Německo)
- \* Pipetor (Hirschmann, Německo)
- \* Spektrální průtokový cytometr (SONY Biotechnology, USA)
- \* Vortex IKA (Sigma-Aldrich, USA)

### **3.1.5 Software**

- \* FlowJo software v.10.7 (BD Life Sciences, Ashland, OR)
- \* GraphPad Prism v.8 software (GraphPad Software, La Jolla, CA)

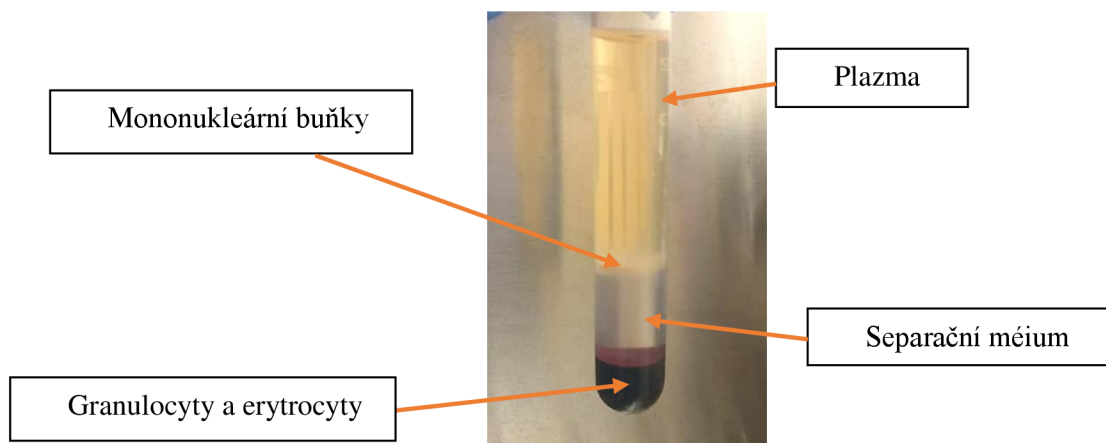
## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava vzorků periferní krve pacientů s IgAN

Nejprve byla odebrána každému objednanému pacientovi trpícímu IgA nefropatií nesrážlivá krev do 2 fialových odběrových zkumavek (každá o 7,5 ml objemu) s antikoagulantem EDTA na Oddělení nefrologie III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc s cílem provedení analýzy buněčných populací v periferní krvi. Odebraná krev byla do 30 minut po odběru zpracována provedením izolace PBMC („peripheral blood mononuclear cells“).

### 3.2.2 Izolace PBMC v periferní krvi

Po odběru nesrážlivé krve byla provedena analýza buněčné populace v periferní krvi pomocí PBMC (peripheral blood mononuclear cell) izolace. Nesrážlivá krev o objemu 15 ml byla z odběrových zkumavek přepipetována pomocí pipetoru do 50 ml falkony a zředěna v poměru 1:1 PBS („phosphate buffered saline“) pufrům. K izolaci byla použita metoda založená na Ficoll-Paque hustotním gradientu. Principem je, že na vrstvu 4 ml Ficoll-Paque, což je hydrofilní sacharid bylo nanášeno po 7,5 ml směsi krve a PBS pufru. Takto byl rozpipetován do čtyř 15 ml falkon celý objem 30 ml vždy tak, aby nedošlo k promíchání vrstev sacharidu a krve. Na základě hustotního gradientu bylo centrifugací na 400 g při  $23 \pm 2$  °C po dobu 40 minut docíleno odseparování jednotlivých složek krve. Erytrocyty a granulocyty prošly vrstvou Ficoll-Paque a usadily se na dně zkumavky, na rozhraní Ficoll-Paque zůstaly usazeny mononukleární buňky (lymfocyty, monocyty a NK buňky) a vytvořily bílý prstenec, tzv. buffy coat. Úplně nejsvrchnější vrstvu tvořila krevní plazma obsahující trombocyty, cytokiny, hormony a elektrolyty (viz Obr. 7).



Obr. 7 Výsledek izolace PBMC

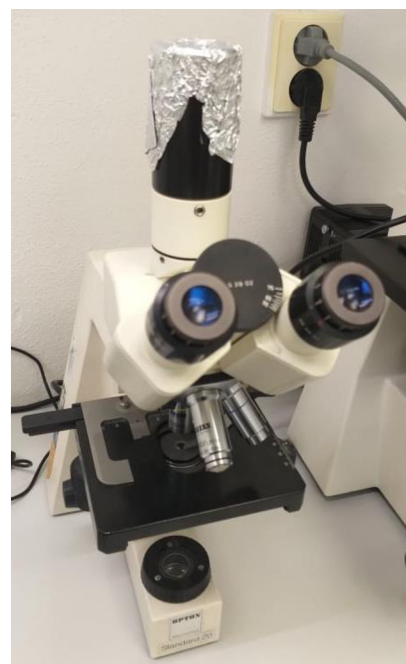
Následně bylo odebráno 1,5 ml bílého prstence s izolovanými mononukleárními buňkami do 15 ml falkony a doplněno do plného objemu PBS pufrům. Takto připravená směs byla opět centrifugována na 200 g při  $23 \pm 2$  °C po dobu 20 minut. Supernatant byl odstraněn do odpadní nádoby a mononukleární buňky usazené na dně falkony resuspendovány 1 ml PBS pufru. Následně byly odebrány 2  $\mu$ l buněk do mikrozkušavky a bylo přidáno 18  $\mu$ l PBS pufru do finálního objemu 20  $\mu$ l. Tento krok sloužil jako příprava pro další krok, a tím bylo počítání buněk.

### 3.2.3 Počítání buněk

Při počítání buněk se vycházelo z předchozího postupu izolace PBMC, kdy bylo získáno 20  $\mu$ l suspenze mononukleárních buněk v PBS pufru, ke kterým bylo přidáno 20  $\mu$ l trypanové modři. Pro samotné měření byla použita Bürkerova komůrka (Obr. 10) a světelný mikroskop. Bürkerovu komůrku tvoří devět velkých čtverců, přičemž každý má obsah 1 mm<sup>2</sup>. Jeden velký čtverec je složen ze šestnácti malých čtverců opět každý o ploše 0,04 mm<sup>2</sup>. Mezi podložní a krycí sklo Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 20  $\mu$ l již připravené směsi a provedlo se spočítání buněk pod světelným mikroskopem se zvětšením 200x (Obr. 8 a 9). Do výpočtu byly brány pouze buňky nacházející se v jednom z velkých čtverců a ty které se z obou stran dotýkaly dvou zvolených hran čtverce, a to horní a pravé.



Obr. 8 Vzorek suspenze buněk s přídavkem trypanové modři pro účely počítání buněk.



Obr. 9 Mikroskop používaný pro počítání buněk.



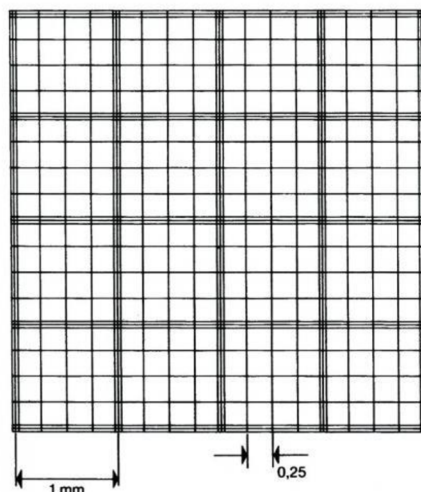
Pro výpočet koncentrace buněk v 1 ml suspenze byl pužit následující vzorec:

$$K = \frac{a \times 10^4}{n}$$

$K$  ... koncentrace buněk na 1 ml suspenze

$a$  ... určený počet buněk

$n$  ... počet čtverců



Obr. 10 Bürkerova komůrka použitá jako nástroj na počítání buněk. (Převzato a upraveno dle <https://hdl.cz/pocitaci-komora-fuchs-rosenthal/po%C4%8Di>)

### 3.2.4 Nastavení reakce pro stimulaci buněk pomocí IL-6

Po stanovení počtu buněk izolovaných z periferní krve byla provedena jejich stimulace interleukinem-6 (IL-6). Do šesti jamkového panelu bylo do každé jamky napipetováno pomocí pipetoru 4-5 ml (dle počtu buněk) kompletního RPMI 1640 média a přidáno odpovídající množství IL-6 o výsledné koncentraci 10, 50, 100 a 150 ng·ml<sup>-1</sup>, pro kontrolu byla jedna ze šesti jamek ponechána bez stimulace a označena jako NS. Všechny jamky byly doplněny o stejné množství buněčné suspenze získané izolací PBMC o finální koncentraci 1-2 mil. buněk / ml kompletního média. Reakce tedy byly nastaveny dle Tab. 1.

Tab. 1 Nastavení množství IL-6 (výchozí koncentrace byla  $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v médiu na odpovídající výslednou koncentraci.

Koncentrace IL-6 ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Množství IL-6 ( $\mu\text{l}$ ) na 1 ml média
NS (bez stimulace)	-
10	1
50	5
100	10
150	15

### 3.2.5 Nastavení reakce pro inhibici buněk za použití inhibitorů JAK/STAT dráhy

Při nastavení inhibiční reakce byl použit stejný postup jako u IL-6 s tím rozdílem, že byly navíc do reakce přidány dva inhibitory. Stattic pro inhibici STAT3 dráhy a AZD 1480 jako inhibitor JAK2 dráhy. Výsledná koncentrace obou inhibitorů byla  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a IL-6  $10 \text{ ng/ml}$ . Pro každý vzorek byly v šesti-jamkovém panelu vždy připraveny 4 jamky s izolovanými buňkami (konc.  $1\text{-}2 \text{ mil.}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). První sloužila jako nestimulovaná kontrola, buňky ve druhé byly stimulované IL-6 stejně jako v kap. 3.2.4. Do zbylých dvou jamek byl přidán inhibitor – Stattic nebo AZD 1480 o výsledné koncentraci  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Panel byl umístěn do  $\text{CO}_2$  inkubátoru na 1 hodinu. Poté byl do jamek obsahujících inhibitory přidán IL-6  $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a buňky byly kultivovány při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \%$   $\text{CO}_2$  po dobu 5-7 dnů (Tab. 2).

Tab. 2 Nastavení množství IL-6 ( $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), Stattic ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a AZD 1480 ( $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v médiu na odpovídající výslednou koncentraci.

Koncentrace IL-6 a inhibitorů	Množství ( $\mu\text{l}$ ) na 1 ml média
NS (bez stimulace)	-
$10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IL-6	1
$8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Stattic	0,8
$8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZD 1480	4

### 3.2.6 Povrchové barvení buněk pomocí markerů B lymfocytů a Gd-IgA1

Nejprve byly vyjmuty šesti jamkové panely se vzorky z CO<sub>2</sub> inkubátoru a byly vloženy do flow boxu. Obsahy jednotlivých jamek byly přepipetovány do řádně popsanych 15 ml falkon a celý objem byl cetrifugován po dobu 5 minut při zrychlení 250 g za pokojové teploty (RT). Supernatant byl následně odsán a pelet resuspendován v 50 ul 0,05% roztoku Subtilisinu A a ponechán inkubovat 2 hodiny při RT. Následně byly objemy vzorků přepipetovány do 1,5 ml eppendorfek a směs byla promyta 1 ml PBS. Poté byla provedena opět cenrifugace po dobu 5 minut při zrychlení 250 g a RT. Supernatant byl opět odstraněn, ale bylo nutné postupovat opatrně, jelikož peleta má tendence se odlepovat. Dále byla provedena blokace Fc receptorů přidáním 50 µl 10% lidského séra v PBS pufru pro každou reakci. Blokace trvala 10 minut za RT. Následovalo promytí 1 ml PBS pufru, centrifugace po dobu 5 minut při RT a otáčkách 250 g. Po odstranění supernatantu byly pelety resuspendovány roztokem 50 µl 5% FBS (fetálního bovinního séra) v PBS pufru a byla přidána galaktosa-deficientní protilátka Gd-IgA 35A12 o koncentraci 0,57 mg·ml<sup>-1</sup> v konjugaci s biotinem. Vzorky byly ponechány inkubovat v inkubátoru 1 hodinu při teplotě 37 °C. Následovalo promytí 1 ml PBS a centrifugace (250 g, 5 min. a RT). Do každé reakce bylo přidáno 50 µl roztoku 5% FBS v PBS s protilátkami (anti-CD19, anti-IgA a Streptavidin) dle Tab. 3.

Takto připravená směs byla inkubována po dobu 30 minut za RT ve tmě kvůli přítomným fluorochromům. Po inkubaci následovalo promytí 1 ml PBS pufru, centrifugace (250 g, 5 min. a RT) a odsátí supernatantu. Výsledný buněčný pelet byl resuspendován ve 200 µl PBS pufru a celý objem od každého vzorku byl přenesen do cytometrických zkumavek a bylo provedeno měření pomocí průtokového cytometru.

Tab. 3: Množství použité protilátky s příslušným fluorochromem na jednu reakci.

Marker	Fluorochrom	Množství na jednu reakci (µl)
CD19	PE-eFluor610	5
IgA	Fitc	2
Streptavidin	PE	0,25 (1:200)

### 3.2.7 Nastavení knihovny pro použití průtokové cytometrie v experimentu

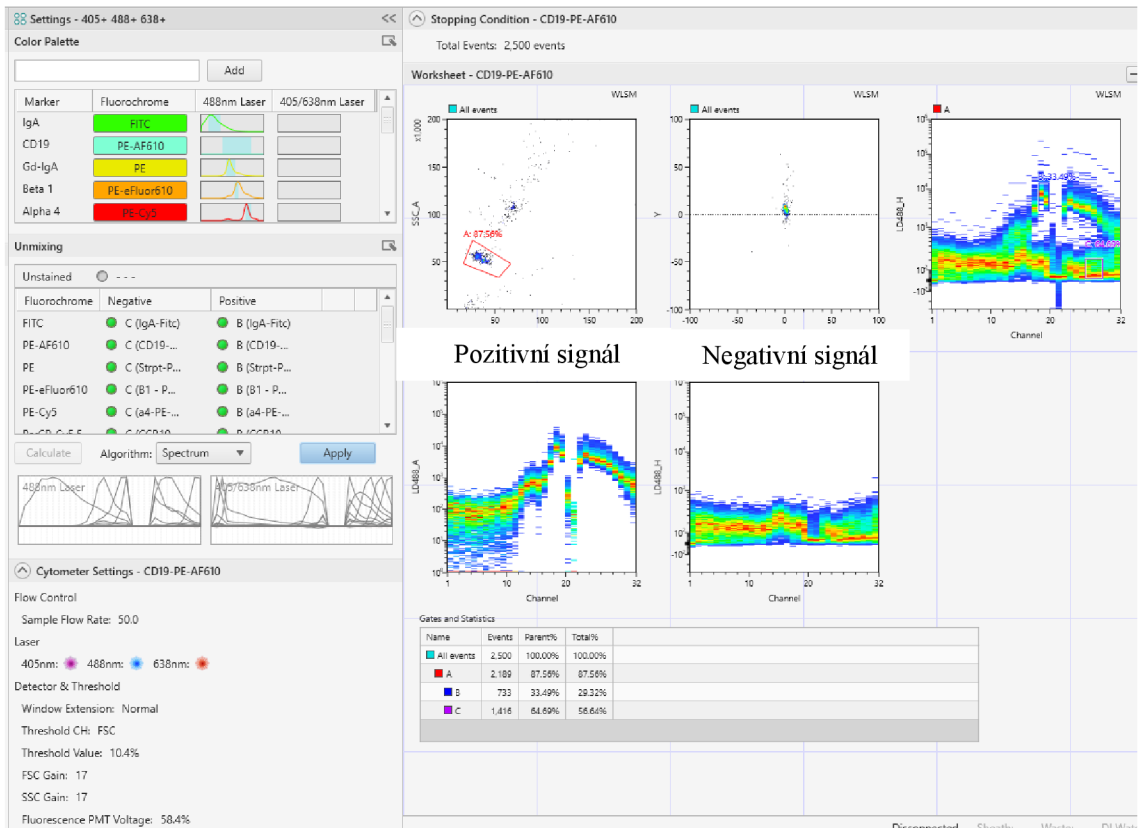
Před prací se samotnými vzorky byl proveden experiment s cílem tvorby knihovny fluorochromů použitých v měření. K navázání fluorescenčně značených protilátek byly využity UltraComp eBeads™ stávající se ze dvou populací. První váže specificky protilátku a druhá neváže vůbec, čímž slouží jako negativní kontrola.

Nastavení bylo provedeno u tří fluorochromů, k čemuž byly využity právě ony polystyrenové kuličky. Přehled fluorochromů viz Tab. 4. Každá z označených zkumavek obsahovala jednu kapku UltraComp eBeads. Následně byly do každé zkumavky zvlášť přidány 3  $\mu$ l anti-IgA, anti-Gd-IgA1 a anti-CD19 protilátky a směs byla důkladně promíchána za použití vortexu. Následně proběhla 15 minutová inkubace ve tmě. Po inkubaci byl přidán 1 ml PBS pufry na promytí a provedena centrifugace po dobu 5 minut při 250 g a RT. Supernatant byl odsát a do každé zkumavky bylo přidáno 200  $\mu$ l PBS pufry. Celý obsah každé zkumavky s různými fluorochromy byl přepipetován do cytometrických zkumavek a nastavena knihovna. Intenzita fluorescence příslušného fluorochromu byla detekována díky změnám napětí na laserech (označované jako PMT) v rozmezí od  $10^4$ - $10^5$  s počtem událostí nastaveným na 5000.

Za účelem následného měření exprese buněčného markeru v případě experimentu byla použita výše nastavená knihovna změřených fluorochromů se saturačním poměrem menším jak 1 % a společná voltage stejně jako intenzita laseru (PMT) byla u všech vzorků shodná (Obr. 11).

Tab. 4 Přehled protilátek a jejich fluorochromů pro účel sestavení knihovny

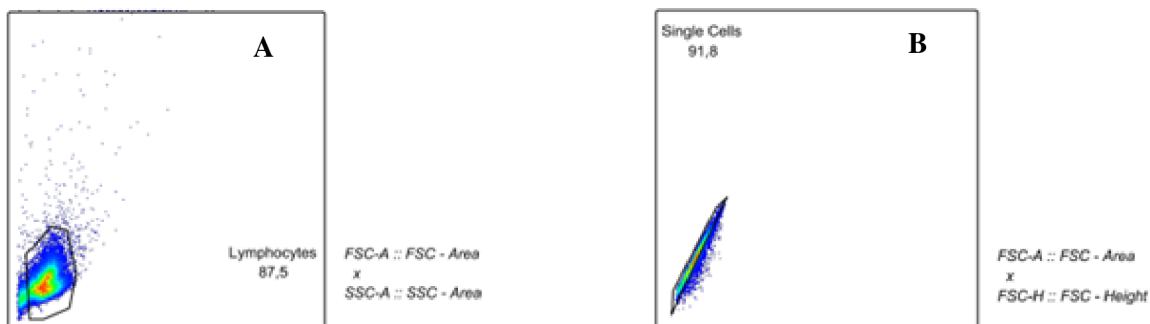
Marker	Fluorochrom
IgA	FITC
Gd-IgA1	PE
CD19	PE-eFluor610

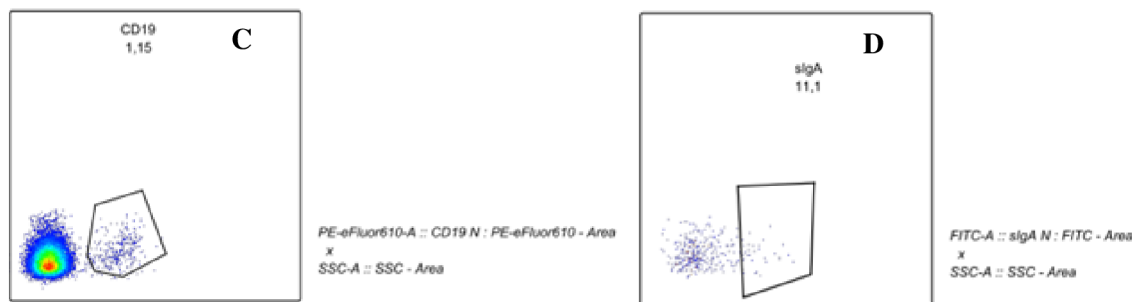


Obr. 11 Nastavení knihovny fluorochromů pro CD19-PE-AlexaFluor610.

## 4 VÝSLEDKY

Experimentální část diplomové práce byla rozdělena do tří etap. Nejprve bylo důležité si navrhnout experiment vytvořením knihovny fluorochromů na průtokovém cytometru s cílem následného měření buněk pozitivních na goat anti-human IgA-FITC, anti-CD19-PE-eFluor 610 a mouse anti-human Gd-IgA1-biotin protilátku používaných k detekci B lymfocytů v periferní krvi. V další fázi proběhl odběr venózní krve pacientů s prokázaným onemocněním IgA nefropatií, a to u čtyř léčených na kortikosteroidním preparátu nazývaném Prednison a čtyř neléčených, kteří sloužili jako kontroly. U těchto pacientů byla z nesrážlivé krve provedena izolace periferních mononukleárních buněk (PBMC), která proběhla úspěšně. Následně byly buňky povrchově nabarveny, spočítány a nastavena reakce. Při nastavení reakce byly zvoleny dva přístupy. Nejprve byla provedena experimentální část u léčených i neléčených pacientů, kdy jsme provedli stimulaci buněk koncentrační řadou IL-6 (10, 50, 100 a 150 ng·ml<sup>-1</sup>) za cílem vybrat nejlepší koncentraci používanou v průběhu celého experimentu. Jako další přístup bylo využito srovnání buněk stimulovaných IL-6 a buněk inhibovaných s pomocí JAK/STAT inhibitorů signálních drah diferenciaci B lymfocytů, a to Stattic a AZD 1480. V poslední etapě bylo provedeno srovnání procentuálního zastoupení buněk CD19<sup>+</sup>, sIgA<sup>+</sup> a Gd-IgA1 mezi léčenými a neléčenými pacienty. Rovněž bylo provedeno porovnání průměrných hodnot MFI („mean fluorescence intensity“) pro výše zmíněné typy B lymfocytárních buněk. Analýza byla provedena metodou průtokové cytometrie. Způsob gatování používaný pro jednotlivé subpopulace zachycuje Obr. 12.

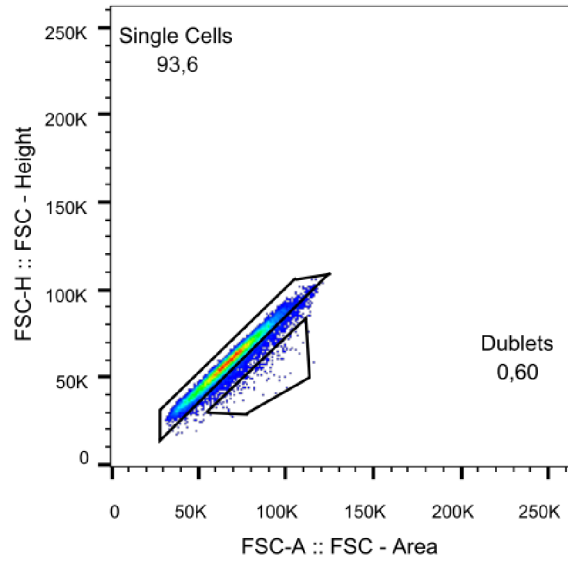




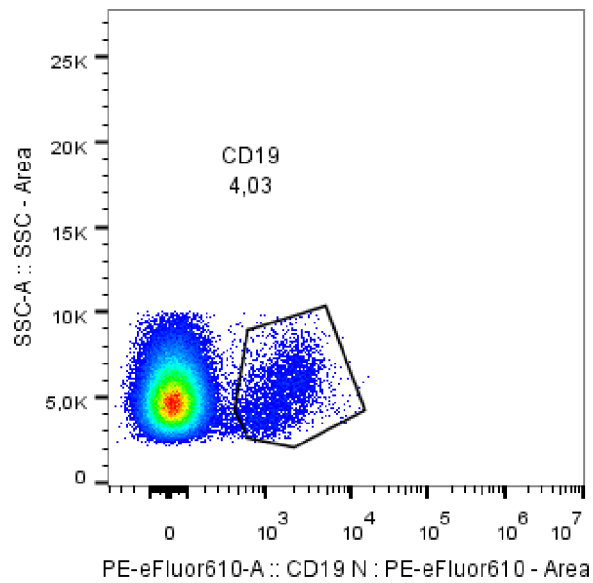
Obr. 12 Zachycení způsobu gatování na příkladu IgAN pacienta neléčeného a stimulovaného IL-6 o koncentraci  $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . A - označuje lymfocyty, B - jednotlivé buňky, C -  $\text{CD19}^+$  buňky z lymfocytů a D -  $\text{sIgA}^+$  z  $\text{CD19}^+$  buněk.

#### 4.1 Stimulace izolovaných PBMC pomocí IL-6

Při tomto experimentu byla nastavena koncentrační řada IL-6 vycházející z doposud získaných poznatků o IL-6. Byly tedy nastaveny celkem čtyři koncentrace, a to  $10$ ,  $50$ ,  $100$  a  $150 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  přičemž u člověka se setkáváme s maximální koncentrací  $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Tento pleiotropní prozánětlivý cytokin produkovaný T lymfocyty a makrofágy v reakci na probíhající zánět nebo tkáňové poškození v těle u pacientů trpících IgAN je jedním s charakteristických znaků míry výskytu zánětu. Slouží tedy jako signál prokazující v našem těle přítomnost zánětlivé reakce stimulací proteinů akutní fáze nebo proliferací B lymfocytů a neutrofilů v těle. Byly tedy použity buňky čtyř léčených a čtyř neléčených IgA nefropatických pacientů stimulovaných výše zmíněnou koncentrační řadou IL-6 a jako kontrola vždy posloužil jeden nestimulovaný vzorek. Cílem tohoto experimentu bylo prokázat účinek IL-6 na stimulaci B lymfocytů u pacientů trpících IgAN, u kterých není nasazena léčba v porovnání s pacienty léčenými pomocí kortikosteroidní léčby prednisonem. Bylo cíleno zejména na průkaznost přítomnosti buněk  $\text{CD19}^+$  z celkových lymfocytů,  $\text{sIgA}^+$  z  $\text{CD19}^+$  a  $\text{Gd-IgA1}$  z  $\text{sIgA}^+$ . Zjistili jsme, že IL-6 u neléčených pacientů s rostoucí koncentrací IL-6 způsobuje stimulaci tvorby IgA, která se blíží 30 % v porovnání s léčenými pacienty na kortikosteroidech (dále jen KS), u kterých stimulace IgA nebyla dostatečně účinná. Nejúčinnější ve stimulaci byla koncentrace  $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  a naopak nejméně účinná byla koncentrace  $150 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Na Obr. 13-16 je vidět zastoupení  $\text{CD19}^+$ ,  $\text{sIgA}^+$  a  $\text{Gd-IgA1}$  B lymfocytů v periferní krvi neléčených pacientů bez stimulace.

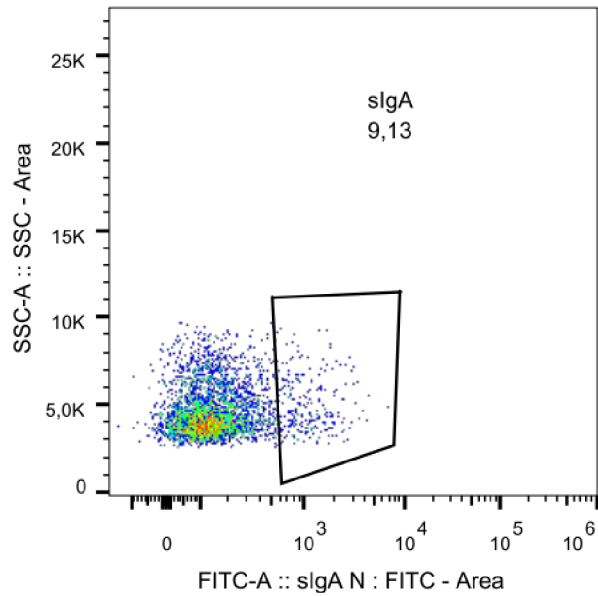


Obr. 13 Zachycení procentuálního zastoupení SC buněk u neléčených a nestimulovaných pacientů.

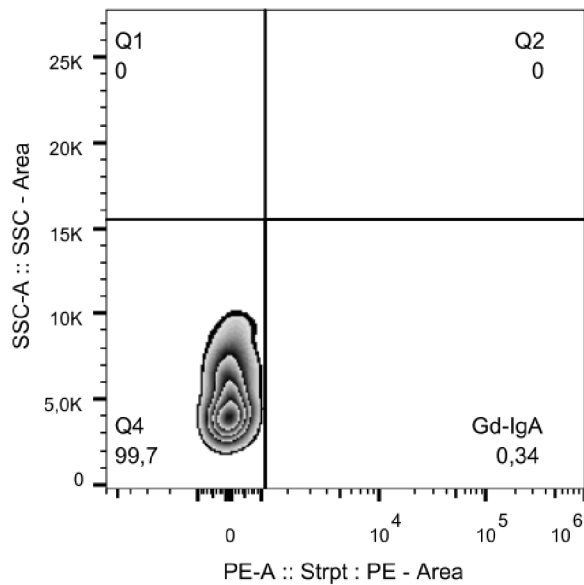


Obr. 14 Zachycení procentuálního zastoupení CD19<sup>+</sup> buněk z lymfocytů u neléčených a nestimulovaných pacientů.



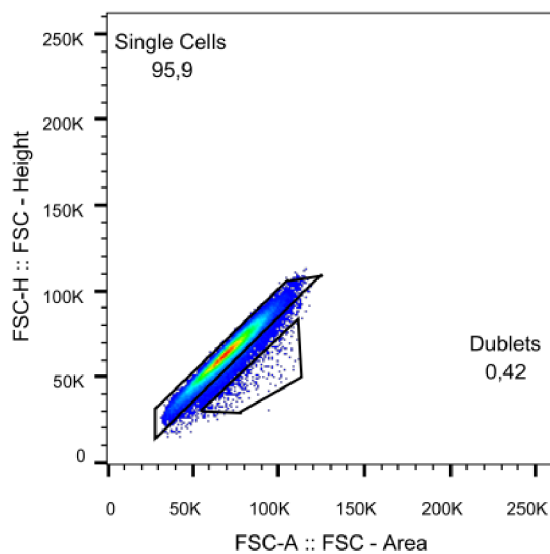


Obr. 15 Zachycení procentuálního zastoupení s IgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> buněk u neléčených a nestimulovaných pacientů.

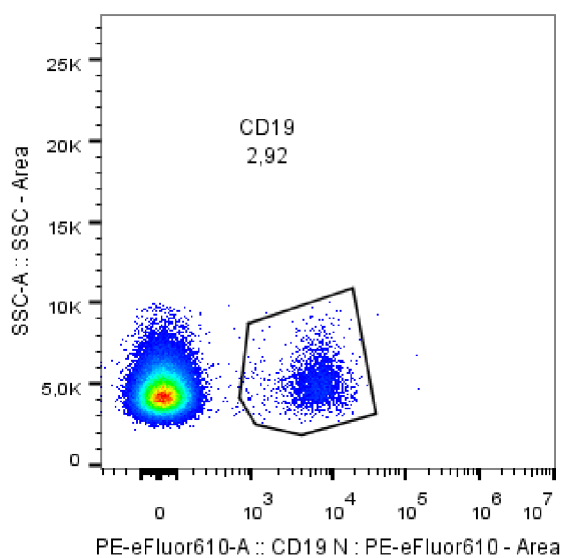


Obr. 16 Zachycení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 B lymfocytů z sIgA<sup>+</sup> buněk u neléčených a nestimulovaných pacientů.

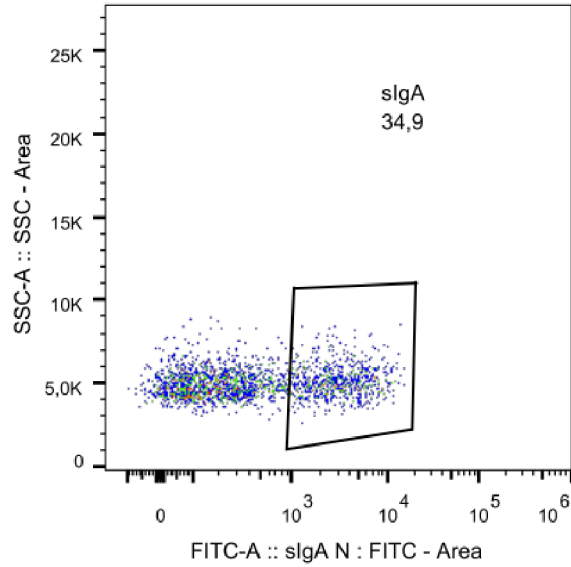
Výsledky na Obr. 17-20 ukazují zastoupení CD19<sup>+</sup>, sIgA<sup>+</sup> a Gd-IgA1 B lymfocytů u léčených pacientů bez stimulace. U léčených pacientů je patrný nárůst v počtu B lymfocytů, pokles CD19<sup>+</sup> buněk a zvýšení sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů a Gd-IgA1 B lymfocytů.



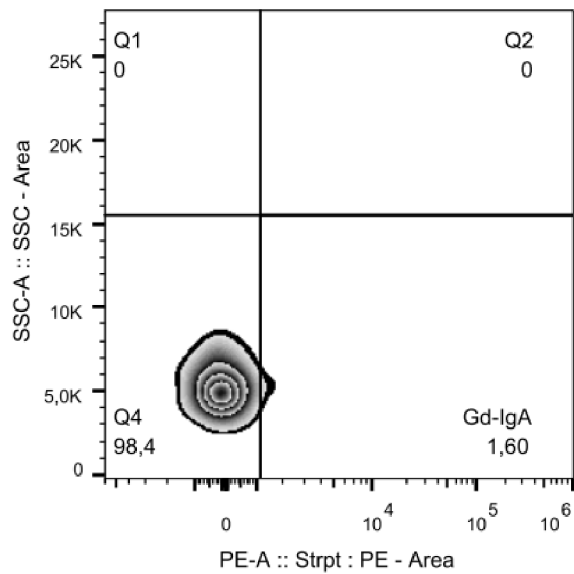
Obr. 17 Zachycení procentuálního zastoupení SC buněk u léčených a nestimulovaných pacientů.



Obr. 18 Zachycení procentuálního zastoupení CD19<sup>+</sup> buněk z lymfocytů u léčených a nestimulovaných pacientů.



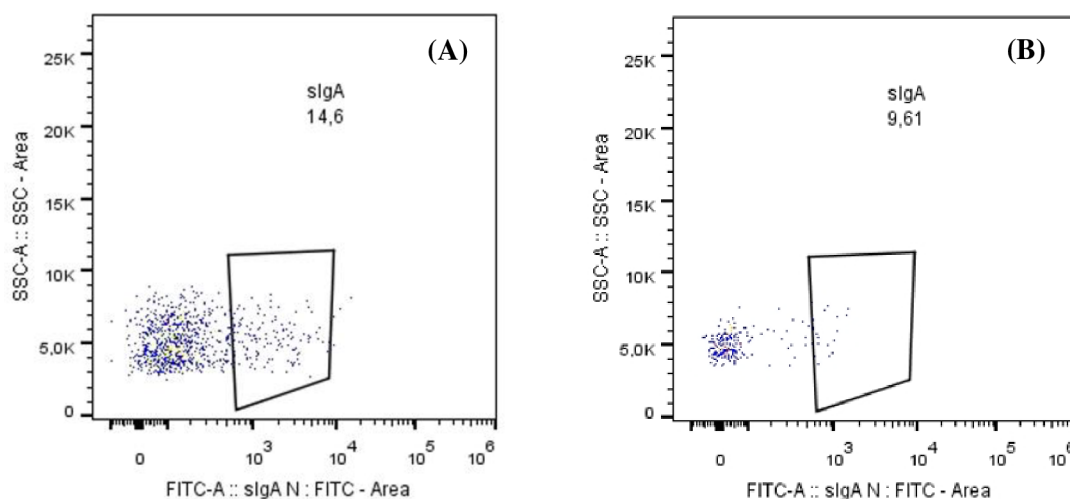
Obr. 19 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u léčených a nestimulovaných pacientů.



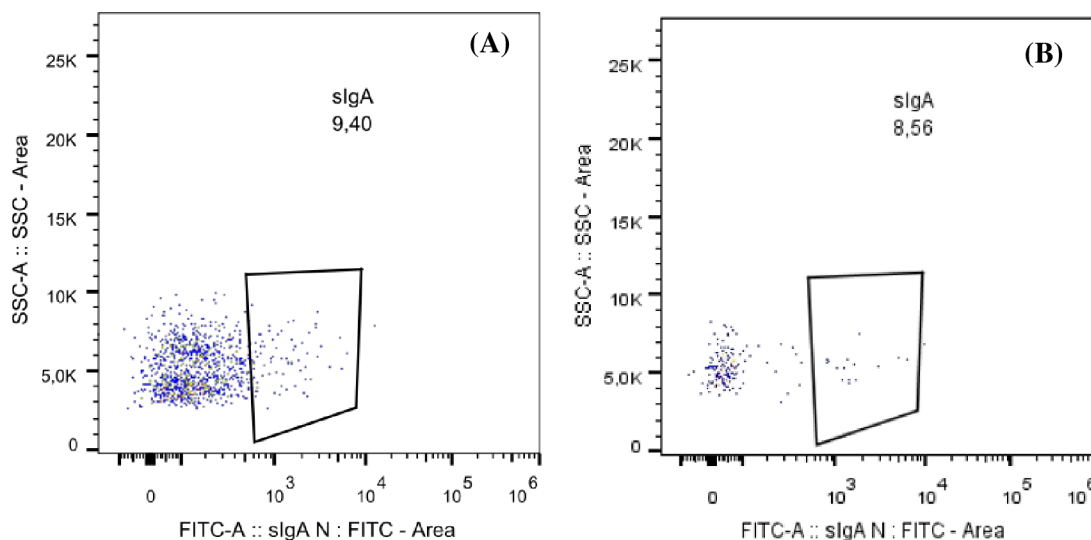
Obr. 20 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u léčených a nestimulovaných pacientů.

Na Obr. 21-24 je zachyceno srovnání zastoupení sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů u neléčených v porovnání s léčenými pacienty pro různé koncentrace IL-6. Rozdíly ve stimulaci sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů jsou patrné zejména u neléčených pacientů, kdy už koncentrace 10 ng·ml<sup>-1</sup> je dostatečná na to, aby došlo ke zvýšení hladiny sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů. U léčených pacientů má stimulace pomocí cytokinu IL-6 rovněž pozitivní vliv, ovšem v porovnání s neléčenými se stimulace tvorby sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů jeví jako více účinná. Hladina Gd-

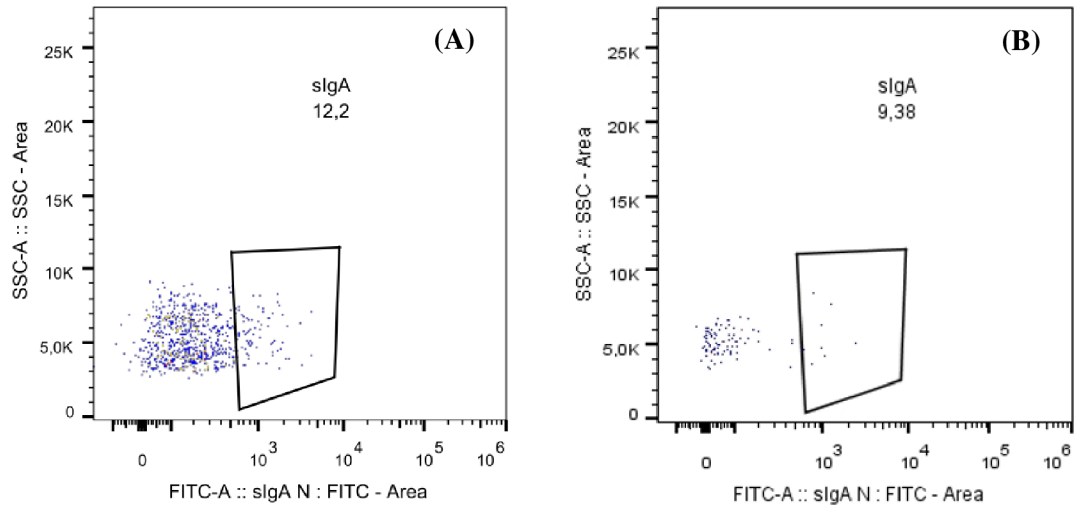
IgA1 B lymfocytů (Obr. 25-28) měla po stimulaci IL-6 u neléčených pacientů rovněž stoupající tendenci, u léčených pacientů byla hladina Gd-IgA1 B lymfocytů kolísavá, ale měla spíše klesající charakter v porovnání s neléčenými pacienty, kdy jeho stimulace klesala až po dosažení koncentrace  $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



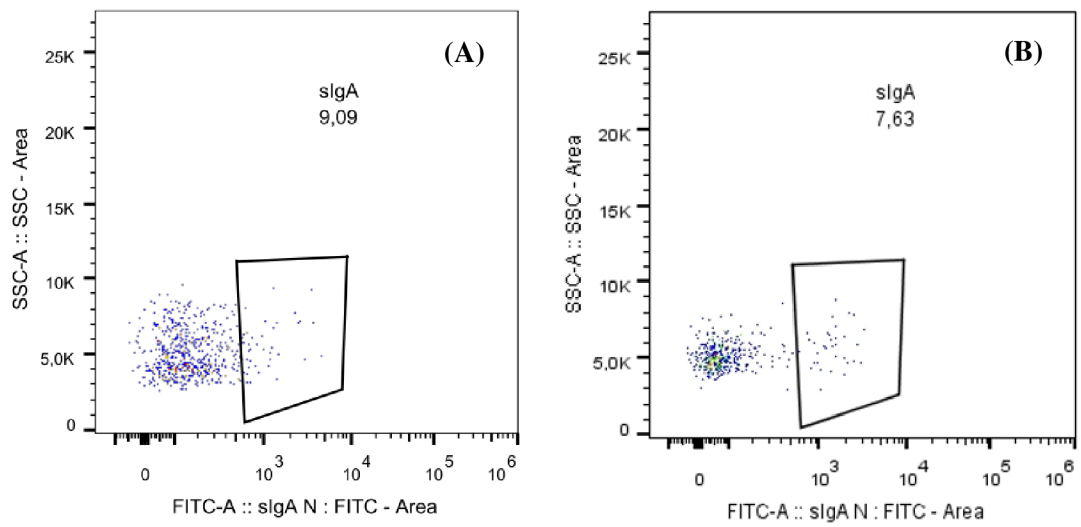
Obr. 21 Zachycení procentuálního zastoupení  $\text{sIgA}^+$  z  $\text{CD19}^+$  lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci  $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  IL-6.



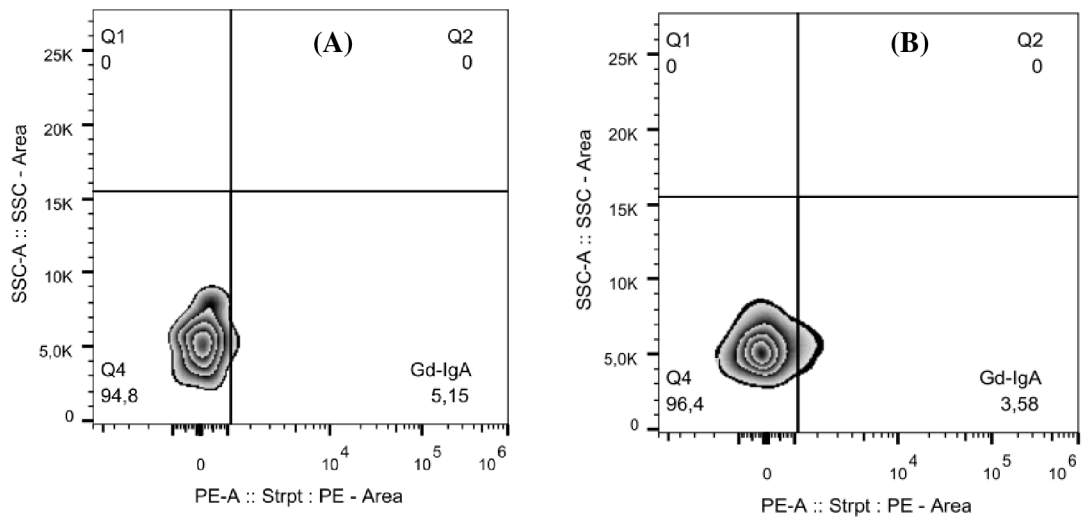
Obr. 22 Zachycení procentuálního zastoupení  $\text{sIgA}^+$  z  $\text{CD19}^+$  lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci  $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  IL-6.



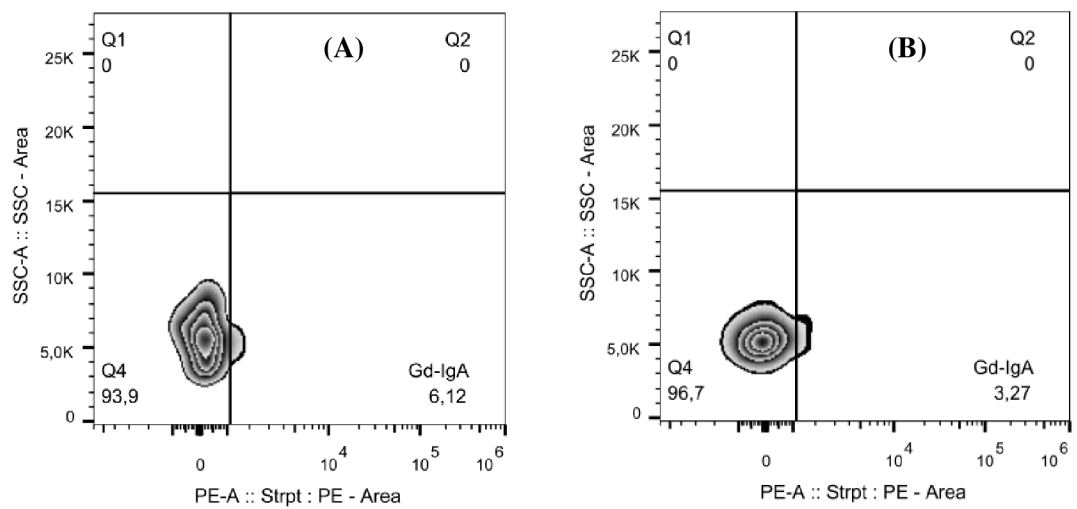
Obr. 23 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci 100 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6.



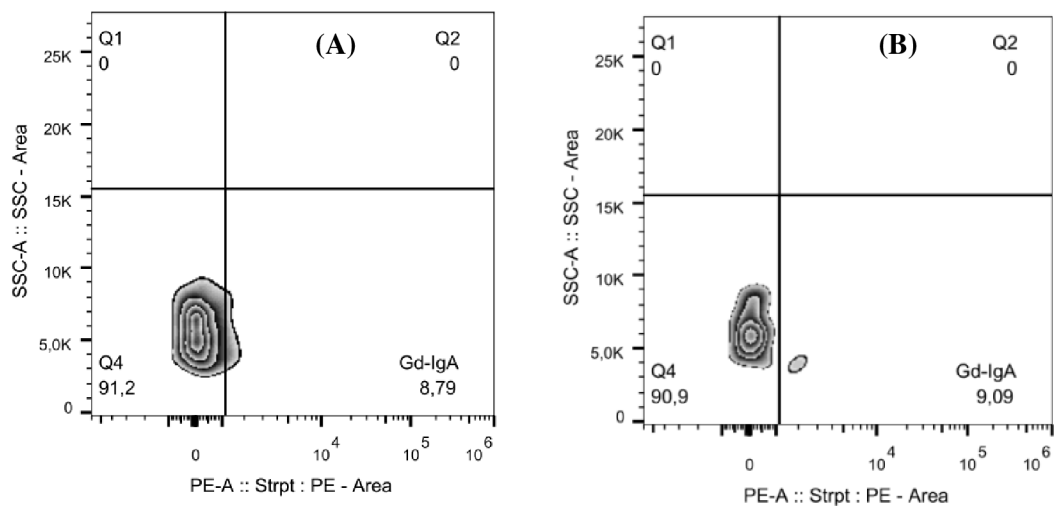
Obr. 24 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci 150 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6.



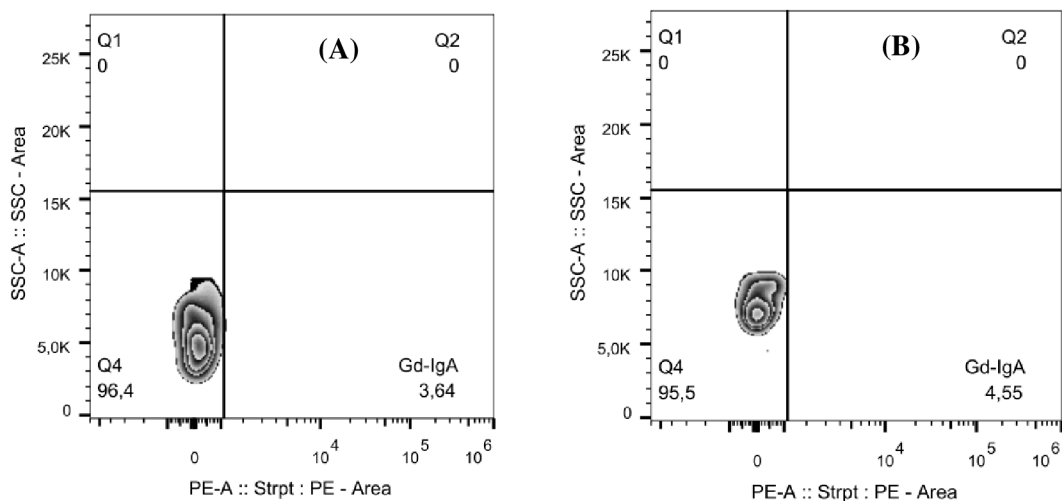
Obr. 25 Zachycení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6.



Obr. 26 Zachycení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> buněk u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci 50 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6.

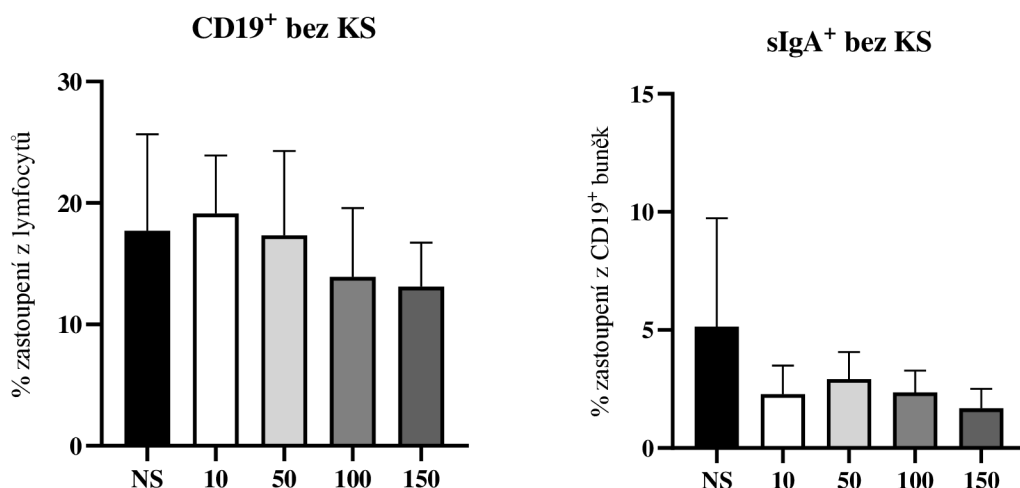


Obr. 27 Zachycení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci 100 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6.

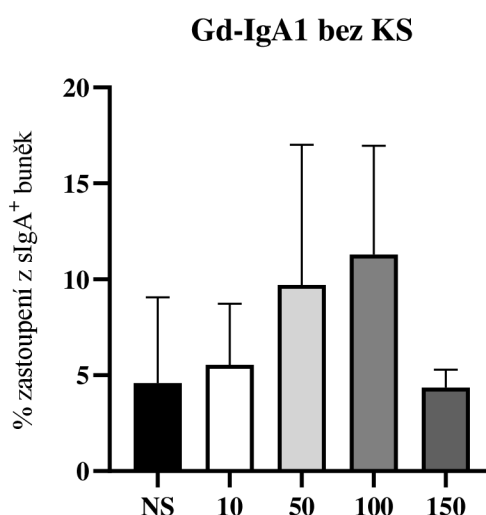


Obr. 28 Zachycení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů u neléčených (A) a léčených (B) pacientů po stimulaci 150 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6.

Z níže uvedených grafů (Obr. 29) lze konstatovat, že po stimulaci IL-6 došlo pouze k mírnému zvýšení hladiny CD19<sup>+</sup> lymfocytů a sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů u neléčených pacientů. Naopak exprese Gd-IgA1 B lymfocytů u neléčených pacientů již při nízké koncentraci IL-6 narůstala (Obr. 30). Na základě těchto výsledků byla pro další účely výzkumu vybrána právě nejnižší koncentrace IL-6, protože se jeví jako dostačující pro charakterizaci chování buněk.



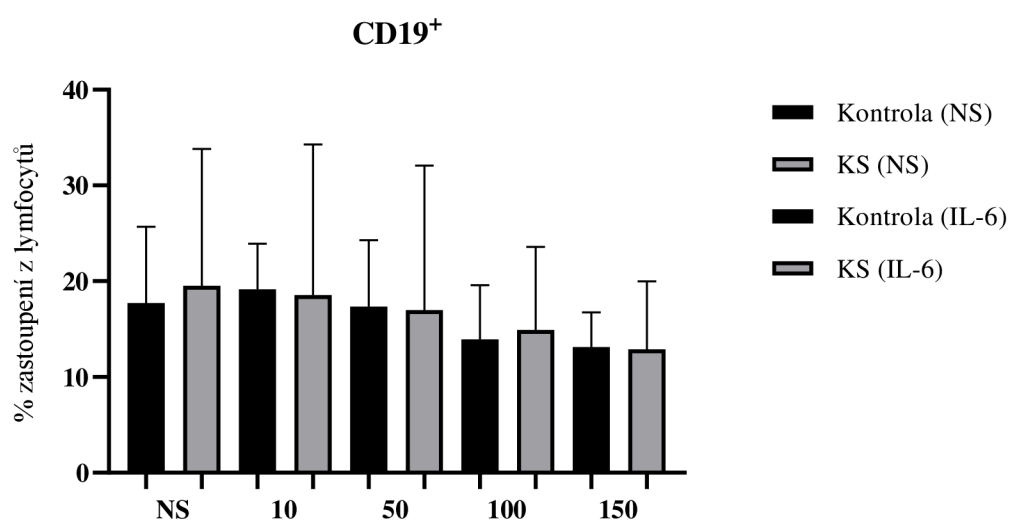
Obr. 29 Grafy znázorňující změny v procentuálním zastoupení CD19<sup>+</sup> a sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů v důsledku změny koncentrace IL-6 u neléčených pacientů (bez KS). Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.



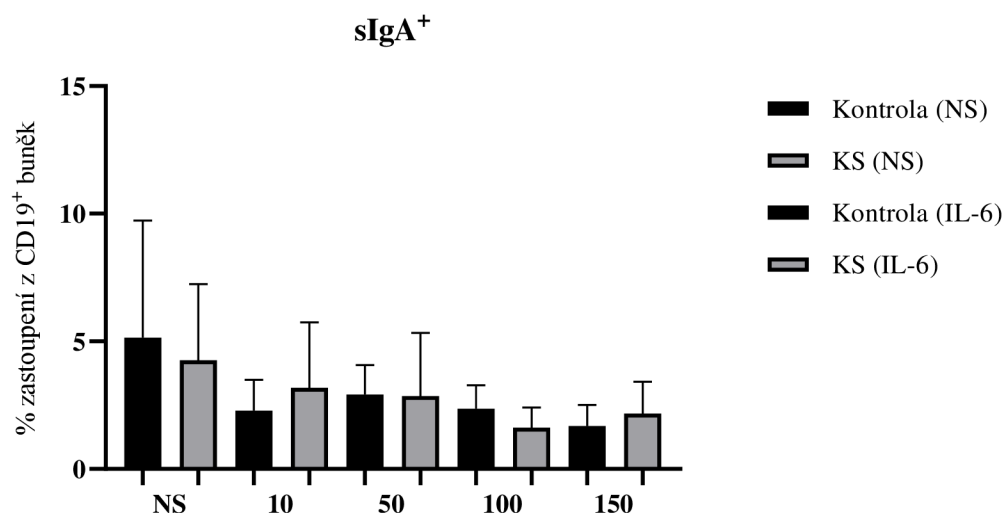
Obr. 30 Graf znázorňující změny v procentuálním zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů v důsledku změny koncentrace IL-6 u neléčených pacientů. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.



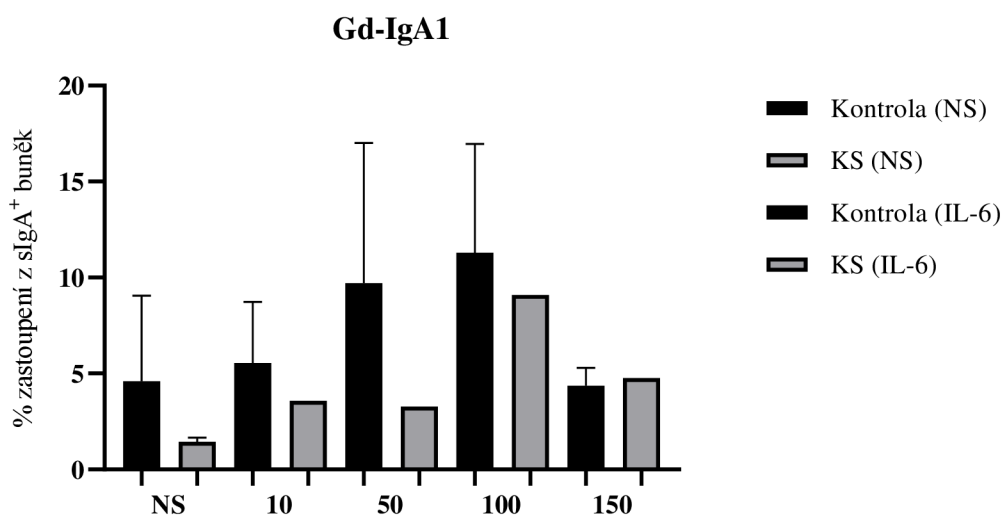
Všeobecně lze říci, že při vysokých koncentracích IL-6 se hladina CD19<sup>+</sup> lymfocytů snižuje v případě neléčených i léčených pacientů (Obr. 31). U sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů došlo v závislosti na zvyšující se koncentraci IL-6 ke snížení exprese jak u neléčených, tak léčených pacientů v porovnání s nestimulovanými (Obr. 32). V případě Gd-IgA1 B lymfocytů bylo možné pozorovat nárůst v závislosti na zvyšující se koncentraci IL-6 zejména u neléčených pacientů, u léčených jeho exprese klesala, což může souviset s účinkem KS (Obr. 33).



Obr. 31 Graf znázorňující změny v procentuálním zastoupení CD19<sup>+</sup> lymfocytů v důsledku změny koncentrace IL-6 ve srovnání neléčení vs. léčení pacientů. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.



Obr. 32 Graf znázorňující změny v procentuálním zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů v důsledku změny koncentrace IL-6 ve srovnání neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

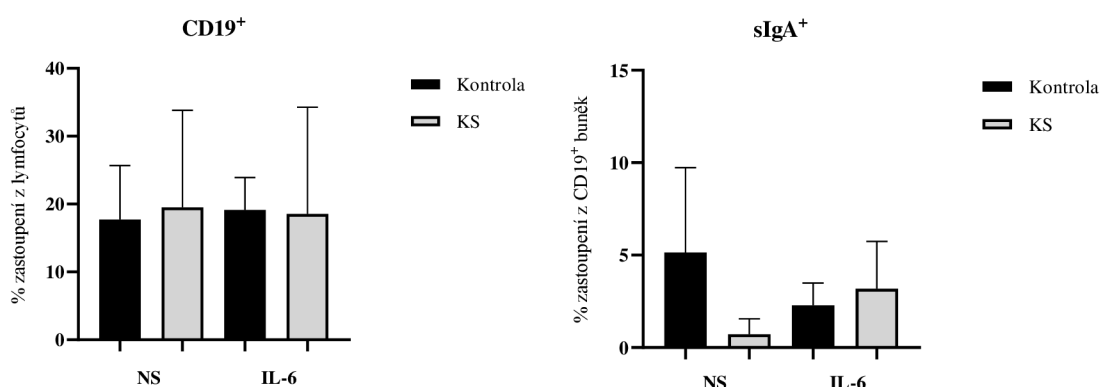


Obr. 33 Graf znázorňující změny v procentuálním zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů v důsledku změny koncentrace IL-6 ve srovnání neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

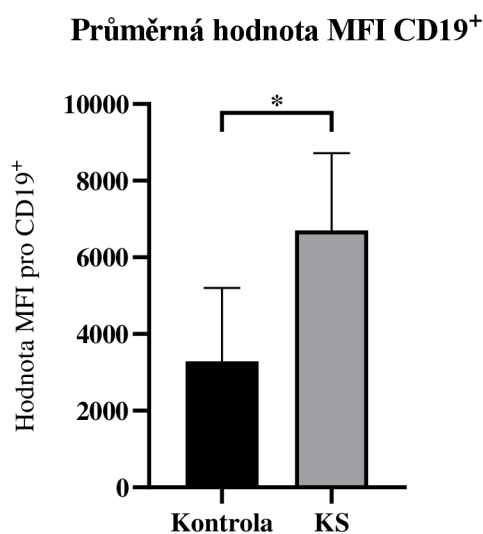
Pokud je srovnáváno procentuální zastoupení CD19<sup>+</sup> lymfocytů mezi nestimulovanými a stimulovanými buňkami IL-6 u neléčených a léčených pacientů tak je patrné, že s ohledem na odchylku měření nedochází k výraznému poklesu ani nárůstu (Obr. 34) ovšem pokud by se vzala v potaz průměrná hodnota intenzity fluorescence (označovaná jako MFI, mean fluorescence intensity), tak z grafu jasně vyplývá, že

intenzita exprese CD19<sup>+</sup> molekuly na povrchu B lymfocytů jak pro kontroly tak pro KS se celkově snižuje (Obr. 36). Ve srovnání neléčených a KS hodnot MFI pro nestimulované CD19<sup>+</sup> buňky je patrný signifikantní rozdíl v expresi, což může být dáno právě účinky kortikosteroidní léčby, která patrně způsobí zablokování procesu zrání buněk (Obr. 35).

Pro sIgA<sup>+</sup> B lymfocyty je již z grafu procentuálního zastoupení patrný rozdíl mezi neléčenými a KS, což vyplývá i z hodnot MFI, že se opakuje situace jako v případě CD19<sup>+</sup>, a to, že opět dochází ke snížení exprese populace sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů po stimulaci IL-6 (Obr. 34 a 37).

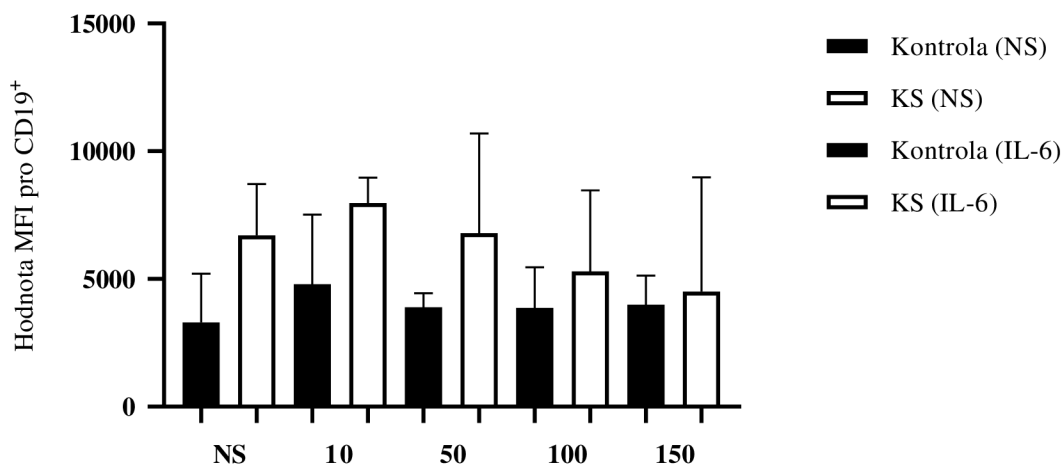


Obr. 34 Grafy znázorňující změny v procentuálním zastoupení CD19<sup>+</sup> a sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů ve srovnání nestimulovaní a stimulovaní neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.



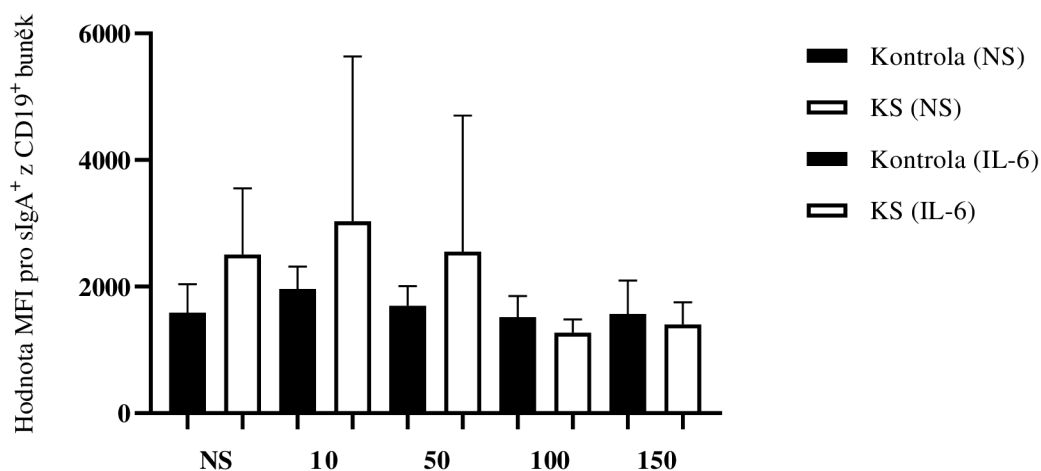
Obr. 35 Graf znázorňující změny v průměrných hodnotách intenzity exprese Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> nestimulovaných buněk ve srovnání neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou nepárového t-testu s použitím Tukey post-hoc testu, kdy platí \*p < 0.05.

### Průměrná hodnota MFI CD19<sup>+</sup>



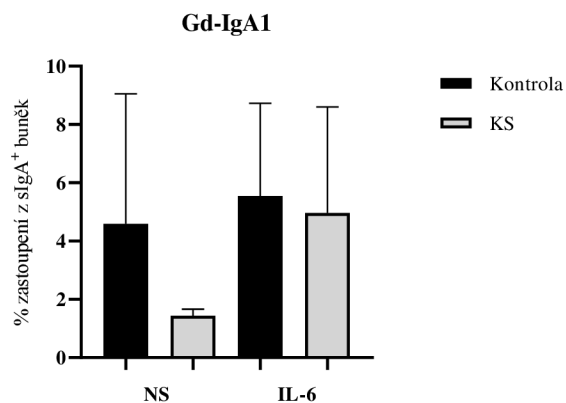
Obr. 36 Graf znázorňující změny v průměrných hodnotách intenzity exprese CD19<sup>+</sup> lymfocytů ve srovnání nestimulovaní a stimulovaní neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

### Průměrná hodnota MFI sIgA<sup>+</sup>

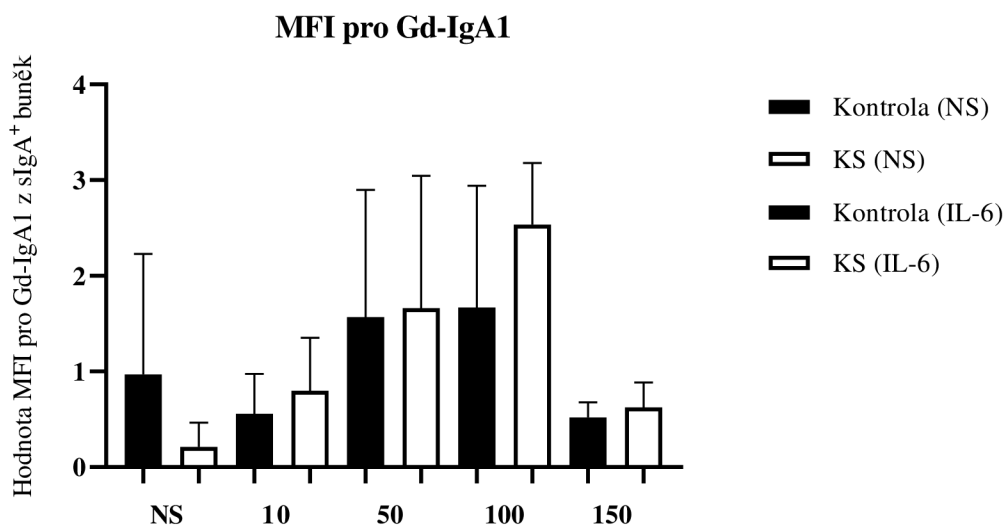


Obr. 37 Graf znázorňující změny v průměrných hodnotách intenzity exprese sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů ve srovnání nestimulovaní a stimulovaní neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

Jak vyplývá z grafů na Obr. 38 a 39 je chování a tedy exprese Gd-IgA1 B lymfocytů v nesouladu s expresí CD19<sup>+</sup> lymfocytů a sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů, protože zde platí, že exprese Gd-IgA1 se s rostoucí koncentrací IL-6 zvyšuje.



Obr. 38 Graf znázorňující změny v procentuálním zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> buněk ve srovnání nestimulovaní a stimulovaní neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

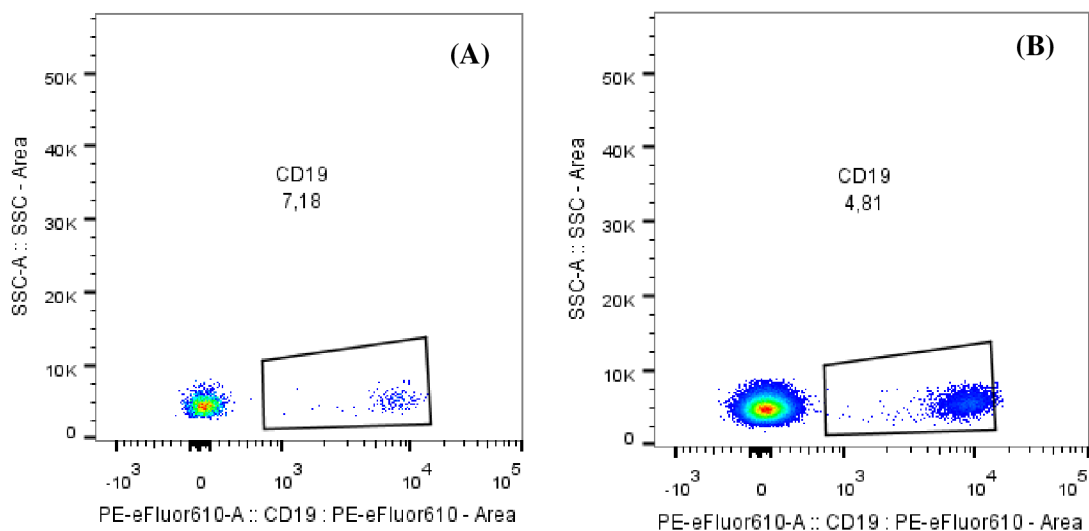


Obr. 39 Graf znázorňující změny v průměrných hodnotách intenzity exprese Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů ve srovnání nestimulovaní a stimulovaní neléčení vs. léčení pacienti. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

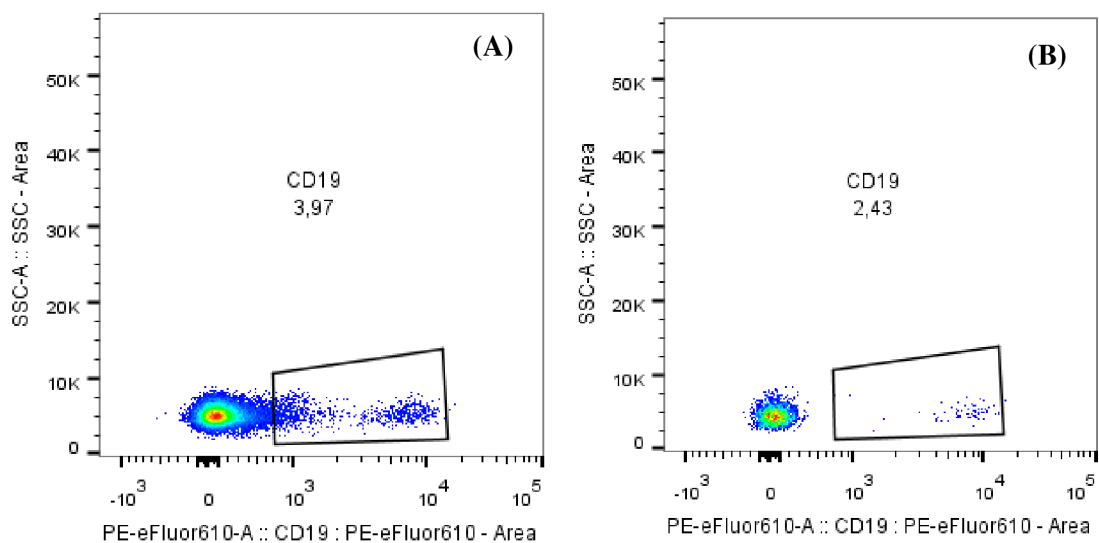
## 4.2 Kultivace PBMC s inhibitory Stattic a AZD 1480

Kromě stanovení vlivu cytokinu IL-6, který měl na populaci sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů stimulační charakter bylo přistoupeno i k ověření opačné situace. Buněčná suspenze izolovaná z periferní krve pěti neléčených pacientů byla podrobena inhibiční reakci stimulace IL-6 za použití inhibitoru Stattic, jakožto inhibitoru STAT3 dráhy a AZD 1480 pro inhibici JAK1/2 signální dráhy v diferenciaci B lymfocytů za cílem stanovení přímého vlivu inhibitorů na některou ze subpopulací B lymfocytů. Pro správné vyhodnocení byl kromě inhibičních reakcí ponechán vzorek úplně bez stimulace jako kontrola a jeden byl opět stimulován koncentrací IL-6, a to 10 ng·ml<sup>-1</sup>. Výsledky zachycují následující obrázky, kdy byl zjištěn pokles hladiny populace povrchových molekul, což se projevilo úbytkem jak CD19<sup>+</sup>, tak i sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů (Obr. 40, 41, 43 a 44).

Graf zachycuje rozdíl mezi nestimulovanými buňkami, stimulovanými IL-6 a inhibovanými. Lze tedy říci, že po přidavku IL-6 došlo ke stimulaci exprese, která byla na úrovni inhibitoru AZD 1480 potlačena již v případě CD19<sup>+</sup> buněk (Obr. 42). V případě Stattic inhibitoru se takový inhibiční efekt projevil až na úrovni sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů, kdy došlo k výraznému snížení sIgA<sup>+</sup> populace (Obr. 45). Prudké snížení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů způsobilo sekundárně takové snížení Gd-IgA1 B lymfocytů, že již nebylo možné je detekovat. Z našich výsledků můžeme stanovit hypotézu, že produkce Gd-IgA1 buněk by mohla být ovlivněna JAK signální dráhou, která je výrazně ovlivňována AZD 1480 inhibitorem, ale pouze sekundárně snížením populace CD19<sup>+</sup> buněk (Obr. 46-48). Stejně tak inhibitor Stattic je schopný ovlivnit produkci Gd-IgA1 buněk pouze prostřednictvím poklesu nadřazené IgA<sup>+</sup> populace.

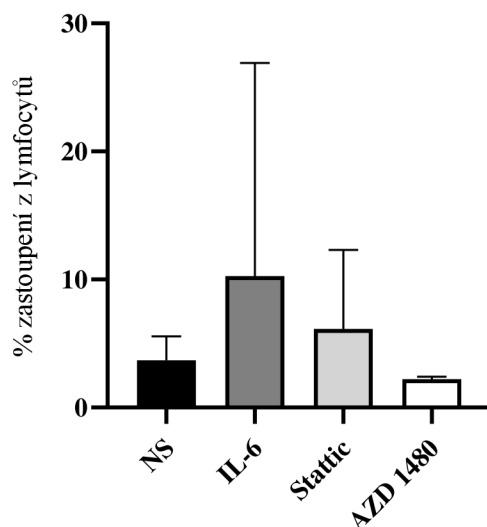


Obr. 40 Zachycení procentuálního zastoupení CD19<sup>+</sup> buněk z lymfocytů u neléčených a nestimulovaných pacientů (A) ve srovnání se stimulovanými buňkami 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 (B).

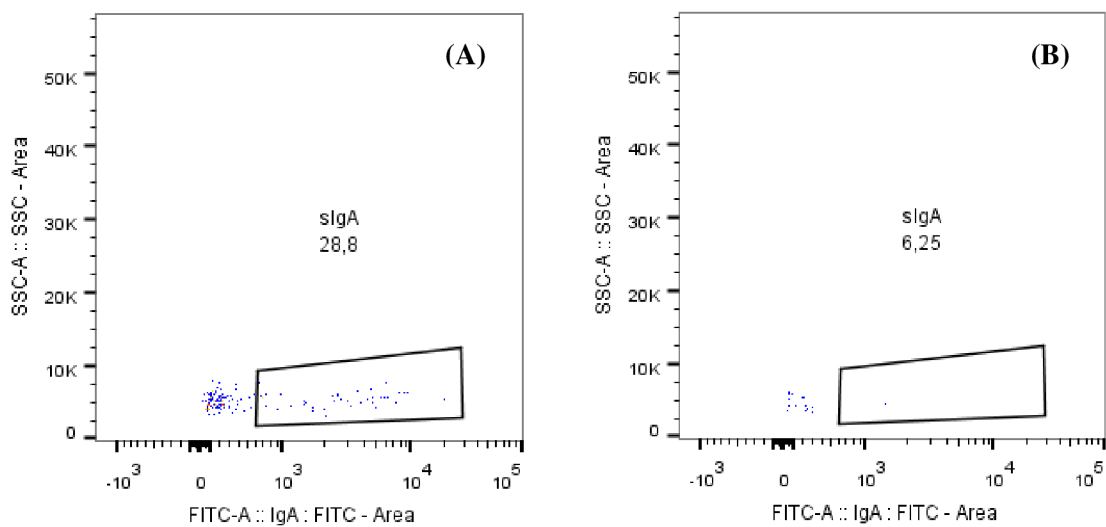


Obr. 41 Zachycení procentuálního zastoupení CD19<sup>+</sup> buněk z lymfocytů u neléčených a stimulovaných pacientů 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 za použití inhibitorů Statoc (A) a AZD 1480 (B).

### Inhibice CD19<sup>+</sup>

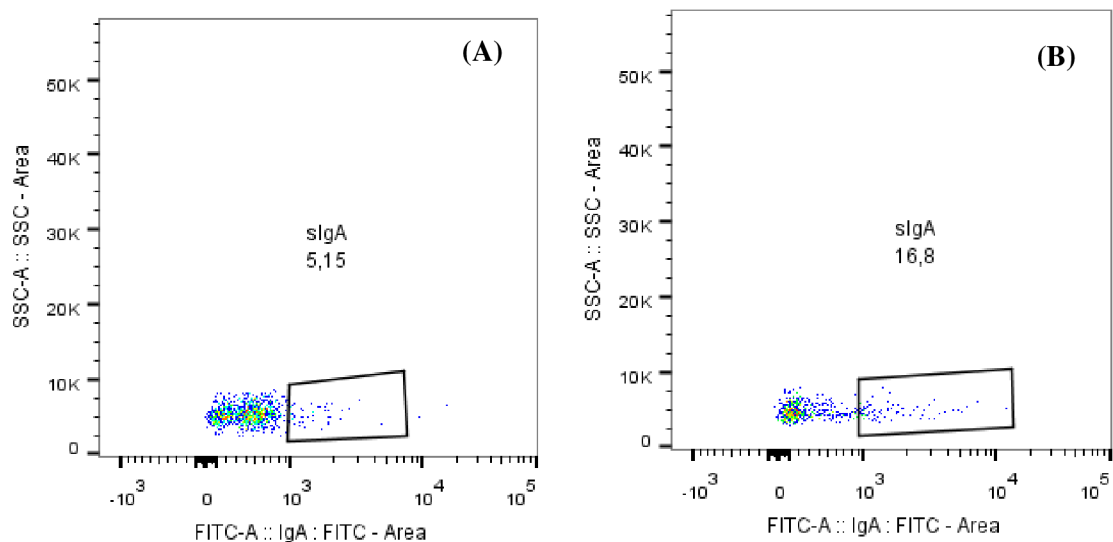


Obr. 42 Zachycení procentuálního zastoupení CD19<sup>+</sup> buněk z lymfocytů neléčených pacientů nestimulovaných, stimulovaných pouze 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 a stimulovaných za použití inhibitorů Stattic a AZD 1480. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

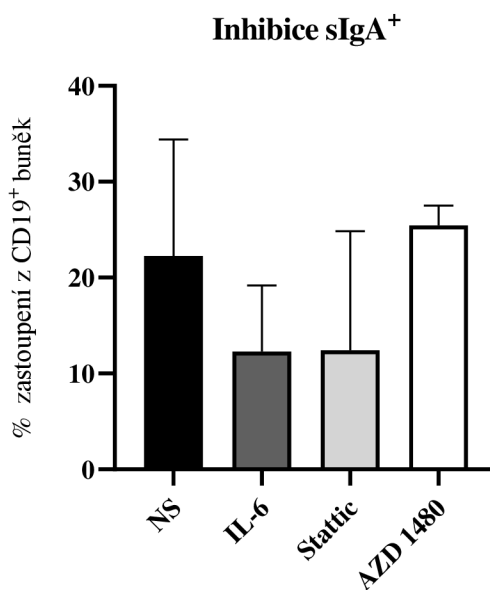


Obr. 43 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> Blymfocytů u neléčených a nestimulovaných pacientů (A) ve srovnání se stimulovanými buňkami 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 (B).

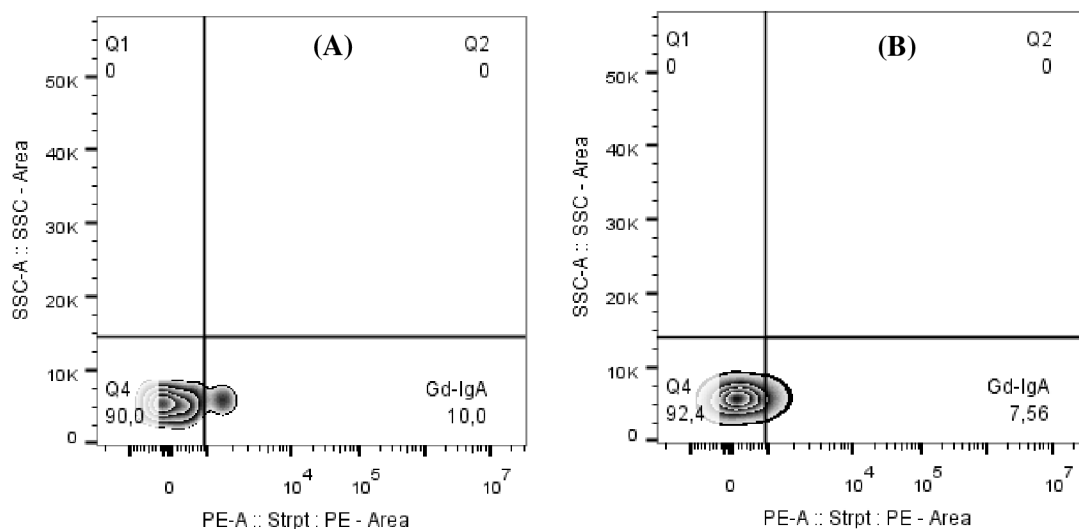




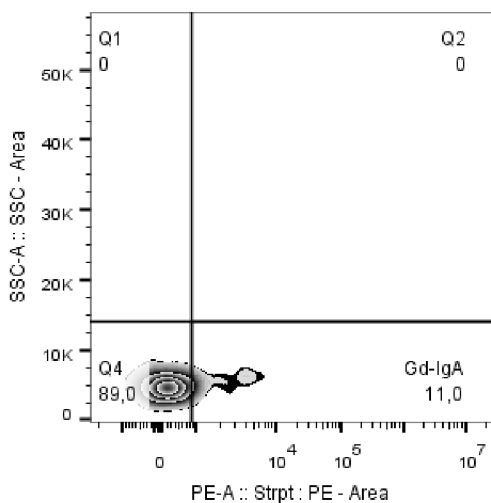
Obr. 44 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u neléčených a stimulovaných pacientů 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 za použití inhibitorů Stattic (A) a AZD 1480 (B).



Obr. 45 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů neléčených pacientů nestimulovaných, stimulovaných pouze 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 a stimulovaných za použití inhibitorů Stattic a AZD 1480. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

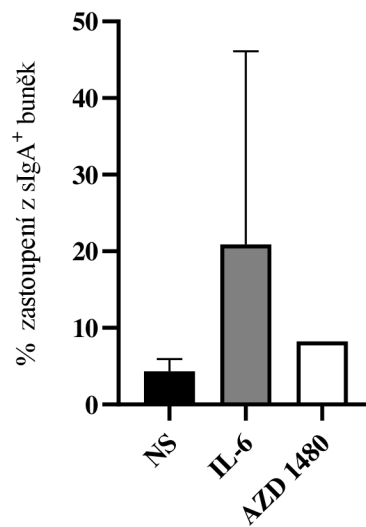


Obr. 46 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> buněk z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u neléčených a nestimulovaných pacientů (A) ve srovnání se stimulovanými buňkami 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 (B).



Obr. 47 Zachycení procentuálního zastoupení sIgA<sup>+</sup> z CD19<sup>+</sup> lymfocytů u neléčených a stimulovaných pacientů 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 za použití inhibitoru AZD 1480.

### Inhibice Gd-IgA1



Obr. 48 Zachycení procentuálního zastoupení Gd-IgA1 z sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů neléčených pacientů nestimulovaných, stimulovaných pouze 10 ng·ml<sup>-1</sup> IL-6 a stimulovaných za použití inhibitorů Stattic a AZD 1480. Hodnoty byly vyhodnoceny statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-hoc testu.

## 5 DISKUZE

V předkládané experimentální části diplomové práce je provedeno srovnání exprese povrchových diferenciačních antigenů B lymfocytů. Typickým příkladem jsou buňky CD19<sup>+</sup> lymfocytů, sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů a galaktosa deficientní IgA1 B lymfocytů (zkráceně Gd-IgA1). Stanovení subpopulací B lymfocytů bylo provedeno za cílem pochopení souvislostí ve změně exprese a diagnóze. Na základě poznatků vědců, kteří se zabývali problematikou srovnání léčených a neléčených pacientů, bylo prokázáno, že prednisonová terapie je účinná zejména ve snížení hladiny sIgA<sup>+</sup> a v návaznosti na to i Gd-IgA1, jejichž přítomnost v periferní krvi je hlavním indikátorem onemocnění IgA nefropatie. K tvorbě Gd-IgA1 může docházet zejména předčasnou sialylací povrchových glykoproteinů. Za běžných podmínek dochází k navázání galaktosy na N-acetylgalaktosamin, a poté až k vazbě kyseliny sialové v procesu posttranslační modifikace v pantové oblasti těžkého řetězce molekuly IgA1. U Gd-IgA1 molekul se ovšem naváže na N-acetylgalaktosamin nejprve kyselina sialová, která zabrání ve vazbě galaktose a tím dochází k tvorbě Gd-IgA1. Gd-IgA1 je rozpoznán v rámci obranného mechanismu organismu IgG protilátkou, která se na něho váže a vytváří cirkulující imunitní komplexy, které se hromadí v glomerulech a způsobují proliferaci mesangiálních buněk, a tedy rozvoj onemocnění.

Pro účely experimentální části diplomové práce byla použita Gd-IgA1 (35A12) protilátka poskytnutá vědci z Lékařské fakulty Univerzity Fujita v Japonsku. Specifita této protilátky byla srovnána se specifitou dosud v literatuře častěji zmiňované KM55. Protilátka 35A12 ani žádná jiná nebyla dosud využita k výzkumu týkajícího se inhibitorů JAK/STAT signálních drah (Stattic a AZD 1480). Jejich účinek na B lymfocyty izolované z periferní krve pacientů trpících IgAN byl popsán poprvé v této práci.

Jak bylo v zápětí zjištěno, tato zvolená strategie výzkumu byla velice náročná z hlediska průběhu izolace, jelikož bylo pracováno s krví pacientů, bylo nutné brát velký ohled na správnou manipulaci se vzorky, aby nedošlo k jejich kontaminaci v průběhu izolace. Rovněž i z pohledu vyhodnocování se při výzkumu objevila řada úskalí. Jedním z nich je například to, že se jedná o periferní krev různých pacientů z hlediska věku, pohlaví, stupně diagnózy IgAN či možných jiných onemocnění. Při analýze je tudíž nutné počítat s možnými odchylkami. Zohlednit je nutno i počet pacientů, jelikož výzkum byl prováděn v období, kdy byly podmínky stíženy pandemií COVID-19. Počet pacientů byl v případě stimulace IL-6 roven osmi (čtyři IgAN bez léčby a čtyři kontrolní bez KS).

Inhibiční eseje byly provedeny u pěti neléčených IgAN pacientů, a proto přistupujeme k výsledkům jako ke způsobu charakterizace této nově používané anti-Gd-IgA1 protilátky. Nicméně lze z těchto analýz vyvodit mnoho zajímavých poznatků ohledně chování CD19<sup>+</sup> lymfocytů, sIgA<sup>+</sup> a Gd-IgA1 B lymfocytů z pohledu procentuálního zastoupení buněk IgAN pacientů bez a s kortikosteroidní léčbou.

Suspenze buněk byly hlavně podrobeny stimulaci IL-6, jakožto prozánětlivým cytokinem, a to u pacientů s IgAN bez KS i s KS a rovněž i inhibici stimulace IL-6 pomocí Stattic a AZD 1480 inhibitorů. Práce s inhibitory byla dosti stížena, a to zejména u Stattic inhibitoru pro STAT3 signální dráhu, jelikož tento inhibitor je pro buňky poměrně toxický, a proto byla zkrácena i doba inkubace na čtyři dny v porovnání s IL-6, který byl inkubován sedm dní.

Pro analýzu buněčných populací B lymfocytů byla záměrně zvolena metoda průtokové cytometrie, která, jak ukázal nedávný výzkum z letošního roku 2022, který byl proveden týmem vědců z Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, byla velmi efektivně použita například i pro fenotypizaci mb-Gd-IgA1 (35A12) B lymfocytů z periferní krve. V této studii se v periferní krvi pacientů s IgAN podařilo prokázat, že membránově vázané Gd-IgA1<sup>+</sup> buňky preferenčně exprimují  $\lambda$  lehké řetězce na rozdíl od celkových IgA<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup> nebo IgM<sup>+</sup> buněk, které preferují k expresi  $\kappa$  lehký řetězec u všech analyzovaných skupin, a proto lze považovat přítomnost  $\lambda$  lehkého řetězce za jednu z možných dalších charakteristik pro IgAN (Zachova et al., 2022).

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části byla rozebrána problematika IgA nefropatie, a to ve vztahu k tvorbě galaktosa-deficientního IgA1 a nejnovějších poznatků v této oblasti zahrnující rovněž i seznámení se s hypotézou čtyř hitů. Podstatná část rešerše byla věnována B lymfocytům a jejich diferenciaci a v neposlední řadě i IL-6, jakožto prozánětlivého cytokinu ovlivňujícího expresi B lymfocytárních subpopulací jako jsou například CD19<sup>+</sup> lymfocyty. Rovněž byly rozebrány i signální dráhy JAK1/2 a STAT3, na jejichž inhibici se podílejí právě v experimentální části používané inhibitory Stattic a AZD 1480.

Experimentální část diplomové práce zahrnovala analýzu buněk z periferní krve IgAN pacientů, které byly následně stimulovány a inhibovány za účelem charakterizace Gd-IgA1 B lymfocytů a podrobeny analýze pomocí průtokové cytometrie. Nejprve tedy bylo provedeno u neléčených pacientů srovnání nevhodnější koncentrace IL-6 pro nastavení stimulačních a inhibičních reakcí. Dle získaných dat byla touto koncentrací právě 10 ng·ml<sup>-1</sup>. Dále bylo provedeno srovnání účinku nejnižší koncentrace IL-6 a nestimulovaných buněk u neléčených a kortikosteroidy léčených pacientů. Bylo zjištěno, že IL-6 způsobuje rychlejší dozrávání B lymfocytů a tím ovlivňuje expresi Gd-IgA1 B lymfocytů, což by bylo pro průběh nemoci poměrně nepříznivé. Z výsledků ovšem vyplývá, že účinkem IL-6 se snižuje populace CD19<sup>+</sup> a sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů a naopak se zvyšuje zastoupení Gd-IgA1 B lymfocytů, což by znamenalo, že exprese Gd-IgA1 B lymfocytů není přímo závislá na sIgA<sup>+</sup> B lymfocytech. CD19<sup>+</sup> molekuly se více exprimovaly na povrchu buněk u léčených pacientů, protože došlo nejspíše k zablokování buněčného zrání v období kultivace. Lze tedy říci, že kortikosteroidy díky svému pleiotropnímu efektu jsou schopny tlumit jiné vedlejší příznaky nemoci než je právě exprese Gd-IgA1 B lymfocytů.

Výsledkem inhibičních reakcí bylo zjištění, že oba inhibitory mají do jisté míry vliv na expresi CD19<sup>+</sup> i sIgA<sup>+</sup> B lymfocytů ovšem, co bylo podstatné, tak Stattic nezpůsobil inhibici již CD19<sup>+</sup> buněk, ale inhiboval až expresi sIgA<sup>+</sup> buněk z CD19<sup>+</sup> lymfocytů, což se projevilo naprostým snížením procentuálního zastoupení Gd-IgA1 B lymfocytů, že jej nebylo možné změřit, a proto se nabízí otázka, zda při diferenciaci Gd-IgA1 B lymfocytů nedochází častěji k aktivaci JAK1/2 signální dráhy, protože inhibitor AZD 1480 bylo možné analyzovat ve všech zkoumaných populacích B lymfocytů. Problematika studia Gd-IgA1 diferenciaci a exprese na buněčné úrovni je uplně nové téma, které by mělo být potenciálním předmětem dalšího zkoumání.

## 7 SEZNAM LITERATURY

- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed). Garland Science.
- Alinikula, J., & Lassila, O. (2011). Gene Interaction Network Regulates Plasma Cell Differentiation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(6), 512-519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02556.x>
- Allen, A. C., Bailey, E. M., Brenchley, P. E. C., 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. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.060003969.x>
- Allen, C. D. C., Okada, T., & Cyster, J. G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*, 27(2), 190-202. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009>
- Allman, D., Li, J., & Hardy, R. R. (1999). Commitment to the B Lymphoid Lineage Occurs before DH-JH Recombination. *Journal of Experimental Medicine*, 189(4), 735-740. <https://doi.org/10.1084/jem.189.4.735>
- Anti-Human Antibodies for COVID-19 (SARS-CoV-2) Immunoglobulin Detection Research. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/immunology-research/anti-human-antibodies-covid-19-sars-cov-2-immunoglobulin-detection> (24. 4. 2022)
- Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S. -J., Saeki, Y., Kitamura, Y., & Hirano, T. (2002). A Point Mutation of Tyr-759 in Interleukin 6 Family Cytokine Receptor Subunit gp130 Causes Autoimmune Arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 196(7), 979-990. <https://doi.org/10.1084/jem.20020619>
- B Lymphocytes and Humoral Immunity. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/b-lymphocytes-and-humoral-immunity/>. (22. 4. 2022)
- Barratt, J., & Feehally, J. (2005). IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), 2088-2097. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005020134>
- Batista, F. D., & Harwood, N. E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 9(1), 15-27. <https://doi.org/10.1038/nri2454>
- Batten, M., Groom, J., Cachero, T. G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J. L., & Mackay, F. (2000). Baff Mediates Survival of Peripheral Immature B Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 192(10), 1453-1466. <https://doi.org/10.1084/jem.192.10.1453>
- Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B. W., & de Messias-Reason, I. J. A. ©. (2015). The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic Heart Disease. *Frontiers in Pediatrics*, 2. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00148>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235-238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Berthelot, L., Papista, C., Maciel, T. T., Biarnes-Pelicot, M., Tissandie, E., Wang, P. H. M., Tamouza, H., Jamin, A., Bex-Coudrat, J., Gestin, A., Boumediene, A., Arcos-Fajardo, M., England, P., Pillebout, E., Walker, F., Daugas, E., Vrtosvnik, F., Flamant, M., Benhamou, M., et al. (2012). Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), 793-806. <https://doi.org/10.1084/jem.20112005>
- Berthoux, F., Suzuki, H., Thibaudin, L., Yanagawa, H., Maillard, N., Mariat, C., Tomino, Y., Julian, B. A., & Novak, J. (2012). Autoantibodies Targeting Galactose-Deficient IgA1 Associate with Progression of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(9), 1579-1587. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012010053>
- Bishop, G. A., & Hostager, B. S. (2001). Signaling by CD40 and its Mimics in B Cell Activation. *Immunologic Research*, 24(2), 097-110. <https://doi.org/10.1385/IR:24:2:097>

- Bossen, C., & Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Seminars in Immunology*, 18(5), 263-275. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.04.006>
- Brandtzaeg, P. (2013). Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00222>
- Breedveld, A., & van Egmond, M. (2019). IgA and Fc $\alpha$ RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>
- Coletta, I., Soldo, L., Polentarutti, N., Mancini, F., Guglielmotti, A., Pinza, M., Mantovani, A., & Milanese, C. (2000). Selective Induction of MCP-1 in Human Mesangial Cells by the IL-6/sIL-6R Complex. *Nephron Experimental Nephrology*, 8(1), 37-43. <https://doi.org/10.1159/000059327>
- Conley, M. E., Delacroix, D. L. (1987). Intravascular and Mucosal Immunoglobulin A: Two Separate but Related Systems of Immune Defense?. *Annals of Internal Medicine*, 106(6). <https://doi.org/10.7326/0003-4819-106-6-892>
- Costa-Pereira, A. P. (2014). Regulation of IL-6-type cytokine responses by MAPKs. *Biochemical Society Transactions*, 42(1), 59-62. <https://doi.org/10.1042/BST20130267>
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>FH</sub>). *Annual Review of Immunology*, 29(1), 621-663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
- Cuss, A. K., Avery, D. T., Cannons, J. L., Yu, L. J., Nichols, K. E., Shaw, P. J., & Tangye, S. G. (2006). Expansion of Functionally Immature Transitional B Cells Is Associated with Human-Immunodeficient States Characterized by Impaired Humoral Immunity. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1506-1516. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1506>
- Daha, M. R., & van Kooten, C. (2013). Deposition of IgA in primary IgA nephropathy: it takes at least four to tango\*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(4), 794-797. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs445>
- Dominitzki, S., Fantini, M. C., Neufert, C., Nikolaev, A., Galle, P. R., Scheller, J., Monteleone, G., Rose-John, S., Neurath, M. F., & Becker, C. (2007). Cutting Edge: Trans-Signaling via the Soluble IL-6R Abrogates the Induction of FoxP3 in Naive CD4 CD25<sup>-</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2041-2045. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2041>
- Dorner, A. J., Goldman, S. J., & Keith, J. C. (1997). Interleukin-11. *BioDrugs*, 8(6), 418-429. <https://doi.org/10.2165/00063030-199708060-00002>
- Ebihara, N., Matsuda, A., Nakamura, S., Matsuda, H., & Murakami, A. (2011). Role of the IL-6 Classic- and Trans-Signaling Pathways in Corneal Sterile Inflammation and Wound Healing. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(12). <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7956>
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25<sup>-</sup> T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, 172, 5149-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5149>
- Feghali, C. A., & Wright T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, 2(4), 12-26. <https://doi.org/10.2741/A171>
- Ferenčík, M. (2005). *Imunitní systém: informace pro každého* (Vyd. 1. české). Grada.
- Ferrer, G., Bosch, R., Hodgson, K., Tejero, R., Roué, G., Colomer, D., Montserrat, E., & Moreno, C. (2014). B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *British Journal of Haematology*, 164(4), 570-578. <https://doi.org/10.1111/bjh.12645>
- Fujimoto, M., Nakano, M., Terabe, F., Kawahata, H., Ohkawara, T., Han, Y., Ripley, B., Serada, S., Nishikawa, T., Kimura, A., Nomura, S., Kishimoto, T., & Naka, T. (2010). The Influence of Excessive IL-6 Production In Vivo on the Development and Function of Foxp3 Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 186(1), 32-40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903314>
- Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., & Hirano, T. (1996). Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130: Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis. *Immunity*, 5(5), 449-460. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80501-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80501-4)



- Fulcher, D. A., & Basten, A. (1997). B cell life span: A review. *Immunology and Cell Biology*, 75(5), 446-455. <https://doi.org/10.1038/icb.1997.69>
- Fu, L., Lin-Lee, Y. -C., Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., & Ford, R. J. (2009). BAFF-R promotes cell proliferation and survival through interaction with IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B/c-Rel in the nucleus of normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Blood*, 113(19), 4627-4636. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-183467>
- Gaber, L. W., Khan, F. N., Graviss, E. A., Nguyen, D. T., Moore, L. W., Truong, L. D., Barrios, R. J., & Suki, W. N. (2020). Prevalence, Characteristics, and Outcomes of Incidental IgA Glomerular Deposits in Donor Kidneys. *Kidney International Reports*, 5(11), 1914-1924. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.08.018>
- Gale, D. P., Molyneux, K., Wimbury, D., Higgins, P., Levine, A. P., Caplin, B., Ferlin, A., Yin, P., Nelson, C. P., Stanescu, H., Samani, N. J., Kleta, R., Yu, X., & Barratt, J. (2017). Galactosylation of IgA1 Is Associated with Common Variation in C1GALT1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(7), 2158-2166. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016091043>
- Gomez-Guerrero, C., Lopez-Armada, M.J., Gonzalez, E., & Egido, J. (1994). Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol*, 153, 5247-55.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassègue, B., & Ushio-Fukai, M. (2000). Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), 2175-2183. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.10.2175>
- Grossetête, B., Launay, P., Lehuen, A., Jungers, P., Bach, J. -F., & Monteiro, R. C. (1998). Down-regulation of Fc $\alpha$  receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: Evidence for a negative regulatory role of serum IgA. *Kidney International*, 53(5), 1321-1335. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00885.x>
- Harcourt, B. E., Forbes, J. M., & Matthews, V. B. (2012). Obesity-induced renal impairment is exacerbated in interleukin-6-knockout mice. *Nephrology*, 17(3), 257-262. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2011.01547.x>
- Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., & Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, 91(3), 7-11. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)03144-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)03144-2)
- Hayashi, E. A., Granato, A., Paiva, L. S., Bertho, Á. L., Bellio, M., & Nobrega, A. (2010). TLR4 Promotes B Cell Maturation: Independence and Cooperation with B Lymphocyte-Activating Factor. *The Journal of Immunology*, 184(9), 4662-4672. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903253>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1), 1-20. <https://doi.org/10.1042/bj20030407>
- Hiemstra, P. S., Gorter, A., Stuurman, M. E., Van Es, L. A., & Daha, M. R. (1987). Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *European Journal of Immunology*, 17(3), 321-326. <https://doi.org/10.1002/eji.1830170304>
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S. -ichiro, Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., & Kishimoto, T. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(6092), 73-76. <https://doi.org/10.1038/324073a0>
- Hirano, T. (2009). Interleukin 6 and its Receptor: Ten Years Later. *International Reviews of Immunology*, 16(3-4), 249-284. <https://doi.org/10.3109/08830189809042997>
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., & Špišek, R. (2017). *Základy imunologie* (6., aktualizované vydání). Stanislav Juhaňák - Triton.
- Hu, S., Tamada, K., Ni, J., Vincenz, C., & Chen, L. (1999). Characterization of TNFRSF19, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. *Genomics*, 62(1), 103-107. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5979>

- Huang, Z., Wen, Q., Zhou, S. -F., & Yu, X. -Q. (2008). Differential chemokine expression in tubular cells in response to urinary proteins from patients with nephrotic syndrome. *Cytokine*, 42(2), 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.02.005>
- Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. (2006). The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 610-621. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052723>
- Chen, W. J., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. -jian, Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4 CD25<sup>-</sup> Naive T Cells to CD4 CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875-1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., & Karolina Palucka, A. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunology*, 1(6), 510-514. <https://doi.org/10.1038/82763>
- Chodorowska G, Glowacka A, Tomczyk M. (2004) Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med*, 59:189–93.
- Chung, J. B., Silverman, M., & Monroe, J. G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in Immunology*, 24(6), 342-348. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00119-4)
- Ishiko, S., Horinouchi, T., Fujimaru, R., Shima, Y., Kaito, H., Tanaka, R., Ishimori, S., Kondo, A., Nagai, S., Aoto, Y., Sakakibara, N., Nagano, C., Yamamura, T., Yoshimura, M., Nakanishi, K., Fujimura, J., Kamiyoshi, N., Nagase, H., Yoshikawa, N., et al. (2020). Glomerular galactose-deficient IgA1 expression analysis in pediatric patients with glomerular diseases. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71101-y>
- Iwasaki, H., Zhang, Y., Tachibana, K., Gotoh, M., Kikuchi, N., Kwon, Y. -D., Togayachi, A., Kudo, T., Kubota, T., & Narimatsu, H. (2003). Initiation of O-Glycan Synthesis in IgA1 Hinge Region Is Determined by a Single Enzyme, UDP-N-Acetyl- $\alpha$ -d-galactosamine: PolypeptideN-Acetylgalactosaminyltransferase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5613-5621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211097200>
- Jennette, J. C. (1988). The Immunohistology of IgA Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*, 12(5), 348-352. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(88\)80022-2](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(88)80022-2)
- Ji, M., Lu, Y., Zhao, C., Gao, W., He, F., Zhang, J., Zhao, D., Qiu, W., Wang, Y., & Nakano, H. (2016). C5a Induces the Synthesis of IL-6 and TNF- $\alpha$  in Rat Glomerular Mesangial Cells through MAPK Signaling Pathways. *PLOS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161867>
- Kamimura, D., Ishihara, K., & Hirano, T. (2004). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1-38. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0012-2>
- Kaplanski, G. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in Immunology*, 24(1), 25-29. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)00013-3)
- Kataoka, H., Ohara, M., Honda, K., Mochizuki, T., & Nitta, K. (2011). Maximal glomerular diameter as a 10-year prognostic indicator for IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(12), 3937-3943. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr139>
- Kielar, M. L., John, R., Bennett, M., Richardson, J. A., Shelton, J. M., Chen, L., Jeyarajah, D. R., Zhou, X. J., Zhou, H., Chiquett, B., Nagami, G. T., & Lu, C. Y. (2005). Maladaptive Role of IL-6 in Ischemic Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(11), 3315-3325. <https://doi.org/10.1681/ASN.2003090757>
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2011). Th17 cells in inflammation. *International Immunopharmacology*, 11(3), 319-322. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.10.004>
- Knoppova, B., Reily, C., Maillard, N., Rizk, D. V., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Raska, M., Renfrow, M. B., Julian, B. A., & Novak, J. (2016). The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00117>
- 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. <https://doi.org/10.1681/ASN.V9112048>
- Krangel, M. S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nature Immunology*, 4(7), 624-630. <https://doi.org/10.1038/ni0703-624>
- Krishnaraju, K., Hoffman, B., & Liebermann, D. A. (1998). The Zinc Finger Transcription Factor Egr-1 Activates Macrophage Differentiation in M1 Myeloblastic Leukemia Cells. *Blood*, 92(6), 1957-1966. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.6.1957>
- Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 149-159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>
- Lai, K. N., Leung, J. C. K., Chan, L. Y. Y., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Tam, K. Y., Xiao, J., Lai, F. M., & Tang, S. C. W. (2009). Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(1), 62-72. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn441>
- Lamas, J. R., Rodríguez-Rodríguez, L., Tornero-Esteban, P., Villafuertes, E., Hoyas, J., Abasolo, L., Varadé, J., Álvarez-Lafuente, R., Urcelay, E., & Fernández-Gutiérrez, B. (2013). Alternative splicing and proteolytic rupture contribute to the generation of soluble IL-6 receptors (sIL-6R) in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 61(3), 720-723. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.025>
- Lamm, M. E., Emancipator, S. N., Robinson, J. K., Yamashita, M., Fujioka, H., Qiu, J., & Plaut, A. G. (2008). Microbial IgA Protease Removes IgA Immune Complexes from Mouse Glomeruli In Vivo: Potential Therapy for IgA Nephropathy. *The American Journal of Pathology*, 172(1), 31-36. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070131>
- Lau, K. K., Wyatt, R. J., Moldoveanu, Z., Tomana, M., Julian, B. A., Hogg, R. J., Lee, J. Y., Huang, W. -Q., Mestecky, J., & Novak, J. (2007). Serum levels of galactose-deficient IgA in children with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura. *Pediatric Nephrology*, 22(12), 2067-2072. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0623-y>
- Launay, P., Grossetête, B., Arcos-Fajardo, M., Gaudin, E., Torres, S. P., Beaudoin, L., Patey-Mariaud de Serre, N., Lehuen, A., & Monteiro, R. C. (2000). Fcα Receptor (Cd89) Mediates the Development of Immunoglobulin a (Iga) Nephropathy (Berger's Disease). *Journal of Experimental Medicine*, 191(11), 1999-2010. <https://doi.org/10.1084/jem.191.11.1999>
- Lechner, S. M., Papista, C., Chemouny, J. M., Berthelot, L., & Monteiro, R. C. (2016). Role of IgA receptors in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Journal of Nephrology*, 29(1), 5-11. <https://doi.org/10.1007/s40620-015-0246-5>
- Li, H., Rokavec, M., & Hermeking, H. (2015). Soluble IL6R represents a miR-34a target: potential implications for the recently identified IL-6R/STAT3/miR-34a feed-back loop. *Oncotarget*, 6(16), 14026-14032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4334>
- Lied, G. A., & Berstad, A. (2011). Functional and Clinical Aspects of the B-Cell-Activating Factor (BAFF): A Narrative Review. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02470.x>
- Lin, X., Ding, J., Zhu, L., Shi, S., Jiang, L., Zhao, M., & Zhang, H. (2009). Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(11), 3372-3375. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp294>
- Lin-Lee, Y. -C., Pham, L. V., Tamayo, A. T., Fu, L., Zhou, H. -J., Yoshimura, L. C., Decker, G. L., & Ford, R. J. (2006). Nuclear Localization in the Biology of the CD40 Receptor in Normal and Neoplastic Human B Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18878-18887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513315200>
- Lust, J. A., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A., & Maihle, N. J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*, 4(2), 96-100. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90043-Q](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90043-Q)
- Mackay, F., & Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology*, 9(7), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nri2572>
- Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., & Browning, J. L. (1999). Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along

- with Autoimmune Manifestations. *Journal of Experimental Medicine*, 190(11), 1697-1710. <https://doi.org/10.1084/jem.190.11.1697>
- MacLennan, I. C. M., Toellner, K. -M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M. -Y., Zúñiga, E., Cook, M. C., & Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews*, 194(1), 8-18. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00058.x>
- 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. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014101000>
- Malchow, S., Thaiss, W., Jänner, N., Waetzig, G. H., Gewiese-Rabsch, J., Garbers, C., Yamamoto, K., Rose-John, S., & Scheller, J. (2011). Essential role of neutrophil mobilization in concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(3), 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.009>
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., & Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231-234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
- Manser, T. (2004). Textbook Germinal Centers?. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3369-3375. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3369>
- Matsumoto, T., Hess, S., Kajiyama, H., Sakairi, T., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Nojima, Y., & Kopp, J. B. (2010). Proteomic analysis identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 as a podocyte product. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 299(4), F776-F784. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00597.2009>
- McCarthy, D. D., Kujawa, J., Wilson, C., Papandile, A., Poreci, U., Porfilio, E. A., Ward, L., Lawson, M. A. E., Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Pei, Y., Novak, L., Lee, J. Y., Julian, B. A., Novak, J., Ranger, A., Gommerman, J. L., & Browning, J. L. (2011). Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3991-4002. <https://doi.org/10.1172/JCI45563>
- McHeyzer-Williams, L. J., & McHeyzer-Williams, M. G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 487-513. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115732>
- Mestecky, J., Moro, I., Kerr, M. A., & Woof, J. M. (2005). Mucosal Immunoglobulins. *Mucosal Immunology*, 153-181. <https://doi.org/10.1016/B978-012491543-5/50013-9>
- Moldoveanu, Z., Wyatt, R. J., Lee, J. Y., Tomana, M., Julian, B. A., Mestecky, J., Huang, W. -Q., Anreddy, S. R., Hall, S., Hastings, M. C., Lau, K. K., Cook, W. J., & Novak, J. (2007). Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney International*, 71(11), 1148-1154. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002185>
- Molyneux, K., Wimbury, D., Pawluczyk, I., Muto, M., Bhachu, J., Mertens, P. R., Feehally, J., & Barratt, J. (2017). B1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney International*, 92(6), 1458-1468. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.05.002>
- Morton, H. C., & Brandtzaeg, P. (2001). CD89: The human myeloid IgA fc receptor. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 49(3), 217-229.
- Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Gdoura, A., Leroy, V., Sadaka, C., Mahlaoui, N., Lepelletier, Y., Vrtovsniak, F., Haddad, E., Benhamou, M., & Monteiro, R. C. (2005). Engagement of Transferrin Receptor by Polymeric IgA1: Evidence for a Positive Feedback Loop Involving Increased Receptor Expression and Mesangial Cell Proliferation in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(9), 2667-2676. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004111006>
- Moutabarrick, A., Nakanishi, I., & Ishibashi, M. (1994). Interleukin-6 and Interleukin-6 Receptor are Expressed by Cultured Glomerular Epithelial Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 40(2), 181-186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1994.tb03448.x>
- Mülberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C., & Rose-John, S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by

- shedding. *European Journal of Immunology*, 23(2), 473-480. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230226>
- Nagasawa, T. (2007). The Chemokine CXCL12 and Regulation of Hsc and B Lymphocyte Development in the Bone Marrow Niche. *Osteoimmunology*, 69-75. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72009-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72009-8_9)
- Nam, K. H., Joo, Y. S., Lee, C., Lee, S., Kim, J., Yun, H. -R., Park, J. T., Chang, T. I., Ryu, D. -R., Yoo, T. -H., Chin, H. J., Kang, S. -W., Jeong, H. J., Lim, B. J., & Han, S. H. (2020). Predictive value of mesangial C3 and C4d deposition in IgA nephropathy. *Clinical Immunology*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108331>
- Naradikian, M. S., Perate, A. R., & Cancro, M. P. (2015). BAFF receptors and ligands create independent homeostatic niches for B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 34, 126-129. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.005>
- Novak, J., Tomana, M., Kilian, M., Coward, L., Kulhavy, R., Barnes, S., & Mestecky, J. (2000). Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1. *Molecular Immunology*, 37(17), 1047-1056. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00019-0](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00019-0)
- Novak, J., Tomana, M., Brown, R., Hall, S., Novak, L., Julian, B. A., Wyatt, R. J., Mestecky, J., & Matousovic, K. (2005). IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney International*, 67(2), 504-513. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67107.x>
- Novak, J., Moldoveanu, Z., Renfrow, M. B., Yanagihara, T., Suzuki, H., Raska, M., Hall, S., Brown, R., Huang, W. -Q., Goepfert, A., Kilian, M., Poulsen, K., Tomana, M., Wyatt, R. J., Julian, B. A., & Mestecky, J. (2007). IgA Nephropathy and Henoch-Schoenlein Purpura Nephritis: Aberrant Glycosylation of IgA1, Formation of IgA1-Containing Immune Complexes, and Activation of Mesangial Cells. *IgA Nephropathy Today*, 134-138. <https://doi.org/10.1159/000102455>
- Novak, J., Julian, B. A., Tomana, M., & Mestecky, J. (2008). IgA Glycosylation and IgA Immune Complexes in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Seminars in Nephrology*, 28(1), 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.10.009>
- Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D., & Rubinstein, M. (1989). Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *Journal of Experimental Medicine*, 170(4), 1409-1414. <https://doi.org/10.1084/jem.170.4.1409>
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 160-171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Oberg, H. -H., Wesch, D., Grüssel, S., Rose-John, S., & Kabelitz, D. (2006). Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4 CD25- and CD25high regulatory T cells. *International Immunology*, 18(4), 555-563. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh396>
- Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., Itoh, M., Okano, H., Hibi, M., & Hirano, T. (2000). Dissection of Signaling Cascades through gp130 In Vivo. *Immunity*, 12(1), 95-105. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80162-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80162-4)
- O'Riordan, M., & Grosschedl, R. (1999). Coordinate Regulation of B Cell Differentiation by the Transcription Factors EBF and E2A, 21-31. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80078-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80078-3)
- Pakkanen, S. H., Kantele, J. M., Moldoveanu, Z., Hedges, S., Häkkinen, M., Mestecky, J., & Kantele, A. (2010). Expression of Homing Receptors on IgA1 and IgA2 Plasmablasts in Blood Reflects Differential Distribution of IgA1 and IgA2 in Various Body Fluids. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(3), 393-401. <https://doi.org/10.1128/CVI.00475-09>
- Pakkanen, S. H., Kantele, J. M., Moldoveanu, Z., Hedges, S., Häkkinen, M., Mestecky, J., & Kantele, A. (2010). Expression of Homing Receptors on IgA1 and IgA2 Plasmablasts in Blood Reflects Differential Distribution of IgA1 and IgA2 in Various Body Fluids. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(3), 393-401. <https://doi.org/10.1128/CVI.00475-09>
- Perše, M., & Večerić-Haler, Ž. (2019). The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246199>

- Peters M, Odenthal M, Schirmacher P, Blessing M, Fattori E, Ciliberto G, et al. Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice. *J Immunol* (1997) 159:1474–81.
- Peters, H. P. E., Waanders, F., Meijer, E., van den Brand, J., Steenbergen, E. J., van Goor, H., & Wetzels, J. F. M. (2011). High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(11), 3581-3588. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr135>
- Pfäfflin, A., Brodbeck, K., Heilig, C., Häring, H., Schleicher, E., & Weigert, C. (2006). Increased Glucose Uptake and Metabolism in Mesangial Cells Overexpressing Glucose Transporter 1 Increases Interleukin-6 and Vascular Endothelial Growth Factor Production: Role of AP-1 and HIF-1 $\alpha$ . *Cellular Physiology and Biochemistry*, 18(4-5), 199-210. <https://doi.org/10.1159/000097667>
- Počítací komora, Fuchs-Rosenthal. <https://bdl.cz/pocitaci-komora-fuchs-rosenthal/po%C4%8Di> (24. 4. 2022)
- Raska, M., Moldoveanu, Z., Suzuki, H., Brown, R., Kulhavy, R., Andrasi, J., Hall, S., Vu, H. L., Carlsson, F., Lindahl, G., Tomana, M., Julian, B. A., Wyatt, R. J., Mestecky, J., & Novak, J. (2007). Identification and Characterization of CMP-NeuAc: GalNAc-IgA1  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase in IgA1-producing Cells. *Journal of Molecular Biology*, 369(1), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.002>
- Rizk, D. V., Saha, M. K., Hall, S., Novak, L., Brown, R., Huang, Z. -Q., Fatima, H., Julian, B. A., & Novak, J. (2019). Glomerular Immunodeposits of Patients with IgA Nephropathy Are Enriched for IgG Autoantibodies Specific for Galactose-Deficient IgA1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(10), 2017-2026. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018111156>
- Rodrigues, J. C., Haas, M., & Reich, H. N. (2017). IgA Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(4), 677-686. <https://doi.org/10.2215/CJN.07420716>
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., & Mantovani, A. (1997). Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity*, 6(3), 315-325. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80334-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80334-9)
- Roos, A., Bouwman, L. H., van Gijlswijk-Janssen, D. J., Faber-Krol, M. C., Stahl, G. L., & Daha, M. R. (2001). Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *The Journal of Immunology*, 167(5), 2861-2868. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2861>
- Roos, A., Rastaldi, M. P., Calvaresi, N., Oortwijn, B. D., Schlagwein, N., van Gijlswijk-Janssen, D. J., Stahl, G. L., Matsushita, M., Fujita, T., van Kooten, C., & Daha, M. R. (2006). Glomerular Activation of the Lectin Pathway of Complement in IgA Nephropathy Is Associated with More Severe Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(6), 1724-1734. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005090923>
- Rose-John, S., & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal*, 300(2), 281-290. <https://doi.org/10.1042/bj3000281>
- Rose-John, S., Waetzig, G. H., Scheller, J., Grötzinger, J., & Seeger, D. (2007). The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(5), 613-624. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.5.613>
- Russell, M. W., & Mansa, B. (1989). Complement-Fixing Properties of Human IgA Antibodies Alternative Pathway Complement Activation by Plastic-Bound, But Not Specific Antigen-Bound, IgA. *Scandinavian Journal of Immunology*, 30(2), 175-183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1989.tb01199.x>
- Sanchez-Niño, M. -D., Bozic, M., Córdoba-Lanús, E., Valcheva, P., Gracia, O., Ibarz, M., Fernandez, E., Navarro-Gonzalez, J. F., Ortiz, A., & Valdivielso, J. M. (2012). Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 302(6), F647-F657. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00090.2011>

- Scheller, J., Grötzinger, J., & Rose-John, S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduction*, 6(4), 240-259. <https://doi.org/10.1002/sita.200600086>
- Scheller, J., & Rose-John, S. (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(4), 173-183. <https://doi.org/10.1007/s00430-006-0019-9>
- Schmitt, R., Ståhl, A., -lie, Olin, A. I., Kristoffersson, A. -C., Rebetz, J., Novak, J., Lindahl, G., & Karpman, D. (2014). The Combined Role of Galactose-Deficient IgA1 and Streptococcal IgA-Binding M Protein in Inducing IL-6 and C3 Secretion from Human Mesangial Cells: Implications for IgA Nephropathy. *The Journal of Immunology*, 193(1), 317-326. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302249>
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. -L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R. H., Browning, J. L., & Tschopp, J. (1999). BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth. *Journal of Experimental Medicine*, 189(11), 1747-1756. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1747>
- Schrader, L. I., Kinzenbaw, D. A., Johnson, A. W., Faraci, F. M., & Didion, S. P. (2007). IL-6 Deficiency Protects Against Angiotensin II-Induced Endothelial Dysfunction and Hypertrophy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(12), 2576-2581. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.153080>
- Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Dejana, E., & Mantovani, A. (1989). IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *Journal of Immunology*, 2(142), 142 (2) 549-553.
- Smith, A. C., de Wolff, J. F., Molyneux, K., Feehally, J., & Barratt, J. (2006). O-Glycosylation of Serum IgD in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(4), 1192-1199. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005101115>
- Song, L., & Schindler, C. (2004). IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 177(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.06.018>
- Stuchlova Horynova, M., Vrablikova, A., Stewart, T. J., Takahashi, K., Czernekova, L., Yamada, K., Suzuki, H., Julian, B. A., Renfrow, M. B., Novak, J., & Raska, M. (2015). N-Acetylgalactosaminide  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of galactose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(2), 234-238. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu308>
- Suzuki, H., Kiryluk, K., Novak, J., Moldoveanu, Z., Herr, A. B., Renfrow, M. B., Wyatt, R. J., Scolari, F., Mestecky, J., Gharavi, A. G., & Julian, B. A. (2011). The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(10), 1795-1803. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011050464>
- Suzuki, H., Raska, M., Yamada, K., Moldoveanu, Z., Julian, B. A., Wyatt, R. J., Tomino, Y., Gharavi, A. G., & Novak, J. (2014). Cytokines Alter IgA1 O-Glycosylation by Dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 5330-5339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.512277>
- Suzuki, H., Allegri, L., Suzuki, Y., Hall, S., Moldoveanu, Z., Wyatt, R. J., Novak, J., & Julian, B. A. (2016). Galactose-Deficient IgA1 as a Candidate Urinary Polypeptide Marker of IgA Nephropathy?. *Disease Markers*, 2016, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2016/7806438>
- Suzuki, H., Yasutake, J., Makita, Y., Tanbo, Y., Yamasaki, K., Sofue, T., Kano, T., & Suzuki, Y. (2018). IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis. *Kidney International*, 93(3), 700-705. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.10.019>
- Suzuki, H. (2019). Biomarkers for IgA nephropathy on the basis of multi-hit pathogenesis. *Clinical and Experimental Nephrology*, 23(1), 26-31. <https://doi.org/10.1007/s10157-018-1582-2>
- Tanaka, H., Matsumura, I., Nakajima, K., Daino, H., Sonoyama, J., Yoshida, H., Oritani, K., Machii, T., Yamamoto, M., Hirano, T., & Kanakura, Y. (2000). GATA-1 blocks IL-6-induced macrophage differentiation and apoptosis through the sustained expression of cyclin D1 and Bcl-2 in a murine myeloid cell line M1. *Blood*, 95(4), 1264-1273. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.4.1264.004k09> 1264 1273

- Tangye, S. G., Bryant, V. L., Cuss, A. K., & Good, K. L. (2006). BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Seminars in Immunology*, 18(5), 305-317. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.04.004>
- Tilg, H., Dinarello, C. A., & Mier, J. W. (1997). IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today*, 18(9), 428-432. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01103-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01103-1)
- Tomana, M., Novak, J., Julian, B. A., Matousovic, K., Konecny, K., & Mestecky, J. (1999). Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *Journal of Clinical Investigation*, 104(1), 73-81. <https://doi.org/10.1172/JCI5535>
- Tortajada, A., Gutierrez, E., Pickering, M. C., Praga Terente, M., & Medjeral-Thomas, N. (2019). The role of complement in IgA nephropathy. *Molecular Immunology*, 114, 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.07.017>
- Trimarchi, H., & Coppo, R. (2019). Podocytopathy in the mesangial proliferative immunoglobulin A nephropathy: new insights into the mechanisms of damage and progression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34(8), 1280-1285. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy413>
- Tsai, D. -Y., Hung, K. -H., Chang, C. -W., & Lin, K. -I. (2019). Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. *Journal of Biomedical Science*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0558-1>
- van Zandbergen, G., Westerhuis, R., Mohamad, N. K., van De Winkel, J. G., Daha, M. R., & van Kooten, C. (1999). Crosslinking of the human fc receptor for IgA (Fc $\alpha$ RI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(11), 5806-5812.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGF $\beta$  in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*, 24(2), 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- Vignesh, P., Rawat, A., Sharma, M., & Singh, S. (2017). Complement in autoimmune diseases. *Clinica Chimica Acta*, 465, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.017>
- Vujicic, B., Turk, T., Crncevic-Orlic, Z., orevic, G., & Racki, S. (2012). Diabetic Nephropathy. *Pathophysiology and Complications of Diabetes Mellitus*. <https://doi.org/10.5772/50115>
- Waddington, F., Naunton, M., & Thomas, J. (2014). Paracetamol and analgesic nephropathy: Are you kidneying me?. *International Medical Case Reports Journal*. <https://doi.org/10.2147/IMCRJ.S71471>
- Waldherr, R., Rambausek, M., Duncker, W. D., & Ritz, E. (1989). Frequency of Mesangial IgA Deposits in a Non-Selected Autopsy Series\*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 4(11), 943-946. <https://doi.org/10.1093/ndt/4.11.943>
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., & Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science*, 301(5638), 1374-1377. <https://doi.org/10.1126/science.1086907>
- Wassmann, S., Stumpf, M., Strehlow, K., Schmid, A., Schieffer, B., Böhm, M., & Nickenig, G. (2004). Interleukin-6 Induces Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction by Overexpression of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation Research*, 94(4), 534-541. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000115557.25127.8D>
- Wei, F., Chang, Y., & Wei, W. (2015). The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 76(2), 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.014>
- Wu, J., Wang, N., Wang, J., Xie, Y., Li, Y., Liang, T., Wang, J., Yin, Z., He, K., & Chen, X. (2010). Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(14), 1971-1978. <https://doi.org/10.1002/rcm.4601>
- Xing, C. -Y., Saleem, M. A., Coward, R. J., Ni, L., Witherden, I. R., & Mathieson, P. W. (2006). Direct effects of dexamethasone on human podocytes. *Kidney International*, 70(6), 1038-1045. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001655>
- Yamada, K., Huang, Z. -Q., Raska, M., Reily, C., Anderson, J. C., Suzuki, H., Ueda, H., Moldoveanu, Z., Kiryluk, K., Suzuki, Y., Wyatt, R. J., Tomino, Y., Gharavi, A. G., Weinmann, A., Julian, B. A., Willey, C. D., & Novak, J. (2017). Inhibition of STAT3 Signaling Reduces



- IgA1 Autoantigen Production in IgA Nephropathy. *Kidney International Reports*, 2(6), 1194-1207. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2017.07.002>
- Yanagawa, H., Suzuki, H., Suzuki, Y., Kiryluk, K., Gharavi, A. G., Matsuoka, K., Makita, Y., Julian, B. A., Novak, J., Tomino, Y., & Ahuja, S. K. (2014). A Panel of Serum Biomarkers Differentiates IgA Nephropathy from Other Renal Diseases. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098081>
- Yasutake, J., Suzuki, Y., Suzuki, H., Hiura, N., Yanagawa, H., Makita, Y., Kaneko, E., & Tomino, Y. (2015). Novel lectin-independent approach to detect galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(8), 1315-1321. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv221>
- Yeo, S. C., Cheung, C. K., & Barratt, J. (2018). New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Pediatric Nephrology*, 33(5), 763-777. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3699-z>
- Zachova, K., Jemelkova, J., Kosztyu, P., Ohyama, Y., Takahashi, K., Zadrazil, J., Orsag, J., Matousovic, K., Galuszkova, D., Petejova, N., Mestecky, J., & Raska, M. Galactose-Deficient IgA1 B cells in the Circulation of IgA Nephropathy Patients Carry Preferentially Lambda Light Chains and Mucosal Homing Receptors. *Journal of the American Society of Nephrology*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2021081086>
- Zhang, J., Li, Y., Shan, K., Wang, L., Qiu, W., Lu, Y., Zhao, D., Zhu, G., He, F., & Wang, Y. (2013). Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF- $\beta$ 1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBP $\beta$  acetylation. *The FASEB Journal*, 28(3), 1511-1525. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242693>
- Zhang, Y., Li, J., Zhang, Y. -M., Zhang, X. -M., & Tao, J. (2015). Effect of TACI Signaling on Humoral Immunity and Autoimmune Diseases. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2015/247426>
- Zhao, N., Hou, P., Lv, J., Moldoveanu, Z., Li, Y., Kiryluk, K., Gharavi, A. G., Novak, J., & Zhang, H. (2012). The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney International*, 82(7), 790-796. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.197>
- Zhou, L., Zhong, R., Hao, W., Wang, H., Fan, X., Zhang, L., & Mi, Q. (2009). Interleukin-10 and interferon- $\gamma$  up-regulate the expression of B-cell activating factor in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 87(1), 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.04.002>
- Zhuang, P. -Y., Wang, J. -D., Tang, Z. -H., Zhou, X. -P., Quan, Z. -W., Liu, Y. -B., & Shen, J. (2015). Higher proliferation of peritumoral endothelial cells to IL-6/sIL-6R than tumoral endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1763-2>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA4	anti-gangliosidová monoklonální protilátka
APRIL	ligand vyvolávající proliferaci buněk
ATR1	angiotensin II receptor 1
BAFF	aktivační faktor B lymfocytů
BAFF-R	receptor aktivačního faktoru B lymfocytů
BCMA	antigen pro zrání B lymfocytů
BCR	receptor B lymfocytů
BLyS	stimulátor B lymfocytů
C1Gal-T1	core 1 $\beta$ -1,3 galaktosyltransferasa
CIC	cirkulující imunitní komplexy
CLP	společný lymfoini progenitor
CSR	class-switch recombination
<i>CXCL12</i>	gen kódující chemokin 12
DMSO	dimethylsulfoxid
E2A	transkripční regulátor
EBF	early B cell factor
FDC	folikulární dendritická buňka
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
Gal	galaktosa
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GalNAcT	N-acetylgalaktosamin transferasa
Gd-IgA1	galaktosově-deficientní IgA1
gp130	glykoprotein 130
HSA	tepelně stabilní antigen
HSC	hematopoetické kmenové buňky
IgAN	IgA nefropatie
IL-6	interleukin 6
IL-6R	receptor interleukinu-6
ITAM	motiv aktivace na bázi imunoreceptoru tyrosinu
JAK	Janusova kinasa
LTB4	leukotrien B4
MASP	serinová proteasa asociovaná s MBL
MBL	manosu vázající lektin
MFI	mean fluorescence intensity
MGPN	membranoproliferativní glomerulonefritida

mIgA	monomerní IgA
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NeuNAc	kyselina sialová
NK	natural killers (přírození zabijáci)
KS	kortikosteroidy
PBS	fosfátový pufr
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
pIgA	polymerní IgA
pIgR	polymerní imunoglobulinový receptor
ROR	Retinoid-related Orphan Receptor
ROS	reaktivní forma kyslíku
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SC	sekreční složka
SHM	somatická hypermutace
SIgA	sekreční forma imunoglobulinu A
sIL-6R	rozpustná forma IL-6 receptoru
STAT	převodníky signálu a aktivátory transkripce
TACI	transmembránový aktivátor a CAML interaktor
Tfh	folikulární pomocné T lymfocyty
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor