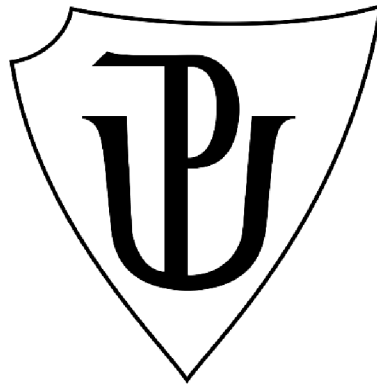


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Štúdium špecifických lymfocytárnych populácií ovplyvňujúcich produkciu galaktozyl-deficitného IgA u IgA nefropatie

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Alica Čutková
Študijný program:	N0512A130009 Biochémia
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok:	2023

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 18.4.2023

Pod'akovanie

Obrovská VĎAČNOST' patrí mojej školiteľke, Katke Zachovej. Pri vypracovávaní diplomovej práce som sa na ňu mohla kedykoľvek obrátiť, dávala mi cenné rady, odborne ma viedla, motivovala a podporovala. Veľa ma toho naučila a vďaka jej každodennému optimizmu som sa tešila na prácu v laboratóriu. Rovnako chcem veľmi poďakovať Ústavu imunológie LF UP za umožnenie vypracovania práce na ich pôde a pracovníkom ústavu, menovito Petrovi, Milade, Eliške a Kristýne. Niektorým za to, že mi venovali ich čas a naučili ma metódy použité v tejto práci a niektorým za to, že mi pomáhali orientovať sa na pracovisku, hľadať chemikálie či prestavovať centrifúgy. Poďakovať by som sa chcela ďalej Katedre biochémie, s ktorou som strávila päť rokov života a ktorá ma naučila mnohé z chemického, biologického, biotechnologického a vedeckého sveta. Zo srdiečka ďakujem aj mojim blízkym, rodine, priateľom, spolužiakom, ktorí ma neskutočne podporovali.

Spracovanie tejto práce bolo podporené grantom IGA_LF_2022_011.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Alica Čutková
Názov práce	Štúdium špecifických lymfocytárných populácií ovplyvňujúcich produkciu galaktozyl-deficitného IgA u IgA nefropatie
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Hlavnou témou diplomovej práce je IgA nefropatia a jej patogenéza, pričom pozornosť je sústredená na T lymfocyty ovplyvňujúce procesy v tomto ochorení. Ďalej je zameraná na ľahké reťazce imunoglobulínov a časť teoretického úvodu je venovaná aj opisu sortovania buniek. Metódami použitými v práci sú izolácia buniek z periférnej krvi človeka, sortovanie buniek, stanovenie množstva imunoglobulínov pomocou metódy ELISA a fluorescenčná mikroskopia. Porovnaná je produkcia IgA a Gd-IgA medzi skupinami buniek celkové lymfocyty, B lymfocyty a B lymfocyty s T pomocnými bunkami, pričom všetky skupiny buniek boli stimulované tromi biologicky aktívnymi molekulami: IL-6, IL-21 a CD40-L. Ako negatívna kontrola boli použité celkové lymfocyty nestimulované. Skupiny buniek sú zároveň porovnané medzi zdravými jedincami a IgA nefropatickými pacientami. Výsledkom tohto experimentu je, že k významnému zvyšovaniu produkcie IgA a Gd-IgA dochádzala len u skupiny buniek stimulované celkové lymfocyty a špecificky len u IgA nefropatických pacientov. Pozorne sledovaná skupina, u ktorej sa očakávalo možné zvýšenie produkcie imunoglobulínov, bola B lymfocyty s T pomocnými bunkami. Avšak k významnému zvýšeniu u nej nedošlo, a tým bolo identifikované, že na zvyšovanie produkcie IgA a Gd-IgA u IgA nefropatických pacientov nestačia len T pomocné bunky, ale sú potrebné ďalšie populácie buniek, ktoré sú obsiahnuté v populácii celkové lymfocyty. Ďalším výsledkom diplomovej práce je pozorovanie buniek pod fluorescenčným mikroskopom, ktoré exprimujú IgA, Gd-IgA, lambda ľahké reťazce a spojovacie

J-reťazce vytvárajúce polymérne štruktúry imunoglobulínov. Nad rámec cieľov tejto práce je uvedená produkcia a purifikácia rekombinantného proteínu CH1-HR-CH2, ktorá však vyžaduje optimalizáciu. CH1-HR-CH2 je fragment Gd-IgA, ktorý by v prípade úspešnej produkcie mohol byť použitý pre ďalšie analýzy v rámci štúdia IgA nefropatie.

Kľúčové slová	IgA nefropatia, T lymfocyty, galaktozyl-deficitný IgA, aktivácia B lymfocytov, interleukín 6, interleukín 21, ligand CD40, lambda ľahký reťazec, J-reťazec, sortovanie buniek, fluorescenčná mikroskopia
Počet strán	86
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Alica Čutková
Title	Study of specific lymphocyte populations influencing galactose-deficient IgA production in IgA nephropathy
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

The main topic of the diploma thesis is IgA nephropathy and its pathogenesis with attention focusing on T lymphocytes influencing the processes in this disease. Furthermore, it is focused on the light chains of immunoglobulins, and part of the theoretical introduction also concerns the description of cell sorting. The methods used in the thesis are the isolation of cells from human peripheral blood, the cell sorting, the determination of the amount of immunoglobulins using the ELISA method and fluorescence microscopy. The production of IgA and Gd-IgA between the cell groups of total lymphocytes, B lymphocytes and B lymphocytes with T helper cells were compared, where all of groups were stimulated by three biologically active molecules: IL-6, IL-21 and CD40-L. As a negative control, total lymphocytes that were not stimulated, were used. These cell groups are also compared between healthy controls and patients with IgA nephropathy. The result of this experiment is that only stimulated total lymphocytes specifically in patients with IgA nephropathy show a significant increase in the production of IgA and Gd-IgA. B lymphocytes with T helper cells were closely monitored for the production of immunoglobulins. However, there was no significant increase, which means that T helper cells alone are not sufficient to increase IgA and Gd-IgA production in patients with IgA nephropathy and additional cell populations that are part of the total lymphocytes population are required. Another result of the diploma thesis is the observation of cells using the fluorescence microscope that express IgA, Gd-IgA, lambda light chains and joining J-chains forming polymeric structures of

immunoglobulins. There is also a chapter about the production and purification of recombinant CH1-HR-CH2 protein, which is beyond the aims of this thesis. However, protocol optimization is required. CH1-HR-CH2 is a Gd-IgA fragment which, in case of successful production, could be used for further analyses in the study of IgA nephropathy.

Keywords	IgA nephropathy, T lymphocytes, galactosyl-deficient IgA, B lymphocyte activation, interleukin 6, interleukin 21, CD40 ligand, lambda light chain, J-chain, cell sorting, fluorescence microscopy
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	3
2.1 IgA nefropatia	3
2.1.1 Patogenéza.....	3
2.1.1.1 Galaktozyl-deficitný IgA1	4
2.1.1.2 Pôvod galaktozyl-deficitného IgA1	6
2.1.1.3 Protilátky proti galaktozyl-deficitnému IgA1	7
2.1.1.4 Návratnosť IgA nefropatie po transplantácii obličiek.....	7
2.1.1.5 Interleukíny v patogenéze IgA nefropatie.....	8
2.1.1.6 Ďalšie faktory ovplyvňujúce patogenézu IgA nefropatie.....	9
2.1.2 Genetika	9
2.1.3 Diagnóza, prognóza a liečba IgA nefropatie.....	10
2.2 T lymfocyty	11
2.2.1 T-bunkový receptor	12
2.2.2 Naivné, pamäťové a efektorové T lymfocyty	13
2.2.2 T lymfocytárne subpopulácie.....	14
2.2.2.1 Hlavné subpopulácie pomocných T lymfocytov	14
2.2.2.2 Ďalšie subpopulácie pomocných T lymfocytov	15
2.2.2.3 Regulačné T lymfocyty	16
2.2.3 Mechanizmus komunikácie medzi T a B lymfocytmi	16
2.2.4 Stimulácia B buniek bez pomocných T buniek.....	18
2.3 T lymfocyty zapojené v IgA nefropatii	18
2.3.1 Cytokíny ovplyvňujúce diferenciáciu T lymfocytov	19
2.3.2 Genetika spojená s T lymfocytmi v IgA nefropatii.....	19
2.3.3 T bunky ovplyvňujúce produkciu galaktozyl-deficitného IgA1	20
2.3.4 T lymfocyty ovplyvňujúce obličkové poškodenie v IgA nefropatii	21
2.4 Ľahké reťazce imunoglobulínov	22
2.4.1 Patologické formy ľahkých reťazcov imunoglobulínov	22

2.4.2 Ľahké reťazce imunoglobulínov v IgA nefropatii	23
2.5 Sortovanie buniek.....	24
2.5.1 Spôsoby sortovania buniek	24
2.5.1.1 Triedenie buniek aktivované fluorescenciou	25
2.5.2.1 Sortovanie buniek pomocou metódy „jet-in-air“	26
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Zoznam použitého biologického materiálu.....	28
3.1.2 Zoznam použitých protilátok a ďalších biologicky aktívnych molekúl.....	28
3.1.3 Zoznam použitých chemikálií	29
3.1.4 Zoznam použitých roztokov.....	31
3.1.5 Zoznam použitých pomôcok	34
3.1.6 Zoznam použitých prístrojov	35
3.1.7 Zoznam použitých vyhodnocovacích a štatistických programov	36
3.2 Metódy	36
3.2.1 Metódy smerujúce k detekcii populácií T lymfocytov prispievajúcich k produkcii Gd-IgA	36
3.2.1.1 Izolácia mononukleárnych buniek z periférnej krvi.....	36
3.2.1.2 Sortovanie vybraných populácií buniek a ich stimulácia pomocou IL-6, IL-21 a CD40-L.....	38
3.2.1.3 Stanovenie koncentrácie IgA pomocou metódy sendvičová ELISA	39
3.2.1.4 Stanovenie koncentrácie Gd-IgA pomocou metódy sendvičová ELISA....	41
3.2.2 Metódy analýzy ľahkých reťazcov Gd-IgA u IgA+ lymfocytov po stimulácii buniek IL-6.....	43
3.2.2.1 Izolácia buniek z periférnej krvi a ich stimulácia pomocou IL-6	44
3.2.2.2 Fixácia buniek na mikroskopických sklíčkach	44
3.2.2.3 Intracelulárne farbenie IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov	44
3.2.2.4 Povrchové farbenie Gd-IgA+, IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov...	45
3.2.2.5 Farbenie spojovacieho reťazca, Gd-IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov	46

3.2.3 Metódy produkcie a purifikácie proteínu CH1-HR-CH2 pri natívnych podmienkach	47
3.2.3.1 Namnoženie štartovacej bakteriálnej kultúry a indukcia produkcie proteínu CH1-HR-CH2	47
3.2.3.2 Homogenizácia bakteriálnej kultúry	49
3.2.3.3 Purifikácia proteínu CH1-HR-CH2.....	49
3.2.3.4 Príprava gélov pre SDS-PAGE	50
3.2.3.5 SDS-PAGE za účelom identifikácie proteínov v jednotlivých frakciách získaných purifikáciou	50
3.2.3.6 Farbenie gélu pomocou farbiva Coomassie Brilliant Blue	51
3.2.3.7 Western blot a identifikácia záujmového proteínu CH1-HR-CH2 na membráne	51
3.2.3.8 Zakoncentrovanie proteínu.....	52
3.2.3.9 Meranie koncentrácie celkových proteínov	52
3.2.3.10 Špecifické meranie koncentrácie proteínu pomocou SDS-PAGE	53
4 VÝSLEDKY	54
4.1 Výber cieľových bunkových populácií pre sortovanie	54
4.2 Detekcia populácií T lymfocytov prispievajúcich k produkcii Gd-IgA	56
4.2.1 Porovnanie produkcie IgA medzi vybranými skupinami buniek.....	56
4.2.2 Porovnanie produkcie Gd-IgA medzi vybranými skupinami buniek	58
4.3 Analýza ľahkých reťazcov Gd-IgA u IgA ⁺ lymfocytov po stimulácii IL-6 pomocou fluorescenčnej mikroskopie	60
4.3.1 Intracelulárne farbenie IgA ⁺ buniek a lambda ľahkých reťazcov	60
4.3.2 Povrchové farbenie Gd-IgA ⁺ , IgA ⁺ buniek a lambda ľahkých reťazcov.....	62
4.3.3 Pozorovanie spojovacieho reťazca, Gd-IgA ⁺ buniek a lambda ľahkých reťazcov	65
4.4 Vyhodnotenie produkcie a purifikácie proteínu CH1-HR-CH2 pri natívnych podmienkach	69
4.4.1 Detekcia proteínu CH1-HR-CH2.....	69
4.4.2 Čistota proteínu CH1-HR-CH2 hodnotená pomocou záznamu po SDS-PAGE	71

4.4.3 Meranie koncentrácie proteínu CH1-HR-CH2	71
5 DISKUSIA	74
6 ZÁVER	78
7 LITERATÚRA.....	79
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	83

CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

- Popis IgA nefropatie
- T-lymfocytárne subpopulácie
- T lymfocyty zapojené v IgA nefropatii
- Ľahké reťazce imunoglobulínov
- Princíp sortovania buniek

Praktická časť:

- Zoznámenie sa so sortovaním špecifických bunkových populácií pomocou sortera
- Optimalizácia sortovania buniek do rôznych formátov (tkanivový plast, mikroskopické sklíčka)
- Detekcia populácií T lymfocytov prispievajúcich k produkcii Gd-IgA
- Analýza ľahkých reťazcov Gd-IgA u sortovaných IgA lymfocytov po stimulácii IL-6 pomocou fluorescenčnej mikroskopie

1 ÚVOD

IgA nefropatia je celosvetovo najčastejšou formou primárnej glomerulonefritídy a hlavnou príčinou zlyhania obličiek u ľudí (Tang et al., 2020). Konečné štádium renálneho ochorenia sa rozvinie približne u 40 % pacientov do 20 rokov od diagnózy. (Sallustio et al., 2019). Okrem zlyhania obličiek sú ďalšími prejavmi ochorenia hematuria, proteinúria, hypertenzia či infekcia horných dýchacích ciest. Postihovať môže všetky vekové skupiny (Knoppova et al., 2016).

Kľúčovým procesom v patogenéze je nadmerná expresia molekúl imunoglobulínu A1 s nízkou galaktozyláciou (Tang et al., 2020). Na tieto galaktozyl-deficitné imunoglobulíny A1 sa viažu autoprotilátky za vzniku cirkulujúcich imunitných komplexov, ktoré sa ukladajú v glomeruloch obličiek. Dochádza tak k aktivácii mezangiálnych buniek a spusteniu neprimeranej imunitnej odpovede, čo poškodzuje tento orgán (Hassler, 2020).

S patogenézou úzko súvisia T lymfocyty. B lymfocyty sú zodpovedné za produkciu imunoglobulínov, pričom aktivácia produkcie je regulovaná T bunkami (Sallustio et al., 2019). Imunitná abnormalita T buniek sa prejavuje abnormálnou signalizáciou a zmenami v odpovedi B buniek (Tang et al., 2020).

IgA nefropatickí pacienti v porovnaní so zdravými jedincami majú v obehu niektoré populácie T pomocných buniek zastúpené viac, niektoré naopak menej. Zvýšené sú napríklad subpopulácie T pomocných lymfocytov Th2 a Th17. Interleukíny odvodené od týchto populácií, ako interleukín 4, 6 či 17, ovplyvňujú tvorbu a aktivitu enzýmov podieľajúcich sa na výstavbe sacharidového reťazca imunoglobulínu A, čím narúšajú jeho galaktozyláciu (Ruszkowski et al., 2019).

Znížený počet buniek v obehu vykazujú T pomocné lymfocyty Th1 a T regulačné lymfocyty. Th1 lymfocyty produkujú interferón γ , ktorý má pravdepodobne preventívne účinky proti progresii IgA nefropatie. T regulačné lymfocyty zas ochraňujú ľudský organizmus pred autoimunitnými reakciami (Ruszkowski et al., 2019).

Folikulárne pomocné T lymfocyty sa môžu tiež podieľať na zvýšenej syntéze imunoglobulínu A a jeho galaktozyl-deficitnej forme prostredníctvom interleukínu 21. Tento interleukín reguluje tvorbu enzýmu regulujúceho produkciu imunoglobulínu A (Ruszkowski et al., 2019). Na spustenie produkcie interleukínu 21 T pomocnými bunkami je potrebný interleukín 6 (Diehl et al., 2012). Interleukín 6 je zároveň v IgA nefropatii negatívnym

faktorom, ktorý zvyšuje produkciu imunoglobulínu A a galaktozyl-deficitného IgA (Groza et al., 2022).

Pre IgA nefropatiu je charakteristické, že v glomerulárnych depozitoch prevládajú ľahké reťazce lambda nad kappa (Ravipati et al., 2022). Rovnako je tomu v cirkulujúcich bunkách exprimujúcich galaktozyl-deficitný imunoglobulín A (Zachova et al., 2022). Táto prevaha nie je dobre pochopená, ale možno súvisí so zvýšenou afinitou k mezangiálnej depozícii (Ravipati et al., 2022).

IgA nefropatia je ochorenie, pre ktorú neexistuje špecifická terapia a neobjasnené sú mnohé procesy patogenézy (Hassler, 2020). Preto je dobré toto ochorenie ďalej študovať.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 IgA nefropatia

IgA nefropatia (IgAN) je autoimunitné ochorenie a najbežnejšia primárna glomerulonefritída na svete (Knoppova et al., 2016), ktorá bola prvýkrát opísaná Bergerom a Hinglaisom v roku 1968. Imunohistologicky je definovaná prítomnosťou glomerulárnych depozitov, ktoré sú sprevádzané rôznymi histopatologickými léziami (Donadio & Grande, 2002). Depozity sú tvorené imunoglobulínom A (IgA), ktorý je výlučne z podtriedy IgA1 (Ohyama et al., 2021), pričom v nich prevažuje aberantne glykozylovaná forma tohto imunoglobulínu (Reily et al., 2014). Okrem IgA je často prítomný aj komplementový proteín 3 (C3) s IgG, IgM alebo obidvoma imunoglobulínmi súčasne (Knoppova et al., 2016). Aj keď má IgAN zvyčajne benígny klinický priebeh, ku konečnému štádiu renálneho ochorenia nakoniec dochádza u 15–20 % pacientov v priebehu 10 rokov a u 30–40 % pacientov v priebehu 20–30 rokov po prvom klinickom prejave (Ruszkowski et al., 2019).

Klinické prejavy sa medzi deťmi a dospelými mierne líšia. U detí sa najčastejšie vyskytuje viditeľná hematuria, horúčky a infekcia horných dýchacích ciest. U dospelých je viditeľná hematuria menej častá, dokonca po 40 rokoch extrémne zriedkavá. Typickými prejavmi v dospelosti sú mikroskopická hematuria, proteinúria, hypertenzia a rôzne stupne chronického ochorenia obličiek (Knoppova et al., 2016).

IgAN sa môže vyskytovať v akomkoľvek veku, najviac je to však v druhej a tretej dekáde života. Postihuje 1–3 pacientov na 100 000 obyvateľov za rok, pričom prevláda u mužov v porovnaní so ženami (Infante et al., 2020). Pomer výskytu u mužov a žien sa pohybuje od 2:1 v Japonsku až po 6:1 v severnej Európe a Spojených štátoch. Belosi a Ázijci sú na IgA nefropatiu náchylnejší ako černosi zo Spojených štátov a z Južnej Afriky (Donadio & Grande, 2002).

2.1.1 Patogenéza

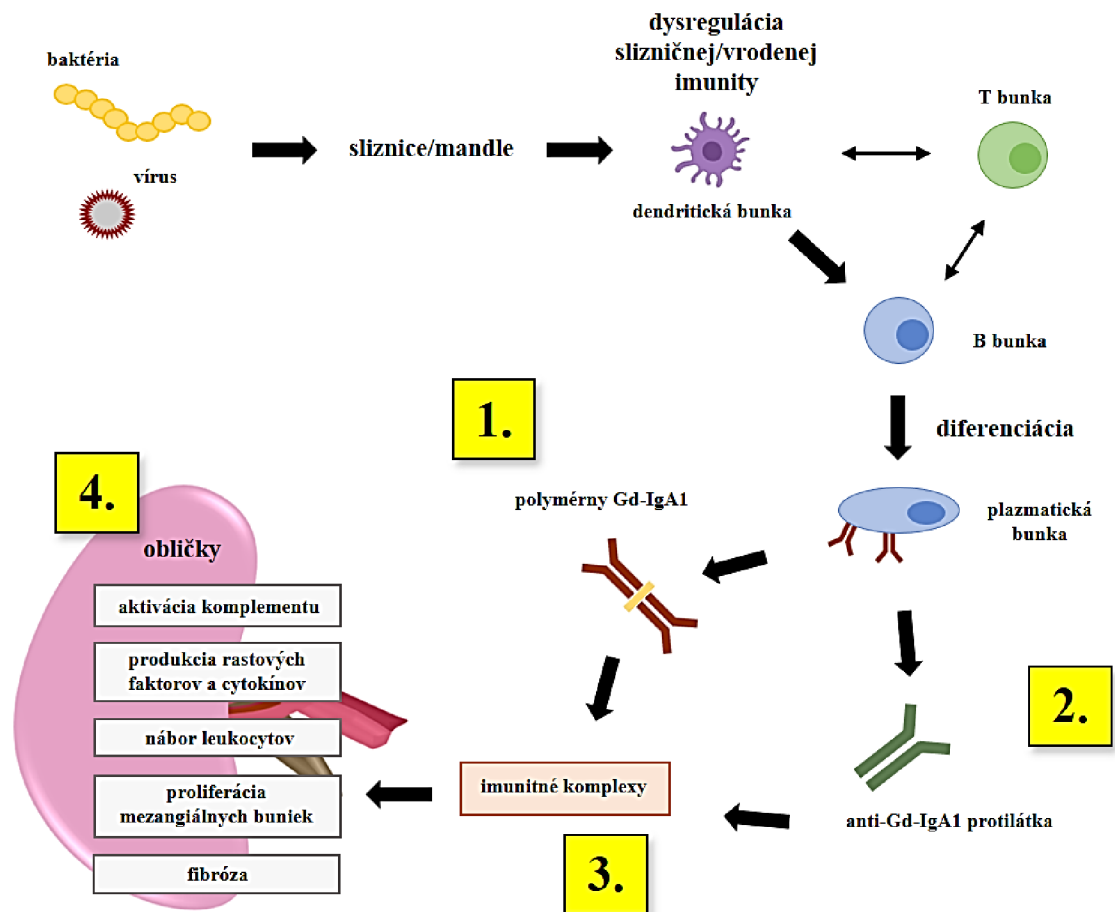
IgAN postihuje jedinca, ktorý je geneticky predisponovaný vytvárať atypický, galaktozyl-deficitný IgA1 (Gd-IgA1), a u ktorého sa potom objaví spúšťacie respiračné alebo gastrointestinálne ochorenie. Spúšťacie ochorenie vedie k produkcii antiglykánových protilátok IgG alebo IgA. Tie viažu Gd-IgA1 za vzniku komplexov,

ktoré cirkulujú v krvi a následne sa ukladajú v mezangiu obličiek, čo iniciuje obličkové poškodenie (Obr. 1) (Infante et al., 2020).

2.1.1.1 Galaktozyl-deficitný IgA1

Zatiaľ čo ľudský IgA v cirkulácii pochádza z B buniek v kostnej dreni a je zastúpený prevažne v monomérskej forme (Ohyama et al., 2021), IgA produkovaný na slizniciach je vo forme polymérnej a je ho niekoľkonásobne viac. Rozlišované sú dve podtriedy IgA. Sú nimi IgA1 a IgA2, pričom dominantný je IgA1 (de Sousa-Pereira a Woof, 2019).

Rozdiel medzi IgA1 a IgA2 je predovšetkým v pántovej oblasti (HR), ktorá leží medzi dvomi Fab ramenami a Fc oblasťou imunoglobulínu (Woof a Kerr, 2004). IgA1 má o 13 aminokyselín dlhšiu HR (Suzuki et al., 2011), pričom 9 z týchto aminokyselín sú



Obr. 1: Štyri procesy potrebné pre vyvolanie poškodenia obličiek a vyústenia v IgAN: 1. aberantná glykozylácia IgA1, 2. syntéza protilátok namierených proti Gd-IgA1, 3. viazanie Gd-IgA1 protilátkami proti glykánu za vzniku imunitných komplexov, 4. akumulácia týchto komplexov v glomerulárnom mezangiu a iniciácia poškodenia obličiek (upravené podľa Infante et al., 2020 a Suzuki, 2019).

seríny a treoníny (Knoppova et al., 2016). Na serín a treonín sú glykozidovou väzbou k atómu kyslíka pripojené relatívne krátke a jednoduché sacharidové reťazce, nazývané O-glykány (Suzuki et al., 2011). Počet O-glykánov môže byť 3 až 6, ale v krvi ľudí za fyziologických podmienok je ich najbežnejšie 4 až 5. IgA2 O-glykány nemá (Knoppova et al., 2016).

O-glykány IgA1 sú zvyčajne tvorené N-acetylgalaktózaminom (GalNAc) s β -1,3-viazanou galaktózou (Obr. 2). Jeden alebo obidva tieto sacharidy môžu byť sialylované. Galaktóza je s kyselinou sialovou viazaná cez väzbu α -2,3- a GalNAc cez α -2,6-. Zloženie O-glykánov na normálnom sérovom IgA1 je variabilné (Knoppova et al., 2016) a zahŕňajú rôzne formy (Obr. 2) (Suzuki et al., 2011). Prevládajúcou formou v obehu je disialylovaná forma disacharidu GalNAc-galaktóza (Obr. 2 VI.) (Knoppova et al., 2016).

Prvým procesom v patogenéze IgAN je prítomnosť Gd-IgA1 v obehu. Deficit galaktózy sa vyskytuje na niektorých O-glykánoch v HR (Obr. 2 I. a II.) (Ruszkowski et al., 2019). Pacienti s IgAN majú zvýšenú hladinu cirkulujúceho Gd-IgA1 (Suzuki et al., 2011) a aj sérová koncentrácia samotného IgA je signifikantne vyššia u pacientov s IgAN v porovnaní so zdravými jedincami a s pacientmi trpiacimi iným chronickým ochorením obličiek (Ruszkowski et al., 2019). Zvýšená hladina Gd-IgA1 v sére súvisí zrejme skôr so zníženým hepatálnym katabolizmom než so zvýšenou produkciou (Reily et al., 2014).

Aberantná O-glykozylácia v IgAN je spôsobená abnormalitami v expresii alebo aktivite glykozyltransferáz zapojených do sekvenčnej posttranslačnej modifikácie IgA1 (Suzuki et al., 2011). Prvou možnosťou zníženej rýchlosti galaktozylácie je predčasná sialylácia pomocou enzýmu ST6 N-acetylgalaktózaminid α -2,6-sialyltransferázy 2 (ST6GalNAc2, EC 2.4.3.3), ktorá zabraňuje pridaniu galaktózy k GalNAc. Druhým mechanizmom je nižšia aktivita core 1 β -1,3-galaktozyltransferázy (C1GalT1, EC 2.4.1.122). Stabilita C1GalT1 závisí od C1GalT1 špecifického chaperónu 1 (C1GalT1C1), predtým známeho aj ako COSMC. Bunky produkujúce Gd-IgA1 od pacientov s IgAN sú charakteristické zvýšenou expresiou ST6GalNAc2 a zníženou expresiou C1GalT1 a C1GalT1C1 (Ruszkowski et al., 2019).

Koncentrácia Gd-IgA1 môže byť meraná metódou ELISA, kde sa často využíva GalNAc-špecifický lektín, *Helix aspersa* aglutinín, Súčasťou tohto stanovenia je aj oštiepenie acetylneuraminyl hydrolázou (sialidáza, EC 3.2.1.18) na odstránenie koncovej kyseliny sialovej (Suzuki et al., 2011). Nedávno však bola zavedená nová metóda nezávislá od lektínu a využívajúca monoklonálnu protilátku KM55 na meranie sérových

hladín Gd-IgA1 (Suzuki, 2019). Rovnako protilátka 35A12 vyvinutú v štúdií Hiki et al. (2015) môže byť využívaná na meranie koncentrácie Gd-IgA.

2.1.1.2 Pôvod galaktozyl-deficitného IgA1

Pôvod Gd-IgA1 zatiaľ nie je jasný. Navrhnutých bolo niekoľko hypotéz, pričom podľa jednej z nich Gd-IgA1 pochádza z cirkulácie a ide o dôsledok zníženej galaktozylácie počas posttranslačnej modifikácie IgA1 (Ruszkowski et al., 2019). Existujú však argumenty, že by mohlo ísť o IgA1, ktorý je produkovaný slizničnými plazmatickými bunkami (Yeo et al., 2018).

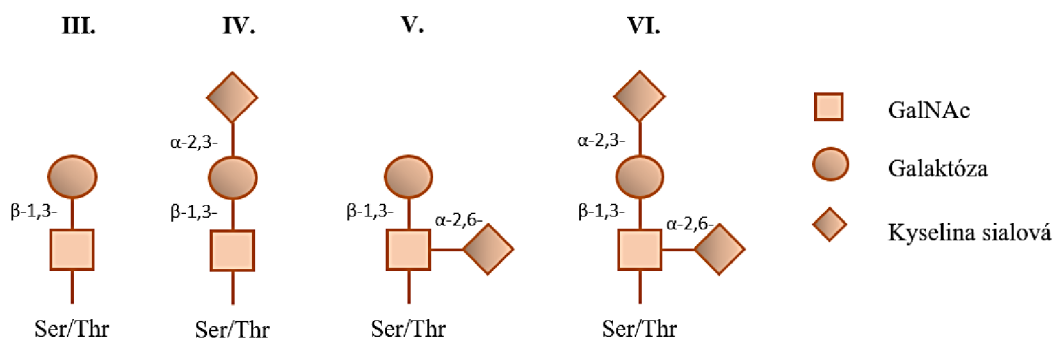
Niektorí autori uvádzajú, že nejde o IgA1 s deficitom galaktózy, ale o nesprávne nasmerovanú normálnu mukozálnu formu IgA1, ktorá je produkovaná do obehu. Ďalšia teória predpokladá, že patologická sekrécia IgA1 do obehu je výsledkom chybného prenosu počas dozrievania B buniek a že plazmatické bunky migrujú do kostnej drene namiesto toho, aby sa usadili na sliznici (Yeo et al., 2018).

V krvi je Gd-IgA1 na rozdiel od IgA1 predovšetkým v polymérnej forme a často je viazaný v cirkulujúcich imunitných komplexoch, čo možno interpretovať tak, že buď systémové bunky produkujúce IgA1 zmenili molekulárnu formu IgA1 z monomérskej na polymérnu, alebo že bunky produkujúce IgA1 na slizniciach migrovali na miesto

Glykány s deficitom galaktózy



Galaktozylované varianty O-glykánov



Obr. 2: Formy O-glykánov IgA1 a Gd-IgA1 (upravené podľa Suzuki et al., 2011).

v blízkosti systémového prietoku krvi (Reily et al., 2014). Glomerulárne depozity u IgAN pacientov obsahujú prevažne polymérny IgA1 (Ohyama et al., 2021).

2.1.1.3 Protilátky proti galaktozyl-deficitnému IgA1

Ďalším mechanizmom v patogenéze IgAN je produkcia IgG alebo IgA1 autoproti látok proti Gd-IgA1 (Maixnerova et al., 2016). Zmeny O-glykozylácie v HR IgA1 pravdepodobne vytvárajú konformačné zmeny, čo prispieva k expozícii epitopov pre anti-Gd-IgA1 autoproti látky (Ohyama et al., 2021). Gd-IgA1 môže byť týmto spôsobom rozpoznávaný ako autoantigén a imunitná odpoveď proti nemu môže viesť k produkcii anti-Gd-IgA1 proti látok. Avšak niektoré patogény, ako sú vírusy a grampozitívne baktérie, spojené s infekciami horných dýchacích ciest, majú na svojom povrchu štruktúry obsahujúce GalNAc, ktoré môžu napodobňovať GalNAc v pántovej oblasti Gd-IgA1. Infekcie tak môžu stimulovať produkciu proti látok s krížovou afinitou k Gd-IgA1, čo môže viesť k tvorbe patologických imunitných komplexov (Ruszkowski et al., 2019).

Z autoproti látok proti Gd-IgA1 prevládajú IgG autoproti látky a nachádzajú sa v glomerulárnych depozitoch všetkých pacientov s IgAN. IgG produkovaný IgG-bunkovými líniami od pacientov s IgAN je vysoko reaktívny s desialylovaným a degalaktozylovaným IgA1 a reaktivitu s Gd-IgA1 ovplyvňujú aj špecifické zmeny aminokyselinovej sekvencie v regióne určujúcej komplementaritu 3 (CDR3) vo variabilnej oblasti ťažkých reťazcov IgG (Ohyama et al., 2021).

U pacientov s IgAN sú sérové hladiny IgG a IgA autoproti látok proti Gd-IgA1 zvýšené v porovnaní s hladinami zdravých kontrol a pacientov s inými renálnymi ochoreniami (Suzuki, 2019).

2.1.1.4 Návratnosť IgA nefropatie po transplantácii obličiek

Transplantácia obličiek je jednou z terapeutických možností pre pacientov s IgAN. K recidíve ochorenia na transplantáte však môže dôjsť v 20-60 % prípadov. Mieru recidív ovplyvňuje imunosupresívny režim, pričom vysadenie steroidov je spojené so zvýšeným rizikom návratnosti (Berthelot et al., 2015).

Ukladanie IgA nemusí nevyhnutne súvisieť s poškodením glomerulov, pokiaľ nie je sprevádzané ukladaním komplementu. Imunitné komplexy pri IgAN aktivujú systém komplementu, o čom svedčí prítomnosť proteínu C3 v glomerulárnych imunodepozitoch

(Ohyama et al., 2021). Dvomi možnosťami aktivácie komplementu počas IgAN je alternatívna a lektínová dráha (Infante et al., 2020). Následne dochádza ku glomerulárnemu a renálnemu tubulárnemu poškodeniu (Ohyama et al., 2021). C3 je prítomný aj v cirkulujúcich imunitných komplexoch približne v 90 % prípadov s IgAN. Zapojenie komplementového systému teda možno pokladať za dôležitý kľúčový proces v recidíve IgAN po transplantácii (Infante et al., 2020).

V IgAN sa spoločne s cirkulujúcimi imunitnými komplexami ukladajú v obličkách aj serínové proteázy spojené s properdínom alebo lektínom viažucim manán (MBL). Ukladanie MBL sa vyskytuje v 20-25 % prípadov a je spojené so závažnejšou proteinúriou a zvýšeným poškodením obličiek. S agresívnejším primárnym ochorením a následným zvýšeným rizikom recidívy po transplantácii môžu byť spojené aj vysoké predtransplantačné sérové hladiny Gd-IgA1 a antiglykánových protilátok, ako aj nízke hladiny CD89, čo je uvoľnený IgA-receptor z povrchu leukocytov (Infante et al., 2020).

2.1.1.5 Interleukíny v patogenéze IgA nefropatie

Slizničné infekcie spojené s IgAN môžu vyvolávať produkciu viacerých cytokínov, vrátane prozápalového cytokínu, interleukínu (IL) 6. IL-6 je diferenciálny faktor plazmatických buniek a kanonický induktor produkcie IgA1, ktorý viaže komplex receptora IL-6 s glykoproteínom 130 a aktivuje dráhu JAK/STAT3, čo vedie k jadrovej translokácii STAT3. Počas akútneho zápalu je IL-6 produkovaný monocytmi, makrofágmi a endotelovými bunkami (Groza et al., 2022).

IL-6 sa podieľa na patogenéze IgAN (Zachova et al., 2022). U niektorých pacientov s IgAN je sérová hladina IL-6 zvýšená. Pokiaľ sú bunky produkujúce IgA1 od pacientov s IgAN vystavované IL-6, tak dochádza k predĺženiu a významnému zvýšeniu aktivácie STAT3 v porovnaní s bunkami od zdravých jedincov (Reily et al., 2014).

Signalizácia IL-6 zvyšuje produkciu IgA1 u zdravých jedincov a pacientov s IgAN. Aj produkcia Gd-IgA1 je IL-6 zvýšená, ale iba v bunkách od pacientov s IgAN (Reily et al., 2014). Zvýšená produkcia Gd-IgA1 prostredníctvom IL-6 nastáva v dôsledku dysregulácie expresie a aktivít špecifických cieľov, vrátane C1GalT1, C1GalT1C1 a ST6GalNAc2 (Ohyama et al., 2021). IL-6 zvyšuje aktivitu ST6GalNAc2 a u C1GalT1 ju naopak znižuje (Ruszkowski et al., 2019).

Dysregulácia expresie a aktivít C1GalT1 a ST6GalNAc2 je indukovaná aj IL-4 (Suzuki, 2019).

2.1.1.6 Ďalšie faktory ovplyvňujúce patogenézu IgA nefropatie

B-bunkový aktivačný faktor (BAFF) a ligand indukujúci proliferáciu (APRIL) sú proteíny superrodiny nádorových nekrotizujúcich faktorov a ich vysoká expresia sa podieľa na patogenéze IgAN (Infante et al., 2020).

APRIL sa podieľa na tvorbe plazmatických buniek produkujúcich IgA nezávisle od T buniek a tiež na prepínaní triedy IgA (Reily et al., 2014). V IgAN je nadmerne produkovaný B bunkami v zárodočných centrách mandlí (Ohyama et al., 2021). Sérové hladiny APRIL sú zvýšené u niektorých pacientov s IgAN (Reily et al., 2014). Toll-like receptor (TLR) 9 hrá kľúčovú úlohu v progresii IgAN (Suzuki, 2019). U myši náchylných na IgAN a v línii ľudských B buniek je expresia APRIL a IL-6 zvýšená aktiváciou TLR9 pomocou CpG-oligonukleotidov, čo vedie k zvýšenej produkcii Gd-IgA1 (Ohyama et al., 2021).

BAFF sprostredkúva ďalší mechanizmus prepínania triedy IgA nezávislý od T buniek (Ruszkowski et al., 2019). Nadmernou expresiou faktora BAFF u myši dochádza k autoimunitnému ochoreniu s glomerulárnymi depozitmi IgA závislými od komenzálnych mikrobiotík (Reily et al., 2014).

Slezinová tyrozínkináza je exprimovaná v niekoľkých typoch buniek, ale predovšetkým v B bunkách a myeloidných bunkách. Má úlohu v intracelulárnych kaskádach prenosu signálu po zapojení imunoreceptorov, vrátane B-bunkového receptoru a aktivačných Fc receptorov. Môže mať preto úlohu v patogenéze IgAN prostredníctvom svojej aktivity v B bunkách alebo plazmatických bunkách produkujúcich IgA a IgG a jej farmakologická inhibícia môže predstavovať spôsob liečby IgAN (Infante et al., 2020).

2.1.2 Genetika

Celogenómová asociačná štúdia identifikovala niekoľko lokusov, ktoré súvisia s IgAN. Tieto lokusy zahŕňajú gény kódujúce viaceré zložky imunitného systému vrátane génov dráhy komplementu, génov adaptívnej imunity s hlavným komplexom histokompatibility (MHC), génov vrodenej imunity, rastových faktorov a cytokínov (Reily et al., 2014).

Hlavný lokus na chromozóme 22q12.2 ovplyvňuje citlivosť na IgAN. Dva cytokínové gény na tomto lokuse, LIF a OSM, sú exprimované v B bunkách (Suzuki et al., 2011) a ovplyvňujú hladiny IgA v sére. LIF a OSM patria do rodiny cytokínov IL-6 a sú exprimované v slizničných tkanivách, kde majú imunoregulačné účinky. Ďalšie gény

ovplyvňujúce IgAN sú gény pre ľudský adefenzín a gény superrodiny tumor nekrotizujúceho faktora 13 (Reily et al., 2014).

Kľúčovú úlohu vo vývoji a progresii IgAN môže zohrávať komplementový faktor H a s ním súvisiace proteíny 1 a 3 (CFHR-1 a 3). CFHR-1 a 3 sú konkurentmi faktora H a môžu viesť k nekontrolovanej aktivácii komplementu. Delécia CFHR-1 a 3 má ochranný účinok v IgAN (Infante et al., 2020).

Zvýšená hladina Gd-IgA1 v obehú pacientov s IgAN je dedičná vlastnosť, avšak nepostačuje na rozvoj IgAN. V rodinách s dvomi alebo viacerými pacientmi s IgAN má takmer polovica prvostupňových príbuzných zvýšené hladiny Gd-IgA1. Väčšina z nich ale nevykazuje žiadne abnormality v moči (Reily et al., 2014).

2.1.3 Diagnóza, prognóza a liečba IgA nefropatie

Diagnóza IgAN sa stanovuje pomocou renálnej biopsie a následného imunofluorescenčného vyšetrenia kortikálneho obličkového tkaniva (Knoppova et al., 2016). Renálna biopsia je zlatým štandardom v diagnostike IgAN. Používaná je aj na hodnotenie aktivity ochorenia a prognózy u pacientov s IgAN. Má však svoje negatíva. Keď sa biopsia vykonáva počas skorých štádií IgAN, patologické nálezy môžu byť nedostatočné a môže byť ťažké stanoviť prognózu. Naopak, zlá prognóza IgAN môže byť čiastočne spôsobená oneskorenou diagnózou. Okrem toho, obličková biopsia sa často nevykonáva z dôvodu procesných rizík alebo obmedzení krytia zdravotným poistením. V západných krajinách sa renálna biopsia vykonáva u pacientov, ktorým sa rozvinie zvýšená proteinúria alebo zhoršená funkcia obličiek. Neodporúča sa u pacientov s izolovanou hematúriou alebo miernou proteinúriou (Suzuki, 2019).

Stupeň proteinúrie je dôležitým faktorom prognózy pri IgAN a iných obličkových ochoreniach. Je však ťažké kvalitatívne rozlíšiť proteinúriu v akútnej a chronickej fáze, a tak hodnotenie aktivity ochorenia na základe proteinúrie je obmedzené. Navyše u IgA nefropatických pacientov s miernou proteinúriou a miernymi histologickými léziami v čase renálnej biopsie, sa progresia proteinúrie pozoruje približne v 30-40 % prípadov. Z uvedených dôvodov je dôležité hľadať nové biomarkery na diagnostiku a hodnotenie aktivity ochorenia IgAN (Suzuki, 2019).

Nový špecifický marker pre IgAN môže predstavovať močový Gd-IgA1. Časť Gd-IgA1 z glomerulárnych depozitov sa vylučuje do moču a odlišuje tak pacientov s IgAN od pacientov s inými proteinurickými obličkovými chorobami (Suzuki, 2019).

Ďalším perspektívnym biomarkerom je sérová hladina autoprotilátok IgG proti Gd-IgA1. Tá je spojená s vyšším rizikom recidívy ochorenia. Taktiež sérové hladiny Gd-IgA1 a hladiny imunitných komplexov významne súvisia s hematúriou a proteinúriou a môžu predstavovať spôsoby na diagnostiku a hodnotenie aktivity ochorenia IgAN (Suzuki, 2019).

IgAN v súčasnosti nemá špecifickú liečbu (Hassler, 2020). Liečené môžu byť len klinické syndrómy, preto je liečba IgAN do značnej miery individualizovaná. Zameriava sa predovšetkým na zníženie proteinúrie, optimalizáciu krvného tlaku a zníženie zápalového stavu (Infante et al., 2020).

Udržiavanie primeraného krvného tlaku je realizované pomocou inhibítora angiotenzín konvertujúceho enzýmu, blokátorov receptora angiotenzínu alebo rybieho oleja (Hassler, 2020).

Na zachovanie funkcie obličiek a znižovanie proteinúrie sú využívané kortikosteroidy (Hassler, 2020), ale aj nesteroidné imunosupresíva, medzi ktoré patria napríklad cyklofosamid, azatioprin a cyklosporín (Ruszkowski et al., 2019).

2.2 T lymfocyty

T lymfocyty sú heterogénna populácia buniek podieľajúca sa na adaptívnej imunitnej odpovedi. Sú charakteristické prítomnosťou T-bunkového receptora a komplexu proteínov CD3 na bunkovom povrchu (Ruszkowski et al., 2019). Sú odvodené od lymfoidných prekursorov pochádzajúcich z kostnej drene. Dozrievajú v týmuse, pričom nadobúdajú fyziologické vlastnosti ako je špecifickosť rozpoznávania, pamäť z predchádzajúceho stretnutia s antigénom a absencia autoreaktivity. Sú teda zodpovedné za organizovanie vysoko špecifickej, dlhotrvajúcej imunitnej odpovede na patogény a prísny selekčným procesom prežívajú len tie T lymfocyty, ktoré dokážu efektívne rozpoznať infekčné nevlastné antigény a zároveň ktoré ignorujú alebo sú umlčané neinfekčnými vlastnými antigénmi. Väčšina T lymfocytov migruje a po kontakte s antigén prezentujúcou bunkou (APC) ďalej dozrieva v sekundárnych lymfoidných orgánoch ako slezina, lymfatické uzliny či slizničné lymfoidné tkanivo (Fabbri et al., 2003).

2.2.1 T-bunkový receptor

T-bunkový receptor (TCR) je membránový heterodimér, ktorý vzniká preskupovaním génov počas vývoja T lymfocytov v týmuse. Vďaka nemu T lymfocyty dokážu špecificky rozpoznávať jediný antigén po zvyšok ich životnosti. Aby cudzie antigény mohli byť pomocou TCR špecificky rozpoznávané, musia byť prezentované ako spracované peptidy na MHC, ktorý je exprimovaný na plazmatickej membráne APCs (Fabbri et al., 2003).

Väčšina ľudských T buniek má TCR zložený z jedného α - a jedného β -reťazca (Ruszkowski et al., 2019). Jedná sa o transmembránové reťazce, pričom ich N-terminálne časti sú variabilné a tvoria väzbové miesto pre antigén (Hořejší & Bartůňková, 2009). Bunky s týmto typom TCR sa nazývajú $\alpha\beta$ T bunky. Relatívne malá skupina ľudských T buniek exprimuje TCR zložený z γ a δ reťazcov. Táto skupina sa označuje ako $\gamma\delta$ T bunky (Ruszkowski et al., 2019).

TCR pre správnu funkciu vyžaduje asociovaný komplex niekoľkých proteínov, ktorý sa nazýva CD3 komplex, a je dôležitý pre prenos signálu (Hořejší & Bartůňková, 2009). Reťazce CD3 komplexu sú taktiež transmembránové proteíny, ktorých intracelulárne časti sú asociované s proteín-tyrozín kinázami rodiny Src (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Signalizácia TCR začína v momente, keď TCR zachytí relevantný komplex peptid-MHC (pMHC) (Courtney et al., 2018). Pri rozpoznávaní pMHC spolupracujú s TCR koreceptory T buniek CD4 a CD8 a zvyšujú účinnosť signalizácie (Alberts et al., 2002). Signalizáciu ďalej sprostredkujú reťazce proteínov CD3, δ , ϵ , γ a ζ , ktoré obsahujú imunoreceptorové tyrozínové aktivačné motívy (ITAM) (Gorentla & Zhong, 2012).

Po väzbe pMHC na TCR je signálny motív ITAM fosforylovaný tyrozínkinázou a je schopný aktivovať proteínkinázu 70 spojenú s reťazcom ζ , ktorá ďalej fosforyluje linker na aktiváciu T buniek so štyrmi hlavnými fosforylačnými miestami: Y132, Y171, Y191 a Y226. Fosfo-Y132 regrutuje fosfolipázu C gama 1 (PLC γ 1) a zabezpečuje tak aktiváciu vápnikovej dráhy a dráhy Ras-mitogénom aktivovanej proteínkinázy. Fosfo-Y171, fosfo-Y191 a fosfo-Y226 sú zodpovedné za nábor adaptérových proteínov, čo môže viesť k aktivácii ďalších molekúl a k rôznym efektorovým odpovediam. TCR a kostimulačná molekula CD28 aktivujú tiež fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K). PI3K fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za vzniku fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu, ktorý môže získavať proteíny do vnútornej vrstvy plazmatickej membrány (Courtney et al., 2018).

Aktivácia kinázových kaskád vedie nakoniec k bunkovému deleniu, k aktivácii efektorových mechanizmov T buniek a ďalším procesom (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Celý systém je následne uvádzaný do pôvodného stavu defosforyláciou fosforylovaných proteínov pôsobením enzýmov fosfatáz, ktoré hydrolyzujú fosfoestery hydroxyaminokyselín na fosfát a hydroxyaminokyseliny (Hořejší & Bartůňková, 2009).

2.2.2 Naivné, pamäťové a efektorové T lymfocyty

T lymfocyty, ktoré sa nikdy nestretli s antigénmi, sú označované ako naivné. Každá naivná T bunka rozpoznáva antigény, ktoré im predkladajú iné bunky, pomocou jedinečného prototypu antigénneho TCR. Na počiatočné zachytenie antigénu na periférii a jeho prezentáciu T bunkám v proximálnej lymfatickej uzline sú potrebné bunky vrodenej imunity, ako napríklad dendritické bunky, ktoré priamo rozpoznávajú obmedzený súbor molekulárnych vzorov asociovaných s patogénom. Pri prvom stretnutí naivnej T bunky a jej špecifického antigénu dochádza k zadržaniu bunky v lymfatickej uzline, kde podlieha intenzívnej proliferácii a získava ďalšie diferenciačné markery a rôzne funkčné schopnosti (Fabbri et al., 2003).

Naivné T bunky vyžadujú na aktiváciu aspoň dva signály. Oba sú poskytované APCs. Prvý signál poskytujú pMHCs viažuce sa na receptory T buniek. Druhý signál poskytujú hlavne kostimulačné proteíny B7 viažuce sa na CD28 na povrchu T buniek. Ak T bunka prijme iba prvý signál, je zvyčajne odstránená alebo inaktivovaná (Alberts et al., 2002).

T lymfocyty majú dlhú životnosť a môžu pretrvávajú roky ako pamäťové bunky (Fabbri et al., 2003). Pamäťové bunky sú zodpovedné za imunologickú pamäť, čo znamená, že po ďalšom stretnutí s rovnakým antigénom sú rýchlo aktivované a zahajujú sekundárnu odpoveď, ktorá je oveľa rýchlejšia a efektívnejšia ako odpoveď primárna (Hořejší a Bartůňková, 2009). Po rozpoznaní antigénu dochádza ku klonálnej amplifikácii antigénšpecifických T lymfocytov, ktoré nadobúdajú efektorové funkcie ako schopnosť zabíjať infikované bunky či produkovať rozpustné parakrinné faktory potrebné na spoluprácu medzi imunitnými bunkami (Fabbri et al., 2003).

Aby sa zabezpečila maximálna účinnosť a citlivosť pri rozpoznávaní a eliminácii antigénu, naivné bunky prednostne cirkulujú cez sekundárne lymfoidné orgány, zatiaľ čo pamäťové a efektorové bunky sú sústredené v periférnych tkanivách a do krvi znovu vstupujú cez aferentné lymfatické cievy (Fabbri et al., 2003).

2.2.2 T lymfocytárne subpopulácie

Podľa typu reťazcov v TCR sú rozlišované $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T lymfocyty. $\alpha\beta$ T bunky sú funkčne rozdelené na pomocné T (Th), cytotoxické T (Tc) a regulačné T (Treg) populácie. $\gamma\delta$ T bunky sa delia na dve podskupiny v závislosti od expresie génov V δ 1 alebo V δ 2 (Ruszkowski et al., 2019).

Týmus opúšťajú prekursori Th buniek s povrchovým receptorom CD4 (CD4+ T bunky) a prekursori Tc buniek s povrchovým receptom CD8 (CD8+ T bunky). Prekursori Th a Tc sa po stretnutí s antigénom diferencujú na zrelé efektorové bunky (Hořejší & Bartůňková, 2009).

T bunky exprimujúce CD4 majú centrálnu funkciu vo vytváraní, udržiavaní a regulácii humorálnej, ale aj bunkovej časti imunitnej odpovede. Organizujú celkovú imunitnú odpoveď prostredníctvom parakrinnej bunkovej signalizácie a môžu byť rozdelené na základe ich profilu expresie cytokínov a súvisiacich funkcií do dvoch hlavných podskupín, a to Th1 a Th2 (Fabbri et al., 2003). Sú však rozlišované aj ďalšie špecifické podskupiny zrelých Th buniek ako Th9, Th17, Th22 alebo Tfh (Ruszkowski et al., 2019).

Diferencované CD8+ T bunky sú označované ako cytotoxické, pretože sa u nich vyvinula skupina cytolytických proteínov, ktoré im umožňujú zabíjať bunky infikované patogénom pomocou aktivácie apoptózy (Fabbri et al., 2003).

CD4 a CD8 sú vzájomne vylučujúce sa membránové molekuly a sú definované ako koreceptory, pretože vymedzujú typ komplexu MHC rozpoznávaného pomocou TCR. CD4+ T bunky rozpoznávajú iba molekuly MHC triedy II, CD8+ T bunky molekuly MHC triedy I (Fabbri et al., 2003).

2.2.2.1 Hlavné subpopulácie pomocných T lymfocytov

Th1 a Th2 lymfocyty sú dve najhlavnejšie a najznámejšie subpopulácie pomocných T buniek (Ruszkowski et al., 2019).

Th1 lymfocyty sa primárne podieľajú na bunkami sprostredkovanvej imunite a hrajú dôležitú úlohu pri eliminácii intracelulárnych patogénov (Ruszkowski et al., 2019). Aktivujú Tc bunky na zabíjanie infikovaných buniek, produkujú tumor nekrotizujúci faktor α (TNF- α) a interferón γ (IFN- γ). Okrem pôsobenia voči intracelulárnym patogénom, môžu tiež stimulovať B bunky, aby produkovali špecifické podtriedy IgG protilátok, ktoré sa môžu viazať na extracelulárne mikróby a aktivovať komplement (Alberts et al., 2002).

Th1 efektorové bunky používajú dva signály na aktiváciu makrofágov. Jeden využíva IFN- γ , ktorý sa viaže na receptory IFN- γ na povrchu makrofágov. Druhý využíva vystavenie kostimulačného proteínu CD40 ligandu (CD40-L) na povrchu, ktorý sa viaže na CD40 na makrofáge. CD40-L používajú aj Th bunky na aktiváciu B buniek. Pretože dendritické bunky tiež exprimujú CD40, Th1 bunky v miestach infekcie môžu pomôcť pri ich aktivácii. V dôsledku toho dendritické bunky zvyšujú produkciu molekúl MHC triedy II, kostimulačných proteínov B7 a rôznych cytokínov, najmä IL-12, vďaka čomu sú účinnejšie pri stimulácii Th buniek, aby sa v periférnych lymfoidných orgánoch diferencovali na subpopuláciu Th1 efektorových buniek. Dendritické bunky tak poskytujú pozitívnu spätnú väzbu, ktorá zvyšuje produkciu samotných Th1 buniek a tým aj aktiváciu makrofágov (Alberts et al., 2002).

Th2 lymfocyty kontrolujú humorálnu imunitu, ktorá je sprostredkovaná imunoglobulínmi. Dôležitú úlohu hrajú pri odstraňovaní mnohobunkových a extracelulárnych parazitov (Ruszkowski et al., 2019), pričom k tomu využívajú produkciu IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13. Th2 bunky môžu stimulovať B bunky, aby tvorili väčšinu tried protilátok, vrátane IgE a niektorých podtried IgG protilátok, ktoré sa viažu na žirne bunky, bazofily a eozinofily. Tieto bunky uvoľňujú lokálne mediátory, ktoré spôsobujú kýchanie, kašeľ alebo hnačku a pomáhajú tým vypudzovať extracelulárne mikróby a väčšie parazity z epitelových povrchov tela (Alberts et al., 2002).

2.2.2.2 Ďalšie subpopulácie pomocných T lymfocytov

Folikulárne pomocné T (T_{fh}) lymfocyty, podobne ako Th2 lymfocyty, sú špecializované na spoluprácu s B bunkami (Ruszkowski et al., 2019). Zúčastňujú sa pri tvorbe germinálnych centier počas protilátkových reakcií závislých od T buniek (Karnowski et al., 2012). Prostredníctvom IL-21 podporujú prežitie a dozrievanie B buniek a procesy, ako je prepínanie triedy imunoglobulínov a dozrievanie protilátkovej afinity (Ruszkowski et al., 2019). Majú teda kľúčovú funkciu pri tvorbe pamäťových buniek a plazmatických B buniek s dlhou životnosťou (Chang & Li, 2020).

Th17 a Th22 lymfocyty sú subpopulácie definované schopnosťou produkovať vysoké koncentrácie IL-17 a IL-22. Obe subpopulácie majú podobnú úlohu. Podieľajú sa na imunitnej odpovedi proti extracelulárnym baktériám a stimulujú napríklad epitelové bunky k produkcii antibakteriálnych peptidov. Th17 lymfocyty taktiež vylučujú prozápalové cytokíny, ako sú IL-17A a IL-17F, ktoré pôsobia na bunky a up-regulujú expresiu prozápalových cytokínov, chemokínov a metaloproteáz. Bunky Th17 sú preto

považované za súčasť autoimunitných procesov. Na rozdiel od toho IL-22 produkovaný Th22 bunkami ovplyvňuje iba epitelové bunky kože, obličiek, tráviaceho a dýchacieho traktu (Ruszkowski et al., 2019).

2.2.2.3 Regulačné T lymfocyty

Treg bunky sú hlavnou populáciou lymfocytov, pre ktorú je charakteristická vysoká expresia transkripčného faktora FoxP3, ktorý pôsobí proti nadmernej imunitnej reakcii a chráni telo pred autoimunitnými reakciami. Možno ich rozdeliť na prirodzené Treg vznikajúce v týmuse a indukovateľné Treg, ktoré sú diferencované počas imunitnej odpovede mimo týmus. Treg bunky uplatňujú svoj supresorový účinok takmer na všetky bunky imunitného systému prostredníctvom vylučovaných cytokínov, predovšetkým IL-10, a medzibunkového kontaktu, v ktorom zohrávajú úlohu membránovo viazané proteíny, ako napríklad CTLA-4 (Ruszkowski et al., 2019).

2.2.3 Mechanizmus komunikácie medzi T a B lymfocytmi

Th bunky môžu pomôcť stimulovať B bunky k proliferácii a diferenciácii buď na efektorové bunky produkujúce protilátky alebo pamäťové bunky. Môžu tiež stimulovať B bunky, aby došlo k zmene triedy protilátok, z IgM a IgD na jednu zo sekundárnych tried protilátok (Alberts et al., 2002).

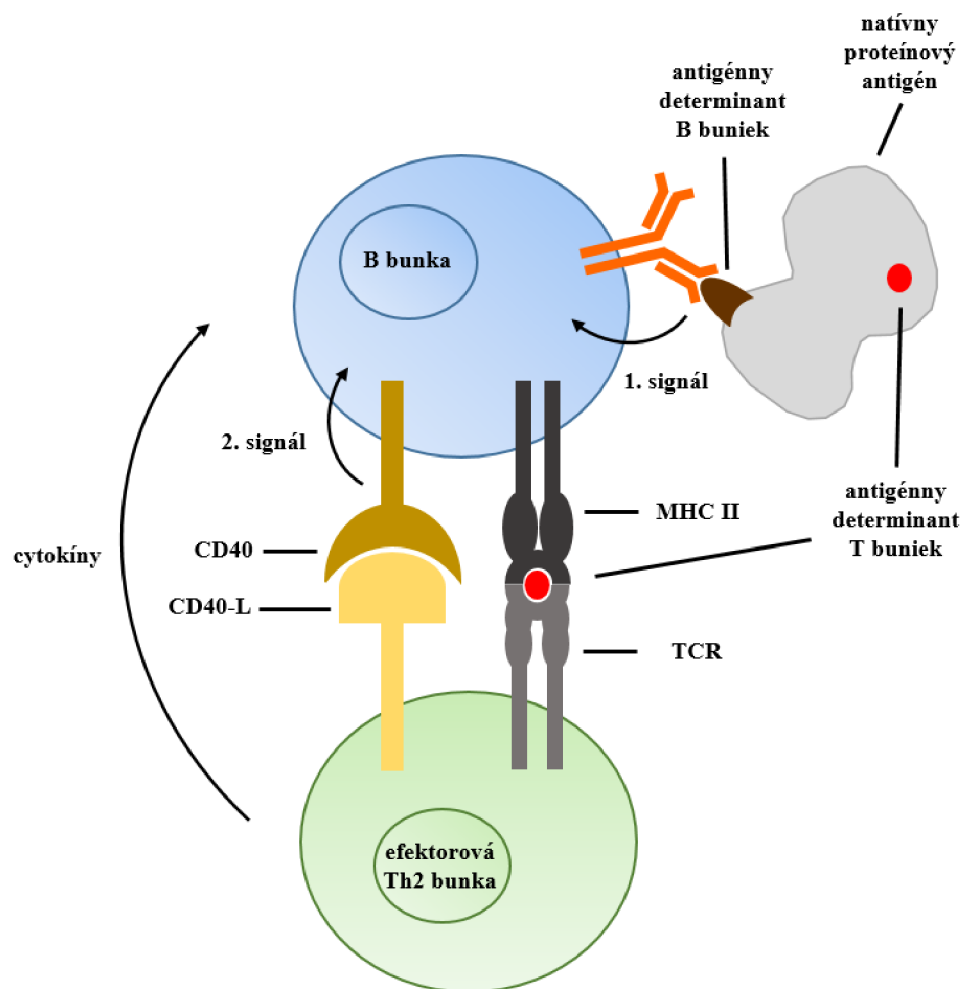
B bunky vyžadujú na aktiváciu dva typy extracelulárnych signálov. Prvý signál je poskytovaný cez väzbu antigénu a B-bunkového receptora (BCR) (Obr. 3). BCR predstavuje molekulu protilátky viazanú na membránu. Druhý signál zvyčajne poskytuje Th bunka (Obr. 3). Ak B bunka dostane iba prvý signál, zvyčajne je eliminovaná alebo funkčne inaktivovaná, čím je dosiahnutá tolerancia voči vlastným antigénom (Alberts et al., 2002).

B bunka na rozdiel od buniek vrodenej imunity prezentuje iba antigén, ktorý špecificky rozpoznáva. Cudzie proteíny sú po vyselektovaní pomocou BCR prijímané endocytózou, degradované a recyklované na bunkový povrch vo forme peptidov naviazaných na proteíny MHC II (Obr. 3) (Alberts et al., 2002).

Pri primárnych protilátkových odpovediach môže dozretá efektorová Th bunka aktivovať B bunky s receptormi, ktoré špecificky rozpoznávajú antigén, ktorý pôvodne aktivoval T bunku. T a B bunky ale zvyčajne rozpoznávajú odlišné antigénne determinanty na antigéne (Obr. 3). Na aktiváciu je tiež nutné, aby B bunka na svojom

povrchu obsahovala MHC II. Pri sekundárnych protilátkových odpovediach môžu samotné pamäťové B bunky pôsobiť ako bunky prezentujúce antigén a aktivovať Th bunky, alebo byť aj následnými cieľmi efektorových Th buniek. Vzájomne sa posilňujúce pôsobenie Th buniek a B buniek vedie k imunitnej odpovedi, ktorá je intenzívna a vysoko špecifická (Alberts et al., 2002).

CD40-L je transmembránový signálny proteín exprimovaný na povrchu efektorových Th buniek. Na neaktivovaných naivných alebo pamäťových Th bunkách sa však nenachádza. B bunky na svojom povrchu exprimujú proteín CD40 a ten je rozpoznávaný CD40-L (Obr. 3), pričom táto interakcia je potrebná, aby Th bunky aktivovali B bunky a pomohli im proliferovať a diferencovať sa na pamäťové alebo efektorové bunky produkujúce protilátky (Alberts et al., 2002).



Obr. 3: Aktivácia B buniek závislá na T bunkách a vyžadujúca dva typy extracelulárnych signálov. Prvý signál je realizovaný cez väzbu antigénu a BCR. Druhý signál zvyčajne poskytuje Th bunka cez CD40-L, ktorý je rozpoznávaný CD40 na B bunke. Na aktiváciu je tiež dôležitá prítomnosť molekuly MHC II na povrchu B bunky, ktorá prezentuje antigénny determinant T buniek rozpoznávaný TCR (upravené podľa Alberts et al., 2002).

Signály z Th buniek v niektorých prípadoch pomáhajú meniť triedu protilátok, ktoré B bunky produkujú. IL-4 je jedným z takýchto signálov. Je produkovaný Th2 bunkami, spolupracuje s CD40-L pri stimulácii proliferácie a diferenciácie B buniek a podporuje prechod k produkcii IgE protilátok (Alberts et al., 2002).

2.2.4 Stimulácia B buniek bez pomocných T buniek

Niektoré antigény môžu stimulovať B bunky k proliferácii a diferenciácii na efektorové bunky produkujúce protilátky bez pomoci T buniek. Väčšina týchto antigénov nezávislých na T bunkách sú mikrobiálne polysacharidy. Antigény nezávislé na T bunkách neaktivujú Th bunky, a tak nedokážu vyvolať B bunkovú pamäť, afinitné dozrievanie alebo prepínanie tried, pretože všetky tieto procesy vyžadujú pomoc T buniek. Stimulujú hlavne tvorbu nízkoafinitných, ale vysokoavidných, IgM protilátok. Väčšina B buniek, ktoré tvoria protilátky bez pomoci T buniek, patrí do odlišnej línie, pričom táto B bunková línia sa zdá sa byť obzvlášť dôležitá pri obrane proti črevným patogénom (Alberts et al., 2002).

2.3 T lymfocyty zapojené v IgA nefropatii

Neliečení pacienti s IgAN majú jednak vyšší absolútny počet lymfocytov a tiež inú distribúciu subpopulácií leukocytov v porovnaní so zdravými jedincami (Esteve et al., 2020). IgAN sa vyznačuje vyšším počtom obehových Th2, Tfh, Th17, Th22 a $\gamma\delta$ T buniek. Naopak počet Th1 a Tregs buniek je pri IgAN znížený (Ruszkowski et al., 2019).

Percento celkových T lymfocytov v krvi, označovaných ako CD3+ bunky, medzi neliečenými pacientmi s IgAN a zdravými jedincami je podobné, ale percentá CD8+ a CD4+ T lymfocytov sú nižšie u pacientov s IgAN (Esteve et al., 2020).

Aktivované a efektorové pamäťové CD8+ a CD4+ T lymfocyty u pacientov s IgAN majú vyššie percentuálne zastúpenie v porovnaní so zdravými jedincami. Naproti tomu naivné CD8+ a CD4+ T lymfocyty majú percentuálne zastúpenie nižšie (Esteve et al., 2020).

IgA nefropatickí pacienti s horšou prognózou sa vyznačujú vyššími percentami efektorových pamäťových CD8+ a efektorových pamäťových Th17 CD4+ T lymfocytov ako pacienti s lepšou prognózou ochorenia (Esteve et al., 2020).

2.3.1 Cytokíny ovplyvňujúce diferenciáciu T lymfocytov

IL-6 môže regulovať diferenciáciu T buniek. Spôsobuje up-reguláciu dvoch transkripčných faktorov, jadrového faktora aktivovaných T buniek a homológu onkogénu muskuloaponeurotického fibrosarkómu v-maf, čo zvyšuje expresiu IL-4 (Groza et al., 2022).

IL-4 posúva rovnováhu smerom k Th2 subpopulácii a potláča diferenciáciu Th1 lymfocytov indukciou supresora cytokínovej signalizácie 1 a inhibíciou exprese IFN- γ (Groza et al., 2022).

IL-6 spolu s transformujúcim rastovým faktor beta (TGF- β) indukuje diferenciáciu naivných CD4⁺ T buniek na prekursorov Th17 buniek, ktoré po stimulácii IL-23 dozrievajú na bunky Th17 produkujúce IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α a tiež IL-6. Okrem toho IL-6 podporuje diferenciáciu podskupiny naivných CD8⁺ T buniek na jedinečnú populáciu efektorových CD8⁺ T buniek, ktoré sú charakteristické produkciou vysokých hladín IL-21 a nízkych hladín IFN- γ . Podobne ako CD4⁺ Tfh bunky, IL-21-produkujúce CD8⁺ T bunky generované v prítomnosti IL-6 priamo poskytujú pomoc B bunkám pri indukcii prepínania izotypov (Groza et al., 2022).

IL-6 podporuje tiež diferenciáciu aktivovaných CD4⁺ T buniek na Tfh bunky (Karnowski et al., 2012).

2.3.2 Genetika spojená s T lymfocytmi v IgA nefropatii

Existuje súvislosť medzi polymorfizmom IFN- γ a vyššou náchylnosťou k rozvoju IgAN. Polymorfizmus + 874T/A sa vyskytuje vo väzbovom mieste pre transkripčný nukleárny faktor kappa-light-chain-enhancer aktivovaných B buniek (NF- κ B) (Ruszkowski et al., 2019). *In vitro* je rizikový variant + 874A spojený so zníženou väzbovou afinitou NF- κ B a zníženou produkciou IFN- γ . IFN- γ produkovaný Th1 bunkami teda môže byť prospešný ako prevencia proti progresii IgAN (Chang & Li, 2020).

Ďalšie polymorfizmy asociované s vývojom IgAN boli zaznamenané v niekoľkých génoch zapojených do vývoja a funkcie Th17 buniek. Jedna z rizikových alel IgAN je známa zvýšenou expresiou génu CARD9. Proteín kódovaný týmto génom zjednocuje signály stimulujúce diferenciáciu Th17 po mikrobiálnej expozícii. Polarizácia Th2 a Th17 je spojená s nedostatkom mikroRNA miR-155 v mononukleárných bunkách periférnej krvi pacientov s IgAN, čo fyziologicky inhibuje diferenciáciu Th2 supresiou transaktivátorov promotora IL-4 (Ruszkowski et al., 2019).

Pre IgAN je tiež typický deficit a znížená imunosupresívna funkcia Treg buniek. Nedostatok miR-155 môže inhibovať dozrievanie a diferenciáciu Treg buniek. Inhibícia diferenciácie Treg buniek môže byť zapríčinená aj molekulami miR-133a a miR-133b, ktoré obmedzujú transláciu FoxP3. Deficit Treg buniek môže byť spôsobený aj chronickou tonzilitídou alebo môže byť výsledkom polymorfizmov promotóra IL-10 spojených so zníženou produkciou IL-10 (Ruszkowski et al., 2019).

Nadmerná aktivita imunoproteazómov v IgAN môže viesť k nerovnováhe Th17/Treg buniek. Pacienti s IgAN majú vyššiu expresiu génu PSMB8, ktorý kóduje imunoproteazómovú podjednotku a tá je nevyhnutná pre diferenciáciu Th17 a inhibíciu diferenciácie Treg buniek (Ruszkowski et al., 2019).

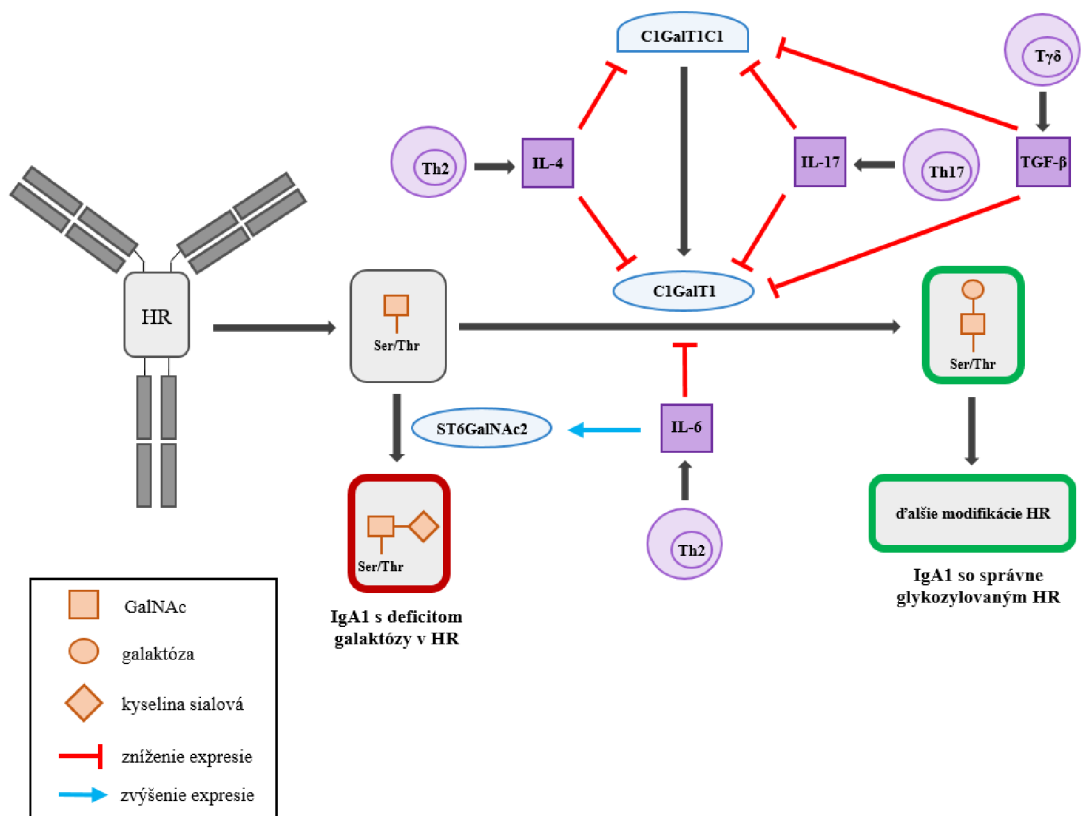
2.3.3 T bunky ovplyvňujúce produkciu galaktozyl-deficitného IgA1

T bunky sa môžu podieľať na aberantnej galaktozylácii IgA1 (Obr. 4). Polarizácia Th2 buniek a produkcia IL-4 touto subpopuláciou T buniek podporuje hypogalaktozyláciu IgA. IL-4 tiež zvyšuje produkciu IgA1. Zmena terminálnej glykozylácie u produkovaného IgA1 môže byť výsledkom inhibície expresie C1GalT1 a jeho molekulárneho chaperónu C1GalT1C1 (Obr. 4). IL-4 podporuje hypermetyláciu CpG ostrovčekov v promotore génu C1GalT1C1, tým dochádza k down-regulácii mRNA pre C1GalT1C1 a súvisiacej vyššej produkcii Gd-IgA1 B bunkami. B bunky od pacientov s IgAN sú pravdepodobne na IL-4 citlivejšie, pretože pokles hladiny mRNA pre C1GalT1C1 vyvolaný IL-4 bol u nich väčší než u lymfocytov od zdravých jedincov alebo pacientov s inými obličkovými ochoreniami (Ruszkowski et al., 2019).

IL-17 vykazuje podobný mechanizmus účinku ako IL-4. Expresia mRNA pre C1GalT1 a C1GalT1C1 je v B bunkách stimulovaných IL-17 významne nižšia (Lin et al., 2018).

Tfh lymfocyty sa môžu podieľať na zvýšenej syntéze IgA a Gd-IgA1 prostredníctvom IL-21. IL-21 up-reguluje expresiu týchto imunoglobulínov v zreých B bunkách aktiváciou indukovanej cytidindeaminázy, čo je enzým upravujúci DNA, ktorý sprostredkováva prepínanie triedy IgA počas diferenciácie aktivovaných B buniek na plazmatické bunky (Sun et al., 2015). Na expresiu IL-21 CD4+ T bunkami je však potrebný IL-6 (Dienz et al., 2009).

Prepínanie triedy IgA závislé od T buniek v B bunkách pacientov s IgAN môže byť stimulované aj TGF- β , cytokínom produkovaným mnohými typmi buniek, napríklad $\gamma\delta$ T



Obr. 4: Cytokíny pomocných T buniek ovplyvňujúce glykozyláciu HR IgA1 a podieľajúce sa tým na tvorbe Gd-IgA1. IL-6 zvyšuje expresiu ST6GalNAc2 a znižuje ju u C1GalT1. IL-4, IL-17 a TGF- β znižujú expresiu C1GalT1 a C1GalT1C1 (upravené podľa Ruszkowski et al., 2019).

a Treg bunkami. TGF- β tiež významne znižuje hladiny mRNA pre C1GalT1 a C1GalT1C1, a tým prispieva k vyššej produkcii Gd-IgA1 (Obr. 4). TGF- β ale neovplyvňuje sialyláciu IgA1 (Ruszkowski et al., 2019).

Menej špecifický mechanizmus prepínania triedy IgA závislý od T buniek je sprostredkovaný prostredníctvom CD40-L. Tento ligand viazaný na membránu je prítomný po aktivácii na Th1, Th2, Tfh, Th17 bunkách, ale nie na Treg (Koguchi et al., 2012).

2.3.4 T lymfocyty ovplyvňujúce obličkové poškodenie v IgA nefropatii

Imunohistochemické farbenie renálnych biopsií v IgAN naznačuje, že obličky v progresívnom IgAN sú infiltrované $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T bunkami. Gd-IgA1 stimuluje mezangiálne bunky k produkcii chemokínov pre Th17 a Th22 bunky. Odpoveď glomerulárnych buniek na imunitné komplexy IgA a zníženie rýchlosti glomerulárnej filtrácie môže zintenzívniť

polarizácia Th2 buniek. Taktiež sa predpokladá, že zníženým počtom Treg buniek nedochádza k účinnému potlačeniu poškodenia obličiek (Ruszkowski et al., 2019).

2.4 Ľahké reťazce imunoglobulínov

Molekula imunoglobulínu je zložená z dvoch ťažkých (H) a dvoch ľahkých (L) reťazcov spojených v konfigurácii tvaru písmena „Y“. Existujú dva izotypy L reťazca, κ a λ , z ktorých každý obsahuje variabilnú (V) a konštantnú (C) oblasť. Variabilná oblasť každého páru H a L reťazca tvorí miesta viažuce antigén (Basnayake et al., 2011).

Každý ľahký reťazec obsahuje približne 220 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 25 kDa. Gény kódujúce ľahké reťazce κ a λ sa nachádzajú na chromozómoch 2 a 22. V rámci C oblastí κ a λ ľahkých reťazcov je odlišnosť malá. Variabilná oblasť L reťazca obsahuje štyri rámcové oblasti tvoriace hydrofóbne jadro, v ktorom sú rozptýlené tri hypervariabilné sekvencie nazývané komplementárne určujúce regióny a označované ako CDR1, CDR2 a CDR3. Diverzita CDR odráža veľký počet možných kombinácií VL a spojovacích (J) génových segmentov, ktoré ich kódujú. Kappa L reťazec je skonštruovaný zo 40 $V\kappa$ a 5 $J\kappa$ segmentov a lambda L reťazec z 30 $V\lambda$ a 8 $J\lambda$ segmentov s aminokyselinovými substitúciami v oblasti VL (Basnayake et al., 2011).

Prítomnosť amfipatických aminokyselín tyrozínu a tryptofánu v CDR ľahkého reťazca môže zlepšovať väzbu antigénu a zvyšovať účinnosť protilátky, pretože tieto aminokyseliny nie sú ovplyvňované zmenou hydrofilného prostredia na hydrofóbne, ku ktorej dochádza pri väzbe antigénu. Ďalej sa zúčastňujú elektrostatických interakcií a taktiež majú flexibilné bočné reťazce, ktoré môžu vytvárať štruktúrne poddajnú oblasť. Na druhej strane tieto faktory môžu umožniť imunoglobulínom krížovú reakciu so štruktúrne podobnými ligandami a predisponovať k potenciálnym nežiaducim účinkom (Basnayake et al., 2011).

2.4.1 Patologické formy ľahkých reťazcov imunoglobulínov

Za fyziologických podmienok sú L reťazce oproti H reťazcom produkované v nadbytku. Väčšina L reťazcov v sére je naviazaná na H reťazce a hladina neviazaných L reťazcov, takzvaných voľných L reťazcov (FLC), je nízka. Za patologických podmienok však môže byť produkcia FLC abnormálne vysoká. Napríklad pri monoklonálnych gamapatiách, ako je mnohopočetný myelóm, primárna systémová amyloidóza a neamyloidná depozícia ľahkého reťazca, a taktiež pri určitých zápalových alebo autoimunitných ochoreniach,

ako je skleróza multiplex, systémový lupus erythematosus, AIDS a Sjogrenova choroba (Kaplan et al., 2011).

κ -FLC sú monomérne a λ -FLC dimérne, hoci v oboch prípadoch sa vyskytujú aj vyššie oligomérne a polymérne formy. Každý klon FLC má odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré za určitých okolností spôsobujú poškodenie tkaniva. Keďže FLC sú primárne odstraňované z obehu obličkami, tento orgán býva často poškodený (Basnayake et al., 2011).

2.4.2 Ľahké reťazce imunoglobulínov v IgA nefropatii

Mezangiálne depozity IgA v IgAN vykazujú prítomnosť κ aj λ L reťazcov, avšak λ L reťazce pri detekcii pomocou fluorescenčnej mikroskopie sú zastúpené viac ako κ (Hassler, 2020).

U sérových IgG a IgM sú vo všeobecnosti za fyziologického stavu ľahké reťazce kappa voči ľahkým reťazcom lambda exprimované v pomere 2:1. Pre IgA je tento pomer nižší a predstavuje hodnotu 1,2:1 (Ravipati et al., 2022).

Bunky s membránovo viazaným Gd-IgA1 (mb-Gd-IgA1+ bunky) v periférnej krvi pacientov s IgAN v porovnaní so zdravými jedincami a pacientami s membranóznou nefropatiou (non-IgAN) exprimujú prevažne λ L reťazce. Na druhej strane sú celkové mb-IgA+, mb-IgG+ a mb-IgM+ bunky u zdravých jedincov, IgAN pacientov aj non-IgAN pacientov pozitívne hlavne na κ L reťazce. U všetkých troch spomenutých skupinách síce prevažuje κ L reťazec, ale pacienti s IgAN v porovnaní s non-IgAN pacientmi a zdravými jedincami majú väčšie populácie buniek mb-IgG+, mb-IgM+ a mb-IgA+ s λ L reťazcom (Zachova et al., 2022).

λ + mb-Gd-IgA1+ bunky sú zároveň CCR10+ a CCR9+. Takéto bunky sa nachádzajú predovšetkým v horných dýchacích cestách a tráviacom trakte. Taktiež mb-Gd-IgA1+ populácie obsahujú viac CD138+ a CD38+ buniek v porovnaní s celkovými mb-IgA+ bunkami. Periférna krv pacientov s IgAN je teda obohatená o migrujúce λ + mb-Gd-IgA1+ B bunky s potenciálom prechádzať do slizničných miest, kde by počas lokálnych infekcií dýchacích ciest alebo tráviaceho traktu mohol byť Gd-IgA1 produkovaný (Zachova et al., 2022).

2.5 Sortovanie buniek

Presné a vysokovýkonné sortovanie buniek je kľúčovou technológiou v molekulárnej a bunkovej biológii, biotechnológii a medicíne (Shields et al., 2015). Ide o proces, v ktorom sú cieľové bunky separované z komplexných a heterogénnych zmesí podľa vlastností alebo typu, zvyčajne pre následnú analýzu alebo purifikáciu vymedzených populácií buniek (Shen et al., 2019). Nevyhnutná je prietoková cytometria, ktorá umožňuje charakterizáciu špecifickej bunkovej vlastnosti. Analýza prietokovou cytometriou poskytuje distribúciu parametrov v populácii, a tým vyjadruje, aká veľká šanca je nájsť bunku s danými vlastnosťami (Mattanovich & Borth, 2006).

2.5.1 Spôsoby sortovania buniek

Podľa spôsobu rozpoznávania cieľových buniek v komplexných a heterogénnych zmesiach možno rozlišovať dva hlavné prístupy triedenia buniek, a to fluorescenčne aktivované triedenie buniek (FACS) založené na protilátkach spojených s fluorofórom a triedenie magneticky aktivovaných buniek (MACS) s použitím magnetických guľôčok spojených s protilátkou. MACS predstavuje rýchly spôsob, ktorý nevyžaduje žiadne špecializované nástroje, avšak čistota a miera výťažnosti sú vo všeobecnosti lepšie pri triedení pomocou FACS (Staunstrup et al., 2022).

V sortovaní jednotlivých buniek možno rozlišovať dva druhy mechanizmov. Prvý mechanizmus je založený na mechanickom princípe. Môže byť využívaná zachytávacia rúrka, ktorá sa pohybuje tak, že vstupuje do prúdu za sebou idúcich buniek a zbiera len záujmové bunky. Ak je bunka identifikovaná ako cieľová, je zachytená zachytávacou rúrkou a zhromaždená do skúmavky alebo koncentračného modulu, v opačnom prípade je odoslaná do odpadovej nádrže. Tento spôsob sortovania buniek využívajú prístroje ako napríklad FACSCalibur™ od spoločnosti BD a CyFlow® Sorter od Partec (Picot et al., 2012). Okrem zachytávacej rúrky možno využiť mechanický ventil, ktorý sa otvára len pre bunky, ktoré sú predmetom záujmu. V tomto prípade proces triedenia prebieha pri veľmi nízkom tlaku, okolo 2 psi, a je nezávislý od nosnej kvapaliny. Bunky teda nie sú vystavené dekompresii ani žiadnemu elektrickému náboju. Príkladom triediča buniek využívajúceho mechanický ventil je MACSQuant® Tyto® od Miltenyi Biotec (Staunstrup et al., 2022). Mechanický princíp sortovania buniek neumožňuje triedenie viacerých subpopulácií súčasne. Ďalšou nevýhodou je pomalšia rýchlosť triedenia. Na druhej strane tieto prístroje sú navrhnuté s uzavretým kvapalinovým systémom, vďaka

čomu sú vhodné na prácu s potenciálne biologicky nebezpečnými vzorkami, pretože neprodukurujú žiadne biologicky nebezpečné aerosóly (Picot et al., 2012).

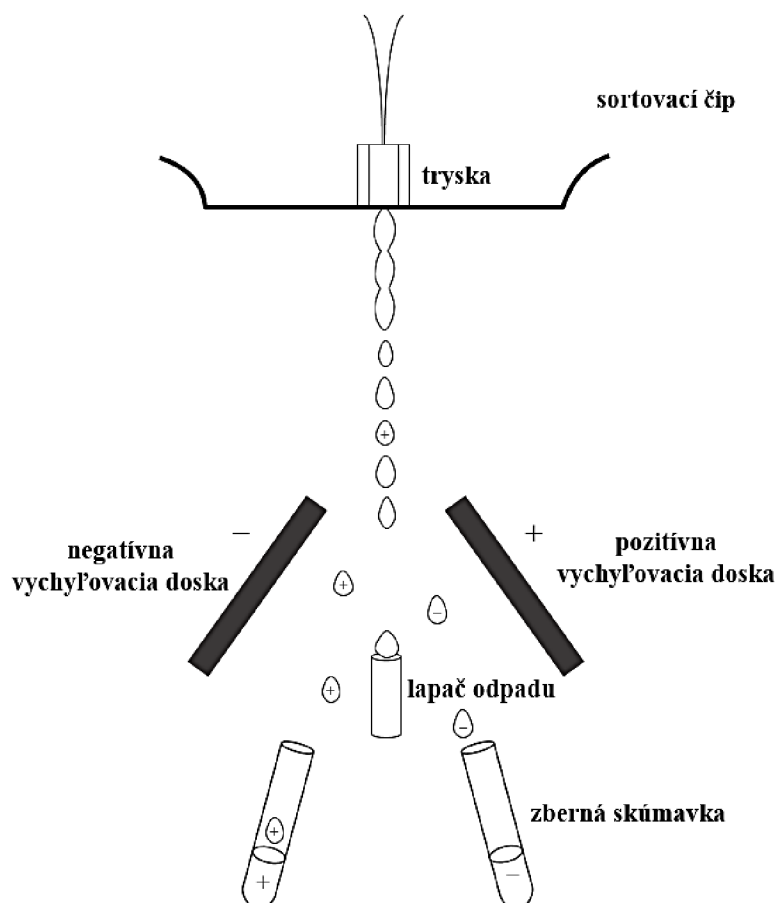
Druhý mechanizmus, ktorý je typický pre väčšinu vysokorýchlostných triedičov buniek, využíva elektrostatické vychýľovanie kvapiek, čo je nazývané ako metóda „jet-in-air“. Výhodou tohto systému je možnosť triediť až šesť subpopulácií buniek súčasne v závislosti od modelu prístroja. Triedenie vytvára v komore aerosóly, a tak práca s potenciálne biologicky nebezpečnými vzorkami si vyžaduje implementáciu vhodných opatrení (Picot et al., 2012). Príkladom prístroja využívajúceho metódu „jet-in-air“ je FACS Aria™ III od BD (Staunstrup et al., 2022) alebo LE-SH800 od SONY (Cell Sorter Operator's Guide).

Okrem týchto dvoch opísaných triediacich mechanizmov sa v posledných rokoch začali využívať aj mikrofluidné technológie (Shields et al., 2015), teda technológie umožňujúce manipuláciu s tekutinami v kanáloch s rozmermi desiatok mikrometrov (Bragheri et al., 2020), ktoré umožňujú realizáciu miniaturizovaných zariadení a vyhýbajú sa potrebe vytvárať aerosólové kvapky. Využívajú rôzne princípy triedenia, ako elektrokinetické, optické či sily tlakových vln (Shields et al., 2015).

2.5.1.1 Triedenie buniek aktivované fluorescenciou

FACS je vysoko sofistikovaná technika na čistenie požadovaných bunkových populácií, pri ktorej je možné získať veľmi vysokú čistotu triedenej populácie, v hodnotách 95-100 % (Basu et al., 2010). Pri identifikácii typu buniek sa spolieha na fluorescenčné sondy alebo farby (Shields et al., 2015). Značenie bunkovej populácie je najčastejšie realizované pomocou flouorofórovo značenej protilátky viažucej sa na exprimovaný povrchový marker danej bunkovej populácie. Vo všeobecnosti by sa na farbenie slabo exprimovaných povrchových markerov mali použiť protilátky značené najjasnejším fluorofórom, zatiaľ čo slabé fluorofóry sa môžu použiť na farbenie vysoko exprimovaných povrchových markerov. Okrem toho by sa protilátky mali vyberať takým spôsobom, aby prekryvanie ich emisných spektier bolo minimálne. Často však k spektrálnemu prekrytiu dochádza a v tejto situácii sa vykoná kompenzácia (Basu et al., 2010).

V priebehu sortovania na fluorescenčne značené bunky, ktoré sú hydrodynamicky zafokusované a organizované v laminárnom prúde, dopadá zaostrený laserový lúč, ktorý je rozptýlený. Rozptyl svetla a fluorescenčný signál je následne analyzovaný, aby mohol byť každej bunke priradený spôsob triedenia (Shields et al., 2015).



Obr. 5: Schéma sortovania buniek metódou „jet-in-air“. Nabíjané sú kvapky obsahujúce cieľové bunky, ktoré sú následne elektrostatiicky vychýľené pomocou vychyľovacích dosiek a dopadajú do zberných skúmaviek. Nenabité kvapky sú zbierané v lapači odpadu (upravené podľa (Cell Sorter Operator’s Guide)).

2.5.2.1 Sortovanie buniek pomocou metódy „jet-in-air“

Bunky v roztoku prejdú bodom optickej detekcie a následne vychádzajú z trysky (Cell Sorter Operator’s Guide). Tryska je najčastejšie používaný typ triediča na sortovanie jednotlivých buniek (Mattanovich & Borth, 2006). Prevodník rozvibruje čip pri ultrazvukovej frekvencii za účelom rozbitia prúdu tekutiny na kvapôčky, ktoré možno triediť. Veľkosť kvapiek je určená veľkosťou trysky, frekvenciou vibrácií a rýchlosťou prúdenia tekutiny (Cell Sorter Operator’s Guide).

Kvapky, ktoré obsahujú cieľové bunky na sortovanie, sa nabíjajú, keď vychádzajú z trysky triediaceho čipu. Ak teda kvapôčka spĺňa kritériá triedenia, dostane elektrostatiický náboj z nabíjacej elektródy. Elektrostatiický náboj je distribuovaný na obvode kvapky a neovplyvňuje bunky obsiahnuté v kvapôčke. Kladná alebo záporná

polarita náboja aplikovaná na kvapku závisí od definovaných kritérií triedenia buniek. Nežiaduce kvapôčky zostanú nenabité a sú zbierané v lapači odpadu (Obr. 5) (Cell Sorter Operator's Guide).

Vysokonapäťové vychyľovacie dosky odkláňajú elektrostaticky nabité kvapôčky vyvrhnuté z trysky triediaceho čipu doľava alebo doprava pomocou elektrostatickej príťažlivosti a odpudzovania, a tak triedia nabité kvapôčky s cieľovými bunkami do určených zberných skúmaviek a nádob (Obr. 5) (Cell Sorter Operator's Guide).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Zoznam použitého biologického materiálu

- Nezrazená periférna krv IgA nefropatických pacientov (odber krvi vo Fakultnej nemocnici, Olomouc, Česká republika)
- Nezrazená periférna krv zdravých jedincov (HC) (odber krvi na Ústave imunológie LF UP, Olomouc, Česká republika)
- Transformované baktérie *Escherichia coli* (*E. coli*) obsahujúce vektor pET101 s vloženou sekvenciou pre kódovanie proteínu CH1-HR-CH2 (pripravené na Ústave imunológie LF UP, Olomouc, Česká republika)

3.1.2 Zoznam použitých protilátok a ďalších biologicky aktívnych molekúl

- 35A12 protilátka (Anti-Gd-IgA) o koncentrácii $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Kazuo Takahashi research group, Fujita Health University, Nagoya, Aichi, Japan)
- AffiniPure F(ab)₂ Fragment Goat Anti Human, Serum IgA α Chain specific protilátka (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA)
- Anti-mouse IgG značená fenolický donor:peroxid vodíku oxidoreduktázou (chrenová peroxidáza, HRP, EC 1.11.1.7) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Biotinylovaná 35A12 protilátka (Anti-Gd-IgA) (Kazuo Takahashi research group, Fujita Health University, Nagoya, Aichi, Japan)
- Biotinylovaná IgA protilátka (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA)
- CD40-L (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA)
- ChromPure Human IgA, serum o koncentrácii $4,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA)
- HRP značená anti-IgA protilátka (Peroxidase-conjugated AffiniPure (F(ab)₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA α Chain specific protilátka) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA)
- IL-6 (Gibco, Bazilej, Švajčiarsko)

- IL-21 (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA)
- Penta-His HRP konjugovaná protilátka (Qiagen, Hilden, Nemecko)
- Protilátka Anti-Human-CD3-BV510 (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA)
- Protilátka Anti-Human-CD4-BV765 (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA)
- Protilátka Goat Anti-Lambda-TRITC (Novus Biologicals, Englewood, Colorado, United States)
- Protilátka Anti-Mouse-IgG-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Protilátka fixable viability dye 421 (FVD-421) (eBioscience, San Diego, California, USA)
- Protilátka Goat Anti-Rabbit-IgG-AF-488 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA)
- Protilátka Mouse Anti-Human-CD19-PE-CF594 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Protilátka Rabbit Anti-Human-J-chain (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)
- Streptavidin-APC-R700 (eBioscience, San Diego, California, USA)
- Streptavidin-FITC (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, USA)
- Štandard pIgA Ale (pripravený podľa štúdie Suzuki et al. (2008) na Ústave imunológie LF UP, Olomouc, Česká republika)
- Zásobný roztok sialidázy o koncentrácii $5 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA)

3.1.3 Zoznam použitých chemikálií

- 10x nosná kvapalina (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA)
- 10x permeabilizačný tlmivý roztok (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- 16 % zásobný roztok paraformaldehydu (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- 30 % peroxid vodíka v H_2O (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)

- Albumín z hovädzieho séra (BSA), Fraction V (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- Ampicilín (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- Aprotinín (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Automatic setup beads (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA)
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Butanol (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Citrát sodný dihydrát (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Dezinfekčný prostriedok (Savo, Chicago, Illinois, USA)
- Dulbecco's PBS (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- EDTA (kyselina etyléndiamíntetraoctová), Molecular Biology Grade (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Etanol (BC-CHEMSERVIS, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika)
- Farbivo Coomassie Brilliant Blue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Fetálne bovinné sérum (FBS) (Gibco, Bazilej, Švajčiarsko)
- Ficoll-Paque o hustote $1.077 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)
- Chemiluminiscenčný substrát West Pico PLUS- roztok luminol/zosilňovač + stabilný roztok peroxidu) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Imidazol (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- IPTG (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- KCl (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- KH_2PO_4 (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina citrónová, bezvodná (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina sírová ((Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- LB médium (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- Leupeptín (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Lyzozým (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Metanol (Serva, Baden-Wuerttemberg, Nemecko)
- Montovacie médium s DAPI (Abcam, Cambridge, Spojené kráľovstvo)
- NaCl (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Ni-NTA agaróza (Qiagen, Hilden, Nemecko)
- O-fenyléndiamín dichlorid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Penicilín-streptomycín (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Persíran amónny (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- Pierce™ BCA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- PMSF (fenylmetylsulfonylfluorid) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- RPMI médium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Sušené mlieko (Bohemilk, Opočno, Česko)
- Štandard pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- TEMED (tetrametyletyléndiamín) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Tepelne spracované ľudské sérum (pripravené na Ústave imunológie LF UP, Olomouc, Česká republika)
- Tris (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)

3.1.4 Zoznam použitých roztokov

- 1x nosná kvapalina- pripravená z 10x nosnej kvapaliny riedením destilovanou vodou
- 1x PBS- pripravené z 10x PBS riedením destilovanou vodou
- 1x PBS s 0,05 % Tweenom 20- riedené pomocou destilovanej vody
- 1x permeabilizačný tlmivý roztok- pripravené z 10x permeabilizačného tlmivého roztoku riedením destilovanou vodou
- 2x SDS vzorkovací tlmivý roztok o pH 6,8- pripravený z 0,755 g Trisu, 7,95 ml glycerolu, 2,3 g SDS, 5 ml 2-merkptoetanolu a doplnené destilovanou vodou 50 ml
- 4 x Tris tlmivý roztok o pH 6,8- pripravený z 30,25 g Trisu, 2 g SDS a doplnené na 500 ml destilovanej vody

- 4 x Tris tlmivý roztok o pH 8,8- pripravený z 91 g Trisu, 2 g SDS a doplnené na 500 ml destilovanej vody
- 4 % roztok paraformaldehydu- pripravený zo 16 % zásobného roztoku riedením Dulbecco's PBS
- 5 % roztok FBS- roztok pripravený z 5 µl FBS a 95 µl Dulbecco's PBS
- 5 % roztok sušeného mlieka s 0,05 % Tweenom- riedené pomocou destilovanej vody
- 10x PBS- roztok pripravený z 240 g NaCl; 6 g KCl; 40,08 g Na₂HPO₄·12H₂O; 6 g KH₂PO₄; doplnené na 3 l destilovanou vodou a pH upravené na hodnotu 7,5
- 10 % roztok tepelne spracovaného ľudského séra- roztok pripravený z 10 µl tepelne spracovaného ľudského séra a 90 µl Dulbecco's PBS
- 10 % vodný roztok persíranu amónneho- riedené destilovanou vodou
- 30 % akrylamidbisakrylamid- pripravený z 75 g akrylamidu, 2 g bisakrylamidu a doplnené na 250 ml destilovanou vodou
- 70 % etanol- riedený pomocou destilovanej vody
- AffiniPure F(ab)₂ Fragment Goat Anti Human, Serum IgA α Chain specific protilátka o koncentrácii 1 µg·ml⁻¹- pripravená nariadením zásobného roztoku protilátky o koncentrácii 1,2 mg·ml⁻¹ pomocou sterilného 1x PBS
- Ampicilín o koncentrácii 100 mg·ml⁻¹- riedené pomocou destilovanej vody
- Blokovací tlmivý roztok- zloženie 1 % BSA a 0,05 % Tween 20 v sterilnom 1x PBS
- Citrátový tlmivý roztok o koncentrácii 10 mmol·ml⁻¹ a pH 6- pripravený zriedeným citrátového tlmivého roztoku o koncentrácii 100 mmol·ml⁻¹ a pH 6, ten bol pripravený zmiešaním 5,75 ml roztoku kyseliny citrónovej o koncentrácii 100 mmol·ml⁻¹ a 44,25 ml roztoku citrátu sodného o koncentrácii 100 mmol·ml⁻¹
- Elektródový tlmivý roztok- pripravený z 45,3 g Tris, 216 g glycinu, 15 g SDS a doplnené na 3 l destilovanou vodou
- Elučný tlmivý roztok o pH 8- pripravený z 6,0 g NaH₂PO₄·H₂O; 17,54 g NaCl; 17 g imidazolu a doplnené na 1 l destilovanou vodou
- Fixačný tlmivý roztok- pripravený z 750 ml isopropanolu, 300 ml kyseliny octovej a doplnené na 3 l destilovanou vodou

- Kompletné kultivačné RPMI médium s 10 % FBS a 1 % penicilín-streptomycín-roztok pripravený z 50 ml FBS a 5 ml penicilín-streptomycínu a doplnené RPMI médium na objem 500 ml
- LB médium o koncentrácii 25 g·l⁻¹ s ampicilínom- za sterilných podmienok v laminárnom flow boxe bolo do 1 l LB média o koncentrácii 25 g·l⁻¹ napipetovaný 1 ml ampicilínu o koncentrácii 100 mg·ml⁻¹
- Natívny lyzačný tlmivý roztok- tvorený Trisom o koncentrácii 50 mmol·l⁻¹; NaCl o koncentrácii 300 mmol·l⁻¹; imidazolom o koncentrácii 10 mmol·l⁻¹; tesne pred použitím bol pridaný roztok EDTA (100 mmol·l⁻¹) o množstve 10 µl na 10ml; Triton X-100 o množstve 10 µl na 10ml, lyozým o množstve 5 mg na 10 ml; PMSF (250 mmol·l⁻¹) o množstve 20 µl na 10 ml; leupeptín (1 mg·ml⁻¹) o množstve 4 µl na 10 ml a aprotinín (1 mg·ml⁻¹) o množstve 5,25 µl na 10 ml natívneho lyzačného tlmivého roztoku; pH 8
- Odfarbovací roztok- pripravený z 150 ml metanolu, 210 ml kyseliny octovej a doplnené na 3 l destilovanou vodou
- OPD tlmivý roztok- pripravený z 9,2 g Na₂HPO₄·12H₂O a 2,55 g kyseliny citrónovej, doplnené na 0,5 l a pH upravené na hodnotu 5
- Premývací tlmivý roztok o pH 8- pripravený z 6,9 g NaH₂PO₄·H₂O; 17,54 g NaCl; 1,36 g imidazolu a doplnené na 1 l destilovanou vodou
- Roztok 1 mol·l⁻¹ kyseliny sírovej- riedené pomocou destilovanej vody
- Roztok FBS a EDTA- 1920 µl PBS, 40 µl FBS a 40 µl sterilného EDTA roztoku o koncentrácii 100 mmol·l⁻¹ a pH 8
- Roztok fosforečnanu sodného o koncentrácii 0,1 mol·l⁻¹ a pH 6 určený pre riedenie zásobného roztoku sialidázy- pripravený z 1,2 ml roztoku Na₂HPO₄ o koncentrácii 0,5 mol·l⁻¹ a 4,4 ml roztoku NaH₂PO₄ o koncentrácii 1 mol·l⁻¹, doplnené destilovanou vodou na 50 ml. Roztok fosforečnanu sodného o koncentrácii 0,1 mol·l⁻¹ bol skladovaný pri laboratórnej teplote.
- Roztok HRP značenej anti-mouse IgG protilátky- pripravený zmiešaním HRP značenej anti-mouse IgG protilátky a blokovacieho tlmivého roztoku v pomere 1:2000
- Roztok HRP značenej IgA protilátky- zásobný roztok protilátky Peroxidase-conjugated AffiniPure (F(ab)₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA α Chain

specific (HRP značená IgA protilátka) bola zriedená blokovacím tlmivým roztokom v pomere 1:10000

- Roztok IPTG o koncentrácii $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - riedený destilovanou vodou
- Roztok Na_2HPO_4 o koncentrácii $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - pripravený z 8,95 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a bolo doplnené destilovanou vodou na objem 50 ml
- Roztok NaH_2PO_4 o koncentrácii $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - pripravený z 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a bolo doplnené destilovanou vodou na objem 50 ml
- Roztok sialidázy o koncentrácii $2 \text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$ - pripravený zo zásobného roztoku sialidázy o koncentrácii $5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ a roztoku fosforečnanu sodného o koncentrácii $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 6
- Suspensia regenerovanej Ni-NTA agarózy- Ni-NTA agaróza s natívnym lyzačným tlmivým roztokom v pomere 1:1
- Sterilné 1x PBS- roztok pripravený z 100 ml 10x PBS a 900 ml destilovanej vody
- Sterilný EDTA roztok o koncentrácii $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 8- riedené pomocou destilovanej vody
- Towbinov tlmivý roztok- pripravený z 9 g Tris, 43,2 g glycínu, 600 ml metanolu a doplnené na 3 l destilovanou vodou
- Vyvolávací roztok pre metódu ELISA- pripravený z 5 mg substrátu O-fenyléndiamín dichloridu, 10 ml OPD tlmivý roztok a 10 μl peroxidu vodíka, pričom peroxid vodíka je pridávaný až tesne pred vyvolaním
- Zásobný roztok BSA o koncentrácii $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ - riedené destilovanou vodou

3.1.5 Zoznam použitých pomôcok

- 30 μm filter pre zachytenie bunkových zhlukov (Sysmex, Kóbe, Hjógo, Japonsko)
- 6-jamkový panel (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švajčiarsko)
- 96-jamková mikrotitračná doštička s plochým dnom, maxisorp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- 96-jamkový panel s okrúhlym dnom (SARSTEDT, Newton, North Carolina, USA)
- Aparatúra pre prípravu gélov (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Aparatúra pre SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Automatické jednokanálové a dvanásťkanálové pipety (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

- Blotovacie filtračné papiere (VWR, West Chester, Pennsylvania, USA)
- Čip na triedenie buniek (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA)
- Erlenmayerove banky (Simax, Viedeň, Rakúsko)
- Falkonky o objeme 15 ml (VWR, West Chester, Pennsylvania, USA)
- Falkonky o objeme 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemecko)
- Filter pre účel cytocentrifugácie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Chromatografická kolóna (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Krycie sklíčka (Menzel Gläser, Braunschweig, Nemecko)
- Kyvety o objeme 0,5 l (Himac, Hitačinaka, Ibaraki, Japonsko)
- Laboratórne držiaky (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Laboratórny stojan (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Laboratórne svorky (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Lievikový nadstavec (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Mikroskúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Odmerný valec (Pyrex, Staffordshire, Spojené kráľovstvo)
- Pipety s akumulátorovým pipetovacím nástavcom (Hirschmann, Baden-Württemberg, Nemecko)
- Pipetovacie špičky (Alpha Laboratories, Hampshire, Spojené kráľovstvo)
- Plastový držiak mikroskopických sklíčok pre účel cytocentrifugácie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Polyzínové mikroskopické sklíčka (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- PVDF (polyvinylidéndifluorid) membrána (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- Vacuette EDTA skúmavky (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)

3.1.6 Zoznam použitých prístrojov

- Centrifúgy (Hettich, Tuttlingen, Nemecko)
- Cytocentrifúga (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- Fluorescenčný mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)
- Inkubátor s CO₂ (PHCbi, Wood Dale, Illinois, USA)

- Kultivačná rotačka (Trigon Plus, Čestlice, Česká republika)
- Laminárny Flowbox Aura-VF48 (BioAir, Pero, Taliansko)
- Premývačka mikrodoštičiek (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA)
- Prístroj na sortovanie buniek (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA)
- G:Box Chemi XX9 (Syngene, Cambridge, Spojené kráľovstvo)
- Rolovacia trepačka (CAPPRondo, Nordhausen, Nemecko)
- Spektrofotometer (Lasany International, Haryana, India)
- Stolná centrifúga (MPW, Hebron, Ohio, USA)
- Synergy HTX multi-mode reader (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA)
- Trepačka (Ika, Staufen im Breisgau, Nemecko)
- Ultrazvukový sonikátor (Hielscher, Teltow, Brandenburg, Germany)
- Veľkoobjemová centrifúga (Himac, Hitačínaka, Ibaraki, Japonsko)
- Vortex (Ika, Staufen im Breisgau, Nemecko)
- Zariadenie pre western blot (Hofer, Holliston, Massachusetts, United States)

3.1.7 Zoznam použitých vyhodnocovacích a štatistických programov

- BioTek Gen5 Data Analysis Software (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA)
- GraphPad Prism verzia 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA)
- Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA a Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, Madison, Wisconsin, USA)
- Program Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)

3.2 Metódy

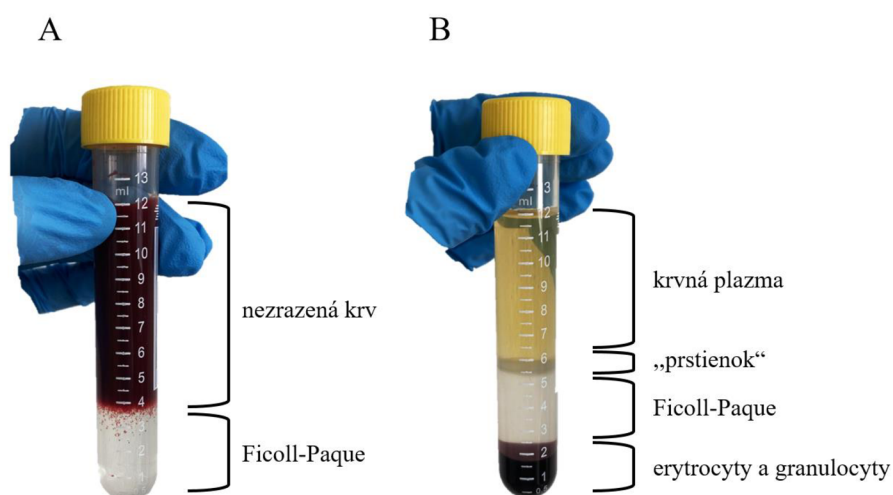
3.2.1 Metódy smerujúce k detekcii populácií T lymfocytov prispievajúcich k produkcii Gd-IgA

3.2.1.1 Izolácia mononukleárnych buniek z periférnej krvi

Izolácia mononukleárnych buniek z periférnej krvi zdravých jedincov a IgA nefropatických pacientov bola uskutočnená na základe protokolu uvedeného

v bakalárskej práci Čutková (2021). Vyžadované boli sterilné podmienky a laminárny flowbox.

1. Nezrazená periférna krv zdravého jedinca alebo IgA nefropatického pacienta z odberových EDTA skúmaviek bola prenesená do falkonky o objeme 50 ml a pridané bolo sterilné Dulbecco's PBS tak, aby výsledný pomer krvi a Dulbecco's PBS bol 3:2. Bolo jemne premiešané.
2. Do falkoniiek o objeme 15 ml bolo pomocou pipety s akumulátorovým pipetovacím nástavcom napipetované po 4 ml roztoku Ficoll-Paque o hustote $1,077 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následne bola navrstvená zriedená krv (Obr. 6A) tak, aby bolo vo všetkých falkonkách približne rovnaké množstvo.
3. Centrifugované bolo 40 minút pri $400 \times g$ a laboratórnej teplote.
4. Po centrifugácii boli odobrané fázy s mononukleárnymi bunkami (lymfocytmi, monocytmi a NK bunkami), ktoré sú označované ako „prstienok“ (Obr. 6B), a boli rovnomerne prerozdelené do falkoniiek o objeme 15 ml.
5. Bolo uskutočnené premývanie. K mononukleárnym bunkám bolo doplna pridané Dulbecco's PBS a bolo centrifugované 15 minút pri $200 \times g$ a laboratórnej teplote.
6. Po centrifugácii bol supernatant odsatý a k peletám bolo opäť doplna falkonky pridané Dulbecco's PBS. Centrifugované bolo pri rovnakých podmienkach ako v predošlom bode a supernatant znova odsatý.



Obr. 6: Izolácia mononukleárných buniek z periférnej krvi pomocou centrifugácie v hustotnom gradiente. Na Obr. 6A možno pozorovať krv pred centrifugáciou, ktorá je navrstvená na roztok Ficoll-Paque o hustote $1,077 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na Obr. 6B možno pozorovať tri oddelené fázy krvi po centrifugácii. Mononukleárne bunky sú sústredené vo fáze „prstienok“.

3.2.1.2 Sortovanie vybraných populácií buniek a ich stimulácia pomocou IL-6, IL-21 a CD40-L

Sortovanie buniek bolo realizované na základe manuálu Cell Sorter Operator's Guide (2015) a optimalizované pre potreby tejto diplomovej práci. Práca s bunkami vyžadovala sterilné podmienky a laminárny flowbox.

7. Nešpecifické väzby v podobe Fc receptorov na mononukleárných bunkách boli blokované pomocou 10 % tepelne spracovaného ľudského séra, pričom do každej falkonky bolo pridaných 50 μ l. Po 10 minútovej inkubácii bolo uskutočnené premytie, pridané bolo Dulbecco's PBS a centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote.
8. Pelety boli rozsuspendované a zjednotené pomocou 100 μ l 5 % FBS.
9. Pred sortovaním boli bunky špecificky farbené. Do 5 % roztoku FBS s bunkami boli pridané protilátky spojené s fluorofórom- 1 μ l protilátky FVD-421 na rozlíšenie, či sú bunky živé alebo mŕtve, 5 μ l fluorescenčne značenej protilátky Anti-Human-CD19-PE-CF594, 5 μ l fluorescenčne značenej protilátky Anti-Human-CD3-BV510 a 5 μ l fluorescenčne značenej protilátky Anti-Human-CD4-BV765. Bunky s protilátkami boli ponechané 30 minút v tme.
10. Po 30 minútovej inkubácii bolo uskutočnené premytie. Pridaných bolo 5 ml Dulbecco's PBS a centrifugované bolo 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
11. K nafarbeným bunkám pred sortovaním bol pridaný 1 ml roztoku FBS a EDTA za účelom predchádzania lepenia buniek o stenu skúmavky a vytvárania bunkových zhlukov. Následne bol roztok s bunkami prefiltrovaný cez 30 μ m filter na zachytenie bunkových zhlukov.
12. Bol zapnutý prístroj na sortovanie buniek a bola uskutočnená jeho denná údržba a doplnenie všetkých prevádzkových kvapalín, ako nosná kvapalina, destilovaná voda či 70 % etanol. Vložený bol taktiež čip na triedenie buniek.
13. Kalibrácia prístroja bola uskutočnená pomocou roztoku „automatic setup beads“.
14. V softvéri na ovládanie prístroja boli následne zvolené lasery 405 nm a 488 nm. Taktiež boli vybrané fluorochrómy, na základe ktorých boli identifikované záujmové populácie.
15. Pomocou prietokovej cytometrie, ktorá je súčasťou prístroja pre sortovanie buniek, boli charakterizované záujmové bunkové populácie. Výber cieľových

bunkových populácii je opísaný v kapitole 4.1. Následne boli bunky sortované do kompletného kultivačného RPMI média o objeme 1 ml. Každá populácia buniek bola triedená do falkonky zvlášť. K vysortovaným populáciám buniek patrili:

- živé celkové lymfocyty o počte 100 000 buniek
- živé CD19+ bunky o počte 100 000 a 75 000
- živé CD4+ bunky o počte 25 000

16. CD19+ bunky o počte 75 000 boli spojené s CD4+ bunkami o počte 25 000, teda v pomere 3:1 na základe protokolu v článku Dienz et al. (2009).
17. Všetky populácie buniek v kompletnom kultivačnom RPMI médiu boli centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
18. K peletám bolo pridaných 200 μ l kompletného kultivačného RPMI média a v ňom boli bunky rozsuspendované. Roztok s bunkami bol prepipetovaný do jamiek v 96-jamkovom paneli s okrúhlym dnom.
19. Bunky boli nastimulované pomocou IL-6, IL-21 a CD40-L. Koncentrácia IL-6 predstavovala 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ kompletného kultivačného RPMI média, koncentrácia IL-21 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a koncentrácia CD40-L 1 000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inkubované bolo 6 dní pri 37 °C a 5 % CO₂.
20. Po 6-dňovej inkubácii boli odobraté supernatanty a zamrazené na -20 °C.

3.2.1.3 Stanovenie koncentrácie IgA pomocou metódy sendvičová ELISA

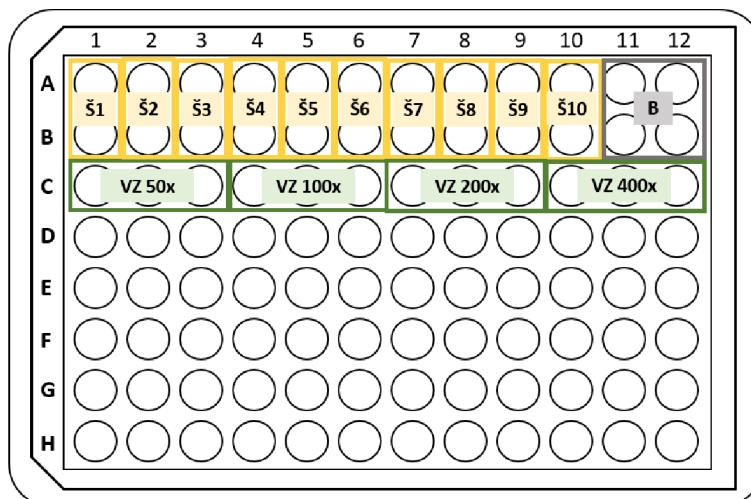
Metóda sendvičová ELISA na stanovenie koncentrácie IgA bola uskutočnená podľa optimalizovaného protokolu Ústavu imunológie LF UP v Olomouci.

1. deň

1. Na polystyrénovú membránu v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke s plochým dnom bolo nanosených 100 μ l protilátky AffiniPure F(ab)₂ Fragment Goat Anti Human, Serum IgA α Chain specific o koncentracii 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
2. Inkubované bolo cez noc v chladiacej miestnosti pri 4 °C.

2. deň

3. Doštička bola vytemperovaná na laboratórnu teplotu.



Obr. 7: Rozloženie štandardu a vzorky na doštičke pri meraní koncentrácie IgA pomocou metódy sendvičová ELISA. „Š1“ je štandard o koncentrácii $18,4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ napipetovaný v duplikáte, „Š2“ je štandard o koncentrácii $9,2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ napipetovaný v duplikáte a tak ďalej. „B“ predstavuje blank. „VZ 50x“ je vzorka zriedená blokovacím tlmivým roztokom v pomere 1:50 a napipetovaná v triplikáte. „VZ 100x“, „VZ 200x“ a „VZ 400x“ sú vzorky zriedené v pomere 1:100, 1:200 a 1:400 taktiež pipetované v triplikáte.

4. Bolo uskutočnené 5-krát premývanie na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS.
5. Blokovanie bolo uskutočnené s 275 μl blokovacieho tlmivého roztoku a inkubované 3 hodiny pri laboratórnej teplote. Následne bol blokovací tlmivý roztok vyklepaný z doštičky.
6. Do každej jamky bolo napipetované po 100 μl blokovacieho tlmivého roztoku.
7. Štandard ChromPure Human IgA o pôvodnej koncentrácii $4,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol zriedený blokovacím tlmivým roztokom v pomere 1:125 000.
8. Vzorky so supernatantom, získané v kapitole 3.2.1.2 v bode číslo 20, boli zriedené v pomere 1:25 blokovacím tlmivým roztokom.
9. V duplikáte bolo napipetovaných 100 μl štandardu (výsledné riedenie štandardu teda bolo 1:250 000). V nasledujúcich susedných jamkách bol štandard vždy dvojnásobne zriedený a výsledná koncentrácia štandardu bola 18,4; 9,2; 4,6; 2,3; 1,2; 0,6; 0,3; 0,14; 0,07 a $0,04 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 7).
10. V triplikáte bolo napipetovaných 100 μl vzorky (výsledné riedenie vzorky teda bolo 1:50). Do nasledujúcich susedných jamiek bola vzorka nariedená ešte 100x, 200x a 400x (Obr. 7).
11. Inkubované bolo cez noc v chladiacej miestnosti.

3. deň

12. Ráno bola doštička a blokovací tlmivý roztok vytemperované na laboratórnú teplotu.
13. Doštička bola 5-krát premytá na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS s 0,05 % Tweenom 20. Po poslednom premytí boli zvyšky roztoku vyklepané.
14. Do jamiek bolo pridaných 100 μl roztoku s HRP značenou anti-IgA protilátkou.
15. Bolo inkubované 2-3 hodiny pri laboratórnej teplote.
16. Následne bola doštička 5-krát premytá na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS s 0,05% Tweenom a 5-krát pomocou PBS.
17. Do jamiek bolo napipetovaných 100 μl vyvolávajúceho roztoku pre metódu ELISA.
18. Vyvolávacia reakcia bola zastavená pomocou 100 μl roztoku 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny sírovej.
19. Prístroj Synergy HTX multi-mode reader bola pri vlnovej dĺžke 492 nm zmeraná absorbanca blanku, štandardu a vzoriek.

3.2.1.4 Stanovenie koncentrácie Gd-IgA pomocou metódy sendvičová ELISA

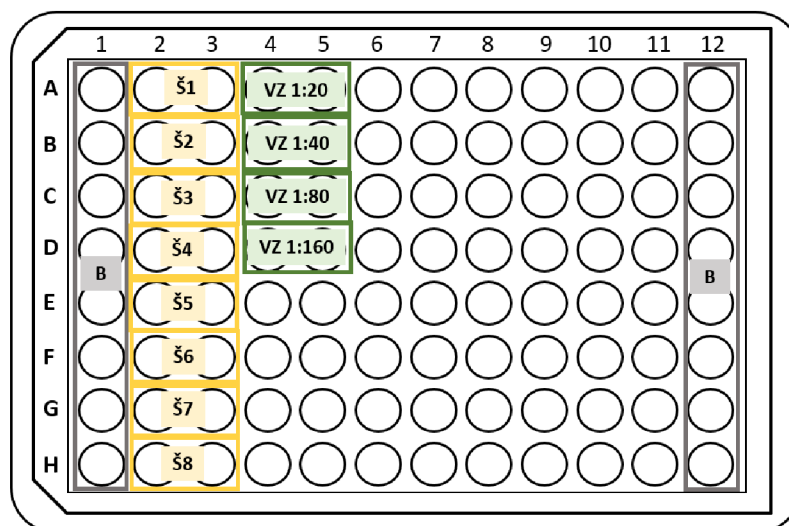
Metóda sendvičová ELISA na stanovenie koncentrácie Gd-IgA bola uskutočnená podľa optimalizovaného protokolu Ústavu imunológie LF UP v Olomouci.

1. deň

1. Na polystyrénovú membránu v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke s plochým dnom bolo nanosených 100 μl protilátky AffiniPure F(ab)₂ Fragment Goat Anti Human, Serum IgA α Chain specific o koncentrácii 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
2. Inkubované bolo cez noc v chladiacej miestnosti pri 4 °C.

2. deň

3. Doštička bola vytemperovaná na laboratórnú teplotu.
4. Bolo uskutočnené 5-krát premývanie na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS.
5. Blokovanie bolo uskutočnené s 275 μl blokovacieho tlmivého roztoku a inkubované 3 hodiny pri laboratórnej teplote. Následne bol blokovací tlmivý roztok vyklepaný z doštičky.
6. Do každej jamky bolo napipetované po 100 μl blokovacieho tlmivého roztoku.



Obr. 8: Rozloženie štandardu a vzorky na doštičke pri meraní koncentrácie Gd-IgA pomocou metódy sendvičová ELISA. „Š1“ je štandard o koncentrácii $1156,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ napipetovaný v duplikáte, „Š2“ je štandard o koncentrácii $578,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ napipetovaný v duplikáte a tak ďalej. „B“ predstavuje blank. „VZ 1:20“ je vzorka zriedená blokovacím tlmivým roztokom v pomere 1:20 a napipetovaná v duplikáte, „VZ 1:40“ je vzorka zriedená blokovacím tlmivým roztokom v pomere 1:40 a napipetovaná v duplikáte a tak ďalej.

7. Štandard pIgA Ale o pôvodnej koncentrácii $0,5087 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol zriedený tak, že do $220 \mu\text{l}$ blokovacieho tlmivého roztoku bol pridaný $1 \mu\text{l}$ štandardu.
8. Vzorky so supernatantom, získané v kapitole 3.2.1.2 v bode číslo 20, boli riedené v pomeroch 1:10.
9. V duplikáte bolo napipetovaných $100 \mu\text{l}$ štandardu a bolo premiešané. Následne bolo odobratých $100 \mu\text{l}$ a prenesených do vedľajšej jamky, čím bol štandard dvojnásobne zriedený oproti predošlej jamke. Výsledná koncentrácia štandardu teda bola $1156,1; 578,1; 289,0; 144,5; 72,3; 36,1; 18,1$ a $9,0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 8).
10. V duplikáte bolo napipetovaných $100 \mu\text{l}$ vzorky a bolo premiešané. Následne bolo odobratých $100 \mu\text{l}$ a prenesených do vedľajšej jamky, čím bola vzorka dvojnásobne zriedená oproti predošlej jamke. Tento proces zriedovania sa opakoval ešte s ďalšími dvomi jamkami. Výsledné riedenie vzorky bolo 1:20, 1:40, 1:80 a 1:160 (Obr. 8).
11. Inkubované bolo cez noc v chladiacej miestnosti pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. deň

12. Doštička bola vytemperovaná na laboratórnu teplotu a 5-krát premytá na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS. Po poslednom premytí boli zvyšky premývacieho roztoku vyklepané.

13. Do jamiek so vzorkami a štandardom bolo napipetovaných 100 μl roztoku so sialidázou o koncentrácii 2 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do ostatných jamiek bolo napipetovaných 100 μl roztoku fosforečnanu sodného o koncentrácii 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Inkubované bolo 3 hodiny pri 37 °C.
14. Po inkubácii bola doštička premytá na premývačke mikrodoštičiek 5-krát pomocou 1x PBS a zvyšky roztoku boli vyklepané.
15. Nanesených bolo 100 μl roztoku protilátky 35A12, ktorý bol pripravený zriedením jej zásobného roztoku pomocou blokovacieho tlmivého roztoku v pomere 1:2000, a inkubované bolo cez noc v chladiacej miestnosti pri 4 °C.

4. deň

16. Doštička a blokovací tlmivý roztok boli vytemperované na laboratórnu teplotu.
17. Doštička bola 5-krát premytá na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS, po poslednom premytí boli zvyšky roztoku vyklepané.
18. Do jamiek bolo pridaných 100 μl roztoku HRP značenej anti-mouse IgG protilátky v blokovacom tlmivom roztoku.
19. Inkubované bolo 2-3 hodiny pri laboratórnej teplote.
20. Následne bola doštička 5-krát premytá na premývačke mikrodoštičiek pomocou 1x PBS s 0,05% Tweenom a 5-krát pomocou 1x PBS.
21. Do jamiek bolo napipetovaných 100 μl vyvolávajúceho roztoku pre metódu ELISA.
22. Vyvolávacia reakcia bola zastavená pomocou 100 μl roztoku 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny sírovej.
23. Pomocou prístroja Synergy HTX multi-mode reader bola pri vlnovej dĺžke 492 nm zmeraná absorbanca blanku, štandardu a vzoriek.

3.2.2 Metódy analýzy ľahkých reťazcov Gd-IgA u IgA+ lymfocytov po stimulácii buniek IL-6

Fixácia, farbenie buniek a ich pozorovanie pod fluorescenčným mikroskopom boli realizované pomocou optimalizovaných protokolov Ústavu imunológie LF UP v Olomouci a pomocou novovytvorených protokolov uvedených v tejto práci.

3.2.2.1 Izolácia buniek z periférnej krvi a ich stimulácia pomocou IL-6

1. Bunky z nezrazenej periférnej krvi IgA nefropatických pacientov o objeme približne 9 ml boli vyizolované podľa metódy opísanej v podkapitole 3.2.1.1.
2. Peleta s bunkami bola rozsusedovaná v kompletnom kultivačnom RPMI médiu o množstve 1 ml média na 1-2 milióny buniek.
3. Do jamiek v 6-jamkovom paneli bolo napipetovaných 5 až 7 ml roztoku buniek v kompletnom kultivačnom RPMI médiu.
4. Do jamiek bol pridaný IL-6, pričom koncentrácia IL-6 predstavovala 10 ng na 1 ml média.
5. Bunky stimulované IL-6 boli kultivované týždeň v inkubátore pri 37 °C a pri 5 % CO₂.

3.2.2.2 Fixácia buniek na mikroskopických sklíčkach

1. Bunky získané v kapitole 3.2.2.1 v bode číslo 5 boli premyté pomocou Dulbecco's PBS a centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý (v ďalších bodoch tento proces pod pojmom „premytie buniek“).
2. K bunkovej pelete bolo pridané Dulbecco's PBS o množstve 100 µl na približne 200 000 buniek a bolo rozsuspendované.
3. Bunky v roztoku boli na polyzínové mikroskopické sklíčka koncentrované pomocou cytocentrifúgy. Do každého plastového držiaku s mikroskopickým sklíčkom a filtrom bolo napipetovaných 100 µl roztoku s približne 200 000 bunkami. Cytocentrifugované bolo 3 minúty pri 200 x g a laboratórnej teplote.
4. Bunky na sklíčkach boli fixované pomocou 4 % roztoku paraformaldehydu 10 minút pri laboratórnej teplote. Následne boli premyté s 50 µl Dulbecco's PBS, vysušené a uskladnené do mrazničky pri teplote -20 °C.

3.2.2.3 Intracelulárne farbenie IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov

1. Sklíčka s bunkami získané v kapitole 3.2.2.2 v bode číslo 4 boli rozmrazené na buničine.
2. Za účelom blokácie nešpecifických väzieb bolo na sklíčko s bunkami pridaných 50 µl 10 % ľudskeho séra a 10 minút bolo inkubované pri laboratórnej teplote.
3. Sklíčko boli premyté pomocou 50 µl Dulbecco's PBS a po 5 minútach bolo odklepané.

4. Biotinylovaná IgA protilátka bola pridaná do 5 % FBS tak, aby jej zriedenie bolo 100x a 50 µl takto pripraveného roztoku bolo nanosených na bunky na sklíčku a inkubované 45 minút pri laboratórnej teplote a vo vlhkom prostredí (respektíve cez noc pri 4 °C a vo vlhkom prostredí).
5. Roztok s biotinylovanou IgA protilátkou bol odklepnutý a 3-krát bolo uskutočnené 5 minútové premývanie s 50 µl Dulbecco's PBS.
6. Do 5 % FBS bol pridaný streptavidin-FITC tak, aby jeho zriedenie bolo 1 000x a rovnako bola pridaná protilátka proti ľahkému reťazcu imunoglobulínu λ, anti-lambda-TRITC, tak, aby jej zriedenie bolo 200x. Na bunky na sklíčku bolo nanosených 50 µl tohto roztoku so streptavidinom-FITC a protilátkou anti-lambda-TRITC a inkubované bolo 45 minút pri laboratórnej teplote vo vlhkom prostredí a v tme.
7. Roztok so streptavidinom a protilátkou bol odklepnutý a bolo uskutočnené 3-krát 5 minútové premývanie s 50 µl Dulbecco's PBS.
8. Sklíčko bolo premyté destilovanou vodou, voda bola odklepnutá a bolo ponechané uschnúť.
9. Po vysušení bolo na mikroskopické sklíčko nanosené montovacie médium s DAPI, prikryté bolo krycím sklíčkom a bunky boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom.

3.2.2.4 Povrchové farbenie Gd-IgA+, IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov

1. Bunky získané v kapitole 3.2.2.1 v bode číslo 5 boli premyté.
2. Nešpecifické väzby v podobe Fc receptorov buniek boli blokové 10 minút pomocou 50 µl 10 % tepelne spracovaného ľudskeho séra. Po inkubácii boli bunky premyté.
3. K pelete bolo pridaných 100 µl 5 % FBS a protilátka 35A12, ktorá bola zriedená 100x. Inkubované bolo 30 minút pri 37 °C.
4. Na ďalších 30 minút pri 37 °C bola k bunkám v roztoku 5 % FBS s protilátkou 35A12 pridaná ďalšia protilátka, biotinylovaná IgA. Po inkubácii bolo uskutočnené premytie buniek.
5. K pelete bolo pridaných 100 µl 5 % FBS a protilátky anti-mouse-IgG-FITC zriedená 200x, anti-lambda-TRITC zriedená 200x a streptavidin-APC-R700

zriedený 200x. Inkubované bolo 45 minút pri laboratórnej teplote a následne bolo uskutočnené premytie buniek.

6. Bunky boli prenesené a fixované na mikroskopických sklíčkach pomocou 4 % paraformaldehydu podľa postupu opísaného v kapitole 3.2.2.2.
7. Po fixácii bolo uskutočnené 5 minútové premytie s 50 µl Dulbecco's PBS a následne prepláchnutie s destilovanou vodou.
8. Po vysušení bolo na mikroskopické sklíčko nanesené montovacie médium s DAPI, prikryté bolo krycím sklíčkom a bunky boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom.

3.2.2.5 Farbenie spojovacieho reťazca, Gd-IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov

1. deň

1. Bunky získané v kapitole 3.2.2.1 v bode číslo 5 boli premyté.
2. Nešpecifické väzby v podobe Fc receptorov buniek boli blokové 10 minút pomocou 50 µl 10 % tepelne spracovaného ľudského séra. Po inkubácii bolo uskutočnené premytie.
3. K pelete bolo pridaných 100 µl 5 % FBS a 2 µl biotinylovanej 35A12 protilátky, ktorá bola zriedená 100x. Inkubované bolo 1 hodinu pri 37 °C a následne bolo uskutočnené premytie buniek.
4. K pelete bolo pridaných 100 µl 5 % FBS a protilátky anti-lambda-TRITC zriedenej 200x a streptavidinu-APC-R700 taktiež zriedeného 200x. Inkubované bolo 45 minút pri laboratórnej teplote. Po inkubácii bolo uskutočnené premytie.
5. Bunky boli fixované vo falkonke pomocou 4 % paraformaldehydu 10 minút pri laboratórnej teplote v tme a po fixácii boli bunky premyté.
6. K pelete bolo pridaných 50 µl Dulbecco's PBS a na noc uskladneno pri 4 °C v tme.

2. deň

1. Bunky boli centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
2. Pridaný bol na 10 minút 1x permeabilizačný tlmivý roztok. Následne boli bunky boli centrifugované 5 minút pri 320 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.

3. Pridaný bol citrátový tlmivý roztok a bunky v tomto roztoku boli zahriate 5 minút na 96 °C. Ďalších 15 minút boli bunky ponechané schladnúť pri laboratórnej teplote a v tme.
7. Bolo uskutočnené premytie buniek.
4. Bunky boli resuspendované v 1x permeabilizačnom tlmivom roztoku s 2 % FBS a pridaná bola protilátka rabbit anti-human-J-chain zriedená 100x. Bolo inkubované na dobu 15 minút a v tme. Následne bolo uskutočnené premytie buniek.
5. Bunky boli resuspendované v 1x permeabilizačnom tlmivom roztoku s 2 % FBS a pridaná bola sekundárna protilátka goat anti-rabbit-IgG-AF-488 zriedená 1000x. Inkubované bolo 30 minút a v tme. Následne boli bunky premyté.
6. Na mikroskopické sklíčko boli bunky koncentrované pomocou metódy opísanej v kapitole 3.2.2.2 v bodoch číslo 2 a 3.
7. Po vysušení bolo na mikroskopické sklíčko nanesené montovacie médium s DAPI, prikryté bolo krycím sklíčkom a bunky boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom.

3.2.3 Metódy produkcie a purifikácie proteínu CH1-HR-CH2 pri natívnych podmienkach

Proteín CH1-HR-CH2 je rekombinantná časť IgA, ktorú možno sacharidovo modifikovať. Bola by tak získaná HR Gd-IgA, ktorá by potencionálne mohla byť využitá ako protilátka na detekciu anti-Gd-IgA+ B lymfocytov. Produkcia a purifikácia proteínu CH1-HR-CH2 bola uskutočnená podľa knižného návodu QIAexpressionist (2003) a optimalizovaných protokolov Ústavu imunológie LF UP v Olomouci.

3.2.3.1 Namnoženie štartovacej bakteriálnej kultúry a indukcia produkcie proteínu CH1-HR-CH2

1. deň

1. Pomocou odmerného valca bolo odmeraných 100 ml LB média o koncentrácii 25 g·l⁻¹ s ampicilínom a prenesených do 250 ml Erlenmayerovej banky. Rovnako ďalších 100 ml LB média s ampicilínom bolo odmeraných a prenesených do druhej Erlenmayerovej banky.

2. LB média s ampicilínom o objeme 20 ml bolo prenesených do tretej 250 ml Erlenmayerovej banky, ktorá slúžila ako negatívna kontrola.
3. Zmrazená bakteriálna kultúra *E. coli*, ktorá predstavovala expresný systém pET101 s vloženou sekvenciou pre kódovanie proteínu CH1-HR-CH2, bola rozmrazená a doplnená LB médiom s ampicilínom tak, aby konečný objem bol cca 500 μ l.
4. Do dvoch Erlenmayerových baniek so 100 ml LB média s ampicilínom bolo pridaných 220 μ l roztoku s bunkami a štartovacia kultúra bola inkubovaná cez noc na kultivačnej rotačke pri teplote 37°C.

2. deň

6. Na ďalší deň bol z mrazničky vytiahnutý roztok IPTG o koncentrácii 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a zahrievaný pri teplote 37°C.
7. Za sterilných podmienok v laminárnom flow boxe bolo do Erlenmayerových baniek o objeme 2 l pridaných 450 ml LB média s ampicilínom a následne bolo pridaných 50 ml štartovacej bakteriálnej kultúry.
8. Baktérie boli ponechané rásť približne 2 hodiny na kultivačnej rotačke pri teplote 37°C. V priebehu rastu bola meraná hodnota optickej hustoty pri vlnovej dĺžke 600 nm (OD_{600}) pomocou spektrofotometra- hodnota OD_{600} bola meraná po 1 hodine, po 1 hodine a 30 minútach, po 1 hodine a 45 minútach a po 1 hodine a 55 minútach od začiatku kultivácie, pričom 1 ml negatívnej kontroly poslužil ako blank a na meranie OD_{600} bol použitý 1 ml bakteriálnej kultúry.
9. Po dosiahnutí rozmedzia hodnoty OD_{600} 0,6-0,8; bol pridaný roztok IPTG o koncentrácii 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a množstve 10 ml na 1 l bakteriálnej kultúry.
10. Po 4 hodinách inkubácie na kultivačnej trepačke pri 37°C, boli bakteriálne kultúry scentrifugované vo veľkoobjemovej centrifúge v kyvetách o objeme 0,5 l 15 minút pri 8 000 x g a 4°C (alternatívne možno centrifugovať aj 10 minút pri 10 000 x g a 4°C). Supernatant bol odliaty do dezinfekčného prostriedku Sava.
11. Bunky boli premyté pomocou 1x PBS a centrifugované 15 minút pri 8 000 x g a 4°C. Supernatant bol odliaty do dezinfekčného prostriedku Sava.
12. Pridaný bol natívny lyzačný tlmivý roztok o množstve 10 ml roztoku na 1 g pelety.
13. Baktérie boli v natívnom lyzačnom tlmivom roztoku resuspendované a následne zamrazené.

3.2.3.2 Homogenizácia bakteriálnej kultúry

1. deň

1. Transformované indukované baktérie *E. coli* v natívnom lyzačnom tlmivom roztoku boli po rozmrazení premiešané a rozdelené do troch falkoniiek o objeme 50 ml.
2. Následne boli 25-krát sonikované pomocou ultrazvukového sonikátora po 15 sekúnd s pauzami trvajúcimi 1-2 minúty. Počas páuz bol lyzát umiestnený na ľade, aby nedochádzalo k jeho prehrievaniu.
3. Po sonikácii bol lyzát centrifugovaný 25 min pri 15 550 x g a teplote 4°C.
4. Supernatant z falkoniiek bol odliaty do dvoch čistých falkoniiek. Pelety boli odložené do mrazničky pri -20°C na ďalšie použitie.

3.2.3.3 Purifikácia proteínu CH1-HR-CH2

1. deň

5. K supernatantu získaného po homogenizácii bakteriálnej kultúry bola pridaná suspenzia regenerovanej Ni-NTA agarózy o množstve 1 ml na 10 ml supernatantu, respektíve 1 ml suspenzie Ni-NTA agarózy na 1 g bunkovej pelety, a následne bola táto zmes umiestnená na 1 hodinu na rolovaciu trepačku do chladiacej miestnosti o teplote 4°C.
6. Prázdna chromatografická kolóna bola ekvilibrovaná s približne 20 ml deionizovanej vody a následne bola svorkami a držiakmi upevnená na laboratórny stojan. Pripojený bol lievikový nadstavec pre lepšie nalievanie zmesi supernatantu a regenerovanej Ni-NTA agarózy do kolóny.
7. Supernatant so suspenziou regenerovanej Ni-NTA agarózy bol nanesený na chromatografickú kolónu a voľným pretečením bola zozbieraná frakcia „flow through“.
8. Pridaný bol objem premývacieho tlmivého roztoku v ml, ktorého množstvo bolo vypočítané ako 20-krát hmotnosť pelety v gramoch. Najprv bol pridaný do falkoniiek, v ktorých sa predtým nachádzal supernatant so suspenziou regenerovanej Ni-NTA agarózy. Takto boli falkonky premyté a následne bol premývací tlmivý roztok nanesený na kolónu. Po pretečení chromatografickou kolónou bola zozbieraná frakcia „wash“.

9. K elúcii záujmového rekombinantného proteínu CH1-HR-CH2 bol využitý elučný tlmivý roztok, pričom bolo pridané množstvo odpovedajúce 10 ml tohto roztoku na 1 l bakteriálnej kultúry. Pre 2 l bakteriálnej kultúry bolo teda pridaných 20 ml elučného tlmivého roztoku. Získaných bolo 10 frakcií o objeme 2 ml označené ako „elúcia 1“, „elúcia 2“, „elúcia 3“ až po „elúciu 10“.
10. Frakcie flow-through, wash a elúcie boli uskladnené do chladiacej miestnosti pri 4°C.

3.2.3.4 Príprava gélov pre SDS-PAGE

1. deň

11. Zostavená bola aparátúra pre prípravu gélov.
12. 12 % deliaci gél bol pripravený z 5,25 ml destilovanej vody; 6 ml 30 % akrylamidbisakrylamidu; 3,75 ml 4 x Tris tlmivého pH 8,8; 75 µl 10 % vodného roztoku persíranu amónneho a 15 µl TEMEDu. Výsledná zmes bola napipetovaná medzi sklá. Bublínky boli odstránené butanolom a gél bol ponechaný 20 minút schnúť.
13. Po stvrdnutí gélu bol butanol vymytý destilovanou vodou a voda odstránená pomocou filtračného papiera.
14. 4 % zaostrovací gél bol pripravený z 6,2 ml destilovanej vody; 1,3 ml 30 % akrylamidbisakrylamidu; 2,5 ml 4 x Tris tlmivého roztoku o pH 6,8; 50 µl 10 % vodného roztoku persíranu amónneho a 10 µl TEMEDu. Výsledná zmes bola napipetovaná medzi sklá a ihneď boli vložené hrebene. Gél bol ponechaný stvrdnúť.
15. Gély boli cez noc uchované v elektródovom tlmivom roztoku a v chladiacom priestore.

3.2.3.5 SDS-PAGE za účelom identifikácie proteínov v jednotlivých frakciách získaných purifikáciou

2. deň

16. Z každej frakcie získanej po purifikácii bolo odoberatých 50 µl do mikroskúmaviiek o objeme 1,5 ml.
17. Z pôvodnej pelety bolo špičkou pipety odoberaté malé množstvo.

18. Do každej mikroskúmavky bolo pridaných 50 µl 2x SDS vzorkovacieho tlmivého roztoku.
19. Vzorky boli zahriaté na 95°C po dobu 5 minút, zvertexované a stočené na stolnej centrifúge. Nanášané na gél boli až po ich vychladnutí na laboratórnu teplotu.
20. Bola zostavená aparátúra pre SDS-PAGE a do nej naliaty elektródový tlmivý roztok.
21. Do jamiek bolo napipetovaných 5 µl štandardu pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti, ďalej 8 µl elúcie 1, elúcie 2, elúcie 3 až elúcie 10, frakcie flow through, frakcie wash a pelety.
22. Elektroforéza prebiehala približne 1 hodinu pri napätí 140 V.
23. Po zastavení elektroforézy bol gél vybratý a jeho zaostrovacia časť odstránená.

3.2.3.6 Farbenie gélu pomocou farbiva Coomassie Brilliant Blue

2. deň

24. Gél bol 10 minút fixovaný vo fixačnom tlmivom roztoku na trepačke.
25. Fixačný tlmivý roztok bol odliaty a na 20-30 minút bola pridané farbivo Coomassie Brilliant Blue za stáleho trepania.
26. Farbivo bolo odliate späť do zásobnej fľaše a pridaný bol odfarbovací roztok.
27. Odfarbovanie bolo uskutočnené niekoľkokrát a gély boli následne vyfotené pomocou kopírky.

3.2.3.7 Western blot a identifikácia záujmového proteínu CH1-HR-CH2 na membráne

2. deň

28. Druhý gél získaný pri elektroforéze bol umiestnený na 10 minút do Towbinoveho tlmivého roztoku na trepačke.
29. PVDF membrána bola premytá v metanole a následne vložená na 10 minút do Towbinoveho tlmivého roztoku.
30. Do Towbinoveho tlmivého roztoku boli na pár minút za stáleho trepania vložené aj blotovacie filtračné papiere.
31. Na zariadení pre western blot bol umiestnený ako prvý blotovací filtračný papier, na ktorý bola položená membrána, na ňu gél a opäť blotovací filtračný papier.

32. Western blot prebiehal pol hodinu pri 60 mA, ak boli dve membrány, tak pri 120 mA, a maximálne 25 V.
33. PVDF membrána po western blote bola blokovaná cez noc v chladiacej miestnosti pri 4°C pomocou 5 % roztoku sušeného mlieka s 0,05 % Tweenom za stáleho trepania.

3. deň

34. K PVDF membráne bola pridaná Penta-His HRP konjugovaná protilátka, pričom riedená bola pomocou roztoku sušeného mlieka v pomere približne 1:10 000 a inkubované bolo 1,5 hodiny na trepačke pri laboratórnej teplote.
35. Roztok sušeného mlieka bol odliaty a uskutočnené bolo 4-krát premývanie v roztoku 1x PBS s 0,05 % Tweenom po 20 minút a následné 2-krát premývanie v 1x PBS po 15 minút.
36. Pridaný bol chemiluminiscenčný substrát o množstve 2 ml roztoku luminol/zosilňovač + 2 ml stabilného roztoku peroxidu a 5 minút bolo pretrepané.
37. Membrána bola vložená do fólie a vyfotená na prístroji G:Box Chemi XX9.

3.2.3.8 Zakoncentrovanie proteínu

1. Elúcie 1-10 získané v kapitole 3.2.3.3 boli zlúčené a centrifugované v špeciálnej falkonke s filtrom prepúšťajúcim len proteíny menšie ako 10 kDa pri 6 000 x g a 4°C.
2. Po zakoncentrovaní bol proteín premytý 2-krát pomocou 5 ml 1x PBS a opäť bol zakoncentrovaný centrifugáciou.
3. Proteín bol uskladnený pri 4°C.

3.2.3.9 Meranie koncentrácie celkových proteínov

1. Pripravené boli kalibračné roztoky BSA o koncentráciách 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250, 125, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ podľa protokolu PierceTM BCA Assay Kit.
2. Blank predstavoval roztok PBS.
3. Kalibračné roztoky BSA, blank a vzorka so zakoncentrovaným proteínom získaná v kapitole 3.2.3.8 boli napipetované do 96-jamkového panelu s plochým dnom a pridané k nim boli činidlá o množstve, ktoré je udávané v protokole PierceTM BCA Assay Kit.

4. 96-jamkový panel bol 30 sekúnd pretrepaný a následne inkubovaný 30 minút pri 37°C.
5. Absorbancia bola meraná pomocou prístroja Synergy HTX multi-mode reader pri 562 nm.

3.2.3.10 Špecifické meranie koncentrácie proteínu pomocou SDS-PAGE

1. Zo zásobného roztoku BSA o koncentrácii 0,25 mg·ml⁻¹ bolo do štyroch mikroskúmaviek napipetovaných 4 µl; 2 µl; 1 µl; 0,5 µl a 0,25 µl. Následne boli objemy doplnené PBS tak, aby v každej mikroskúmavke bol konečný objem 4 µl.
2. Vzorky boli pripravené napipetovaním 2 µl a 4 µl roztoku so záujmovým proteínom, pripraveným v kapitole 3.2.3.8, a následne boli objemy doplnené PBS tak, aby v každej mikroskúmavke bol konečný objem 4 µl.
3. Do každej mikroskúmavky bolo napipetované po 4 µl 2x SDS vzorkovacieho tlmivého roztoku.
4. Pripravené roztoky boli zvortexované, stočené na stolnej centrifúge a 5 minút povarené pri 95°C.
5. Bola zostavená aparátúra pre SDS-PAGE a do nej naliaty elektródový tlmivý roztok.
6. Do jamiek bolo napipetovaných 5 µl štandardu pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti a po 8 µl roztokov s BSA o konečnej hmotnosti proteínu 1; 0,5; 0,25; 0,125 a 0,063 µg a 8 µl vzorky nezriedenej a 2x zriedenej.
7. Elektroforéza prebiehala pri 150 V približne 1 hodinu.
8. Po vypnutí elektroforézy bol gél vybratý, jeho zaostrovacia časť odstránená a 10 minút bol fixovaný vo fixačnom tlmivom roztoku na trepačke.
9. Fixačný tlmivý roztok bol odliaty a na noc bola pridaná farbička Coomassie Brilliant Blue za stáleho trepania.

2. deň

10. Ráno bola farbička odliata späť do zásobnej fľaše a pridaný bol odfarbovací roztok.
11. Odfarbovanie bolo uskutočnené niekoľkokrát a gél následne vyfotený.

4 VÝSLEDKY

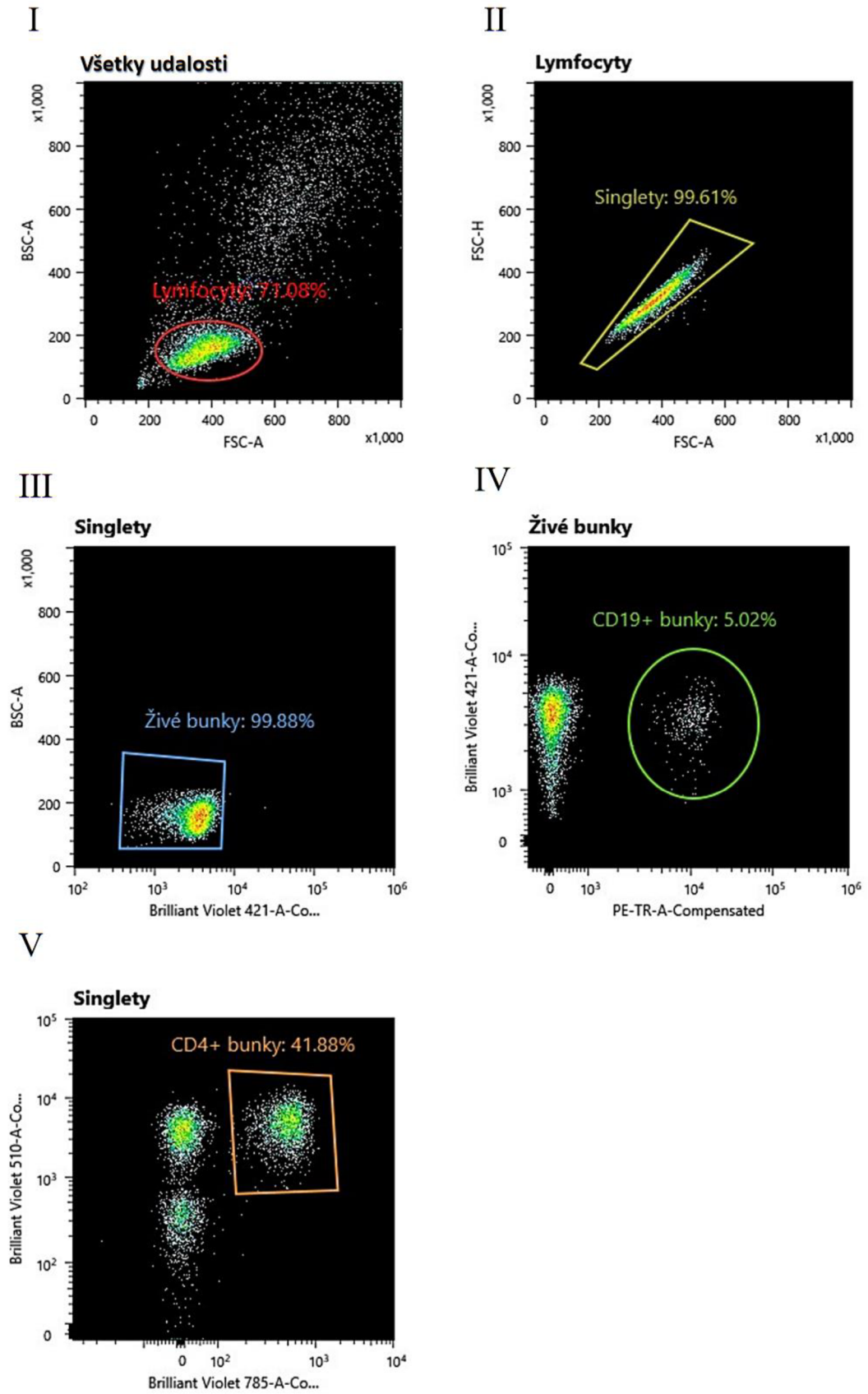
4.1 Výber cieľových bunkových populácií pre sortovanie

Po vyzolovaní buniek z periférnej krvi a ich nafarbení, teda po pridaní protilátok spojených s fluorofórom, bolo uskutočnené sortovanie buniek. Samotnému sortovaniu predchádzal výber cieľových bunkových populácií, ktoré mali byť následne triedené. Charakterizácia týchto populácií bola realizovaná prostredníctvom prietokovej cytometrie, ktorá je súčasťou prístroja na sortovanie.

V grafe na Obr. 9I, ktorý bol získaný vynesением predného rozptylu (FSC-A) a spätného rozptylu svetla (BSC-A), boli vyznačené, alebo takzvané „gatované“, celkové lymfocyty. V rámci tejto populácie buniek bol následne zostrojený graf (Obr.9II) vynesением FSC-A a FSC-H a v ňom gatované singlety, teda bunky vyskytujúce sa samostatne, netvoriace bunkový zhluk.

Zo singletov boli gatované živé bunky. Mŕtve bunky v porovnaní so živými svietia intenzívnejšie, pretože značená protilátka FVD-421 u mŕtvych buniek viaže jednak voľné amíny na povrchu a zároveň prechádza cez plazmatickú membránu a farbí tak voľné amíny vo vnútri bunky. Naproti tomu u živých buniek táto značená protilátka membránou neprechádza, bunky sú farbené len povrchovo a preto svietia menej (Flow Cytometry Protocols Handbook). Na grafe, ktorý bol zostrojený pomocou vynesения BSC-A a fluorescenčného signálu z fluorofóru Brilliant Violet 421 (Obr. 9III), bola pozorovaná prítomnosť len jednej populácie buniek. Vzhľadom na to, že sortovanie buniek bolo uskutočnené ihneď po ich vyzolovaní a nafarbení, bolo rozhodnuté, že sa jedná o populáciu živých buniek. Živé mononukleárne bunky sa pri izolácii buniek z periférnej krvi zhromažďujú vo fáze „prstienok“, zatiaľ čo mŕtve bunky prepadávajú cez Ficoll-Paque a usádzajú sa na dne skúmavky (Nybo, 2010).

Zo živých buniek gatovaných v grafe na Obr. 9III bol zostavený graf vynesением fluorescenčného signálu z fluorofóru Brilliant Violet 421 a fluorofóru PE-TR a bola gatovaná CD19+ populácia buniek (B bunky) (Obr. 9IV). Rovnako z gatovaných živých buniek na Obr. 9III bol zostavený graf vynesением fluorescenčného signálu z fluorofóru Brilliant Violet 510 a fluorofóru Brilliant Violet 785 a bola gatovaná CD4+ populácia buniek (Th bunky) (Obr. 9V).



Obr. 9: Charakterizácia bunkových populácií procesom gatovania.

4.2 Detekcia populácií T lymfocytov prispievajúcich k produkcii Gd-IgA

4.2.1 Porovnanie produkcie IgA medzi vybranými skupinami buniek

Štyrmi skupinami buniek, na ktorých boli skúmané odlišnosti v schopnosti produkovať IgA, boli:

1. živé celkové lymfocyty o počte 100 000, nestimulované, ktoré slúžili ako negatívna kontrola;
2. živé celkové lymfocyty o počte 100 000, stimulované pomocou IL-6, IL-21 a CD40-L;
3. živé CD19+ bunky o počte 100 000, stimulované pomocou IL-6, IL-21 a CD40-L;
4. živé CD19+ bunky v kombinácii s CD4+ bunky o celkovom počte 100 000 (75 000 CD19+ a 25 000 CD4+ buniek), stimulované pomocou IL-6, IL-21 a CD40-L;

pričom bunky pochádzali od troch zdravých jedincov a troch IgA nefropatických pacientov. Tieto skupiny buniek počas 6-dňovej inkubácie produkovali do kompletného kultivačného RPMI média rôzne látky, pričom jednou z nich bol IgA. Pomocou metódy sendvičová ELISA, ktorá je opísaná v podkapitole 3.2.1.3, bola z tohto média stanovená koncentrácia IgA, udávaná v $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Kalibračná krivka bola zostrojená na základe kalibračnej rady štandardu o koncentráciách 18,4; 9,2; 4,6; 2,3; 1,2; 0,6; 0,3; 0,14; 0,07 a 0,04 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a absorbcie odpovedajúcej k týmto koncentráciám. Každá vzorka bola nariadená v triplikáte v pomeroch 1:50, 1:100, 1:200 a 1:400. Nameraná absorbcia jednotlivých riedení bola prepočítaná na koncentráciu IgA pomocou získanej kalibračnej krivky v softvéri BioTek Gen5 Data Analysis a následne prepočítaná na koncentráciu IgA v pôvodnej nezriedenej vzorke.

Z hodnôt koncentrácie IgA v pôvodnej vzorke boli následne nájdené a odstránené odľahlé hodnoty pomocou kvartilných funkcií v programe Excel:

1. Prvý kvartil (QTL1) bol vypočítaný pomocou funkcie QUARTILE.INC(„oblasť s hodnotami“,1)
2. Tretí kvartil (QTL3) bol vypočítaný pomocou funkcie QUARTILE.INC(„oblasť s hodnotami“,3)

3. Medzikvartilový rozsah (IQR) bol získaný odčítaním hodnôt tretieho a prvého kvartilu ($QTL3 - QTL1$)
4. Spodná hranica bola vypočítaná pomocou vzorca: $QTL1 - 1,5 \cdot (IQR)$
5. Horná hranica bola vypočítaná pomocou vzorca: vzorec na výpočet hornej hranice je: $QTL3 + 1,5 \cdot (IQR)$.

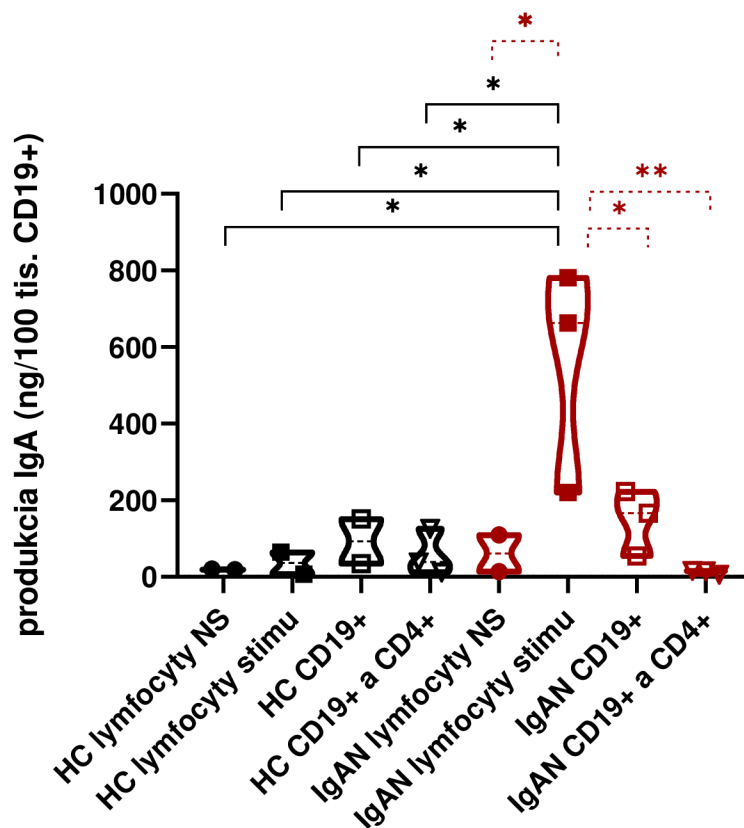
Spodná a horná hranica určujú rozpätie hodnôt. Hodnoty, ktoré boli menšie alebo väčšie ako toto rozpätie, boli vylúčené (Excel-Lib.net).

Po odstránení odľahlých hodnôt bol vypočítaný priemer koncentrácie IgA pre každú vzorku a z tejto priemernej koncentrácie bola vypočítaná hmotnosť v ng, ktorá predstavovala produkciu IgA jednotlivými skupinami buniek. V podkapitole 3.2.1.2 boli bunky 6 dní inkubované v 0,2 ml média, ktoré následne bolo v tejto kapitole v bode číslo 20 odobraté a z neho stanovená hladina IgA. Preto každá priemerná koncentrácia bola vynásobená 0,2 ml.

Produkcia IgA bola následne prepočítaná tak, aby každá skupina buniek predstavovala rovnaký počet CD19+ pozitívnych buniek. To znamená, že produkcia IgA u populácií celkových lymfocytov bola vynásobená faktorom 20 (z celkových lymfocytoch o počte 100 000 je CD19+ buniek približne 5 %) a produkcia IgA u skupiny CD19+ buniek v kombinácii s CD4+ bola vynásobená faktorom 4/3 (v populácii CD19+ bunky v kombinácii s CD4+ bolo celkovo 100 000 buniek, ale CD19+ len 75 000). Produkcia IgA u populácie CD19+ buniek upravovaná nebola z dôvodu, že táto populácia už obsahovala 100 000 CD19+ buniek.

Prepočítaná produkcia IgA vzťahnutá na 100 000 CD19+ buniek bola následne medzi skupinami pochádzajúcimi od zdravých jedincov či IgA nefropatických pacientov porovnaná pomocou štatistického testu ANOVA s Tukeyho post hoc testom v programe GraphPad Prism, pričom porovnávaný bol priemer 2 až 3 hodnôt produkcie IgA v každej skupine (Obr. 10).

Signifikantnú odlišnosť v produkcii IgA voči každej ďalšej skupine buniek vykazovala len skupina živé celkové lymfocyty stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L od IgA nefropatických pacientov (v grafe na Obr. 10 IgAN lymfocyty stimu) a predstavovala tak najviac citlivú skupinu buniek na prídavok IL-6, IL-21 a CD40-L. Produkcia IgA u žiadnej ďalšej skupiny buniek nebola signifikantne odlišná voči ostatným skupinám.



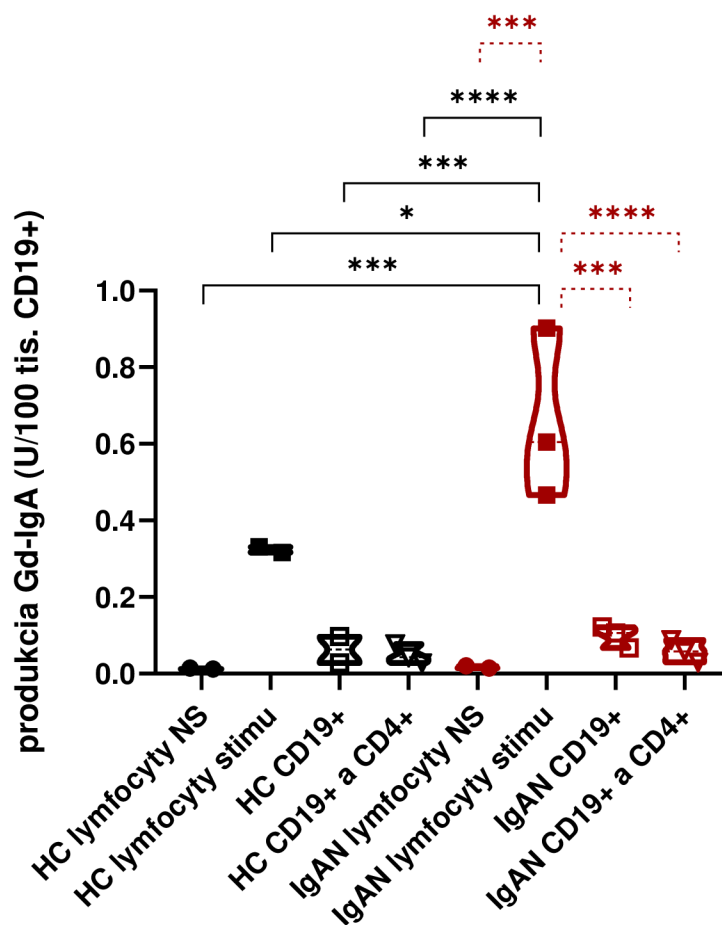
Obr. 10: Porovnanie produkcie IgA medzi štyrmi skupinami buniek od HC a IgAN pacientov pomocou štatistického testu ANOVA a Tukeyho post hoc testu. Porovnávaný bol priemer 2 až 3 hodnôt. Štyrmi skupinami buniek boli živé celkové lymfocyty nestimulované (v grafe označené ako „lymfocyty NS“), živé celkové lymfocyty stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe označené ako „lymfocyty stimu“), živé B bunky stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe označené ako „CD19+“) a živé B bunky v kombinácii s pomocnými T bunkami v pomere 3:1 a stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe označené ako „CD19+ a CD4+“). Všetky signifikantné odlišnosti v produkcii IgA medzi skupinami buniek boli označené hviezdíčkou. Nesignifikantné odlišnosti neboli na grafe znázornené. Produkcia IgA bola uvedená v ng a vztiahnutá na 100 000 CD19+ buniek v každej skupine buniek (na osi y označené ako ng/100 tis. CD19+).

4.2.2 Porovnanie produkcie Gd-IgA medzi vybranými skupinami buniek

Štyri skupiny buniek, opísané v kapitole 4.2.1, boli skúmané za cieľom zistenia odlišností v schopnosti produkovať Gd-IgA. Pomocou metódy sendvičová ELISA (podkapitola 3.2.1.4) boli získané hodnoty absorbancie v jednotlivých vzorkách. Vzorkami bolo kompletné kultivačné RPMI médium, získané po 6-dňovej inkubácii buniek (kapitola 3.2.1.2, bod číslo 20). Z absorbancie avšak nebola stanovená reálna koncentrácia, teda

absolútna hodnota množstva Gd-IgA vo vzorke, ale len hodnota relatívna. Dôvodom bolo, ako je uvedené aj v štúdiu Zhao et al. (2012), že použitý štandard „pIgA Ale“ nie je úplne zbavený galaktózy a vyjadrenie výsledkov v $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ by teda presne neodrážalo koncentráciu Gd-IgA1. Koncentrácia bola preto uvedená v jednotkách na mililiter ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jedna jednotka Gd-IgA1 bola definovaná ako 1 μg štandardu pIgA Ale.

Získané absorbancie vzoriek nariadených v pomere 1:20 boli prepočítané na $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ na základe absorbancie pre štandard o koncentrácii 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ pomocou priamej úmery.



Obr. 11: Porovnanie produkcie Gd-IgA medzi štyrmi skupinami buniek od HC a IgAN pacientov pomocou štatistického testu ANOVA a Tukeyho post hoc testu. Porovnávaný bol priemer 2 až 3 hodnôt. Štyrmi skupinami buniek boli živé celkové lymfocyty nestimulované (v grafe označené ako „lymfocyty NS“), živé celkové lymfocyty stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe označené ako „lymfocyty stimu“), živé B bunky stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe označené ako „CD19+“) a živé B bunky v kombinácii s pomocnými T bunkami v pomere 3:1 a stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe označené ako „CD19+ a CD4+“). Všetky signifikantné odlišnosti v produkcii Gd-IgA medzi populáciami buniek boli označené hviezdíčkou. Nesignifikantné odlišnosti neboli na grafe znázornené. Produkcia Gd-IgA bola uvedená v jednotke U a vztiahnutá na 100 000 CD19+ buniek v každej skupine buniek (na osi y označené ako U/100 tis. CD19+).

Pôvodný objem u všetkých vzoriek bol 0,2 ml; hodnoty v $U \cdot ml^{-1}$ ním boli vynásobené. Získaná tak bola produkcia Gd-IgA v jednotkách U. Produkcia Gd-IgA bola následne prepočítaná na rovnaký počet CD19+ pozitívnych buniek v jednotlivých skupinách. U populácií celkových lymfocytov bola vynásobená faktorom 20 (z celkových lymfocytoch o počte 100 000 je CD19+ buniek približne 5 %) a u skupiny CD19+ buniek v kombinácii s CD4+ bola vynásobená faktorom 4/3 (v populácii CD19+ bunky v kombinácii s CD4+ bolo celkovo 100 000 buniek, ale CD19+ len 75 000). Produkcia Gd-IgA u populácie CD19+ buniek upravovaná nebola z dôvodu, že táto populácia už obsahovala 100 000 CD19+ buniek.

Produkcia Gd-IgA uvedená v jednotkách U a vzťahnutá na 100 000 CD19+ buniek bola následne medzi skupinami pochádzajúcimi od zdravých jedincov či IgA nefropatických pacientov porovnaná pomocou štatistického testu ANOVA s Tukeyho post hoc testom v programe GraphPad Prism, pričom porovnávaný bol priemer 2 až 3 hodnôt produkcie Gd-IgA v každej skupine (Obr. 11).

Signifikantnú odlišnosť v produkcii Gd-IgA voči každej ďalšej skupine buniek vykazovali len živé celkové lymfocyty stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L od IgA nefropatických pacientov (v grafe na Obr. 11 IgAN lymfocyty stimu). Produkcia Gd-IgA u žiadnej ďalšej skupiny buniek nebola signifikantne odlišná voči ostatným skupinám. Zhodné výsledky boli dosiahnuté aj pri produkcii IgA (kapitola 4.2.1).

4.3 Analýza ľahkých reťazcov Gd-IgA u IgA+ lymfocytov po stimulácii IL-6 pomocou fluorescenčnej mikroskopie

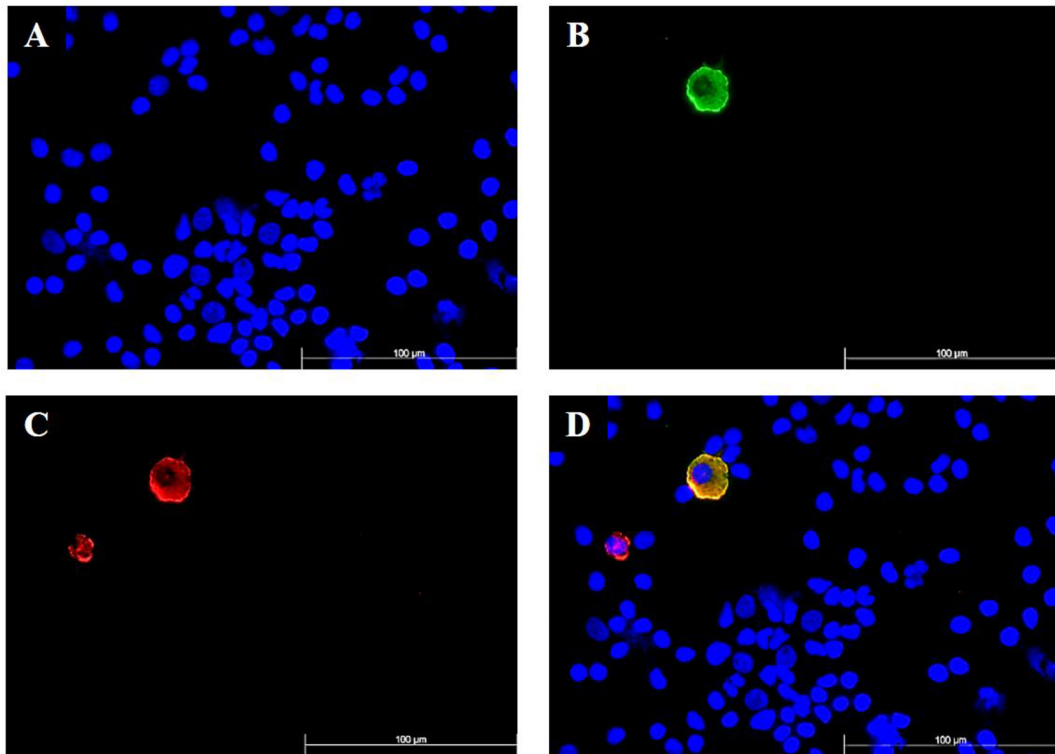
4.3.1 Intracelulárne farbenie IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov

Pomocou fluorescenčnej mikroskopie a farbenia buniek fluorescenčne značenými protilátkami boli pozorované bunky obsahujúce IgA a bunky, ktoré produkujú imunoglobulíny s λ ľahkými reťazcami. Intracelulárnym farbením bola dosiahnutá vizualizácia imunoglobulínov v cytoplazme týchto buniek.

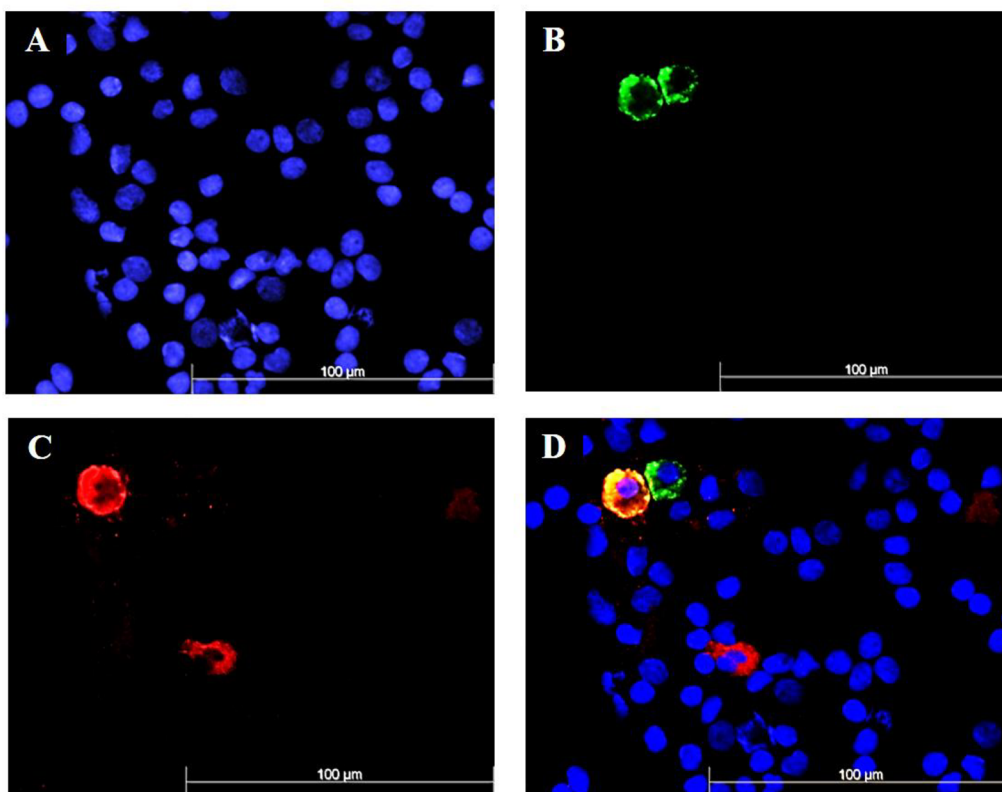
Za účelom detekcie fluorescenčných farbív DAPI, FITC a TRITC boli na fluorescenčnom mikroskope použité mikroskopické kocky Leica DAP, L5 a RHO. Získané tak boli tri fotografie rôznych fluorescencií buniek (Obr. 12A, B, C a Obr. 13A, B, C), ktoré následne boli zjednotené do jedného obrazu (Obr. 12D a Obr. 13D).

Bunky s λ ľahkými reťazcami imunoglobulínov boli rôzneho typu. Jednak to boli IgA+ bunky, ktoré na Obr. 12D a Obr. 13D svietia na zeleno a súčasne červeno. Druhým typom buniek boli bunky tvoriace iné triedy imunoglobulínov ako IgA a tie na Obr. 12D a Obr. 13D možno pozorovať len ako červené bunky.

Na Obr. 13D je prítomná bunka svietiacia len na zeleno. To znamená že je IgA+ bez λ ľahkých reťazcov.



Obr. 12: Pozorovanie IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 400x. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), biotinylovanej IgA protilátky so streptavidinom-FITC (zelená farba) a protilátkou anti-lambda-TRITC (červená farba). Na Obr. 12A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 12B možno pozorovať prítomnosť IgA+ bunky s imunoglobulínmi A vo vnútri cytoplazmy. Na Obr. 12C možno pozorovať prítomnosť dvoch buniek s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch vo vnútri cytoplazmy. Obr. 12D predstavuje prekrytie Obr.12A, B a C a možno na ňom pozorovať dva rôzne typy buniek: červenú bunku predstavujúcu λ + pozitívnu bunku a bunku svietiacu na zeleno aj červeno, ktorá je dvojito pozitívna, teda IgA+ λ + bunka.



Obr. 13: Pozorovanie IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 400x. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), biotinylovanej IgA protilátky so streptavidinom-FITC (zelená farba) a protilátkou anti-lambda-TRITC (červená farba). Na Obr. 13A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 13B možno pozorovať prítomnosť dvoch IgA+ buniek s imunoglobulínmi A vo vnútri cytoplazmy. Na Obr. 13C možno pozorovať prítomnosť dvoch buniek s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch vo vnútri cytoplazmy. Obr. 13D predstavuje prekrytie Obr.13A, B a C a možno na ňom pozorovať tri rôzne typy buniek: zelenú bunku predstavujúcu IgA+ pozitívnu bunku, červenú predstavujúcu λ + pozitívnu a bunku svietiacu na zeleno aj červeno, ktorá je dvojito pozitívna, teda IgA+ λ + bunka.

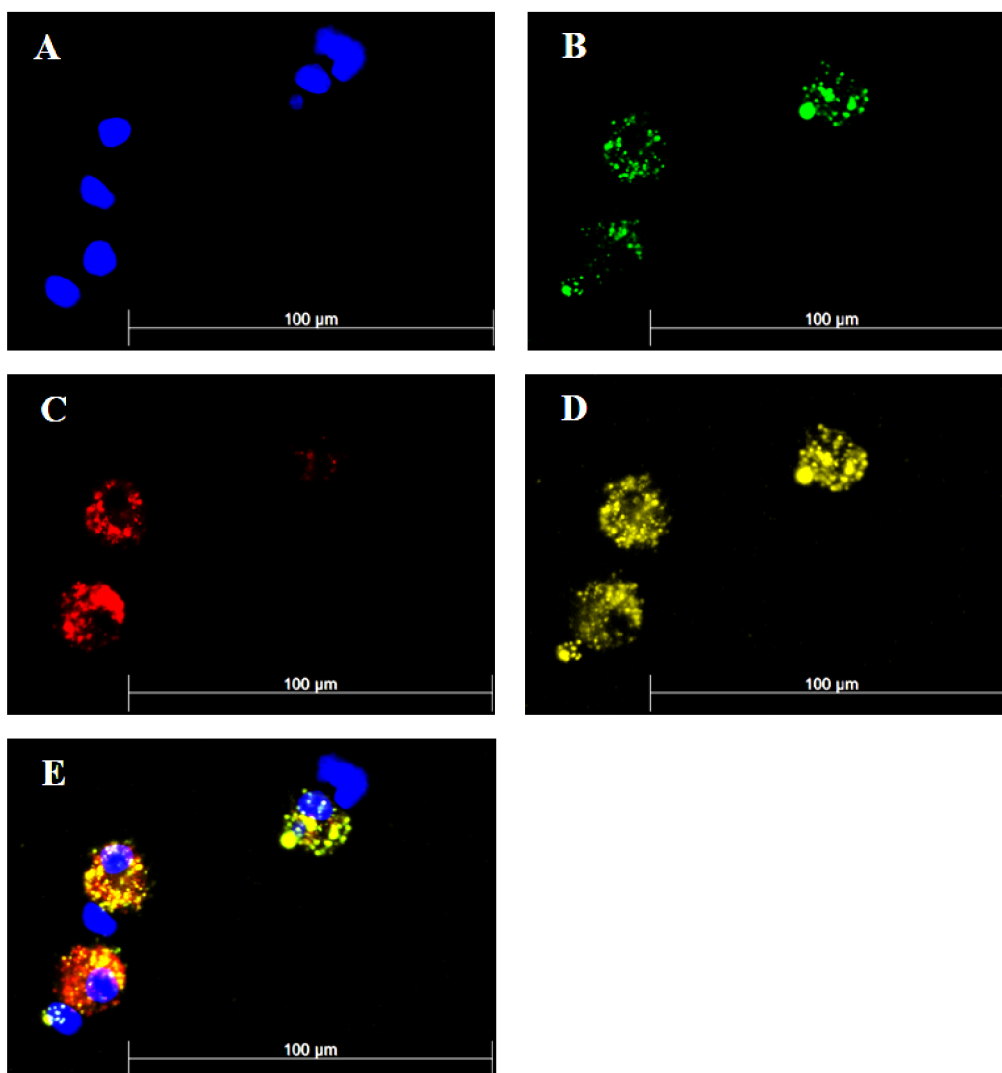
4.3.2 Povrchové farbenie Gd-IgA+, IgA+ buniek a lambda ľahkých reťazcov

Pomocou fluorescenčnej mikroskopie a farbenia buniek fluorescenčne značenými protilátkami pred ich fixáciou paraformaldehydom bolo umožnené pozorovať IgA, Gd-IgA a λ ľahké reťazce imunoglobulínov na povrchu týchto buniek.

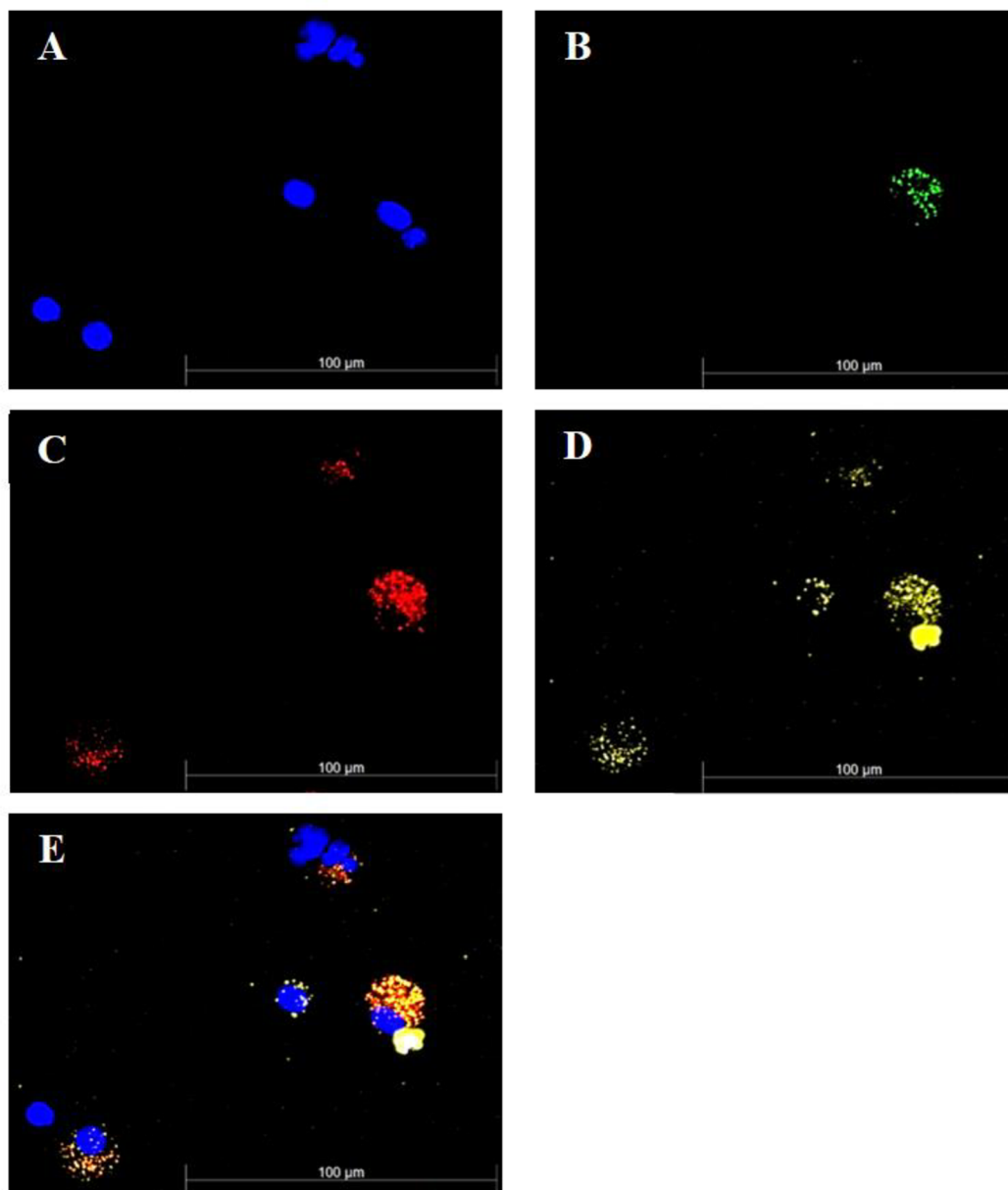
Za účelom detekcie fluorescenčných farbív DAPI, FITC, TRITC a APC-R700 boli na fluorescenčnom mikroskope použité mikroskopické kocky Leica DAP, L5, RHO a Y5. Získané tak boli štyri fotografie rôznych fluorescencií buniek (Obr. 14A, B, C, D; Obr. 15A, B, C, D a Obr. 16A, B, C, D), ktoré následne boli zjednotené do jedného obrazu (Obr. 14E; Obr. 15E a Obr. 16E).

Na Obr. 14 možno pozorovať dve Gd-IgA+ bunky s λ ľahkými reťazcami a dve Gd-IgA+ bunky bez λ ľahkých reťazcov. Všetky štyri spomenuté bunky boli zároveň pozitívne aj na IgA. Trojito pozitívne bunky, Gd-IgA+IgA+ λ +, možno vidieť aj na Obr. 15 a Obr. 16.

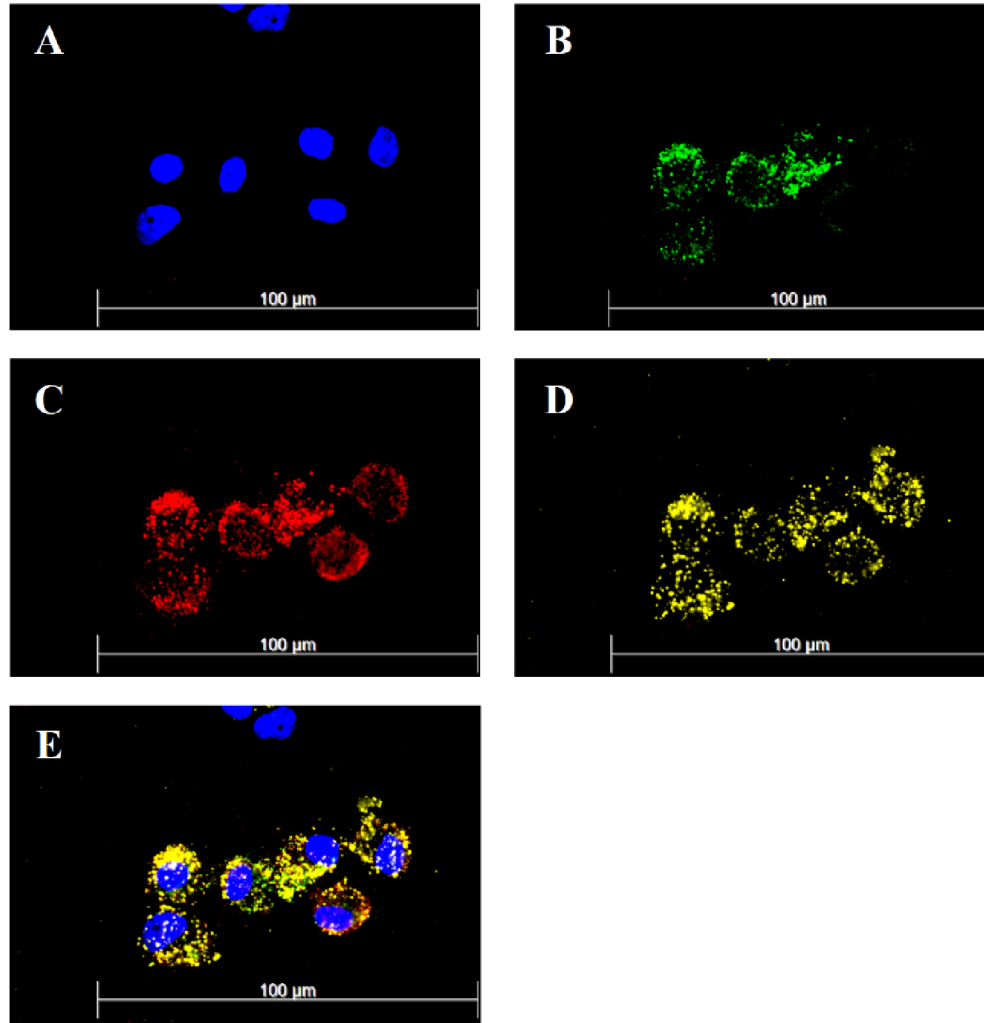
Prítomné boli aj bunky bez Gd-IgA. Na Obr. 15 je to bunka čisto IgA+ a dve bunky IgA+ λ +. Na Obr. 16 sú dve IgA+ λ + bunky bez Gd-IgA.



Obr. 14: Pozorovanie Gd-IgA+, IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 400x. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), protilátky 35A12 s protilátkou anti-mouse-IgG-FITC (zelená farba), protilátky anti-lambda-TRITC (červená farba) a biotinylovanej IgA protilátky so streptavidinom-APC-R700 (žltá farba). Na Obr. 14A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 14B možno pozorovať prítomnosť štyroch Gd-IgA+ buniek s molekulami Gd-IgA na povrchu bunky. Na Obr. 14C možno pozorovať prítomnosť dvoch buniek s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch na povrchu bunky. Na Obr. 14D možno pozorovať prítomnosť štyroch IgA+ buniek s imunoglobulínmi A na povrchu bunky. Obr. 14E predstavuje prekrytie Obr. 14A, B, C a D a možno na ňom pozorovať dva rôzne typy nafarbených buniek: dve bunky dvojito pozitívne, Gd-IgA+IgA+ bunky, a dve bunky trojito pozitívne, Gd-IgA+IgA+ λ + bunky.



Obr. 15: Pozorovanie Gd-IgA+, IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 400x. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), protilátky 35A12 so sekundárnou protilátkou anti-mouse-IgG-FITC (zelená farba), protilátky anti-lambda-TRITC (červená farba) a biotinylovanej IgA protilátky so streptavidinom-APC-R700 (žltá farba). Na Obr. 15A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 15B možno pozorovať prítomnosť jednej Gd-IgA+ bunky s molekulami Gd-IgA na jej povrchu. Na Obr. 15C možno pozorovať prítomnosť troch buniek s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch na ich povrchu. Na Obr. 15D možno pozorovať prítomnosť štyroch IgA+ buniek s imunoglobulínmi A na ich povrchu (najintenzívnejšia žltá farba na obrázku môže predstavovať piatu IgA+ bunku, ale môže predstavovať aj znečistenie, preto do počtu IgA+ buniek zarátavaná nie je). Obr. 15E predstavuje prekrytie Obr. 15A, B, C a D a možno na ňom pozorovať tri rôzne typy nafarbených buniek: jednu len IgA+ bunku, dve bunky dvojito pozitívne, IgA+ λ + bunky, a jednu bunku trojito pozitívnu, Gd-IgA+IgA+ λ + bunku.

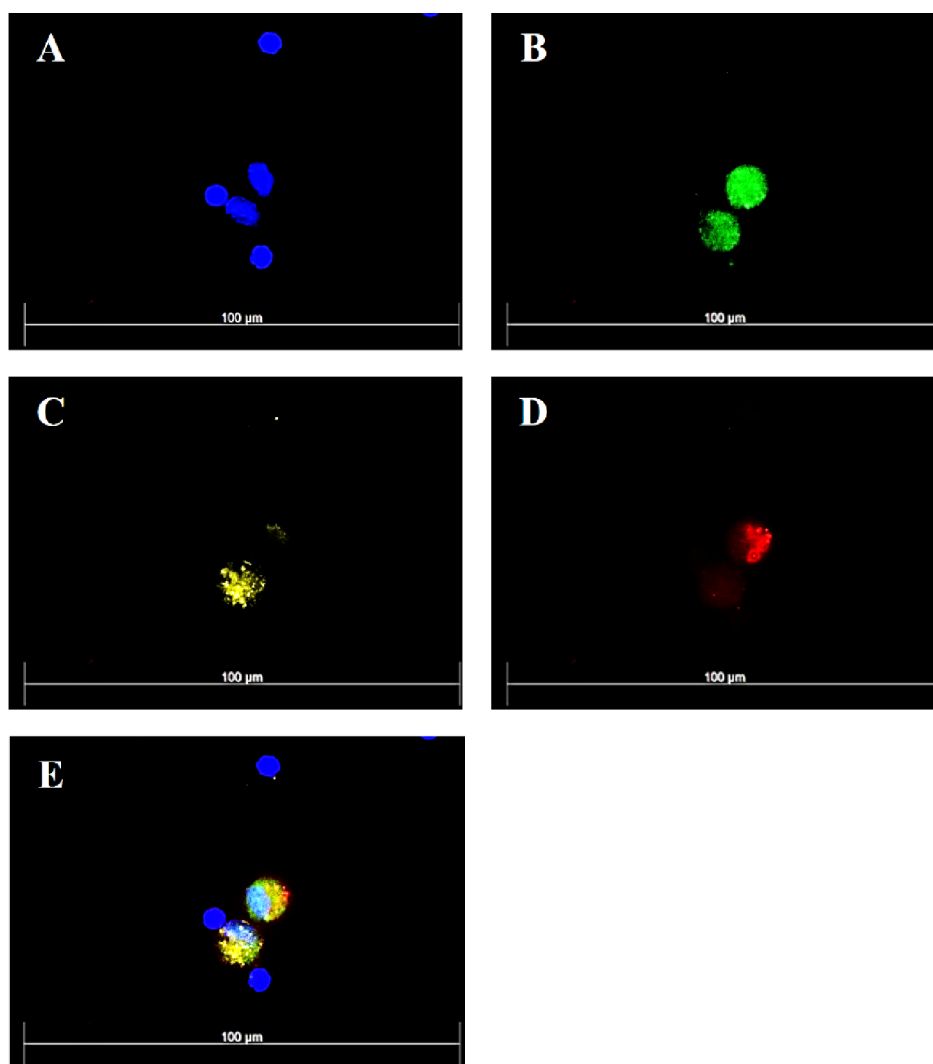


Obr. 16: Pozorovanie Gd-IgA⁺, IgA⁺ a λ⁺ mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 400x. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), protilátky 35A12 so sekundárnou protilátkou anti-mouse-IgG-FITC (zelená farba), protilátky anti-lambda-TRITC (červená farba) a biotinylovanej IgA protilátky so streptavidinom-APC-R700 (žltá farba). Na Obr. 16A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 16B možno pozorovať prítomnosť štyroch Gd-IgA⁺ buniek s molekulami Gd-IgA na ich povrchu. Na Obr. 16C možno pozorovať prítomnosť šiestich buniek s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch na ich povrchu. Na Obr. 16D možno pozorovať prítomnosť šiestich IgA⁺ buniek s imunoglobulínmi A na ich povrchu. Obr. 16E predstavuje prekrytie Obr. 16A, B, C a D a možno na ňom pozorovať zhluk šiestich IgA⁺λ⁺ buniek, pričom štyri z nich sú zároveň pozitívnej aj na Gd-IgA. Ďalšie dve IgA⁺λ⁺ bunky sú bez Gd-IgA.

4.3.3 Pozorovanie spojovacieho reťazca, Gd-IgA⁺ buniek a lambda ľahkých reťazcov

Pomocou fluorescenčnej mikroskopie a kombináciou povrchového a intracelulárneho farbenia buniek fluorescenčne značenými protilátkami bolo umožnené súčasne pozorovať spojovacie (J) reťazce, λ ľahké reťazce imunoglobulínov a Gd-IgA.

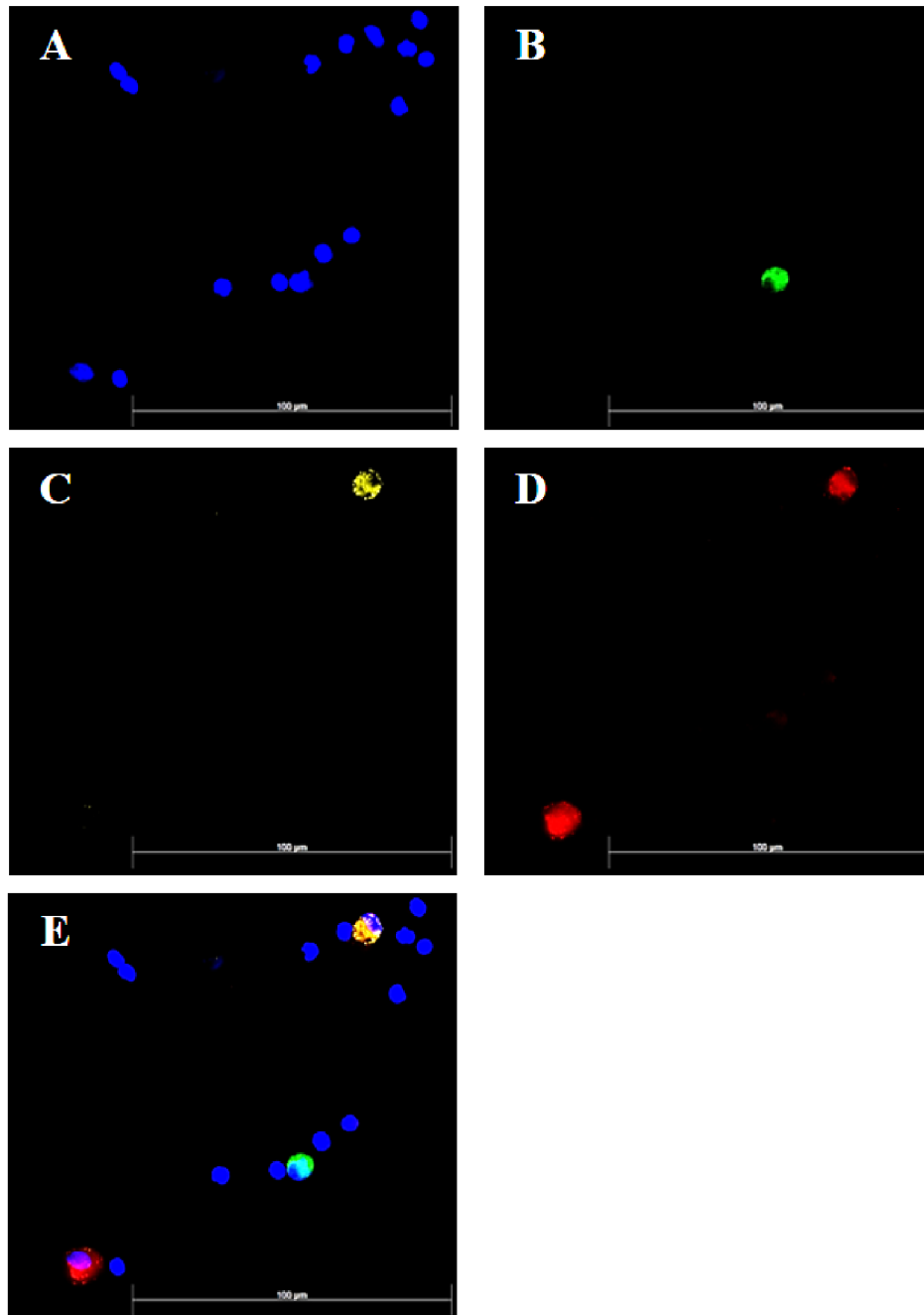
Za účelom detekcie fluorescenčných farbív DAPI, AF-488, TRITC a APC-R700 boli na fluorescenčnom mikroskope použité mikroskopické kocky Leica DAP, L5, RHO a Y5. Pozorovanie pod mikroskopom bolo tentokrát realizované pri zväčšení 600x za použitia imerzného oleja. Získané vždy boli štyri fotografie buniek (Obr. 17A, B, C, D; Obr. 18A, B, C, D a Obr. 19A, B, C, D), ktoré následne boli zjednotené do jedného obrazu (Obr. 17E; Obr. 18E a Obr. 19E).



Obr. 17: Pozorovanie J-reťazec+, Gd-IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 600x za použitia imerzného oleja. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), protilátky rabbit anti-human-J-chain so sekundárnou protilátkou goat anti-rabbit-IgG-AF-488 (zelená farba), protilátky anti-lambda-TRITC (žltá farba) a biotinylovanej 35A12 protilátky so streptavidinom-APC-R700 (červená farba). Na Obr. 17A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 17B možno pozorovať prítomnosť dvoch buniek s J reťazcami. Na Obr. 17C možno pozorovať prítomnosť jednej bunky s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch. Na Obr. 17D možno pozorovať prítomnosť jednej Gd-IgA+ bunky. Obr. 17E predstavuje prekrytie Obr. 17A, B, C a D a možno na ňom pozorovať dva rôzne typy nafarbených buniek: jednu J-reťazec+Gd-IgA+ a druhú J-reťazec+ λ + bunku.

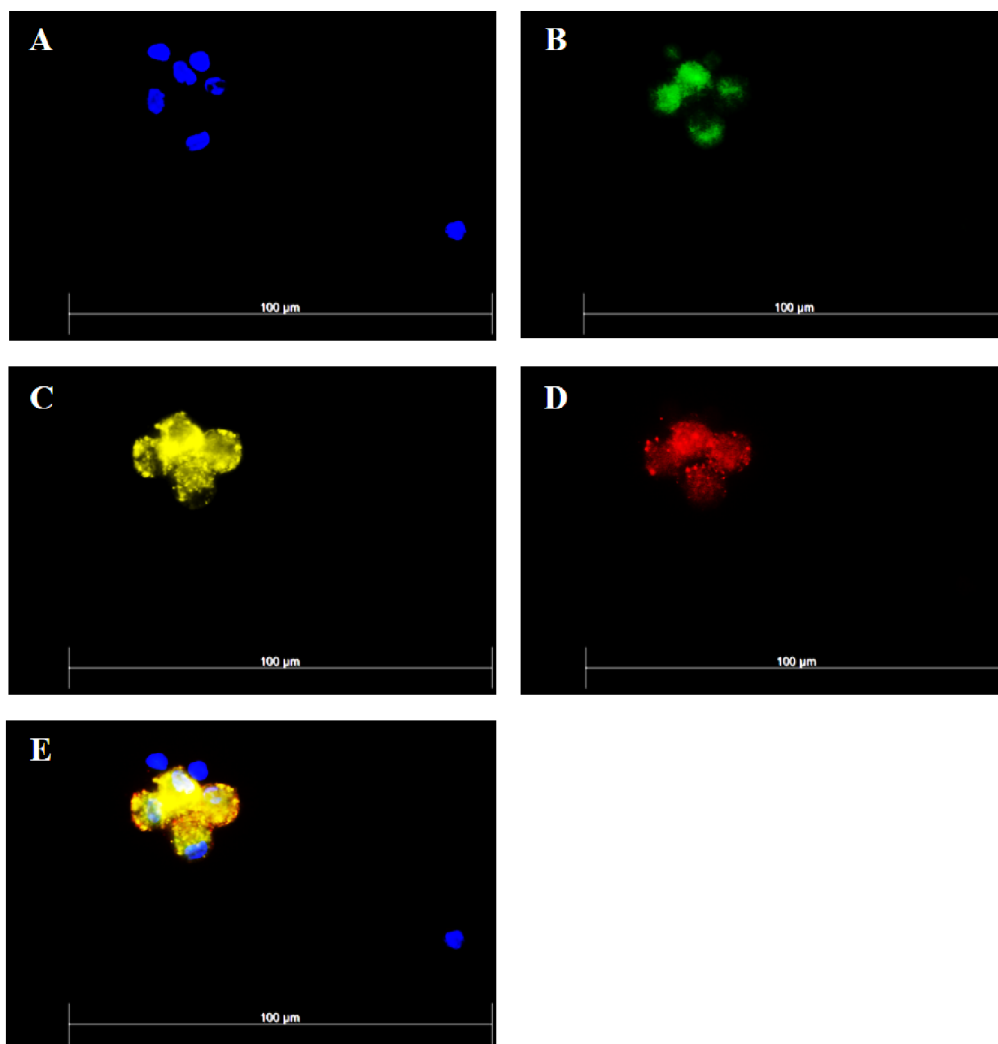
Pozorované boli rôzne typy buniek obsahujúce J reťazce. Na Obr. 18 možno pozorovať jednu čisto J-reťazec+ bunku. Na Obr. 17 možno vidieť jednu J-reťazec+Gd-IgA+ a druhú J-reťazec+ λ + bunku. Na Obr. 19 sú trojito pozitívne bunky, J-reťazec+Gd-IgA+ λ +, vytvárajúce zhluk.

Prítomné boli aj bunky bez J reťazcov. Na Obr. 18 je to bunka čisto Gd-IgA+ a ďalšia je Gd-IgA+ λ +



Obr. 18: Pozorovanie J-reťazec+, Gd-IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 600x za použitia imerzného oleja. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), protilátky rabbit anti-human-J-chain so sekundárnou protilátkou goat anti-rabbit-IgG-AF-488

(zelená farba), protilátky anti-lambda-TRITC (žltá farba) a biotinylovanej 35A12 protilátky so streptavidinom-APC-R700 (červená farba). Na Obr. 18A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 18B možno pozorovať prítomnosť jednej bunky s J reťazcami. Na Obr. 18C možno pozorovať prítomnosť jednej bunky s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch. Na Obr. 18D možno pozorovať prítomnosť dvoch Gd-IgA+ buniek. Obr. 18E predstavuje prekrytie Obr. 18A, B, C a D a možno na ňom pozorovať tri rôzne typy nafarbených buniek: jednu len J-reťazec+ bunku, jednu len Gd-IgA+ bunku a jednu Gd-IgA+ λ + bunku.



Obr. 19: Pozorovanie J-reťazec+, Gd-IgA+ a λ + mononukleárných buniek z periférnej krvi od IgA nefropatického pacienta pod fluorescenčným mikroskopom pri zväčšení 600x za použitia imerzného oleja. Bunky boli stimulované IL-6 týždeň a farbené pomocou DAPI (modrá farba), protilátky rabbit anti-human-J-chain so sekundárnou protilátkou goat anti-rabbit-IgG-AF-488 (zelená farba), protilátky anti-lambda-TRITC (žltá farba) a biotinylovanej 35A12 protilátky so streptavidinom-APC-R700 (červená farba). Na Obr. 19A sú bunkové jadrá farbené pomocou DAPI. Na Obr. 19B možno pozorovať prítomnosť štyroch buniek s J reťazcami. Na Obr. 19C možno pozorovať prítomnosť štyroch buniek s ľahkými reťazcami λ na imunoglobulínoch. Na Obr. 19D možno pozorovať prítomnosť štyroch Gd-IgA+ buniek. Obr. 19E predstavuje prekrytie Obr. 19A, B, C a D a možno na ňom pozorovať zhluk štyroch J-reťazec+Gd-IgA+ λ + buniek.

4.4 Vyhodnotenie produkcie a purifikácie proteínu CH1-HR-CH2 pri natívnych podmienkach

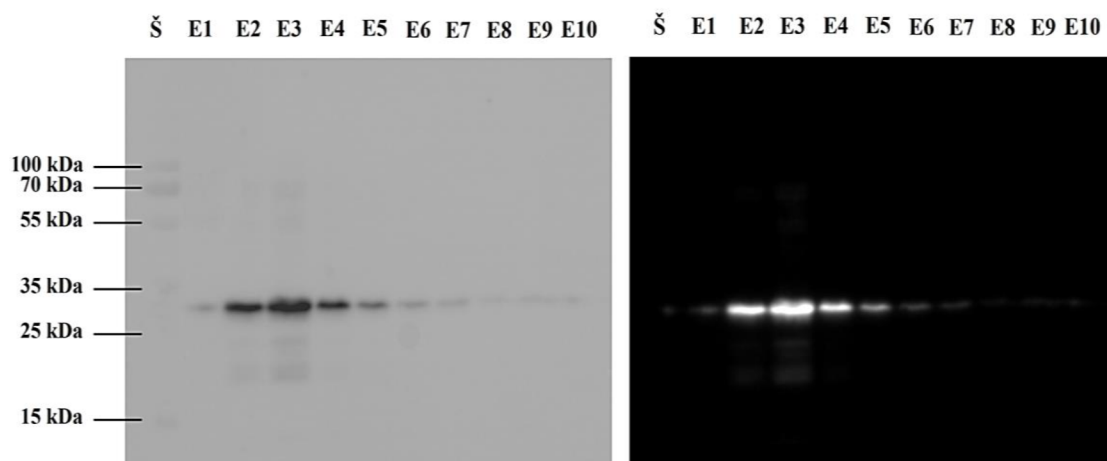
Proteín CH1-HR-CH2 o molekulovej hmotnosti 26,8 kDa bol detegovaný pomocou metódy Western blot a Penta-His HRP konjugovanej protilátky. Čistota proteínu bola hodnotená pomocou metódy SDS-PAGE a merania koncentrácie proteínov.

4.4.1 Detekcia proteínu CH1-HR-CH2

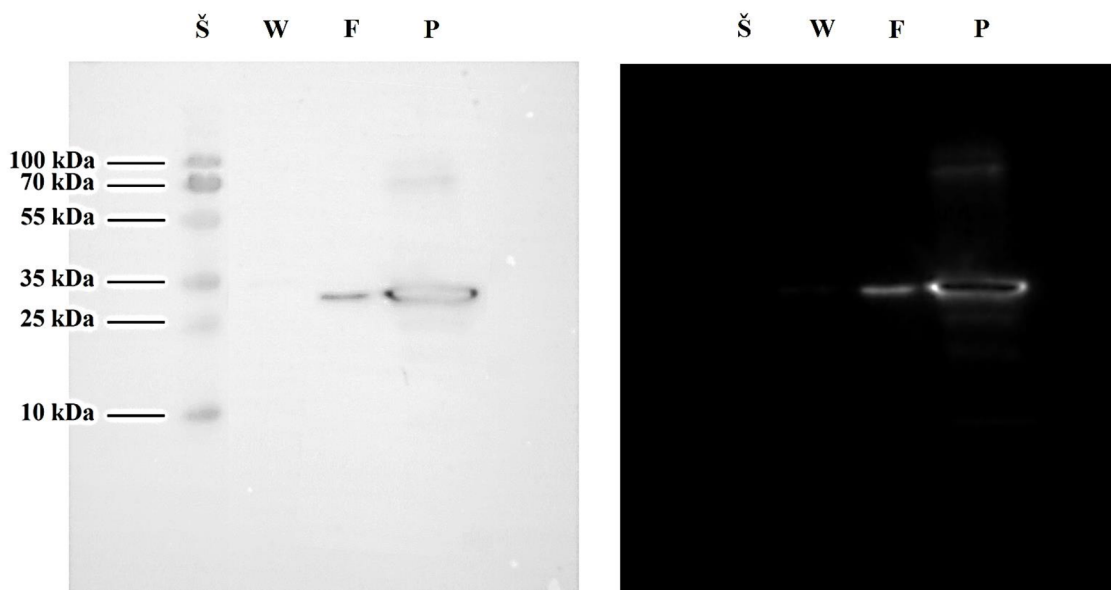
Použitím metódy Western blot a Penta-His HRP konjugovanej protilátky bol identifikovaný záujmový proteín CH1-HR-CH2 v jednotlivých frakciách.

Viditeľný bol v elúciách 1-7 (Obr. 20), ale pravdepodobne jeho nedetekovateľné množstvo sa môže nachádzať aj v elúciách 8-10. Elúcia 3 je frakcia s najväčším zastúpením tohto proteínu (Obr. 20).

Prítomnosť proteínu avšak bola zaznamenaná aj vo frakciách flow-through a v pelete baktérií (Obr. 21), čo možno hodnotiť ako nepriaznivý výsledok. V týchto frakciách by záujmový proteín za ideálnych okolností prítomný byť nemal. Detekcia proteínu CH1-HR-CH2 vo frakcii flow-through bola pravdepodobne zapríčinená nedostatočným naviazaním proteínu na Ni-NTA agarózu, zatiaľ čo u frakcii bakteriálna peleta sa jednalo

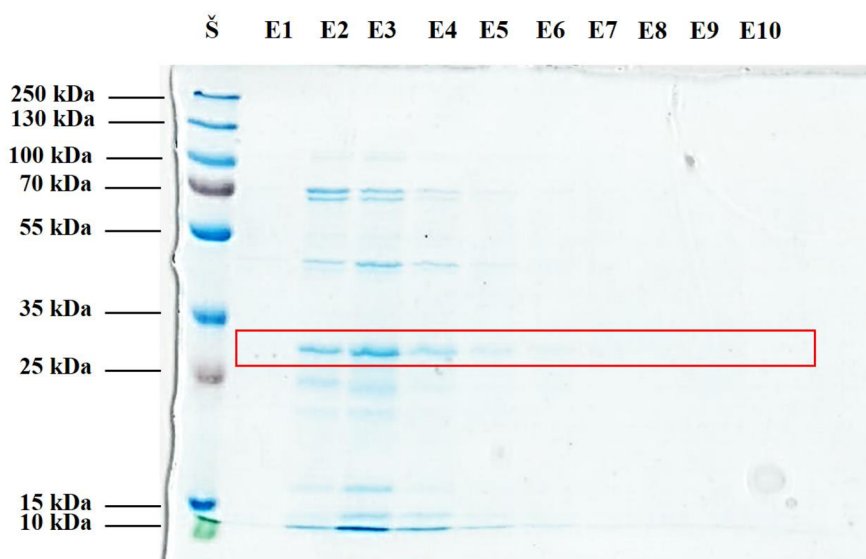


Obr. 20: Záznam po western blote a detekcia záujmového proteínu CH1-HR-CH2 pomocou Penta-His HRP konjugovanej protilátky v elúciách 1-10 (E1-E10). Štandard pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti proteínu je označený ako „Š“. Iba bandy s proteínmi, na ktoré sa naviazala protilátka, svietia. Tieto bandy taktiež odpovedajú molekulovej hmotnosti záujmového proteínu CH1-HR-CH2 (26,8 kDa). Elúcia 3 je frakcia s najväčším zastúpením záujmového proteínu, ale prítomný je aj v elúciách 1-7 a pravdepodobne jeho nedetekovateľné množstvo aj v elúciách 8-10.



Obr. 21: Záznam po western blote a detekcia záujmového proteínu CH1-HR-CH2 pomocou Penta-His HRP konjugovanej protilátky vo frakciách wash (W), flow-through (F) a v pelete baktérií (P). Štandard pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti proteínu je označený ako „Š“. Záujmový proteín o molekulovej hmotnosti 26,8 kDa je prítomný vo flow-through a v pelete baktérií.

zrejme o nedostatočné vyzolovanie proteínu CH1-HR-CH2 z expresného systému. Band so záujmovým proteínom vo frakcii bakteriálna peleta obsahoval veľké množstvo tohto proteínu a z tohto dôvodu band až presvecoval (Obr. 21). Vo frakcii wash záujmový proteín detegovaný nebol (Obr. 21).



Obr. 22 Záznam po SDS-PAGE v 12 % géli zobrazujúci prítomnosť proteínov v elúciách 1-10 (E1-E10) získaných počas purifikácie proteínu CH1-HR-CH2. Štandard pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti proteínu je označený ako „Š“. Okrem záujmového proteínu CH1-HR-CH2 o molekulovej hmotnosti 26,8 kDa (v červenom rámičku) možno pozorovať bandy s ďalšími proteínmi (nad a pod červeným rámičkom).

4.4.2 Čistota proteínu CH1-HR-CH2 hodnotená pomocou záznamu po SDS-PAGE

Na zázname po SDS-PAGE (Obr. 22) možno pozorovať, že v elúciách bol prítomný nie len band s proteínom CH1-HR-CH2 o molekulovej hmotnosti 26,8 kDa (na Obr. 22 ohraničený červeným rámkom), ale aj bandy s ďalšími proteínmi (na Obr. 22 sa nachádzajú nad a pod červeným rámkom), čo poukazuje na nedostatočnú čistotu proteínu po purifikácii.

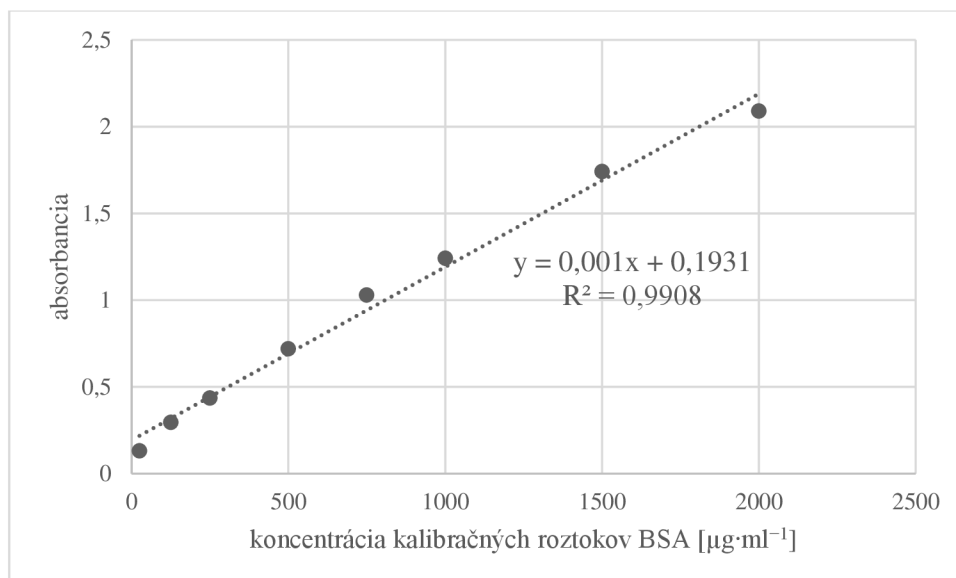
4.4.3 Meranie koncentrácie proteínu CH1-HR-CH2

Koncentrácia proteínu CH1-HR-CH2 bola meraná dvomi spôsobmi. V jednom sa jednalo o nešpecifické meranie koncentrácie za pomoci kitu na stanovenie celkových proteínov. Druhý spôsob predstavoval špecifické meranie koncentrácie prostredníctvom metódy SDS-PAGE s vyhodnotením intenzity sfarbenia proteínových bandov (Obr. 24) v aplikácii „Image J“.

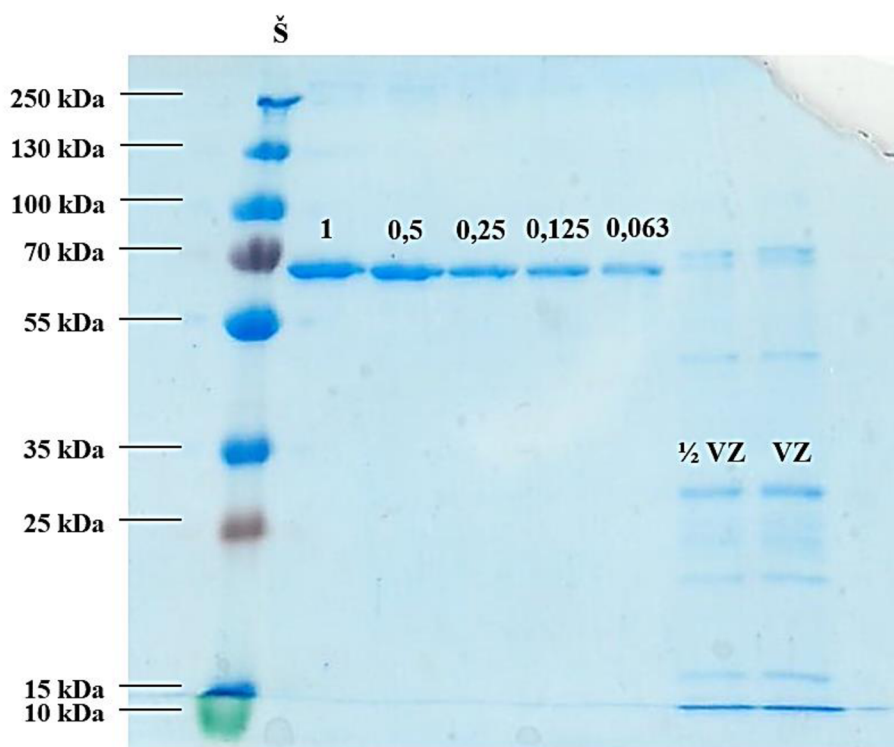
V nešpecifickom meraní bola zostavená kalibračná krivka vynesím koncentrácie kalibračnej rady roztokov a k nim odpovedajúcej nameranej absorbancie (Obr. 23). Získaná lineárna rovnica kalibračnej krivky (Obr. 23) a namerané hodnoty absorbancie pre vzorku (absorbancia vzorky meraná v triplicate a nameranými hodnotami boli 0,443; 0,429 a 0,430) boli použité na výpočet koncentrácie proteínov vo vzorke. Celková priemerná koncentrácia proteínov vo vzorke činila $240,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V 7 ml roztoku vzorky bolo teda 1,7 mg celkových proteínov.

Avšak pri špecifickom stanovení proteínu CH1-HR-CH2 bola koncentrácia odhadnutá na $0,032 \mu\text{g}$ v $4 \mu\text{l}$, čo by znamenalo, že v 7 ml roztoku je $56,0 \mu\text{g}$ záujmového proteínu. Hodnota bola odhadnutá z dôvodu, že bandy s proteínom CH1-HR-CH2 sa nachádzali mimo kalibračnú krivku (Tab. 1, Tab. 2, Obr. 24), ale veľkosť plochy pod vrcholom u nezriedenej vzorky (hodnota 1 198,18) bola približne polovičná ako veľkosť plochy pod vrcholom u najnižšej hmotnosti štandardu BSA $0,063 \mu\text{g}$ (hodnota 2 504,60) (Tab.1, Tab 2.).

Výťažok proteínu CH1-HR-CH2 z 2 l bakteriálnej kultúry bol teda veľmi malý a s takýmto množstvom nebolo možné ďalej pracovať.



Obr. 23: Graf závislosti absorbancie na koncentrácii kalibračných roztokov BSA. Koncentrácia kalibračných roztokov proteínu BSA je udávaná v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V grafe je zobrazená lineárna rovnica kalibračnej krivky a spoľahlivosť trendovej spojnice R^2 .



Obr. 24: Záznam po SDS-PAGE v 12 % géli zobrazujúci bandy s proteínom BSA o daných hmotnostiach v μg predstavujúce kalibračnú radu a bandy vzorky a polovične zriedenej vzorky. Intenzita týchto bandov bola analyzovaná v aplikácii „Image J“ a výsledkom boli hodnoty plochy pod vrcholom uvedené v Tab. 1 a v Tab. 2. „Š“ je označenie štandardu pre SDS-PAGE na určenie molekulovej hmotnosti proteínu.

Tab. 1: Hodnoty plochy pod vrcholom získané v programe ImageJ pre kalibračnú radu proteínu BSA.

Hmotnosť kalibračnej rady proteínu BSA [μg]	Plocha pod vrcholom
1	10 868,32
0,5	9 230,13
0,25	5 700,10
0,125	4 157,03
0,063	2 504,60

Tab. 2: Hodnoty plochy pod vrcholom získané v programe ImageJ pre vzorku.

Hmotnosť kalibračnej rady proteínu BSA [μg]	Plocha pod vrcholom
$\frac{1}{2}$ VZ	697,99
VZ	1 198,18

5 DISKUSIA

Vznik a vývoj IgA nefropatie je podmienený množstvom faktorov. Jedným z nich sú imunologické abnormality zahŕňajúce B a T lymfocyty spolu s ich rozpustnými mediátormi. Zúčastňujú sa všetkých úrovní patogenézy IgAN, od iniciácie až po deštrukciu tkaniva a orgánov. Produkcia imunoglobulínov B bunkami je regulovaná jednak pomocou T buniek, ale aj nezávisle od nich (Sallustio et al., 2019).

Na produkciu IgA B bunkami je potrebné, aby B lymfocyty v priebehu dozrievania podstúpili proces prepínania izotypov. Z naivných B buniek exprimujúcich len IgM a IgD sa tak stávajú plazmatické bunky produkujúce aj zmenené izotypy, ako IgG, IgA a IgE. Na proces prepínania izotypov sú zvyčajne vyžadované dva signály, CD40-L a špecifický cytokín, ktoré pochádzajú od aktivovaných Th lymfocytov. Niektoré štúdie taktiež naznačujú, že pôsobením CD40-L a IL-21 na naivné B bunky dochádza prednostne k tvorbe IgA+ buniek (Avery et al., 2008).

IL-6 sa podieľa na regulácii diferenciácie T buniek (Su et al., 2017) a na spustení produkcie IL-21 CD4+ T bunkami (Diehl et al., 2012), po ktorom nasleduje kooperatívne pôsobenie IL-6 a IL-21 vedúce k dozrievaniu B buniek. Taktiež je produkovaný samotnými Th bunkami. V patogenéze IgAN je IL-6 negatívnym faktorom. V IgA1-produkujúcich bunkách z periférnej krvi IgA nefropatických pacientov zvyšuje produkciu IgA1 a Gd-IgA (Groza et al., 2022).

Keďže Th bunky poskytujú signál pre aktiváciu dozrievania B buniek (den Haan et al., 2014) bola na začiatku experimentu definovaná hypotéza, že Th bunky by mohli byť populáciou, ktorá sa zúčastňuje zvyšovania produkcie IgA a Gd-IgA, a tým negatívne vplyvajú na IgA nefropatiu. Tri skupiny buniek- B lymfocyty, B lymfocyty s Th lymfocytmi a celkové lymfocyty, boli stimulované tromi biologicky aktívnymi molekulami: IL-6, IL-21 a CD40-L. IL-21 a CD40-L boli použité za účelom získania predominantne IgA-produkujúcich buniek a IL-6 bol použitý kvôli negatívnym účinkom v patogenéze IgAN.

Pri detekcii populácií T lymfocytov prispievajúcich k produkcii IgA a Gd-IgA boli ostro sledovanou skupinou živé B bunky (CD19+ bunky) v kombinácii s Th bunkami (CD4+) stimulované IL-6, IL-21 a CD40-L (v grafe na Obr. 10 a 11 HC alebo IgAN CD19+ a CD4+). Avšak táto skupina buniek nevykazovala významné zvýšenie produkcie IgA a Gd-IgA B lymfocytmi, čo môže znamenať, že samotné Th bunky nestačia a sú potrebné ďalšie faktory.

Naproti tomu u živých celkových lymfocytov stimulovaných IL-6, IL-21 a CD40-L od IgA nefropatických pacientov (v grafe na Obr. 10 a 11 IgAN lymfocyty stimu) dochádzalo k významnému zvyšovaniu. V celkových lymfocytoch sú Th bunky taktiež obsiahnuté, avšak spolu s nimi túto populáciu buniek tvoria aj Tc bunky, B bunky a NK (CD16+CD56+) bunky (Virgo a Gibbs, 2012). Rozdiel produkcie IgA a Gd-IgA bolo možné pozorovať aj medzi zdravými jedincami a IgA nefropatickými pacientami (v grafe na Obr. 10 a 11 HC a IgAN lymfocyty stimu). Zdraví jedinci na rozdiel od IgA nefropatických pacientov významné zvyšovanie produkcie nejavili. Možno teda usudzovať, že ďalšie populácie buniek celkových lymfocytov, alebo nimi produkované látky, sú potrebné pre nadprodukciu IgA a Gd-IgA. Zároveň možno konštatovať, že k tomuto javu dochádza špecificky len u IgA nefropatických pacientov.

Získané výsledky by mohli byť overené na väčšej skupine zdravých jedincov a IgA nefropatických pacientov. V tejto práci mala byť každá skupina buniek tvorená tromi hodnotami od troch jedincov, avšak u niektorých skupín tretia hodnota chýbala z dôvodu, že koncentrácia IgA bola pod limitom detekcie alebo že došlo ku kontaminácii vzorky počas inkubácie buniek. Jednou z možností vylepšenia tejto metódy je, že celkový počet buniek v každej skupine by bol z počtu 100 000 upravený na 200 000 buniek. Lenže to by sa odrazilo na množstve počiatkovej krvi, ktorej by bol potrebný pravdepodobne dvojnásobok a predstavovalo by to tak väčšiu záťaž pre testovaných ľudí. Taktiež by sa dvojnásobne predĺžil čas sortovania, pričom vysortovať 100 000 B buniek trvalo približne hodinu.

Štúdie poukazujú na to, že pri IgAN, či už glomerulárne depozity s Gd-IgA alebo Gd-IgA+ bunky v sére, obsahujú prevažne lambda ľahké reťazce (Hassler, 2020). IgA je bežne produkovaný na slizniciach a v dimérnej forme, na ktorej vytváraní sa podieľa J reťazec (Fagarasan et al., 2009). Gd-IgA v cirkulácii sa vyskytuje v polymérnej forme v porovnaní od cirkulujúceho, predominantne monoméneho, IgA (Reily et al., 2014). Niektoré štúdie taktiež naznačujú, že plazmatické bunky mandlí a gastrointestinálneho traktu vylučujú prevažne ľahký reťazec lambda, na rozdiel od plazmatických buniek odvodených z kostnej drene, ktoré vylučujú hlavne kappa ľahké reťazce. Lambda ľahký reťazec by teda mohol zohrávať úlohu v objasnení pôvodu polymérneho Gd-IgA v krvi (Ravipati et al., 2022).

V diplomovej práci bolo pomocou fluorescenčnej mikroskopie uskutočnené pozorovanie a následná analýza Gd-IgA+, λ + a J-reťazec+ buniek, po tom, čo mononukleárne bunky od IgA nefropatického pacienta boli stimulované IL-6. Potvrdená

bola prítomnosť Gd-IgA+λ+J-reťazec+ buniek. Pozorované však boli aj bunky produkujúce imunoglobulíny, u ktorých nebol detegovaný λ ľahký reťazec (napríklad bunka na Obr. 17). Vyplýva z toho, že nie všetky bunky od IgA nefropatického pacienta majú λ ľahké reťazce na imunoglobulínoch, ale vytvárajú aj druhý typ ľahkého reťazca κ. Ďalšie typy buniek, ktoré boli pozitívne na λ ľahký reťazec a negatívne na IgA či Gd-IgA (napríklad bunka na Obr. 13), mohli vytvárať inú triedu imunoglobulínov, napríklad IgG.

Pri pozorovaní buniek pozitívnych na J reťazec boli niektoré bunky negatívne na Gd-IgA a λ ľahký reťazec ale zároveň pozitívne na J reťazec (napríklad bunka na Obr. 18). Pravdepodobne sa jednalo o bunky tvoriace κ ľahké reťazce na IgA alebo IgM. IgA a IgM sú jediné dve triedy imunoglobulínov vytvárajúce polymérne štruktúry (Johansen et al., 2000), preto bunky J-reťazec+Gd-IgA-λ- nemohli predstavovať IgG+ alebo IgE+ bunky.

Rekombinantný proteín CH1-HR-CH2 je časť IgA, ktorú možno sacharidovo modifikovať. Získaná by tak bola HR Gd-IgA, ktorá by následne mohla byť využitá pre ďalšie vedecké účely, predovšetkým na detekciu anti-Gd-IgA+ B lymfocytov a na vychytávanie protilátok namierených proti Gd-IgA s ich následnou analýzou.

Produkcia a purifikácia proteínu CH1-HR-CH2 uvedená v tejto práci vyžaduje optimalizáciu vzhľadom na nízku výťažnosť a nedostatočnú čistotu. Prvým problémom je zadržiavanie záujmového proteínu v bakteriálnej pelete, čo vedie k malej výťažnosti. V baktériách pravdepodobne dochádza k vytváraniu inklúzných teliesok, čo je jedným z najčastejších nežiaducich udalostí pri využívaní expresných systémov na produkciu rozpustných rekombinantných proteínov (García-Fruitós, 2010). Inklúzne telieska sa vyskytujú v cytoplazme a z 80-95 % predstavujú heterológny exprimovaný proteín v nerozpustnej forme. Ide o zhluk nezložených proteínov, často neaktívnych, ako následok environmentálnych stresových podmienok alebo rýchlej a vysokej expresie (Ramón et al., 2014). Existujú však spôsoby ako získať bioaktívny záujmový proteín z inklúzných teliesok. Tento proces zahŕňa štyri kroky, a to izoláciu inklúzných teliesok z buniek *E. coli*, solubilizáciu proteínových agregátov, preskladanie a purifikáciu solubilizovaného proteínu. Izolácia od zvyšku bunkových komponentov je väčšinou realizovaná pomocou nízkorychlostnej centrifugácie po lýze buniek. Proteínové agregáty spolu s kontaminantmi sa potom solubilizujú použitím vysokých koncentrácií chaotropných činidiel, medzi ktoré patrí močovina, guanidín hydrochlorid a detergenty ako SDS, N-cetyltrimetylamóniumchlorid a sarkozyl (Singh a Panda, 2005). Opísaný

proces získania záujmového proteínu z inklúzných teliesok môže predstavovať riešenie problému so zadržiavaním proteínu uvedeného v tejto práci.

Prítomnosť proteínov prirodzene sa vyskytujúcich v *E. coli* a bohatých na histidín je ďalšia nevýhoda tohto expresného systému pri použití afinitnej purifikácie His-tag. Rekombinantný proteín CH1-HR-CH2 v tejto práci bol znečistený týmito proteínmi. Najúčinnším prostriedkom na zvýšenie čistoty cieľového proteínu je použitie dodatočných afinitných značiek alebo viacnásobných purifikačných krokov, čo však znižuje výťažok, zvyšuje čas čistenia a náklady. Možnosť optimalizácie tejto metódy môže predstavovať expresný kmeň *E. coli* s názvom LOBSTR, ktorý znižuje produkciu niektorých kontaminujúcich proteínov a zároveň udržiava normálny rast buniek (Andersen et al., 2013).

Niektoré ciele praktickej časti diplomovej práce boli modifikované kvôli optimalizácii podmienok. Ide o ciele „optimalizácia sortovania buniek do rôznych formátov (tkanivový plast, mikroskopické sklíčka)“ a „analýza ľahkých reťazcov Gd-IgA u sortovaných IgA lymfocytov po stimulácii IL-6 pomocou fluorescenčnej mikroskopie“.

Sortovanie buniek v tejto práci bolo optimalizované, ale len do formátu falkoniiek. Bunky mohli byť teoreticky sortované aj do tkanivového plastu, v ktorom následne boli inkubované. Avšak z dôvodu, že bunky po sortovaní museli byť zbavené nosnej kvapaliny, čo znamenalo premytie a centrifugovanie, a následne ešte dochádzalo ku zlučovaniu B buniek s Th bunkami, tak jednoduchšie bolo uchovávať bunky vo falkonkách.

Analýza ľahkých reťazcov Gd-IgA IgA lymfocytov po stimulácii IL-6 pomocou fluorescenčnej mikroskopie taktiež bola uskutočnená, s tým že boli použité mononukleárne bunky namiesto čisto IgA⁺ buniek. Dôvodom bolo, že sortovanie takejto populácie buniek by bolo časovo náročné. IgA⁺ bunky sú avšak prítomné v mononukleárnych bunkách.

6 ZÁVER

V teoretickej časti diplomovej práce bola opísaná problematika IgA nefropatie, patogenéza tohto ochorenia, diagnóza či možnosti liečby. Ďalšie kapitoly boli venované T lymfocytom a ich vplyvom na IgA nefropatiu, ľahkým reťazcom imunoglobulínov a procesu sortovania buniek.

V praktickej časti bola uskutočnená detekcia T lymfocytov prispievajúcich k produkcii Gd-IgA, pričom využitými metódami boli izolácia mononukleárnych buniek z periférnej krvi, sortovanie vybraných populácií buniek a sendvičová ELISA. Postup pri sortovaní buniek bol navrhnutý a optimalizovaný pre účel tejto diplomovej práce. Porovnaná bola produkcia IgA a Gd-IgA medzi 4 skupinami buniek od zdravých jedincov a IgA nefropatických pacientov. Týmito skupinami buniek boli celkové lymfocyty, B lymfocyty a B lymfocyty s T pomocnými bunkami stimulované tromi biologicky aktívnymi molekulami: interleukínom 6, 21 a ligandom CD40. Ako negatívna kontrola boli použité celkové lymfocyty nestimulované.

Na základe porovnania bolo zistené, že samotné T pomocné bunky neovplyvňujú B lymfocyty natoľko, aby dochádzalo k významnému zvyšovaniu produkcie IgA a Gd-IgA. Na toto zvyšovanie sú potrebné pravdepodobne ďalšie populácie buniek, alebo látky nimi produkované, ktoré sú zahrnuté v rámci populácie celkové lymfocyty. Zároveň k významnému zvyšovaniu dochádzalo špecificky len u IgA nefropatických pacientov, čím sa podarilo identifikovať faktory špecifické pre nadprodukciiu Gd-IgA u IgA nefropatických pacientov.

Ďalším výsledkom praktickej časti bolo vytvorenie postupu fluorescenčného farbenia buniek a ich fixácie za účelom vizualizácie Gd-IgA⁺, λ⁺ buniek a buniek pozitívnych na spojovacie J-reťazec pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Pozorované a analyzované tak boli rôzne typy buniek od IgA nefropatického pacienta po ich stimulácii interleukínom 6.

Nad rámec cieľov diplomovej práce bola popísaná produkcia a purifikácia rekombinantného proteínu CH1-HR-CH2, predstavujúceho časť protilátky IgA, ktorá by v prípade úspešnej produkcie mohla byť upravená na pántovú oblasť Gd-IgA a tá by následne mohla slúžiť na ďalšie vedecké účely. Produkciu a purifikáciu je však potrebné vylepšiť z dôvodu nízkeho výťažku a znečistenia proteínu ďalšími skupinami proteínov.

7 LITERATÚRA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th edition). Garland Science.
- Andersen, K. R., Leksa, N. C., & Schwartz, T. U. (2013). Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(11), 1857-1861. <https://doi.org/10.1002/prot.24364>
- Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R., & Tangye, S. G. (2008). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*, 181(3), 1767-1779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1767>
- Basnayake, K., Stringer, S. J., Hutchison, C. A., & Cockwell, P. (2011). The biology of immunoglobulin free light chains and kidney injury. *Kidney international*, 79(12), 1289-1301. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.94>
- Basu, S., Campbell, H. M., Dittel, B. N., & Ray, A. (2010). Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (41), e1546. doi:10.3791/1546
- Berthelot, L., Robert, T., Vuiblet, V., Tabary, T., Braconnier, A., Dramé, M., Toupance, O., Rieu, P., Monteiro, R.C., & Touré, F. (2015). Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD89 complexes. *Kidney international*, 88(4), 815-822. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.158>
- Bragheri, F., Vázquez, R. M., & Osellame, R. (2020). *Three-dimensional microfabrication using two-photon polymerization* (2nd edition). William Andrew Publishing.
- Cell Sorter Operator's Guide, LE-SH800 Series, Software Version 2.1, (2015), Sony Biotechnology, San Jose, California, USA.
- Chang, S., & Li, X. K. (2020). The role of immune modulation in pathogenesis of IgA nephropathy. *Frontiers in Medicine*, 7, 92. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00092>
- Čutková, A. (2021). *Charakterizácia buniek z periférnej krvi po stimulácii interleukínom-6 u IgA nefropatie* [Bakalárska práca]. Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- de Sousa-Pereira, P., & Woof, J. M. (2019). IgA: structure, function, and developability. *Antibodies*, 8(4), 57. <https://doi.org/10.3390/antib8040057>
- den Haan, J. M., Arens, R., & van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology letters*, 162(2), 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.011>
- Diehl, S. A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., Blom, B., & Spits, H. (2012). IL-6 triggers IL-21 production by human CD4+ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. *Immunology and cell biology*, 90(8), 802-811.
- Dienz, O., Eaton, S.M., Bond, J.P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E.M., Charland, C., Leonard, W.J., Ciliberto, G., et al. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206(1), 69-78. <https://doi.org/10.1084/jem.20081571>
- Donadio, J. V., & Grande, J. P. (2002). IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 347(10), 738-748. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020109>
- Esteve Cols, C., Graterol Torres, F. A., Quirant Sánchez, B., Marco Rusiñol, H., Navarro Díaz, M. I., Ara del Rey, J., & Martínez Cáceres, E. M. (2020). Immunological pattern in IgA nephropathy. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1389. <https://doi.org/10.3390/ijms21041389>

- Excel-Lib.net*. <https://sk.excel-lib.net/11705309-how-to-find-outliers-in-excel-and-how-to-handle-these> (31.3.2023)
- Fabbri, M., Smart, C., & Pardi, R. (2003). T lymphocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(7), 1004-1008. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00037-2)
- Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O., & Suzuki, K. (2009). Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annual review of immunology*, 28, 243-273. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101314>
- Flow Cytometry Protocols Handbook, Cellular biology, (2022), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- García-Fruitós, E. (2010). Inclusion bodies: a new concept. *Microbial cell factories*, 9, 1-3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-80>
- Gorentla, B. K., & Zhong, X. P. (2012). T cell receptor signal transduction in T lymphocytes. *Journal of clinical & cellular immunology*, 2012 (Suppl 12), 005. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.S12-005>
- Groza, Y., Jemelkova, J., Kafkova, L. R., Maly, P., & Raska, M. (2022). IL-6 and its role in IgA nephropathy development. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 66, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.04.001>
- Hassler, J. R. (2020). IgA nephropathy: a brief review. *Seminars in diagnostic pathology*, 37(3), 143-147. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2020.03.001>
- Hiki, Y., Hori, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Yuzawa, Y., Kitaguchi, N., & Takahashi, K. (2015). Specificity of two monoclonal antibodies against a synthetic glycopeptide, an analogue to the hypo-galactosylated IgA1 hinge region. *Journal of Nephrology*, 28, 181-186. <https://doi.org/10.1007/s40620-014-0118-4>
- Hořejší, V., & Bartůňková, M. (2009), *Základy imunologie*. (4. vydání), Triton, Praha.
- Infante, B., Rossini, M., Di Lorenzo, A., Coviello, N., Giuseppe, C., Gesualdo, L., Giuseppe, G., & Stallone, G. (2020). Recurrence of immunoglobulin A nephropathy after kidney transplantation: a narrative review of the incidence, risk factors, pathophysiology and management of immunosuppressive therapy. *Clinical Kidney Journal*, 13(5), 758-767. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa060>
- Johansen, F. E., Braathen, R., & Brandtzaeg, P. (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scandinavian journal of immunology*, 52(3), 240-248. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2000.00790.x
- Kaplan, B., Livneh, A., & Sela, B. A. (2011). Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *TheScientificWorldJournal*, 11, 726-735. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.65>
- Karnowski, A., Chevrier, S., Belz, G.T., Mount, A., Emslie, D., D'Costa, K., Tarlinton, D.M., Kallies, A. and Corcoran, L.M. (2012). B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 2049-2064. <https://doi.org/10.1084/jem.20111504>
- Koguchi, Y., Buenafe, A. C., Thauland, T. J., Gardell, J. L., Bivins-Smith, E. R., Jacoby, D. B., Slifka, M.K., & Parker, D. C. (2012). Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T follicular helper cells as well as CD4+ 8- thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. *PLoS one*, 7(2), e31296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031296>
- 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, 117. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00117>

- Lin, J. R., Wen, J., Zhang, H., Wang, L., Gou, F. F., Yang, M., & Fan, J. M. (2018). Interleukin-17 promotes the production of underglycosylated IgA1 in DAKIKI cells. *Renal failure*, 40(1), 60-67. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2017.1419972>
- Mattanovich, D., & Borth, N. (2006). Applications of cell sorting in biotechnology. *Microbial cell factories*, 5(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-12>
- Maixnerova, D., Reily, C., Bian, Q., Neprasova, M., Novak, J., & Tesar, V. (2016). Markers for the progression of IgA nephropathy. *Journal of nephrology*, 29, 535-541. <https://doi.org/10.1007/s40620-016-0299-0>
- Nybo, K. (2010). Molecular Biology Techniques Q&A. *BioTechniques*, 49(4), 703-705. <https://doi.org/10.2144/000113732>
- Ohyama, Y., Renfrow, M. B., Novak, J., & Takahashi, K. (2021). Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy: What we know and what we don't know. *Journal of Clinical Medicine*, 10(16), 3467. <https://doi.org/10.3390/jcm10163467>
- Pierce™ BCA Assay Kit, (2020), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64(2), 109-130. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
- QIAexpressionist (2003). *A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins* (5th edition). Qiagen.
- Ramón, A., Señorale-Pose, M., & Marín, M. (2014). Inclusion bodies: not that bad... *Frontiers in microbiology*, 5, 56. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00056>
- Ravipati, P., Freese, R. L., Royal, V., Bu, L., Canetta, P., Gipson, D., Kallash, M., Kiryluk, Krzysztof., Nast, C., Reich, H. N., et al. (2022). Clinicopathologic Significance of Predominant Lambda Light Chain Deposition in IgA Nephropathy. *Kidney International Reports*, 7(11), 2462-2473. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.08.003>
- Reily, C., Ueda, H., Huang, Z. Q., Mestecky, J., Julian, B. A., Willey, C. D., & Novak, J. (2014). Cellular signaling and production of galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy, an autoimmune disease. *Journal of Immunology Research*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/197548>
- Ruszkowski, J., Lisowska, K. A., Pindel, M., Heleniak, Z., Dębska-Ślizień, A., & Witkowski, J. M. (2019). T cells in IgA nephropathy: role in pathogenesis, clinical significance and potential therapeutic target. *Clinical and experimental nephrology*, 23(3), 291-303. <https://doi.org/10.1007/s10157-018-1665-0>
- Sallustio, F., Curci, C., Di Leo, V., Gallone, A., Pesce, F., & Gesualdo, L. (2019). A new vision of IgA nephropathy: the missing link. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 189. <https://doi.org/10.3390/ijms21010189>
- Shen, Y., Yalikun, Y., & Tanaka, Y. (2019). Recent advances in microfluidic cell sorting systems. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 282, 268-281. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.025>
- Shields IV, C. W., Reyes, C. D., & López, G. P. (2015). Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab on a Chip*, 15(5), 1230-1249. <https://doi.org/10.1039/C4LC01246A>
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 303-310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Staunstrup, N. H., Petersen, C. C., Fuglsang, T., Starnawska, A., Chernomorchenko, A., Qvist, P., & Schack, V. R. (2022). Comparison of electrostatic and mechanical cell sorting with limited starting material. *Cytometry Part A*, 101(4), 298-310. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24523>

- Su, H., Lei, C. T., & Zhang, C. (2017). Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Frontiers in immunology*, 8, 405. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00405>
- Sun, Y., Liu, Z., Liu, Y., & Li, X. (2015). Increased frequencies of memory and activated B cells and follicular helper T cells are positively associated with high levels of activation-induced cytidine deaminase in patients with immunoglobulin A nephropathy. *Molecular medicine reports*, 12(4), 5531-5537. DOI: 10.3892/mmr.2015.4071
- Suzuki, H., Moldoveanu, Z., Hall, S., Brown, R., Vu, H. L., Novak, L., Julian, B. A., Tomana, M., Wyatt, R. J., Edberg, J. C., et al. (2008). IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 629-639. doi:10.1172/JCI33189
- Suzuki, H., Kiryluk, K., Novak, J., Moldoveanu, Z., Herr, A. B., Renfrow, M. B., Wyatt, R.J., Scolari, F., Mestecky, J., Gharavi, A.G., et al. (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. (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>
- Tang, Y., He, H., Hu, P., & Xu, X. (2020). T lymphocytes in IgA nephropathy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(1), 186-194. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8673>
- Virgo, P. F., & Gibbs, G. J. (2012). Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of clinical biochemistry*, 49(1), 17-28. DOI: 10.1258/acb.2011.011128
- Woof, J. M., & Kerr, M. A. (2004). IgA function—variations on a theme. *Immunology*, 113(2), 175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01958.x>
- Yeo, S. C., Cheung, C. K., & Barratt, J. (2018). New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Pediatric Nephrology*, 33, 763-777. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3699-z>
- Zachova, K., Jemelkova, J., Kosztu, P., Ohyama, Y., Takahashi, K., Zadrazil, J., Orsag, J., Matousovic, K., Galuszkova, D., Petejova, N., et al. (2022). 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*, 33(5), 908-917. <https://doi.org/10.1681/ASN.2021081086>
- 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>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

$\alpha\beta$ T bunky	T bunky, ktorých TCR je zložený z jedného α - a jedného β -reťazca
AIDS	syndrom získaného imunodeficitu
APC	antigén prezentujúca bunka
APRIL	ligand indukujúci proliferáciu
B7	proteín nachádzajúci sa na aktivovaných bunkách APCs, ktorý sa páruje s CD28
BAFF	B-bunkový aktivačný faktor
BCR	B-bunkový receptor
BSC-A	spätný rozptyl svetla
C oblasť	konštantná oblasť
C1GalT1	core 1 β -1,3-galaktozyltransferáza
C1GalT1C1 = COSMC	C1GalT1 špecifický chaperón 1
C3	komplementový proteín 3
CARD9	gén
CCR	chemokínový receptor
CD3	proteínový komplex a koreceptor T buniek, ktorý sa podieľa na aktivácii cytotoxických a pomocných T buniek
CD4	povrchový glykoproteín pomocných T lymfocytov
CD8	povrchový glykoproteín cytotoxických T lymfocytov
CD19	povrchový antigén B lymfocytov
CD28	kostimulačný receptor T lymfocytov prítomný na naivných T-lymfocytoch a rozoznávajúci kostimulačné molekuly CD80 a CD86 na povrchu APCs
CD38	glykoproteín prítomný na plazmablastoch
CD40	receptor nachádzajúci sa na APCs
CD40-L	CD40 ligand, proteín prítomný predovšetkým na aktivovaných T lymfocytoch
CD89	IgA-receptor na povrchu leukocytov

CD138	glykoproteín prítomný na plazmatických bunkách
CDR	komplementárny určujúci región
CFHR	proteín súvisiaci s komplementovým faktorom H a s ním
CH1-HR-CH2	rekombinantná časť IgA
CpG	miesta na DNA, kde za cytozínovým nukleotidom nasleduje guanínový nukleotid
CTLA-4	receptor, kontrolný bod imunitného systému, inhibujúci T bunkovú imunitnú odpoveď
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	fragmentová oblasť imunoglobulínu viažuca antigén
FACS	fluorescenčne aktivované triedenie buniek
Fc	oblasť kryštalizovateľného fragmentu imunoglobulínu interagujúca s Fc receptormi
FLC	voľné ľahké reťazce
FoxP3	transkripčný faktor
FSC-A	predný rozptyl A
FSC-H	predný rozptyl A
FVD-421	fixable viability dye (farbivo na rozlíšenie živých mŕtvych buniek)
GalNAc	N-acetylgalaktozamín
$\gamma\delta$ T bunky	T bunky, ktorých TCR je zložený z jedného γ - a jedného δ -reťazca
Gd-IgA1	galaktozyl-deficitný IgA1
H reťazec	ťažký reťazec
HC	zdravý jedinec
HR	pántová oblasť imunoglobulínu
HRP	chrenová peroxidáza
Ig	imunoglobulín
IgAN	IgA nefropatia
IL	intreleukín
IFN- γ	interferón γ
IQR	medzikvartilový rozsah
ITAM	imunoreceptorové tyrozinové aktivačné motívy

J reťazec	spojovacích reťazec
JAK/STAT3	signalizačná dráha zahrňujúca JAK kinázy a STAT transkripčné faktory
KM55	monoklonálnu protilátku KM55 na meranie sérových hladín Gd-IgA1
komplementový faktor H	glykoproteín cirkulujúci v ľudskej plazme
LIF	cytokínový gén
L reťazec	ľahký reťazec
MACS	triedenie magneticky aktivovaných buniek
MBL	lektín viažuci manán
MHC	glykoproteíny hlavného histokompatibilného komplexu
mb-Gd-IgA1	membránovo viazaný Gd-IgA1
mb-Ig	membránovo viazaný imunoglobulín
miR-133a, miR-133b, miR-155	mikroRNA
NF- κ B	transkripčný nukleárny faktor kappa-light-chain-enhancer aktivovaných B buniek
NK bunky	prirodzené zabíjači
non-IgAN	membranózna nefropatia
O-glykány	sacharidové reťazce pripojené na serín a treonín pomocou glykozidovej väzby cez atóm kyslíka
OD	optická hustota
OSM	cytokínový gén
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PLC γ 1	fosfolipáza C gama 1
pMHC	komplex antigénový peptid-MHC
PSMB8	gén
PVDF	polyvinylidéndifluorid
QTL1	prvý kvartil
QTL3	tretí kvartil
Src	kinázy rodiny Src
ST6GalNAc2	ST6 N-acetylgalaktózaminid α -2,6-sialyltransferázy 2

Tc bunky	T cytotoxické bunky
TCR	T-bunkový receptor
Tfh bunky	folikulárne pomocné T bunky
TGF- β	transformujúci rastový faktor beta
Th bunky	T pomocné bunky
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor nekrotizujúci faktor α
Treg bunky	T regulačné bunky
V oblasť	variabilná oblasť