

Středoškolská odborná činnost

Korelace míry exprese genu *FCRN*
s účinností přenosu protilátek IgG přes
placentu

Eliška Freiburgerová

Brno 2016

Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 06. Zdravotnictví

Korelace míry exprese genu *FCRN*
s účinností přenosu protilátek IgG přes
placentu

Correlation between the *FCRN* gene
expression and transplacental IgG antibody
transfer

Autor: Eliška Freibbergerová

Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice, příspěvková organizace

Konzultant: RNDr. Barbora Ravčuková

RNDr. Kateřina Cibulková

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma Korelace míry exprese genu *FCRN* s účinností přenosu protilátek IgG přes placentu jsem vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Barbory Ravčukové a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 20. 1. 2016

podpis:



Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Barboře Ravčukové za vedení mé práce a obětavou pomoc po celou dobu trvání výzkumu, školní konzultantce RNDr. Kateřině Cibulkové za věcné připomínky a čas, který práci věnovala, Bc. Janě Dederové za pomoc s experimentální částí mé práce, celému kolektivu genetické laboratoře Centra kardiovaskulární a transplantační chirurgie Brno za poskytnutí zázemí pro uskutečnění mé práce, pracovníkům porodních sálů FN Brno (Obilní trh a Brno-Bohunice) za sběr vzorků, pracovníkům Ústavu klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny v Brně za stanovení koncentrací IgG a v neposlední řadě i Jihomoravskému centru pro mezinárodní mobilitu za finanční podporu.

Anotace

Protilátky tvoří zásadní složku imunity jak dospělých jedinců, tak dětí. Jedinou třídou protilátek, která je v období těhotenství přenášena z krevního oběhu matky do cirkulace plodu a chrání organismus novorozence v prvních měsících života, je imunoglobulin G (IgG).

Transplacentární přenos IgG je zajišťován prostřednictvím neonatálního Fc receptoru (FcRn). FcRn spadá do skupiny proteinů zvaných Fc receptory, jejichž obecnou vlastností je schopnost vazby na konstantní část molekuly imunoglobulinů, fragment Fc. Konkrétně neonatální Fc receptor slouží k vazbě a následnému transportu nebo prodlužování životnosti IgG. V případě přenosu IgG přes placentu má FcRn za úkol navázat se na molekulu IgG a zprostředkovat její transport z mateřské strany svrchní vrstvy buněk placenty na stranu plodovou.

Gen kódující protein FcRn se nachází pouze v některých typech tkání. Expresí genu nazýváme proces, kdy je přepisována sekvence nukleové kyseliny kódující určitý protein, přičemž dochází k produkci tohoto proteinu.

Předpokladem této práce bylo, že míra exprese genu *FCRN* v pupečnickové (plodové) krvi a v placentární tkáni by mohla souviset s účinností transplacentárního přenosu IgG. U 32 perinatálně odebraných vzorků byla zkoumána koncentrace protilátek IgG v mateřské a pupečnickové krvi a míra exprese mRNA genu *FCRN* v pupečnickové krvi a placentární tkáni.

Byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace mezi mírou exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi a gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi, zatímco mezi mírou exprese genu *FCRN* v placentární tkáni a fetomaternálním gradientem IgG žádná souvislost detekována nebyla. Ve výsledcích se objevila také negativní korelace koncentrace IgG v mateřské krvi a gradientu IgG v pupečnickové a mateřské krvi, která by mohla být vysvětlena saturovatelností systému zajišťujícího přenos IgG přes placentu.

Pokud by se výsledky práce potvrdily ve studiích s větším množstvím vzorků, mohlo by se uvažovat o jejich využití ke zvýšení efektivity přenosu IgG přes placentu cestou ovlivnění množství molekuly FcRn v cirkulaci plodu. To by mohlo pomoci zejména nedonošeným novorozencům, kteří během období gestace nezískají dostatečné množství protilátek z krve matky.

Klíčová slova

IgG, FcRn, transplacentární přenos, exprese genu *FcRN*

Annotation

Antibodies form an essential component of immunity both in adults and infants. The only antibody class that can be transferred from maternal circulation to the fetal one during the gestation period to protect newborns for the first months of their life is called immunoglobulin G (IgG).

This materno-fetal IgG transfer is carried out by the neonatal Fc receptor (FcRn). FcRn belongs to a group of proteins called Fc receptors. These proteins are able to bind a constant part of the immunoglobulin molecule, so-called Fc fragment. FcRn is especially important for its ability to bind and transport IgG. When it comes to the transplacental IgG transfer, the main role of FcRn lays in binding and moving an IgG molecule from the maternal to the fetal side of placenta cross the upper layer of placental cells.

Gene encoding the FcRn can only be found in some types of tissue. The process of transcription of a nucleic acid sequence to mRNA and its subsequent translation to protein and production of this protein is called gene and protein expression, respectively.

We worked on the assumption that *FcRN* gene expression level in the umbilical (fetal) blood and placental tissue may be related to the efficiency of the transplacental IgG transfer. We explored *FcRN* gene expression levels in umbilical blood and placental tissue and IgG concentrations in maternal and umbilical blood in 32 samples collected perinatally.

A positive correlation was found between the *FcRN* gene expression in the fetal blood and the efficiency of materno-fetal IgG transfer, while no relation was detected in placental tissue. The results also showed a negative correlation between the maternal IgG concentration and feto-maternal IgG gradient. This may be explained by saturability of the transplacental IgG transfer.

If our results are confirmed by further studies including higher amount of samples, they may possibly be used for implementation of a new method raising the efficiency of materno-fetal IgG transport by increasing FcRn concentration in fetal circulation. This may be useful especially in premature newborns that are not able to acquire sufficient IgG amount from maternal circulation themselves.

Keywords

IgG, FcRn, transplacental transport, *FCRN* gene expression

Seznam zkratek

NK buňky – natural killers

H řetězec – těžký řetězec

řetězec – lehký řetězec

IgG – imunoglobulin G

IgA –imunoglobulin A

IgD – imunoglobulin D

IgM – imunoglobulin M

IgE – imunoglobulin E

FcRn – neonatální Fc receptor

MHC – hlavní histokompatibilní komplex

DNA – deoxyribonukleová kyselina

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

FCRN, FCGRT – gen kódující FcRn

VNTR – variabilní počet tandemových repetice

rcf – relativní centrifugační zrychlení

PCR – polymerázová řetězová reakce

CT – treshold cycle

Obsah

Úvod	14
1 Teorie	16
1.1 Funkce imunitního systému	16
1.2 Dělení imunity	16
1.2.1 Mechanismy nespecifické	16
1.2.2 Mechanismy specifické	17
1.3 Lymfocyty	17
1.3.1 T-lymfocyty	17
1.3.2 B-lymfocyty	17
1.4 Imunoglobuliny	18
1.4.1 Struktura imunoglobulinů	18
1.4.2 Třídy imunoglobulinů	19
1.5 Fc-receptory	20
1.6 Neonatální Fc-receptor	21
1.6.1 Struktura FcRn	21
1.6.2 Vazba FcRn-IgG	21
1.6.3 Funkce FcRn	22
1.7 Mechanismus transplacentárního přenosu IgG	23
1.7.1 Účinnost přenosu jednotlivých typů IgG v průběhu těhotenství	23
1.8 Kódování genetické informace	25
1.8.1 Uspořádání DNA v buněčném jádře	26

1.8.2	Gen	27
1.8.3	Transkripce a translace	27
1.8.4	Polymorfismus	28
1.9	Gen <i>FCRN</i>	28
1.9.1	Polymorfismy genu <i>FCRN</i>	29
2	Cíle práce	30
3	Použité metody a materiál	31
3.1	Izolace RNA	31
3.2	Reverzní transkripce	32
3.3	Real-time PCR	32
3.4	Nefelometrie	34
3.5	Práce se vzorky	35
4	Výsledky	36
5	Diskuze	45
	Seznam použité literatury	49
	Seznam obrázků	52
	Seznam tabulek	54
	Přílohy	56
	Zpracování výsledků Real-Time PCR	56

Úvod

Lidské tělo je denně napadáno velkým množstvím nebezpečných látek z okolí. Obecně známým faktem je, že pro obranu organismu před škodlivinami je zásadně důležitý plně funkční imunitní systém. Tato skutečnost neplatí pouze pro dospělé jedince, ale snad v ještě větší míře pro děti, zejména novorozence. Ale jakým mechanismem je tělo schopno zabezpečit novorozenci tuto ochranu?

Významnou složkou imunity dítěte v prvních měsících života jsou protilátky získané v období těhotenství od matky. V tomto směru má jedna ze tříd protilátek výsadní pozici - jedná se o imunoglobulin G (IgG). Stejně jako ostatní protilátky, také imunoglobulin G zprostředkovává likvidaci nebezpečných struktur, které ohrožují stálost prostředí lidského těla. IgG je ovšem jedinou třídou protilátek, které jsou přenášeny v období těhotenství přes placentu z mateřské krve do oběhu plodu.

Transport IgG přes placentu má také svého nezbytného prostředníka, neonatální Fc receptor. Fc receptory obecně jsou specifické proteiny, které vážou molekuly protilátek, přenáší je a stimulují imunitní pochody. Neonatální Fc receptor, FcRn, má na starosti prodlužování životnosti molekul IgG a jejich transport. Klíčovou roli hraje také ve zmíněném transplacentárním přenosu IgG, kde zajišťuje transport protilátek z mateřské krve skrz plodovou část placenty do oběhu potomka. FcRn společně s molekulou IgG prostupuje svrchní vrstvu buněk placenty ve váčku zvaném endozom. Prostředí endozomu je mírně okyselené, což je podmínkou vytvoření vazby FcRn-IgG. Endozom se dostává zpět do prostředí o fyziologickém pH až na opačné straně buňky, kde je molekula IgG uvolněna do oběhu plodu, zatímco FcRn se může vrátit ke straně mateřské a cyklus opakovat.

Neonatální Fc receptor je produkován pouze buňkami některých tkání, mezi něž patří právě placentární tkáň nebo pupečnicková krev. V těchto buňkách se nachází gen kódující strukturu FcRn. Informace o struktuře FcRn nese primárně deoxyribonukleová kyselina (DNA), která se při produkci proteinu nejprve přepisuje do kyseliny ribonukleové (RNA), kyselina ribonukleová je již překládána do proteinu, jenž po úpravách nabude finální podoby neonatálního Fc receptoru. Nabízí se proto otázka, zda existuje souvislost mezi mírou exprese genu *FcRN* a účinností přenosu protilátek IgG z matky na potomka. Je možné, že hladina RNA v pupečnickové krvi a placentární tkáni ovlivňuje účinnost přenosu protilátek?

1 Teorie

1.1 Funkce imunitního systému

Imunitní systém je jedním ze základních mechanismů pro udržování homeostázy¹ organismu. Podstatou jeho funkce je rozpoznávání škodlivých látek a reakce na ně. Škodliviny mohou pocházet jak z vnějšího prostředí (exoantigeny), tak z organismu samotného (autoantigeny). Hlavními úlohami imunitního systému jsou obranyschopnost (ochrana organismu před vnějšími škodlivinami), autotolerance (rozpoznání vlastních tkání a tolerance vůči nim) a imunitní dohled (rozpoznání vnitřních škodlivin a průběžné odstraňování starých, poškozených nebo mutovaných buněk).[1]

1.2 Dělení imunity

Imunitní mechanismy můžeme rozdělit na mechanismy nespecifické (vrozené) a antigenně specifické (adaptivní). Obě tyto složky hrají u obratlovců důležitou roli a při imunitních reakcích vzájemně spolupracují.[1]

1.2.1 Mechanismy nespecifické

Imunita nespecifická je evolučně starší a je založena na funkci buněk a proteinů, které jsou schopny reagovat na typově různé patogeny na základě jejich společných znaků. Buněčných procesů nespecifické imunity se účastní především fagocytující buňky² a buňky NK³, humorální (látkovou) složku tvoří různé proteiny rozpuštěné především v krevní plazmě a na sliznicích. Mechanismy nespecifické odpovídají na přítomnost antigenu velmi rychle, obvykle v řádech minut, a nemají imunologickou paměť (nejsou ovlivněny předchozím setkáním s určitým antigenem).[1]

¹homeostáza = udržování stálosti vnitřního prostředí organismu

²fagocytující buňky = buňky schopné pohlcovat nebezpečné struktury

³buňky NK - přirozeně cytotoxické buňky, běžně nazývané NK z anglického natural killers

1.2.2 Mechanismy specifické

V případě specifické imunity na antigeny reagují vysoce specifické molekuly, které se aktivují až po setkání s danou cizorodou strukturou. Řadíme sem mechanismy buněčně zprostředkované, jejichž hlavní složkou jsou lymfocyty, a mechanismy humorální, které jsou založeny především na protilátkách, tzv. imunoglobulinech. Kompletní imunitní reakce trvá několik dní až týdnů, ale díky imunologické paměti se při opakovaném setkání s určitým antigenem dokáže aktivovat výrazně rychleji.[1]

1.3 Lymfocyty

Lymfocyty jsou buňky hrající zásadní roli v mechanismech specifické imunity. Řadí se mezi bílé krvinky (leukocyty) a můžeme je dále rozdělit na *T-lymfocyty* a *B-lymfocyty*. [1]

1.3.1 T-lymfocyty

Podstatou funkce T-lymfocytů je rozpoznání antigenů různých mikroorganismů či jiných nebezpečných struktur a následná eliminace těchto mikroorganismů nebo jimi infikovaných buněk. T-lymfocyty pomocí specifických receptorů identifikují fragmenty antigenu na povrchu tzv. buněk prezentujících antigen⁴, čímž vyvolávají řadu dalších imunitních odpovědí. T-lymfocyty můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin - buňky cytotoxické a buňky pomocné. Zatímco cytotoxické T-lymfocyty zajišťují přímo likvidaci cizorodých organismů nebo infikovaných buněk, T-lymfocyty pomocné vylučují proteiny zvané cytokiny, které stimulují aktivitu nejen ostatních lymfocytů, ale také dalších buněk imunitního systému. [2]

1.3.2 B-lymfocyty

B-lymfocyty jsou v lidském těle jedinou skupinou buněk, které jsou schopny produkovat protilátky - imunoglobuliny. B-lymfocyty, stejně jako T-lymfocyty, nejprve rozeznají antigen pomocí receptoru na svém povrchu, čímž spustí kaskádu dalších

⁴buňky prezentující antigen = APCs (antigen presenting cells), buňky, které na svém povrchu vystavují antigeny nebo jejich části; ty mají být rozpoznány dalšími imunitními buňkami a vyvolat imunitní reakci

reakcí. Tyto reakce vedou k diferenciaci⁵ B-lymfocytů na tzv. plazmatické buňky, které produkují velké množství imunoglobulinů schopných vázat (a tím zneškodnit) daný antigen.[2]

1.4 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (protilátky) jsou proteiny, jejichž hlavní funkcí je likvidace antigenů ohrožujících homeostázu. Imunoglobuliny jsou sekretovány B-lymfocyty, většina z nich poté cirkuluje v krevním oběhu, některé další jsou například navázány na sliznicích nebo slouží jako antigenně specifické receptory B-lymfocytů. Protilátka zajišťuje eliminaci antigenu tím způsobem, že se naváže na jeho epitop⁶, čímž antigen neutralizuje, opsonizuje⁷, nebo aktivuje další molekuly imunitního systému, které jsou schopny ho zlikvidovat.[2]

1.4.1 Struktura imunoglobulinů

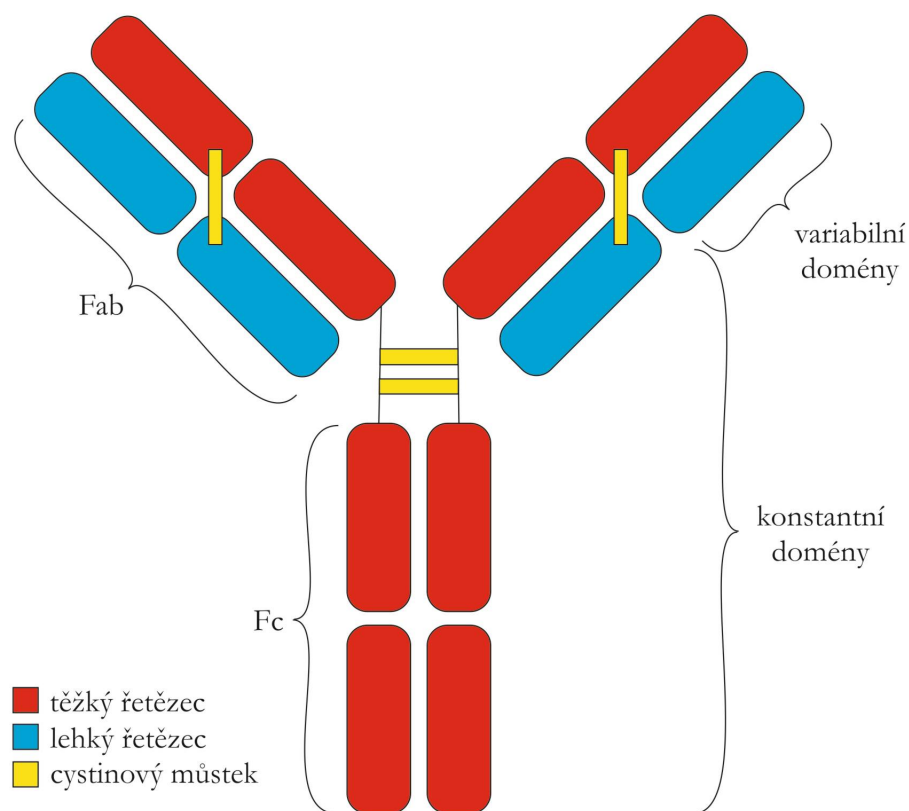
Molekula imunoglobulinu se skládá ze dvou identických těžkých (H) a dvou identických lehkých (L) řetězců (Obr. 1). Těžké řetězce jsou navzájem spojeny cystinovými můstky⁸, na každý z nich je poté dalším cystinovým můstkem navázán řetězec lehký. Každý z těžkých řetězců je tvořen čtyřmi až pěti strukturně podobnými úseky o délce přibližně 110 aminokyselin, lehký řetězec má tyto domény pouze dvě. Oblast lehkého řetězce a k němu navázaných dvou domén řetězce těžkého nazýváme fragment Fab (molekula imunoglobulinu má dva identické fragmenty Fab), spojené domény těžkých řetězců nazýváme fragment Fc. Fragment Fab je oblastí sloužící k vazbě antigenu. Jeho koncové domény mají jak u lehkých, tak u těžkých řetězců variabilní strukturu, čímž protilátky získávají schopnost vázat široké spektrum antigenů. Ostatní domény tohoto fragmentu jsou konstantní. Fragment Fc se skládá pouze z konstantních domén a je ligandem pro specifické molekuly imunitního systému, tzv. Fc-receptory. Místo spojení fragmentů Fc a Fab se nazývá pantová oblast.[1]

⁵diferenciace = rozlišování, získávání specifity

⁶epitop = část antigenu, která je rozpoznávána receptory T lymfocytů a imunoglobuliny

⁷opsonizace = "ochucení" molekuly antigenu pro fagocytující buňky, fagocyty mohou opsonizovaný antigen snáze rozeznat a pohltit

⁸cystinový, také disulfidický můstek = kovalentní vazba dvou atomů síry



Obrázek 1: Struktura molekuly imunoglobulinu

1.4.2 Třídy imunoglobulinů

Imunoglobuliny lze podle typu těžkých řetězců rozdělit do pěti tříd (tzv. izotypů). Molekuly protilátek různých tříd se navzájem liší počtem a strukturou konstantních domén a také počtem a rozložením cystinových můstků. Jednotlivé třídy se nazývají IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Třídy IgA a IgG můžeme dále rozdělit do několika podtříd s drobnými strukturálními odlišnostmi (IgA1-2 a IgG1-4).

Imunoglobulin M se vyskytuje jak v sekretované formě, tak na povrchu B-lymfocytů, kde slouží jako antigenně specifický receptor. Po rozpoznání antigenu je IgM prvním izotypem protilátek, který se začne produkovat. IgM velmi dobře váže sérové proteiny nespecifické imunity (tzv. komplement), které zajišťují lýzu buněk nesoucích antigen.

Imunoglobulin D je zastoupen v séru pouze ve stopovém množství, prakticky veškeré molekuly IgD se nacházejí na povrchu B-lymfocytů, kde (podobně jako IgM) plní funkci antigenně specifických receptorů.

Imunoglobulin G je ze všech izotypů protilátek v séru zastoupen nejhojněji, vyskytuje se také v tkáňovém moku a na povrchu epiteliálních⁹ buněk. Při setkání s antigenem molekuly IgG aktivují komplement nebo jsou rozpoznány Fc-receptory fagocytů, neboť antigen pro fagocyty opsonizují. Fc-receptory se schopností vázat imunoglobuliny se nevyskytují pouze u fagocytů, a IgG se tak uplatňuje v poměrně širokém spektru procesů. IgG můžeme rozdělit do podtříd IgG1-IgG4. Aktivaci komplementu zajišťují nejúčinněji podtřídy IgG1 a IgG3. Molekuly IgG jsou relativně malé a snadno tak pronikají do tkání. V období těhotenství jsou jako jediné přenášeny přes placentu z matky na potomka a zajišťují tak novorozenci důležitou složku obranyschopnosti. Mechanismus přenosu IgG přes placentu bude blíže popsán v následujících kapitolách.

Imunoglobulin A se nachází především v séru a na povrchu sliznic. Jeho funkcí je opsonizace antigenů pro fagocyty, slizniční forma IgA se značně podílí na ochraně před mikroorganismy. Izotyp A můžeme rozdělit na dvě podtřídy - IgA1 a IgA2. Zatímco molekuly IgA2 jsou sekretovány většinou slizničními plazmocyty, molekuly IgA1 jsou přítomny v cirkulaci a pocházejí zejména z kostní dřeně.

Imunoglobulin E je ve velmi malém množství obsažen v séru a v tkáňovém moku¹⁰. Jeho primární funkcí je ochrana organismu před antigeny mnohobuněčných parazitů. Molekuly IgE obvykle zajišťují likvidaci buněk nesoucích antigen aktivací buněčných složek nespecifické imunity.[3]

1.5 Fc-receptory

Fc-receptory jsou specifické molekuly, které jsou schopny vázat Fc fragmenty imunoglobulinů. Podle třídy imunoglobulinů, které jsou jednotlivé Fc-receptory schopny vázat, je můžeme rozdělit na typy $Fc\mu$, $Fc\gamma$, $Fc\alpha$ a $Fc\epsilon$. K jejich expresi dochází na

⁹epitel = jeden ze základních druhů tkáně, často tvoří povrchovou vrstvu buněk kryjících orgány; buňky na sebe těsně přisedají s minimálními mezibuněčnými prostory

¹⁰tkáňový mok (též intersticiální tekutina) = tekutina, která vyplňuje mezibuněčné prostory, tvoří cca 15 % tělesné hmotnosti

leukocytech nebo slizničních buňkách. Fc-receptory jsou zodpovědné především za aktivaci imunologických mechanismů, které v konečném důsledku vedou k likvidaci antigenu. Významnou roli hrají zejména při fagocytóze a endocytóze protilátkami opsonizovaných částic, mohou však působit také jako negativní regulační receptory. Fc-receptory plní také funkci transportní. V této oblasti má specifické postavení neonatální Fc-receptor, FcRn.[1]

1.6 Neonatální Fc-receptor

Ačkoli FcRn řadíme mezi Fc-receptory, vyznačuje se několika strukturními i funkčními odlišnostmi. Neonatálnímu Fc-receptoru je přikládán velký význam především pro jeho jedinečnou schopnost přenášet molekuly imunoglobulinu G přes placentu z matky na potomka, který je tak chráněn před infekcemi v první fázi života, než se začne rozvíjet jeho vlastní imunita. Další důležitou funkcí FcRn je prodlužování poločasu (životnosti) IgG a albuminu¹¹ v séru. FcRn je pravděpodobně odpovědný také za přenos imunokomplexů přes sliznice.[5]

1.6.1 Struktura FcRn

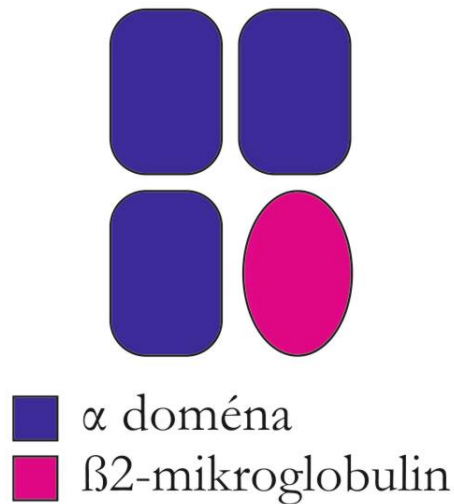
FcRn je glykoprotein, který se svou strukturou výrazně podobá molekulám MHC třídy I (molekuly zodpovědné za vazbu fragmentů degradovaných proteinů nebo antigenů a jejich vystavování pro T-lymfocyty). Od glykoproteinů MHC se však odlišuje svou funkcí a lokací genu, kterým je kódován. Skládá se ze tří domén tvořících tzv. transmembránový řetězec α a β 2-mikroglobulinu (Obr. 2).[4]

1.6.2 Vazba FcRn-IgG

K vazbě mezi molekulami FcRn a IgG nedochází při neutrálním pH (7,4), ale pouze ve slabě kyselém prostředí (pH se pohybuje mezi 6 a 6,5). Pokud je tato podmínka splněna, jedna z α domén Fc receptoru interaguje s Fc fragmentem imunoglobulinu. Na straně Fc receptoru se vazby účastní histidinový pár, na straně IgG se jedná o dva až tři histidiny, isoleucin a tyrosin¹². Na jednu molekulu IgG se obvykle navážou dvě

¹¹albumin = protein podílející se na transportu látek a udržování rovnováhy složek v séru

¹²histidin, isoleucin, tyrosin - aminokyseliny, základní stavební jednotky proteinů



Obrázek 2: Struktura molekuly FcRn

molekuly FcRn. V případě vazby symetrické se každá z molekul FcRn váže na jeden z těžkých řetězců imunoglobulinu, vazba může být i asymetrická, pokud se obě molekuly FcRn vážou na tentýž těžký řetězec.[4]

1.6.3 Funkce FcRn

FcRn je exprimován buňkami různých tkání, a proto se předpokládá, že výše popsaná vazba FcRn-IgG má v lidském těle poměrně široké využití. Jednou z tkání, kde k expresi FcRn dochází, je cévní endotel. Endoteliální buňky internalizují komplex FcRn-IgG, molekuly IgG jsou díky vazbě odlišeny od proteinů určených k degradaci a mohou být uvolněny zpět do krevního oběhu, čímž se výrazně prodlužuje jejich poločas v séru. Produkce FcRn byla zaznamenána také v buňkách střevního epitelu, kde pravděpodobně FcRn plní funkci přenašeče komplexů IgG-antigen z lumenální (vnitřní) strany epitelu k fagocytujícím buňkám. Dále se uvažuje o významu exprese FcRn některými buňkami ledvin (zde by se receptor mohl podílet na filtraci IgG v moči), buňkami epitelu centrální nervové soustavy (zde by potenciální funkcí FcRn mohla být například redukce amyloidního plaku¹³ v oblasti hematoencefalické

¹³amyloidní plak = plak vytvářející se v mozkové tkáni pacientů trpících Alzheimerovou chorobou

bariéry¹⁴) nebo epitelu dýchacích cest, kde by se FcRn mohl podílet na přenosu erythropoetinu (hormonu zodpovědného za tvorbu červených krvinek). Nejvýznamnější a zcela nezpochybnitelnou funkcí neonatálního Fc-receptoru je však již zmíněný transplacentární přenos IgG z mateřského oběhu do cirkulace plodu.[4]

1.7 Mechanismus transplacentárního přenosu IgG

Placentu můžeme rozdělit na mateřskou část a plodovou část. Předěl mezi těmito částmi tvoří tzv. chorion, vnější obal plodu, na jehož povrchu se nacházejí tzv. choriové klky. Zatímco z vnější strany jsou klky omývány mateřskou krví, v kapilárách uvnitř klků cirkuluje krev plodu. Při přenosu IgG přes placentu musí molekula IgG prostoupit přes syncytiotrofoblast, svrchní vrstvu buněk choriových klků. V buňkách syncytiotrofoblastu proto dochází k expresi FcRn, který je zodpovědný za transcytózu¹⁵.

Transcytóza začíná internalizací molekuly IgG z mateřské krve omývajícím choriové klky dovnitř buňky syncytiotrofoblastu. Zde je molekula protilátky uzavřena do váčku zvaného endozom. Následně dochází k okyselení endozomu, čímž je umožněna vazba mezi FcRn a IgG, komplex FcRn-IgG v mírně kyselém endozomu putuje směrem k fetální (plodové) straně syncytiotrofoblastu. Při kontaktu endozomu s prostředím fetálního oběhu dochází ke změně pH na standardní fyziologické, čímž se rozpadá vazba mezi receptorem a protilátkou a molekula IgG je uvolněna do cirkulace plodu. Neonatální receptor se vrací zpět k mateřské straně syncytiotrofoblastu, kde může cyklus opakovat (Obr. 3).[4]

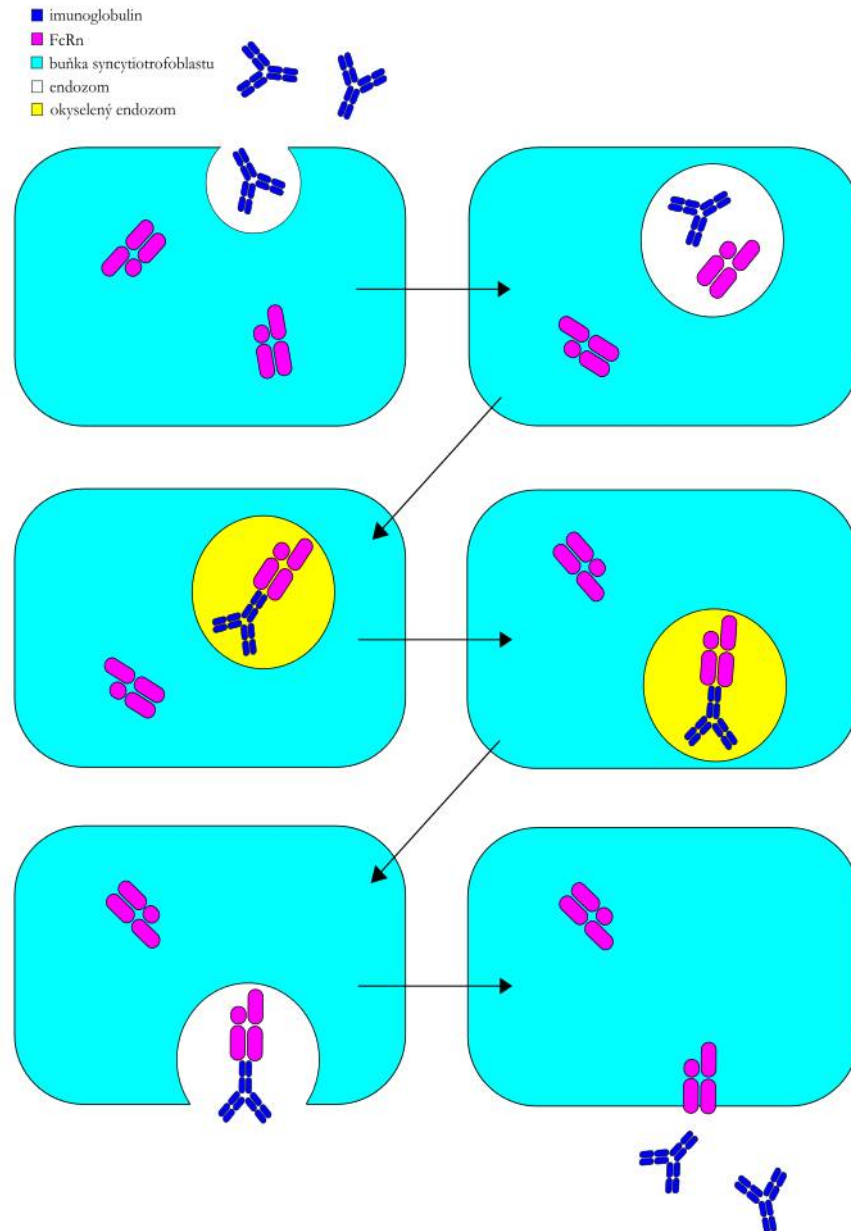
1.7.1 Účinnost přenosu jednotlivých typů IgG v průběhu těhotenství

Transplacentární přenos protilátek IgG začíná přibližně ve 12. týdnu těhotenství, do té doby k němu dochází pouze v minimální míře. Od 13. do 18. týdnu poté účinnost transportu IgG mírně stoupá. Zásadním zlomem je období mezi 22. a 25. týdnem těhotenství, kdy efektivita tohoto procesu prudce roste a měření hladiny protilátek v oběhu plodu a choriových klcích ukazuje výrazně vyšší hodnoty. Nejvíce

¹⁴hematoencefalická bariéra = bariéra tvořící předěl mezi mozkovou tkání a cévním systémem

¹⁵transcytóza = prostoupení molekuly přes vnitřní prostředí buňky protilátek

protilátek je ovšem transportováno v pozdějším období, přibližně mezi 29. a 41. týdnem těhotenství. V závěru těhotenství koncentrace IgG v krvi plodu obvykle lehce překračuje koncentraci protilátek v krvi mateřské. Toto platí především pro subtypy IgG1 a IgG3, které jsou přes placentu přenášeny nejefektivněji. Účinnost přenosu IgG2 je výrazně nižší, subtyp IgG4 je transportován s velmi variabilní efektivitou.[5]



Obrázek 3: Transplacentární přenos IgG

1.8 Kódování genetické informace

Genetická informace organismu je kódována nukleovými kyselinami, které se nacházejí uvnitř buněčných jader. Rozlišujeme kyselinu deoxyribonukleovou (DNA) a ribonukleovou (RNA).

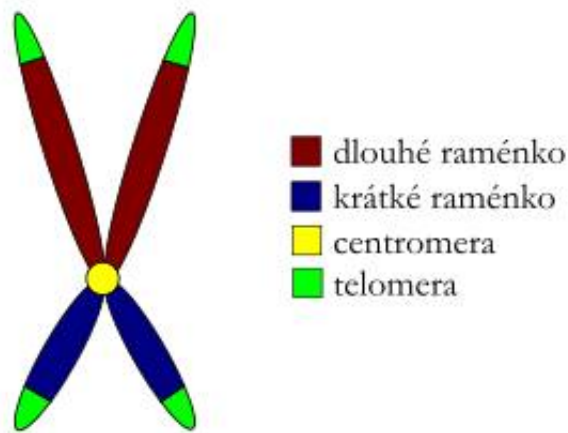
DNA má podobu levotočivé dvoušroubovice. Každý z řetězců šroubovice je tvořen variabilní sekvencí nukleotidů. Jednotlivé nukleotidy se skládají z pětiuhlíkatého cukru, fosfátového zbytku a dusíkaté báze. Dusíkaté báze dělíme podle dusíkatého uhlovodíku, z něhož byly derivovány, na báze purinové (adenin a guanin) a báze pyrimidinové (cytosin a thymin). Nukleotidy jednotlivých řetězců jsou propojeny vodíkovými můstky, přičemž jejich dusíkaté báze musí být navzájem komplementární - páruje se vždy adenin s thyminem a guanin s cytosinem.

RNA je tvořena rovněž sekvencí nukleotidů, na rozdíl od DNA je však pouze jednořetězcová a thymin je nahrazen uracilem. RNA můžeme rozdělit na tři základní typy s odlišnými funkcemi.

- mRNA (messenger, informační RNA) - nese genetickou informaci, kóduje strukturu bílkoviny
- tRNA (transferová RNA) - slouží k přenosu aminokyselin při tvorbě bílkovin - proteosyntéze (viz níže)
- rRNA (ribosomální RNA) - tvoří základní stavební jednotku ribozomů (=buněčné organely, na kterých dochází k proteosyntéze)[17]

1.8.1 Uspořádání DNA v buněčném jádře

Kromě DNA obsahuje buněčné jádro také proteiny histony. Dvoušroubovice DNA se kolem těchto proteinů omotává a společně vytváří tzv. chromatinové vlákno. V interfázi¹⁶ je toto vlákno neuspořádaně smotáno uvnitř jádra a tvoří hmotu zvanou chromatin. V období buněčného dělení se vlákno spiralizuje do tzv. chromozomů (Obr. 4). Chromozom se skládá ze dvou sesterských chromatid a centromery. Každá chromatida je tvořena krátkým a dlouhým raménkem, přičemž centromera se nachází na jejich předělu. Na konci ramének se nacházejí repetitivní sekvence nezbytné pro celistvost chromozomů a replikaci jaderné hmoty - telomery. Lidská somatická buňka obsahuje dvě identické sady po 23 chromozomech, celkem tedy 46 chromozomů, pohlavní buňky (=gamety) mají pouze jednu sadu chromozomů.[17]



Obrázek 4: Chromozom

¹⁶interfáze = období buněčného cyklu, kdy nedochází k buněčnému dělení

1.8.2 Gen

Úsek DNA kódující jeden konkrétní protein nazýváme gen. Gen je tvořen kódujícími oblastmi, tzv. exony, a oblastmi nekódujícími, tzv. introny. Přestože introny zabírají většinu délky genu, jejich význam dosud nebyl zcela objasněn. *Housekeepingovými* nazýváme takové geny, které zajišťují základní funkce buňky a typicky se vyskytují ve všech buňkách organismu.

Konkrétní forma genu se nazývá alela. V lidském těle se každý gen vyskytuje jednou na každé z chromozomových sad, pro každý gen tedy existují dvě alely. Jestliže má jedinec obě alely určitého genu stejné, nazývá se homozygot, pokud jsou alely odlišné, jedná se o heterozygot. Souhrn veškeré genetické informace jedince se označuje jako genotyp, souhrn vnějších znaků jedince představuje fenotyp.[17]

1.8.3 Transkripce a translace

Proces syntézy proteinů začíná *transkripcí* (přepisem) DNA do RNA. Na začátku genu kódujícího daný protein se nachází tzv. promotor, což je sekvence DNA, kterou rozpoznává enzym DNA-dependentní RNA-polymeráza (dále jen RNA-polymeráza). RNA-polymeráza se váže na do oblasti promotoru, dvoušroubovice DNA je poté rozvolněna na jednoduchá vlákna a enzym postupuje podél jednoho z nich (tzv. vlákno pracovní) ve směru 5' - 3'. S pohybem enzymu jsou k nukleotidům vlákna DNA přikládány komplementární RNA nukleotidy a vzniká řetězec mRNA. Na konci daného genu se nachází tzv. terminátor, tedy specifická sekvence DNA, která dává enzymu signál k ukončení transkripce. U eukaryotických buněk poté dochází k tzv. sestřihu, tedy procesu, kdy jsou ze sekvence mRNA vystřiženy nekódující úseky.

Další fází tvorby bílkovin je *translace* (překlad). Jedná se o produkci proteinu tvořeného sekvencí aminokyselin na základě informace uložené v mRNA, přičemž každá aminokyselina je kódována třemi nukleotidy mRNA. Tento systém kódování aminokyselin se nazývá tripletový kód, každá trojice bází (=triplet) mRNA tvoří tzv. kodon. Proces je zahájen iniciační tRNA, která na ribozomech prochází vlákna mRNA (opět od 5' konce ke 3' konci) a hledá specifickou iniciační sekvenci. Jakmile je iniciační sekvence nalezena, aktivizují se další molekuly tRNA. Každá molekula tRNA nese jednu aminokyselinu a obsahuje trojici bází zvanou antikodon, která je

komplementární k příslušné trojici bází mRNA. K řetězci mRNA jsou postupně přikládány molekuly tRNA nesoucí aminokyseliny, mezi kterými vznikají vazby a vytváří se tak souvislý řetězec aminokyselin - polypeptidové vlákno. Translace je ukončena ve chvíli, kdy tRNA narazí na triplet, který nekóduje žádnou aminokyselinu. Pro získání finální podoby proteinu je polypeptidové vlákno často dále upravováno.

Opačným procesem transkripce je *reverzní transkripce*. Její podstatou je zpětný přepis mRNA do DNA. Takto vzniklá DNA je pouze jednořetězcová a nazývá se cDNA (komplementární DNA). Reverzní transkripce je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou. Tento jev je pro organismy mnohem méně běžný než standardní transkripce; využívají jej např. některé druhy virů (retroviry), hojně je uplatňován v laboratořích k vyšetření kvality nebo kvantity exprimované mRNA.[17]

1.8.4 Polymorfismus

Některé geny mohou u jedinců téhož druhu nabývat několika různých podob. Tyto drobné odlišnosti se poté mohou projevit na struktuře a funkci exprimovaného proteinu, a tím také na fenotypu¹⁷. V případě, že se jednotlivé varianty sekvence daného genu objevují u více než 1 % populace, nazýváme tento jev *polymorfismus*.

Jednou z běžných podob polymorfismu je *variabilní počet tandemových repetice* (VNTR). Jedná se o variabilitu počtu opakování určitého úseku DNA.[17]

1.9 Gen *FCRN*

Gen kódující FcRn (*FCGRT*, *FCRN*) se nachází na 19. chromozomu, tedy mimo oblast kódování MHC molekul I. třídy. Jeho délka je přibližně 15,5 kb (15 500 párů bází). Gen obsahuje 7 exonů, tedy kódujících oblastí sekvence DNA.[5]

¹⁷fenotyp = soubor vnějších znaků jedince jedince

1.9.1 Polymorfismy genu *FCRN*

Při zkoumání polymorfismů genu *FCRN* byl zaznamenán polymorfismus typu VNTR promotorové oblasti. Bylo objeveno 5 různých alel (VNTR1–VNTR5, značí počet opakování sekvence promotoru), přičemž nejběžnějšími byly alely VNTR3 a VNTR2. Při následném studiu efektivity transkripce *FcRn* bylo zjištěno, že u alely VNTR3 se gen *FCRN* přepisuje účinněji než u alely VNTR2 [8]. Ačkoli tato teorie nebyla zatím dalšími autory potvrzena, je pravděpodobné, že účinnost transkripce *FCRN* tedy závisí na počtu opakování oblasti promotoru. Na pracovišti školitele nebyla nalezena souvislost mezi polymorfismy genu *FCRN* a fenotypem pacientů s primární poruchou tvorby protilátek ani přenosem protilátek IgG přes placentu [7, 9]. Byla však odhalena souvislost mezi mírou exprese genu *FCRN* a průběhem plicních chorob u pacientů s poruchou imunity, který byl v případě pacientů s nižší mírou exprese genu *FCRN* těžší [9]. Možná korelace míry exprese genu *FCRN* s přenosem IgG přes placentu dosud nebyla zkoumána.

2 Cíle práce

- stanovení korelace mezi mírou exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi a poměrem koncentrace protilátek IgG pupečnickové krvi a mateřské krvi
- stanovení korelace mezi mírou exprese genu *FCRN* v placentární tkáni a poměrem koncentrace protilátek IgG pupečnickové krvi a mateřské krvi

3 Použité metody a materiál

Mezi metody použité v experimentální části práce patří:

1. izolace RNA z vzorků pupečnickové krve a placentární tkáně
2. reverzní transkripce izolované RNA do cDNA
3. kvantifikační metoda Real-Time PCR
4. nefelometrie

3.1 Izolace RNA

Použitý materiál:

- RiboPure RNA Purification Kit, blood, Ambion, Life Technologies
- RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN

RNA byla izolována z 32 vzorků pupečnickové krve a placentární tkáně odebíraných na porodních sálech FN Brno (pracoviště Obilní trh a Brno-Bohunice) po podepsání informovaného souhlasu matkou. Pro uchování RNA ve vzorku a zabránění její degradaci byl použit roztok RNAlater.

Při izolaci RNA z pupečnickové krve jsme nejprve centrifugací 1 min při 16 000 rcf získali usazeninu krvinek a proteinů. Po odstranění supernatantu jsme zajistili lýzu krvinek přidáním 800 μ l Lysis Solution a 50 μ l Sodium Acetate Solution a důkladným protřepáním roztoku. Následně jsme přidali 500 μ l Acid-Phenol:chloroformu a nechali roztok 5 min stát při laboratorní teplotě. Centrifugací 2 min při 16 000 rcf se poté oddělila organická fáze obsahující zbytky buněčných membrán a vodní fáze obsahující RNA. Do oddělené vodní fáze jsme přidali 600 μ l 96 % etanolu. Roztok jsme poté pipetovali do kolonky, na jejíž membráně se při centrifugaci zachytila RNA. Kolonku jsme poté promývali 700 μ l Wash Solution 1 a dvakrát 700 μ l Wash Solution 2/3, jednou jsme centrifugovali prázdnou kolonku pro odstranění zbytků roztoků, které by RNA ředily. Dalším krokem již byla eluce RNA. Na membránu kolonky jsme napipetovali 50 μ l Elution Solution předeřátého na teplotu 75 °C, nechali

působit a centrifugovali 1 min při 16 000 rcf, tento krok jsme zopakovali ještě jednou pro větší výtěžek RNA. Izolovaná RNA byla následně pro zvýšení čistoty ošetřována DNázou, enzymem pro odstranění zbylé DNA. Do roztoku jsme přidali 20X DNase Buffer o objemu 1/20 objemu roztoku a 1 μ l DNase I. Roztok jsme promíchali a inkubovali 30 min při teplotě 37 °C. Poté jsme přidali DNase Inactivation Reagent o objemu 1/5 objemu roztoku. Opět jsme RNA s reagensy promíchali, nechali stát 2 min při laboratorní teplotě a centrifugovali 1 min při 16 000 rcf. Sediment jsme poté odstranili a izolovanou RNA zmrazili v -80 °C. Koncentrace a čistota izolované RNA byla ověřována pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

3.2 Reverzní transkripce

Použitý materiál:

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche

mRNA izolovaná z nasbíraných vzorků byla pro možnost další analýzy přepisována do jednovláknové cDNA. Principem metody je využití enzymu reverzní transkriptázy, který postupuje po vlákně RNA a přikládá k němu komplementární nukleotidy, čímž vytváří řetězec cDNA. Reakce probíhala v přístroji Tprofessional TRIO Thermocycler, Biometra.

Nejprve jsme připravili roztok obsahující 1-5,5 μ l vzorku mRNA (podle koncentrace RNA) doplněný RNase free vodou. Přidali jsme 1 μ l dNTP (Deoxynucleotide Mix) a inkubovali 10 min při 65 °C. Následně jsme roztok doplnili o 2 μ l pufru (Transcriptor RT Reaction Buffer), 0,25 μ l protektoru (Protector RNase Inhibitor) a 0,25 μ l enzymu reverzní transkriptázy (Transcriptor Reverse Transcriptase). Samotná reakce reverzní transkripce probíhala v termických cyklech 10 min – 25 °C, 30 min – 55 °C, 5 min – 85 °C, 10 min – 20 °C. cDNA jsme poté uchovávali při teplotě -20 °C.

3.3 Real-time PCR

Použitý materiál:

- 20X TaqMan Gene Expression Assay Solutions (*FCRN*, *ACTB*, *RPL32*)

- 2X TaqMan Gene Expression Master Mix
- RNase Free Water

Standardní metoda PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je založena na množení (amplifikaci) konkrétního úseku DNA pomocí enzymu DNA polymeráza. Na vlákno DNA se nejprve vážou specifické nukleotidové sekvence zvané primery, které jsou komplementární k určité části sekvence DNA a označují tak oblast sekvence našeho zájmu. Následně v místě primeru na 5' konec vlákna DNA přisedá DNA-polymeráza, které ke čtené sekvenci postupně přikládá komplementární nukleotidy a vytváří tak nový řetězec DNA. Takto enzym postupuje až k primeru na 3' konci vlákna.

Při jednom takovém cyklu se množství DNA v daném objemu zdvojnásobí. Při každém dalším cyklu se amplifikuje také nově syntetizovaná DNA a celkové množství produktu tedy exponenciálně roste.

Metoda *Real-Time PCR* (PCR v reálném čase, kvantitativní PCR) slouží ke kvantifikaci DNA (cDNA) ve vzorku. Stejně jako u běžné PCR enzym DNA polymeráza amplifikuje primery označený úsek DNA, mezi primery je však v našem případě navíc umístěn specifický oligonukleotid. Na oligonukleotid je navázána fluorescenční sonda a zhášec. Pokud se zhášec nachází v blízkosti sondy, sonda není schopna emitovat záření. Ve chvíli, kdy DNA polymeráza začne přepisovat sekvenci s navázaným oligonukleotidem, zhášec se odštěpuje a sonda začíná vyzařovat fluorescenci. S každým amplifikovaným vláknem se míra fluorescence zvyšuje, je tedy přímo úměrná množství DNA obsažené ve vzorku. Přístroj emitované záření zaznamenává a na základě jeho hodnot je schopen koncentrace DNA v reálném čase vyhodnotit.

Amplifikace DNA v našem případě probíhala v roztoku o objemu 10 μ l. Do zkumavky

Délka cyklu [min]	Teplota [°C]
10	25
30	55
5	85
10	20

Tabulka 1: Průběh reakce reverzní transkripce

jsme připravili 0,5 μl 20X TaqMan Gene Expression Assay, 5 μl 2X TaqMan Gene expression MasterMix, 1 μl cDNA (v případě vzorků pupečnickové krve) nebo 4,5 μl cDNA (v případě vzorků pupečnickové krve) a doplnili objem do 10 μl RNase Free vodou. Vzorky jsme poté analyzovali pomocí přístroje 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems. Ke každému běhu zkoumaných vzorků byla přidána negativní kontrola neobsahující DNA a pozitivní kontrola v podobě řady vzorku cDNA ředěného do stále stejných, vzájemně porovnatelných koncentrací. Reakce probíhala v termických cyklech 20 min – 50 °C, 10 min – 95 °C, 15 s – 95 °C, 1 min – 60 °C, přičemž třetí a čtvrtý krok se 40x opakují (Tab. 2).

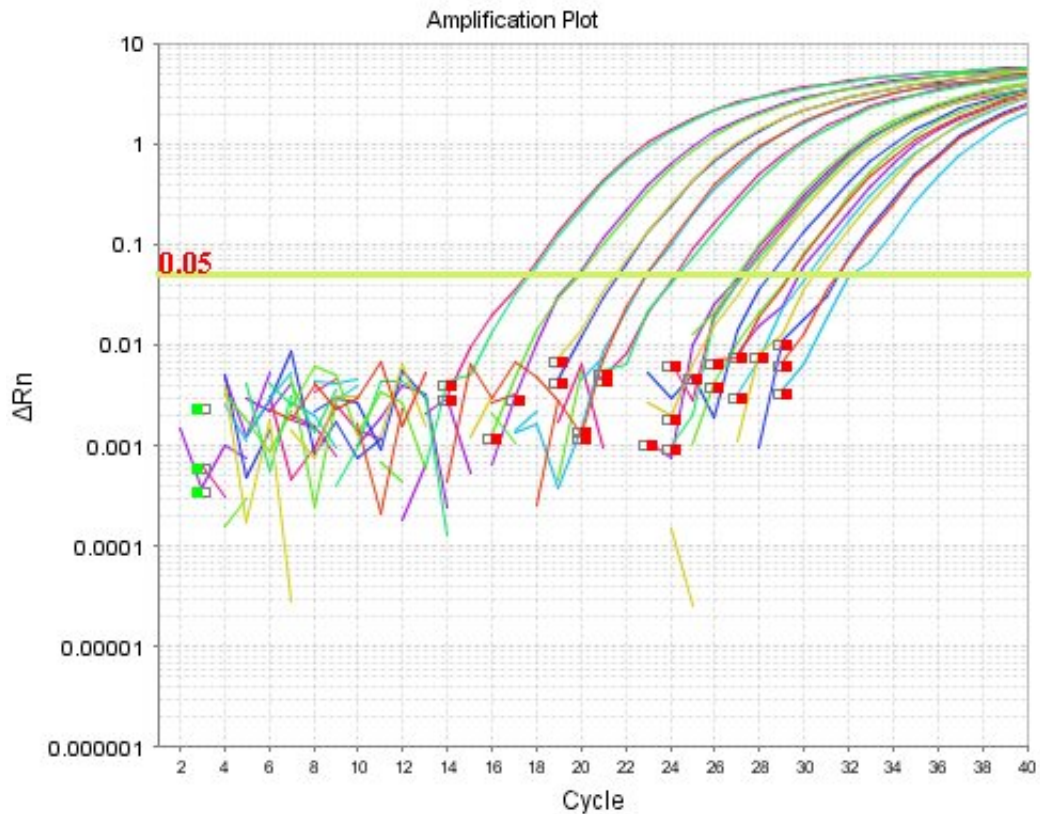
Graf zaznamenávající výsledky reakce Real-Time PCR obsahuje jednu osu udávající míru fluorescence a druhou osu určující číslo cyklu. Systém automaticky generuje hranici fluorescence zvanou treshold. Pro kvantifikaci DNA v určitém vzorku je poté zásadní právě bod, ve kterém křivka jeho fluorescence protne treshold. Číslo cyklu, ve kterém k překročení dané hranice fluorescence došlo, nazýváme CT (treshold cycle) a na základě tohoto čísla můžeme DNA kvantifikovat (Graf 1).

Délka cyklu [min]	Teplota [°C]	Počet opakování
20	50	1x
10	95	
0,25	95	40x
1	60	

Tabulka 2: Průběh reakce Real-Time PCR

3.4 Nefelometrie

Nefelometrie sloužila ke stanovení koncentrace protilátek IgG v mateřské a fetální krvi. Hladina IgG ve vzorku byla stanovena na základě potřebného množství roztoku anti IgG (látka, která váže IgG a vytváří s ním imunokomplexy, simuluje antigen) pro zreagování celého objemu IgG. Metoda byla provedena v laboratoři Ústavu klinické imunologie a alergologie u sv. Anny na přístroji IMMAGE 800 Nephelometer Beckman-Coulter.



Graf 1: Real-Time PCR

svislá osa - míra fluorescence

vodorovná osa - číslo cyklu

světle zelená vodorovná linie - treshold

křivky průběhu reakce u jednotlivých vzorků

3.5 Práce se vzorky

Každý ze 32 vzorků RNA pupečnickové krve a 32 vzorků RNA placentární tkáně byl přepisován do cDNA v duplikátech. Každý z duplikátů byl následně nasazen do reakce Real-time PCR v triplikátech. Pro každý vzorek byla zkoumána exprese genu *FCRN* a housekeepingových (referenčních) genů *ACTB* a *RPL32* pro možnost vyhodnocení míry exprese genu *FCRN* pomocí relativní kvantifikace (hodnota množství RNA pozorovaného genu *FCRN* byla vztažena k hodnotě pro konstantně exprimované geny *ACTB* a *RPL32*).

4 Výsledky

Po provedení Real-Time PCR jsme získali 3 hodnoty C_T pro každý z genů *FCRN*, *ACTB* a *RPL32* u všech duplikátů cDNA získaných z reverzní transkripce 32 vzorků placentární tkáně i pupečnickové krve.

Pro kontrolu přesnosti byl z hodnot C_T triplikátů pro každý gen každého vzorku počítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient. Přes poměrně nízký variační koeficient byly pro dosažení přesnějších výsledků další výpočty prováděny s průměrem geometrickým. (Pro ilustraci je na tomto místě uvedena tabulka 3, veškerá data pro zbývající geny a reverzní transkripce jsou přiložena na konci souboru – viz tabulky č. 8–18.)

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient	Geometrický průměr
B15/002	26,7052	26,9599	26,6927	26,79	0,12	0,46%	26,79
B15/003	25,5951	25,4381	25,4144	25,48	0,08	0,31%	25,48
B15/004	25,5918	25,8245	25,9733	25,80	0,16	0,61%	25,80
B15/005	25,7121	25,5112	25,83	25,68	0,13	0,51%	25,68
B15/006	26,9237	28,0127	27,6873	27,54	0,46	1,66%	27,54
B15/007	25,9166	26,2663	26,3176	26,17	0,18	0,68%	26,17
B15/008	25,8283	25,2626	25,7912	25,63	0,26	1,01%	25,63
B15/009	26,0537	27,0065	26,2041	26,42	0,42	1,58%	26,42
B15/010	25,637	26,3537	26,179	26,06	0,31	1,17%	26,05
B15/011	22,7438	23,1742	23,7454	23,22	0,41	1,77%	23,22
B15/012	24,0847	24,2196	24,4749	24,26	0,16	0,67%	24,26
B15/013	25,3763	25,115	24,7181	25,07	0,27	1,08%	25,07
B15/014	25,5174	26,0425	25,6455	25,74	0,22	0,87%	25,73
B15/015	25,5662	25,777	26,2687	25,87	0,29	1,14%	25,87
B15/016	24,8888	25,1686	25,3034	25,12	0,17	0,69%	25,12
B15/017	25,1265	25,4809	25,5709	25,39	0,19	0,76%	25,39
B15/018	25,4363	25,4636	24,9672	25,29	0,23	0,90%	25,29
B15/019	26,0637	26,2349	26,38	26,23	0,13	0,49%	26,23
B15/020	24,3764	24,3617	23,7634	24,17	0,29	1,18%	24,17
B15/021	25,8906	26,2278	25,5988	25,91	0,26	0,99%	25,90
B15/022	26,3155	26,4124	26,5103	26,41	0,08	0,30%	26,41
B15/023	26,5575	26,5565	26,5395	26,55	0,01	0,03%	26,55
B15/024	26,6318	26,4046	26,4585	26,50	0,10	0,37%	26,50
B15/025	26,973	27,174	27,4496	27,20	0,20	0,72%	27,20
B15/026	26,2708	26,6569	26,7132	26,55	0,20	0,74%	26,55
B15/027	26,9429	27,0199	26,9157	26,96	0,04	0,16%	26,96
B15/028	26,4677	26,1673	26,0758	26,24	0,17	0,64%	26,24
B15/029				vyřazeno z technických důvodů			
O15/006	27,5286	27,5392	27,6745	27,58	0,07	0,24%	27,58
O15/007	27,807	29,5026	29,4157	28,91	0,78	2,70%	28,90
O15/008	26,5225	26,4418	26,5341	26,50	0,04	0,15%	26,50
O15/009	26,2067	26,4213	26,3395	26,32	0,09	0,34%	26,32
O15/010	26,1091	26,2782	26,1573	26,18	0,07	0,27%	26,18

Tabulka 3: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *FCRN* z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve

Míra exprese genu *FCRN* v daném vzorku byla udána jako rozdíl geometrického průměru C_T triplikátů pro gen *FCRN* a geometrického průměru dílčích geometrických průměrů hodnot C_T pro referenční geny *ACTB* a *RPL32*. Hodnota uvedeného rozdílu byla označena jako ΔC_T . Linearizovaný výsledek měl podobu $2^{-\Delta C_T}$. Tento postup byl uplatněn pro každý z duplikátů cDNA získaných z reverzní transkripce, čímž jsme pro každý vzorek našli dvě hodnoty míry exprese genu *FCRN*. Spočítáním aritmetického průměru těchto dvou hodnot byl dosažen finální výsledek. Hodnoty míry exprese mRNA genu *FCRN* v pupečnickové krvi jsou uvedeny v tabulce č. 4, hodnoty pro placentární tkáň jsou v tabulce č. 5.

Vzorek	Míra exprese genu <i>FCRN</i> (první RT)	Míra exprese genu <i>FCRN</i> (druhá RT)	Směrodatná odchylka	Variační koeficient ze dvou RT [%]	Míra exprese genu <i>FCRN</i> v pupečnickové krvi
B15/002	0,10	0,11	0,00	4,31	0,11
B15/003	0,10	0,11	0,00	0,94	0,11
B15/004	0,14	0,12	0,01	5,47	0,13
B15/005	0,10	0,08	0,01	10,36	0,09
B15/006	0,05	0,04	0,01	12,48	0,04
B15/007	0,08	0,06	0,01	9,72	0,07
B15/008	0,10	0,10	0,00	1,11	0,10
B15/009	0,15	0,17	0,01	4,36	0,16
B15/010	0,07	0,17	0,05	40,91	0,12
B15/011	0,16	0,14	0,01	6,36	0,15
B15/012	0,14	0,14	0,00	0,92	0,14
B15/013	0,16	0,20	0,02	10,77	0,18
B15/014	0,11	0,11	0,00	0,06	0,11
B15/015	0,06	0,04	0,01	14,55	0,05
B15/016			vyřazeno z technických důvodů		
B15/017	0,06	0,06	0,00	0,61	0,06
B15/018	0,18	0,13	0,02	15,44	0,16
B15/019	0,14	0,09	0,02	20,67	0,12
B15/020	0,15	0,13	0,01	8,18	0,14
B15/021	0,11	0,12	0,00	0,91	0,12
B15/022	0,07	0,11	0,00	1,50	0,11
B15/023	0,15	0,09	0,00	2,92	0,09
B15/024	0,09	0,10	0,00	3,38	0,09
B15/025	0,07	0,05	0,01	11,76	0,06
B15/026	0,05	0,05	0,00	2,19	0,05
B15/027	0,08	0,07	0,01	6,96	0,07
B15/028	0,13	0,16	0,01	9,60	0,15
B15/029			vyřazeno z technických důvodů		
O15/006	0,17	0,11	0,03	20,84	0,14
O15/007	0,05	0,05	0,00	4,33	0,05
O15/008	0,14	0,10	0,02	14,65	0,12
O15/009	0,18	0,13	0,03	16,52	0,16
O15/010	0,11	0,09	0,01	12,54	0,10

Tabulka 4: Míra exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi

Vzorek	Míra exprese genu <i>FCRN</i> (první RT)	Míra exprese genu <i>FCRN</i> (druhá RT)	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Míra exprese genu <i>FCRN</i> v placentární tkáni
B15/002	0,02	0,06	0,02	57,71	0,04
B15/003	0,14	0,16	0,01	7,21	0,15
B15/004	0,05	0,05	0,00	2,39	0,05
B15/005	0,10	0,08	0,01	10,50	0,09
B15/006	0,04	0,04	0,00	1,31	0,04
B15/007	0,20	0,15	0,03	15,55	0,18
B15/008	0,08	0,09	0,01	6,94	0,09
B15/009	0,03	0,03	0,00	1,65	0,03
B15/010	0,08	0,09	0,00	5,45	0,08
B15/011	0,04	0,05	0,00	10,12	0,04
B15/012	0,09	0,10	0,00	3,31	0,09
B15/013	0,03	0,03	0,00	0,39	0,03
B15/014			malý výtěžek RNA		
B15/015	0,08	0,07	0,00	3,74	0,07
B15/016	0,19	0,17	0,01	4,42	0,18
B15/017	0,04	0,04	0,00	4,10	0,04
B15/018	0,13	0,14	0,01	4,50	0,14
B15/019	0,03	0,07	0,02	36,50	0,05
B15/020	0,04	0,10	0,03	38,08	0,07
B15/021	0,06	0,01	0,02	69,16	0,03
B15/022	0,20	0,25	0,02	11,00	0,22
B15/023	0,44	0,43	0,01	1,56	0,43
B15/024	0,02	0,01	0,00	23,87	0,02
B15/025	0,05	0,05	0,00	4,41	0,05
B15/026	0,05	0,03	0,01	32,53	0,04
B15/027	0,03	0,03	0,00	0,16	0,03
B15/028	0,38	0,50	0,06	13,49	0,44
B15/029	0,07	0,04	0,01	29,62	0,05
O15/006	0,06	0,10	0,02	19,75	0,08
O15/007	0,03	0,09	0,03	43,54	0,06
O15/008	0,04	0,04	0,00	2,10	0,04
O15/009	0,20	0,21	0,01	3,25	0,20
O15/010	0,14	0,14	0,00	2,94	0,14

Tabulka 5: Míra exprese genu *FCRN* v placentární tkáni

Výsledné hodnoty míry exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi i v placentární tkáni jsme zpracovali do tabulky a grafu společně s koncentracemi IgG v mateřské a pupečnickové krvi a gradientem protilátek IgG v pupečnickové a mateřské krvi (viz tabulky č. 6–7).

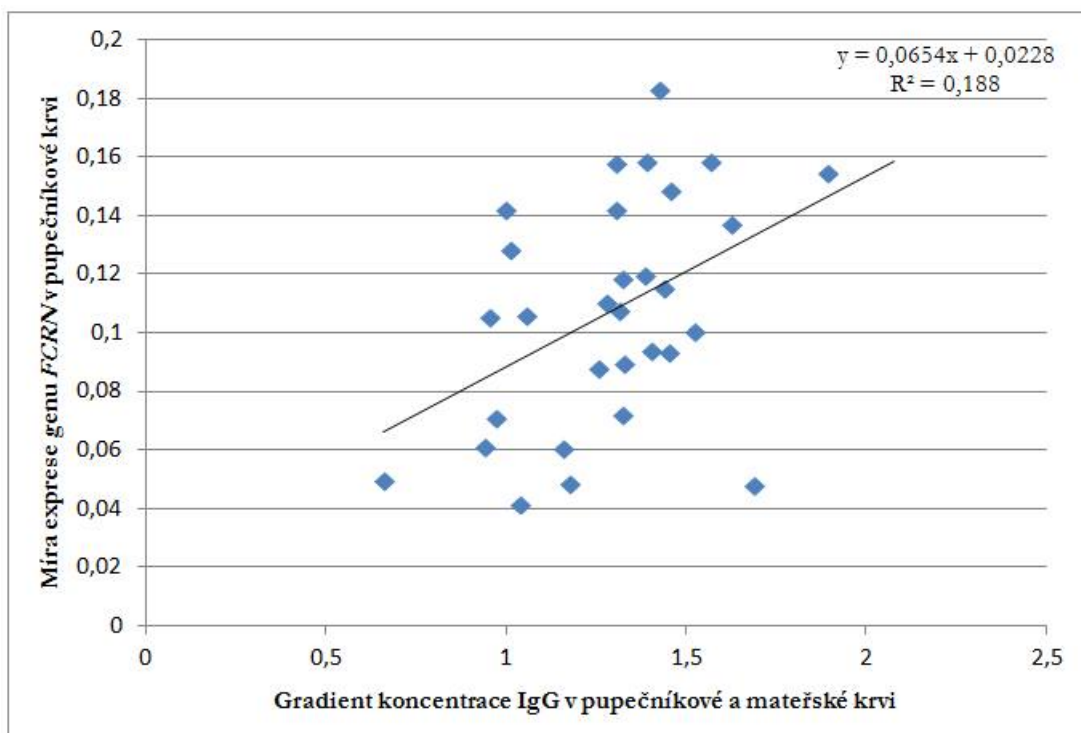
Vzorek	Koncentrace IgG v mateřské krvi	Koncentrace IgG v pupečnickové krvi	Gradient IgG v pupečnickové/mateřské krvi	Míra exprese genu <i>FCRN</i> v pupečnickové krvi
B15/002	8,45	11,10	1,31	0,11
B15/003	8,82	8,41	0,95	0,11
B15/004	8,80	8,90	1,01	0,13
B15/005	7,30	10,60	1,45	0,09
B15/006	8,88	9,21	1,04	0,04
B15/007	11,40	11,10	0,97	0,07
B15/008	9,45	14,40	1,52	0,10
B15/009	9,00	12,50	1,39	0,16
B15/010	8,30	11,50	1,39	0,12
B15/011	6,50	12,30	1,89	0,15
B15/012	9,90	12,90	1,30	0,14
B15/013	8,01	11,40	1,42	0,18
B15/014	12,40	13,10	1,06	0,11
B15/015	5,81	9,81	1,69	0,05
B15/016		vyřazeno z technických důvodů		
B15/017	10,10	9,48	0,94	0,06
B15/018	7,55	9,84	1,30	0,16
B15/019	5,17	6,85	1,32	0,12
B15/020	10,60	10,60		0,14
B15/021	7,24	10,40	1,44	0,12
B15/022	7,08	9,05	1,28	0,11
B15/023	8,28	10,40	1,26	0,09
B15/024	6,28	8,82	1,40	0,09
B15/025	8,12	9,42	1,16	0,06
B15/026	10,30	12,10	1,17	0,05
B15/027	8,47	11,20	1,32	0,07
B15/028	5,22	7,60	1,46	0,15
B15/029		vyřazeno z technických důvodů		
O15/006	8,18	13,30	1,63	0,14
O15/007	8,83	5,83	0,66	0,05
O15/008	7,91	10,50	1,33	0,09
O15/009	7,71	12,10	1,57	0,16
O15/010		vyřazeno z technických důvodů		

Tabulka 6: Srovnání míry exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi s gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi

Vzorek	Koncentrace IgG v mateřské krvi	Koncentrace IgG v pupečnickové krvi	Gradient IgG v pupečnickové/mateřské krvi	Míra exprese genu <i>FCRN</i> v placentární tkáni
B15/002	8,45	11,10	1,31	0,04
B15/003	8,82	8,41	0,95	0,15
B15/004	8,80	8,90	1,01	0,05
B15/005	7,30	10,60	1,45	0,09
B15/006	8,88	9,21	1,04	0,04
B15/007	11,40	11,10	0,97	0,18
B15/008	9,45	14,40	1,52	0,09
B15/009	9,00	12,50	1,39	0,03
B15/010	8,30	11,50	1,39	0,08
B15/011	6,50	12,30	1,89	0,04
B15/012	9,90	12,90	1,30	0,09
B15/013	8,01	11,40	1,42	0,03
B15/014			malý výtěžek RNA	
B15/015	5,81	9,81	1,69	0,07
B15/016	8,24	11,00	1,33	0,18
B15/017	10,10	9,48	0,94	0,04
B15/018	7,55	9,84	1,30	0,14
B15/019	5,17	6,85	1,32	0,05
B15/020	10,60	10,60		0,07
B15/021	7,24	10,40	1,44	0,03
B15/022	7,08	9,05	1,28	0,22
B15/023	8,28	10,40	1,26	0,43
B15/024	6,28	8,82	1,40	0,02
B15/025	8,12	9,42	1,16	0,05
B15/026	10,30	12,10	1,17	0,04
B15/027	8,47	11,20	1,32	0,03
B15/028	5,22	7,60	1,46	0,44
B15/029	11	9,7	0,88	0,05
O15/006	8,18	13,30	1,63	0,08
O15/007	8,83	5,83	0,66	0,06
O15/008	7,91	10,50	1,33	0,04
O15/009	7,71	12,10	1,57	0,20
O15/010	5,97	12,40	2,08	0,14

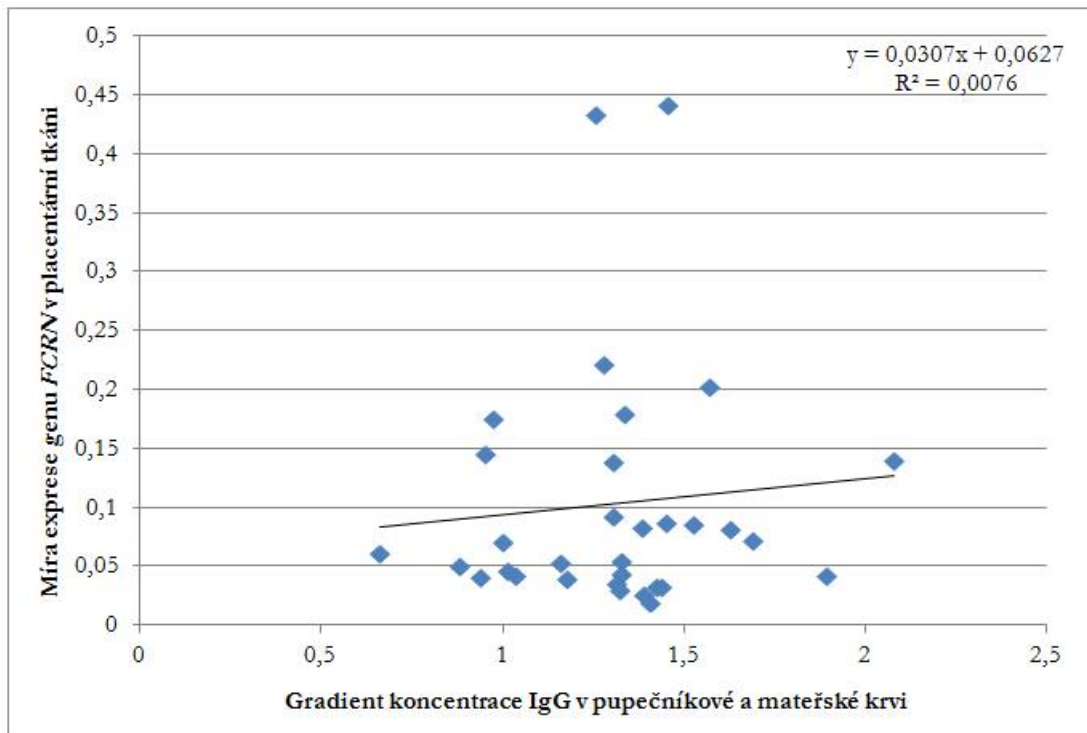
Tabulka 7: Srovnání míry exprese genu *FCRN* v placentární tkáni s gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi

Hodnoty míry exprese genu *FCRN* a gradientu IgG v pupečnickové a mateřské krvi byly vyneseny do grafu (viz grafy č. 2–4). Pro vyhodnocení korelace mezi zadanými hodnotami byl využit Spearmanův korelační test (vyhodnocováno pomocí programu STATISTICA, StatSoft, Inc.). Na základě Spearmanova korelačního koeficientu lze určit tzv. hodnotu *p*, která udává statistickou významnost korelace. Čím více se hodnota *p* přibližuje nule, tím je korelace významnější. Jako hranice statistické významnosti korelace byla použita standardní hodnota $p = 0,05$. Některé vzorky nemohly být do vyhodnocení výsledků z technických důvodů zahrnuty.



Graf 2: Korelace míry exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi a gradientu pupečnickové a mateřské koncentrace IgG

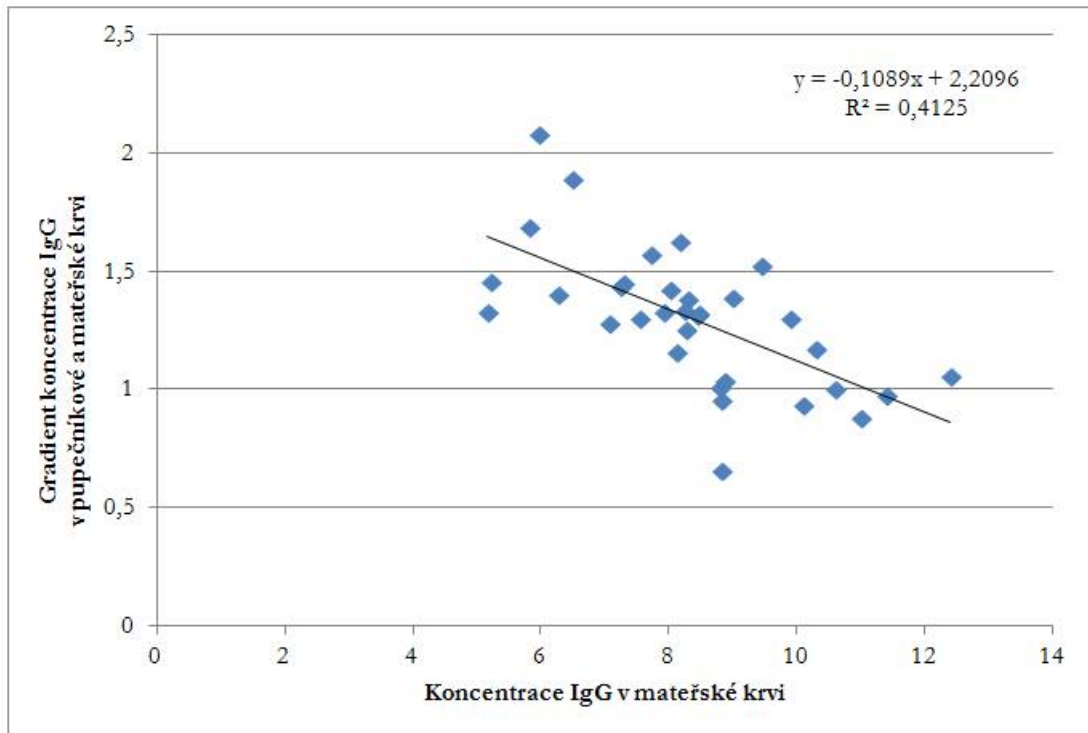
Z grafu 2 je patrný rostoucí trend vyznačený křivkou. Po vyhodnocení výsledků pomocí Spearmanova testu byla nalezena statisticky významná korelace ($p = 0,027$) mezi mírou exprese genu *FCRN* a gradientem koncentrace IgG v mateřské a pupečnickové krvi.



Graf 3: Korelace míry exprese genu *FCRN* v placentární tkáni a gradientu pupečnickové a mateřské koncentrace IgG

Graf 3 naopak ukazuje, že korelace míry exprese genu *FCRN* v placentární tkáni a gradientu koncentrace IgG v mateřské a pupečnickové krvi nebyla zaznamenána.

Vyhodnotili jsme také korelaci mezi gradientem IgG v pupečnickové a mateřské krvi a koncentrací IgG v mateřské krvi.



Graf 4: Korelace mateřské koncentrace IgG a gradientu pupečnickové a mateřské koncentrace IgG

Z grafu 4 je patrná výrazná negativní korelace mezi koncentrací IgG v mateřské krvi a gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi. Negativní korelace je statisticky významná ($p = 0,00001$).

5 Diskuze

Již dlouhou dobu jsou si vědci vědomi nezpochybnitelného významu imunoglobulinu G pro lidský organismus. Právě nepostradatelnost protilátek vedla v minulosti k rozvíjení různých teorií o možnosti jejich přenosu z matky na potomka. Již v 60. letech 20. století vznikla první teze o možné existenci proteinu, který by přenos protilátek zprostředkovával [10]. V roce 1985 byl poprvé z krysího tenkého střeva izolován protein schopný navázat se na IgG, tento protein byl nazván neonatálním Fc receptorem [11]. Záhy byla popsána existence strukturně velmi podobného receptoru také u člověka. Trvalo necelých 20 let (během kterých byla detailněji popsána dynamika přenosu IgG přes placentu; zajímavá je například molekulová hmotnost IgG, která je oproti ostatním molekulám schopným penetrovat přes placentu poměrně velká [12]), než se na přelomu tisíciletí potvrdila zásadní role neonatálního Fc receptoru, FcRn, v transplacentárním přenosu protilátek IgG, a to jak u hlodavců, tak u lidského materno-fetálního přenosu IgG [13].

Neonatální Fc receptor se tak stal atraktivním objektem zkoumání mnoha vědeckých skupin. V roce 2006 byla nalezena souvislost mezi polymorfismy v genu *FCRN* a úrovní jeho exprese [8]. Později byly podrobněji popsány tkáně, kde je gen *FCRN* v lidském těle exprimován. Mimo jiné byla demonstrována exprese *FCRN* ve svrchní vrstvě buněk placenty zvané syncytiotrofoblast [14]. Význam FcRn v přenosu IgG byl dále potvrzen zajímavou studií, která ukázala, že při mutaci molekuly IgG vedoucí k narušení vazby mezi molekulami FcRn a IgG, došlo ke snížení efektivity přenosu IgG [16].

V této práci jsme zkoumali, zda exprese mRNA genu *FCRN* v pupečnickové krvi a placentární tkáni souvisí s efektivitou přenosu protilátek IgG přes placentu.

Naše výsledky ukázaly, že mezi mírou exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi a gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi existuje statisticky významná korelace, což podporuje závěry dřívějších studií o významu FcRn pro transplacentární přenos protilátek a jejich udržování v cirkulaci plodu. Z výsledků je možné usuzovat, že pro výslednou koncentraci protilátek IgG v cirkulaci plodu má větší význam FcRn exprimovaný v pupečnickové krvi než FcRn exprimovaný v placentární tkáni. Překvapivě však nebyla nalezena korelace mezi mírou exprese genu

FCRN v placentární tkáni a gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi. Tento výsledek by mohl být vysvětlen saturačními systémy zajišťujícími přenos IgG přes placentu. Již dříve bylo demonstrováno, že zvyšující se nabídka IgG nevede k lineárnímu nárůstu přeneseného IgG přes vrstvu lidských placentárních endoteliálních buněk [13]. Je ovšem nutno připustit i některé technické limitace, které mohly výsledek ovlivnit. Při odběru nebylo z praktických důvodů možné dodržet předpokládané množství vzorku placentární tkáně a tím také poměr mezi objemem vzorku a výrobcem doporučeným množstvím roztoku RNeasy, který zajišťuje stabilitu RNA.

Zajímavým výsledkem naší práce je i negativní korelace mezi koncentrací IgG v mateřské krvi a poměrem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi. Také toto pozorování koresponduje s předpokladem, že systém přenosu protilátek přes placentu je saturační. Vyšší koncentrace IgG v mateřské cirkulaci nevedla k odpovídajícímu nárůstu koncentrace IgG v pupečnickové krvi.

Podle našich vědomostí nebyla u člověka souvislost míry exprese *FCRN* s efektivitou přenosu IgG přes placentu dosud analyzována. V roce 2015 byla ovšem publikována práce zkoumající dynamiku přenosu IgG v závislosti na expresi genu *FCRN* u krys. Míra exprese genu se s blížícím se termínem porodu zvyšovala, nárůst koncentrace IgG v krvi potomka byl tomuto jevu přímo úměrný [15]. Nabízí se proto otázka, jestli dochází k podobné situaci také v případě lidského transplacentárního přenosu IgG. Na tuto otázku naše práce odpovědět nemohla, protože naše vzorky pocházely z těhotenství ukončených porodem v termínu a nemohli jsme tak hodnotit případný nárůst koncentrace mRNA genu *FCRN* v čase.

Pro potvrzení teze o pozitivní korelaci mezi mírou exprese genu *FCRN* a účinností materno-fetálního přenosu IgG, případně také negativní korelace mezi koncentrací IgG v mateřské krvi a účinností přenosu IgG přes placentu by bylo třeba rozšířit studii a zahrnout do zkoumání výrazně vyšší počet vzorků.

Rozšíření této práce a potvrzení dosavadních výsledků by v budoucnu mohlo vést k vyvinutí léčebného postupu, který by cestou zvýšení koncentrace FcRn v cirkulaci plodu vedl ke zvýšení efektivity materno-fetálního přenosu IgG. Takový postup by mohl hrát významnou roli pro zvýšení obranyschopnosti nedonošených dětí nebo dětí s nedostatečnou či porušenou expresí genu *FcRN*. Vzhledem ke gradaci přenosu IgG během těhotenství mají nedonošené děti nedostatečné množství protilátek, což by mohlo řešit právě prenatální zvýšení přenosu protilátek ovlivněním míry exprese genu *FcRN*.

Závěr

V období těhotenství jsou přes placentu z matky na potomka přenášeny protilátky IgG. Za tento transport je zodpovědný protein zvaný FcRn, neonatální Fc receptor. Gen kódující FcRn (*FCRN*) je exprimován pouze v některých typech buněk, mimo jiné také v buňkách cévního endotelu, některých imunitních buňkách nebo placentární tkáni.

Tato práce se zabývala hledáním možné korelace mezi mírou exprese genu *FCRN* a účinností přenosu protilátek přes placentu. Zajímavým výsledkem bylo zejména nalezení statisticky významné korelace mezi mírou exprese genu *FCRN* v pupečnickové krvi a účinností přenosu IgG přes placentu a negativní korelace koncentrace IgG v mateřské krvi s účinností transplacentárního přenosu protilátek IgG. Korelace mezi mírou exprese genu *FCRN* v placentární tkáni a účinností přenosu IgG přes placentu detekována nebyla.

Pokud by se výsledky výzkumu potvrdily na širším výběru vzorků, mohly by být v budoucnu potenciálně uplatněny k zavedení metody vedoucí ke zvýšení koncentrace FcRn v cirkulaci plodu za účelem zvýšení efektivity přenosu protilátek IgG přes placentu. Taková metoda by mohla výrazně pozitivně ovlivnit obranyschopnost zejména nedonošených dětí.

Seznam použité literatury

- [1] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005, 279 s. ISBN 80-725-4686-4.
- [2] ABBAS, Abul K., and Andrew H. LICHTMAN. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012. Print. ISBN 978-1-4377-1528-6.
- [3] CHAPEL, Helen. *Essentials of Clinical Immunology*. 5th ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub., 2006. Print. ISBN 978-1-4051-2761-5.
- [4] ROOPENIAN, Derry C. and Shreeram AKILESH. *FcRn: the neonatal receptor comes of age*. *Nature Reviews Immunology* , vol. 7, no. 9, pp. 715-725, 2007.
- [5] KUO, Timothy T. a kol. *Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics*. *J Clin Immunol.*, 30(6) 2010, pp. 777-89, 2010
- [6] SIMISTER, N. *Placental Transport of Immunoglobulin G*. *Vaccine*, vol. 21, no. 24, pp. 3365-3369, 2003.
- [7] FREIBERGER, T. a kol. *No Association of FCRN Promoter VNTR Polymorphism with the Rate of Maternal-fetal IgG Transfer*. *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 85, no. 2, pp. 193-97, 2010.
- [8] SACHS, Ulrich J. H. a kol. *A Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism Influences the Transcriptional Activity of the Neonatal Fc Receptor γ -chain Promoter*. *Immunology*, vol. 119, no. 1, pp. 83-89, 2006.
- [9] FREIBERGER, T. a kol. *Association of FcRn Expression with Lung Abnormalities and IVIG Catabolism in Patients with Common Variable*

- Immunodeficiency. Clinical Immunology*, vol. 136, no. 3, pp. 419-25, 2010.
- [10] BRAMBELL, F. W. Rogers, *The Transmission of Immunity from Mother to Young and the Catabolism of Immunoglobulins. The Lancet*, vol. 288, no. 7473, pp. 1087-109, 1966.
- [11] SIMISTER, N. E., *Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. European Journal of Immunology*, vol. 7, no. 15, pp. 733-739, 1985.
- [12] SAJI, F. *Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. Reviews of Reproduction*, vol. 4, no. 2, pp. 81-89, 1999.
- [13] ANTOHE, F. a kol. *Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. Human Immunology*, vol. 62, no. 2, pp. 93-105, 2001.
- [14] SZLAUER, R. a kol. *Functional Expression of the Human Neonatal Fc-receptor, hFcRn, in Isolated Cultured Human Syncytiotrophoblasts. Placenta*, vol. 30, no. 6, pp. 507-515, 2009.
- [15] WANG, Y. a kol. *Quantitative Investigation on Correlation Between IgG and FcRn During Gestation and Lactating Periods in Rat. American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 75, no. 2, pp. 81-85, 2015.
- [16] EINARSDOTTIR, H. a kol. *H435-containing immunoglobulin G3 allotypes are transported efficiently across the human placenta: Implications for alloantibody-mediated diseases of the newborn. Transfusion*, vol. 54, no. 3, pp. 665-671, 2013.

- [17] SNUSTAD, D. Peter, and Michael J. SIMMONS. *Genetika*. Brno: Masarykova Univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.

Seznam obrázků

1	Struktura molekuly imunoglobulinu	19
2	Struktura molekuly FcRn	22
3	Transplacentární přenos IgG	24
4	Chromozom	26

Seznam tabulek

1	Průběh reakce reverzní transkripce	33
2	Průběh reakce Real-Time PCR	34
3	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>FCRN</i> z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve	37
4	Míra exprese genu <i>FCRN</i> v pupečnickové krvi	38
5	Míra exprese genu <i>FCRN</i> v placentární tkáni	39
6	Srovnání míry exprese genu <i>FCRN</i> v pupečnickové krvi s gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi	40
7	Srovnání míry exprese genu <i>FCRN</i> v placentární tkáni s gradientem koncentrace IgG v pupečnickové a mateřské krvi	41
8	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>FCRN</i> z druhé reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve	56
9	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>ACTB</i> z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve	57
10	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>ACTB</i> z druhé reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve	58
11	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>RPL32</i> z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve	59
12	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>RPL32</i> z druhé reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve	60
13	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>FCRN</i> z první reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně	61
14	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>FCRN</i> z druhé reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně	62

15	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>ACTB</i> z první reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně	63
16	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>ACTB</i> z druhé reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně	64
17	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>RPL32</i> z první reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně	65
18	Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen <i>RPL32</i> z druhé reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně	66

Tabulky č. 8–18 jsou uvedeny mezi přílohami na konci práce.

Seznam grafů

1	Real-Time PCR	35
2	Korelace míry exprese genu <i>FCRN</i> v pupečnickové krvi a gradientu pupečnickové a mateřské koncentrace IgG	42
3	Korelace míry exprese genu <i>FCRN</i> v placentární tkáni a gradientu pupečnickové a mateřské koncentrace IgG	43
4	Korelace mateřské koncentrace IgG a gradientu pupečnickové a mateřské koncentrace IgG	44

Přílohy

Zpracování výsledků Real-Time PCR

Tabulka kontroly rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *FCRN* z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve je uvedena v kapitole Výsledky.

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	29,1369	28,779	29,0126	28,98	0,15	0,51	28,98
B15/003	25,7798	25,7734	25,7504	25,77	0,01	0,05	25,77
B15/004	26,0456	25,7245	25,6444	25,80	0,17	0,67	25,80
B15/005	26,1828	26,2122	26,1042	26,17	0,05	0,17	26,17
B15/006	27,9631	27,8387	27,9519	27,92	0,06	0,20	27,92
B15/007	26,302	25,8758	26,1524	26,11	0,18	0,68	26,11
B15/008	25,6738	25,7154	25,7459	25,71	0,03	0,11	25,71
B15/009	26,5725	25,4822	27,6273	26,56	0,88	3,30	26,55
B15/010	25,3155	24,2581	24,1245	24,57	0,53	2,17	24,56
B15/011	23,8459	23,8834	23,0416	23,59	0,39	1,65	23,59
B15/012	24,0373	24,4468	24,0416	24,18	0,19	0,79	24,17
B15/013	24,5092	24,1629	24,6935	24,46	0,22	0,90	24,45
B15/014	25,6001	25,9817	25,966	25,85	0,18	0,68	25,85
B15/015	26,6126	26,7642	26,3669	26,58	0,16	0,62	26,58
B15/016	25,018	25,4221	24,7801	25,07	0,27	1,06	25,07
B15/017	25,5166	25,5811	25,2762	25,46	0,13	0,52	25,46
B15/018	25,9888	25,6684	25,7208	25,79	0,14	0,54	25,79
B15/019	26,6842	26,8208	26,9308	26,81	0,10	0,38	26,81
B15/020	24,0146	24,5236	24,5615	24,37	0,25	1,02	24,37
B15/021	25,8122	26,4715	25,5194	25,93	0,40	1,54	25,93
B15/022	26,3637	26,6138	26,2859	26,42	0,14	0,53	26,42
B15/023	26,372		26,6536	26,51	0,14	0,53	26,51
B15/024	26,4585	26,1109	26,4597	26,34	0,16	0,62	26,34
B15/025	27,4168	28,538	27,6352	27,86	0,49	1,74	27,86
B15/026	26,8838	27,0665	26,5692	26,84	0,21	0,77	26,84
B15/027	26,8217	28,1716	26,5188	27,17	0,72	2,64	27,16
B15/028	25,7149	25,85	25,7533	25,77	0,06	0,22	25,77
B15/029				vyřazeno z technických důvodů			
O15/006	27,6969	27,6758	27,807	27,73	0,06	0,21	27,73
O15/007	28,8506	29,3047	28,8546	29,00	0,21	0,73	29,00
O15/008	26,8917	27,0209	26,7517	26,89	0,11	0,41	26,89
O15/009	26,0994	26,1555	25,9185	26,06	0,10	0,39	26,06
O15/010	26,6025	26,7164	26,5821	26,63	0,06	0,22	26,63

Tabulka 8: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *FCRN* z druhé reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	18,8986	19,4364	19,0226	19,12	0,23	1,20	19,12
B15/003	17,8722	17,947	17,8795	17,90	0,03	0,19	17,90
B15/004	18,2004	18,35	18,3129	18,29	0,06	0,35	18,29
B15/005	17,8912	17,9169	17,8866	17,90	0,01	0,07	17,90
B15/006	18,0879	18,0875	18,2045	18,13	0,06	0,30	18,13
B15/007	18,0685	17,9852	18,1054	18,05	0,05	0,28	18,05
B15/008	17,5971	17,7217	17,6811	17,67	0,05	0,29	17,67
B15/009	18,4265	17,9974	18,2278	18,22	0,18	0,96	18,22
B15/010	16,2757	16,8182	17,0718	16,72	0,33	1,99	16,72
B15/011	15,5122	15,6162	16,0598	15,73	0,24	1,51	15,73
B15/012	16,8648	16,2113	16,9914	16,69	0,34	2,05	16,69
B15/013	17,2936	17,6765	17,6009	17,52	0,17	0,94	17,52
B15/014	17,963	17,871	17,7319	17,86	0,10	0,53	17,86
B15/015	17,4446	17,7387	17,8668	17,68	0,18	1,00	17,68
B15/016	17,6144	17,4671	17,6164	17,57	0,07	0,40	17,57
B15/017	17,4851	17,5432	17,6747	17,57	0,08	0,45	17,57
B15/018	17,7029	17,6521	17,8303	17,73	0,07	0,42	17,73
B15/019	18,5586	18,7375	18,3539	18,55	0,16	0,84	18,55
B15/020	17,1142	17,171	17,3198	17,20	0,09	0,50	17,20
B15/021	17,7727	17,8238	17,9987	17,87	0,10	0,54	17,86
B15/022	18,2314	18,2539	18,3777	18,29	0,06	0,35	18,29
B15/023	18,7947	18,3849	18,352	18,51	0,20	1,09	18,51
B15/024	17,9887	18,1765	17,9511	18,04	0,10	0,55	18,04
B15/025	18,6178	18,5229	18,409	18,52	0,09	0,46	18,52
B15/026	17,9136	18,0646	18,2692	18,08	0,15	0,81	18,08
B15/027	18,565	18,4324	18,5826	18,53	0,07	0,36	18,53
B15/028	18,1892	18,4118	18,2213	18,27	0,10	0,54	18,27
B15/029	18,217	18,1894	18,3073	18,24	0,05	0,28	18,24
O15/006	20,3652	20,1497	20,1126	20,21	0,11	0,55	20,21
O15/007	20,0211	20,1583	20,1927	20,12	0,07	0,37	20,12
O15/008	19,0439	18,9626	18,8203	18,94	0,09	0,49	18,94
O15/009	19,146	19,2747	18,7978	19,07	0,20	1,06	19,07
O15/010	18,2162	18,358	18,0065	18,19	0,14	0,79	18,19

Tabulka 9: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *ACTB* z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	21,0186	21,4791	21,5173	21,34	0,23	1,06	21,34
B15/003	18,3323	18,0853	18,2292	18,22	0,10	0,56	18,22
B15/004	18,0416	18,3059	18,2106	18,19	0,11	0,60	18,19
B15/005	17,6861	17,843	17,7369	17,76	0,07	0,37	17,76
B15/006	18,2642	18,1851	18,144	18,20	0,05	0,27	18,20
B15/007	17,745	17,7927	17,3787	17,64	0,18	1,05	17,64
B15/008	18,0144	17,7019	17,7007	17,81	0,15	0,83	17,81
B15/009	18,1975	18,2141	18,3903	18,27	0,09	0,48	18,27
B15/010	16,2807	16,6118	16,9142	16,60	0,26	1,56	16,60
B15/011	15,0063	15,8828	15,5102	15,47	0,36	2,32	15,46
B15/012	17,0476	16,9111	16,6866	16,88	0,15	0,88	16,88
B15/013	17,0388	16,9029	17,8473	17,26	0,42	2,41	17,26
B15/014	17,8725	17,8105	17,6629	17,78	0,09	0,49	17,78
B15/015	17,8524	17,8948	17,9428	17,90	0,04	0,21	17,90
B15/016	17,256	17,6145	17,379	17,42	0,15	0,85	17,42
B15/017	17,6266	17,7592	17,5982	17,66	0,07	0,40	17,66
B15/018	17,6962	17,8782	17,5487	17,71	0,13	0,76	17,71
B15/019		18,7008	18,4743	18,59	0,11	0,61	18,59
B15/020	17,2745	17,8424	17,2691	17,46	0,27	1,54	17,46
B15/021	17,7754	17,8535	17,6328	17,75	0,09	0,51	17,75
B15/022	18,3655	18,5316	18,1889	18,36	0,14	0,76	18,36
B15/023	18,3507	18,3215	18,3097	18,33	0,02	0,09	18,33
B15/024	18,1559	17,9088	17,8903	17,98	0,12	0,67	17,98
B15/025	18,885	18,8367	18,914	18,88	0,03	0,17	18,88
B15/026	18,2645	18,2902	17,9703	18,18	0,15	0,80	18,17
B15/027	18,3252	18,3644	18,3272	18,34	0,02	0,10	18,34
B15/028	18,145	18,1909	18,1222	18,15	0,03	0,16	18,15
B15/029	17,9683	18,2414	17,66	17,96	0,24	1,32	17,95
O15/006	19,5123	19,3741	19,8007	19,56	0,18	0,91	19,56
O15/007	19,8643	19,8265	19,4675	19,72	0,18	0,91	19,72
O15/008	19,1273	19,1274	19,2132	19,16	0,04	0,21	19,16
O15/009	18,165	18,7057	18,3499	18,41	0,22	1,22	18,41
O15/010	18,7359	18,6751	18,7	18,70	0,02	0,13	18,70

Tabulka 10: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *ACTB* z druhé reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	28,8324	29,1393	28,75	28,91	0,17	0,58	28,91
B15/003	27,5614	27,4467	27,7483	27,59	0,12	0,45	27,59
B15/004	28,7918	28,6064	28,7081	28,70	0,08	0,26	28,70
B15/005	28,0311	28,0492	28,0535	28,04	0,01	0,03	28,04
B15/006	29,3847	29,4059	29,675	29,49	0,13	0,45	29,49
B15/007	27,9382	28,0861	27,9863	28,00	0,06	0,22	28,00
B15/008	28,4251	28,2603	27,9849	28,22	0,18	0,64	28,22
B15/009	31,0041	30,7875	30,6692	30,82	0,14	0,45	30,82
B15/010	29,4086	29,5067	29,7737	29,56	0,15	0,52	29,56
B15/011	26,4608	28,4166	26,2136	27,03	0,99	3,65	27,01
B15/012	27,6358	27,7763	27,1531	27,52	0,27	0,97	27,52
B15/013	29,1131	28,7638	28,4372	28,77	0,28	0,96	28,77
B15/014	28,5632	27,7456	28,7678	28,36	0,44	1,56	28,36
B15/015	28,3913	28,8779	28,8844	28,72	0,23	0,80	28,72
B15/016	28,2337	28,2918	28,1894	28,24	0,04	0,15	28,24
B15/017	26,7437	28,5628	27,5613	27,62	0,74	2,69	27,61
B15/018	29,3851	29,4165	29,4388	29,41	0,02	0,07	29,41
B15/019	29,1893	29,6556	29,8879	29,58	0,29	0,98	29,58
B15/020	28,8696	28,7642	29,2331	28,96	0,20	0,69	28,95
B15/021	29,0125	29,0237	29,0648	29,03	0,02	0,08	29,03
B15/022	29,2798	29,4942	29,6361	29,47	0,15	0,50	29,47
B15/023	28,7131	28,3887	28,6628	28,59	0,14	0,50	28,59
B15/024	29,3279	29,4031	29,5546	29,43	0,09	0,32	29,43
B15/025	29,4821	29,3639	29,2025	29,35	0,11	0,39	29,35
B15/026	29,4827	29,7965	30,0916	29,79	0,25	0,83	29,79
B15/027	28,7447	28,9437	29,9336	29,21	0,52	1,78	29,20
B15/028	29,833	29,6312	29,9731	29,81	0,14	0,47	29,81
B15/029	29,9336	29,1155	28,8184	29,29	0,47	1,61	29,29
O15/006	30,6036	31,3942	30,7123	30,90	0,35	1,13	30,90
O15/007	29,8973	29,9273	30,5772	30,13	0,31	1,04	30,13
O15/008	29,2305	29,5991	29,5757	29,47	0,17	0,57	29,47
O15/009	29,605	29,5331	30,624	29,92	0,50	1,66	29,92
O15/010	29,7228	28,8263	28,8392	29,13	0,42	1,44	29,13

Tabulka 11: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *RPL32* z první reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	31,3065	31,2206	31,2268	31,25	0,04	0,13	31,25
B15/003	27,6939	27,9102	28,0219	27,88	0,14	0,49	27,88
B15/004	28,5528	28,5528	28,3561	28,49	0,09	0,33	28,49
B15/005	28,5273	28,9823	28,6889	28,73	0,19	0,66	28,73
B15/006	29,1056	29,7556	29,4013	29,42	0,27	0,90	29,42
B15/007	27,8515	27,8821	27,6885	27,81	0,08	0,31	27,81
B15/008	28,2798	28,2868	27,8489	28,14	0,20	0,73	28,14
B15/009	30,2471	30,7237	30,4363	30,47	0,20	0,64	30,47
B15/010	29,468	29,6465	28,3003	29,14	0,60	2,05	29,13
B15/011	27,8312	28,1696	27,9217	27,97	0,14	0,51	27,97
B15/012	25,8787	27,5847	27,74	27,07	0,84	3,12	27,05
B15/013	28,5692	28,3208	28,4012	28,43	0,10	0,36	28,43
B15/014	28,7702	28,6366	28,8682	28,76	0,09	0,33	28,76
B15/015	28,9718	25,8888	28,5987	27,82	1,37	4,94	27,79
B15/016				vyřazeno z technických důvodů			
B15/017	28,7414		28,546	28,64	0,10	0,34	28,64
B15/018	29,452	29,7634	29,559	29,59	0,13	0,44	29,59
B15/019	29,4412	29,1102	29,8568	29,47	0,31	1,04	29,47
B15/020	28,0724	27,3091	28,7942	28,06	0,61	2,16	28,05
B15/021	29,4642	29,3248	29,2676	29,35	0,08	0,28	29,35
B15/022	29,3407	29,4014	29,7038	29,48	0,16	0,54	29,48
B15/023	29,011	28,8125	29,1355	28,99	0,13	0,46	28,99
B15/024	29,4929	29,2224	29,3886	29,37	0,11	0,38	29,37
B15/025	29,4099	29,8116	29,5269	29,58	0,17	0,57	29,58
B15/026	27,6063	30,0983	30,0893	29,26	1,17	4,01	29,24
B15/027	29,4976	29,5539	29,458	29,50	0,04	0,13	29,50
B15/028	29,4964	29,7664	29,3427	29,54	0,18	0,59	29,53
B15/029	29,3275	29,5315	29,3194	29,39	0,10	0,33	29,39
O15/006	30,6728	30,8521	30,7211	30,75	0,08	0,25	30,75
O15/007	30,6312	30,243	31,2364	30,70	0,41	1,33	30,70
O15/008	28,4843	28,8916	29,7794	29,05	0,54	1,86	29,05
O15/009	29,2457	28,6638	29,3779	29,10	0,31	1,07	29,09
O15/010	27,8708	28,9227	28,867	28,55	0,48	1,69	28,55

Tabulka 12: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *RPL32* z druhé reverzní transkripce pro vzorky pupečnickové krve

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	25,9334	29,8269	31,1758	28,98	2,22	7,67	28,89
B15/003	28,7744	26,6163	27,2003	27,53	0,91	3,31	27,52
B15/004	26,9275	27,0148	27,0374	26,99	0,05	0,18	26,99
B15/005	25,9809	25,9941	25,9113	25,96	0,04	0,14	25,96
B15/006	27,8232	27,9952	27,9596	27,93	0,07	0,27	27,93
B15/007	25,4226	25,4592	25,2824	25,39	0,08	0,30	25,39
B15/008	29,2537	29,5081	29,3457	29,37	0,11	0,36	29,37
B15/009	28,8192	28,9532	29,0202	28,93	0,08	0,29	28,93
B15/010	29,2243	29,3162	29,6019	29,38	0,16	0,55	29,38
B15/011	31,3401	31,0663	31,4477	31,28	0,16	0,51	31,28
B15/012	29,0731	29,1737	29,3911	29,21	0,13	0,45	29,21
B15/013	31,2265	31,4557	31,3751	31,35	0,09	0,30	31,35
B15/014				malý výtěžek RNA			
B15/015	30,6375	30,732	30,9441	30,77	0,13	0,42	30,77
B15/016	27,8847	27,923	27,9085	27,91	0,02	0,06	27,91
B15/017	28,6826	28,8261	28,7584	28,76	0,06	0,20	28,76
B15/018	29,2814	28,3222	28,0675	28,56	0,52	1,83	28,55
B15/019	27,7699	25,8573	26,5683	26,73	0,79	2,95	26,72
B15/020	26,5271	26,9318	25,562	26,34	0,57	2,18	26,33
B15/021	25,0287	28,4105	26,1934	26,54	1,40	5,28	26,51
B15/022	25,2776	24,4143	24,513	24,73	0,39	1,56	24,73
B15/023	23,3904	23,8519	24,0687	23,77	0,28	1,19	23,77
B15/024	27,4816	29,9373	30,9319	29,45	1,45	4,92	29,41
B15/025	29,2468	27,5047	27,6066	28,12	0,80	2,84	28,11
B15/026	31,589	29,914	31,6323	31,05	0,80	2,58	31,03
B15/027	27,4507	28,2826	27,3052	27,68	0,43	1,56	27,68
B15/028	26,7274	26,6345	26,7304	26,70	0,04	0,17	26,70
B15/029	28,6844	27,6776	28,0335	28,13	0,42	1,48	28,13
O15/006	27,0672	26,9591	26,9354	26,99	0,06	0,21	26,99
O15/007	26,9527	26,6292	26,119	26,57	0,34	1,29	26,87
O15/008	30,0291	30,527	30,1351	30,23	0,21	0,71	30,23
O15/009	26,9488	27,023	26,9567	26,98	0,03	0,12	26,98
O15/010	26,2416	26,8095	27,0635	26,70	0,34	1,29	26,70

Tabulka 13: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *FCRN* z první reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	26,2746	28,0256	30,0704	28,12	1,55	5,52	28,08
B15/003	28,6349	26,9445	27,3958	27,66	0,71	2,58	27,65
B15/004	26,5687	26,8976	27,1959	26,89	0,26	0,95	26,89
B15/005	26,182	26,5229	26,8092	26,50	0,26	0,97	26,50
B15/006	28,0056	27,8841	27,8841	27,92	0,06	0,21	27,92
B15/007	25,6835	25,5388	25,6244	25,62	0,06	0,23	25,62
B15/008	29,4619	29,2792	29,3719	29,37	0,07	0,25	29,37
B15/009	28,986	28,9373	28,8635	28,93	0,05	0,17	28,93
B15/010	29,2007	29,1781	28,9663	29,12	0,11	0,36	29,11
B15/011	31,2794	30,7153	31,1046	31,03	0,24	0,76	31,03
B15/012	29,3595	29,3567	29,4665	29,39	0,05	0,17	29,39
B15/013	31,2519	31,3753	31,2515	31,29	0,06	0,19	31,29
B15/014				malý výtěžek RNA			
B15/015	30,8662	30,6385	30,5554	30,69	0,13	0,43	30,69
B15/016	27,6535	27,723	27,7242	27,70	0,03	0,12	27,70
B15/017	29,3004	29,2525	29,2645	29,27	0,02	0,07	29,27
B15/018	27,9524	28,1876	28,8122	28,32	0,36	1,28	28,32
B15/019	24,9543	26,2564	27,7844	26,33	1,16	4,39	26,31
B15/020	23,903	25,0648	27,0446	25,34	1,30	5,12	25,30
B15/021	31,386	28,6973	27,3947	29,16	1,66	5,70	29,11
B15/022	24,7562	24,2254	24,2219	24,40	0,25	1,03	24,40
B15/023	23,8055	23,4105	24,0297	23,75	0,26	1,08	23,75
B15/024	31,3923	28,6455		30,02	1,37	4,58	29,99
B15/025	28,474	28,4716	28,4423	28,46	0,01	0,05	28,46
B15/026	34,5741	31,5739	31,9314	32,69	1,34	4,09	32,67
B15/027	27,3708	27,3708	27,7699	27,50	0,19	0,68	27,50
B15/028	26,7197	26,7641	26,2525	26,58	0,23	0,87	26,58
B15/029	29,5736	29,9314	27,6692	29,06	0,99	3,42	29,04
O15/006	26,6669	26,8894	26,9973	26,85	0,14	0,51	26,85
O15/007	24,4534	24,9233	24,9264	24,77	0,22	0,90	24,77
O15/008	29,9384	29,7809	30,3927	30,04	0,26	0,86	30,04
O15/009	26,4802	26,4008	26,2416	26,37	0,10	0,38	26,37
O15/010	27,1669	27,3232	26,8643	27,12	0,19	0,70	27,12

Tabulka 14: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *FCRN* z druhé reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	19,9863	18,95	19,11	19,35	0,46	2,35	19,34
B15/003	20,9618	21,49	21,55	21,33	0,26	1,24	21,33
B15/004	17,7243	17,94	18,38	18,01	0,27	1,51	18,01
B15/005	17,8591	18,31	17,87	18,01	0,21	1,17	18,01
B15/006	19,1624	18,81	19,2	19,06	0,17	0,92	19,06
B15/007	17,7643	18,73	18,6	18,36	0,43	2,33	18,36
B15/008	21,4578	21,92	21,79	21,72	0,19	0,89	21,72
B15/009	18,8915	19,62	19,24	19,25	0,30	1,54	19,25
B15/010	21,3754	21,18	21,3	21,29	0,08	0,39	21,29
B15/011	22,5286	22,14	22,71	22,46	0,24	1,06	22,46
B15/012	21,3323	21,35	21,86	21,51	0,24	1,13	21,51
B15/013	21,4066	21,33	21,41	21,38	0,04	0,18	21,38
B15/014				malý výtěžek RNA			
B15/015	21,6422	22,51	22,06	22,07	0,35	1,60	22,07
B15/016	20,8033	20,45	20,41	20,55	0,18	0,86	20,55
B15/017	19,6269	19,63	20,05	19,77	0,20	1,00	19,77
B15/018	19,6497	19,52	19,79	19,65	0,11	0,55	19,65
B15/019	18,6229	18,52	19,05	18,73	0,23	1,22	18,73
B15/020	18,255	18,25	18,35	18,28	0,04	0,24	18,28
B15/021	19,3385	19,31	19,49	19,38	0,08	0,41	19,38
B15/022	18,0476	17,98	18,04	18,02	0,03	0,16	18,02
B15/023	18,0973	18,12	18,07	18,10	0,02	0,10	18,10
B15/024	20,9611	21,23	21,14	21,11	0,11	0,53	21,11
B15/025	19,9729	19,65	19,85	19,82	0,13	0,67	19,82
B15/026	22,7671	22,95	23,17	22,96	0,16	0,71	22,96
B15/027	19,0035	19,15	19,12	19,09	0,06	0,33	19,09
B15/028	21,225	20,92	22,55	21,57	0,71	3,29	21,55
B15/029	19,7289	19,41	20,3	19,81	0,37	1,85	19,81
O15/006	17,564	18,01	17,68	17,75	0,19	1,07	17,75
O15/007	17,8946	18,14	17,72	17,92	0,17	0,97	17,92
O15/008	19,9258	20,66	20,69	20,43	0,35	1,73	20,42
O15/009	18,6447	19,07	19,42	19,04	0,32	1,66	19,04
O15/010	18,8018	19,49	19,6	19,30	0,35	1,83	19,29

Tabulka 15: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *ACTB* z první reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	19,8987	19,5791	19,2124	19,56	0,28	1,43	19,56
B15/003	22,0813	21,2865	21,8873	21,75	0,34	1,56	21,75
B15/004	18,0101	17,9752	17,9405	17,98	0,03	0,16	17,98
B15/005	17,9424	18,1941	17,99	18,04	0,11	0,61	18,04
B15/006	18,495	19,2034	19,5593	19,09	0,44	2,32	19,08
B15/007	17,4693	18,1599	18,0336	17,89	0,30	1,68	17,89
B15/008	21,0156	21,3927	22,3519	21,59	0,56	2,61	21,58
B15/009	18,9779	19,1043	19,3496	19,14	0,15	0,81	19,14
B15/010	20,9743	21,0153	21,1939	21,06	0,10	0,45	21,06
B15/011	22,5487	22,4073	22,6981	22,55	0,12	0,53	22,55
B15/012	21,6038	21,5914	22,1943	21,80	0,28	1,29	21,79
B15/013	20,9098	21,0774	21,76	21,25	0,37	1,73	21,25
B15/014				malý výtěžek RNA			
B15/015	21,7244	21,4772	22,1799	21,79	0,29	1,34	21,79
B15/016	20,5199	20,0141	20,5083	20,35	0,24	1,16	20,35
B15/017	20,3393	19,7985	19,5798	19,91	0,32	1,60	19,90
B15/018	19,4699	19,5451	19,6867	19,57	0,09	0,46	19,57
B15/019	19,6521	19,2657	19,3118	19,41	0,17	0,89	19,41
B15/020	18,3148	18,4005	18,3131	18,34	0,04	0,22	18,34
B15/021	19,1673	19,1073	19,3035	19,19	0,08	0,43	19,19
B15/022	17,9762	17,9753	18,0651	18,01	0,04	0,23	18,01
B15/023	18,3386	18,2074	18,1274	18,22	0,09	0,48	18,22
B15/024	21,6025	21,5955	20,8088	21,34	0,37	1,75	21,33
B15/025	20,7766	19,8957	20,1802	20,28	0,37	1,81	20,28
B15/026	23,8894	23,0404	24,1758	23,70	0,48	2,03	23,70
B15/027	19,1339	19,3069	19,0868	19,18	0,09	0,49	19,18
B15/028	21,1156	22,5358	21,8645	21,84	0,58	2,66	21,83
B15/029	20,2571	20,221	20,1436	20,21	0,05	0,23	20,21
O15/006	17,696	18,4581	18,1083	18,09	0,31	1,72	18,08
O15/007	17,7656	17,6003	17,369	17,58	0,16	0,93	17,58
O15/008	20,0106	20,3447	20,2218	20,19	0,14	0,68	20,19
O15/009	18,3648	18,8496	19,1836	18,80	0,34	1,79	18,80
O15/010	18,8679	19,5619	19,7931	19,41	0,39	2,03	19,40

Tabulka 16: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *ACTB* z druhé reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	26,9408	27,1291	26,8016	26,96	0,13	0,50	26,96
B15/003	28,3748	28,5227	28,4079	28,44	0,06	0,22	28,44
B15/004	28,8187	28,1884	28,1229	28,38	0,31	1,11	28,37
B15/005	28,2977	28,28	28,2746	28,28	0,01	0,03	28,28
B15/006	28,502	28,7196	28,6861	28,64	0,10	0,33	28,64
B15/007	28,9038	29,0754	29,1241	29,03	0,09	0,33	29,03
B15/008	29,0828	31,1	31,2687	30,48	0,99	3,26	30,47
B15/009	28,9955	29,0583	29,3078	29,12	0,13	0,46	29,12
B15/010	30,9057	30,9607	31,2796	31,05	0,16	0,53	31,05
B15/011	30,9325	31,6768	31,7071	31,44	0,36	1,14	31,44
B15/012	30,437	30,86	31,0597	30,79	0,26	0,84	30,78
B15/013	32,3533	32,831	32,6207	32,60	0,20	0,60	32,60
B15/014				malý výtěžek RNA			
B15/015	33,0348	33,2076	33,1109	33,12	0,07	0,21	33,12
B15/016	31,2821	31,7015	31,8432	31,61	0,24	0,75	31,61
B15/017	29,6223	29,6621	29,585	29,62	0,03	0,11	29,62
B15/018	33,3934	33,4526	33,4085	33,42	0,03	0,08	33,42
B15/019	25,3141	25,7498	25,521	25,53	0,18	0,70	25,53
B15/020	26,0447	25,9316	26,0969	26,02	0,07	0,27	26,02
B15/021	25,8134	25,7825	25,5666	25,72	0,11	0,43	25,72
B15/022	27,7026	27,8527	27,8544	27,80	0,07	0,26	27,80
B15/023	27,7604	28,0662	28,7398	28,19	0,41	1,45	28,19
B15/024	27,4249	27,2582	27,3171	27,33	0,07	0,25	27,33
B15/025	28,249	28,6808	28,7154	28,55	0,21	0,74	28,55
B15/026	31,0223	31,2854	31,2568	31,19	0,12	0,38	31,19
B15/027	26,642	26,7656	26,8035	26,74	0,07	0,26	26,74
B15/028	29,603	29,7489	29,7792	29,71	0,08	0,26	29,71
B15/029	29,5025	29,3957	29,7475	29,55	0,15	0,50	29,55
O15/006	29,0332	30,4364	30,268	29,91	0,63	2,09	29,91
O15/007	26,4127	26,3501	26,08	26,28	0,14	0,55	26,28
O15/008	32,1022	32,7223	32,4797	32,43	0,26	0,79	32,43
O15/009	31,5072	31,5792	32,4565	31,85	0,43	1,36	31,84
O15/010	28,8219	29,7446	29,7291	29,43	0,43	1,47	29,43

Tabulka 17: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *RPL32* z první reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně

Vzorek	$C_T(1)$	$C_T(2)$	$C_T(3)$	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]	Geometrický průměr
B15/002	29,3416	29,1869	29,2517	29,26	0,063415	0,22	29,26
B15/003	28,7668	28,6388	28,6063	28,67	0,069283	0,24	28,67
B15/004	28,4113	27,7965	27,7665	27,99	0,297133	1,06	27,99
B15/005	28,6658	28,5276	29,3183	28,84	0,344821	1,20	28,84
B15/006	28,5776	28,7562	28,1858	28,51	0,238208	0,84	28,51
B15/007	29,2387	29,3626	29,0828	29,23	0,114482	0,39	29,23
B15/008	31,2212	31,2913	30,9416	31,15	0,151081	0,48	31,15
B15/009	29,1644	29,3763	28,936	29,16	0,179805	0,62	29,16
B15/010	31,1994	31,1231	31,025	31,12	0,071394	0,23	31,12
B15/011	31,661	31,1943	31,3555	31,40	0,193560	0,62	31,40
B15/012	31,0148	31,0745	31,0412	31,04	0,024415	0,08	31,04
B15/013	32,6558	32,5689	32,6716	32,63	0,045166	0,14	32,63
B15/014				malý výtěžek RNA			
B15/015	33,0999	33,2631	32,8221	33,06	0,182038	0,55	33,06
B15/016	31,0478	31,1423	31,1176	31,10	0,040004	0,13	31,10
B15/017	30,2442	30,6424	30,3128	30,40	0,173828	0,57	30,40
B15/018	33,4111	33,3964	33,0541	33,29	0,164896	0,50	33,29
B15/019	25,9849	26,307	26,3577	26,22	0,165092	0,63	26,22
B15/020	26,4682	26,3523	25,9178	26,25	0,236894	0,90	26,25
B15/021	26,1939	26,4425	26,3382	26,32	0,101914	0,39	26,32
B15/022	28,4526	28,1942	26,7813	27,81	0,734589	2,64	27,80
B15/023	27,7714	27,7717	27,9232	27,82	0,071459	0,26	27,82
B15/024	26,796	26,7033	26,7759	26,76	0,039850	0,15	26,76
B15/025	28,7912	29,1216	29,2284	29,05	0,186117	0,64	29,05
B15/026	31,8033	31,6277	31,7356	31,72	0,072309	0,23	31,72
B15/027	25,8331	26,0371	26,743	26,20	0,389872	1,49	26,20
B15/028	30,1937	29,9631	29,7514	29,97	0,180609	0,60	29,97
B15/029	28,9909	29,2289	28,9117	29,04	0,134800	0,46	29,04
O15/006	30,6368	30,5619	30,2695	30,49	0,158462	0,52	30,49
O15/007	25,6097	25,6768	25,7695	25,69	0,07	0,26	25,69
O15/008	32,2601	32,2803	31,9409	32,16	0,155456	0,48	32,16
O15/009	30,9916	30,8597	30,9743	30,94	0,058551	0,19	30,94
O15/010	30,5674	30,615	30,321	30,50	0,128851	0,42	30,50

Tabulka 18: Kontrola rozdílů mezi hodnotami C_T triplikátů pro gen *RPL32* z druhé reverzní transkripce pro vzorky placentární tkáně