

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium interakce galaktosa-deficientního IgA a
autoprotilátky IgG u IgA nefropatie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Markéta Vajdíková
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
Rok:	2022

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

V Olomouci dne

Moc ráda bych poděkovala společnostem ČD, Arriva a LeoExpress, díky kterým jsem měla veškerý potřebný komfort k psaní diplomové práce při cestách z a do Olomouce. Obzvláště bych vyzvedla skvělé situace, kdy vlaky nabíraly hodinová až dvouhodinová (v jednom případě i čtyřhodinové) zpoždění, díky čemuž jsem na cestě mohla trávit více času a napsala jsem takto minimálně většinu praktické části této práce. Taky moc děkuju svým skvělým spolubydlícím a naší neméně skvělé kočce, se kterými jsme si byly navzájem podporou. (Akorát teda kočce to bylo jedno.) Dále bych poděkovala své nejoblíbenější skupině přátel nejen za námi vytvořený playlist (<https://open.spotify.com/playlist/0SFPvwlGcwCAJcQgNINurw>) ke psaní diplomové práce, díky kterému jsem na to nikdy nebyla sama. Velký dík taky patří domů, kde mám při studiu tu největší možnou podporu, za což jsem velmi vděčná. Také bych chtěla poděkovat za skvělé a přátelské prostředí na Ústavu imunologie, kde probíhala praktická část této práce. Největší zásluhu má ovšem vedoucí mé diplomové práce, Mgr. Petr Kosztyu, Ph. D., který nikdy neztrácel optimismus a dobrou náladu, a naopak vždy našel nějakou chvíli, kterou mohl ztratit s touto prací. Děkuju.

Zpracování této diplomové práce bylo podpořeno grantem IGA_LF_2022_011.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Vajdíková
Název práce	Studium interakce galaktosa-deficientního IgA a autoprotilátky IgG u IgA nefropatie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>IgA nefropatie je nejčastější primární glomerulonefritida na světě. Je charakteristická tvorbou galaktosově deficientního IgA. To rozpoznávají specifické autoprotilátky IgG a spolu pak tvoří cirkulující imunitní komplexy. Ty se následně ukládají v glomerulech a tam spouští mesangiální proliferaci, expanzi matrix a tvorbu zánětlivých faktorů. V současné době je léčba založena na obecném zpomalení úbytku ledvinových funkcí a je podobná jako u ostatních ledvinových onemocnění. Pro budoucí léčbu se zde nachází možnosti kauzální terapie, které mohou být zaměřeny na inhibici buněk tvořících gd-IgA1, snížení molekulové hmotnosti imunitních komplexů, inhibice proliferace mesangiálních buněk či štěpení již uložených imunitních komplexů v mesangiích. V této diplomové práci bylo vytvořeno polymerní degalaktosylované IgA1 a také 1123 IgG autoprotilátka. Pomocí těchto byly tvořeny imunitní komplexy, které pak byly detekovány metodou ELISA a jejich afinita měřena metodou SPR. Bylo detekováno zvýšení vaznosti oproti kontrolním vzorkům. Následně byly detekovány gd-IgA1 v sérech pacientů, stejně tak autoprotilátky v sérech pacientů a afinita mezi gd-IgA1 ve vybraném séru pacienta a vytvořenou autoprotilátkou. Data budou využita při dalším výzkumu malých rekombinantních inhibitorů imunitních komplexů.</p>
Klíčová slova	IgA nefropatie, autoimunitní onemocnění, glomerulonefritida, galaktosově deficientní IgA1, autoprotilátky, léčba IgAN
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Markéta Vajdíková
Title	Study of the interaction of galactose-deficient IgA and autoantibody IgG in IgA nephropathy
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>IgA nephropathy is the most common primary glomerulonephritis worldwide. It's characterized by the formation of galactose-deficient IgA, which is recognized by specific IgG antibodies and together they form circulating immune complexes. These are deposited in the glomeruli, where they trigger mesangial proliferation, matrix expansion and the formation of inflammatory factors. Available treatment is based on a slowing of the loss of kidney function and it's similar as the treatment of other kidney diseases. For future treatment, there are some options of causal therapy, that can be aimed at inactivation of the cells producing galactose deficient IgA1, reducing the size of immune complexes, stopping of mesangial cells activation or cleavage of immune complexes already deposited in mesangium. This diploma thesis was focused on production of degalactosylated polymeric IgA1, production of 1123 IgG autoantibody. <i>De novo</i> formation of immune complexes of dg-IgA1 and the 1123 IgG autoantibody, which were detected by ELISA and their affinity measured by SPR. An increase of binding compared to control samples was detected. Finally, gd-IgA1 in the sera was detected, as well as autoantibodies in the patient's sera and the affinity between the gd-IgA1 in the selected patient's serum and recognized by the autoantibody. The data will be used in further research on small recombinant inhibitors of immune complexes.</p>
Keywords	IgA nephropathy, autoimmune disease, glomerulonephritis, galactose deficient IgA1, autoantibodies, treatment of IgAN
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
2.1	IgA nefropatie.....	3
2.2	Patogeneze IgA nefropatie	4
2.2.1	První faktor: Zvýšené hladiny gd-IgA1 v séru.....	6
2.2.2	Druhý faktor: Anti-gd-IgA1 protilátky	8
2.2.3	Třetí faktor: Zvýšené hladiny cirkulujících imunitních komplexů	9
2.2.4	Čtvrtý faktor: Proliferace mesangiálních buněk, glomerulární zánět a poškození ledvin	10
2.3	Klinická prezentace	12
2.4	Léčba	13
2.4.1	Blokáda renin-angiotensin	13
2.4.2	Léčba imunosupresivy	13
2.5	Kauzální terapie.....	15
2.5.1	Inhibice tvorby gd-IgA1.....	17
2.5.2	Ovlivnění tvorby imunitních komplexů.....	17
2.5.3	Inhibice aktivace mesangiálních buněk	18
2.5.4	Štěpení IgA1 v mesangiálních depozitech	18
2.6	SPR.....	19
2.6.1	Mechanismus SPR	20
2.6.2	Nevýhody SPR.....	21
2.6.3	Strategie imobilizace	21
2.6.4	Druhy uspořádání imunoesejí založených na SPR.....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál a chemikálie	27
3.1.1	Chemikálie	27

3.1.2	Protilátky	28
3.1.3	Pufry a roztoky	29
3.1.4	Přístrojové vybavení.....	30
3.2	Metody.....	31
3.2.1	Vzorky sér pacientů s IgAN.....	31
3.2.2	Tvorba autoprotiilátky IgG 1123.....	32
3.2.3	SDS-PAGE elektroforéza IgG 1123 autoprotiilátky.....	34
3.2.4	Detekce 1123 IgG autoprotiilátky metodou semi-dry Western blot	36
3.2.5	Tvorba degalaktosylovaného IgA1	37
3.2.6	Detekce degalaktosylovaného IgA1 metodu ELISA	38
3.2.7	Detekce imunitních komplexů metodou ELISA	39
3.2.8	Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí lektinu <i>Helix pomatia</i> metodou ELISA	40
3.2.9	Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí 1123 IgG autoprotiilátky metodou ELISA	41
3.2.10	Detekce IgG autoprotiilátky v sérech pacientů pomocí dg-IgA1 metodu ELISA	41
3.2.11	Kompetice lektinů <i>Helix pomatia</i> a <i>Helix aspersa agglutinin</i> s IgG v sérech pacientů, detekce metodou ELISA	42
3.2.12	Charakterizace imunitních komplexů metodou SPR	43
3.2.13	Statistická analýza.....	45
4	VÝSLEDKY	46
4.1	Produkce 1123 IgG autoprotiilátky a její detekce	46
4.2	Tvorba gd-IgA1	48
4.2.1	Detekce degalaktosylace IgA1 metodu ELISA.....	49
4.3	Detekce imunitních komplexů tvořených dg-IgA1 a autoprotiilátkou 1123 metodou ELISA.....	50

4.4	Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí 1123 IgG autoprotilátky metodou ELISA.....	51
4.5	Detekce IgG autoprotilátky v sérech pacientů.....	52
4.6	Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí lektinu <i>Helix pomatia</i> metodou ELISA.....	53
4.7	Kompetice lektinů <i>Helix pomatia</i> a <i>Helix aspersa agglutinin</i> s IgG v sérech pacientů	54
4.8	Charakterizace imunitních komplexů metodou SPR.....	56
5	DISKUZE	61
6	ZÁVĚR	63
7	Citovaná literatura.....	64
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	71

Cíle práce

Teoretická část: Vypracování literární rešerše na téma IgA nefropatie, molekulární mechanismy vzniku s důrazem na vliv imunitních komplexů, jejich tvorba a interakce.

Praktická část: Tvorba imunitních komplexů s využitím galaktosově deficientního IgA a autoprotilátky IgG, měření afinity vzniklých imunokomplexů metodou SPR, měření afinity imunitních komplexů vzniklých interakcí rekombinantní autoprotilátky IgG a galaktosa-deficientního IgA v séru pacientů s IgA nefropatií

1 ÚVOD

IgA nefropatie je nejčastější primární glomerulonefritidou a příčinou hematurie na světě a jako taková zasahuje na světě zhruba 200 000 – 300 000 osob ročně (Schena, 2018). Častěji se vyskytuje u asijské populace, téměř vůbec se naopak nevyskytuje v populaci africké. Existuje zde tedy velká pravděpodobnost genetických predispozic, které by vysvětlovaly častější výskyt tohoto onemocnění (Gutiérrez, 2020). Kromě faktorů genetických zde mohou hrát roli také lokální patogeny, například infekce parazitickými hlísty (Sallustio, 2020).

IgAN vykazuje širokou škálu příznaků a různé projevy onemocnění. Kvůli tomu je velmi obtížné rozřadit pacienty dle jednotlivých klinických a histologických znaků, což velmi ztěžuje způsob léčby (Gutiérrez, 2020). IgA nefropatie patří mezi autoimunitní onemocnění, které je charakteristické tvorbou galaktosově deficientního IgA. K jeho tvorbě dochází, pokud neproběhne v pořádku glykosylace v pantové oblasti IgA1 a je odkryt N-acetylgalaktosamin, který je rozpoznáván jako antigen autoprotiátkami, IgG nebo IgA izotypu, za vzniku imunitních komplexů. Tyto komplexy se ukládají v glomerulech, kde spouští mesangiální proliferaci, expanzi matrix a tvorbu zánětlivých faktorů (Heineke, 2017).

V současné době je léčba IgAN založena na obecném zpomalení úbytku ledvinových funkcí, snížení proteinurie a kontrolu krevního tlaku, a proto je podobná jako u ostatních ledvinových onemocnění. Nejčastějšími způsoby léčby jsou blokáda systému renin-angiotensin, nebo léčba imunosupresivy. Žádná z těchto metod však nemá vliv na konečné zachování renálních funkcí (Coppo, 2010). Pro budoucí léčbu se zde vyskytují možnosti kauzální terapie, které jsou momentálně ve fázi výzkumu. Patří mezi ně možná inhibice buněk tvořící gd-IgA1, snížení molekulové hmotnosti imunitních komplexů vytvořením pouze částečných IgA či autoprotiátky. Dále je zde možnost pokusit se inhibovat proliferaci mesangiálních buněk či štěpit již uložené komplexy v mesangiálních depozitech. Žádný z těchto způsobů ještě není uveden do klinické praxe, avšak je počítáno s vytvořením kauzální terapie, která bude plně funkční, v nejbližší době (Raška, 2016).

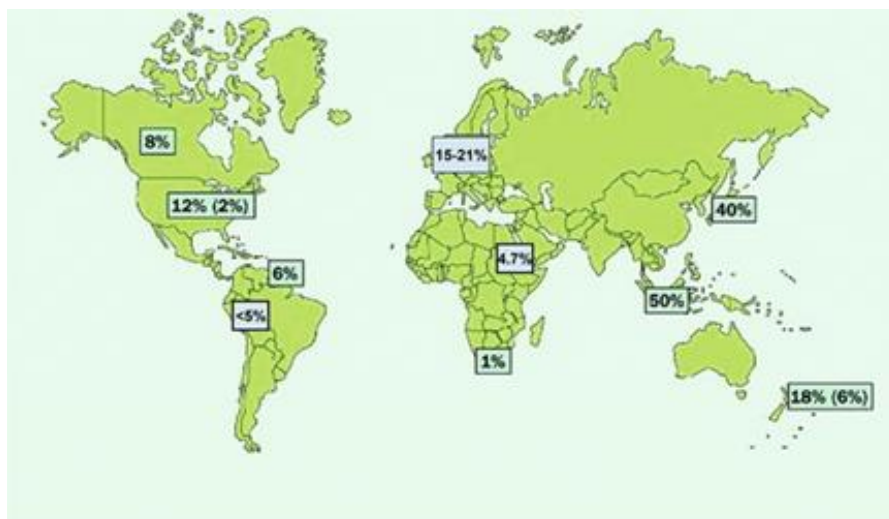
Oblíbenou metodou pro studium interakcí biomolekul je povrchová plasmonová rezonance (SPR). Pokud záření dopadá na povrch zlata, stříbra a dalších kovů, změní směr odrazu. Stane se tomu tak díky rezonanci vznikající mezi zářením a povrchovými

elektrony kovu. Díky této metodě je možné měřit interakce různých biomolekul, například protilátek, v reálném čase a bez použití značek (Nguyen, 2015).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 IgA nefropatie

Autoimunitní onemocnění IgA nefropatie (IgAN), často označována jako Bergerova choroba, je nejčastější primární glomerulonefritidou zasahující okolo 200 000 - 350 000 lidí na světě ročně (Schena, 2018). Její výskyt však není rovnoměrně rozmístěn. IgAN se objevuje velmi často v asijské populaci, převážně v jihovýchodní Asii, téměř vůbec se naopak nevyskytuje v populaci africké. Její distribuce v Evropě je též rozličná, s predominancí na severu a východě kontinentu. Je tedy pravděpodobné, že v těchto částech světa mohou být určité genetické predispozice, které mohou částečně vysvětlit častější výskyt této choroby (Gutiérrez, 2020) (Obr. 1). Moderní pohled na IgA nefropatii také poukazuje na to, že je třeba brát ohledy i na environmentální faktory, životní styl a stravu pacienta. Některé články navíc naznačují, že kromě genetických faktorů můžou mít na vznik tohoto onemocnění významný vliv také lokální patogeny, hlavně infekce parazitickými hlísty (Sallustio, 2020; Kiryluk, 2014).



Obr. 1: Geografické znázornění výskytu IgAN. Procenta představují podíl případů IgAN ve srovnání se všemi provedenými nativními biopsiemi ledvin. Upraveno podle *Cheung & Barratt, 2016*.

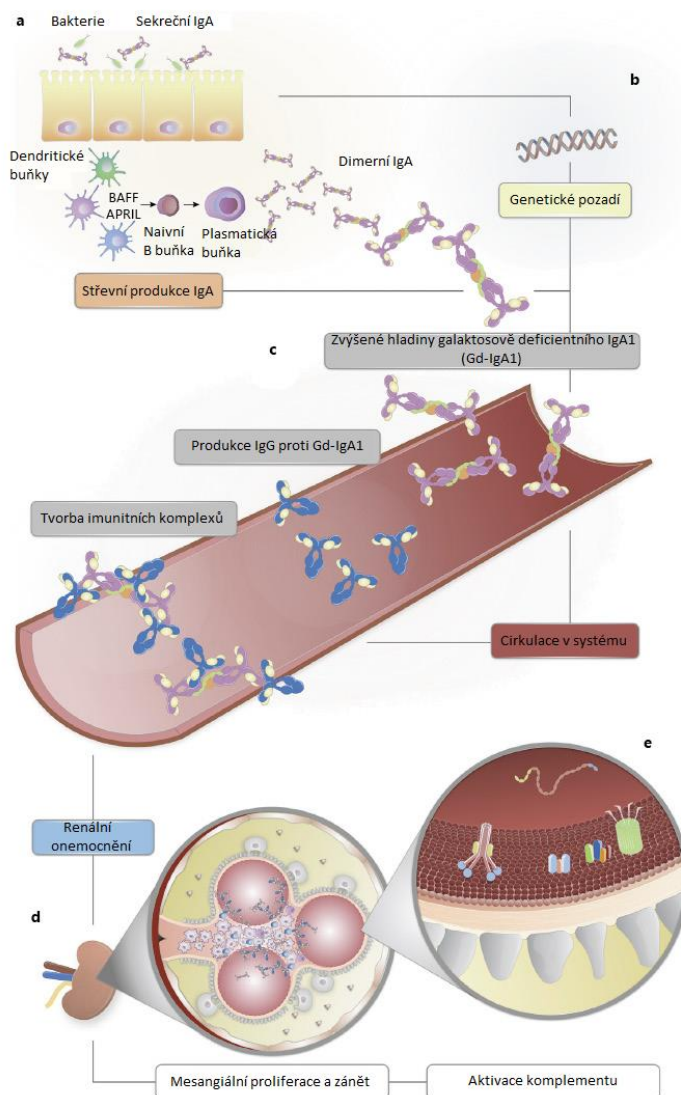
Chronické renální selhání nastává do dvaceti let u zhruba 30 % pacientů starších 30 let, u kterých byla prováděna renální biopsie (Huang, 2019). Nejdůležitějším znakem pro určení ztráty funkce ledvin je míra proteinurie během pozorování pacienta, neboť rychlost poklesu odhadované rychlosti glomerulární filtrace se zvyšuje přímo úměrně s množstvím proteinurie. IgAN se však vyznačuje širokou škálou klinických projevů a různými průběhy. Nacházíme zde také rozdílné projevy i v porovnání dětských a dospělých pacientů (Gutiérrez, 2020). Navíc jsou klinické znaky také poznamenány pohlavím, příslušností k etniku a rasou. U 5,8 % případů se také nacházejí genetické predispozice pro IgA nefropatii (Li, 2015). Proto se má za to, že IgAN může vznikat různými biologickými cestami, načež zde nastává otázka, zda je IgAN jedinou patogenní entitou. Rozřazení pacientů dle jednotlivých klinických a histologických znaků je zatím velmi obtížné, což značně komplikuje terapeutický přístup. Často se klinický obraz (převážně u asymptomatické proteinurie a hematurie) objevuje roky před provedením renální biopsie (Gutiérrez, 2020).

IgA nefropatie je autoimunitní choroba charakteristická abnormální syntézou IgA1 a jeho glykosylací vedoucí k nárůstu cirkulujícího galaktosově-deficientního IgA1 (gd-IgA1). Toto abnormální IgA1 může vytvářet imunitní komplexy se specifickými autoprotilátkami. Následně se komplexy IgA1 ukládají v glomerulech a zahajují rozvoj mesangiální proliferace a expanze matrix. Nejkonzistentnějším klinickým nálezem u IgAN je přítomnost hematurie; nicméně klinické faktory, které ovlivňují vývoj tohoto onemocnění jsou proteinurie, přítomnost nebo vývoj arteriální hypertenze a snížená rychlost glomerulární filtrace. Vzhledem k tomu, že hladina proteinurie je významně spojována s horší funkcí ledvin, jsou všechna terapeutická opatření zacílena na její redukci. Navzdory tomu vznikají studie, které jsou zaměřeny přímo na patogenezi IgA nefropatie. Stanovení nových validních biomarkerů a začleňování nových proměnných, jako jsou hematurie, histologie, aktivita komplementu a podobně, by mohlo vést k radikální změně terapeutického postupu u tohoto komplikovaného onemocnění (Heineke, 2017).

2.2 Patogeneze IgA nefropatie

IgAN je autoimunitní onemocnění ovlivněné mnoha genetickými, etnickými a environmentálními faktory. Přestože hlavním činitelem se zdá být gd-IgA1, k rozvoji

IgAN a renálnímu poškození přispívá více faktorů. V současnosti je jako model patogenity akceptován „čtyř-faktorový“ model (Suzuki, 2011a) (Obr. 2).

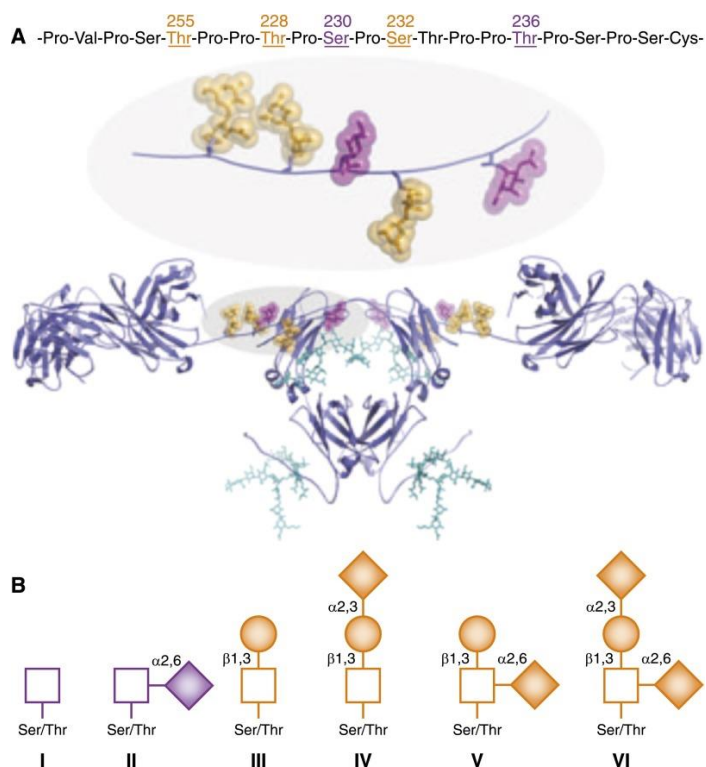


Obr. 2: Patogeneze IgAN. Grafické znázornění vícefaktorové teorie patogeneze onemocnění. **a** Produkce slizničního IgA může být indukována závislými, nebo nezávislými mechanismy T-buněk. Sekrece cytokinů, jako jsou interleukin-6, interleukin-10, BAFF nebo APRIL, dendritickými buňkami indukuje B-buňky, aby zahájily produkci IgA1. Plasmatické buňky produkující IgA migrují do slizničního vaziva a uvolňují dimerní IgA1 do lumen. Některé nesprávně nasměrované buňky sekretující IgA jsou uvolněny do systémového kompartmentu, kde následně produkují špatně O-galaktosylovaný IgA1 do systémové cirkulace. **b** Některé genetické a environmentální faktory mohou vyvolávat u pacientů abnormální imunitní odpověď. Toto genetické pozadí může také ovlivňovat fenotyp IgAN. **c** Vazba TLR způsobuje polyklonální proliferaci lymfocytů. Jsou vytvářeny specifické IgG a IgA proti gd-IgA1 a ihned formují imunitní komplexy. **d** Imunitní komplexy jsou zachytávány v mesangiu díky zvýšené afinitě gd-IgA1 ke komponentům extracelulární matrix a spouštějí zánětlivé dráhy, což následně vyústí v glomerulární poranění a tubulointersticiální zjizvení. **e** Aktivace komplementu v patogenezi IgAN násobí a prohlubuje zánět a renální poruchu. Upraveno podle *Gutiérrez et al., 2020*.

2.2.1 První faktor: Zvýšené hladiny gd-IgA1 v séru

IgA je u lidí nejsyntetizovanější protilátkou vyskytující se na površích sliznic a zásadní pro slizniční antigenní odpovědi. Existují dvě podtřídy IgA – IgA1 a IgA2. Větší část, zhruba 80 % celkového IgA, tvoří IgA1, které je také hlavní u IgAN (Breedveld, 2019).

Stejně jako ostatní imunoglobuliny, je IgA1 glykosylovaný. Jako potencionální antigen byl rozpoznán změněný vzorec glykosylace u IgA1 (Coppo, 2010). Klíčovým znakem je deficiencie galaktosy v pantové oblasti těžkého řetězce IgA1. Jeho pantová oblast je narozdíl od IgA2 prodloužena o 13 aminokyselin a nachází se pouze u člověka a vyšších primátů (Obr. 3). Na řetězci těchto aminokyselin může být navázáno až 6 *O*-glykanů, které jsou připojeny glykosidovou vazbou na kyslík serinu či threoninu. Tyto glykany jsou syntetizovány postupně a mohou mít šest různých forem (Mestecky, 2009).



Obr. 3: Lidské IgA1: **A** Sekvence aminokyselin v pantové oblasti. V pantové oblasti IgA1 se nachází až 6 *O*-glykanů. Místa možné *O*-glykosylace jsou značena oranžově, místa *N*-glykosylace značena fialově. **B** Možné uspořádání glykanů u IgA1. Čtverce bez výplně značí GalNAc, kolečka značí galaktosu a čtverce s výplní značí kyselinu sialovou. Galaktosově deficientní glykany, které se vyskytují u pacientů s IgAN ve větší míře, jsou znázorněny na schématech **I** a **II** – ve fialové barvě. Zbytek schémat – oranžová barva reprezentuje galaktosylované varianty. Převzato z *Suzuki, 2011*.

V porovnání se zdravými jedinci vykazují pacienti s IgAN větší zastoupení špatně glykosylovaných cirkulujících IgA1 (Moldoveanu, 2007). Gd-IgA1 jsou polymerní a obvykle jsou produkovány na slizničním povrchu jako část vrozené imunitní odpovědi. Z toho vyplývá, že abnormální vrozená imunitní odpověď na slizniční infekce nebo antigeny může být zapojena do produkce gd-IgA u IgAN. Tudiž u patogeneze IgAN může být také významná role TLR, který způsobuje proliferaci polyklonálních lymfocytů a tvorbu cirkulujících imunitních komplexů. Aktivace slizničního TLR-9 indukuje nadměrnou expresi aktivačního faktoru B-buněk (BAFF) v dendritických buňkách, expanzi B-buněk a zvýšenou syntézu IgA. Na druhou stranu stejná aktivace TLR-9 indukuje produkci proteinu APRIL, což je proliferaci indukující ligand, a interleukinu-6 (IL-6), přičemž APRIL a IL-6 společně podporují tvorbu gd-IgA1. Slizniční lymfoidní tkáň by tedy mohla být potenciálním terapeutickým cílem u IgAN (Makita, 2020; Muto, 2017).

Při glykosylaci hrají významnou roli glykosylační enzymy. Začátek *O*-glykosylace IgA1 probíhá v Golgiho aparátu, kde je připojován GalNAc za katalýzy N-acetylgalaktosaminyltransferas (GalNAc-T). V buňkách produkujících gd-IgA1 je zvýšeně transkribován jeden z rodiny N-acetylgalaktosaminyltransferas, GalNAc-T14. Následně pokračuje syntéza *O*-glykanového řetězce připojením galaktosy na GalNAc aktivitou β -1,3-galaktosyltransferasy (C1GalT1) za účasti chaperonu Cosmc (Raška, 2016).

Změny v mikroprostředí modifikují IgA1 *O*-glykosylaci. Nejvýznamněji je tento vliv zprostředkován cytokiny T-helper 2 a interleukinem-6, které snižují tvorbu klíčových glykosylačních enzymů a vedou ke tvorbě aberantně glykosylovaného IgA1 (Yamada, 2010). Jsou zde také důkazy pro epigenetickou kontrolu *O*-glykosylace IgA1 pomocí mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou endogenní, krátké, nekódující jednovláknové molekuly RNA, které regulují genovou expresi. Zvýšená syntéza specifické miRNA (miR-148b) v mononukleárních buňkách periferní krve je spojena se sníženou expresí C1GalT1 a produkcí gd-IgA1. Exprese miR-148b vede ke snížení hladin mRNA kódujícího C1GalT1 a zvýšení produkce gd-IgA1 (Serino, 2012).

Dvě nedávno publikované studie QT-GWAS (kvantitativní genomové asociační studie) identifikovaly jasné asociace mezi SNP (jednonukleotidovými polymorfismy) v nekódující oblasti C1GalT1, genem kódujícím galaktosyltransferasu C1GalT1, a sérovými hladinami gd-IgA1 (Kiryluk, 2017; Gale, 2017). Toto pozorování je v souladu s myšlenkou, že změny v *O*-glykosylaci IgA1 u IgAN jsou závislé na

transkripční regulaci genu C1GalT1, pravděpodobně v důsledku sekvenční variace v nepřekládané oblasti jeho mRNA, v promotoru, nebo oblasti zesilovačů, které ovlivňují stav methylace DNA, nebo vazbu transkripčního faktoru. Jeden silně asociovaný SNP leží v oblasti jaderného promotoru pro C1GalT1 (Zeng, 2015). Pomocí analýz *in silico* bylo identifikováno několik dalších silně asociovaných SNP, které leží v rámci shodného elementu v genu, který váže transkripční faktory. Vazebné místo pro miR-148b bylo také identifikováno v rizikovém haplotypu C1GalT1, což posiluje potenciální roli miRNA při kontrole IgA1 O-glykosylace v IgAN (Novak, 2018).

V dalších studiích bylo publikováno, že prodlužování glykanového řetězce může být zastaveno předčasnou sialilací GalNAc, kterou katalyzuje ST6 N-Acetylgalaktosaminid α -2,6-sialyltransferasa (ST6GalNAc-II) (Stuchlova Horynova, 2015). Glykosyltransferasy, které se podílí na abnormální glykosylaci IgA1 u pacientů s IgAN jsou tedy tyto: GalNAc-T14, jejíž aktivita je zvýšená, C1GalT1, jejíž aktivita je snížena a ST6GalNAc-II, jejíž aktivita je zvýšená. Tyto enzymy mohou na IgA1 působit samostatně i v komplexu (Raška, 2016).

2.2.2 Druhý faktor: Anti-gd-IgA1 protilátky

Aberantně glykosylované IgA1 se nachází v krvi pacientů, kteří trpí IgAN, převážně ve formě imunitních komplexů. Tyto komplexy tvoří kromě IgA1 také IgG. Imunoglobuliny G jsou schopny rozpoznat epitopy, které odhalují GalNAc v pantové oblasti IgA1, a tvoří tak autoimunitní složku IgAN. Navíc tyto IgG vykazují jedinečné znaky v komplementaritě určující oblasti 3 (CDR3) variabilní oblasti těžkých řetězců (Tomana, 1999).

U IgG pacientů s IgAN se na třetí pozici CDR3 typicky vyskytuje serin, který je potřebný pro vazbu na gd-IgA1. Sérové hladiny IgG specifických pro gd-IgA1 korelují s hladinami proteinurie, tudíž s vážností onemocnění. Zatím není známo, zda serinová substituce v CDR3 oblasti pochází ze somatických mutací, které se objeví během zrání buněk, které protilátky produkují, nebo zda jsou to mutace zděděné (Suzuki, 2011a).

Tyto protilátky se též vyskytují v séru zdravých jedinců, avšak v menším zastoupení. Vzhledem k tomu, že podstupují afinitní maturaci, se dá předpokládat, že se tyto IgG tvoří jako odpověď na virovou či bakteriální infekci, kdy dané infekční

částice na svém povrchu vystavují epitopy obsahující GalNAc. Poté mohou zkříženě reagovat s galaktosově deficientními glykany na IgA1 (Tomana, 1999).

2.2.3 Třetí faktor: Zvýšené hladiny cirkulujících imunitních komplexů

U IgAN jsou mesangiální buňky cílem pro patogenní depozity tvořeny z cirkulujících imunitních komplexů, nebo depozity aberantně glykosylovaného IgA1 s následnou vazbou nově vytvořených autoprotilátek za vzniků imunitních komplexů *in situ* (Glassock, 2011). Přítomnost cirkulujících imunitních komplexů obsahující IgA1 není jedinečná pro IgAN. Takové komplexy mohou být také detekovány u osob bez zjevného ledvinového onemocnění včetně zdravých jedinců či pacientů trpících Henoch-Schoenleinovou purpurou (Tomana, 1999; Levinsky, 1979).

Cirkulující patogenní komplexy tvořené gd-IgA1 a autoprotilátkou IgG jsou relativně velké – zhruba 800 kDa, tudíž mohou být vyloučeny do Disseho prostoru, kde dosáhnou asialoglykoproteinového receptoru (ASGP-R) na hepatocytech, což je klasická katabolická cesta oběhového IgA1. Ve výsledku tyto imunitní komplexy vstoupí do renálního oběhu. Díky jedinečnému umístění mesangia mezi fenestrovanou endoteliální výstelkou kapilár a glomerulární bazální membránou je mesangium náchylné k ukládání imunitních komplexů. I když není úplně jasné, co určuje vstup cirkulujících imunitních komplexů do mesangia, některými faktory jsou pravděpodobně velikost imunitních komplexů, jejich množství a lokální hemodynamické faktory (Sterzel, 1982).

2.2.3.1 Biologické aktivity imunitních komplexů

Biologická aktivita velkých cirkulujících imunitních komplexů s gd-IgA1 je zvýšena u pacientů s IgAN během epizod makroskopické hematurie (Novak, 2005). Není však známo, zda je tato zvýšená aktivita způsobena větší produkcí gd-IgA1, autoprotilátek nebo dalšími faktory, které ovlivňují tvorbu imunitních komplexů nebo jejich skládání (Novak, 2007). Tohoto kroku se také mohou účastnit MHC alely ovlivněním účinnosti prezentace, rozpoznávání a zpracování antigenu a následné aktivace autoreaktivních B lymfocytů (Suzuki, 2011a).

Díky výzkumu na kultivovaných lidských mesangiálních buňkách bylo zjištěno, že cirkulující imunitní komplexy vykazují daleko větší vaznost na mesangiální buňky než

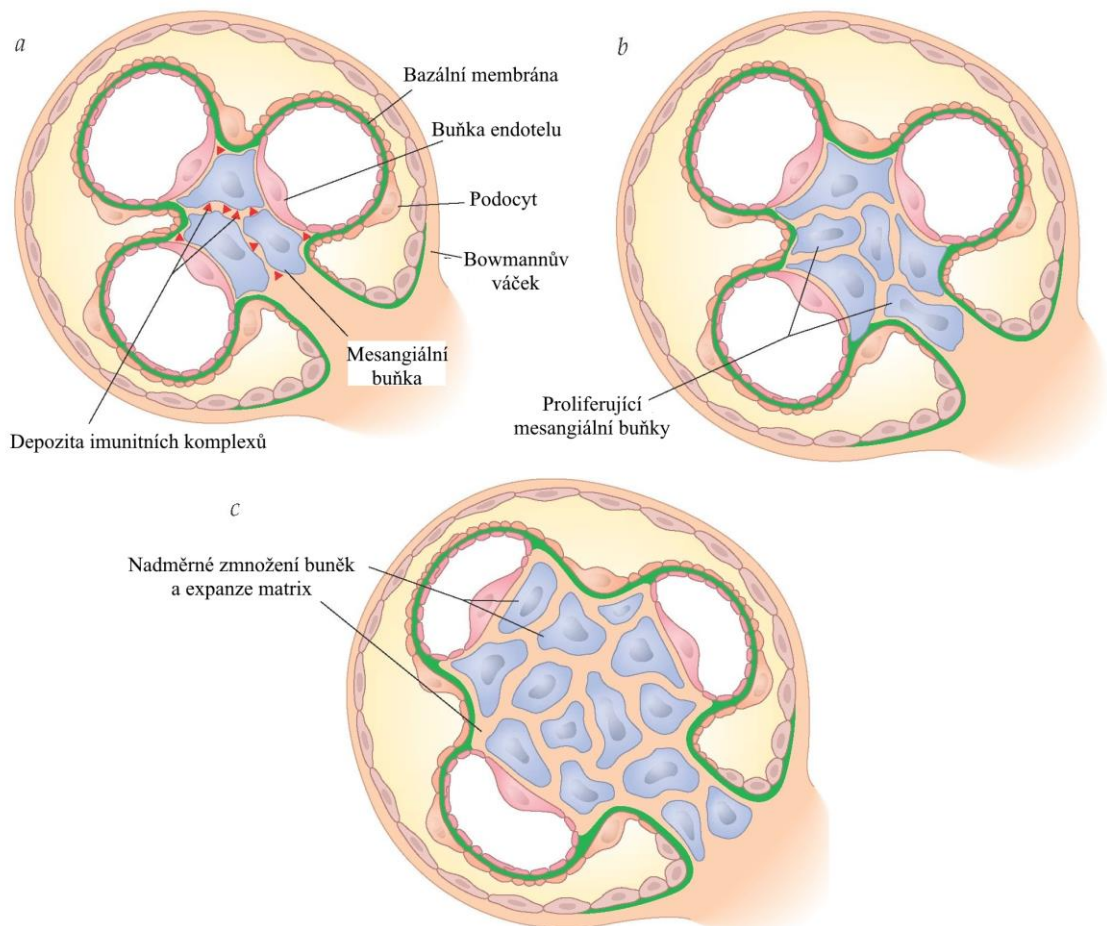
volné IgA1 (Novak, 2002). Dále bylo odhaleno díky frakcionaci těchto komplexů, že ty komplexy, které měly velikost 800-900 kDa podporují buněčnou proliferaci, produkci cytokinů a komponent extracelulární matrix. Potvrzení role IgA1 v těchto komplexech bylo potvrzeno jeho odstraněním z komplexů, kdy dané komplexy ztratily schopnost tyto buněčné aktivity stimulovat. Naopak imunitní komplexy, které měly molekulovou hmotnost 700-800 kDa buněčnou proliferaci nevyvolávaly, či ji dokonce inhibovaly (Novak, 2011).

V nedávné studii byl poprvé *in vivo* objeven důkaz patogenní role autoprotilátek IgG specifických pro gd-IgA1 u IgAN. Ve studii byly použity imunodeficientní myši, kterým bylo injektováno gd-IgA1 spolu s autoprotilátkami IgG od pacientů s IgAN. U těchto myší byla nalezena glomerulární depozita tvořena IgA, IgG a myším komplementem C3 a mesangiální glomerulární poškození s hematurií a proteinurií. Po podání samotného gd-IgA1, nebo IgG nenastaly patologické změny. Kromě toho imunitní komplexy podané imunodeficientním myším vyvolaly histopatologické změny charakteristické pro lidské onemocnění. Profilování transkriptomů tkání myších ledvin ukázalo, že kvůli podaným imunitním komplexům došlo ke změně genové exprese mnoha drah, které byly v souladu se změnami pozorovanými v biopsiích ledvin pacientů s IgAN (Moldoveanu, 2021).

2.2.4 Čtvrtý faktor: Proliferace mesangiálních buněk, glomerulární zánět a poškození ledvin

Tato poškození jsou charakteristická expanzí extracelulárního matrix, aktivací komplementu a uvolněním cytokinů. Některé cytokiny mohou poškozovat podocyty, měnit expresi genů podocytů a glomerulární filtrace a indukovat proteinurii (Lai, 2008) (Obr. 4). Mesangiální buňky mají receptory pro IgA, tudíž mohou iniciovat škodlivé mechanismy. Depozice imunitních komplexů ve tkáních může spouštět lokální aktivaci komplementu, avšak to, jak přesně k ní dochází, ještě není zcela známé. Mesangiální buňky jsou základem pro buněčnou stabilitu a jejich stresové podmínky mohou ovlivňovat chování podocytů a vysvětlovat podocytopatii u IgAN. Souvislost mezi mesangiem a podocyty může objasňovat výskyt proteinurie, tubulointerstickálního poškození a uvolňování cytokinů, jako jsou tumor necrosis factor, IL-6 a angiotensin II, by mohlo indukovat zánět a následnou glomerulosklerózu. Hematurie by tak mohla být zahrnuta do mesangiální expanze a

poškození podocytů prostřednictvím mechanismů, které zahrnují modifikaci mesangiální architektury (Gutiérrez, 2020).



Obr. 4: Imunitní komplexy a jejich vliv na mesangiální buňky glomerulů ledvin. **a** Glomerulus a tři kapilární smyčky. Zobrazení bazální membrány je zvýrazněno zeleně, přičemž podocyty jsou umístěny vně a endoteliální buňky se nachází uvnitř smyček. Centrální nosná struktura je tvořena mesangiálními buňkami. Červeně vyznačena jsou depozita imunitních komplexů. **b** Proliferující mesangiální buňky. **c** Buňky mesangia, které intenzivně proliferují a nadprodukuji extracelulární matrix. Upraveno podle Luft, 2017.

Je známo hodně složek patogeneze IgA nefropatie. Není však objasněno spektrum glomerulárních odpovědí na depozity imunitních komplexů u IgA nefropatie. Rostoucí množství studií naznačuje určitou alternativu: dráhy lektinu a terminálního komplementu ovlivňují glomerulární zánětlivé a poškozující odpovědi na uložené IgA1 a přispívají k vážnosti onemocnění (Tortajada, 2019).

2.3 Klinická prezentace

U IgAN je velmi široké spektrum klinických projevů – od asymptomatické mikroskopické hematurie, po vysoce progresivní formy vedoucí ke selhání ledvin. Avšak nejčastější klinická prezentace je mikrohematurie a mírná proteinurie s relativně zachovanou funkcí ledvin. Klinický projev nemoci může být v některých případech předcházen infekcí doprovázenou makrohematurií (Gutiérrez, 2020).

IgAN může mít různé klinické průběhy od spontánních remisí u malého počtu jedinců, k rychlému zhoršování renálních funkcí, či k pomalému zhoršování renálních funkcí při delším sledování, což je pravděpodobně nejčastější forma klinické prezentace. Avšak je zde také velké množství pacientů, u kterých se stav nezhoršuje (Gutiérrez, 2012).

Makroskopická hematurie a proteinurie následující infekci horního respiračního traktu může být jednou z typických forem prezentace, převážně u dětí a při časném stádiu onemocnění. Kromě toho se klinická závažnost výrazně liší podle pohlaví, etnického původu a rasy (Gutiérrez, 2018).

Hematurie je nejkonzistentnějším klinickým příznakem a zhruba u poloviny pacientů propukne makrohematurie. Tato může způsobit akutní ledvinové onemocnění a u 25 % pacientů starších 50 let se ledviny nevrací k míře své předchozí funkčnosti (Gutiérrez, 2006). Za marker dobrých výsledků se tradičně považuje nepropuknutí akutního ledvinového poranění. Jedním z hlavních faktorů zodpovídajících za akutní ledvinové poranění je tubulární poškození způsobené hemoglobinem uvolněným z červených krvinek do tubulárního lumenu (Praga, 1985). Náchylní na toto poškození jsou převážně starší pacienti trpící chronickým onemocněním ledvin. Ve studii s pacienty staršími 60 let bylo uvedeno, že akutní renální poranění je velmi časté (u 40 %) (Sevillano, 2019). U 86 % případů bylo akutní renální poranění úměrné makroskopické hematurii, z čehož 34 % byly podávány antikoagulanty. Toto by mohla

být jedna z teorií vysvětlující zvýšení akutního renálního poranění u starších pacientů. V další studii jsou publikována data navrhuující, že léčba warfarinem může zvyšovat risk akutního renálního selhání kvůli glomerulárnímu krvácení a renální tubulární obstrukci (Brodsky, 2009).

2.4 Léčba

Zatím neexistuje specifická léčba pro pacienty trpící IgAN, avšak jsou naznačeny cesty, kterými by se mohla ubírat. Pro vyvážení poměru rizika a přínosu různých terapeutických možností je nezbytný individuální přístup, vzhledem k tomu, že se zde nachází široká škála klinických projevů (Gutiérrez, 2020).

Aktuální léčebné metody jsou založeny na snaze o zachování či zpomalení úbytku renální funkce pomocí modulace nepříznivých imunitních a zánětlivých jevů odehrávajících se v glomerulu a tubulointersticiu. Tudiž je převážná většina současných léčebných strategií obecná a společná pro další formy glomerulárních onemocnění (Boyd, 2012).

2.4.1 Blokáda renin-angiotensin

U pacientů s IgAN, u kterých se projevuje proteinurie v hladinách menších než 0,5-1 g/den, se volí léčba pomocí blokády renin-angiotensin-aldosteronového systému (RAAS). Ač v této oblasti neexistuje velké množství studií, je prokázáno, že pacienti léčení tímto způsobem vykazují lépe zachovalou funkci ledvin (Praga, 2003) (Van den Belt, 2018). Blokáda RAAS vykazovala také protizánětlivý a antiproteinurický účinek u dospělých i u dětí (Coppo, 2014).

V současnosti je používána léčba spojená s inhibicí RAAS u všech pacientů, u kterých byla biopsií potvrzena IgAN, pokud trpí trvalou abnormální proteinurií. Cílem této léčby je udržet proteinurii pod hranicí 0,5-0,75 g/den (Gutiérrez, 2020). K blokadě samotné jsou používány dva inhibitory – inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu (ACEi) nebo blokátor receptoru angiotensinu II (ARB) (Coppo, 2007).

2.4.2 Léčba imunosupresivy

Léčba pomocí steroidů a ostatních imunosupresivních látek je stále kontroverzní téma. Pokyny pro glomerulární léčbu iniciativy Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) doporučují vzhledem k předchozím studiím (Manno, 2009) 6

měsíců léčby pomocí kortikosteroidů u pacientů s trvajícím proteinurií v hodnotách větších než 1 g/den navzdory optimální blokádě RAAS a adekvátní kontrole krevního tlaku, ale pouze u pacientů s hodnotami odhadované rychlosti glomerulární filtrace (eGFR) většími než 50 ml/min/1,73 m² (Gutiérrez, 2020). Po zveřejnění doporučení KDIGO byla publikována studie, která analyzovala velký počet pacientů za využití pravděpodobnosti zařazení pacientů do stejné srovnatelné populace na základě jejich popisných charakteristik – zaváděcích faktorů. Tato studie dokazovala prospěšný účinek steroidů. Zajímavé je, že příznivý účinek se více projevil u pacientů s masivnější proteinurií a s eGFR menšími než 50 ml/min/1,73 m² (Coppo, 2014).

Dvě nedávné studie s větším počtem pacientů a důslednějším designem jen částečně vyřešily pochybnosti o imunosupresivní léčbě. První studií byla studie STOP-IgAN (Rauen, 2015). Zahrnovala přes tři sta pacientů po 6 měsících podpůrné léčby, která udržovala proteinurii >0,75 g/den a eGFR >30 ml/min/1,73 m². Třetina pacientů dosáhla v zaváděcím období výzkumu proteinurie menší než 0,75 g/den, zatímco zbývající dvě třetiny byly randomizovány k podpůrné léčbě proti 2 imunosupresivním léčebným režimům (steroidy, pokud eGFR >60 ml/min/1,73 m² a steroidy + cyklofosfamid / azathioprin, pokud eGFR <60 ml/min/1,73 m²). Přestože počet pacientů, kteří dosáhli kompletní remise, byl významně vyšší ve skupině s imunosupresí, nebyly během 3 let sledování žádné rozdíly ve ztrátě funkce ledvin s méně vedlejšími účinky ve skupině podpůrné léčby (Rauen, 2015). Hlavní slabiny této studie byla krátká doba sledování, absence histologických dat, vyloučení progresivních pacientů a použití dvou různých imunosupresivních terapií (Gutiérrez, 2020).

Druhá studie porovnávala léčbu steroidy a podávání placebo. Měla pojmout přes 700 pacientů s proteinurií >1 g/den a eGFR >20 mL/min/1,73 m². Navzdory příznivému vlivu na proteinurii a pokles eGFR bylo riziko nežádoucích účinků v léčené skupině vysoké, a proto byl výzkum po randomizaci pouze 262 pacientů pozastaven (Lv, 2017).

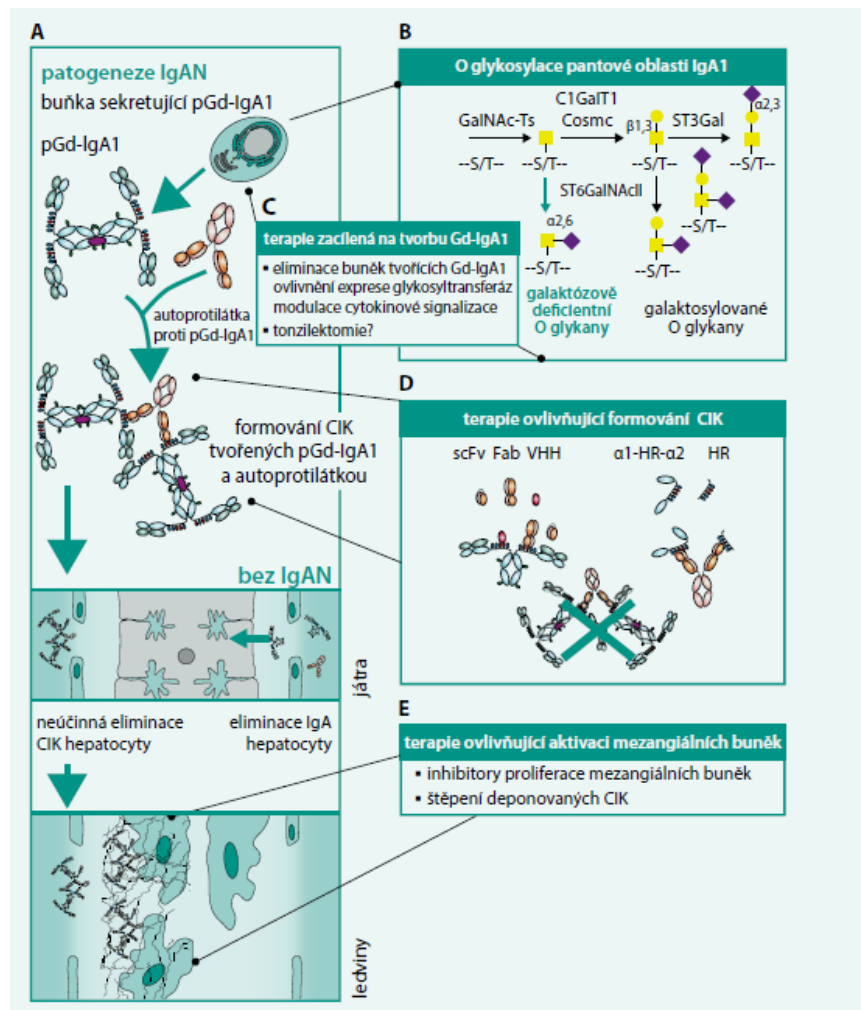
Stručně řečeno, glukokortikoidy mají protizánětlivé a imunosupresivní účinky. Způsob patogeneze IgAN nabízí vhodný scénář pro její léčbu s použitím glukokortikoidů. V budoucích studiích by měla být zahrnuta i hematurie a histologické nálezy. V tomto smyslu je v současné době testována možnost vedení léčby glukokortikoidy v závislosti na histologii ve studii Léčba IgA nefropatie (Coppo,

2020). U ostatních imunosupresiv, kterými jsou například cyklofosfamid, azathioprin a rituximab, nebyly dokázány jasné výhody (Lafayette, 2017).

2.5 Kauzální terapie

Čtyřfaktorový model patogeneze IgA nefropatie poskytuje příležitost vytvořit léčbu, která se bude zabývat kauzality onemocnění, nikoliv pouze léčením příznaků (Obr. 5). Tento model předpovídá, že tvorba nefritogenních imunitních komplexů složených z galaktosově deficientního IgA a autoprotilátek IgG spouští onemocnění. Tudíž by mohly být efektivní zásahy, které snižují tvorbu galaktosově deficientního IgA1, autoprotilátek IgG, nebo zásahy, které blokují interakci mezi těmito dvěma složkami. Tyto zásahy by mohly být docíleny zvýšením enzymové aktivity glykosyltransferas pro syntézu *O*-glykanů obsahujících galaktosu v pantové oblasti. Tak by mohla být snížena dostupnost aberantně glykosylovaných IgA1 pro tvorbu imunitních komplexů (Suzuki, 2011b).

Alternativou by mohlo být vytvoření malých jednořetězcových protilátek, které by měly vysokou afinitu pro GalNac na galaktosově deficientním IgA1. To by mohlo předejít vazbě autoprotilátek. Na druhou stranu by také mělo mít účinek zablokování autoprotilátek pomocí glykopeptidu (Suzuki, 2011b).



Obr. 5: **A** Znárodnění patogeneze IgAN. Tvorba abnormálně glykosylovaného polymerního IgA1 (pGd-IgA1). Následná vazba specifických autoprotíláték dá vzniknout cirkulujícím imunitním komplexům, které nejsou dostatečně eliminovány játry a pokračují až do ledvin, kde se ukládají v mesangiu a aktivují proliferaci mesangiálních buněk, nadprodukcii extracelulární matrici a tvorbu protizánětlivých cytokinů. **B** Vznik *O*-glykanového řetězce v pantové oblasti IgA. Na pantovou oblast jsou postupně připojovány monosacharidy díky glykosyltransferasám. Jako první je na pantovou oblast připojen GalNAc (žlutý čtverec), jehož připojení katalyzuje *N*-acetylgalaktosaminyltransferasa (GalNAc-Ts), poté následuje připojení galaktosy (žlutý kruh), což katalyzuje β -1,3-galaktosyltransferasa (C1GalT1) a také se účastní chaperon Cosmc. Následně dojde k připojení kyseliny sialové (SA, fialový čtverec) na galaktosu a na GalNAc. První reakci katalyzuje α -2,3-sialyltransferasa (ST3Gal) a druhou α -2-6-sialyltransferasa (ST6GalNAc-II). Pokud dojde k sialyzaci GalNAc, je zablokováno připojení galaktosy a vzniká galaktosově deficientní IgA. **C** Znárodnění kauzální terapie, která je zaměřena na inhibici tvorby gd-IgA1. **D** Terapie, která ovlivňuje vytváření imunitních komplexů za využití monovalentních analogů autoprotíláték (vlevo), nebo *O*-glykosylovaných analogů pantové oblasti IgA1 (vpravo). **E** Terapie zaměřená na ovlivnění aktivace mesangiálních buněk. Zahrnuje inhibitory proliferace mesangiálních buněk, nebo štěpení deponovaných CIK. Převzato z Raška, 2016.

2.5.1 Inhibice tvorby gd-IgA1

Jedním z patogenních procesů, které přispívají k tvorbě imunitních komplexů, je dědičné zvýšení cirkulujících galaktosově deficientních IgA1. Potenciální při jejich tvorbě může být také vystavení sliznice infekčním nebo dietním antigenům (Smith, 2006). Jako možná řešení tohoto faktoru se jeví potlačení syntézy galaktosově deficientního IgA1, enzymatické posílení přenosu galaktosy do *O*-glykanového řetězce pantové oblasti IgA1 nebo potlačení sialylace *O*-glykanů s deficitem galaktosy (Smith, 2006).

Pro potlačení syntézy gd-IgA1 by mohly být eliminovány buňky, které ho produkují. Tyto buňky mají totiž minoritní výskyt, takže zde není velká pravděpodobnost, že by se v budoucnosti vytvořila imunodeficience. K tomuto kroku je však nutné znát původ a specifické fenotypové znaky na povrchu buněk, v nichž probíhá produkce gd-IgA1 (Raška, 2016).

Na rozdíl od výše popsané varianty, u které existuje ještě stále dost slepých míst, je zde další možnost inhibice tvorby gd-IgA1. Existuje totiž poměrně obsáhlé množství informací o procesu intracelulární tvorby gd-IgA1 a o funkci a regulaci enzymů tvořících glykanový řetězec v pantové oblasti daného imunoglobulinu – glykosyltransferas (Reily, 2014). Vzhledem k tomu, že k nesprávné funkci glykosyltransferas přispívají také cytokiny IL-6 a IL-4, mohla by být vytvořena terapie, která se bude zaměřovat na jejich ovlivnění jejich signální dráhy, nebo bránění vazby IL-6 na receptor, a díky tomu možnou regulaci exprese glykosyltransferas (Suzuki, 2014).

2.5.2 Ovlivnění tvorby imunitních komplexů

Imunitní komplexy, které tvoří patogenní složku u IgAN mají velikost 800-900 kDa. Kvůli své velikosti mají tyto komplexy schopnost aktivovat mesangiální buňky. Naopak menší komplexy způsobují jejich inhibici (Novak, 2005). Ve změně velikosti patogenních imunitních komplexů se potenciálně nachází další z možností kauzální terapie. Ta by mohla nastat už při narušení poměru, ve kterém se antigen a autoprotlátka nachází (Raška, 2016).

K narušení poměru může dojít dvěma způsoby. Buď mohou být vytvořeny kratší glykopeptidy, které by obsahovaly glykanovou složku odpovídající glykanům nacházejících se v pantové oblasti IgA1 vyskytujících se u daného pacienta trpící

IgAN. Takovéto glykopeptidy by mohly být připraveny pomocí rekombinantní DNA (Suzuki, 2008). Vzhledem ke své struktuře se následně budou vytvořené glykopeptidy kompetitivně vázat na autoprotilátky. Druhým způsobem je modifikace autoprotilátek. Monovalentní analog autoprotilátek je možné vytvořit stejně jako v předchozím případě, pomocí technologie rekombinantní DNA. Ten bude následně interagovat s gd-IgA1. Mohou být použity fragmenty protilátek, jako jsou Fab fragment obsahující lehký řetězec či scFV fragment obsahující variabilní domény obou řetězců včetně jejich propojení. Výhodné pro přípravu monovalentních protilátek je také použití imunizace zvířat, jako jsou například velbloudi nebo lamy. Ta totiž vytváří protilátky, které nemají lehké řetězce (Raška, 2016).

2.5.3 Inhibice aktivace mesangiálních buněk

Uložením patogenních komplexů do mesangia dochází k aktivaci a proliferaci mesangiálních buněk, je také zvýšena produkce extracelulární matrix a jsou tvořeny prozánětlivé cytokiny (Suzuki, 2011a). Ty vznikají díky fosforylační dráze MAPK/ERK, která je spuštěna právě uložením imunitních komplexů. Při využití inhibitorů těchto proteinkinás, které jsou v této dráze zapojeny, by mohlo dojít k významnému snížení zánětlivých a proliferačních reakcí (Tamouza, 2012).

Do signalizace zprostředkované přes imunoreceptory je zařazena také slezinná tyrosinkinasa (SYK) a také existují důkazy k její roli u patogeneze IgAN. Byla vytvořena studie, ve které byl následně použit i její inhibitor – R406. Následovalo snížení mesangiální proliferace i tvorby cytokinů, které u pacientů trpících IgAN zapříčiňovaly zánětlivou reakci. Tato inhibice by tedy mohla být další cestou k léčbě IgAN (Kim, 2012).

2.5.4 Štěpení IgA1 v mesangiálních depozitech

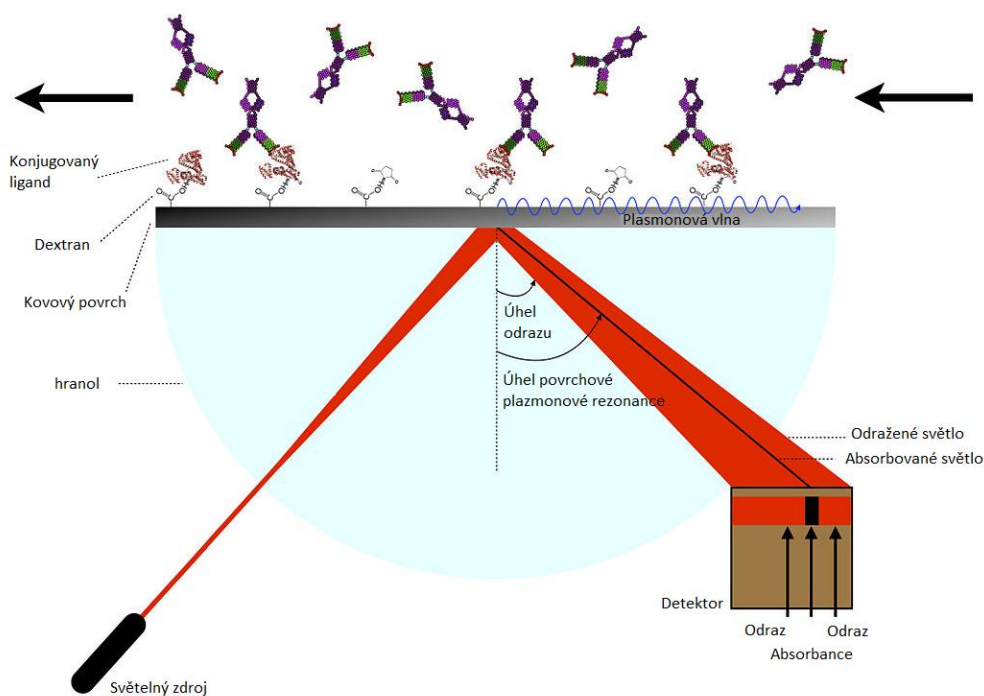
Posledním přístupem je štěpení již vzniklých depozit v mesangiu. Docílit by se toho mohlo bakteriálními proteasami, které jsou schopny štěpit IgA1. Bakteriální IgA proteasy vykazují substrátovou specifitu a jsou schopny atakovat pantovou oblast IgA1 (XIE, 2010). Mnohé studie také potvrdily, že bakterie mají schopnost degradace imunitního komplexu, který obsahuje IgA1, jak *in vivo*, tak *in vitro* (Lamm, 2008a) (Wang, 2016). Při jedné ze studií bylo za pomoci intravenózní injekce IgA proteasy

dosazeno odstranění jak antigenní, tak protilátkové složky v glomerulu u myšního modelu IgAN (Lamm, 2008b).

Bakteriální proteasy však neštěpí pouze gd-IgA1, ale štěpí i ostatní IgA1. Tudiž, než by tyto proteasy doputovaly k mesangiálním depozitům, bylo by rozštěpeno i velké množství IgA1 nacházejícího se v systému, což by mělo výrazné dopady na imunitní systém (Raška, 2016). Navazujícím řešením by mohlo být vytvoření protilátek pro neutralizaci proteas s následující dávkou léku (Eitner, 2008).

2.6 SPR

Povrchová plasmonová rezonance (SPR) je fyzikální jev, při kterém záření dopadající na povrch zlata, stříbra a dalších kovů změní směr odrazu. Tento jev je umožněn díky rezonanci, která vzniká mezi zářením a povrchovými elektrony kovu, kdy na rozhraní hranol/kov/dielektrikum dochází k excitaci elektronů v kovu a vzniku povrchových plasmonů. Na rozhraní kovu a dielektrika dochází ke vzniku evanescentní vlny (Obr. 6).



Obr. 6: Konfigurace SPR čipu. Kovový čip ze stříbra, nebo zlata je připravován s dextranovým povrchem. Díky jeho karboxylovým skupinám je možné vytvořit vazbu s aminoskupinou proteinu a tím ho přichytit ke kovovému povrchu. Vlevo dole je znázorněn světelný zdroj, kterým je laser vyzařující světlo o jedné vlnové délce. Světlo vstupuje do hranolu, což vyústí v různé světelné úhly paprsků, které následně dopadnou na povrch kovu. Z těchto paprsků se odráží všechny kromě toho úhlu, ve kterém kov foton pohltí a přemění jeho energii na plasmonovou vlnu. Díky tomu se tedy pod tímto úhlem žádné světlo neodráží, a tím se na detektoru objeví s velmi nízkou až žádnou intenzitou. Upraveno podle Sabban, 2011.

V posledních letech se tato metoda stala velmi oblíbenou pro klinické analýzy související s interakcemi biomolekul. Díky této technice je totiž možné měřit interakce v reálném čase, s vysokou sensitivitou a bez nutnosti použití značek (Nguyen, 2015).

2.6.1 Mechanismus SPR

Molekuly v dosahu evanescentní vlny vytvořené na rozhraní kovu (typicky zlato) a dielektrika (typicky kapalně medium – pufr či testovaný vzorek) jsou zodpovědné za změnu refraktivního indexu (RI) a samotný signál SPR je do určité míry závislý na několika faktorech (Nguyen, 2015). Hlavní faktor je vztažený k molekulové hmotnosti vázané molekuly, která se přímo zrcadlí v lokálním RI. Dále je také důležitá vzdálenost mezi zlatým povrchem senzoru a zachycenou molekulou. V bezprostřední vzdálenosti je totiž efekt vazby analytu na změnu rezonančního úhlu SPR nejvýraznější, naopak čím více se molekula vzdaluje od povrchu plasmonového kovu, účinek exponenciálně klesá. Z tohoto důvodu je analyticky použitelná vzdálenost zhruba 200 nm pro klasickou SPR vlnu vygenerovanou na makroskopických plochých měničích (Su, 2018) a několik desítek nm pro lokalizované SPR vyskytující se na povrchu nanočástic (Qu, 2020).

Moderní diagnostika, od screeningových testů pro rychlou detekci biomarkerů civilizačních chorob až po detekci virových a bakteriálních infekcí, je z velké části založena na detekci specifického proteinu vyskytujícího se na dané infekční částici (Falkowski, 2021). Společnými znaky většiny těchto molekulárních cílů je jejich relativně velká hmotnost a široké možnosti použití vysokoafinitních protilátek pro jejich detekci. Obě tyto vlastnosti činí proteinové biomarkery atraktivními cíli SPR a poskytují možnost jejich přímého stanovení (Drozd, 2021).

V klasickém uspořádání hrají protilátky roli ligandů a analytický signál vyplývá přímo ze specifické vazby na cílový antigen. Tento styl získávání výsledků je nejvíce preferovaný, neboť umožňuje detekci přímo ve vzorcích bez dalších kroků. V mnoha případech je ovšem možné použít i nepřímé formáty metody, jako je například sendvičové nebo kompetitivní SPR. Ve většině případů je potřeba se k těmto způsobům uchýlit kvůli nízké molekulové hmotnosti analytu nebo jeho velmi nízké koncentraci (Mariani, 2014).

2.6.2 Nevýhody SPR

Detektory SPR nerozlišují specificky vázané analyty od náhodně adsorbovaných interferentů. Z tohoto důvodu jsou tyto biosenzory obzvláště náchylné k problémům s nespecifickou vazbou při analýzách komplexních vzorků a při stanovování ultranízke koncentrace analytů, která je však pro lékařskou diagnostiku běžná. Problémy s adsorpcí složek vzorků tělních tekutin se mohou odrazit ve zhoršení klíčových parametrů jako je například základní stabilita, limit detekce a životnost. Také nedostatečná odolnost imunostímací vrstvy proti znečištění narušuje biomedicínsky definovanou citlivost a selektivitu testu, která je chápána jako procento falešně pozitivních a falešně negativních výsledků a může vést k selhání jejich validace. Z tohoto důvodu musí být při aplikaci v lékařské diagnostice věnováno mnoho pozornosti vhodné kvalitě intermediálních imunopovrchů (Drozd, 2021).

2.6.3 Strategie imobilizace

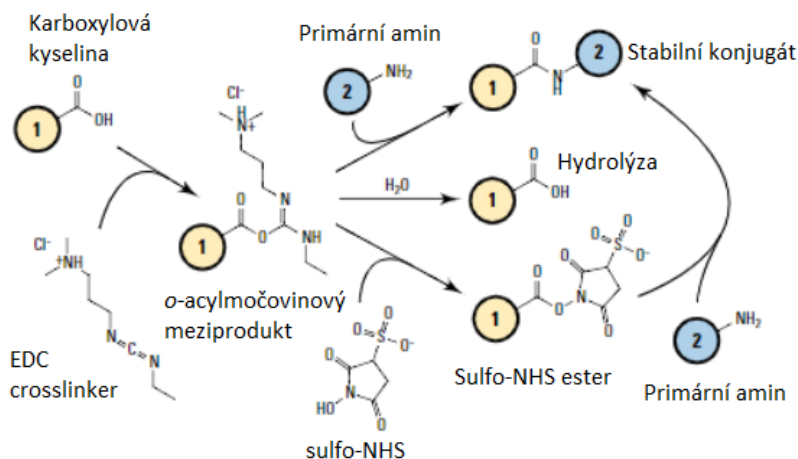
V současné době existuje mnoho kompatibilních molekul pro imobilizaci u SPR a rovněž velké množství způsobů, jak toto připojení na povrch zlatých čipů provést. Kromě toho je nabízena řada strategií pro připojení proteinového receptoru, jako jsou například neorientovaná imobilizace prostřednictvím absorpce, neorientovaná imobilizace prostřednictvím chemické vazby nebo orientovaná imobilizace nativních a značených receptorů na základě afinity (Drozd, 2021).

Metody založené na adsorpci protilátek a antigenních receptorů na površích jsou široce používány při konstrukci imunotestů kvůli jejich jednoduchosti implementace. I samotný zlatý povrch vykazuje schopnost vázat imunoglobuliny a jejich fragmenty (Crivianu-Gaita, 2015). Mnohem širší škálu možností pro adsorpci proteinů však nabízejí převodníky předem modifikované kationtovými monovrstvami a polymerními vrstvami, například cysteaminem. Vazba receptorů na povrch je určována především elektrostatickými interakcemi mezi opačně nabitými koncovými aminovými a karboxylovými zbytky aminokyselin a také interakcemi koordinačního typu (Vashist, 2014).

2.6.3.1 Karboxylové senzory

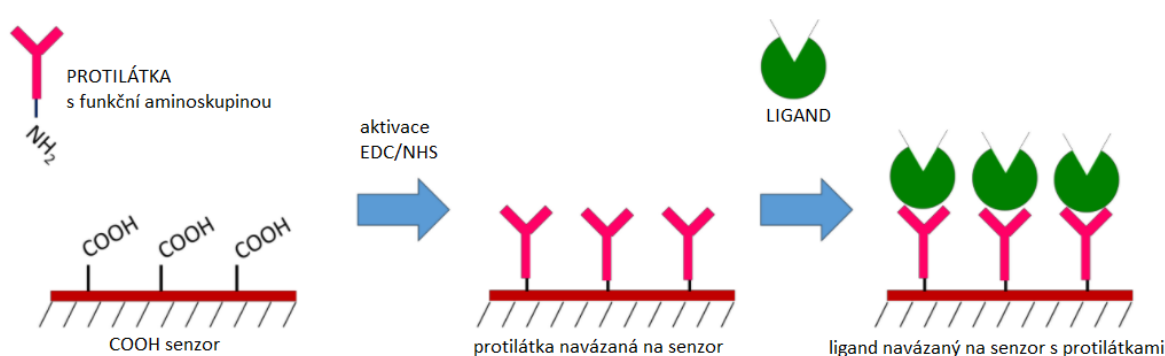
Karboxylové senzory vyžadují použití EDC/NHS pro aktivaci funkčních skupin na povrchu senzoru. Díky ní se následně na karboxyl mohou navázat aminoskupiny nebo

lysinová rezidua. Karboxylové skupiny jsou nejprve aktivovány karbodiimidem a přeměněny na aktivní esterové intermediáty, které následně mohou být aminolyzované lysinem, nebo N-terminální NH₂ skupinou ligandu. Karbodiimidy jsou používány pro zprostředkování aminové vazby mezi karboxyláty a primárními, nebo sekundárními aminy. Nejčastěji je používán 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karboxydiimid (EDC). Samotné činidlo spolu s vedlejšími produkty reakce jsou rozpustné ve vodě, což usnadňuje aktivaci a zpracování čipu. Původně je dodáváno EDC jako hydrochlorid, který je jak hygroskopický, tak labilní v přítomnosti vody. O-acylmočovinný meziprodukt podléhá rychlé hydrolyze (sekundy), tudíž by nepřežil dobu od aktivace do injekce ligandu. Proto je potřeba ho přeměnit na ester, který je více stabilní. Toho je docíleno přidáním N-hydroxysukcinimidu (NHS), nebo jeho derivátu N-hydroxysulfosukcinimidu, které jsou rozpustné ve vodě, do aktivační směsi (Obr. 7). Esterový meziprodukt NHS má poločas rozpadu v rámci minut při pH 8-9, nebo hodin při pH 4-5 (Schasfoort, 2017). Největší výhodou této metody je její relativní přímota, konzistentnost a stabilita. Jako hlavní nevýhodu je možné považovat neschopnost ovlivnit orientaci ligandu, jelikož nelze ovlivnit, jakou stranou bude provedena vazba. Další limitací je, že v některých případech může být ovlivněna interakce mezi analytem a ligandem (Surface Plasmon Resonance Sensors: A Comprehensive Guide for Scientists).



Obr. 7: schéma vytvoření vazby mezi sulfo-NHS a EDC: vazba karboxylu na amin u karbodiimidu EDC a sulfo-NHS. Adice NHS, nebo sulfo-NHS k EDC reakcím zvýší efektivitu a umožní aktivaci EDC pro skladování a pozdější použití. Upraveno podle *Crosslinking Reagents Handbook, 2012*.

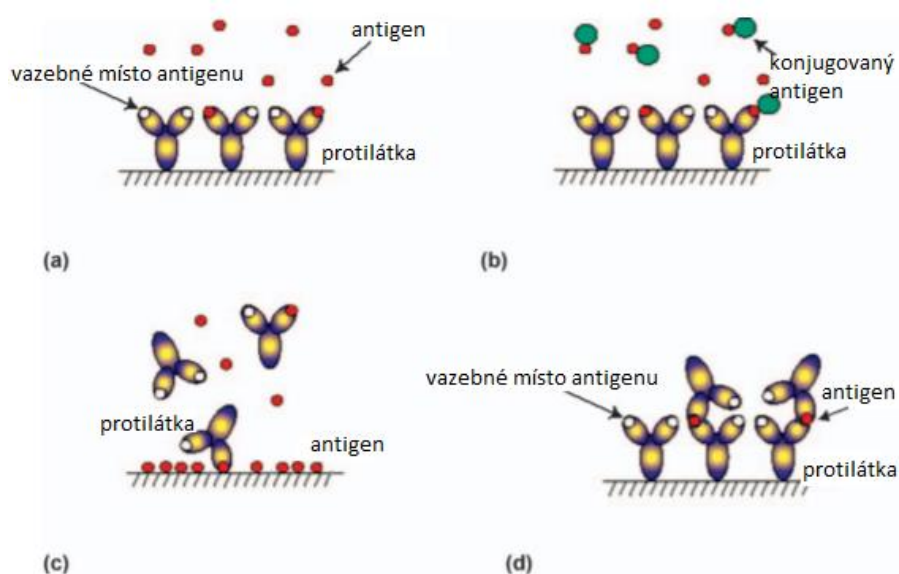
Pro mnoho proteinů jsou dostupné vysokoafinitní protilátky, které mohou být použity pro zachycení specifického ligandu. Za pomoci karboxylového čipu je nejprve imobilizována protilátka a následně je za pomoci dané protilátky zachycen chtěný ligand (Obr. 8). Největší výhoda této metody spočívá v tom, že neovlivňuje aktivitu ligandu a umožňuje specifickou orientaci ligandu. Tato varianta může být použita pro zachycení specifického ligandu v komplexních vzorcích, což je výhodné pro dokázání přítomnosti určitého proteinu ve vzorku (*Surface Plasmon Resonance Sensors: A Comprehensive Guide for Scientists*).



Obr. 8: Karboxylový senzor. Pro napojení protiátky s funkční aminoskupinou je potřeba aktivace pomocí EDC/NHS. Po vytvoření vazby mezi protiátkou a senzorem může být na protiátce zachycen chtěný ligand. Upraveno podle *Surface Plasmon Resonance Sensors: A Comprehensive Guide for Scientists*.

2.6.4 Druhy uspořádání imunoesejí založených na SPR

Imunoesej je laboratorní technika založená na vazbě mezi antigenem a jeho homologní protilátkou, která má za cíl identifikovat a kvantifikovat specifický antigen či protilátku ve vzorku. V klasické imunoeseji závisí určení koncentrace analytu na signálech vytvořených určitými značkami, které jsou navázány na antigen či protilátku. Patří mezi ně různá fluorescenční barviva, enzymy, nebo radioizotopy. Nevýhodou značení je, že může narušit vazebná místa důležitá pro interakci molekul. Navíc značení zvyšuje heterogenitu biomolekulárních interakcí, neboť ve většině případů značení specifické molekuly není homogenně distribuováno. Navíc některé značky mohou samy o sobě interagovat s ligandy, což vede k falešné pozitivitě. Způsob, jak obejít některé z těchto problémů, je použití označené sekundární vazebné molekuly, což ale vyžaduje krok navíc, vysoce afinitní vazebnou molekulu a také prodloužení času potřebného pro analýzu. Biosenzor na bázi SPR měří vazbu protein-protein přímo jako posun v povrchově vázaných hmotách, a proto může být také použit k vytvoření imunoeseje (Schasfoort, 2017). Druhy různých uspořádání imunoesejí jsou znázorněné na obrázku (Obr. 9).



Obr. 9: Formy imunoesejí běžně užívaných při měření pomocí SPR. **a)** Přímá esej. Ligand (protilátka) je imobilizován na povrchu senzoru a interakce s analytem (zde antigen) vynáší detekovatelný posun refraktivního indexu. **b)** Kompetiční esej pro měření malých molekul, kde přímé zachycení antigenu neposkytuje dostatečný posun refraktivního indexu, kdežto konjugovaný antigen je dostatečně velký na vytvoření měřitelného posunu refraktivního indexu. **c)** Inhibiční esej, kde je analytem stejná molekula, jako imobilizovaný ligand. Protilátka je přidána do vzorku v menším přebytku. Analyt vytváří konjugát s protilátkou a inhibuje vazbu na povrch senzoru. **d)** Sendvičová esej se sekundární protilátkou. Upraveno podle Schasfoort, 2017.

2.6.4.1 Přímá esej

V tomto nejjednodušším typu eseje jsou protilátky proti danému antigenu imobilizovány na povrchu senzoru. Roztok vzorku obsahující antigen je následně inkubován s citlivým povrchem senzoru. Zvýšení signálu pochází z vazby antigenu a je přímo úměrné množství antigenu ve vzorku. Rozložení přímé eseje může být také opačné – navázání antigenu na povrch a detekce vazby specifické protilátky (Schasfoort, 2017).

2.6.4.2 Kompetiční esej

Tento typ eseje je typicky používán pro detekci nízkomolekulárních antigenů, které negenerují dostatečný signál, když jsou navázány na povrch senzoru. V této eseji jsou imobilizovány specifické protilátky na povrchu senzoru a roztok vzorku obsahující antigen je smíchán s konjugovaným antigenem. Díky jeho velké molekulové hmotnosti konjugát zvýší posun SPR úhlu. Směs antigenu a konjugovaného antigenu je inkubována s povrchem senzoru. Rozdíl signálu mezi referenčním vzorkem obsahujícím pouze konjugovaný antigen a roztokem vzorku určuje množství antigenu ve vzorku. V této eseji vyústí vysoké koncentrace ve vzorku v nízký signál (méně konjugovaného antigenu bude navázáno). Kineticky tato varianta vykazuje odchylky, jelikož difúzní konstanty analytu a konjugovaného analytu se výrazně liší (Schasfoort, 2017).

Kompetiční eseje jsou často využívány pro detekci toxických sloučenin. Maximální signál je generován, když není přítomný žádný volný analyt. Pokud je signál velmi nízký, pravděpodobně je analyt ve vzorku přítomen, nebo byly ligandy denaturovány, nebo otráveny vzorkem a nejsou dále aktivní (Schasfoort, 2017).

2.6.4.3 Inhibiční esej

V této formě eseje je cílový antigen imobilizován na povrchu senzoru. Roztok vzorku obsahující antigen je smísen se specifickými protilátkami v nadbytku a je inkubován s povrchem senzoru. Protilátky budou tvořit vazbu jak s antigenem v roztoku, tak s antigenem, který je vázán na povrch senzoru. Rozdíl signálu mezi blankovým vzorkem, který neobsahuje antigen a roztokem vzorku udává množství antigenu ve vzorku. Vysoké koncentrace analytu vyústí v nízký signál (méně protilátek zůstává

volných k vazbě na povrch). Protože protilátky mají vysokou molekulovou hmotnost, jejich vazba je detekována přímo. Jak kompetiční, tak inhibiční esej potřebuje více měření s rozdílnými koncentracemi antigenu a fixními koncentracemi kompetitoru/inhibitoru (Schasfoort, 2017).

2.6.4.4 Sendvičová esej

U sendvičových esejí jsou molekuly protilátek imobilizovány na povrchu senzoru zachycující molekuly analytu ve chvíli, kdy je roztok analytu inkubován s povrchem senzoru. V další injekci je vázána sekundární protilátka specificky buď s antigenem, nebo s antigen vázající protilátkou. Antigen je zachycen mezi dvěma protilátkami (Schasfoort, 2017).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

- Akrylamid/bisakrylamid (Serva, Německo)
- Avidin konjugovaný HRP (Sigma Aldrich, USA)
- Citrát sodný (Sigma Aldrich, USA)
- Dihydrofosforečnan sodný dihydrát (Lach-Ner, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- Freestyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Glycin (Lach-Ner, ČR)
- Glycobuffer 1 (NEB, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (NEB, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid sodný (mikroCHEM, ČR)
- Isopropanol (Lach-Ner, ČR)
- Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kyselina chlorovodíková 36% (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina sírová 95% (VWR Chemicals BDH[®], USA)
- Ledová kyselina octová 99,8% (Lach-Ner, ČR)
- Lektin *Helix aspersa agglutinin* konjugovaný s biotinem (Sigma Aldrich, USA)
- Lektin *Helix pomatia* konjugovaný s biotinem (Sigma Aldrich, USA)
- Methanol (Sigma Aldrich, USA)
- N.N.N',N'-Tetramethylethyldiamin – TEMED (Serva, Německo)
- N-butanol (Lach-Ner, ČR)
- Opti-MEM[™] Reduced Serum Medium GIBCO (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Page Ruler[™] Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Peroxid vodíku (Sigma Aldrich, USA)
- Persíran amonný (MERCK, Německo)

- PierceTM Recombinant Protein A Agarose (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Prozyme (Agilent) pufr (Agilent, USA)
- SDS Pellets (Carl Roth, Německo)
- Sialidasa A (Agilent, USA)
- Streptavidin konjugovaný HRP (Pierce, USA)
- TRIS (Amreco, Polsko)
- Trypan Blue Solution 0,4 % (Sigma Aldrich, USA)
- Tween-20 (Calbiochem, Německo)
- β -1,3-galaktosidasa (NEB, USA)
- β -merkptoethanol (Calbiochem, Německo)

3.1.2 Protilátky

- AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific (Jackson Immunoresearch, USA)
- Anti-Human IgG (γ -chain specific)–Peroxidase antibody produced in goat (MERCK, Německo)
- Anti-Human λ HRP (Jackson Immunoresearch, USA)
- Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific (Jackson Immunoresearch, USA)

3.1.3 Pufry a roztoky

3.1.3.1 SDS-PAGE

Tab. 1: Složení roztoků pro SDS-PAGE

30% A/B	300 g akrylamid, 8 g bisakrylamid, do 1 l doplnit ddH ₂ O
4x Tris HCl pufr (pH 6,8)	15,125 g TRIS, 1 g SDS, doplnit do 250 ml ddH ₂ O
4x TrisHCl pufr (pH 8,8)	45,5 g TRIS, 1 g SDS, doplnit do 250 ml ddH ₂ O
10% APS	10% vodný roztok persíranu amonného
Dělicí gel 8%	4 ml 30% A/B, 3,75 ml 4x Tris pufr (pH = 8,8), 6,25 ml dd H ₂ O, 75 µl 10% H ₂ O roztok persíranu amonného, 15 µl TEMED
Dělicí gel 12%	6 ml 30% A/B, 3,75 ml 4x Tris pufr (pH = 8,8), 5,25 ml dd H ₂ O, 75 µl 10% H ₂ O roztok persíranu amonného, 15 µl TEMED
Zaostřovací gel	1,3 ml 30% A/B, 2,5 ml 4x Tris pufr (pH = 6,8), 6 ml dd H ₂ O, 50 µl 10% H ₂ O roztok persíranu amonného, 10 µl TEMED
SDS elektrodový pufr	25 mM Tris, 190 mM glycin, 3 mM SDS, ddH ₂ O
2x SDS nanášecí pufr, redukční	125 M Tris, pH 6,8, 15,9% glycerol, 160 mM SDS, 10% merkaptoethanol, 0,01% bromfenolová modř
2x SDS nanášecí pufr, neredukční	125 M Tris, pH 6,8, 15,9% glycerol, 160 mM SDS, 0,01% bromfenolová modř
Fixační pufr	25% isopropanol, 10% ledová kyselina octová, ddH ₂ O

3.1.3.2 Western blot

Tab. 2: Složení roztoků pro Western blot

Towbinův transfer pufr	75 mM Tris, 0,58 mM glycin, 60% methanol, ddH ₂ O
Superblokovací pufr	1% BSA, 0,05% Tween, 1xPBS
10 x PBS, pH = 7,5	240 g NaCl, 6 g KCl, 40,08 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, 6 g KH ₂ PO ₄ , doplnit na objem 3 l ddH ₂ O
PBS/T	1xPBS, 0,05% Tween

3.1.3.3 ELISA

Tab. 3: Složení roztoků pro metodu ELISA

Blokovací pufr	1% BSA, 0,05% Tween, 1x PBS
OPD pufr	50 mM Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 25 mM kyselina citronová, ddH ₂ O, pH 5

3.1.4 Přístrojové vybavení

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

3.1.4.1 Spotřební materiál

- 1,5 ml mikrozkušavky (Eppendorftubes[®], Německo)
- 15 ml propylenové zkumavky (TPP, Švýcarsko)
- 50 ml propylenové zkumavky (SPL Life Sciences co., Ltd., Korea)
- Blotovací papíry (VWR, Čína)
- ELISA Maxisorp 96 jamkové desky (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Pipetovací špičky
 - 1 ml (Neptune Scientific, USA)
 - 10 µl (AHN/iBioTech, ČR)
 - 200 µl (Alpha Laboratories Ltd., Velká Británie)
- Purifikační kolona (Bio-Rad, Německo)
- PVDF membrána (Merck KGaA, Německo)
- Zakoncentrovávací kolona (Merck KGaA, Německo)

3.1.4.2 Biologický materiál

- Plazmidy obsahující klonovací vektor pBR322 se sekvencí pro rezistenci k ampicilinu, pCMV promotor pro expresi v savčích buňkách a sekvenci IgG pro lehký a těžký řetězec získanou od pacienta s IgAN (University of Alabama, Birmingham, USA)
- Polymerní myelomové IgA1 (laskavě poskytnuto prof. Městeckým, Ústav mikrobiologie, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA)
- Séra pacientů s IgAN (Ústav imunologie LF UP)
- Savčí expresní buňky linie HEK 293 FreeStyle™ Expression System (ECACC 85120602, THERMO FISHER)

3.2 Metody

3.2.1 Vzorke sér pacientů s IgAN

Vzorke krve, které byly v této diplomové práci využity, byly obdrženy z Oddělení nefrologie III. Interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Byla odebrána srážlivá krev, která byla následně ponechána po dobu 30 minut při pokojové teplotě, aby se srážela. Poté byla na Ústavu imunologie LF UP zpracována tak, že byla centrifugována po dobu 10 minut při 3000 g. Následně bylo odebráno sérum, které bylo rozalíknotováno po 1 ml do mikrozkušavek a zamrazeno na -80 °C.

Před samotným odběrem krve pacienti podepsali informovaný souhlas. Studie, jejíž součástí byla i tato diplomová práce, byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

3.2.2 Tvorba autoprotilátky IgG 1123

Nejprve byly připraveny buňky pro transfekci. Buňky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Byla použita buněčná linie FreeStyle 293F. Buňky byly kultivovány při 37 °C na třepačce při rychlosti 125 RPM ve FreeStyle 293 expresním médiu. Den před transfekcí byly buňky spočítány a byla stanovena jejich životaschopnost. K 10 μ l buněčné kultury bylo přidáno 10 μ l trypanové modři, která je používána ke stanovení vitality buněčné suspenze. Následně bylo do Bürkerovy komůrky přeneseno 10 μ l, komůrka byla zakryta krycím sklíčkem a byly spočítány živé i mrtvé buňky ve čtvercích 1 a 3 a na jejich hranách na obrázku označených dvojitou čarou (Obr. 10).

1	2	3
4	5	6
7	8	9

Obr. 10: Schéma Bürkerovy komůrky. Výpočet buněk probíhal ve čtvercích 1 a 3 a na hranách označených dvojitou čarou.

Koncentrace živých buněk byla vypočtena dle vzorce:

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

Následně byly buňky naředěny na hustotu 1×10^6 buněk/ml. Vzhledem k tomu, že hustota buněk byla určena na 2×10^6 buněk/ml a buněčná kultura byla v 80 ml média, bylo odebráno 40 ml buněčné kultury a přidáno ke 40 ml nového média. Buňky byly opět ponechány přes noc při 37 °C na třepačce rychlosti 125 RPM. Další den byly buňky spočítány stejným způsobem a naředěny na denzitu 1×10^6 buněk/ml na celkový objem 80 ml. Poté byly buňky transfekovány. Transfekční reagentie byly připraveny dle tabulky (Tab. 4).

Tab. 4: Transfekční reagentie pro objem 80 ml buněčné kultury

Plazmid	1. zkumavka			2. zkumavka	
	1123 [80 µg]	LCH [µl] 60	HCH [µl] 60	Opti-MEM™ [ml] 1	293Fectin™ [µl] 80

Do obou zkumavek bylo nejprve napipetováno množství Opti-MEMu™ dle tabulky (Tab. 4). Následně bylo do první zkumavky přidáno dané množství plazmidu pro těžký řetězec (HCH) a plazmidu pro lehký řetězec (LCH). Do druhé zkumavky bylo přidáno dané množství 293Fectinu™. Následně byly obě zkumavky inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Celý objem naředěných plazmidů byl přidán do zkumavky s naředěným Fectinem a transfekční směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Transfekční směs pak byla přidána do buněčné kultury, která byla inkubována 4 dny při 37 °C. Poté byla transfekovaná buněčná kultura zcentrifugována při 1500 g po dobu 10 minut. Supernatant byl přepipetován a byl přidán a naředěn PBS v poměru 1:1.

Následovala purifikace protilátky pomocí proteinu A konjugovaného s agarosou. Protein A je používán k purifikaci, neboť je schopný nekovalentně vázat IgG. Do každé zkumavky bylo přidáno 40 µl Pierce™ Recombinant Protein A Agarose a zkumavky byly ponechány 2 hodiny na rotátoru při laboratorní teplotě. Před jakýmkoliv dalším zpracováním vzorku bylo odebráno 2x 10 µl a smícháno s 10 µl redukčního a 10 µl neredukčního pufru. Následně byly zkumavky zcentrifugovány při 1500 g po dobu 10 minut. Agarosa s proteinem A a navázaným IgG 1123 byla napipetována na kolonu, kde se zachytila. Agarosa byla promyta 10 ml PBS a 1123 autoproti látka IgG byla eluována 4x 100 µl 0,1 M citrátu sodného (pH 4).

Každá eluce byla zachycena do mikrozkušavky a okamžitě zneutralizována přídatkem TrisHCl (pH 8,5) v poměru 3:1. Ze všech elucí byly odebrány vzorky pro detekci pomocí metody Western blot tak, že bylo odebráno po 10 µl vzorku a smícháno s redukčním pufrem a dalších 10 µl vzorku bylo smícháno s neredukčním pufrem, oba pufrы byly přidávány k vzorkům v poměru 1:1.

3.2.3 SDS-PAGE elektroforéza IgG 1123 autoproti látka

1 mm skla pro elektroforézu byla očištěna ethanolem a vysušena. Následně byly do kádinky napipetovány reagentie dle tabulek na přípravu 8% (Tab. 5) a 12% (Tab. 6) dělicího gelu a zaostřovacího gelu (Tab. 7). Nejdřív byly připraveny směsi bez APS a TEMEDu, které byly doplněny těsně před nalitím jednotlivých gelů.

První byly nality 8% a 12% dělicí gely do připravených skel zhruba 2 cm pod horní okraj a byly převrstveny 200 µl n-butanolu pro odstranění bublin a zarovnání gelu. Následně byl gel ponechán polymerovat po dobu 20 minut. Poté byla vymyta vrstva

n-butanolu pomocí ddH₂O a následovalo přidání zaostřovacího gelu až po vrchní okraj skla. Do zaostřovacího gelu byl před zatuhnutím vložen elektroforetický 15jamkový hřebínek pro vytvoření jamek.

Předem připravené vzorky byly rozmrazeny a následně povařeny při 95 °C po dobu 5 minut v termobloku. Následně byla sestavena elektroforetická aparatura – skla s připravenými gely byla vložena do elektroforetické komory hřebínky směrem nahoru. Poté byla komora naplněna elektrodovým pufrem a následně byly vytaženy hřebínky z gelu, čímž byly vytvořeny jamky.

Do první jamky obou gelů bylo napipetováno 6 µl standardu molekulových hmotností (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa) a následně bylo napipetováno po 8 µl vzorků do dalších jamek. Pro vzorky v neredukčním pufru byl zvolen 8% dělicí gel, pro vzorky v pufru redukčním byl zvolen 12% gel. Pak byla elektroforetická komora uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Pro zaostření vzorků v zaostřovacím gelu bylo zvoleno napětí 100 V po dobu 20 minut, které bylo následně zvýšeno na 140 V a elektroforéza probíhala ještě dalších 40 minut. Po uplynulém čase byla elektroforéza zastavena, gely vyjmuty a vloženy do Towbinova pufru.

Tab. 5: Složení 8% dělicího gelu, objemy pro dva gely

	8% dělicí gel
dd H ₂ O	6,25 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	4 ml
4x TrisHCl pufr pH 8,8	3,75 ml
10% APS	75 µl
TEMED	15 µl

Tab. 6: Složení 12% dělicího gelu, objemy pro dva gely

	12% dělicí gel
dd H ₂ O	5,25 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	6 ml
4x TrisHCl pufr pH 8,8	3,75 ml
10% APS	75 µl
TEMED	15 µl

Tab. 7: Složení 4% zaostřovacího gelu, objemy pro dva gely

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

3.2.4 Detekce 1123 IgG autoprotilátky metodou semi-dry Western blot

PVDF membrána byla aktivována methanolem po dobu 5 minut. Následně byl methanol vymyt vodou a poté byla membrána zalita Towbinovým pufrém, stejně jako blotovací papíry. V daném pufru byly membrána a papíry namočený zhruba 30 minut. Následně byly na blotovací zařízení umístěny následovně: blotovací papír, PVDF membrána, gel s rozdělenými vzorky a blotovací papír. Poté byly vytlačeny bubliny mezi vrstvami pomocí válečku. Vzhledem k tomu, že byly vytvořeny dva gely, byl blotting prováděn při 120 mA po dobu 1 hodiny pro redukční gel a po dobu 2 hodin pro neredukční gel. Po vyndání redukčního gelu bylo napětí sníženo na 60 mA. Membrány byly blokovány blokovacím pufrém (1% BSA v PBS s 0,05% Tween20) přes noc při 4 °C.

Druhý den byla membrána s redukovánými vzorky rozstřižena nad hranicí 30 kDa. Vrchní část membrány sloužila k detekci těžkého řetězce, spodní část pro detekci lehkého řetězce. Vrchní část membrány byla hodinu inkubována s 20 ml blokovacího pufru protilátkou anti-human λ HRP naředěnou v poměru 1:1000. Membrána s neredukčními vzorky byla inkubována také 1 hodinu protilátkou s anti-IgG gamma chain specific ve 20 ml blokovacího pufru v poměru 1:40000.

Následně byly všechny membrány hodinu promývány PBS s 0,05% Tweenem20 tak, že ke každé membráně bylo přidáno zhruba 20 ml roztoku, který byl po 10 minutách měněn. Potom byly membrány dvakrát promývány zhruba 20 ml PBS po 10 minutách. Poté byly membrány vloženy na folii a na každou membránu byly nanесeny 2 ml reagentů SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate vytvořených smícháním obou složek v poměru 1:1. Následně byl odečten signál pomocí detekčního zařízení.

3.2.5 Tvorba degalaktosylovaného IgA1

Degalaktosylované IgA1 bylo vytvořeno za využití polymerního myelomového IgA1, které bylo purifikováno ze séra pacienta s mnohočetným myelomem (Gou) (Moore, 2007; Yanagihara, 2012).

Degalaktosylace byla provedena v pufru Glycobuffer. Byly připraveny dva vzorky – negativní kontrola – 30 µg IgA1 v celkovém objemu 30 µl a degalaktosylovaný – 60 µg IgA1 v celkovém objemu 60 µl. Negativní kontrola neobsahovala glykosylační enzymy. Objemy byly pipetovány dle tabulky (Tab. 8). Následovala inkubace vzorků při 37 °C přes noc.

Tab. 8: Tvorba degalaktosylovaného IgA1 a kontrolního vzorku

		Glycobuffer	
		Kontrola	Vzorek
IgA1	[µl]	5	10
dd H ₂ O	[µl]	19	32
BSA	[µl]	3	6
Pufr	[µl]	3	6
β-1,3D-galaktosidasa	[µl]	-	3
Sialidasa A	[µl]	-	3

3.2.6 Detekce degalaktosylovaného IgA1 metodu ELISA

Efektivita degalaktosylace byla ověřena metodou ELISA v sandwichovém uspořádání, pomocí lektinu *Helix pomatia*. Na desku byla navázána protilátka proti lidskému IgA1 o koncentraci 2 µg/ml v PBS, do každé jamky napipetována po 100 µl. Takto připravená deska byla následně inkubována přes noc při 4 °C.

Druhý den byla deska vytemperována na laboratorní teplotu a následně byla promyta 5x 300 µl PBS. Poté bylo do každé jamky napipetováno 275 µl blokovačního pufru a byla inkubována po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla deska promyta 5x 300 µl PBS a do všech jamek desky bylo napipetováno 100 µl blokovačního pufru. Následně byly vzorky naředěny v blokovačním pufru na koncentraci 1 µg/ml a napipetovány do prvních jamek. Na desku byly napipetovány vzorky o výsledné koncentraci v první jamce 0,5 µg/ml v dubletu v tomto pořadí: nedegalaktosylované IgA1, degalaktosylované IgA1, IgA2. Poté byly vzorky propipetovány a následně bylo z prvních jamek přeneseno 100 µl do druhé řady jamek, které byly opět propipetovány. Stejným způsobem byla prováděna titrace až do poslední řady jamek, ze kterých bylo posledních 100 µl odpipetováno do odpadu. Následně byla deska inkubována přes noc při 4 °C.

Třetí den byla deska opět vytemperována na laboratorní teplotu a promyta nejprve 3x 300 µl PBS/T a poté 5x 300 µl PBS. Do všech jamek desky byl napipetován lektin *Helix pomatia* naředěný v poměru 1:300 v blokovačním pufru a deska byla následně inkubována 2 hodiny při 37 °C. Deska byla promyta 3x 300 µl PBS/T a poté 5x 300 µl PBS a poté bylo do všech jamek napipetováno 100 µl avidinu konjugovaného s HRP ředěno v poměru 1:20000 v blokovačním pufru a deska byla inkubována 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Deska byla promyta 3x PBS/T a 5x PBS. Signál byl vyvolán přidáním 100 µl OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H₂O₂ (10 µl na 10 ml OPD pufru) do každé jamky. Vyvolávání signálu bylo zastaveno přidáním 100 µl 1 M H₂SO₄ do každé jamky a poté byla absorbance změřena pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

3.2.7 Detekce imunitních komplexů metodou ELISA

Na ELISA desku byla navázána protilátka proti lidskému IgG, která byla naředěna v PBS na koncentraci 2,5 µg/ml a následně napipetována do každé jamky po 100 µl. Takto připravená deska byla následně inkubována přes noc při 4 °C. Byly připraveny vzorky.

Připravovány byly *de novo* imunitní komplexy, které byly tvořeny degalaktosylovaným IgA1 a 1123 IgG autoprotiilátkou, která se na toto IgA1 váže. První vzorek obsahoval 0,5 µg dgIgA1 a 1 µg autoprotiilátky IgG 1123 v 10 µl PBS, druhý vzorek obsahoval 1 µg dgIgA1 a 1 µg autoprotiilátky IgG 1123 v 10 µl PBS a třetí vzorek obsahoval 1 µg dgIgA1 a 1 µg autoprotiilátky IgG 1123 v 10 µl PBS. Tento byl použit jako kontrola. Vzorky byly inkubovány přes noc při 4 °C.

Druhý den byla deska vytemperována na laboratorní teplotu a následně byla promyta 5x 300 µl PBS. Poté bylo do každé jamky napipetováno 275 µl blokovačního pufru a deska byla inkubována po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla deska promyta 5x 300 µl PBS a do všech jamek bylo napipetováno 100 µl blokovačního pufru. Vzorky *s de novo* připravenými imunitními komplexy byly naředěny 100 µl blokovačního pufru. Poté byly vzorky propipetovány a následně bylo z prvních jamek přeneseno 100 µl do druhé řady jamek, které byly opět propipetovány. Stejným způsobem byla prováděna titrace až do poslední řady jamek, ze kterých bylo posledních 100 µl odpipetováno do odpadu. Následně byla deska inkubována přes noc při 4 °C.

Třetí den byla deska opět vytemperována na laboratorní teplotu a promyta nejprve 3x 300 µl PBS/T a poté 5x 300 µl PBS. Na desku bylo následně napipetováno 100 µl anti-IgA konjugované s HRP do všech jamek ředěno v poměru 1:10000 v blokovačním pufru a deska byla inkubována dvě hodiny při laboratorní teplotě.

Deska byla následně promyta 3x PBS/T a 5x PBS. Signál byl vyvolán přidáním 100 µl OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H₂O₂ (10 µl na 10 ml OPD pufru) do každé jamky. Vyvolávání signálu bylo zastaveno přidáním 100 µl 1 M H₂SO₄ do každé jamky a poté byla absorbance změřena pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

3.2.8 Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí lektinu *Helix pomatia* metodou ELISA

Na ELISA desku byla navázána protilátka proti lidskému IgA naředěna v PBS na koncentraci 2 µg/ml, napipetováno do každé jamky po 100 µl. Takto připravená deska byla následně inkubována přes noc při 4 °C.

Druhý den byla deska vytemperována na laboratorní teplotu a následně byla promyta 5x 300 µl PBS. Poté bylo do každé jamky napipetováno 275 µl blokovačního pufru a deska byla inkubována po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla deska promyta 5x 300 µl PBS a do všech jamek bylo napipetováno 100 µl blokovačního pufru. Následně byla séra naředěna v blokovačním pufru na příslušnou koncentraci a napipetována do prvních jamek v deskách. Séra byla napipetována o výsledném ředění v první jamce 1:100. Poté byly vzorky propipetovány a následně bylo z prvních jamek přeneseno 50 µl do druhé řady jamek, které byly opět propipetovány. Stejným způsobem byla prováděna titrace až do poslední řady jamek, ze kterých bylo posledních 50 µl odpipetováno do odpadu. Následně byla deska inkubována přes noc při 4 °C.

Třetí den byla deska opět vytemperována na laboratorní teplotu a promyta nejprve 3x 300 µl PBS/T a poté 5x 300 µl PBS. Na desku bylo následně napipetováno 100 µl lektinu *Helix pomatia*, do všech jamek ředěno v poměru 1:300 v blokovačním pufru a deska byla inkubována dvě hodiny při 37 °C. Poté bylo na desku přidáno 100 µl avidinu konjugovaného s HRP ředěno v PBS v poměru 1:10000 a deska byla inkubována jednu hodinu při 37 °C. Deska byla následně promyta 3x PBS/T a 5x PBS. Signál byl vyvolán přidáním 100 µl OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H₂O₂ (10 µl na 10 ml OPD pufru) do každé jamky. Vyvolávání signálu bylo zastaveno přidáním 100 µl 1 M H₂SO₄ do každé jamky a poté byla absorbance kvantifikována pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

3.2.9 Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí 1123 IgG autoprotilátky metodou ELISA

Na ELISA desky byla navázána 1123 IgG autoprotilátka naředěna v PBS na koncentraci 1 µg/ml, napipetována do každé jamky po 100 µl. Takto připravené desky byly následně inkubovány přes noc při 4 °C.

Druhý den byly desky vytemperovány na laboratorní teplotu a následně byly promyty 5x 300 µl PBS. Poté bylo do každé jamky napipetováno 275 µl blokovačního pufru a byly inkubovány po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly desky promyty 5x 300 µl PBS a do všech jamek obou desek bylo napipetováno 100 µl blokovačního pufru. Séra byla naředěna v blokovačním pufru 1:50 do celkového objemu 200 µl a napipetována do prvních jamek v deskách. Na obě desky byla napipetována séra o výsledném ředění v první jamce 1:100. Poté byly vzorky propipetovány a následně bylo z prvních jamek přeneseno 100 µl do druhé řady jamek, které byly opět propipetovány. Stejným způsobem byla prováděna titrace až do poslední řady jamek, ze kterých bylo posledních 100 µl odpipetováno do odpadu. Následně byly desky inkubovány přes noc při 4 °C.

Třetí den byly desky opět vytemperovány na laboratorní teplotu a promyty nejprve 3x 300 µl PBS/T a poté 5x 300 µl PBS. Na obě desky bylo následně napipetováno 100 µl anti-IgA konjugované s HRP do všech jamek ředěno v poměru 1:10000 v blokovačním pufru a deska byla inkubována dvě hodiny při laboratorní teplotě. Obě desky byly následně promyty 3x PBS/T a 5x PBS. Signál byl vyvolán přidáním 100 µl OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H₂O₂ (10 µl na 10 ml OPD pufru) do každé jamky. Vyvolávání signálu bylo zastaveno přidáním 100 µl 1 M H₂SO₄ do každé jamky a poté byla absorbance změřena pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

3.2.10 Detekce IgG autoprotilátky v sérech pacientů pomocí dg-IgA1 metodou ELISA

Na ELISA desku bylo navázáno dg-IgA1 naředěno v PBS na koncentraci 1 µg/ml napipetováno do každé jamky po 100 µl. Takto připravená deska byla následně inkubována přes noc při 4 °C.

Druhý den byla deska vytemperována na laboratorní teplotu a následně byla promyta 5x 300 µl PBS. Poté bylo do každé jamky napipetováno 275 µl blokovačního

pufu a deska byla inkubována po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla deska promyta 5x 300 μ l PBS a do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l blokovačeho pufu. Následně byla séra naředěna v blokovačím pufu na příslušnou koncentraci a napipetována do prvních jamek v deskách. Séra byla napipetována o výsledném ředění v první jamce 1:100. Poté byly vzorky propipetovány a následně bylo z prvních jamek přeneseno 50 μ l do druhé řady jamek, které byly opět propipetovány. Stejným způsobem byla prováděna titrace až do poslední řady jamek, ze kterých bylo posledních 50 μ l odpipetováno do odpadu. Následně byla deska inkubována přes noc při 4 °C.

Třetí den byla deska opět vytemperována na laboratorní teplotu a promyta nejprve 3x 300 μ l PBS/T a poté 5x 300 μ l PBS. Na desku bylo následně napipetováno 100 μ l anti-IgG konjugované s HRP do všech jamek ředěno v poměru 1:5000 v blokovačím pufu a deska byla inkubována dvě hodiny při laboratorní teplotě.

Deska byla následně promyta 3x PBS/T a 5x PBS. Signál byl vyvolán přidáním 100 μ l OPD pufu s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H₂O₂ (10 μ l na 10 ml OPD pufu) do každé jamky. Vyvolávání signálu bylo zastaveno přidáním 100 μ l 1 M H₂SO₄ do každé jamky a poté byla absorbance kvantifikována pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

3.2.11 Kompetice lektinů *Helix pomatia* a *Helix aspersa agglutinin* s IgG v sérech pacientů, detekce metodou ELISA

Pro dokázání specifické vazby mezi degalaktosylovaným IgA1 a autoprotilátkou IgG v séru byla provedena kompetiční imunoesej. Lektiny *Helix pomatia* a *Helix aspersa agglutinin* se vážou na odkrytý GalNAc v pantové oblasti u galaktosově deficientních IgA1. Na stejné místo by se také měla vázat IgG autoprotilátka. Pokud přidáme k degalaktosylovanému IgA1 zároveň patientské sérum a některý z výše zmíněných lektinů, můžeme detekovat, zda se autoprotilátka na dg-IgA váže. Na ELISA desku bylo navázáno dg-IgA1 ředěné v PBS tak, aby byla koncentrace 1 μ g/ml. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l. Takto připravené desky byly následně inkubovány přes noc při 4 °C.

Druhý den byla deska vytemperována na laboratorní teplotu a následně byla promyta 5x 300 μ l PBS. Poté bylo do každé jamky napipetováno 275 μ l blokovačeho pufu a deska byla inkubována po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci

byla deska promyta 5x 300 μ l PBS a do všech jamek bylo napipetováno 50 μ l blokovacího pufru. Následně bylo do prvního řádku jamek 2, 3, 7 a 8 napipetováno první patientské sérum ředěné blokovacím pufrům tak, že v jamkách bylo naředěno 1:50. Poté byly první jamky propipetovány a 25 μ l bylo přeneseno do druhých jamek. Takto byla provedena titrace až k posledním jamkám a posledních 25 μ l bylo vylito do odpadu. Do prvních jamek 4, 5, 9 a 10 bylo stejným způsobem napipetováno druhé patientské sérum. Následně bylo do všech jamek sloupců 2-6 napipetováno 50 μ l lektinu *Helix aspersa agglutinin* o koncentraci 5 μ g/ml (ředěný v blokovacím pufru) a do jamek sloupců 7-11 50 μ l lektinu *Helix pomatia* o stejné koncentraci. Deska byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě.

Třetí den byla deska promyta nejprve 3x 300 μ l PBS/T a poté 5x 300 μ l PBS. Do všech jamek desky bylo napipetováno 100 μ l avidinu konjugovaného s HRP ředěno v poměru 1:20000 do blokovacího pufru a deska byla inkubována 1 hodinu při teplotě 37 °C. Deska byla následně promyta 3x PBS/T a 5x PBS. Signál byl vyvolán přidáním 100 μ l OPD pufru s O-fenylendiamindihydrochloridem (0,5 mg/ml) a H₂O₂ (10 μ l na 10 ml OPD pufru) do každé jamky. Vyvolávání signálu bylo zastaveno přidáním 100 μ l 1 M H₂SO₄ do každé jamky a poté byla absorbance kvantifikována pomocí ELISA readeru při vlnové délce 490 nm.

Byly vypočítány procentuální rozdíly při kompetiční imunoeseji, kde byly za 100% hodnoty považovány průměrné absorbance jamek s navázaným lektinem, tyto pak byly porovnávány s průměrnými hodnotami absorbancí jamek, které obsahovaly zároveň sérum i daný lektin. Hodnoty absorbancí byly zadávány po odečtení blanku (0,05). Jako 100% hodnota byla brána průměrná absorbance daného lektinu.

3.2.12 Charakterizace imunitních komplexů metodou SPR

Byly připraveny pufrы pro SPR: 100 ml PBS, 100 ml PBS s 0,05% Tweenem 20 a 100 ml PBS s 0,05% Tweenem 20 a 1% BSA. Roztok s BSA byl přefiltrován. Všechny roztoky byly ponechány 30 minut v ultrazvukové lázni pro odstranění bublin. OpenSPR přístroj byl spuštěn a byl promyt PBS. Poté byl vyjmut karboxylový čip z uchovávacího roztoku, opláchnut destilovanou vodou, osušen pomocí vzduchu a vložen do přístroje místo blankového čipu. Následně byl povrch čipu očištěn pomocí injekce 150 μ l 10 mM glycinu-HCl (GlyHCl) při průtoku 150 μ l/min. Poté byl povrch čipu aktivován pomocí EDC/NHS. Jak EDC, tak NHS z Kitu Amine-10 bylo

rozpuštěno v 1 ml přiloženého aktivačního pufru a následně rozaliquotováno po 100 μ l do mikrozkuvek. Poté byl jeden alikvot EDC smíchán s jedním alikvotem NHS a směs byla ihned vstříknuta do openSPR přístroje injekčním portem. Aktivace čipu probíhala při průtoku 20 μ l/min.

Na druhý kanál aktivovaného čipu byla navázána jako ligand autoprotilátka proti gd-IgA1, 1123 IgG. 10 μ g autoprotilátky bylo smícháno s 200 μ l aktivačního pufru a aplikováno do přístroje při průtoku 20 μ l/min. Následně bylo softwarem provedeno vyhodnocení množství navázaného ligandu pomocí porovnání signálu po aktivaci EDC/NHS se signálem po imobilizaci ligandu. Následně byly zablokovány volné karboxyly 150 μ l blokovacího pufru dodaného v Kitu Amine-10 při rychlosti průtoku 20 μ l/min. Poté byly případné zbylé volné karboxyly zablokovány použitím 1% BSA v PBS s 0,05% Tweenem tak, že bylo do přístroje injektováno 150 μ l tohoto pufru při rychlosti průtoku 20 μ l/min. Pro analýzu byl použit pufr PBS/T. Při následných analýzách byl nastříkovan vzorek vždy pouze do druhého kanálu.

Na karboxylovém čipu s navázanou autoprotilátkou byl nejprve detekován dg-IgA. Bylo připraveno 300 μ l dg-IgA v PBS/T o koncentraci 5 μ g/ml a následně byl vytvořen další vzorek přenesením 100 μ l do 200 μ l PBS/T. Ředění faktorem 3 bylo provedeno ještě dvakrát. Nejprve byl injektován nejméně koncentrovaný vzorek, 150 μ l při rychlosti průtoku 20 μ l/min. Asociační čas byl 5 min a doba disociačního času byla 10 min. Po disociaci bylo provedeno vymytí navázaných dg-IgA pomocí 150 μ l GlyHCl při rychlosti průtoku 200 μ l/min. Po ustálení křivek byly postupně injektovány další vzorky o vzrůstající koncentraci. Stejný postup byl proveden s kontrolním vzorkem nedegalaktosylovaného IgA1 a IgA2.

Poté bylo proměřeno patientské sérum. Pro tuto analýzu byl použit pufr BSA/PBS/T. Sérum bylo připraveno ve třech koncentracích, vztaženo k sérovému IgG 1,37 μ g/ml, 4,11 μ g/ml a 12,3 μ g/ml. Samotné měření proběhlo stejně jako u předchozích vzorků.

Procentuální obsazení ligandu při SPR bylo vypočítáno jako porovnání maximálních hodnot RU obsazení čipu ligandem a hodnot RU detekovaných po přidání analytů. Jako 100% hodnota bylo bráno 2550 RU – hodnota navázání ligandu na čip.

3.2.13 Statistická analýza

Prezentovaná data veškerých měření pomocí metody ELISA představují průměrnou hodnotu ze dvou měření se standardní odchylkou. Rozdíly mezi kontrolními a vyšetřovanými séry byly vyhodnoceny pomocí Studentova *t*-testu. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$.

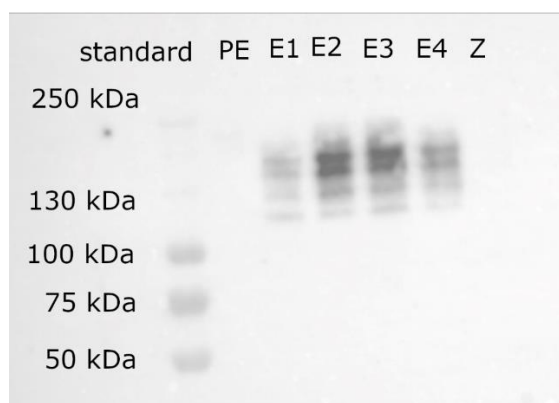
4 VÝSLEDKY

4.1 Produkce 1123 IgG autoprotilátky a její detekce

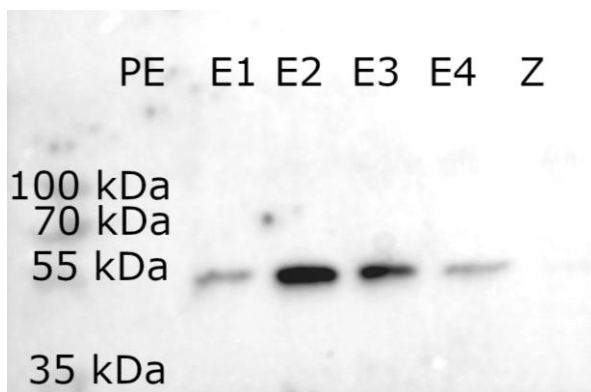
Buňky 239F o koncentraci $1 \cdot 10^6$ /ml byly transfekovány v objemu 80 ml s 20 ng plazmidu pro lehký řetězec a 20 ng plazmidu pro těžký řetězec. Rekombinantní autoprotilátka IgG byla po 3 dnech purifikována na koloně pomocí Proteinu A.

Detekce vytvořené 1123 IgG autoprotilátky byla provedena metodou Western blot. Při neredukčních podmínkách byla autoprotilátka detekována pomocí protilátky proti lidskému IgG značené HRP (Obr. 11). U vzorků, které byly inkubovány v redukčním pufru, byla membrána podélně rozstřížena mezi 25 a 35 kDa. Vrchní část, na které byla předpokládána přítomnost těžkého řetězce IgG, byla detekována taktéž pomocí protilátky proti lidskému IgG značené HRP (Obr. 12). Lehký řetězec molekuly IgG byl detekován pomocí protilátky proti lidskému λ lehkému řetězci značené HRP (Obr. 13). Následně byl vyhodnocen signál.

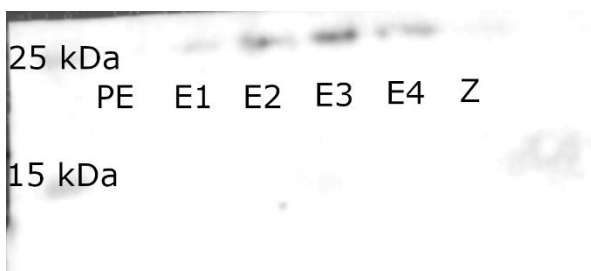
V případě odebraného vzorku před elucí a před nanesením na kolonu nebyl detekován žádný signál, což může být způsobeno nízkou koncentrací vzorku. Autoprotilátka byla nejvíce detekována ve druhé a třetí eluci. U vzorků inkubovaných v neredukčních podmínkách byl detekován proteinový band zhruba v oblasti molekulové hmotnosti 150 kDa, což odpovídá hmotnosti molekuly IgG. Na membráně se nachází více proteinových pásů. To může značit agregaci proteinů či jejich částí. Při redukčních podmínkách byly detekovány proteinové bandy v oblasti 55 kDa při detekci protilátkou proti lidskému IgG, což odpovídá molekulové hmotnosti těžkého řetězce IgG. Při detekci protilátky proti lidskému λ řetězci byly detekovány proteinové bandy odpovídající molekulové hmotnosti 25 kDa. Tato hmotnost odpovídá lehkému řetězci IgG.



Obr. 11: Detekce autoprotiblatky IgG 1123 metodou Western blot. Vzorky inkubovány s neredukčním puřrem a detekovány protiblatkou proti lidskému IgG konjugované s HRP. **Standard** – standard molekulových hmotností; **PE** – vzorek odebrán před nanesením na kolonu a elucí; **E1** – eluce 1; **E2** – eluce 2; **E3** – eluce 3; **E4** – eluce 4; **Z** – zakoncentrovaný vzorek



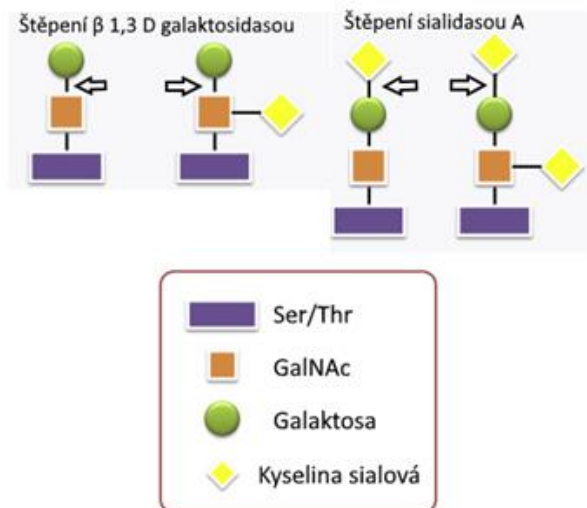
Obr. 12: Detekce 1123 IgG autoprotiblatky metodou Western blot. Vzorky inkubovány s redukčním puřrem a detekovány pomocí protiblatky proti lidskému IgG konjugované s HRP. **PE** – vzorek odebrán před nanesením na kolonu a elucí; **E1** – eluce 1; **E2** – eluce 2; **E3** – eluce 3; **E4** – eluce 4; **Z** – zakoncentrovaný vzorek



Obr. 13: Detekce vytvořené 1123 IgG autoprotiblatky metodou Western blot. Vzorky inkubovány s redukčním puřrem a detekovány pomocí protiblatky proti lidskému λ řetězci konjugované s HRP. **PE** – vzorek odebrán před nanesením na kolonu a elucí; **E1** – eluce 1; **E2** – eluce 2; **E3** – eluce 3; **E4** – eluce 4; **Z** – zakoncentrovaný vzorek

4.2 Tvorba gd-IgA1

Pro vytvoření galaktosově deficientního IgA1 bylo potřeba odštěpit galaktosu navázanou v pantové oblasti IgA1. Kromě galaktosy obsahuje pantová oblast IgA1 ještě GalNAc, na který je galaktosa navázána a kyselinu sialovou, která se naopak váže na galaktosu. Vzhledem k tomu, že enzym β -1,3-D galaktosidasou, který byl využit pro odštěpení galaktosy z glykanového řetězce, patří mezi exoglykosidasou, tzn. působí na konci řetězce, bylo potřeba využít dalšího enzymu. Tímto enzymem byla Sialidasou A, která je rovněž exoglykosidasou a štěpí vazbu mezi kyselinou sialovou a galaktosou. Zobrazeno na obrázku (Obr. 14).

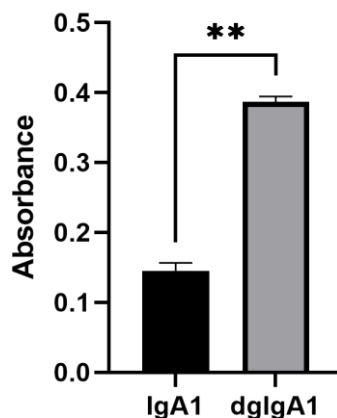


Obr. 14: Štěpení sacharidů glykosylovaného IgA1 enzymy β -1,3-D galaktosidasou a sialidasou A. Šipkami znázorněna tvorba degalaktosylovaného IgA1 pomocí enzymů β -1,3-D galaktosidasou a sialidasou A. β -1,3-D galaktosidasou byla použita ke štěpení vazby mezi galaktosou a GalNAc, sialidasou A byla použita ke štěpení vazby mezi sialidasou a galaktosou. Upraveno podle Han, 2016.

4.2.1 Detekce degalaktosylace IgA1 metodou ELISA

Úspěšnost provedené degalaktosylace byla ověřena metodou ELISA za pomoci lektinu *Helix pomatia* (Obr. 15). Tento lektin vykazuje vaznost v pantové oblasti galaktosově deficientního IgA1, kde rozpoznává odkrytý epitop GalNAc (Tomana, 1997).

U degalaktosylovaných IgA1 došlo k navázání většího množství lektinu, což bylo detekováno jako nárůst absorbance při 490 nm. Detekce tedy dokázala, že degalaktosylace byla úspěšná.

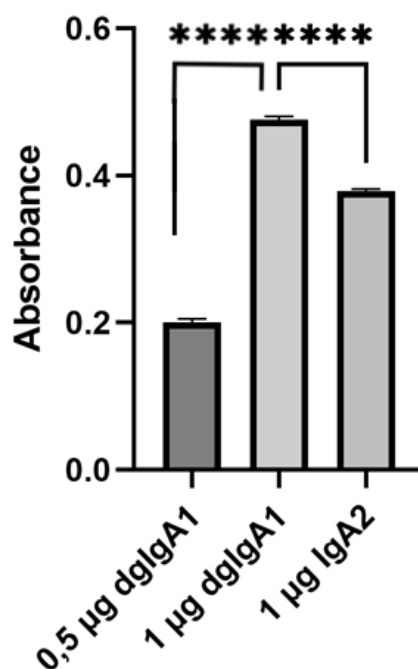


Obr. 15: Detekce degalaktosylace IgA1 pomocí lektinu *Helix pomatia* metodou ELISA. Vlevo neošetřené IgA1, vpravo ošetřené IgA1 enzymy sialidasa A a β -1,3-D galaktosidasa. Na ELISA desku navázány protilátky proti lidskému IgA1, detekce navázaných dg-IgA1 byla provedena lektinem *Helix pomatia* značeným biotinem. ** Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,01$.

4.3 Detekce imunitních komplexů tvořených dg-IgA1 a autoprotiilátkou 1123 metodou ELISA

Vazbou degalaktosylovaného IgA1 na autoprotiilátku IgG 1123 byly vytvořeny modelové imunitní komplexy, které se vyskytují u pacientů s IgAN. Jejich tvorba byla detekována metodou ELISA. Na ELISA desku byla navázána protiilátka proti lidskému IgG a detekce navázaných imunitních komplexů byla provedena pomocí protiilátky proti lidskému IgA značené HRP.

Tvorba imunitních komplexů mezi dg-IgA1 a 1123 IgG autoprotiilátkou byla potvrzena větším navázáním vzorku jak na protiilátku proti lidskému IgG, tak následně na protiilátku proti lidskému IgA, což bylo detekováno jako vzrůst absorbance při 490 nm (Obr. 16). Nárůst množství dg-IgA1 vedl k větší tvorbě imunitních komplexů ve vzorku. U IgA2 byly také detekovány mírně zvýšené hladiny, což však mohlo být v důsledku špatného zablokování desky a nespecifickým navázáním IgA2. Stále jsou však patrné rozdíly mezi dg-IgA1 a IgA2.

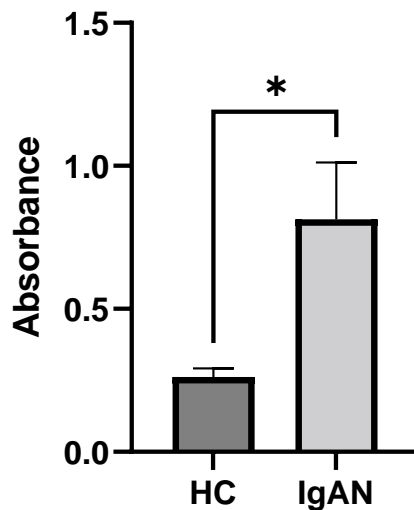


Obr. 16: Detekce tvorby imunitních komplexů mezi dg-IgA1 a 1123 IgG autoprotiilátkou metodou ELISA. Vlevo vzorek obsahující 0,5 µg dg-IgA1 a 1 µg IgG 1123, ve prostřed vzorek obsahující 1 µg dg-IgA1 a 1 µg IgG 1123 a vpravo kontrolní vzorek obsahující 1 µg IgA2 a 1 µg IgG 1123. **** Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,0001$

4.4 Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí 1123 IgG autoprotilátky metodou ELISA

Pro detekování přítomnosti galaktosově deficientních IgA1 v patientských sérech byla použita vytvořená 1123 IgG autoprotilátka, která byla navázána na ELISA desku. Navázané gd-IgA1 na autoprotilátku byly detekovány pomocí protilátky proti lidskému IgA značené HRP.

Množství gd-IgA1 detekovaného pomocí autoprotilátky IgG 1123 bylo signifikantně vyšší v sérech pacientů s IgAN v porovnání se zdravými kontrolami (Obr. 17). Naměřené hodnoty jsou ve shodě s dříve publikovanými výsledky (Stewart, 2019).

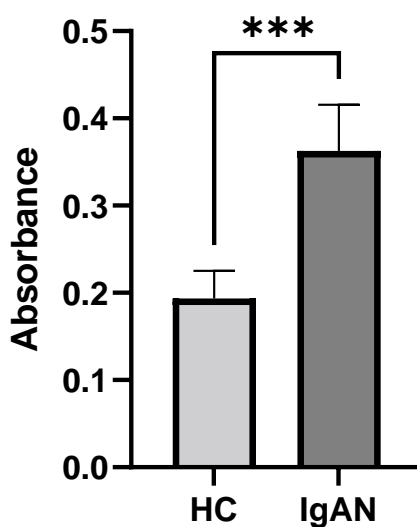


Obr. 17: Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů s IgAN a zdravých kontrol metodou ELISA. **HC** – zdravé kontroly; **IgAN** – pacienti trpící IgAN. Na ELISA desku navázána 1123 IgG autoprotilátka, detekce navázaného gd-IgA1 provedena pomocí protilátky proti lidskému IgA. * Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,05$.

4.5 Detekce IgG autoprotilátky v sérech pacientů

Pro detekování přítomnosti autoprotilátky IgG v patientských sérech byl použit vytvořený dg-IgA, který byl navázán na ELISA desku. Navázané IgG na dg-IgA1 byly detekovány pomocí protilátky proti lidskému IgG značené HRP.

Vystavení séra dg-IgA1 navázaném na desce vedlo k vytvoření imunitních komplexů skládajících se z daného IgA1 a IgG autoprotilátky, která se vyskytovala v séru. Nárůst imunitních komplexů byl detekován jako vzrůst absorbance při 490 nm. Porovnání bylo provedeno se séry zdravých kontrol (Obr. 18).

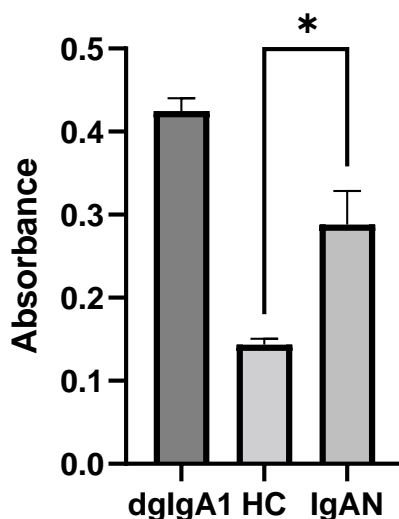


Obr. 18: Detekce autoprotilátky IgG v sérech pacientů s IgAN a zdravých kontrol metodou ELISA. **HC** – zdravé kontroly; **IgAN** – pacienti trpící IgAN. Na ELISA desku navázán dg-IgA1, detekce navázané autoprotilátky IgG provedena pomocí protilátky proti lidskému IgG. *** Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,001$.

4.6 Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů pomocí lektinu *Helix pomatia* metodou ELISA

Pro detekování přítomnosti galaktosově deficientních IgA1 v patientských sérech byl také použit lektin *Helix pomatia*. Na ELISA desku byla navázána protilátka proti lidskému IgA. Navázané gd-IgA1 byly detekovány lektinem *Helix pomatia* konjugovaným s biotinem, na který byl následně navázán avidin značený HRP.

Výskyt gd-IgA1 v séru pacientů s IgAN byl potvrzen vyšším vyšší vazbou na přidaný lektin, což bylo detekováno jako vzrůst absorbance při 490 nm. Porovnání bylo provedeno se séry zdravých kontrol, kde se komplexy lektin-gd-IgA1 téměř netvořily (Obr. 19). V tomto případě byl na desku ještě přidán samotný dg-IgA1 jako kontrolní vzorek.



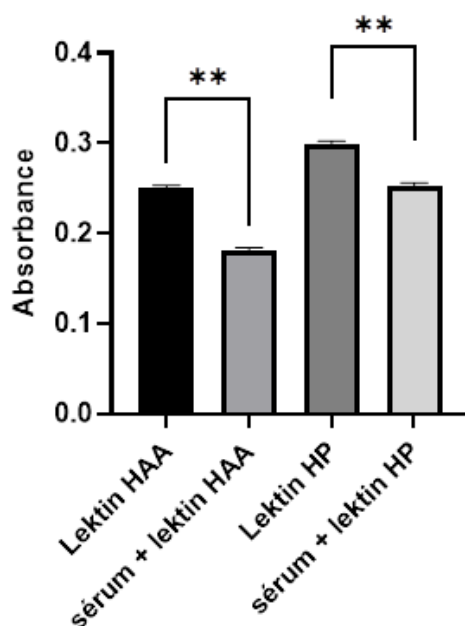
Obr. 19: Detekce gd-IgA1 v sérech pacientů s IgAN a zdravých kontrol metodou ELISA. **HC** – zdravé kontroly; **IgAN** – pacienti trpící IgAN. Na ELISA desku navázána protilátka proti lidskému IgA, detekce navázaného gd-IgA1 provedena pomocí lektinu *Helix pomatia*. * Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,05$

4.7 Kompetice lektinů *Helix pomatia* a *Helix aspersa agglutinin* s IgG v sérech pacientů

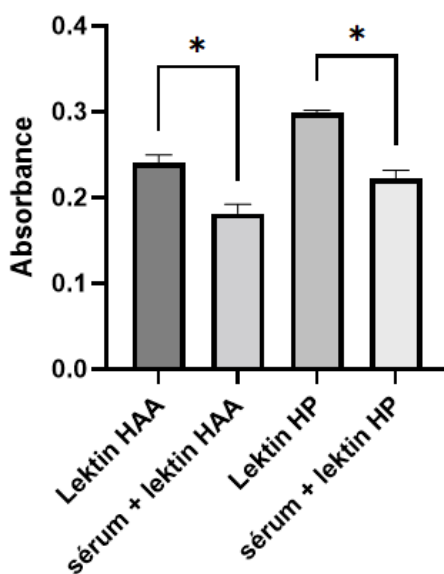
Pro důkaz specifické vazby autoprotilátky IgG v sérech pacientů na gd-IgA1 byla provedena kompetiční imunoesej s lektiny *Helix pomatia* a *Helix aspersa agglutinin*. Na ELISA desku bylo navázáno dg-IgA1. Poté byla přidána dvě různá séra, která byla titrována. Následně byl přidán lektin značený biotinem v konstantním množství, který byl poté detekován avidinem konjugovaným s HRP.

Při výskytu IgG autoprotilátky v séru očekáváme snížení hladiny absorbance. Autoprotilátka se naváže na imobilizované dg-IgA1 na desce a zanechá proto méně vazebných míst pro lektin, který byl přidáván až po séru. To bylo potvrzeno při imunoeseji, kdy byla detekována snížená hladina absorbance v jamkách, které obsahovaly sérum i lektin, oproti jamkám, které obsahovaly pouze lektin, ať už *Helix aspersa agglutinin*, či *Helix pomatia*. Absorbance pak byla nepřímo úměrná množství navázané autoprotilátky. Takto byla vyšetřena dvě séra označená 112 a 13D, jejichž testování je zobrazeno na obrázcích 20 a 21 (Obr. 20, obr. 21).

Následně byly zhodnoceny procentuální úbytky absorbancí po navázání autoprotilátky ze séra (Tab. 9, tab. 10). V případě prvního séra byl procentuální úbytek větší u lektinu *Helix aspersa agglutinin*, u kterého činil 34,59 %. Mezi absorbancemi lektinu *Helix pomatia* a tohoto lektinu společně se sérem činil procentuální úbytek 18,71 %. V případě druhého séra byl procentuální úbytek u lektinu *Helix aspersa agglutinin* menší, činil 16,38 %. Mezi absorbancemi lektinu *Helix pomatia* a tohoto lektinu společně se sérem činil procentuální úbytek 30,67 %. Vzhledem k malému množství proměřených sér oběma lektiny se nedá stanovit, který z lektinů je pro danou analýzu vhodnější, avšak dle procentuálního úbytku lze usoudit, že analýzu lze provádět s oběma.



Obr. 20: Kompetice lektinů a IgG v séru. Na ELISA desku navázáno dg-IgA1. Vazba autoprotilátky IgG v séru byla sledována nepřímo vazbou dvou různých lektinů na dg-IgA1 s již navázanou autoprotilátkou. Vlevo samotný signál lektinu *Helix aspersa aglutinin*, vedle signál lektinu *Helix aspersa aglutinin* (HAA) navázaného po navázání autoprotilátky ze séra. Druhý set značí signál samotného lektinu *Helix pomatia* a signál lektinu *Helix pomatia* (HP) po navázání autoprotilátky ze séra. * Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,01$



Obr. 21: Kompetice lektinů a IgG ve druhém patientském séru. Na ELISA desku navázáno dg-IgA1. Vazba autoprotilátky IgG v séru byla sledována nepřímo vazbou dvou různých lektinů na dg-IgA1 s již navázanou autoprotilátkou. Vlevo samotný signál lektinu *Helix aspersa aglutinin*, vedle signál lektinu *Helix aspersa aglutinin* (HAA) navázaného po navázání autoprotilátky ze séra. Druhý set značí signál samotného lektinu *Helix pomatia* a signál lektinu *Helix pomatia* (HP) po navázání autoprotilátky ze séra. ** Míra signifikance dle studentova *t*-testu, $P < 0,05$

Tab. 9: Procentuální snížení absorbancí mezi lektiny *Helix aspersa agglutinin*, *Helix pomatia* a sérem 112

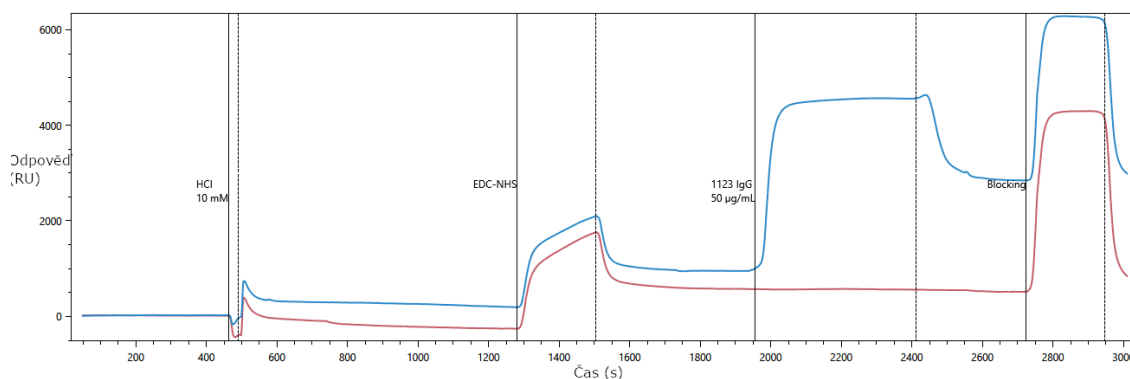
A ₄₉₀ lektinu HAA	A ₄₉₀ lektinu HAA + séra	Snížení absorbancí [%]	A ₄₉₀ lektinu HP	A ₄₉₀ lektinu HP + séra	Snížení absorbancí [%]
0,1995	0,1305	34,59	0,2485	0,202	18,71

Tab. 10: Procentuální snížení absorbancí mezi lektiny *Helix aspersa agglutinin*, *Helix pomatia* a sérem 13D

A ₄₉₀ lektinu HAA [nm]	A ₄₉₀ lektinu HAA + séra [nm]	Snížení absorbancí [%]	A ₄₉₀ lektinu HP [nm]	A ₄₉₀ lektinu HP + séra [nm]	Snížení absorbancí [%]
0,1573	0,1315	16,38	0,2488	0,1725	30,67

4.8 Charakterizace imunitních komplexů metodou SPR

Pro charakterizaci imunitních komplexů pomocí SPR byla nejprve potřeba příprava čipu. Čip byl promyt 10 mM HCl. Nejprve byl pozorován pokles signálu a po vymytí HCl z čipu se hladina signálu opět zvedla a ustálila. Aktivace obou kanálů byla provedena pomocí EDC/NHS. Po jeho přidání bylo detekováno zvýšení signálu v obou kanálech a bylo detekováno zvýšení hladiny signálu taktéž v obou kanálech. Následně byla pouze na druhém kanálu čipu imobilizována 1123 IgG autoproti látka, která při měření posloužila jako ligand. Po přidání ligandu došlo ke vzrůstu signálu na hladinu zhruba 4000 RU. Dle hodnocení softwaru byla imobilizace úspěšná, ligand byl navázán na čip v konečném množství 2550 RU. Nakonec byla aktivovaná ligandem neobsazená místa na čipu inaktivována blokovacím puřrem (Obr. 22). Kanál jedna byl využit jako referenční.

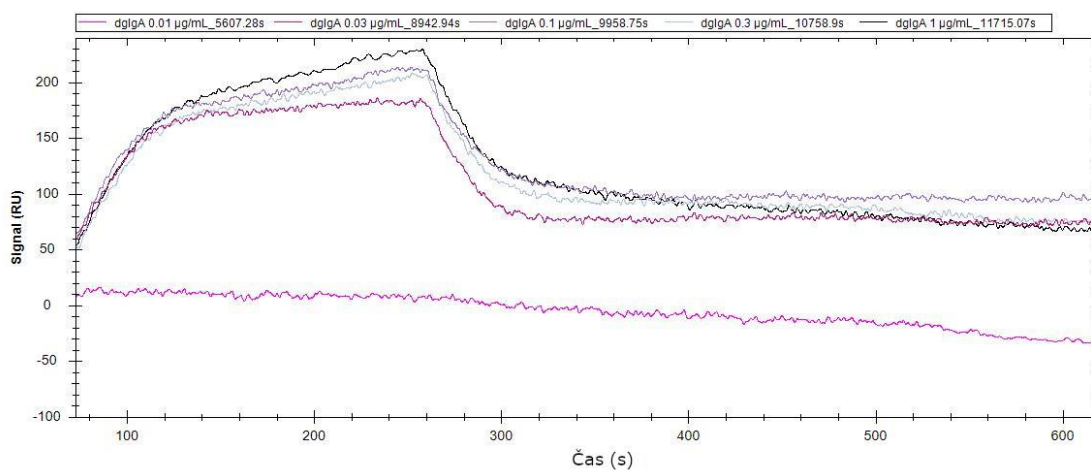


Obr. 22: Znárodnění průběhu imobilizace ligandu na povrch čipu při SPR. Čip byl promyt 10 mM HCl. Po ustálení signálu byl aktivován EDC/NHS. Následně byla na druhý kanál čipu aplikována 1123 IgG autoprottilátka o koncentraci 50 µg/ml. Po ustálení signálu byly oba kanály zablokovány. Kanál jedna byl využíván jako referenční.

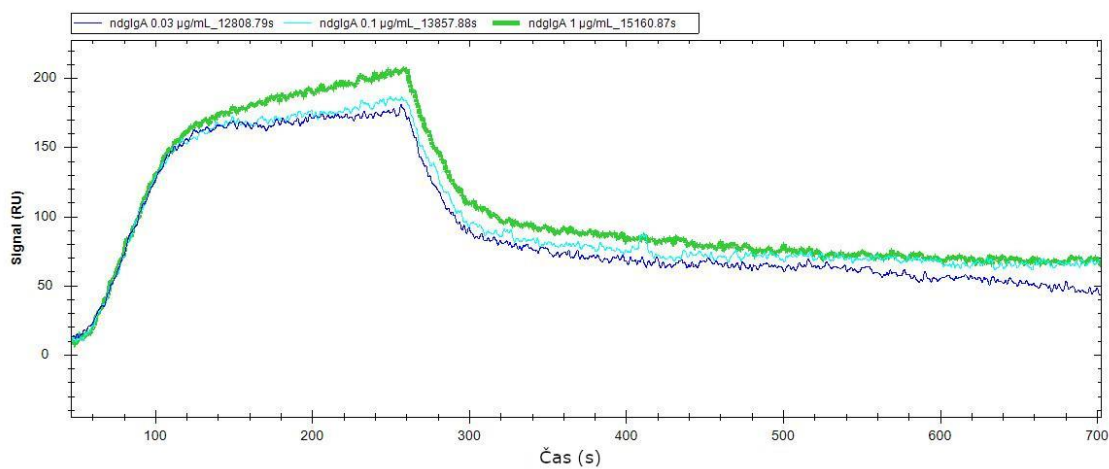
Nejprve byla analyzována interakce ligandu s dg-IgA1 o koncentracích 0,01 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml a 1 µg/ml (Obr. 23). Při koncentraci 0,01 µg/ml nebyla naměřena téměř žádná interakce s 1123 IgG autoprottilátkou. Zařizování bylo po nástřiku každého vzoru regenerováno 10 mM Gly-HCl a vzorky byly aplikovány dle vzrůstající koncentrace. Při koncentraci 0,03 µg/ml už byl detekován vzrůst signálu, který byl v maximální hodnotě 183 RU. Při vzrůstajících koncentracích docházelo ke zvýšení signálu, u koncentrace 0,1 µg/ml byl signál detekován v maximální hodnotě 205 RU. Následující byla koncentrace 0,3 µg/ml, u které byl detekován maximální signál 215. Při nejvyšší koncentraci dg-IgA1 byl detekován maximální signál 240 RU.

Následně byly vstříknuty vzorky ndg-IgA1 o koncentracích 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml a 1 µg/ml (Obr. 24). Zde byl nejvyšší signál odečten při nejvyšší koncentraci, přičemž jeho maximální hodnota byla 208 RU. V případě obou IgA1 je možné pozorovat větší zvýšení signálu, avšak v případě dg-IgA1 zůstalo po disociaci navázáno větší množství molekul. Očekávané rozdíly však byly daleko markantnější. Problém může být ve specifitě autoprottilátky. Pro koncentraci 0,3 µg/ml byla špatně zvolená průtoková rychlost a vzhledem k nižšímu interakčnímu času by mohly být naměřené hodnoty zavádějící, proto nejsou uvedeny. Nakonec bylo aplikováno IgA2 (Obr. 25). Zde bylo pracováno s koncentracemi 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml a 1 µg/ml. V případě IgA2 nebylo detekováno téměř žádné obsazení ligandu, přičemž hodnoty po disociaci byly téměř u všech koncentracích nulové, u některých vyšších koncentrací byly hladiny dokonce nižší než u menších koncentrací. Z toho vyplývá, že signál těchto IgA2 mohl být pod mezí detekce. Z výsledných hodnot signálů všech analyzovaných

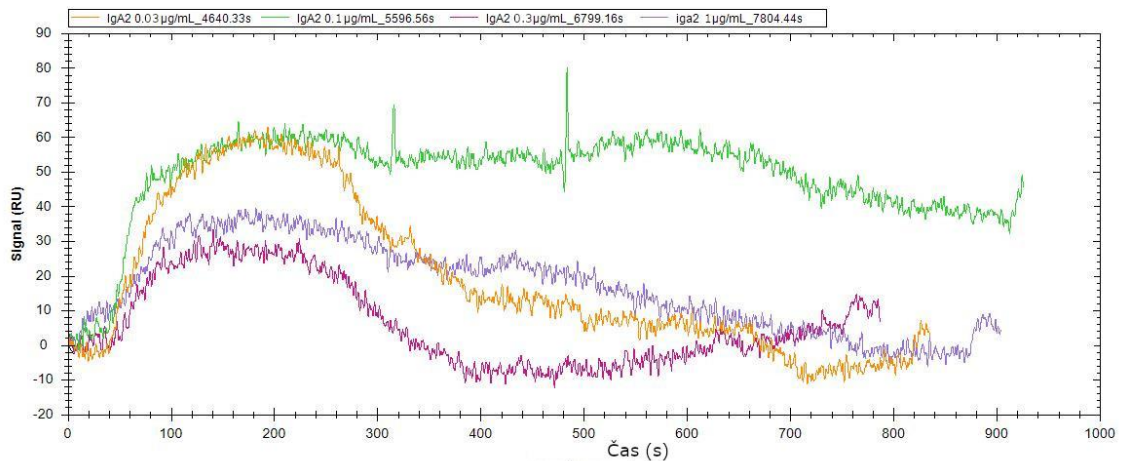
protilátek bylo vypočítáno procentuální skóre vazby na ligand, přičemž jako hodnota 100 % byl brán signál navázaného ligandu – 2550 RU (Tab. 11).



Obr. 23: SPR senzogram znázorňující interakci dg-IgA1 s 1123 IgG autoproti látku. Dg-IgA1 byl aplikován v koncentracích 0,01 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml a 1 µg/ml. Ve výsledném grafu znázorněn nárůst a pokles signálu analyzovaných vzorků v čase.



Obr. 24: SPR senzogram znázorňující vazbu dg-IgA1 na 1123 IgG autoproti látku. Ndg-IgA1 byl aplikován v koncentracích 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml a 1 µg/ml. Ve výsledném grafu znázorněn nárůst a pokles signálu analyzovaných vzorků v čase.

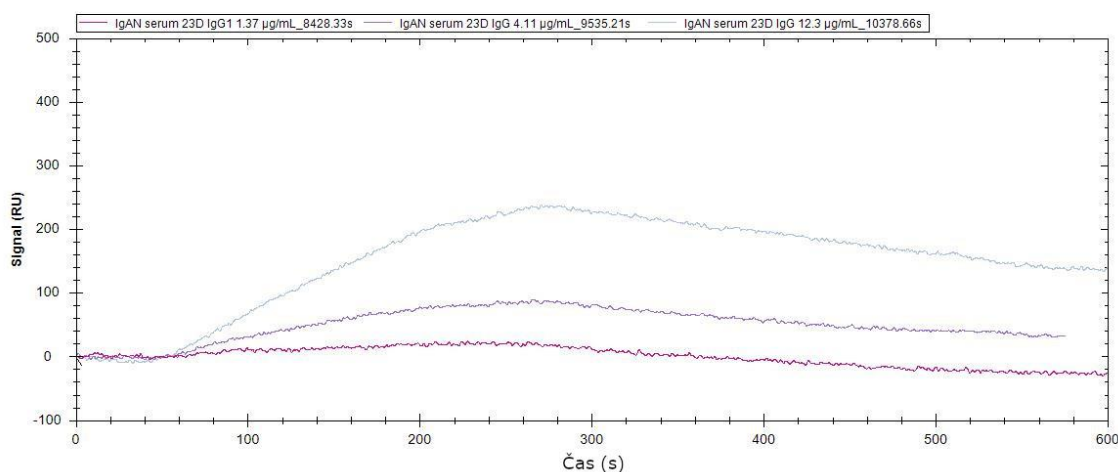


Obr. 25: SPR senzogram znázorňující vazbu IgA2 na 1123 IgG autoprotilátku. IgA2 byl aplikován v koncentracích 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml a 1 µg/ml. Ve výsledném grafu znázorněn nárůst a pokles signálu analyzovaných vzorků v čase.

Tab. 11: Procentuální obsazení ligandu

Vzorek	Koncentrace [µg/ml]	Signál _{max} [RU]	Signál po disociaci [RU]	Obsazení ligandu [%]
dg-IgA1	0,01	-	-	-
	0,03	183	85	7,17
	0,1	205	86	8,04
	0,3	215	100	8,43
	1	240	70	9,41
ndg-IgA1	0,03	179	55	7,02
	0,1	185	75	7,25
	1	208	80	8,26
IgA2	0,03	60	0	2,35
	0,1	61	42	2,39
	0,3	31	0	1,22
	1	38	0	1,49

Následně byla analyzována interakce imobilizované autoprotilátky s gd-IgA1 v séru. Bylo vybráno sérum, u kterého byly naměřeny vysoké hodnoty gd-IgA1 metodou ELISA. Sérum bylo naředěno ve 200 μ l blokovacího pufru v poměrech 1:2430, 1:7290 a 1:21870, o koncentracích 1,37 μ g/ml, 4,11 μ g/ml a 12,3 μ g/ml, vztaženo k celkovému sérovému IgG (Obr. 26). Poté bylo vypočítáno procentuální obsazení ligandu analytem (Tab. 12).



Obr. 26: SPR senzogram znázorňující vazbu gd-IgA1 v séru na 1123 IgG autoprotilátka. Sérum bylo aplikováno v koncentracích vztažených k sérovému IgG 1,37 μ g/ml, 4,11 μ g/ml a 12,3. Ve výsledném grafu znázorněn nárůst a pokles signálu analyzovaných vzorků v čase.

Tab. 12: Procentuální obsazení ligandu

Koncentrace IgG [μ g/ml]	Signál _{max} [RU]	Signál po disociaci [RU]	Obsazení ligandu [%]
1,37	10	0	0,39
4,11	95	60	3,73
12,3	230	165	9,02

5 DISKUZE

IgA nefropatie je renální onemocnění, které charakterizuje tvorba cirkulujících imunitních komplexů, jenž se následně ukládají v mesangiálních depozitech a spouští proliferaci mesangiálních buněk, nadprodukcii buněčné matrix a tvorbu zánětlivých faktorů (D'Amico, 2000). Tyto imunitní komplexy jsou tvořené galaktosově deficientním IgA1 a IgG autoprotiilátkou rozpoznávající gd-IgA1 jako antigen. Hladina imunitních komplexů může být různá při různých stádiích tohoto onemocnění, avšak horší klinický stav je převážně spojen s vyššími hladinami cirkulujících imunitních komplexů (Berthoux, 2013).

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium interakce mezi gd-IgA1 a rekombinantní monoklonální IgG autoprotiilátkou označenou 1123, jejíž sekvence byla získána od pacienta s IgA nefropatií. Bylo zjištěno, že mezi IgA1 degalaktosylovaným pomocí restričních enzymů sialidasy A a β -1,3-D galaktosidasy a vyprodukovanou 1123 IgG autoprotiilátkou dochází k *de novo* tvorbě imunitních komplexů. To souvisí s hypotézou, která byla experimentálně ověřena na myším modelu IgA nefropatie, že gd-IgA1 je rozpoznáváno autoprotiilátkami IgG za tvorby imunitních komplexů (Suzuki, 2009; Moldoveanu, 2021).

Kromě vlastní interakce mezi samotnou autoprotiilátkou a degalaktosylovaným IgA1 byla také prošetřena séra pacientů vykazujících onemocnění IgAN na přítomnost gd-IgA1 a IgG autoprotiilátky. S využitím 1123 autoprotiilátky byly detekovány signifikantně zvýšené hladiny gd-IgA1 v sérech pacientů s IgAN v porovnání se séry zdravých kontrol. Se stejnými séry bylo provedeno také měření zvýšených hladin gd-IgA1 pomocí lektinů *Helix pomatia* a *Helix aspersa agglutinin*, které jsou schopny rozpoznávat galaktosově-deficientní oblast IgA1 (Moldoveanu, 2007). Toto měření potvrdilo, že ve vybraných sérech se gd-IgA1 ve zvýšených koncentracích vyskytuje, což je ve shodě s dříve publikovanými výsledky (Tomana, 1999). Pro detekci přítomnosti autoprotiilátky v séru byl použit dg-IgA1, který by autoprotiilátka měla rozpoznávat. Pro detekci byla zvolena stejná pacientská séra a opět byla pozorována signifikantně zvýšená hladina 1123 autoprotiilátky IgG v porovnání se séry zdravých kontrol, což opět potvrzuje dřívější výsledky (Suzuki, 2009).

Tato diplomová práce byla prováděna za použití enzymově degalaktosylovaného IgA1. Je tedy možné předpokládat, že všechny molekuly IgA1 byly degalaktosylovány stejně. Galaktosová deficiencie u IgA1 však reálně není u všech molekul stejná.

V pantové oblasti IgA1 se nachází šest různých *O*-glykosylačních míst, a to na Thr²²³, Thr²²⁸, Ser²³⁰, Ser²³², Thr²³³ a Thr²³⁶. Na ty je následně posttranslačně vázán GalNAc a další sacharidové jednotky (Mattu, 1998; Ohyama, 2020). V této diplomové práci byly detekovány zvýšené hladiny gd-IgA1 v sérech pacientů s IgAN pomocí GalNAc specifických lektinů a IgG autoprotilátky. Vzhledem k mnohakové povaze *O*-glykosylačního procesu však vykazují *O*-glykoformy v pantové oblasti IgA1 širokou heterogenitu. Autoprotilátky IgG u IgA nefropatie však pravděpodobně rozpoznávají jako antigen pouze některé tyto epitopy. Tudíž je možné naměřit zvýšené hladiny gd-IgA1 i v sérech zdravých kontrol, které však nebudou rozpoznávány jako antigenní (Ohyama, 2020). V současné době není ještě zcela objasněno, které *O*-glykoformy IgA1 představují autoantigen u IgA nefropatie a jsou rozpoznávány autoprotilátkami za vzniku imunitních komplexů. Bude tudíž potřebná další charakterizace všech možných *O*-glykoforem IgA1 (Ohyama, 2021).

Z důvodu neznalosti přesné *O*-glykoformy IgA1 působící jako autoantigen mohlo také dojít k podobnému navázání dg-IgA1 a ndg-IgA1 na ligand, kterým byla 1123 IgG autoprotilátka. Ačkoliv drobné rozdíly mezi těmito vzorky byly, očekávali bychom, že daná autoprotilátka bude zachycovat signifikantně více degalaktosylované molekuly a nedegalaktosylované budou z čipu oddisociovávat rychleji. Naproti tomu IgA2 nebyla na čipu zachycena téměř vůbec.

Výsledky z této studie nabydou v uplatnění při dalším výzkumu, který je zaměřen na možnosti kauzální léčby IgAN. Tato léčba má několik různých cest, kterými může směřovat. Jednou z možností je zaměření na buňky tvořící gd-IgA1 a blokáce její tvorby hned na počátku. Dalším způsobem je zmenšení velikosti cirkulujících imunitních komplexů použitím fragmentů protilátek. Následující přístupy se zaměřují na imunitní komplexy poté, co dojde k vytvoření mesangiálních depozit. Zde je možnost inhibice aktivace mesangiálních buněk či štěpení již uložených imunitních komplexů (Raška, 2016). Výsledky z této studie budou v dalším výzkumu použity pro výzkum malých rekombinantních inhibitorů imunitních komplexů.

6 ZÁVĚR

V první části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma IgA nefropatie, molekulární mechanismy vzniku s důrazem na vliv imunitních komplexů, jejich tvorba a interakce.

V praktické části bylo vytvořeno degalaktosylované polymerní IgA1 a také byla vytvořena 1123 IgG autoprotilátka. Efektivita degalaktosylace byla ověřena metodou ELISA, úspěšná tvorba autoprotilátky byla ověřena metodou Western blot. Následně byly *de novo* vytvořeny imunitní komplexy tvořené dg-IgA1 a 1123 IgG autoprotilátkou. Detekce těchto imunitních komplexů proběhla taktéž metodou ELISA. Poté byla provedena detekce gd-IgA1 v sérech pacientů trpících IgAN za pomoci vytvořené autoprotilátky a také použitím lektinu *Helix pomatia* metodou ELISA. Následně byla detekována přítomnost autoprotilátky v sérech pacientů trpících IgAN pomocí dg-IgA1 metodou ELISA. Celkem bylo takto vyšetřeno 10 sér. Poté byla z těchto sér vybrána 2, u kterých byla prokázána velká tvorba imunitních komplexů a s těmito séry byla provedena lektinová kompetiční imunoesej, při které byla dokazována specifická vazba 1123 IgG autoprotilátky na gd-IgA1 v oblasti rozpoznávané lektiny.

Následně byla změřena afinita imunitních komplexů tvořených 1123 IgG autoprotilátkou a dg-IgA1 pomocí metody SPR. Dále bylo vybráno jedno patientské sérum, u kterého byla také změřena afinita mezi gd-IgA1 a připravenou 1123 IgG autoprotilátkou pomocí metody SPR. Data byla následně statisticky zpracována. Výsledky této práce poslouží k výzkumu inhibitorů imunitních komplexů, což je jedna z možností kauzální terapie IgAN.

7 Citovaná literatura

- BERTHOUX, Francois, Hitoshi SUZUKI, Lise THIBAUDIN et al., 2013. Autoantibodies Targeting Galactose-Deficient IgA1 Associate with Progression of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. **23**(9), 1579-1587. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2012010053
- BOYD, Joanna, Chee CHEUNG, Karen MOLYNEUX, John FEEHALLY a Jonathan BARRATT, 2012. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney International*. **81**(9), 833-843. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2011.501
- BREEDVELD, Annelot a Marjolein VAN EGMOND, 2019. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Frontiers in Immunology* [online]. **10** [cit. 2021-12-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.00553
- BRODSKY, Sergey, Anjali SATOSKAR, Jun CHEN et al., 2009. Acute Kidney Injury During Warfarin Therapy Associated With Obstructive Tubular Red Blood Cell Casts: A Report of 9 Cases. *American Journal of Kidney Diseases* [online]. **54**(6), 1121-1126 [cit. 2021-12-07]. ISSN 02726386. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2009.04.024
- COPPO, Rosanna, John FEEHALLY a Richard J. GLASSOCK, 2010. IgA nephropathy at two score and one. *Kidney International*. **77**(3), 181-186. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2009.427
- COPPO, Rosanna, John FEEHALLY a Richard GLASSOCK, 2010. IgA nephropathy at two score and one. *Kidney International* [online]. **77**(3), 181-186 [cit. 2021-12-20]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2009.427
- COPPO, Rosanna a Christophe MARIAT, 2020. Systemic corticosteroids and mucosal-associated lymphoid tissue-targeted therapy in immunoglobulin A nephropathy: insight from the NEFIGAN study. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. **35**(8), 1291-1294 [cit. 2022-01-05]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfz249
- COPPO, Rosanna, Licia PERUZZI, Alessandro AMORE, Antonio PICCOLI, Pierre COCHAT, Rosario STONE, Martin KIRSCHSTEIN a Tommy LINNÉ, 2007. IgACE: A Placebo-Controlled, Randomized Trial of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Children and Young People with IgA Nephropathy and Moderate Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*. **18**(6), 1880-1888. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2006040347
- COPPO, Rosanna, Stéphan TROYANOV, Shubha BELLUR et al., 2014. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney International* [online]. **86**(4), 828-836 [cit. 2022-01-04]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2014.63
- CRIVIANU-GAITA, Victor a Michael THOMPSON, 2015. Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. **70**, 167-180 [cit. 2022-01-09]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.03.032
- Crosslinking Reagents Handbook*, 2012. 1. U.S.: Thermo Fisher Scientific Inc. ISBN 1602163.
- D'AMICO, Giuseppe, 2000. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: Role of clinical and histological prognostic factors. *American Journal of Kidney Diseases*. **36**(2), 227-237. ISSN 02726386. Dostupné z: doi:10.1053/ajkd.2000.8966
- DROZD, Marcin, Sylwia KAROŃ a Elżbieta MALINOWSKA, 2021. Recent Advancements in Receptor Layer Engineering for Applications in SPR-Based Immunodiagnostics. *Sensors* [online]. **21**(11) [cit. 2022-01-09]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21113781
- EITNER, F. a J. FLOEGE, 2008. Bacterial protease for the treatment of IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **23**(7), 2173-2175. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfn155

- FALKOWSKI, Pawel, Zenon LUKASZEWSKI a Ewa GORODKIEWICZ, 2021. Potential of surface plasmon resonance biosensors in cancer detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **194** [cit. 2022-01-09]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113802
- GALE, Daniel, Karen MOLYNEUX, David WIMBURY et al., 2017. Galactosylation of IgA1 Is Associated with Common Variation in C1GALT1. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **28**(7), 2158-2166 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2016091043
- GLASSOCK, Richard J, 2011. The pathogenesis of IgA nephropathy. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* [online]. **20**(2), 153-160 [cit. 2021-12-20]. ISSN 1062-4821. Dostupné z: doi:10.1097/MNH.0b013e3283436f5c
- GUTIÉRREZ, Eduardo, Fernando CARVACA-FONTÁN, Leonella LUZARDO, Enrique MORALES, Marina ALONSO a Manuel PRAGA, 2020. A Personalized Update on IgA Nephropathy: A New Vision and New Future Challenges. *Nephron* [online]. **144**(11), 555-571 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1660-8151. Dostupné z: doi:10.1159/000509997
- GUTIÉRREZ, Eduardo, Esther GONZÁLEZ, Eduardo HERNÁNDEZ, Enrique MORALES, M. MARTÍNEZ, Gabriel USERA a Manuel PRAGA, 2006. Factors That Determine an Incomplete Recovery of Renal Function in Macrohematuria-Induced Acute Renal Failure of IgA Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **2**(1), 51-57 [cit. 2021-12-07]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.02670706
- GUTIÉRREZ, Eduardo, Manuel PRAGA, Francisco RIVERA, Angel SEVILLANO, Claudia YUSTE, Marian GOICOECHEA a Juan LÓPEZ-GÓMEZ, 2018. Changes in the clinical presentation of immunoglobulin A nephropathy: data from the Spanish Registry of Glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. **33**(3), 472-477 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfx058
- GUTIÉRREZ, Eduardo, Isabel ZAMORA, José BALLARÍN et al., 2012. Long-Term Outcomes of IgA Nephropathy Presenting with Minimal or No Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **23**(10), 1753-1760 [cit. 2021-12-07]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2012010063
- HAN, Lijuan, Xiaodong FANG, Yongcheng HE a Xiong RUAN, 2016. ISN Forefronts Symposium 2015: IgA Nephropathy, the Gut Microbiota, and Gut-Kidney Crosstalk. *Kidney International Reports*. **1**(3), 189-196. ISSN 24680249. Dostupné z: doi:10.1016/j.ekir.2016.08.002
- HEINEKE, Marieke, Aranka BALLERING, Agnès JAMIN, Sanae BEN MKADDEM, Renato MONTEIRO a Marjolein VAN EGMOND, 2017. New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura). *Autoimmunity Reviews* [online]. **16**(12), 1246-1253 [cit. 2021-12-06]. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2017.10.009
- HUANG, Pei, Dan SHU, Zhen SU, Sheng LUO, Fei XU a Fan LIN, 2019. Association between lifestyle, gender and risk for developing end-stage renal failure in IgA nephropathy: a case-control study within 10 years. *Renal Failure*. **41**(1), 914-920. ISSN 0886-022X. Dostupné z: doi:10.1080/0886022X.2019.1635029
- KIM, Min, John MCDAID, Stephen MCADOO, Jonathan BARRATT, Karen MOLYNEUX, Esteban MASUDA, Charles PUSEY a Frederick TAM, 2012. Spleen Tyrosine Kinase Is Important in the Production of Proinflammatory Cytokines and Cell Proliferation in Human Mesangial Cells following Stimulation with IgA1 Isolated from IgA Nephropathy Patients. *The Journal of Immunology*. **189**(7), 3751-3758. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1102603
- KIRYLUK, Krzysztof, Yifu LI, Zina MOLDOVEANU et al., 2017. GWAS for serum galactose-deficient IgA1 implicates critical genes of the O-glycosylation pathway. *PLOS Genetics* [online]. **13**(2) [cit. 2022-03-08]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1006609
- KIRYLUK, Krzysztof, Yifu LI, Francesco SCOLARI et al., 2014. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens.

- Nature Genetics* [online]. **46**(11), 1187-1196 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng.3118
- LAFAYETTE, Richard, Pietro CANETTA, Brad ROVIN et al., 2017. A Randomized, Controlled Trial of Rituximab in IgA Nephropathy with Proteinuria and Renal Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **28**(4), 1306-1313 [cit. 2022-01-05]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2016060640
- LAI, K., J. LEUNG, L. CHAN et al., 2008. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. **24**(1), 62-72 [cit. 2021-12-06]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfn441
- LAMM, Michael, Steven EMANCIPATOR, Janet ROBINSON, Michifumi YAMASHITA, Hisashi FUJIOKA, Jiazhou QIU a Andrew PLAUT, 2008a. Microbial IgA Protease Removes IgA Immune Complexes from Mouse Glomeruli In Vivo: Potential Therapy for IgA Nephropathy. *The American Journal of Pathology* [online]. **172**(1), 31-36 [cit. 2022-01-05]. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.2353/ajpath.2008.070131
- LAMM, Michael, Steven EMANCIPATOR, Janet ROBINSON, Michifumi YAMASHITA, Hisashi FUJIOKA, Jiazhou QIU a Andrew PLAUT, 2008b. Microbial IgA Protease Removes IgA Immune Complexes from Mouse Glomeruli In Vivo: Potential Therapy for IgA Nephropathy. *The American Journal of Pathology* [online]. **172**(1), 31-36 [cit. 2022-01-05]. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.2353/ajpath.2008.070131
- LEVINSKY, RolandJ. a T. MARTIN BARRATT, 1979. IgA IMMUNE COMPLEXES IN HENOCHE-SCHÖNLEIN PURPURA. *The Lancet* [online]. **314**(8152), 1100-1103 [cit. 2021-12-20]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(79)92505-4
- LI, Ming, Jia-Nee FOO, Jin-Quan WANG et al., 2015. Identification of new susceptibility loci for IgA nephropathy in Han Chinese. *Nature Communications*. **6**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8270
- LUFT, Friedrich C., 2017. Mesangial renal disease, oxygen sensing, and prolyl hydroxylase. *Journal of Molecular Medicine*. **95**(3), 235-237. ISSN 0946-2716. Dostupné z: doi:10.1007/s00109-017-1514-8
- LV, Jicheng, Hong ZHANG, Muh WONG et al., 2017. Effect of Oral Methylprednisolone on Clinical Outcomes in Patients With IgA Nephropathy. *JAMA* [online]. **318**(5) [cit. 2022-01-04]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2017.9362
- MAKITA, Yuko, Hitoshi SUZUKI, Toshiki KANO, Akiko TAKAHATA, Bruce JULIAN, Jan NOVAK a Yusuke SUZUKI, 2020. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy. *Kidney International* [online]. **97**(2), 340-349 [cit. 2021-12-06]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1016/j.kint.2019.08.022
- MANNO, C., D. TORRES, M. ROSSINI, F. PESCE a F. SCHENA, 2009. Randomized controlled clinical trial of corticosteroids plus ACE-inhibitors with long-term follow-up in proteinuric IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. **24**(12), 3694-3701 [cit. 2022-01-04]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfp356
- MARIANI, Stefano a Maria MINUNNI, 2014. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **406**(9-10), 2303-2323 [cit. 2022-01-09]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-014-7647-5
- MATTU, Taj S., Richard J. PLEASS, Antony C. WILLIS et al., 1998. The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N -Glycosylation on Fcα Receptor Interactions. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(4), 2260-2272. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.4.2260
- MESTECKY, Jiri, Zina MOLDOVEANU, Phillip SMITH, Zdenek HEL a Rashada ALEXANDER, 2009. Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *Journal of Reproductive Immunology* [online]. **83**(1-2), 196-200 [cit. 2021-12-20]. ISSN 01650378. Dostupné z: doi:10.1016/j.jri.2009.07.005
- MOLDOVEANU, Z., R.J. WYATT, J.Y. LEE et al., 2007. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney International* [online]. **71**(11), 1148-1154 [cit. 2021-12-06]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ki.5002185

- MOLDOVEANU, Zina, Hitoshi SUZUKI, Colin REILY et al., 2021. Experimental evidence of pathogenic role of IgG autoantibodies in IgA nephropathy. *Journal of Autoimmunity*. **118**. ISSN 08968411. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2021.102593
- MOORE, Jennifer, Rose KULHAVY, Milan TOMANA et al., 2007. Reactivities of N-acetylgalactosamine-specific lectins with human IgA1 proteins. *Molecular Immunology*. **44**(10), 2598-2604. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2006.12.011
- MUTO, Masahiro, Benoit MANFROI, Hitoshi SUZUKI et al., 2017. Toll-Like Receptor 9 Stimulation Induces Aberrant Expression of a Proliferation-Inducing Ligand by Tonsillar Germinal Center B Cells in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **28**(4), 1227-1238 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2016050496
- NGUYEN, Hoang, Jeho PARK, Sebyung KANG a Moonil KIM, 2015. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* [online]. **15**(5), 10481-10510 [cit. 2022-01-06]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s150510481
- NOVAK, Jan, Jonathan BARRATT, Bruce JULIAN a Matthew RENFROW, 2018. Aberrant Glycosylation of the IgA1 Molecule in IgA Nephropathy. *Seminars in Nephrology* [online]. **38**(5), 461-476 [cit. 2022-03-08]. ISSN 02709295. Dostupné z: doi:10.1016/j.semnephrol.2018.05.016
- NOVAK, Jan, Zina MOLDOVEANU, Bruce JULIAN et al., 2011. Aberrant Glycosylation of IgA1 and Anti-Glycan Antibodies in IgA Nephropathy: Role of Mucosal Immune System. *Recent Advances in Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways*. Basel: KARGER, 60-63. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. ISBN 978-3-8055-9723-4. Dostupné z: doi:10.1159/000324607
- NOVAK, Jan, Zina MOLDOVEANU, Matthew RENFROW et al., 2007. IgA Nephropathy and Henoch-Schoenlein Purpura Nephritis: Aberrant Glycosylation of IgA1, Formation of IgA1-Containing Immune Complexes, and Activation of Mesangial Cells. TOMINO, Y., ed., Y. TOMINO. *IgA Nephropathy Today* [online]. Basel: KARGER, s. 134-138 [cit. 2021-12-20]. *Contributions to Nephrology*. ISBN 978-3-8055-8286-5. Dostupné z: doi:10.1159/000102455
- NOVAK, Jan, Dana RIZK, Kazuo TAKAHASHI et al., 2015. New Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Kidney Diseases*. **1**(1), 8-18. ISSN 2296-9381. Dostupné z: doi:10.1159/000382134
- NOVAK, Jan, Milan TOMANA, Rhubell BROWN et al., 2005. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney International* [online]. **67**(2), 504-513 [cit. 2021-12-20]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1111/j.1523-1755.2005.67107.x
- NOVAK, Jan, Huong VU, Lea NOVAK, Bruce JULIAN, Jiri MESTECKY a Milan TOMANA, 2002. Interactions of human mesangial cells with IgA and IgA-containing immune complexes1. *Kidney International*. **62**(2), 465-475. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00477.x
- OHYAMA, Yukako, Matthew B. RENFROW, Jan NOVAK a Kazuo TAKAHASHI, 2021. Aberrantly Glycosylated IgA1 in IgA Nephropathy: What We Know and What We Don't Know. *Journal of Clinical Medicine*. **10**(16). ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10163467
- OHYAMA, Yukako, Hisateru YAMAGUCHI, Kazuki NAKAJIMA et al., 2020. Analysis of O-glycoforms of the IgA1 hinge region by sequential deglycosylation. *Scientific Reports*. **10**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-57510-z
- PRAGA, Manuel, Eduardo GUTIERREZ, Ester GONZÁLEZ, Enrique MORALES a Eduardo HERNÁNDEZ, 2003. Treatment of IgA Nephropathy with ACE Inhibitors: A Randomized and Controlled Trial. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **14**(6), 1578-1583 [cit. 2022-01-04]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASN.0000068460.37369.DC
- PRAGA, Manuel, Victor GUTIERREZ-MILLET, José NAVAS, Luis RUILOPE, José MORALES, José ALCAZAR, Ignacio BELLO a José RODICIO, 1985. Acute worsening of renal function during episodes of macroscopic hematuria in IgA nephropathy. *Kidney*

- International* [online]. **28**(1), 69-74 [cit. 2021-12-07]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.1985.120
- QU, Jia-Huan, Annelies DILLEN, Wouter SAEYS, Jeroen LAMMERTYN a Dragana SPASIC, 2020. Advancements in SPR biosensing technology: An overview of recent trends in smart layers design, multiplexing concepts, continuous monitoring and in vivo sensing. *Analytica Chimica Acta* [online]. **1104**, 10-27 [cit. 2022-01-09]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.12.067
- RAŠKA, Milan, Josef ZADRAŽIL, Milada STUCHLOVÁ HORYNOVÁ, Leona RAŠKOVÁ KAFKOVÁ, Alena VRÁBLÍKOVÁ, Karel MATOUŠOVIC, Jan NOVÁK a Jiří MĚSTECKÝ, 2016. IgA nefropatie - otázky, které nastolil výzkum. *Vnitřní lékařství*. **62**(6), 67-77.
- RAUEN, Thomas, Frank EITNER, Christina FITZNER et al., 2015. Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy. *New England Journal of Medicine* [online]. **373**(23), 2225-2236 [cit. 2022-01-04]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1415463
- REILY, Colin, Hiroyuki UEDA, Zhi-Qiang HUANG, Jiri MESTECKY, Bruce JULIAN, Christopher WILLEY a Jan NOVAK, 2014. Cellular Signaling and Production of Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy, an Autoimmune Disease. *Journal of Immunology Research*. **2014**, 1-10. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2014/197548
- SABBAN, Sari, 2011. *Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity Fc receptor*. Sheffield. Thesis. The University of Sheffield.
- SALLUSTIO, Fabio, Claudia CURCI, Vincenzo DI LEO, Anna GALLONE, Francesco PESCE a Loreto GESUALDO, 2020. A New Vision of IgA Nephropathy: The Missing Link. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(1) [cit. 2021-12-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010189
- SERINO, Grazia, Fabio SALLUSTIO, Sharon COX, Francesco PESCE a Francesco SCHENA, 2012. Abnormal miR-148b Expression Promotes Aberrant Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **23**(5), 814-824 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2011060567
- SEVILLANO, Angel, Monserrat DIAZ, Fernando CARAVACA-FONTÁN et al., 2019. IgA Nephropathy in Elderly Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **14**(8), 1183-1192 [cit. 2021-12-07]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.13251118
- SCHASFOORT, Richard B M, ed., 2017. *Handbook of Surface Plasmon Resonance* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry [cit. 2022-01-10]. ISBN 978-1-78262-730-2. Dostupné z: doi:10.1039/9781788010283
- SCHENA, Francesco a Ionut NISTOR, 2018. Epidemiology of IgA Nephropathy: A Global Perspective. *Seminars in Nephrology*. **38**(5), 435-442. ISSN 02709295. Dostupné z: doi:10.1016/j.semnephrol.2018.05.013
- SMITH, Alice, Karen MOLYNEUX, John FEEHALLY a Jonathan BARRATT, 2006. O-Glycosylation of Serum IgA1 Antibodies against Mucosal and Systemic Antigens in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **17**(12), 3520-3528 [cit. 2022-01-05]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2006060658
- STERZEL, R., D. LOVETT, H. STEIN a M. KASHGARIAN, 1982. The mesangium and glomerulonephritis. *Klinische Wochenschrift* [online]. **60**(18), 1077-1094 [cit. 2021-12-20]. ISSN 0023-2173. Dostupné z: doi:10.1007/BF01715838
- STEWART, Tyler J, Kazuo TAKAHASHI, Robert H WHITAKER, Milan RASKA, William J PLACZEK, Jan NOVAK a Matthew B RENFROW, 2019. IgA1 hinge-region clustered glycan fidelity is established early during semi-ordered glycosylation by GalNAc-T2. *Glycobiology*. **29**(7), 543-556. ISSN 1460-2423. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwz007
- STUCHLOVA HORYNOVA, Milada, Alena VRABLIKOVA, Tyler STEWART et al., 2015. N-Acetylgalactosaminide α 2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of

- galactose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **30**(2), 234-238. ISSN 1460-2385. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfu308
- Surface Plasmon Resonance Sensors: A Comprehensive Guide for Scientists. In: *Nicoya* [online]. [cit. 2022-01-09]. Dostupné z: <https://nicoyalife.com/blog/spr-sensor-guide/>
- SU, Yu-wen a Wei WANG, 2018. Surface plasmon resonance sensing: from purified biomolecules to intact cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **410**(17), 3943-3951. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1008-8
- SUZUKI, Hitoshi, Run FAN, Zhixin ZHANG et al., 2009. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *Journal of Clinical Investigation*. **119**(6), 1668-77. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI38468
- SUZUKI, Hitoshi, Krzysztof KIRYLUK, Jan NOVAK et al., 2011a. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **22**(10), 1795-1803 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2011050464
- SUZUKI, Hitoshi, Krzysztof KIRYLUK, Jan NOVAK et al., 2011b. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **22**(10), 1795-1803 [cit. 2022-01-05]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2011050464
- SUZUKI, Hitoshi, Zina MOLDOVEANU, Stacy HALL et al., 2008. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *Journal of Clinical Investigation*. **118**(2), 629-39. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI33189
- SUZUKI, Hitoshi, Milan RASKA, Koshi YAMADA et al., 2014. Cytokines Alter IgA1 O - Glycosylation by Dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(8), 5330-5339. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.512277
- TAMOUZA, Houda, Jonathan CHEMOUNY, Leona RASKOVA KAFKOVA et al., 2012. The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney International*. **82**(12), 1284-1296. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2012.192
- TOMANA, Milan, Karel MATOUSOVIC, Bruce JULIAN, Jiri RADL, Karel KONECNY a Jiri MESTECKY, 1997. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney International*. **52**(2), 509-516. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.1997.361
- TOMANA, Milan, Jan NOVAK, Bruce A. JULIAN, Karel MATOUSOVIC, Karel KONECNY a Jiri MESTECKY, 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *Journal of Clinical Investigation*. **104**(1), 73-81. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI5535
- TOMANA, Milan, Jan NOVAK, Bruce JULIAN, Karel MATOUSOVIC, Karel KONECNY a Jiri MESTECKY, 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **104**(1), 73-81 [cit. 2021-12-20]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI5535
- TORTAJADA, Agustin, Eduardo GUTIERREZ, Matthew PICKERING, Manuel PRAGA TERENCE a Nicholas MEDJERAL-THOMAS, 2019. The role of complement in IgA nephropathy. *Molecular Immunology* [online]. **114**, 123-132 [cit. 2021-12-07]. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2019.07.017
- VAN DEN BELT, Sophie, Hiddo HEERSPINK, Valentina GRACCHI, Dick DE ZEEUW, Elke WÜHL a Franz SCHAEFER, 2018. Early Proteinuria Lowering by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Predicts Renal Survival in Children with CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **29**(8), 2225-2233 [cit. 2022-01-04]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2018010036
- VASHIST, Sandeep, Edmond LAM, Sabahudin HRAPOVIC, Keith MALE a John LUONG, 2014. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chemical Reviews*

- [online]. **114**(21), 11083-11130 [cit. 2022-01-09]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr5000943
- WANG, Li, Xueying LI, Hongchun SHEN, Nan MAO, Honglian WANG, Luke CUI, Yuan CHENG a Junming FAN, 2016. Bacterial IgA protease-mediated degradation of agIgA1 and agIgA1 immune complexes as a potential therapy for IgA Nephropathy. *Scientific Reports* [online]. **6**(1) [cit. 2022-01-05]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep30964
- XIE, Lin-Shen, Jun HUAN, Wei QIN a Jun-Ming FAN, 2010. Brief Communication: Immunoglobulin A1 protease. *Nephrology* [online]. **15**(5), 584-586 [cit. 2022-01-05]. ISSN 13205358. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1797.2010.01278.x
- YAMADA, K., N. KOBAYASHI, T. IKEDA, Y. SUZUKI, T. TSUGE, S. HORIKOSHI, S. EMANCIPATOR a Y. TOMINO, 2010. Down-regulation of core 1 1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **25**(12), 3890-3897. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfq325
- YANAGIHARA, Takeshi, Rhubell BROWN, Stacy HALL et al., 2012. In vitro-generated immune complexes containing galactose-deficient IgA1 stimulate proliferation of mesangial cells. *Results in Immunology*. **2**, 166-172. ISSN 22112839. Dostupné z: doi:10.1016/j.rinim.2012.08.002
- ZENG, Junwei, Rongjuan MI, Yingchun WANG et al., 2015. Promoters of Human Cosmc and T-synthase Genes Are Similar in Structure, Yet Different in Epigenetic Regulation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **290**(31), 19018-19033 [cit. 2022-03-08]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M115.654244

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ACEi inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu
- APRIL proliferaci indukující ligand
- ARB blokátor receptoru angiotensinu II
- ASGP-R asialoglykoproteinový receptor
- BAFF aktivační faktor B-buněk
- C1GalT1 β -1,3-galaktosyltransferasa
- CDR3 komplementaritu určující oblast
- Dg-IgA1 degalaktosylované IgA1
- EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karboxydiimid
- eGFR odhadovaná rychlost glomerulární filtrace
- GalNAc N-acetylgalaktosamin
- GalNAc-T N-acetylgalaktosaminyltransferasa
- GalNAc-T14 N-acetylgalaktosaminyltransferasa 14
- Gd-IgA1 galaktosově deficientní IgA1
- HRP křenová peroxidasa
- IgA Imunoglobulin A
- IgA1 Imunoglobulin A1
- IgA2 Imunoglobulin A2
- IgAN IgA nefropatie
- IgG Imunoglobulin G
- Il-4 Interleukin 4
- Il-6 Interleukin 6
- KDIGO Ledvinové onemocnění: zlepšení globálních výsledků
- MAPK/ERK mitogenem aktivovaná proteinkinasa/extracelulárním systémem regulovaná kinasa
- MiR-148b mikro RNA 148b
- MiRNA mikro RNA
- mRNA mediátorová RNA
- NHS *N*-hydroxysulfosukcinimid
- pGd-IgA1 polymerní galaktosově deficientní IgA
- QT-GWAS kvantitativní genomové asociační studie

- RAAS renin-angiotensin-aldosteronový systém
- RI refraktivní index
- SA kyselina sialová
- scFV jednořetězcový variabilní fragment
- SNP jednonukleotidový polymorfismus
- SPR povrchová plasmonová rezonance
- ST6GalNAc-II ST6 N-Acetylgalaktosaminid α -2,6-sialyltransferasa
- SYK tyrosin-protein kinasa
- TLR receptor podobný genu Toll