

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**Mgr. Alexandra Muravská**

**Proteiny v těhotenství – molekulárně biologická  
a biochemická analýza**

**Pregnancy proteins – molecular biological and biochemical analysis**

Disertační práce

Školitelka: prof. MUDr. Marta Kalousová, PhD.

Konzultantka: RNDr. Marie Jáchymová, PhD.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 16. ledna 2012

Alexandra MURAVSKÁ

.....

# IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

MURAVSKÁ, Alexandra. *Proteiny v těhotenství – molekulárně biologická a biochemická analýza. [Pregnancy proteins – molecular biological and biochemical analysis]*. Praha, 2012. 110 s., 2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Školitelka Kalousová, Marta.

## ABSTRAKT

Cílem této disertační práce bylo zavést metodiky analýzy vybraných polymorfizmů genu *PAPP-A* (*Pregnancy-Associated Plasma Protein A*) a studovat genetické pozadí genu *PAPP-A* a sérové koncentrace *PAPP-A* a *PIGF* (*Placental Growth Factor*) ve vztahu k patologickému těhotenství. Dalším cílem bylo zavést metodiku dvourozměrné (2D) elektroforézy plodové vody.

Byla zavedena metoda na analýzu deseti polymorfizmů genu *PAPP-A*. Tyto polymorfizmy, sérové koncentrace *PAPP-A* a plasmatické koncentrace *PIGF* byly studovány u celkově 165 těhotných pacientek ve třetím trimestru gravidity s hrozícím předčasným porodem (N=98), preeklamsií (N=35), růstovou retardací plodu IUGR (N=34) a benigní těhotenskou cholestázou (N=15). 114 zdravých těhotných žen sloužilo jako kontroly. V rámci této práce byla zavedena 2D elektroforéza plodové vody.

U pacientek s preeklamsií jsme našli signifikantně častější výskyt genotypu TT polymorfizmu Cys327Cys (C/T) genu *PAPP-A* v porovnání s kontrolami. Pacientky s těhotenskou cholestázou vykazovaly trend k zvýšeným hladinám *PAPP-A*, kdežto u pacientek s hrozícím předčasným porodem byly tyto hodnoty spíše nižší. U pacientek s těhotenskou cholestázou a hrozícím předčasným porodem se hladiny *PIGF* nelišily od kontrolní skupiny. Pozitivní korelace *PIGF* s hladinami *PAPP-A* byla nalezena u skupiny zdravých těhotných kontrol. U pacientek s hrozícím předčasným porodem byl nalezen negativní vztah *PIGF* s hladinami erytrocytů a hemoglobinu v oběhu matky. U pacientek s IUGR byla nalezena negativní korelace *PIGF* s kreatininem.

Naše výsledky přispívají k pochopení patologických mechanismů komplikovaných těhotenství a mohou pomoci k efektivnější identifikaci rizikových pacientek s cílem včas zajistit vhodnou péči. Nicméně, pro potvrzení našich výsledků je potřeba další studium s větším počtem pacientek s patologickým těhotenstvím.

**Klíčová slova:** těhotenský protein; *PAPP-A*; placentární růstový faktor; *PIGF*; benigní těhotenská cholestáza; preeklampsie; jednonukleotidový polymorfizmus; gen; růstová retardace plodu; předčasný porod; sekvenace; plodová voda.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to establish methods for selected *PAPP-A* (*Pregnancy-Associated Plasma Protein A*) gene polymorphisms analysis and to study genetic background of *PAPP-A* and biochemical background of *PAPP-A* and *PIGF* (*Placental Growth Factor*) in relation to risk pregnancy. Secondly, the aim was to establish method for two-dimensional (2D) electrophoresis of amniotic fluid.

Methods for analysis of ten *PAPP-A* gene polymorphisms were established. These polymorphisms, *PAPP-A* and *PIGF* levels were studied in together 165 women in third trimester pregnancies complicated with threatening preterm labor (n=98), preeclampsia (n=35), IUGR (*Intrauterine Growth Restriction*) (n=34) and ICP (*Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*) (n=15). 114 healthy pregnant women served as controls. The method for 2D electrophoresis of amniotic fluid was established.

Preeclamptic patients had significantly higher frequency of TT genotype of Cys327Cys (C/T) *PAPP-A* gene polymorphism compared to controls. Patients with ICP had increased serum levels of *PAPP-A* compared to controls, in patients with threatening preterm labor *PAPP-A* levels were rather decreased. *PIGF* levels did not differ from control group in patients with ICP and threatening preterm labor. Positive correlation was found between *PAPP-A* and *PIGF* in group of healthy pregnant controls. Negative relationship was found between *PIGF* and erythrocytes and hemoglobin and between *PIGF* and creatinine in patients with threatening preterm labor and IUGR, respectively.

Our results contribute to better understanding of the pathological mechanisms in risk pregnancies and can help to more effectively identify high-risk patients to provide early and appropriate care. However, further study with larger groups of patients with risk pregnancies is needed to confirm our results.

**Key words:** pregnancy-associated plasma protein A; *PAPP-A*; placental growth factor; *PIGF*; intrahepatic cholestasis of pregnancy; preeclampsia; single nucleotide polymorphism; gene; intrauterine growth restriction; preterm labor; sequencing; amniotic fluid.

# PODĚKOVÁNÍ

Především bych ráda poděkovala mé školitelce prof. MUDr. Martě Kalousové, PhD., a mé konzultantce RNDr. Marii Jáchymové, PhD., z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za jejich odborné vedení a trpělivost, jakož i za cenné připomínky a podněty, které mi poskytly během mého studia a při zpracovávání této disertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat přednostovi Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., MBA, za možnost zapojit se do vědecké práce na tomto ústavu.

Děkuji také kolektivu Laboratoře imunochemie a molekulární diagnostiky Haně Řehákové, Ludmile Pourové a Evě Němcové za pomoc při experimentální části práce a Mgr. Janě Švarcové a Ditě Hudcové za pomoc se speciálními biochemickými analýzami.

Za pomoc při výběru pacientek pro tuto studii, jejich klinickou charakteristiku, orientaci v oblasti medicíny a mnoho dalších věcí jsem velmi vděčná své sestře MUDr. Anně Germanové, která byla mou velkou podporou při psaní této disertace.

A v neposlední řadě děkuji mému manželovi Michalovi za pomoc s jazykovou stránkou této práce, za jeho starostlivost a podporu, které mi celé mé studium velmi ulehčily. Děkuji také mým rodičům, kteří mě vychovali a vštípili mi touhu po dobrém vzdělání.

*Tato práce byla podporována výzkumným záměrem MZO 0000VFN2005 a GAUK 258051-41508.*

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>9</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
1.1 TĚHOTENSKÝ PROTEIN PAPP-A .....	11
1.1.1 Charakteristika a struktura PAPP-A molekuly .....	12
1.1.1.1 Metzincinová rodina metaloproteináz .....	14
1.1.1.2 PAPP-A homology .....	15
1.1.2 PAPP-A a jeho funkce .....	15
1.1.3 PAPP-A/proMBP komplex .....	17
1.1.4 Exprese PAPP-A in vivo .....	19
1.2 PLACENTÁRNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR PLGF .....	20
1.2.1 Izoformy PIGF .....	20
1.2.2 Funkce PIGF v těhotenství .....	21
1.3 MUTACE A POLYMORFIZMUS .....	22
1.3.1 Jednobodový polymorfizmus SNP .....	22
1.3.2 Jednobodové polymorfizmy genu PAPP-A .....	23
1.4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA PATOLOGICKÝCH STAVŮ V TĚHOTENSTVÍ .....	25
1.4.1 Diagnostika vrozených vývojových vad .....	25
1.4.2 Vyšetření plodové vody .....	26
1.4.3 Patologické stavy v těhotenství .....	27
<b>2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>31</b>
3.1 PARAMETRY KLINICKÉ STUDIE .....	31
3.1.1 Pacientky s patologickým těhotenstvím .....	31
3.1.2 Kontrolní skupiny .....	32
3.1.3 Krevní vzorky .....	32
3.2 MATERIÁL .....	33
3.2.1 Chemikálie a ostatní materiál .....	33
3.2.2 Přístroje .....	34
3.3 METODY .....	35
3.3.1 Izolace DNA .....	35
3.3.1.1 Princip metody .....	35
3.3.1.2 Roztoky .....	35
3.3.1.3 Pracovní postup .....	36
3.3.2 Koncentrace DNA .....	38
3.3.2.1 Princip metody .....	38
3.3.3 Sekvenování DNA .....	39

3.3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	39
3.3.3.2 Elektroforéza v agarózovém gelu .....	42
3.3.3.3 Sekvenování DNA .....	44
3.3.4 <i>Biochemické analýzy</i> .....	48
3.3.4.1 Stanovení PAPP-A v séru .....	48
3.3.4.2 Stanovení placentárního růstového faktoru (PIGF) v plasmě .....	49
3.3.4.3 Rutinní laboratorní parametry .....	50
3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	51
3.5 DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA PLODOVÉ VODY .....	51
3.5.1 <i>Princip metody</i> .....	52
3.5.2 <i>Roztoky</i> .....	52
3.5.3 <i>Pracovní postup</i> .....	54
3.5.3.1 Zpracování plodové vody .....	54
3.5.3.2 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové .....	55
3.5.3.3 2D-elektroforéza proteinů plodové vody .....	55
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>58</b>
4.1 IZOLACE DNA A KONCENTRACE DNA VE VZORCÍCH .....	58
4.2 ANALÝZA POLYMORFIZMŮ GENU PAPP-A .....	58
4.2.1 <i>Genotypová a alelická distribuce PAPP-A polymorfizmů</i> .....	58
4.2.1.1 Polymorfizmus Cys327Cys (rs12375498) genu <i>PAPP-A</i> .....	62
4.2.1.2 Polymorfizmus C/G (rs13290387) genu <i>PAPP-A</i> .....	64
4.2.2 <i>Biochemické parametry</i> .....	66
4.2.2.1 PAPP-A protein .....	66
4.2.2.2 PIGF .....	66
4.2.3 <i>Asociace genotypů a biochemických parametrů</i> .....	67
4.3 DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA PLODOVÉ VODY .....	71
<b>5 DISKUZE .....</b>	<b>73</b>
5.1 METODICKÁ ČÁST .....	73
5.2 VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE .....	74
5.2.1 <i>Polymorfizmy genu PAPP-A</i> .....	74
5.2.2 <i>Biochemické parametry</i> .....	76
5.3 DVOUROZMĚRNÁ ANALÝZA PLODOVÉ VODY .....	79
<b>6 ZÁVĚRY .....</b>	<b>81</b>
<b>7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>83</b>
<b>SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA .....</b>	<b>98</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>100</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2DE	dvourozměrná elektroforéza
ACE	angiotensin I convertující enzym
AFP	alfa-1-fetoprotein
AGT	angiotensinogen
ALT	alaninaminotransferáza
AMK	aminokyselina
ANOVA	analýza rozptylu (Analysis of Variance)
APS	amoniumpersulfát
AST	aspartátaminotransferáza
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
CCD	zařízení s vázanými náboji (Charge-Coupled Device)
CCP	protein regulující komplement (Complement Control Protein)
CMV	cytomegalovirus
CRP	C-reaktivní protein
CYP-17	cytochrom P450, rodina 17
dbSNP	databáze jednonukleotidových polymorfizmů
ddNTP	dideoxyribonukleotid fosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid fosfát
DS	Downův syndrom
EBV	virus Epstein-Barrové
EC	klasifikační číslo enzymů (Enzyme Commission number)
ELISA	enzymoimunochemické stanovení (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého (endothelial Nitric Oxide Synthase)
hCG	choriový gonadotropin
hPL	lidský placentární laktogen
HWE	Hardy-Weinbergovo ekvilibrium
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IGF	inzulínu podobný růstový faktor - 1 (Inzuline-like Growth Factor-1)

IGFBP	protein vázající inzulínu podobný růstový faktor (Inzulin-like Growth Factor Binding Protein)
IL	interleukin
IPG	zakotvený pH gradient (Immobilised pH Gradient)
IUGR	růstová retardace plodu (Intrauterine Growth Restriction)
LNR	Lin12/Notch repeticce
MMP	matrixová metaloproteináza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NCBI	Národní Centrum Biotechnologických Informací
NB	nosní kůstka (Nasal Bone)
NT	nuchální translucence
PAGE	polyakryl amidová gelová elektroforéza
PAPP-A	těhotenský protein (Pregnancy-Associated Plasma Protein A)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PD	proteolytická doména
PlGF	placentární růstový faktor (Placental Growth Factor)
proMBP	proforma hlavního bazického eozinofilního proteinu (proform of Eosinophil Major Basic Protein)
RAGE	receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (Receptor for Advanced Glycosylation End Products)
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)
SP1	$\beta$ -glykoprotein specifický pro těhotenství
TLR4	receptor podobný Toll 4 (Toll-Like Receptor 4)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )
TRACE	zesílená emise kryptátu rozložená v čase (Time Resolved Amplified Cryptate Emission)
uE3	nekonjugovaný estriol
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

# 1 ÚVOD

Těhotenství je jedním z nejdůležitějších fyziologických procesů lidského života. Na počátku těhotenství se v těle matky vytváří fetoplacentární jednotka, v které dochází ke komunikaci krevního oběhu matky a plodu. Proteiny produkované fetoplacentární jednotkou jsou důležité pro fyziologický vývoj plodu a jsou detekovatelné především v krevním oběhu matky a v plodové vodě. Některé z těchto proteinů jsou důležitými markery v současnosti využívanými v diagnostice vrozených vývojových vad. Nejnovější výzkum dokazuje, že těhotenské proteiny mohou být využity jako markery dalších patologických stavů v těhotenství i jiných onemocnění nesouvisejících s těhotenstvím.

## 1.1 Těhotenský protein PAPP-A

Těhotenský protein PAPP-A (*Pregnancy-associated Plasma Protein A*) byl původně objeven v séru těhotných žen v roce 1974 spolu s dalšími těhotenskými proteiny PAPP-B, PAPP-C, PAPP-D [1]. PAPP-C je známý také jako  $\beta$ -glykoprotein specifický pro těhotenství (SP1) a PAPP-D jako lidský placentární laktogen (hPL). Následný výzkum přinesl optimistické výsledky pro případné využití proteinu PAPP-A v diagnostice patologických stavů v těhotenství [2]. Do popředí zájmu se protein PAPP-A opět dostal až prací z roku 1990 [3], ve které byly popsány snížené sérové hladiny PAPP-A v prvním trimestru těhotenství s Downovým syndromem. Od té doby je PAPP-A protein považován za jeden z nejdůležitějších biochemických markerů fetálních aneuploidí. Rutinně je využíván pro biochemický screening Downova syndromu v 1. trimestru gravidity spolu s volnou podjednotkou choriogonadotropinu  $\beta$ -hCG [4].

Stále více studií potvrzuje, že snížené hladiny PAPP-A v prvním trimestru gravidity souvisí s komplikacemi v dalším průběhu těhotenství jako je předčasný porod, růstová retardace plodu, preeklampsie nebo narození mrtvého plodu [5]. U pacientek s preeklampsií však byly ve třetím trimestru gravidity zjištěny zvýšené hladiny PAPP-A proteinu v séru [6].

V současnosti tento protein nelze považovat za čistě „těhotenský“. Detekovaný byl v nízkých koncentracích také u netěhotných žen a mužů. Navíc, stále víc poznatků

z výzkumu PAPP-A proteinu indikuje jeho potenciální využití v diagnostice dalších nemocí [7-9].

V těhotenství je PAPP-A protein syntetizován především buňkami placenty syncytiotrofoblasty, jeho produkce byla detekována také v trofoblast-odvozených X buňkách [10]. V koncentracích 100-1000krát nižších než v prvním trimestru gravidity je tento protein exprimován v dalších reprodukčních tkáních žen, např. ovariích, vejcovodu, endometriu a myometriu u žen po menopauze. Místem jeho syntézy je i prostata a nereprodukční tkáně žen a mužů, např. ledviny, tlusté střevo, buňky kostní dřevě, prsní žláza a patofyziologicky změněné tkáně jako karcinom prsu a prostaty.

Dále byla sekrece PAPP-A proteinu prokázána u buněk jako osteoblasty, fibroblasty, buňky hladké svaloviny a granulované buňky, které všechny vykazují IGFBP-4 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4*) proteinázovou aktivitu závislou na IGF (*Insulin-like Growth Factor*) [11].

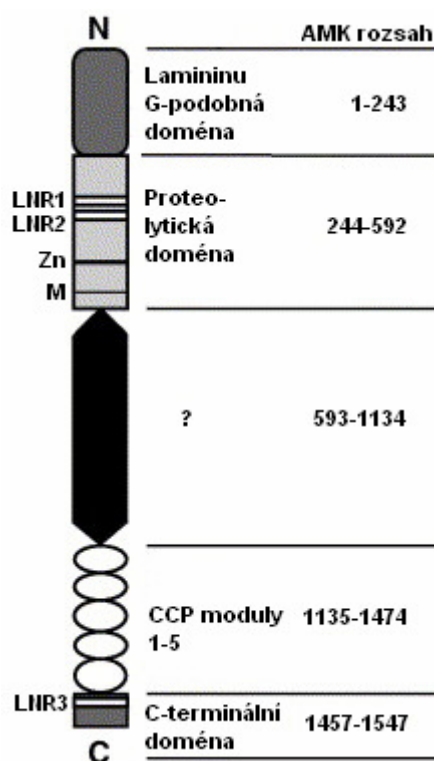
PAPP-A není exprimován makrofágy [12]. Po jeho sekreci dochází k vazbě na buněčný povrch autokrinním/parakrinním způsobem [13-14].

### 1.1.1 Charakteristika a struktura PAPP-A molekuly

Těhotenský protein PAPP-A (pappalysin-1, EC 3.4.24.79) je glykoprotein patřící do skupiny metaloproteináz. Výsledkem translace je prekurzorový prepro-protein o délce 1627 aminokyselin s N-terminální signální sekvencí 22 aminokyselin a propeptidem délky 58 aminokyselin. Propeptid je vysoce bazický, pI 12.9 je výsledkem přítomnosti 17 Arg zbytků a jenom tří kyselých zbytků [15]. Funkce propeptidu nebyla dosud objasněna a zdá se, že není esenciální ani pro skládání nebo sekreci proteinu [16]. Samotný protein odvozený z preproproteinu obsahuje 1547 aminokyselin s pI 5.4 a molekulární hmotností 200kDa. Biochemické analýzy odhalily celkem 82 Cys zbytků, které se všechny podílejí na disulfidové vazbě, dále 14 N-glykosylačních míst a 7 míst pro vazbu glykosaminoglykanů. Tato molekula obsahuje také  $Zn^{2+}$  vázající místo charakteristické pro mnoho metaloproteináz [17].

PAPP-A protein obsahuje pět základních domén (Obrázek 1-1, strana 13). N-terminální doména, dlouhá 243 aminokyselinových zbytků, připomíná strukturu lamininu G (*Laminin G-like domain*). Tato doména se v molekule lamininu opakuje pětkrát v oblasti  $\alpha$ -řetězce. Smyčky vyčnívající ve struktuře dvou zakřivených  $\beta$ -listů jsou odpovědné za vazbu ligandů, jako jsou proteiny, steroidy, nebo glykany [18].

N-terminální doména je esenciální pro expresi PAPP-A a předpokládá se její vliv na stabilitu proteolytické domény [19].



**Obrázek 1-1.** Schematický diagram doménového uspořádání PAPP-A proteinu (převzato a upraveno podle [12]). AMK – aminokyselina; LNR - Lin-12/Notch repetice; Zn – zinek- vázající sekvence; M – Met-otáčka; CCP – protein regulující komplement.

Proteolytická doména je dlouhá asi 350 aminokyselin a je odpovědná za schopnost PAPP-A molekuly štěpit IGFBP-4. Má globulární  $\alpha+\beta$  strukturu. V této doméně se vyskytují dva moduly LNR (Lin-12/Notch repetice), dlouhé asi 26 aminokyselin. Třetí LNR modul byl popsán v koncové C-terminální doméně. Tyto domény byly mimo PAPP-A protein popsány jenom u tzv. Notch proteinů, transmembránových proteinů, které se zásadně podílejí na vývojových procesech [20]. Lin-12 motiv byl popsán u *Caenorhabditis elegans* [12]. PAPP-A varianty s delecí LNR modulů nejsou schopny štěpit IGFBP-4, což naznačuje, že tyto oblasti jsou esenciální pro proteolytickou funkci enzymu.

Dalším strukturním motivem proteolytické domény je zinek-vázající sekvence **HEXXHXXGXXH** a Met-otáčka [17]. Tyto dva motivy jsou charakteristickými prvky metzincinové rodiny metaloproteináz. Součástí aktivního místa enzymu je ion zinku, který je vázán třemi histidinovými zbytky (zvýrazněny tučně). Hydrolýza je iniciována, když glutamátový zbytek (podtržený, v řetězci PAPP-A na pozici 483) aktivuje molekulu vody navázanou na ion zinku. Methionin, který je striktně konzervován v sekvenci metzincinů, je lokalizován v  $\beta$ -otáčce pod ionem zinku (pozice 556 v řetězci PAPP-A) [21].

Funkce třetí domény, ležící v centrální části molekuly PAPP-A, není dosud objasněna. Obsahuje přibližně 500 aminokyselinových zbytků.

Čtvrtá doména se skládá z pěti kopií CCP (*Complement Control Protein*) modulu. Ten je tvořen asi 60 aminokyselinovými zbytky se strukturou  $\beta$ -skládaného listu a je možné ho najít v různých proteinech, včetně selektinů a proteinů komplementu [22]. Tato doména je zodpovědná za vazbu proteinu na buněčný povrch [12].

#### **1.1.1.1 Metzincinová rodina metaloproteináz**

Metzincinová rodina metaloproteináz se dělí do pěti podskupin podle počtu aminokyselin rozdělujících zinek-vázající sekvenci a Met-otáčku (Kapitola 1.1.1, strana 12). Původně čtyři zástupce matrixiny (matrixové metaloproteinázy), serralysiny, astaciny a adamalsiny doplnila pátá podskupina pappalysinů [21] s délkou rozdělující sekvence 63 aminokyselin (Tabulka 1-1, strana 15). Prvním zástupcem této podskupiny se stal těhotenský protein PAPP-A. Druhým zástupcem je PAPP-A2 protein (*Pregnancy-Associated Plasma Protein A2*), který je ze 45% homologní s PAPP-A a na rozdíl od této molekuly není schopen vázat se na povrch buněk [23]. Nejnovějším zástupcem pappalysinů je ulilysin izolovaný z archeonu *Methanosarcina acetivorans* z kmene *Euryarchaeota* [24]. Proulilysin má velikost 38 kDA, přičemž obsahuje pouze pro doménu a katalytickou doménu. Vykazuje sekvenční similaritu s molekulou PAPP-A. V roce 2006 skupina Tallantové a spol. [24] spolu s jeho objevením popsala také jeho krystalickou strukturu a poskytla tak model trojrozměrné struktury proteolytické domény pappalysinů.

**Tabulka 1-1.** Metzincinová rodina metaloproteináz – příklady zástupců a charakteristická délka sekvence rozdělující Zn-sekvenci a Met-otáčku.

<i>Rodina</i>	<i>Příklady zástupců</i>	<i>Počet AMK</i>
Matrixiny	Matrilysin, Kolagenáza I, II	7
Serralysiny	bakteriální proteinázy	27-28
Astaciny	Kostní morfogenetický protein 1	44-46
Adamalysiny	proteinázy hadího jedu	13-19
Pappalysiny	PAPP-A, PAPP-A2, ulilysin	63

AMK – aminokyselina

### 1.1.1.2 PAPP-A homology

Aminokyselinové sekvence PAPP-A homologů vykazují významnou konzervaci, která indikuje esenciální funkci PAPP-A proteinu u savčích druhů. Například aminokyselinová sekvence lidské a myší nebo potkaní PAPP-A se shodují v 91 procentech [25]. PAPP-A protein byl popsán také u dalších obratlovců včetně rybích druhů *Fugu rubripes* (60% shoda s lidskou PAPP-A) nebo *Tetraodon nigroviridis* (50% shoda s lidskou PAPP-A). U bezobratlých živočišných druhů nebyl tento protein nalezen [12].

### 1.1.2 PAPP-A a jeho funkce

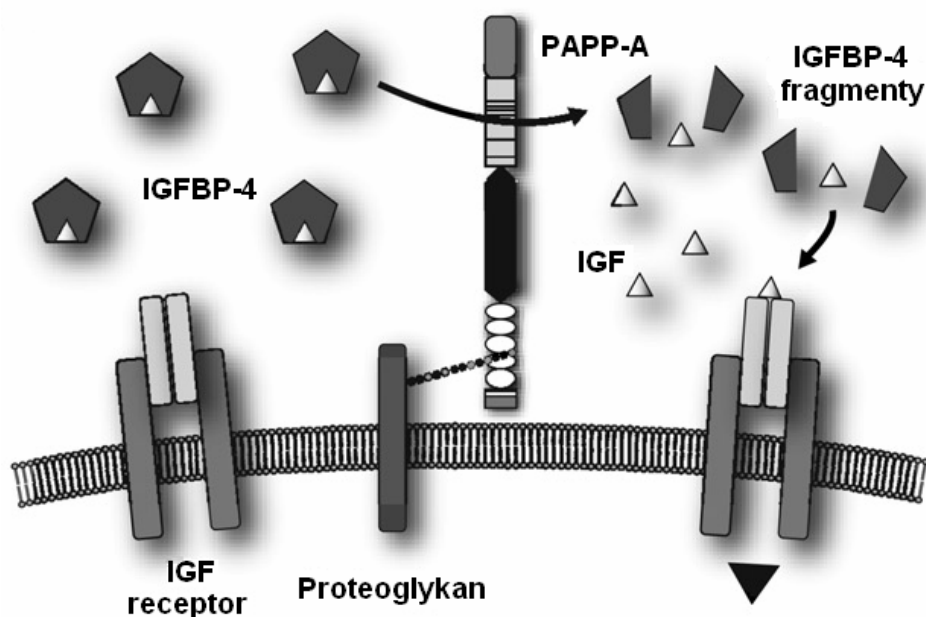
Biologická funkce PAPP-A proteinu byla objasněna až v roce 1999 [26], kdy byla z lidských fibroblastů izolována IGFBP-4 proteináza závislá na IGF a posléze charakterizována jako těhotenský protein PAPP-A.

IGFBP-4 (*Inzulin-like Growth Factor-Binding Protein 4*) působí v buňce jako inhibitor IGF-I a IGF-II (*Inzulin-like Growth Factor I a II*) molekul, ke kterým se váže s vysokou afinitou a zabraňuje tak jejich interakci s IGF-I receptorem. PAPP-A štěpí IGFBP-4 uprostřed molekuly a tím dochází k významnému poklesu afinity k IGF molekulám. Ty se pak vážou k receptoru a aktivují signály buněčného růstu a přežití [26-30] (Obrázek 1-2, strana 16).

Interakce PAPP-A s IGFBP-4 je závislá na přítomnosti IGF-I nebo IGF-II. Vazba těchto molekul na IGFBP-4 usnadňuje její proteolýzu PAPP-A molekulou [31].

Novější studie z této oblasti naznačují, že kromě IGFBP-4 slouží jako substráty pro PAPP-A enzym také IGFBP-2 a IGFBP-5 [32, 33]. Proteolýza IGFBP-2 PAPP-A proteinem vykazuje závislost na IGF, naproti tomu štěpení IGFBP-5 je na přítomnosti IGF nezávislé [32, 34]. Studie z roku 2004 prokázala, že za substrátovou specifitu PAPP-A proteinu jsou v molekule enzymu odpovědné LNR moduly (viz. kapitola 1.1.1, strana 12). Nepřítomnost těchto modulů v molekule enzymu způsobuje kompletní ztrátu proteolytické aktivity vůči IGFBP-4, přičemž schopnost štěpit IGFBP-5 zůstává zachována [35].

Kromě IGFBP proteolytické aktivity se PAPP-A vyznačuje schopností štěpit sama sebe, což je vlastnost, kterou vykazují i další proteiny ze skupiny metzincinů [36]. Místo štěpení je lokalizováno v místě LNR2 modulu proteolytické domény PAPP-A a výsledkem reakce jsou fragmenty s molekulární hmotností 150kDa a 50kDa. Význam této autoproteolýzy není dosud znám.



**Obrázek 1-2.** Vliv PAPP-A proteinu na signální dráhu IGF. IGF molekula vázaná v komplexu s IGFBP-4 není schopna interakce s IGF receptorem. Po proteolýze IGFBP-4 enzymem PAPP-A se afinita vzniklých fragmentů k IGF snižuje a uvolněné molekuly IGF se tak mohou vázat na receptory a tím aktivovat IGF signální dráhy.



### 1.1.3 PAPP-A/proMBP komplex

PAPP-A se v séru a plazmě těhotných žen vyskytuje jako heterotetramér PAPP-A/proMBP, složený ze dvou podjednotek PAPP-A a dvou podjednotek proMBP (*proform of Eosinophil Major Basic Protein*) vázaných disulfidovými vazbami s molekulární hmotností zhruba 500kDa (Obrázek 1-3, strana 18) [37]. Podjednotky PAPP-A/proMBP komplexu mohou být irreverzibilně odděleny pomocí redukce disulfidových vazeb a denaturace.

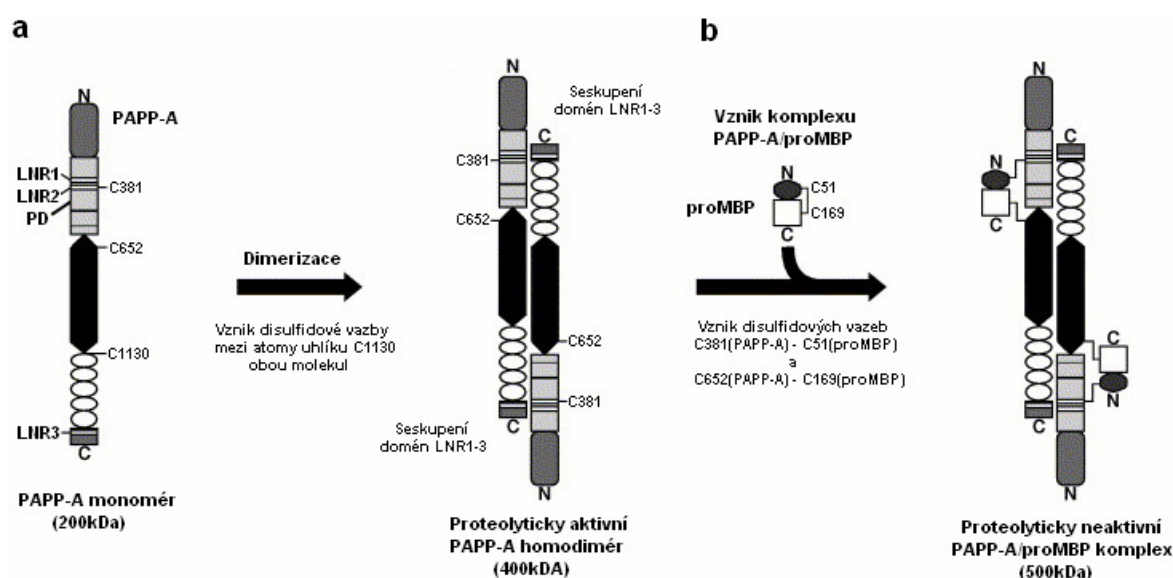
ProMBP o molekulové hmotnosti 38kDa je složen z pro-domény, která obsahuje 90 vysoce kyselých aminokyselinových zbytků s pI 4.0 a je do značné míry glykosylována [38]. Naproti tomu 117 aminokyselin dlouhá MBP-doména je vysoce bazická s pI 11.0 bez evidence glykosylace [39, 40]. V těhotenství proMBP vytváří také 2:2 komplex s angiotensinogenem a 2:2:2 komplex proMBP/angiotensinogen/komplement C3dg [41]. Koncentrace posledně zmíněného heterohexaméru v séru stoupá během koagulace krve, což naznačuje aktivaci komplementu v krvi [42].

Zralý MBP protein je pro savčí buňky cytotoxický a představuje víc než 50% bílkovinného obsahu v granulích eosinofilů [43, 44]. Degranulací je z eosinofilů uvolňován a podílí se tak na efektorových funkcích těchto buněk [45].

Místem syntézy proMBP jsou na rozdíl od PAPP-A proteinu jenom X-buňky placenty, což naznačuje, že kovalentní vazba mezi podjednotkami komplexu vzniká v extracelulárním prostoru po sekreci. Více než 99% sekretovaného PAPP-A proteinu je v séru těhotných žen vázáno do PAPP-A/proMBP komplexu. Stopové množství PAPP-A (méně než 1%) se v séru nachází volně, nevázáno do komplexu, a vykazuje až 100krát vyšší proteolytickou aktivitu, než PAPP-A/proMBP komplex. Tento fakt ukazuje na to, že proMBP protein slouží jakožto přirozený proteinasový inhibitor *in vivo*. Měřitelná aktivita PAPP-A/proMBP komplexu je pravděpodobně dána přítomností minoritní subpopulace částečně inhibovaného PAPP-A v 2:1 komplexu s proMBP. Protože v séru těhotných žen je koncentrace PAPP-A značně zvýšená, inhibice proMBP proteinem je důležitým mechanismem, který zabraňuje dramatickému zvýšení IGFBP-4 proteinázové aktivity v oběhu. Naproti tomu, lokálně zvýšená IGFBP-4 proteinázová aktivita se uplatňuje v procesu vývoje placenty [16]. Tento typ interakce, při které dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi enzymem a jeho inhibitorem, představuje nový mechanismus inhibice proteináz [16].

Majoritní část PAPP-A se v těhotenství vyskytuje v komplexu s proMBP [37], kdežto u akutních koronárních syndromů je jedinou relevantní formou její volná forma [46].

Podíl mezi specifickou hladinou proMBP a PAPP-A mRNA se v placentě během těhotenství mění. Exprese m-RNA obou proteinů je na začátku těhotenství nižší a v průběhu těhotenství stoupá až do období porodu. Hladina PAPP-A m-RNA však roste relativně více, než hladina proMBP m-RNA. To odpovídá také změnám v molárním poměru PAPP-A:proMBP v séru, kdy na začátku těhotenství je pozorován poměr exprese 1:10, přičemž ve třetím trimestru je tento poměr pouze 1:4 [11].

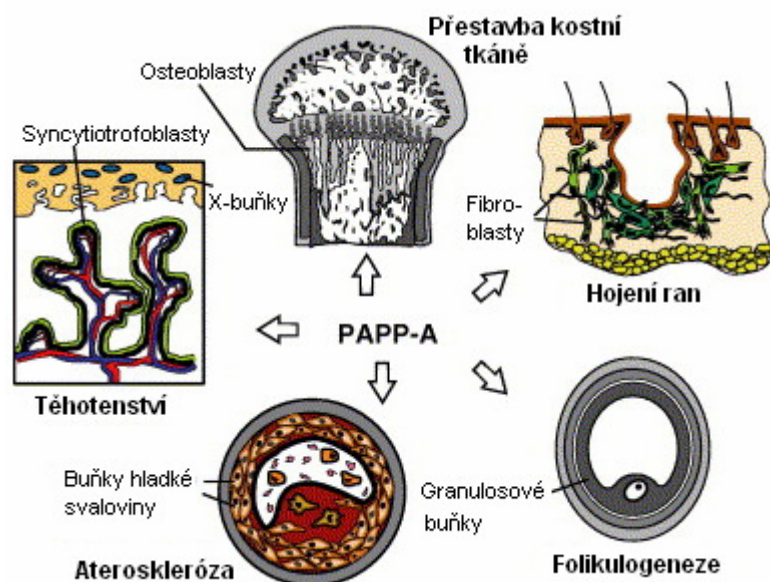


**Obrázek 1-3.** (převzato a upraveno podle [12]). Tvorba diméru a heterotetraméru PAPP-A. (a) Po počáteční nekovalentní interakci mezi dvěma molekulami (200kDa) dochází ke vzniku disulfidové vazby mezi atomy uhlíku C1130 každé podjednotky. Vzniká proteolyticky aktivní PAPP-A homodimér (400kDa), kterého podjednotky jsou uspořádány antiparalelně. Přitom dochází ke vzájemnému přiblížení modulů LRN 1, 2 a 3, které tak vytváří společnou funkční jednotku [35]. (b) Volné thiolové skupiny PAPP-A (atomy uhlíku C381 a C652) se zúčastňují na kovalentní vazbě mezi PAPP-A a proMBP, přičemž vzniká proteolyticky neaktivní heterotetramerní komplex (500kDa). PD – proteolytická doména.

### 1.1.4 Exprese PAPP-A *in vivo*

U zdravých jedinců jsou sérové hladiny PAPP-A proteinu velmi nízké [7, 8]. V průběhu fyziologického těhotenství koncentrace PAPP-A v séru lineárně stoupá až do doby porodu a po něm jeho hladina klesá s biologickým poločasem 3-4 dni [47].

PAPP-A slouží v organismu jako regulátor IGF molekul, které jsou nezbytné pro normální růst během fetálního vývoje a optimální plodnost v reprodukčním věku [48]. Zvýšená exprese PAPP-A byla pozorována při hojení ran v granulační tkáni pokožky v místě rány a přilehlých oblastech spolu s aktivací makrofágů a myofibroblastů [49]. Tyto poznatky naznačují cílenou a regulovanou expresi PAPP-A při procesech akutního poškození a přestavby tkáně *in vivo*. Dalšími procesy, při kterých se uplatňuje tento protein, jsou ovariální folikulární vývoj a vývoj a růst placenty [50-52]. Navíc, studie z roku 2001 a 2006 naznačují možné patologické působení PAPP-A proteinu v odpovědi na chronické poškození, jelikož jeho zvýšená exprese byla pozorována u nestabilních aterosklerotických plátů v asociaci s aktivovanými makrofágy a buňkami hladké svaloviny [7, 53]. Lze tedy říci, že PAPP-A protein se uplatňuje v lidské tkáni v rozmanitých biologických procesech zahrnujících rychlý a striktně kontrolovaný růst a vývoj, jako je hojení ran, přestavba kostní tkáně, folikulogeneze, vývoj placenty a ateroskleróza (Obrázek 1-4).



**Obrázek 1-4.** Místa syntézy PAPP-A proteinu v lidské tkáni (převzato a upraveno podle [12]).

## 1.2 Placentární růstový faktor *PlGF*

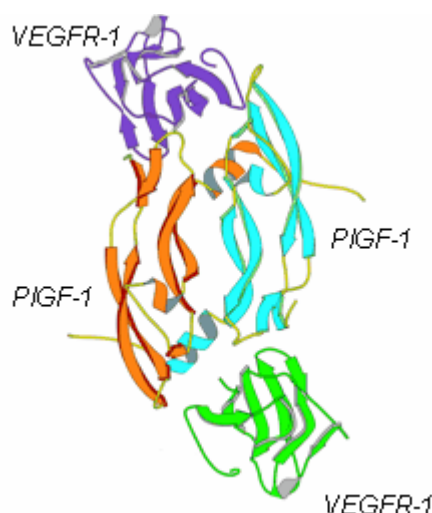
Placentární růstový faktor *PlGF* (*Placental Growth Factor*) je protein patřící do *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) rodiny, která se uplatňuje ve vývoji a růstu vaskulárního a lymfatického endotelu, zejména v průběhu embryogeneze [54]. Tato rodina dále zahrnuje vaskulární endoteliální faktory *VEGF/VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* a *VEGF-E* (virový). *PlGF* byl poprvé popsán v roce 1991 [55] a o 10 let později byla objasněna jeho trojrozměrná struktura (Obrázek 1-5, strana 21) [56]. *PlGF* a *VEGF-A* se shodují ve 42% aminokyselinové sekvence a jejich struktury dosahují značné podobnosti. Lidský *PlGF* gen je lokalizován na chromozomu 14 a čítá celkově 7 exonů [57].

Za fyziologických podmínek je *PlGF* primárně exprimován buňkami placenty trofoblasty během těhotenství [58]. Produkovaný je také tkáněmi jako srdce, plíce, štítná žláza a uplatňuje se u některých patologických stavů jako je hojení ran nebo regulace růstu a angiogeneze u nádorů [59].

### 1.2.1 Izoformy *PlGF*

V důsledku alternativního splicingu primárního transkriptu se lidský *PlGF* vyskytuje ve čtyřech izoformách: *PlGF-1*, *PlGF-2*, *PlGF-3* a *PlGF-4* [57, 60, 61]. Ty se liší ve své velikosti, vlastnostech sekrece i afinitách vazby. *PlGF-1* je homodimér s molekulární hmotností ~46kDa s velikostí 131 aminokyselin/monomer. Placentární růstový faktor-2 je 152 aminokyselin dlouhý a jako pre-protein obsahuje 18 aminokyselinou signální sekvenci. Proti *PlGF-1* obsahuje navíc vysoce bazickou sekvenci (21 aminokyselin), která je odpovědná za vazbu na heparin. *PlGF-3*, který obsahuje 203 aminokyselin, a *PlGF-1* se vážou na receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor *VEGFR-1* (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*). Tato vazba způsobuje amplifikaci signálu receptoru *VEGFR-2* a tím dochází k zesílení *VEGFR*-řízené odpovědi [62]. *PlGF-4* obsahuje navíc od *PlGF-3* doménu odpovědnou za vazbu na heparin [61].

U myši byl nalezen pouze homolog *PlGF-2*, který je identický ze 65% s odpovídající lidskou izoformou [63].



**Obrázek 1-5.** Trojrozměrná struktura PIGF-1 (převzato a upraveno podle [56]). Interakce dvou monomerů PIGF-1 (oranžová a modrá barva) s receptorem VEGFR-1 (zelená a fialová barva).

### 1.2.2 Funkce PIGF v těhotenství

Angiogeneze, tvorba nových cév z již existujícího endotelu, patří mezi klíčové procesy ve formaci placenty. Do tohoto procesu jsou zapojeny různé faktory, které buď tyto procesy usnadňují, nebo jej naopak potlačují. Tyto faktory jsou důležité pro správný vývoj placenty a plodu. Snížené hladiny placentárního růstového faktoru PIGF v séru matky jsou důležitým ukazatelem placentární dysfunkce [64]. Na druhé straně, PIGF  $-/-$  myš je fertilní, normálního vzhledu. V důsledku toho není funkce tohoto proteinu v embryonálním vývoji cév plně objasněna [65]. Z vícero studií různých vaskulárních onemocnění vyplývá, že PIGF má jak angiogenní, tak antiangiogenní funkci, závislou na patofyziologických podmínkách. Vazbou na receptor VEGFR-1 může PIGF nasměrovat vaskulární endoteliální faktor VEGF k receptoru VEGFR-2 a tím podpořit angiogenezi [66]. Naopak heterodimery VEGF/PIGF mohou angiogenezi potlačit [67].

Hladiny PIGF ve fyziologickém těhotenství postupně stoupají až do konce druhého trimestru a poté postupně klesají až do období porodu [68].

## 1.3 Mutace a polymorfismus

Obecně vzato se lidský genom pokládá za vysoce stabilní, přesto v něm dochází k různým typům mutací. Buď se jedná o *somatické* mutace, které vznikají v tělových buňkách jedince, nebo o *gametické* mutace, které jsou dědičné a postihují buňky zárodečné dráhy. Podle rozsahu pak vznikají mutace *genomové* (dochází k abnormálnímu rozdělení chromozomů během buněčného dělení, např. Downův syndrom), *chromozomální* (změny struktury chromozomů, např. mikrodelece chromozomu 22q11.2) nebo *genové*, u kterých dochází ke změně nukleotidů uvnitř genu a které mohou ovlivnit funkci genu.

V rámci genových mutací pak může docházet k *delecím*, *inzercím* a *substitucím* a to u jednoho nebo více nukleotidů uvnitř genu.

Je nutno rozlišit pojem *mutace* a *polymorfismus*. Již v roce 1940 Ford et al. [69] definoval genetický polymorfismus jako přítomnost více než jedné alely (formy genu) v tomtéž lokusu minimálně u 1% sledované populace. Naproti tomu u mutace je změna nukleotidu přítomna velmi zřídka, standardně u méně než 1% procenta sledované populace. V lékařské genetice se pojem mutace používá k popisu změny DNA, která reprezentuje abnormální formu genu a je přítomna u skupiny lidí s určitou patologií, přičemž u zdravých kontrol se nenachází. V dalším textu jsou diskutovány jediné mutace vyskytující se u více než jednoho procenta sledované populace, tedy polymorfizmy.

### 1.3.1 Jednobodový polymorfismus SNP

Nejjednodušší typ genetického polymorfizmu je jednobodový polymorfismus SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). U tohoto typu polymorfizmu dochází ke změně jednoho nukleotidu v sekvenci DNA.

SNP se může vyskytovat v kódujících oblastech genu (*exonech*), v nekódujících oblastech genu (*intronech*) a v oblastech mezi geny. Jednobodový polymorfismus lokalizovaný v kódující sekvenci nemusí nutně způsobit změnu v aminokyselinové sekvenci proteinu, který kóduje, a to díky degeneraci genetického kódu. Stejnou aminokyselinu kóduje více kodonů, které se nejčastěji liší ve své třetí pozici, například kodony GAA a GAG oba kódují aminokyselinu glutamin. Proto to, zda dojde ke změně

aminokyseliny v proteinovém řetězci je závislé na tom, ve které pozici v kodonu dochází ke změně nukleotidu.

Polymorfismus, který nezpůsobuje změnu aminokyseliny, se označuje *synonymní* (tichá mutace). Dochází-li ke změně aminokyseliny, jedná se o *nesynonymní* polymorfismus. SNP, který nespadá do kódující oblasti genu, může mít vliv na funkci genu na úrovni splicingu (sestříhu) m-RNA, vazby transkripčních faktorů, může ovlivnit také sekvenci nekódující RNA, nebo stabilitu proteinu.

Jednobodový polymorfismus tvoří až 90% všech genetických mutací u lidí a v lidském genomu se objevuje s frekvencí 300-1000 bazí [70].

### 1.3.2 Jednobodové polymorfizmy genu PAPP-A

Gen pro lidský těhotenský protein PAPP-A byl v roce 1993 lokalizován na chromozomu 9q33.1 [71]. 200 000 bazí dlouhý gen obsahuje 22 exonů s velikostí od 72 do 1063 nukleotidů [72].

V databázi polymorfizmů Národního centra biotechnologických informací NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [73] je registrováno (k datu 27.7.2011):

- 44 polymorfizmů v exonových částech
- 37 polymorfizmů v oblastech, které nepodléhají translaci
- a více než 2000 polymorfizmů v intronových oblastech.

V exonech se nachází 16 synonymních polymorfizmů, 26 nesynonymních polymorfizmů a 2 delece (Tabulka 1-2, strana 24).

Do dnešní doby bylo vydáno pouze několik vědeckých prací, které se zabývají studiem *PAPP-A* polymorfizmů. Studie z roku 2006 se zabývá možnou asociací polymorfizmu Ser1224Tyr (rs7020782, exon 14) genu *PAPP-A* s opakovanými potraty [74]. Další studie poukázala na vztah polymorfizmu C/G (rs13290387, intron 6) genu *PAPP-A* k akutnímu infarktu myokardu [75].

Naše skupina studovala polymorfizmy na exonu (resp. části intronu) 2, 5, 6, 7 genu *PAPP-A* u pacientek s komplikacemi v těhotenství [76, 77]. Podrobněji viz. kapitola 4.2, strana 58.

**Tabulka 1-2. Přehled jednonukleotidových polymorfizmů v exonových oblastech genu *PAPP-A*.**

<i>P o l y m o r f i z m u s</i>					
<i>Exon</i>	<i>Synonymní</i>		<i>Nesynonymní</i>		<i>Delece</i>
1	Ala57Ala	rs860228	Ser5Ile	rs417012	
			Trp6Leu	rs417019	
			Ala48Pro	rs397077	
			Arg55Gly	rs2517370	
			Gln105His	rs11377	
2	Gly276Gly	rs115729347	Asp142Gly	rs112313704	
	Cys327Cys	rs12375498	Glu309Lys	rs113943017	
	Val397Val	rs80284365	Pro324Leu	rs445154	
	Gly437Gly	rs56341056	Pro325Leu	rs445159	
			Glu373Lys	rs116194500	
4	Pro586Pro	rs57672573			Thr630Thr rs34289934
5			Arg654Lys	rs432500	
			Ala678Pro	rs34371232	
			Thr686Ala	rs35578777	
6	Glu715Glu	rs35407884			
7	Gly847Gly	rs76135391	Phe802Leu	rs1063409	Ser827Leu/Ser rs34087604
	Thr857Thr	rs41280071	Gln854Xxx	rs112566371	
8			Ser944Arg	rs117124330	
10	Pro987Pro	rs35565319	Asn1007Ser	rs10983107	
11			Ile1056Val	rs111984106	
12	Gly1111Gly	rs79136957			
14	Asp1253Asp	rs112369830	Ser1224Tyr	rs7020782	
15			Arg1315His	rs116551272	
			Pro1317Leu	rs60642076	
16	Cys1362Cys	rs2296069	Pro1351Ala	rs55679739	
			Val1383Met	rs55901693	
17			Lys1401Gln	rs35947124	
18			Leu1451Pro	rs117752286	
19	Val1534Val	rs3827668			
22	Asp1601Asp	rs10759836	His1612Gln	rs35109458	
	Asp1605Asp	rs62575393			

Xxx – polymorfizmus způsobuje terminaci proteinového řetězce



## 1.4 Laboratorní diagnostika patologických stavů v těhotenství

### 1.4.1 Diagnostika vrozených vývojových vad

Jednou z nejdůležitějších oblastí preventivních vyšetření je bezpochyby péče o těhotné ženy a efektivní systém sledování výskytu vrozených vývojových vad.

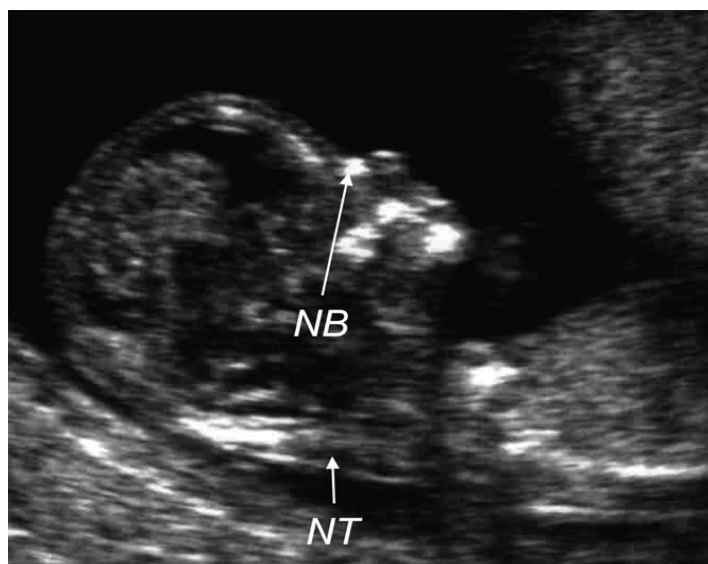
Screening v I. trimestru gravidity byl do klinické praxe zaveden teprve v posledních několika letech. Spočívá ve společném vyhodnocení výsledků biochemických vyšetření (odběr krve v 10.-13. týdnu těhotenství) a ultrazvukového vyšetření (obvykle v 11.-14. týdnu). Při biochemickém vyšetření se zjišťují sérové hladiny těhotenského proteinu PAPP-A a volné podjednotky  $\beta$ -hCG. Hladiny PAPP-A proteinu jsou v séru těhotných žen sniženy u většiny chromozomálních aberací, u Downova syndromu (trisomie 21. chromosomu) jenom v prvním trimestru. Naproti tomu zvýšené hladiny volné podjednotky  $\beta$ -hCG indikují rizikové těhotenství.

Ultrazvukové vyšetření obsahuje změření šíjového projasnění u plodu – nuchální translucence (NT). Jedná se o změření tloušťky anechogenní zóny (včetně sept nebo cyst) v nuchální oblasti plodu mezi kůží a pojivovou tkání, pokrývající krční páteř. Optimálním obdobím pro měření NT je 11.-14. týden těhotenství. Dále se vyšetřuje přítomnost nosní kůstky (NB) u plodu (Obrázek 1-6, strana 26).

Výtěžnost screeningu v prvním trimestru je až 80% při falešné pozitivitě kolem 4-5%. Velkou výhodou je nepochybně také včasná diagnostika a následná prenatální, perinatální a postnatální péče [78, 79].

Další možností je screening provádět v II. trimestru gravidity (14.-20. týden), kdy se tzv. *triple* testem vyšetřuje hladina AFP ( $\alpha$ -1-fetoproteinu), hCG (choriového gonadotropinu) a uE3 (nekonjugovaného estriolu). Ultrazvukovým vyšetřením se upřesní gestační stáří plodu. Velkou nevýhodou je výtěžnost testu pouze kolem 69% při falešné pozitivitě 5%.

Ve světě nejvíce propagovanou možností je provádění tzv. integrovaného testu, kdy jsou hodnoceny výsledky společně z obou trimestrů. Uvádí se, že senzitivita tohoto testu dosahuje 94% s 5% falešnou pozitivitou [78, 79].



**Obrázek 1-6.** (převzato z [80]) Ultrazvukový snímek plodu s normální tloušťkou nuchální translucence (NT) a přítomností nosní kůstky (NB).

#### 1.4.2 Vyšetření plodové vody

Odběr plodové vody nachází v současnosti velké uplatnění v oblasti prenatalní diagnostiky. Pro chromozomální vyšetření buněk plodu získaných amniocentézou slouží molekulárně cytogenetické metody, které jsou v České republice součástí rutinní praxe [79].

Další metodou, která má v oblasti diagnostiky patologických stavů v těhotenství velký potenciál, je proteomická analýza plodové vody.

Výzkum se v posledních letech zaměřuje na plodovou vodu z důvodu, že toto medium je vhodné ke studiu proteinů specifických pro těhotenství a plod s možností lepšího pochopení fyziologie těhotenství a vývoje plodu. Na druhou stranu je nutné respektovat fakt, že odběr plodové vody patří mezi invazivní výkony s jistým rizikem abortu nebo předčasného porodu.

Využití proteomiky v oblasti lidských reprodukčních procesů má velký význam především v identifikaci nových biomarkerů pro diagnostiku a včasný záchyt nemoci. Těhotenství a porod jsou procesy, které závisí na komplexních interakcích intracelulárních a extracelulárních signálů, jako jsou hormony, adhezní molekuly, růstové faktory a imunomodulátory [81]. Dynamika rovnováhy těchto faktorů v průběhu

těhotenství je složitá. V případě fetálních genetických abnormalit může být tato rovnováha porušena a identifikace relevantních markerů by mohla pomoci v identifikaci specifického typu patologie nebo její závažnosti [82]. Cílem je popsat markery, které jsou specifické pro plod a jejich exprese ve fyziologickém těhotenství je odlišná od patologických stavů. Proteomická analýza studuje komplexní bílkovinový soubor daného biologického materiálu a může potenciálně vést k identifikaci tzv. panelu markerů s dostatečnou sensitivitou a specificitou pro danou klinickou aplikaci.

První publikace zabývající se proteomickou analýzou lidské plodové vody byla vydána v roce 1997 [83]. Nilsson a spol. pak byli první skupinou, která k identifikaci proteinů využila metodu hmotnostní spektrometrie MS (*Mass spectrometry*) [84]. Od té doby byly publikovány další práce, které se zabývaly identifikací proteinů a jejich rozdílnou expresí v různých stadiích těhotenství [85-87]. Ve studii z roku 2007 [87] byla v plodové vodě poprvé s využitím proteomické analýzy a MS identifikovaná většina biochemických markerů využívaných v klinické diagnostice patologií asociovaných s těhotenstvím, například  $\beta$ -hCG a AFP u Downova syndromu.

### 1.4.3 Patologické stavy v těhotenství

Preeklampsie, předčasný porod, růstová retardace plodu IUGR (*Intrauterine Growth Restriction*) a benigní těhotenská cholestáza jsou celosvětově nejčastější příčiny morbidity a mortality plodu a matky. Patogenetické mechanismy, které jsou příčinou těchto poruch však nejsou dodnes plně objasněny.

**Preeklampsie.** Toto onemocnění postihuje kolem 3% těhotných žen [88], v rozvojových krajinách se incidence pohybuje až kolem 8-14% [89].

Preeklampsie je definována jako zvýšený krevní tlak v těhotenství nad hodnoty 140/90 mm Hg, proteinurií vyšší než 300mg/24hod, elevací kyseliny močové v séru nad hodnoty 320  $\mu$ mol/L a otoky s manifestací nemoci po 24. týdnu těhotenství. Vyšší proteinurie u preeklampsie vzniká poškozením bazální membrány glomerulů a snížením zpětné resorpce proteinů v tubulech. Klinickými projevy preeklampsie jsou mimo hypertenze a proteinurie také další multisystémové abnormality u matky a fetální syndromy jako růstová retardace plodu, redukce množství plodové vody a abnormální funkce placenty [90].

Navzdory velkému úsilí ze strany vědců není patogeneze onemocnění stále příliš jasná. Mezi navrhované patofyziologické mechanismy patří například imunitní maladaptace, oxidační stres, placentární ischemie a zvýšený oxidační stres [90, 91]. Je pravděpodobné, že se jedná o multifaktoriální onemocnění, které je podmíněno jak genetickými, tak i vnějšími vlivy.

Výzkum genetického pozadí vzniku preeklampsie je zaměřen především na kandidátní geny související s trombofilií, oxidačním stresem, lipidovým metabolismem a renin-angiotensinovým systémem, včetně *Flt-1* genu (*Fms-like Tyrosine Kinase-1*) [92, 93]. Navíc, studiem genů *AGT*, renin, *eNOS* a dalších byla zjištěna jejich asociace také s esenciální hypertenzí v běžné populaci [94-97].

**Předčasný porod.** Plody narozené mezi 24. až 37. týdnem gestace jsou označeny jako předčasně narozené. Mezi klinické příznaky hrozícího předčasného porodu patří kontrakce, pokročilý vaginální nálezy, předčasný odtok plodové vody a krvácení. Frekvence předčasných porodů v České republice kolísá mezi 5-6%. Předčasné porody se podílí na perinatální, resp. časně neonatální mortalitě a morbiditě až v 70% [98, 99].

Nejdůležitější roli v patogenezi předčasného porodu hraje infekce a významnou mírou se na vývoji tohoto patologického stavu podílejí genetické i vnější faktory.

Mnohé studie již prokázaly potenciální roli jednotlivých genů v procesu fyziologického a patologického porodu. Mezi nejvýznamnější skupiny genů, u kterých byla zjištěna jejich asociace s předčasným porodem, patří geny zapojené do procesů vyvolaných infekcí (*TLR4*, *CARD15*), geny zapojené do zánětlivých procesů (např. *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-2*, *IFN- $\gamma$* ) a geny podílející se na metabolismu matrixu (např. *MMP1*, *MMP8*, *MMP9*) [100].

**Růstová retardace plodu**, nebo IUGR, je definována jako opoždění intrauterinního růstu a vývoje plodu podle ultrazvukové biometrie ve vztahu ke gestačnímu stáří.

Nejčastější příčinou vzniku IUGR je placentární dysfunkce. Důsledkem je snížený průtok placentou a redukováná perfuze v intervillózním prostoru. Neadekvátní výměna živin vede k růstové retardaci. Dalšími rizikovými faktory jsou vnější vlivy jako kouření a celková malnutrice. Navíc, je řada genetických onemocnění, která způsobují růstovou retardaci plodu (mnohočetné polygenně dědičné vady, chromozomální aberace, atd.) [98].

Mezi geny, u kterých byla zjištěna souvislost s růstovou retardací plodu, patří mimo jiné *Fas*, *ACE*, *TNF- $\alpha$*  a *CYP-17* [101-104]. Polymorfismus genu *MMP-2*, který se uplatňuje při implantaci embrya, byl studován ve fetální DNA a potvrzen jako prediktivní faktor rozvoje IUGR [105].

**Benigní těhotenská cholestáza**, nazývaná také hepatopatie, je onemocnění charakterizované cholestázou v jaterních žlučovodech a vyskytuje se v posledním trimestru gravidity. Celková incidence je cca 1-1,5%. Hlavním příznakem je pruritus. Nemoc obvykle začíná úporným svěděním končetin, plosek rukou a nohou, nebo kůže břicha.

Hladiny transamináz a alkalické fosfatázy jsou v séru pacientek trpících hepatopatií zvýšeny. Nejčastěji se vyšetřují enzymy aspartátaminotransferáza (AST) a alaninaminotransferáza (ALT), přičemž pro nemoc jsou charakteristické zvýšené sérové hladiny AST nad hodnoty 0.72  $\mu$ kat/l a ALT nad hodnoty 0.78  $\mu$ kat/l.

Žlučové kyseliny v séru jsou zvýšeny desetinásobně, dochází k jejich ukládání do kůže, což způsobuje extrémní pruritus. Častým průvodním jevem je gestační diabetes. Pacientky s hepatopatií vykazují výrazně vyšší riziko antenatálního úmrtí plodu a předčasného porodu [98].

V patogenezi nemoci hraje klíčovou roli genetická predispozice, hormonální faktory a vliv prostředí. Výzkum kandidátních genů je soustředěn především na geny kódující transportní proteiny hepatocytu zapojené do metabolismu žlučových kyselin, jako jsou *ACBC4*, *ACBC11*, *FIC1*, *ATPB81*, *ABCC2*, *NR1H4* [106, 107].

## 2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

### 1. Zavedení metodik analýzy jednobodových polymorfizmů genu *PAPP-A*:

- Zavedení metodiky analýzy polymorfizmů Pro324Leu (rs445154), Pro325Leu (rs445159) a Cys327Cys (rs12375498) na exonu 2 genu *PAPP-A*.
- Zavedení metodiky analýzy polymorfizmů Arg654Lys (rs432500), Ala678Pro (rs34371232) a Thr686Ala (rs35578777) na exonu 5 genu *PAPP-A*.
- Zavedení metodiky analýzy polymorfizmů Glu715Glu (rs35407884) a C/G (rs 13290387) na exonu 6, resp. části intronu 6, genu *PAPP-A*.
- Zavedení metodiky analýzy polymorfizmů Phe802Leu (rs1063409), Ser827Ser/Leu (rs34087604) na exonu 7 genu *PAPP-A*.

### 2. Klinická aplikace zavedených metod:

- Analyzovat výše popsané polymorfizmy u pacientek s patologickým těhotenstvím (hrozící předčasný porod, preeklampsie, růstová retardace plodu a hepatopatie) a kontrolní skupiny zdravých těhotných a netěhotných žen a jejich vztah ke klinické charakteristice a laboratorním výsledkům.

### 3. Stanovení proteinu *PAPP-A* v séru a *PIGF* v plasmě pacientek s patologickým těhotenstvím (hrozící předčasný porod, preeklampsie, růstová retardace plodu a hepatopatie) a u kontrolní skupiny zdravých těhotných žen.

### 4. Zavedení metodiky dvourozměrné elektroforézy jako příprava pro proteomickou analýzu plodové vody.

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Parametry klinické studie

Sledovanou skupinou byly pacientky s patologickým těhotenstvím ve třetím trimestru gravidity a jako kontrolní skupiny zdravé těhotné ženy ve třetím trimestru gravidity a zdravé netěhotné ženy.

Studie byla provedena v souladu s principy Helsinské deklarace a schválená Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Všechny osoby zapojené do projektu podepsaly před zařazením do studie informovaný souhlas.

#### 3.1.1 Pacientky s patologickým těhotenstvím

Do studie bylo zařazeno celkově 165 nepříbuzných pacientek kavkazského původu z České republiky léčených a sledovaných na Gynekologicko-porodnické klinice 1.LF UK a VFN Praha. Všechny pacientky byly ve třetím trimestru gravidity, jejich průměrný věk byl  $31 \pm 5$  let.

Devadesát osm žen (průměrný věk  $30.7 \pm 5.1$  let) vykazovalo symptomy hrozícího předčasného porodu, jako jsou kontrakce, pokročilý vaginální nález, předčasný odtok plodové vody a krvácení.

Třicet pět pacientek (průměrný věk  $31.3 \pm 4.1$  let) mělo preeklampsii či gestační hypertenzi. Hypertenze v těhotenství byla diagnostikována po dvou opakovaných měřeních krevního tlaku, když hodnota systolického tlaku byla minimálně 140 mm Hg a hodnota diastolického tlaku byla minimálně 90 mm Hg u pacientek, které před graviditou hypertenzí netrpěly. U jednadvaceti žen pak byla diagnostikována proteinurie (300mg/den a více), zbylých čtrnáct žen v čase odběru proteinurií netrpělo, vyvinuly ji však během sledování nebo měly zvýšené sérové hladiny kyseliny močové nad 320  $\mu\text{mol/l}$ . Proto byly všechny tyto pacientky zařazeny do preeklamptické skupiny.

U třiceti čtyř žen (průměrný věk  $31.1 \pm 4.6$  let) byla diagnostikována růstová retardace plodu (IUGR, *Intrauterine Growth Restriction*) a patnáct žen (průměrný věk  $31.7 \pm 3.4$  let) trpělo hepatopatií. Růstová retardace plodu byla definována u novorozenců s porodní hmotností pod třetím percentilem pro dané gestační stáří. Hepatopatie, nebo-li benigní těhotenská cholestáza, byla charakterizována zvýšením

hladin enzymů AST nad 0.72  $\mu$ kat/l a ALT nad 0.78  $\mu$ kat/l v séru matky po vyloučení ostatních příčin elevace jaterních testů (hepatitis A, B, C; infekce CMV nebo EBV virem).

### **3.1.2 Kontrolní skupiny**

Do studie bylo zařazeno 114 těhotných žen (průměrný věk  $30.1 \pm 4.3$  let), které byly sledovány během prenatální péče na Gynekologicko-porodnické klinice 1.LF UK a VFN Praha. Ženy byly v čase zapojení se do studie ve třetím trimestru gravidity, jejich gravidita měla fyziologický průběh a všechny porodily v očekávaném termínu.

Jako netěhotné kontroly sloužilo 48 zdravých žen s průměrným věkem  $26.1 \pm 4.2$  let.

### **3.1.3 Krevní vzorky**

Krevní vzorky byly odebírány z loketní žíly současně s odběrem krve pro běžné laboratorní vyšetření. Rutinní biochemické parametry byly stanoveny v čerstvě odebraných vzorcích. Pro odběr krve pro speciální biochemické analýzy byly použity zkumavky bez antikoagulantu (pro získání séra) a zkumavky s EDTA (pro získání plazmy). Krevní vzorky byly centrifugovány 10 minut při 3000 rpm a odebrané sérum a plazma bylo zamraženo na  $-80^{\circ}\text{C}$  až do doby analýzy.

Pro analýzu DNA byla použita nesrážlivá krev ze zkumavek s EDTA (kyselina ethylendiamin-tetraoctová). Zkumavky byly po odebrání plazmy uskladněny při  $4^{\circ}\text{C}$  a izolace DNA byla provedena modifikovanou vysolovací metodou podle Millera et al. [108] do týdne po odběru.



## 3.2 Materiál

### 3.2.1 Chemikálie a ostatní materiál

#### Izolace DNA

*Chlorid sodný, p.a.* (Penta, ČR), *Chlorid amonný, p.a.* (Fluka, Německo), *Hydrogenuhlíčan amonný, p.a.* (Fluka, Německo), *Chlorid hořečnatý hexahydrát, p.a.* (Fluka, Německo), *Chlorid draselný, p.a.* (Lachema, ČR), *Kyselina ethylendiamin-tetraoctová EDTA, p.a.* (Sigma, USA), *Dodecylsíran sodný SDS, p.a.* (Ampresco®, USA), *2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol TRIS, p.a.* (MP Biomedicals, USA), *Kyselina chlorovodíková, p.a.* (Lachema, ČR), *Hydroxid sodný, p.a.* (Lachema, ČR), *Ethanol, 96%, (v/v)* (Penta, ČR), *Proteinkináza K* (Roche, Německo).

#### PCR a sekvenace DNA

*Izopropanol, p.a.* (Penta, ČR), *Ethanol, 96%, (v/v)* (Penta, ČR), *Acetát sodný, p.a.* (Merck, Německo), *Sacharóza, p.a.* (Ampresco®, USA), *3',3'',5',5''-tetrabromfenolsulfoftalein – Modř bromofenolová ind.* (Lachema, ČR), *Kyselina boritá, p.a.* (Penta, ČR), *2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol TRIS, p.a.* (MP Biomedicals, USA), *Kyselina ethylendiamin-tetraoctová EDTA, p.a.* (Sigma, USA), *Ethidium bromid* (Ampresco®, USA), *Agaróza* (Serva, Německo), *MetaPhor® Agaróza* (Cambrex, USA), *PCR Core Kit* (Roche, Germany), *Taq DNA polymeráza* (Roche, Germany), *O'GeneRuler™ 50bp DNA standard* (Fermentas, USA), *O'GeneRuler™ 100bp DNA standard* (Fermentas, USA), *Oligonukleotidové sondy (primery) pro PCR a sekvenování DNA* (Generi Biotech, ČR), *Genome Lab™ DTCS – Quick Start Kit* (Beckman Coulter, USA), *Genome Lab™ Separační gel – LPA I.* (Beckman Coulter, USA), *NukleoSpin® Extract II Purifikační kit* (Macheray-Nagel, Německo).

### 3.2.2 Přístroje

- Úpravna vody: Direct-Q® 3 UV, Milipore, Francie; Meladest® 65, Melag, Německo
- Centrifugy: Rotana 460R, Hettich, Německo; Universal 32 R, Hettich, Německo
- Termocykler DNA Engine Dyad™, Bio-Rad, USA
- Sekvenátor CEQ™ 8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter, USA
- Fotometr pro ELISA destičky: Multiscan RC, Labsystems, Finsko
- B.R.A.H.M.S Kryptor, Německo
- Horizontální elektroforéza nukleových kyselin Minigel 2, Apelex, Francie
- Zdroj elektroforézy Apelex PS 1006, Francie
- Spektrofotometr ND-1000, NanoDrop®, USA
- UV transiluminátor TS-312A Spectroline®, USA
- Mikrovlnná trouba Micromaxx® MM 41580, Německo
- Chladicí stojánek na PCR destičky, Eppendorf®, Německo
- Analytické váhy Snug 600, AdamLab, Velká Británie
- Třepačka Biovortex V-1 plus, Biosan, Lotyšsko
- Filtrační systémy Corning®, USA

### 3.3 Metody

Všechny laboratorní úkony byly prováděny v ochranných rukavicích a všechna pracovní místa byla sterilně čistá. Plastický materiál byl používán jednorázově.

#### 3.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna modifikovanou vysolovací metodou podle Millera et al. [108].

##### 3.3.1.1 Princip metody

Princip metody je založen na lýze membrán erytrocytů v přítomnosti lyzačního pufru SLB (*Salmiak Lysing Buffer*). Dále probíhá lýza jaderných buněk v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) a proteinkinázy K. Reziduální peptidy jsou následně odstraněny vysolováním nasyceným roztokem chloridu sodného (NaCl). Konečnou fází analýzy je rozpouštění vyprecipitované DNA ethanolem.

##### 3.3.1.2 Roztoky

Všechny použité roztoky, s výjimkou ethanolu, 10 M NaOH a 2 M HCl, byly filtrovány filtračním systémem Corning a uchovávány při teplotě 2-8°C. Ethanol byl před použitím skladován při teplotě -20°C.

- 0.5 M EDTA (zásobní roztok, 500 ml): 39.05 g EDTA, 5 ml 10 M NaOH, přidáme redestilovanou vodu do objemu 500 ml
- 10 M NaOH (100 ml): 40 g NaOH, přidáme redestilovanou vodu do objemu 100 ml
- SLB (zásobní roztok, 500 ml): 41.45 g NH<sub>4</sub>Cl, 3.95 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 ml 0.5 M EDTA, přidáme redestilovanou vodu do objemu 500 ml
- TK-1 pufr (2000 ml, pH 7.6): 1.488 g KCl, 2.422 g TRIS, 4.064 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8 ml 0.5 M EDTA, 2 M HCl pro úpravu pH, přidáme redestilovanou vodu do objemu 2000 ml
- 2 M HCl (100 ml): 8.5 ml HCl, přidáme redestilovanou vodu do objemu 100 ml

- 4 M NaCl (200 ml): 46.75 g NaCl, přidáme redestilovanou vodu do objemu 200 ml
- Lyzační pufr – jaderné buňky (500 ml, pH 8.2): 50 ml 4 M NaCl, 5 ml 1 M TRIS-HCl (pH 8.2), 2 ml 0.5 M EDTA, přidáme redestilovanou vodu do objemu 500 ml
- 1 M TRIS-HCl (100 ml, pH 8.2): 12.1 g TRIS, 2 M HCl pro úpravu pH, přidáme redestilovanou vodu do objemu 100 ml
- Rozpouštěcí roztok proteinkinázy K (200 ml): 10 ml 10 % SDS, 0.8 ml 0.5 M EDTA, přidáme redestilovanou vodu do objemu 200 ml
- 10 % SDS w/v, uchováme při laboratorní teplotě
- Pracovní roztok proteinkinázy K (50 ml): 100 mg proteinkináza K, 50 ml rozpouštěcí roztok proteinkinázy K; uchováme alikvoty po 600  $\mu$ l při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ , po rozmražení ihned zpracujeme.
- 96 % ethanol
- 70 % ethanol
- 6 M NaCl (100 ml): 35.1 g NaCl, přidáme redestilovanou vodu do objemu 100 ml
- TE pufr (40 ml): 400  $\mu$ l 1 M TRIS-HCl (pH 7.6), 80  $\mu$ l 0.5 EDTA, přidáme redestilovanou vodu do objemu 40 ml

### 3.3.1.3 Pracovní postup

#### *Lýza buněčné membrány erytrocytů*

1. Vzorek krve (7 ml, EDTA) přelijeme do 50 ml šroubovací sterilní zkumavky, doplníme do cca 40 ml chlazeným SLB pufrem (10 x ředěný), umístíme do drceného ledu. Za občasného otočení zkumavky inkubujeme při  $0^{\circ}\text{C}$  30 minut. Centrifugujeme při 3000 rpm, 30 minut,  $10^{\circ}\text{C}$ . Opatrně odstraníme supernatant, znovu přidáme 40 ml SLB pufru, umístíme na 20 minut do ledu, znovu centrifugujeme za stejných podmínek.
2. Po vylití supernatantu získaný červený pelet omyjeme 30 ml TK-1 pufrem, důkladně zamícháme a centrifugací (20 minut při 3 000 rpm,  $10^{\circ}\text{C}$ ) odstraníme erytrocytární membrány. Tento krok opakujeme třikrát, dokud nezískáme zcela bílý sediment krevních jaderných buněk.

### *Izolace DNA*

3. Čistý leukocytární pelet resuspendujeme ve 3 ml lyzačního pufru pro jaderné membrány, důkladně protřepeme (20 sekund). Přidáme 600  $\mu$ l roztoku proteinkinázy K a 200  $\mu$ l 10 % SDS, opatrně promícháme a inkubujeme při 37°C přes noc.
4. Přidáme 1 ml 6 M NaCl a cca 15 sekund důkladně třepeme. Vzniklý precipitát odstraníme centrifugací, 30 minut, 6000 rpm při laboratorní teplotě.
5. Čirý supernatant přeneseme do nové označené zkumavky, přidáme nejméně trojnásobné množství chlazeného (-20°C) 96 % ethanolu, opatrným obrácením se vysráží DNA (bílé želatinózní vlákno nebo chomáčkovitá sraženina). K precipitaci je možno použít stejný objem izopropanolu (Obrázek 3-1).
6. Sraženinu DNA nabalíme na sterilní skleněný háček, omyjeme chlazeným (-20°C) 70 % ethanolem a necháme oschnout na vzduchu.
7. Skleněný háček vložíme do sterilní kryozkumavky s 1000  $\mu$ l TE pufru. Uvolněnou DNA necháme rozpouštět při laboratorní teplotě minimálně do druhého dne.



**Obrázek 3-1.** Precipitovaná DNA.

### 3.3.2 Koncentrace DNA

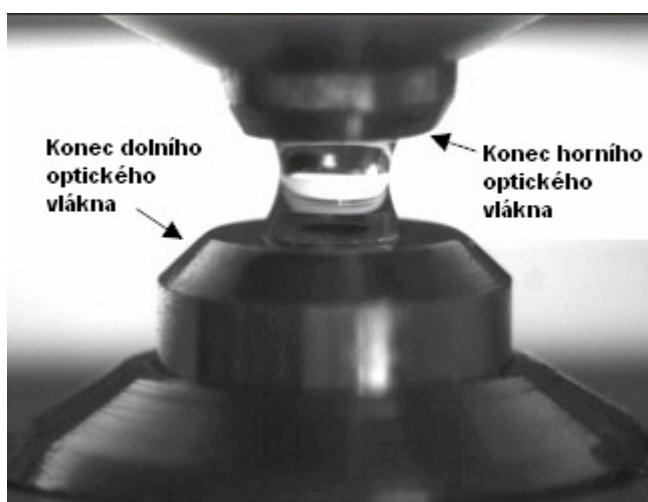
Koncentrace vyizolované DNA byla měřena spektrofotometrem ND-1000 (NanoDrop®).

#### 3.3.2.1 Princip metody

Koncentrace DNA je určována spektrofotometriky pomocí širokospektrálního spektrofotometru (220-750 nm), měřícího koncentraci a čistotu vzorků DNA s koncentrací až do 3700 ng/μl bez potřeby ředění.

V provozu se pipetuje 1-2 μl vzorku DNA na konec dolního optického vlákna. Potom, co se dostane spodní vlákno do kontaktu s koncem horního optického vlákna, dojde působením kapilarity ke vzniku sloupce tekutiny (Obrázek 3-2). Pulsní xenonová výbojka poskytuje zdroj světla. Dochází ke změření absorbance prostřednictvím CCD pole (*Charge-Coupled Device*) a následnému softwarovému zpracování hodnot.

Kromě hodnoty výsledné koncentrace vzorku je zobrazována i absorbance při vlnové délce 230, 260 a 280 nm a hodnoty A260/A280 a A260/A230 pro indikaci čistoty měřených vzorků nukleových kyselin. Vzorky jsou považovány za čisté, když hodnota A260/A280 je přibližně 1.8 a hodnota A260/A230 se nachází v rozmezí 1.8 – 2.2.



**Obrázek 3-2.** Sloupec tekutiny vznikající při měření koncentrace vzorků DNA (převzato z [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)).

### 3.3.3 Sekvenování DNA

Vybrané polymorfizmy genu *PAPP-A* byly analyzovány pomocí přímé sekvenace DNA. Tato metoda je složena z několika kroků. V první fázi probíhala polymerázová řetězová reakce (PCR), při které docházelo k namnožení cílových úseků DNA obsahujících polymorfnní místa. Tyto fragmenty byly dále pročištěny od nespecifických fragmentů DNA, solí a zbytků reakčních komponentů buď přímo z reakční směsi nebo z agarozového gelu. Purifikované fragmenty DNA byly pak dále podrobeny další PCR s přidavkem fluorescenčně značených dideoxynukleotid trifosfátů (ddNTP). Po pročištění produktů od solí a zbytků reakčních komponentů byly tyto DNA fragmenty sekvenovány v sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter).

#### 3.3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

##### 3.3.3.1.1 Princip metody

Metodu polymerázové řetězové reakce PCR (*Polymerase Chain Reaction*) objevil Kary B. Mullis, který byl deset let po tomto objevu, v roce 1993, oceněn Nobelovou cenou za chemii.

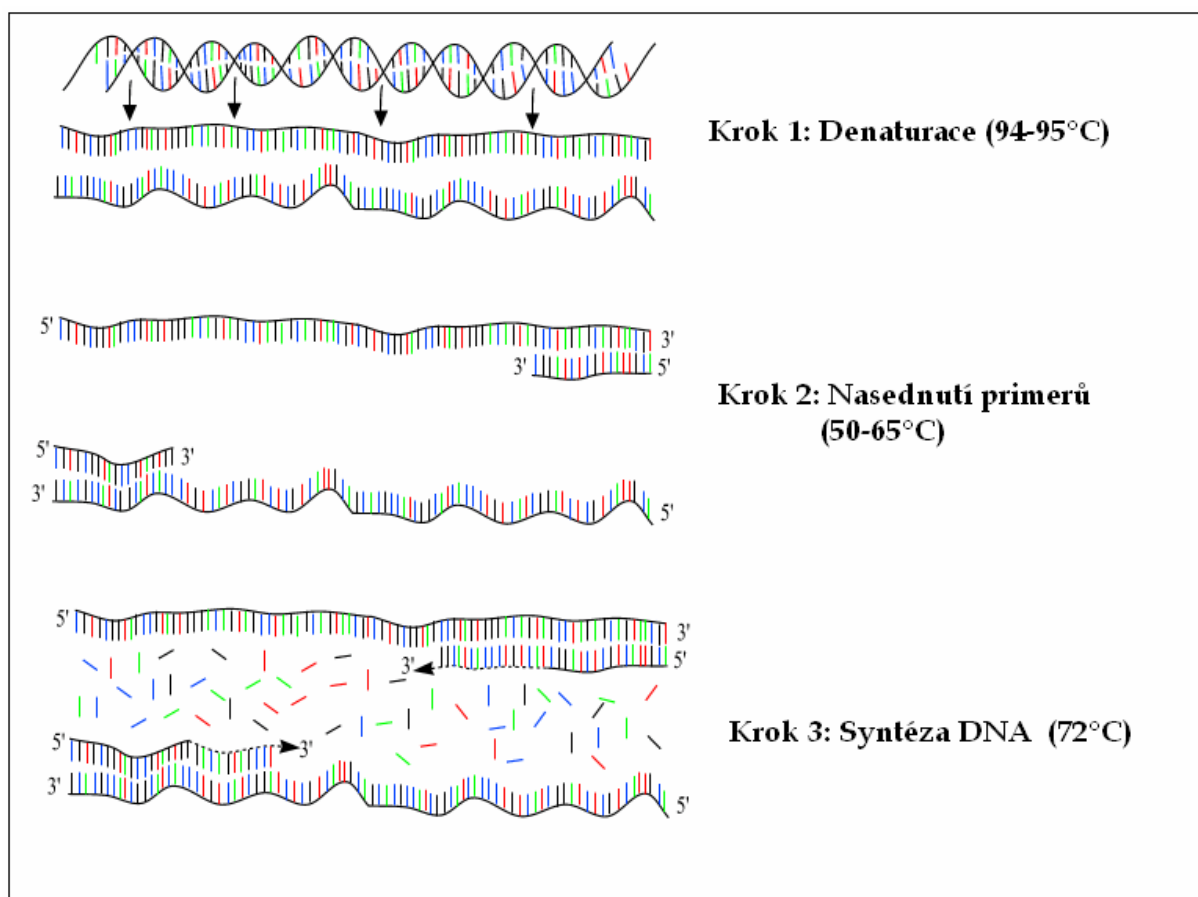
Tato metoda umožňuje exponenciální amplifikaci malého množství specifické nukleotidové sekvence *in vitro* v přítomnosti templátu, termostabilní DNA polymerázy, deoxynukleotid trifosfátů (dNTP),  $Mg^{2+}$  iontů a dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují na obou stranách DNA vlákna a vymezují cílový úsek DNA.

V reakci se cyklicky (asi 30krát) opakují tyto kroky:

1. Denaturace - DNA se po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-95°C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.
2. Nasednutí primerů - teplota se sníží na 50-65°C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.
3. Syntéza DNA - teplota v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza (DNA polymeráza bakterie *Thermus Aquaticus*) má optimum aktivity na 72°C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve

směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (Obrázek 3-3).

PCR metoda se stala jednou z nejvíc používaných technik v molekulární biologii. Její výhodou je její rychlost a senzitivita - metoda je tak citlivá, že dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku.



**Obrázek 3-3.** Polymerázová řetězová reakce.

### 3.3.3.1.2 Pracovní postup

Použité primery byly zkonstruovány v programu Primer3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Tabulka 3-1, strana 41).

1. Vzorky DNA naředíme v sterilních zkumavkách na koncentraci 20 ng/μl.
2. Všechny ostatní reagenty PCR směsi (Tabulka 3-1 a 3-2) napipetujeme do 2 ml zkumavky, uchováme na ledu.



3. Směs jemně promícháme, aby se stala homogenní a potom rozpipetujeme 20  $\mu$ l alikvoty do PCR stripů (0.2 ml zkumavky určené pro termocyklér).
4. Přidáme 5  $\mu$ l (100 ng) zředěné DNA do PCR stripů, dobře promícháme.
5. Krátce centrifugujeme, aby celý objem směsi byl na dně stripu.
6. Vzorke vložíme do termocykleru a spustíme příslušný program (pro podmínky průběhu PCR, viz Tabulka 3-3 a 3-4, strana 42).

**Tabulka 3-1.** Primery použité pro jednotlivé exony a optimální teploty pro nasedání primerů v průběhu PCR.

Exon	5'...sekvence...3'	Optimální T primerů (°C)	Délka produktů (bp)
2	<i>sens</i> : gga ctc agc ggg aga tac tg <i>antisens</i> : cac cgt cgg gtt ctt atg at	60.0	323
5	<i>sens</i> : cgg ctt ggt gct tat ctc tc <i>antisens</i> : aca ggg cac act cac ctt tc	60.0	245
6	<i>sens</i> : cta gtc cca tca gtt gct cat tc <i>antisens</i> : tgt tag gat agt gca agt gct ca	60.0	387
7	<i>sens</i> : gct ctt tcc cca aga act ca <i>antisens</i> : acc tca cgt tcc tcc aca ac	59.7	602

**Tabulka 3-2.** Reagencie polymerázové řetězové reakce pro jeden vzorek.

Reagencie	Koncentrace	Objem (ml)
sterilní voda		11.2
PCR pufr	10 x	2.5
dNTP zásobní roztok	10 mM každého dNTP	1.0
primer <i>sens</i>	5 $\mu$ M	2.5
primer <i>antisens</i>	5 $\mu$ M	2.5
Taq DNA polymeráza	5 U/ $\mu$ l	0.3
DNA templát	100 ng	5.0
Celkový objem		25

**Tabulka 3-3.** Teplotní podmínky průběhu PCR – exon 2 a 6.

Krok	<i>Exon 2</i>		<i>Exon 6</i>	
	Teplota (°C)	Čas	Teplota (°C)	Čas
1	94	2 min	94	2 min
2	94	30 sek	94	30 sek
3	60	45 sek	60	45 sek
4	72	1 min	72	1 min
5	krok 2-4 (32x)		krok 2-4 (32x)	
6	72	7 min	72	7 min

**Tabulka 3-4.** Teplotní podmínky průběhu PCR – exon 5 a 7.

Krok	<i>Exon 5</i>		<i>Exon 7</i>	
	Teplota (°C)	Čas	Teplota (°C)	Čas
1	94	2 min	95	5 min
2	94	25 sek	95	45 sek
3	60	40 sek	59.7	1 min
4	72	1 min	72	1 min
5	krok 2-4 (10x)		krok 2-4 (32x)	
6	94	25 sek	72	7 min
7	60	40 sek		
8	72	50 sek + každý cyklus zvýšit o 5 sek		
9	krok 6-8 (20x)			
10	72	7 min		

### 3.3.3.2 Elektroforéza v agarózovém gelu

#### 3.3.3.2.1 Princip metody

Elektroforéza v agarózovém gelu je metodou používanou v biochemii a molekulární biologii na separaci molekul DNA nebo RNA podle jejich velikosti. To je dosaženo pohybem negativně nabitých molekul nukleových kyselin skrze agarózovou matici v stejnosměrném elektrickém poli, které je tvořeno vkládáním stejnosměrného napětí mezi elektrody. Kratší molekuly putují maticí rychleji a dál než větší molekuly

za stejný čas. K DNA vzorku je přidáván nanášecí pufr, který jej vizualizuje a usazuje na dně jamky v gelu. Negativně nabitě indikátory putují v průběhu elektroforézy společně s DNA a určují její polohu v gelu. DNA standard putuje v samostatné dráze v gelu a po skončení elektroforézy je použit na odhad velikosti jednotlivých fragmentů DNA.

Ethidium bromid je nejčastěji využívané barvivo v elektroforéze na agarózovém gelu. Tato molekula je schopna interkalovat mezi páry bází v molekule DNA (nebo RNA) a v přítomnosti UV světla pak fluoreskuje. Po skončení elektroforézy v gelu s přidavkem ethidium bromidu je pak možno jednotlivé DNA fragmenty detekovat pod UV lampou.

### **3.3.3.2 Pracovní postup**

#### Roztoky

- TBE pufr (zásobní roztok, 1000 ml): 54 g TRIS, 4.6 ml 0.5 M EDTA, 25 g  $H_3BO_3$ , přidáme redestilovanou vodu do objemu 1000 ml
  - Nanášecí pufr: 4 g sacharóza, 2.5 mg bromfenolová modř, 10 ml TBE pufr
  - Ethidium bromid roztok (100 ml): 50 mg ethidium bromid, přidáme redestilovanou vodu do objemu 100 ml
1. K 0.8 g chlazené agarózy přidáme 40 ml 10krát zředěného chlazeného TBE pufru, dobře promícháme.
  2. V mikrovlné troubě přivedeme roztok k varu, aby byla všechna agaróza rozpuštěna – roztok musí být čirý.
  3. Přidáme 40  $\mu$ l ethidium bromidu a krouživými pohyby promícháme. Připravíme gelovou formu a vytřeme ji ethanolem.
  4. Pomalu nalijeme gel do gelové formy, odstraníme bubliny špičkou a vložíme hřebeny.
  5. Necháme ztuhnout při laboratorní teplotě 30 minut, potom přeložíme do lednice na 20 minut.
  6. Nalijeme 210 ml 10krát zředěného TBE pufru do elektroforetické nádoby a přidáme 210  $\mu$ l ethidium bromidu. Do roztoku vložíme gelovou formu se ztuhlým gelem.

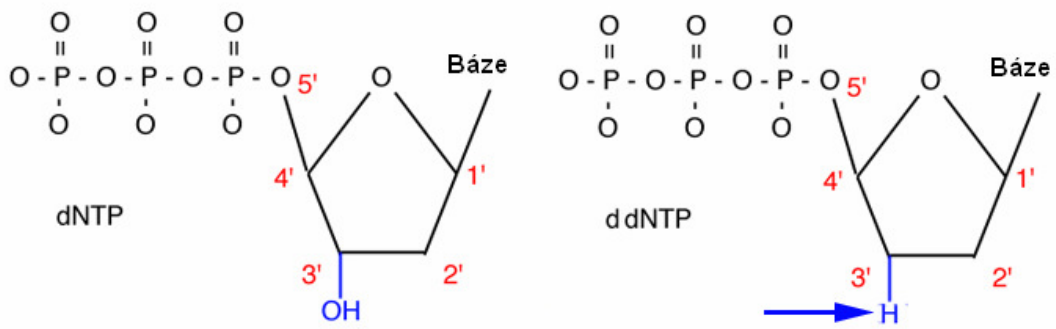
7. Opatrně vybereme hřebeny.
8. Přidáme 4 µl nanášecího pufru ke každému vzorku.
9. Nanese vzorky do jamek na gel, do poslední pozice napipetujeme 50 bp nebo 100 bp standard.
10. Zavřeme elektroforetickou nádobu, zapojíme zdroj elektroforézy. Na prvních 5 minut nastavíme 30-40 V, dále 70-90 V (5 minut) a konečně až do skončení elektroforézy 150 V.
11. Vložíme gel pod UV světlo pro vizualizaci DNA fragmentů.

### **3.3.3.3 Sekvenování DNA**

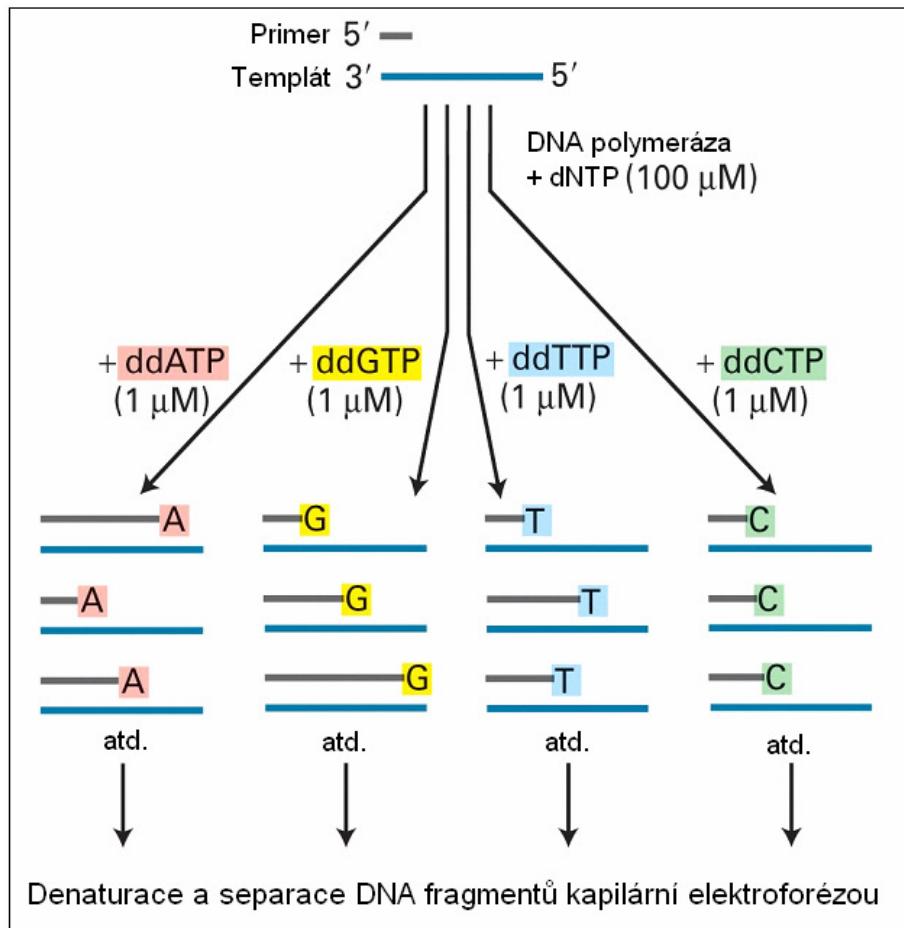
#### **3.3.3.3.1 Princip metody**

DNA sekvenování je proces určení pořadí nukleotidů cílového DNA fragmentu. Většina sekvenátorů používaná v současné době v laboratořích stále pracuje na principu terminace syntézy vyvinutého Frederikem Sangerem a A. R. Coulsonem v roce 1975. Tato technika využívá sekvenčně-specifickou terminaci syntézy DNA pomocí modifikovaných fluorescenčně značených nukleotidových substrátů – dideoxynukleotid trifosfátů (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Tyto molekuly, na rozdíl od klasických deoxynukleotid trifosfátů (dNTP), neobsahují 3' hydroxylovou skupinu (Obrázek 3-4, strana 45) a proto nemohou tvořit fosfodiesterovou vazbu s dalším přichozím dNTP. Po inkorporaci této modifikované báze do nově vzniklého řetězce DNA se tak syntéza ukončuje a vzniká kratší vlákno DNA s posledním navázaným fluorescenčně značeným ddNTP.

Sekvenace DNA probíhá v jedné reakci – to je umožněno značením každého dideoxynukleotid trifosfátu jinou fluorescenční barvou emitující světlo při různé vlnové délce. Vzniklé fragmenty jsou pak separovány podle velikosti kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Pořadí výskytu každého ze čtyř různých fluorescenčních barviv je pak na konci gelu zaznamenána laserem (Obrázek 3-5, strana 45).



**Obrázek 3-4.** Deoxynukleotid trifosfát (vlevo) a dideoxynukleotid trifosfát (vpravo).



**Obrázek 3-5.** Schématické znázornění Sangerovy metody sekvenace DNA (převzato a upraveno podle [109]).

### 3.3.3.3.2 Pracovní postup

1. PCR produkty rozdělíme podle velikosti elektroforézou v 2 % agarózovém gelu podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3.2.2., strana 43.
2. Vyřezeme DNA fragment příslušné délky z agarózového gelu čistým ostrým skalpelem kvůli odstranění nespecifických fragmentů a zbytků primerů po PCR.
3. Vyříznutý proužek zvážíme v 1.5 ml zkumavce. Přidáme 200  $\mu$ l pufru NT (200  $\mu$ l pufru na 100 mg gelu).
4. Inkubujeme při 50°C 5-10 minut, nebo dokud není proužek gelu úplně rozpuštěný. Dobře promícháme.
5. Po úplném rozpuštění gelového proužku přeneseme celý objem do filtrační zkumavky a centrifugujeme při laboratorní teplotě 1 minutu při 10 000 rpm.
6. Sběrnou část zkumavky vylijeme a přidáme 500  $\mu$ l NT3 pufru, znovu centrifugujeme za stejných podmínek.
7. Vylijeme sběrnou část zkumavky, přidáme 200  $\mu$ l NT3 pufru, centrifugujeme při laboratorní teplotě 2 minuty při 10 000 rpm.
8. Filtrační zkumavku přeneseme do čisté 1.5 ml zkumavky. Přidáme 15-50  $\mu$ l NE pufru, inkubujeme při laboratorní teplotě 1 minutu.
9. Centrifugujeme 1 minutu při 10 000 rpm, filtrační zkumavku vyhodíme a pročištěnou DNA skladujeme v lednici, nebo při -20°C.
10. Před dalším zpracováním změříme koncentraci DNA ve vzorku spektrofotometrem.

#### *DNA sekvenace*

1. V sekvenační destičce smícháme všechny reageny sekvenační reakce podle koncentrace DNA ve vzorku (Tabulka 3-5, strana 47).
2. Dobře promícháme a centrifugujeme cca 5 minut.
3. Destičku zavíčkneme, vložíme do termocykléru a spustíme příslušný program (Tabulka 3-6, strana 47).

**Tabulka 3-5.** Reagence sekvenační reakce.

Reagence	Objem (μl)	Délka PCR produktu (bp)	Kvantita (ng)
Sterilní voda	4-0	200	13
DNA templát	1-5	300	20
Primer 1.6μM	1	400	26
Quick Start Master Mix	4	500	33
Celkem	<b>10</b>	1000	65

**Tabulka 3-6.** Teplotní podmínky sekvenační reakce.

Krok	Teplota (°C)	Čas
1	96	20 sec
2	50	20 sec
3	60	4 min
4	krok 2-4 (32x)	

*Precipitace ethanolem*

1. Přidáme 2 μl 3 M acetátu sodného a 50 μl 96 % ethanolu ke každému vzorku.
2. Dobře promícháme a necháme 15 minut při laboratorní teplotě.
3. Centrifugujeme při 4000 rpm 35 minut (4°C).
4. Po skončení centrifugace destičku odvíčkujeme a ihned otočíme na buničinu a centrifugujeme při 500 rpm 30 sekund (4°C).
5. Přidáme 70 μl 70% ethanolu ke každému vzorku a dobře zamícháme.
6. Centrifugujeme při 3500 rpm 15 minut (4°C).
7. Po skončení centrifugace destičku odvíčkujeme a ihned otočíme na buničinu a centrifugujeme při 500 rpm 30 sekund (4°C).
8. Opakujeme body 5.-7.
9. Destičku necháme vyschnout při laboratorní teplotě cca 30 minut.

*Příprava vzorků před vložením do přístroje CEQ 8000*

1. Resuspendujeme vzorky v 20 μl SLS (*Sample Loading Solution*).
2. Každý vzorek převrstvíme minerálním olejem.
3. Do odpovídajících jamek v destičce na pufr nakapeme separační pufr.
4. Vložíme destičku do přístroje a zapneme příslušný program sekvenování DNA.

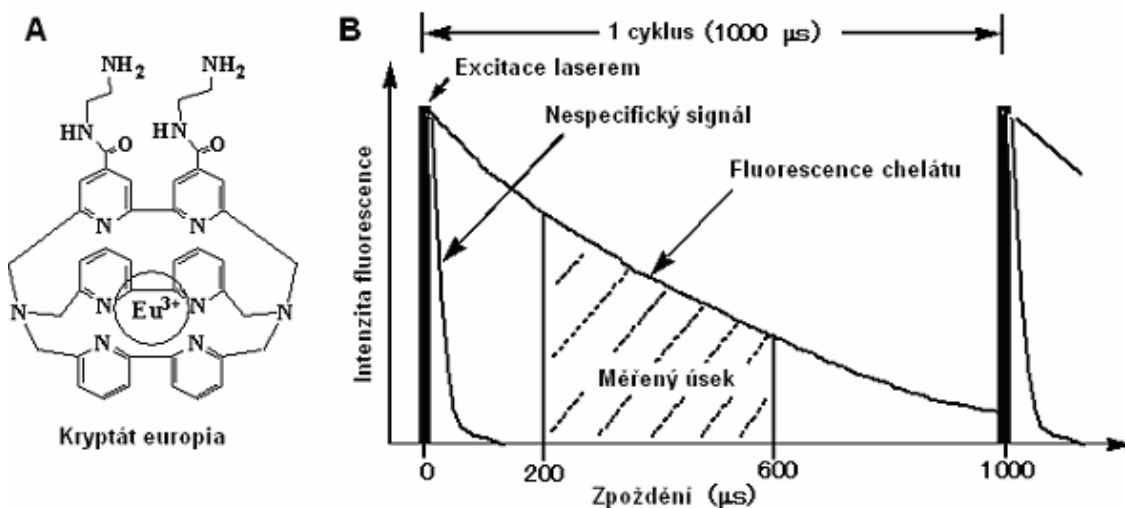
### 3.3.4 Biochemické analýzy

Všechny biochemické analýzy byly provedeny na Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK a VFN Praha.

#### 3.3.4.1 Stanovení PAPP-A v séru

U všech pacientek a kontrol byly změřeny sérové koncentrace PAPP-A pomocí metody TRACE (*Time Resolved Amplified Cryptate Emission* – zesílená emise kryptátu rozložená v čase). Využity byly komerční kity KRYPTOR-PAPP-A (Brahms, Německo). Hladina PAPP-A v séru je vyjádřena jednotkami IU/l, mez detekce je 0.004 IU/l.

Principem TRACE metody je přenos neradioaktivní energie z donoru na akceptor, které se vážou na vzorek ve stejnou dobu. Když je vzorek vybuzen laserem dusíku při 337 nm, donor (kryptát – struktura připomínající klec s iontem europia ve středu (Obrázek 3-6 A)) emituje fluorescenční signál v milisekundách při 620 nm, zatímco akceptor (chemicky modifikovaný, světlo pohlcující protein z řas XL665) generuje signál v nanosekundovém rozsahu při 665 nm. Když je donor i akceptor navázaný na imunokomplex, při 665 nm dojde k zesílení signálu a prodloužení životnosti signálu akceptoru, který lze měřit po dobu několika mikrosekund (Obrázek 3-6 B). Tento signál s dlouhou životností je úměrný koncentraci měřeného analytu.



Obrázek 3-6. A – struktura kryptátu; B - časový diagram měření v metodě TRACE.



Nespecifické signály (signály krátkodobého a nenávaného akceptoru XL665) a středně specifické signály podmíněné přirozenou fluorescencí vzorku jsou eliminovány dočasným zpožděním měření fluorescence.

Signál generovaný kryptátem při 620 nm slouží jako interní reference a měří se simultánně se signálem akceptoru o dlouhé životnosti při 665nm, který je specifickým signálem.

#### **3.3.4.1.1 Pracovní postup**

1. Pomocí soupravy PAPP-A Calibrator provedeme readjustaci kalibrační křivky (pouze při použití nové šarže reagenční jednotky).
2. Kontrolní materiál ve zkumavkách s čárovými kódy umístíme do držáku zkumavek, zadáme požadavky pro analýzu. Provedeme analýzu a vyhodnotíme naměřená data – když naměřená data odpovídají tolerančnímu rozmezí, přejdeme k měření vzorků.
3. Do zkumavek napipetujeme 200  $\mu$ l vzorku, umístíme do držáku zkumavek a vložíme do analyzátoru. Po zadání požadavků v pracovním listu přístroje odstartujeme analýzu. Inkubace trvá 19 minut.

#### **3.3.4.2 Stanovení placentárního růstového faktoru (PIGF) v plasmě**

U 110 pacientek a 41 kontrol byla změřena hodnota PIGF v plasmě metodou ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Pro měření byly využity standardní kity (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA) dle doporučeného postupu výrobce. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách pg/ml, detekční limit je méně než 7 pg/ml.

Měření je založeno na principu kvantitativní sendvičové techniky. Souprava obsahuje destičku s navázanou monoklonální protilátkou specifickou pro PIGF. Standardy a vzorek jsou pipetovány do jamek desky a přítomný PIGF se váže na zakotvenou protilátku. Po odstranění nenávaného materiálu se stanoví množství navázaného PIGF pomocí přidané, s enzymem konjugované další protilátky. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Změna zabarvení měřená při 450 nm je tak přímo úměrná množství PIGF v testovaném vzorku.

### 3.3.4.2.1 Pracovní postup

#### Roztoky

- Promývací roztok: 20 ml promývacího roztoku ve 500 ml redestilované vody
- Substrátový roztok: roztoky A+B v poměru 1:1, 200 µl/vzorek
- Konjugát
- STOP roztok
- Nulový standard: 500 µl roztoku RD6-11 (0 pg/ml)
- Standardy: P/IGF standard rozpustit v 1ml RD6-11 (1000 pg/ml)
  - připravíme sérii standardů s koncentracemi 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml v objemu 500 µl. 500 µl roztoku RD6-11 slouží jako nulový standard (0 pg/ml)

1. Napipetujeme 100 µl Assay diluent RD1-22 do každé jamky.
2. Do jamky napipetujeme 100 µl vzorku nebo standardu, zamícháme a inkubujeme při laboratorní teplotě 2 hodiny.
3. Každou jamku 4x promyjeme promývacím roztokem.
4. Do každé jamky přidáme 200 µl konjugátu, zamícháme a inkubujeme při laboratorní teplotě 2 hodiny.
5. Zopakujeme bod 3. a přidáme 200 µl substrátu. Zamícháme a inkubujeme 30 minut při laboratorní teplotě bez přístupu světla.
6. Do každé jamky přidáme 50 µl STOP roztoku a jemně zamícháme. Měříme absorbanci při 450 nm.
7. Koncentrace vzorku se odečítá z kalibrační křivky.

### 3.3.4.3 Rutinní laboratorní parametry

Rutinní biochemické parametry byly stanoveny standardními biochemickými metodami s využitím komerčně dostupných diagnostických souprav na automatickém analyzátoru Modular (Roche Diagnostics GmbH, Německo).

C-reaktivní protein (CRP) byl měřen imunoturbidimetricky. Sérové hladiny kreatininu byly stanoveny Jaffého metodou. Celková bílkovina ve vzorku moči za 24 hodin byla hodnocena fotometrickou metodou s biuretovým činidlem. Sérové hladiny ALT a AST byly měřeny modifikovanou metodou IFCC pro 37°C s přidavkem

pyridoxal-5-fosfátu. Koncentrace kyseliny močové v séru byla odhadnuta pomocí enzymatické metody s využitím fotometrické detekce a stanovení koncentrace močoviny v séru bylo provedeno enzymatickou UV metodou s ureasou. Celkový bilirubin byl měřen pomocí metody se stabilizovanými diazoniovými solemi.

Krevní obraz byl stanoven pomocí automatického hematologického analyzátoru Beckman Coulter LH750 Hematology analyzer (Beckman Coulter, USA).

### **3.4 Statistické zpracování výsledků**

Výsledky biochemických parametrů jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Pozorování mezi skupinami bylo provedeno nepárovým t-testem a pomocí analýzy rozptylu, tzv. ANOVA testu (*One-Way Analysis of Variance*), s následnou analýzou post-testem (Bonferroni).  $\chi^2$  (chi-kvadrát) test byl použit na otestování rozdílů v distribuci genotypů, frekvencí alel a odchylek v distribuci genotypů od Hardy-Weinbergovy rovnováhy jednotlivých polymorfizmů genu *PAPP-A*. Korelace mezi biochemickými parametry byly hodnoceny pomocí Pearsonova koeficientu. Statistická analýza byla provedena programem “Prism 5”, GraphPad Software Inc.

Výsledky byly považovány za statisticky signifikantní při  $p < 0.05$ .

### **3.5 Dvourozměrná elektroforéza plodové vody**

Metoda dvourozměrné elektroforézy, jejíž postup je popsán v této kapitole, byla zavedena v rámci zahraniční stáže na Oddělení interní medicíny – Sekce Biochemie, University of Perugia, Perugia, Itálie, pod vedením prof. Luciana Binaglii. Vzorky plodové vody pro tuto studii poskytly prof. Di Renzo a MUDr. Juliana Coata z gynekologicko-porodnické kliniky University Degli Studi di Perugia a Santa Maria Della Misericordia Hospital, Perugia, Itálie. Celkově se jednalo o 15 vzorků plodové vody od pacientek s blíže nezjištěnou klinickou charakteristikou. Počáteční fáze zpracování plodové vody probíhala na pracovišti MUDr. Coaty bezprostředně po odebrání vzorků pacientkám. Další zpracování pak probíhalo na Oddělení interní medicíny – Sekce Biochemie.

Metoda byla zavedena jako výchozí krok pro následnou proteomickou analýzu plodové vody.

### 3.5.1 Princip metody

Principem dvourozměrné (2D) elektroforézy je separace proteinů podle jejich náboje v prvním rozměru a podle jejich velikosti v druhém rozměru (Obrázek 3-7, strana 53).

V prvním kroku jsou proteiny plně denaturovány vysokou koncentrací (8 M) močoviny a přeneseny na gelový strip se stabilním pH gradientem rovnoměrně stoupajícím od anody ke katodě. Charakteristickou vlastností každého proteinu je jeho izoelektrický bod, což je hodnota pH, při které má molekula nulový náboj a tudíž se nepohybuje v elektrickém poli. Proteiny jsou během izoelektrické fokusace zaostřeny do úzké zóny (odpovídající rozmezí až 0.01 pH) kolem svého izoelektrického bodu.

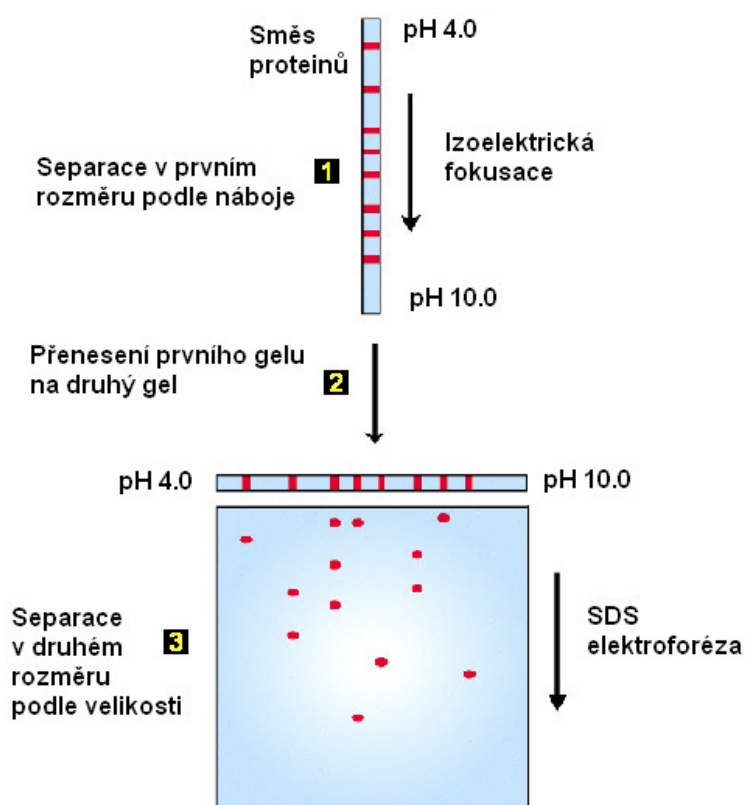
V druhém kroku je pak strip s pH gradientem položen na polyakryamidový gel a probíhá elektroforéza za přítomnosti SDS, při které dochází k rozdělení proteinů podle jejich elektroforetické pohyblivosti (ta závisí na délce polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti, stupni denaturace, posttranslačních modifikacích atd.). Přítomnost SDS zaručí, že všechny proteiny mají stejný, t.j. záporný náboj.

Polypeptidy jsou pak detekovány nejčastěji barvivem Comassie blue nebo koloidním stříbrem [109] a k identifikaci jednotlivých spotů na gelu lze použít analýzu v hmotnostním spektrometru.

### 3.5.2 Roztoky

- Solubilizační pufr: 2.1 g 7 M močovina, 0.76 g 2 M thiomočovina, 0.2 g 4 % CHAPS, 0.045 g 60 mM DTT, 0.02425 g 40 mM TRIS, přidáme redestilovanou vodu do objemu 5 ml.
- Pracovní roztok BSA (0.05 ng/μl): 20 μl BSA (2 ng/μl), přidáme redestilovanou vodu do objemu 800 μl.
- Rehydratační roztok: 1.26 g 7 M močovina, 0.456 g 2 M thiomočovina, 0.06 g 2 % CHAPS, 0.023 g 50 mM DTT, přidáme redestilovanou vodu do objemu 3 ml.

- 12 % lineární gel (18x20x1mm) – na 1 gel: 13.8 ml redestilované vody, 10 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 16 ml 30 % Akrylamid/Bis roztok, 200  $\mu$ l 10 % persulfát amonný (APS), 20  $\mu$ l TEMED.
- Pufr pro elektroforézu: 300 ml TGS 10X, přidáme redestilovanou vodu do objemu 3000 ml.
- Ekvilibrační roztok A a B (pro 2 stripy):  
Zásobní roztok: 3.6 g 6 M močovina, 0.2 g 2 % SDS, 2.5 ml 1.5 M Tris.HCl (pH 8.8), 2 ml glycerol, přidáme redestilovanou vodu do objemu 10 ml.
  - Ekvilibrační roztok A: k 5 ml zásobního roztoku přidáme 100 mg DTT
  - Ekvilibrační roztok B: k 5 ml zásobního roztoku přidáme 125 mg iodoacetamidu a bromphenol blue na konci špičky.
- 1 % agarózový gel: 100 mg agaróza, přidáme 10 ml pufru pro elektroforézu.
- Fixační roztok (pro 1 gel): 20 ml methanol (nebo ethanol), 14 ml kyselina octová, přidáme redestilovanou vodu do objemu 200 ml.



**Obrázek 3-7.** Schéma průběhu dvourozměrné elektroforézy (převzato a upraveno podle [109]).

### 3.5.3 Pracovní postup

#### 3.5.3.1 Zpracování plodové vody

Plodová voda se ihned po odebrání uskladňuje při 4°C a její další zpracování probíhá nejpozději do pěti hodin po samotném odběru.

1. 5ml acetonu necháme zchladit na -80°C.
2. Plodovou vodu centrifugujeme při 800 rpm 10 minut v předem vychlazené centrifuze při 4°C.
3. Odebereme supernatant tak, že nad peletkou necháme 2 mm vrstvu supernatantu neodebranou a vytvoříme alikvoty po 300 µl ve 2 ml plastových zkumavkách.
4. Do třech plastových zkumavek se supernatantem přidáme 1.5 ml studeného acetonu (uloženého v ledu) a uschováme při -20°C přes noc.
5. Zbylé zkumavky se supernatantem a s peletkou buněk plodové vody uskladníme při -80°C až do doby dalšího zpracování.
6. Následujícího dne si připravíme čerstvý solubilizační pufr, uskladníme při laboratorní teplotě.
7. Vzorky s acetonem centrifugujeme 30 minut při 10 000 rpm a 4°C.
8. Supernatant odsajeme, necháme stát 1 minutu při laboratorní teplotě a přidáme 100 µl solubilizačního pufru. Vortexujeme do úplného rozpuštění a třepeme dalších 30 minut na třepačce.
9. Vzorky umístíme na 10-15 minut do sonikátoru a opět třepeme na třepačce 30 minut.
10. Centrifugujeme 10 minut při 12 000 rpm.
11. Supernatant odebereme do nové čisté zkumavky a stanovíme koncentraci proteinů v plodové vodě metodou podle Bradfordové (viz. kapitola 3.5.3.2, strana 55).

#### Buňky plodové vody

12. Vzorky centrifugujeme 10 minut při 800 rpm a 4°C v předem vychlazené centrifuze.
13. Supernatant odsajeme, necháme stát 1 minutu při laboratorní teplotě a přidáme 100µl solubilizačního pufru. Vortexujeme do úplného rozpuštění.

14. Vzorke umístíme na 10-15 minut do sonikátoru a třepeme na třepačce 1 hodinu.
15. Centrifugujeme 15 minut při 2500 rpm.
16. Supernatant odebereme do nové čisté zkumavky a stanovíme koncentraci proteinů v plodové vodě metodou podle Bradfordové.

### 3.5.3.2 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena kolorimetrickou metodou podle Bradfordové [110]. Princip metody je založen na posunu absorpčního spektra barviva Coomassie Brilliant Blue G250 z 464 nm na 595 nm při vazbě na bílkovinu. Tento vzrůst absorbance při 595 nm je přímo úměrný množství navázaného barviva a tudíž i koncentraci proteinů ve vzorku. Koncentrace vzorku se stanovuje z kalibrační křivky.

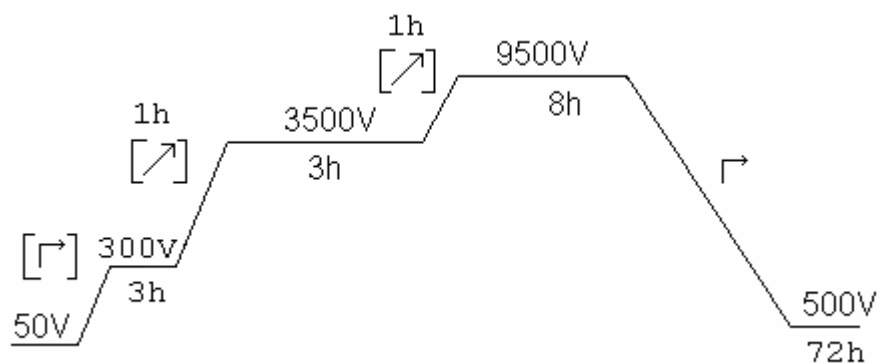
1. Připravíme pracovní roztok BSA (0.05 ng/μl).
2. Připravíme sérii proteinových roztoků BSA s finální koncentrací 1 ng/ml; 1.5 ng/ml a 2 ng/ml, blank a naředěné vzorky (vše v dubletu).
  - 1.0 ng BSA (20 μl pracovního roztoku v 980 μl redestilované vody)
  - 1.5 ng BSA (30 μl pracovního roztoku v 970 μl redestilované vody)
  - 2.0 ng BSA (40 μl pracovního roztoku v 960 μl redestilované vody)
  - Blank: 1000 μl redestilované vody
  - Vzorek (ředěný)
3. Přidáme 500ml *Bradford solution* a promícháme.
4. Po 5 minutách změříme absorbanci každého roztoku při 595 nm.
5. Sestrojíme kalibrační křivku vynesemím koncentrací standardů proti jejich absorbanci při 595 nm do grafu. Vypočteme koncentraci neznámých vzorků.

### 3.5.3.3 2D-elektroforéza proteinů plodové vody

#### Rehydratace a izoelektrická fokusace

1. Připravíme rehydratační roztok.
2. V čisté 2 ml plastové zkumavce smícháme rehydratační roztok ( $V = 400\mu\text{l}$  – objem vzorku) a 400 μg celkových proteinů (vypočteme podle koncentrace vzorku).

3. Přidáme 0.4  $\mu$ l biolytového pufru (finální koncentrace 0.1 %) a bromphenol blue na konci špičky.
4. Centrifugujeme 2.5 minuty při 10 000 rpm.
5. IPG (*Immobilized pH Gradient*) stripy vybereme z lednice a necháme při laboratorní teplotě cca 5 minut.
6. Vzorek přeneseme pipetou přesně doprostřed žlábků rehydratační vaničky a na něj přeneseme strip gelem dolů v orientaci + na + a - na - .
7. Případné bubliny odstraníme a strip převrstvíme minerálním olejem.
8. Pasivní rehydratace probíhá 20-30 minut při 20°C.
9. Spustíme aktivní rehydrataci (16-18°C, 50 V). Po 3 hodinách přerušíme aktivní rehydrataci a mezi elektrody a IPG strip vložíme navlhčené čtverečky speciálního papíru a pokračujeme v rehydrataci dalších 5 hodin.
10. Návazně pokračuje izoelektrická fokusace (nejlépe přes noc). Fokusaci ukončujeme při celkovém napětí  $V_h=75\ 000$  (Obrázek 3-8).



**Obrázek 3-8.** Průběh izoelektrické fokusace.

#### Příprava gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

1. Ve stejný den si připravíme gel. Připravíme si aparaturu na gel, nalitím vody mezi skla zkontrolujeme, jestli je aparatura správně utěsněná.
2. Vodu vylijeme, mezi skla nalijeme ethanol, vylijeme a vysušíme fénem.
3. Připravíme si 12 % lineární gel, APS a TEMED přidáme až na závěr, dobře promícháme a ihned přeneseme mezi skla 1ml pipetou střídavě z levé a pravé strany.



4. Na vrch gelu nalijeme 2 mm vrstvu vodou nasyceného butanolu (50 ml butanolu a 10 ml redestilované vody). Polymerizace probíhá 2 hodiny. Po dvou hodinách odsajeme vodu-butanol a převrstvíme redestilovanou vodou. Uskladníme přes noc při 4°C.
5. Připravíme si pufr pro elektroforézu (můžeme použít 2-3krát).

#### SDS-PAGE elektroforéza

1. Připravíme ekvilibrační roztok A a B.
2. Strip vybereme z rehydratační vaničky a opatrně promyjeme v redestilované vodě. Pak vložíme strip zpět gelem nahoru a přidáme ekvilibrační roztok A. Inkubujeme 10 minut.
3. Roztok A odsajeme a dalších 10 minut inkubujeme s ekvilibračním roztokem B.
4. Mezitím připravíme 1 % agarózový gel.
5. Odsajeme roztok B a na 5 sekund strip ponoříme do pufru pro elektroforézu.
6. Strip položíme mezi skla na povrch gelu a zalijeme agarózovým gelem.
7. Připravíme elektroforetickou vanu s pufrem, vložíme skla s gelem a odstraníme bubliny ze spodní části skel.
8. Elektroforéza probíhá nejdříve při konstantním proudu 50 mA 30 minut, pak pokračuje při 92 mA 3 hodiny, dokud vzorky nedoputují na konec gelu.
9. Připravíme fixační roztok.
10. Po ukončení elektroforézy uvolníme vrchní sklo z gelu, odstraníme strip a agarózový gel a odstříhneme růžek gelu vlevo nahoře (pro orientaci při dalším hodnocení).
11. Gel vložíme na 30 minut do fixačního roztoku.
12. Odstraníme fixační roztok a přidáme 200 ml roztoku RUBY (můžeme použít 3krát). Necháme inkubovat přes noc na třepačce přikryté černou fólií.
13. Následující den odstraníme roztok RUBY a na 1 hodinu opět vložíme do čerstvého fixačního roztoku.
14. Fixační roztok odstraníme a dvakrát přemyjeme gel v redestilované vodě. Gel je nyní připraven ke skenování. Uchovááme v redestilované vodě při 4°C.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Izolace DNA a koncentrace DNA ve vzorcích

Izolace DNA a měření koncentrace DNA bylo provedeno podle pracovních postupů uvedených v kapitolách 3.3.1, strana 35 a 3.3.2, strana 38.

DNA byla izolována celkem z 327 krevních vzorků. Koncentrace získané DNA se pohybovaly v rozmezí 100-500 ng/μl v celkovém objemu 1 ml (celková výtěžnost přibližně 100-500 μg) a čistota DNA vzorků dosahovala hodnot A260/A280 v rozmezí 1.8-2.2.

### 4.2 Analýza polymorfizmů genu *PAPP-A*

V rámci mé disertační práce jsem zavedla metody analýzy celkově 10 polymorfizmů lokalizovaných na čtyřech exonech (resp. částech intronů) genu *PAPP-A* pomocí přímého sekvenování vybraných úseků tohoto genu. Tyto úseky byly vybírány dle výskytu jednonukleotidových polymorfizmů v genu *PAPP-A* zaznamenaných v databázi polymorfizmů Národního centra biotechnologických informací NCBI [73] na začátku této studie na podzim roku 2007. Proto nebyly do analýzy zahrnuty polymorfizmy, které byly do databáze doplněny později a jsou uvedeny v Tabulce 1-2, strana 24.

Sekvenování DNA probíhalo podle pracovních postupů uvedených v kapitole 3.3.3, strana 39.

#### 4.2.1 Genotypová a alelická distribuce *PAPP-A* polymorfizmů

Celkově bylo analyzováno 10 polymorfizmů genu *PAPP-A*:

- Pro324Leu (rs445154), Pro325Leu (rs445159) a Cys327Cys (rs12375498) na exonu 2;
- Arg654Lys (rs432500), Ala678Pro (rs34371232) a Thr686Ala (rs35578777) na exonu 5;
- Glu715Glu (rs35407884) na exonu 6, C/G (rs13290387) na intronu 6;
- Phe802Leu (rs1063409), Ser827Ser/Leu (rs34087604) na exonu 7.

Polymorfizmy na exonu 5 a 7 genu *PAPP-A* byly analyzovány u 103 pacientek s komplikacemi v těhotenství, 52 zdravých těhotných kontrol a 48 zdravých netěhotných kontrol. Jelikož jsme v tomto počtu 203 sledovaných jedinců nenašli mutovanou alelu u žádného ze sledovaných polymorfizmů, pro analýzu těchto exonů jsme dále nerozšiřovali sledovaný soubor jedinců. Polymorfizmy na exonu 2 a 6 genu *PAPP-A* byly analyzovány u 165 pacientek s komplikacemi v těhotenství a u 114 zdravých těhotných kontrol.

V námi studovaných skupinách pacientek s patologickým těhotenstvím a kontrol jsme zachytili pouze polymorfizmus Cys327Cys (rs12375498) na exonu 2 a polymorfizmus C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A*. Pokud jde o zbylé polymorfizmy, u žádného ze sledovaných jedinců jsme nenašli mutovanou alelu těchto polymorfizmů (Tabulka 4-1).

Obrázek 4-1 (strana 60) graficky znázorňuje tři možné genotypy polymorfizmu Cys327Cys na exonu 2 a tři možné genotypy polymorfizmu C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A* získané sekvenační analýzou DNA jsou zobrazeny na obrázku 4-2 (strana 61).

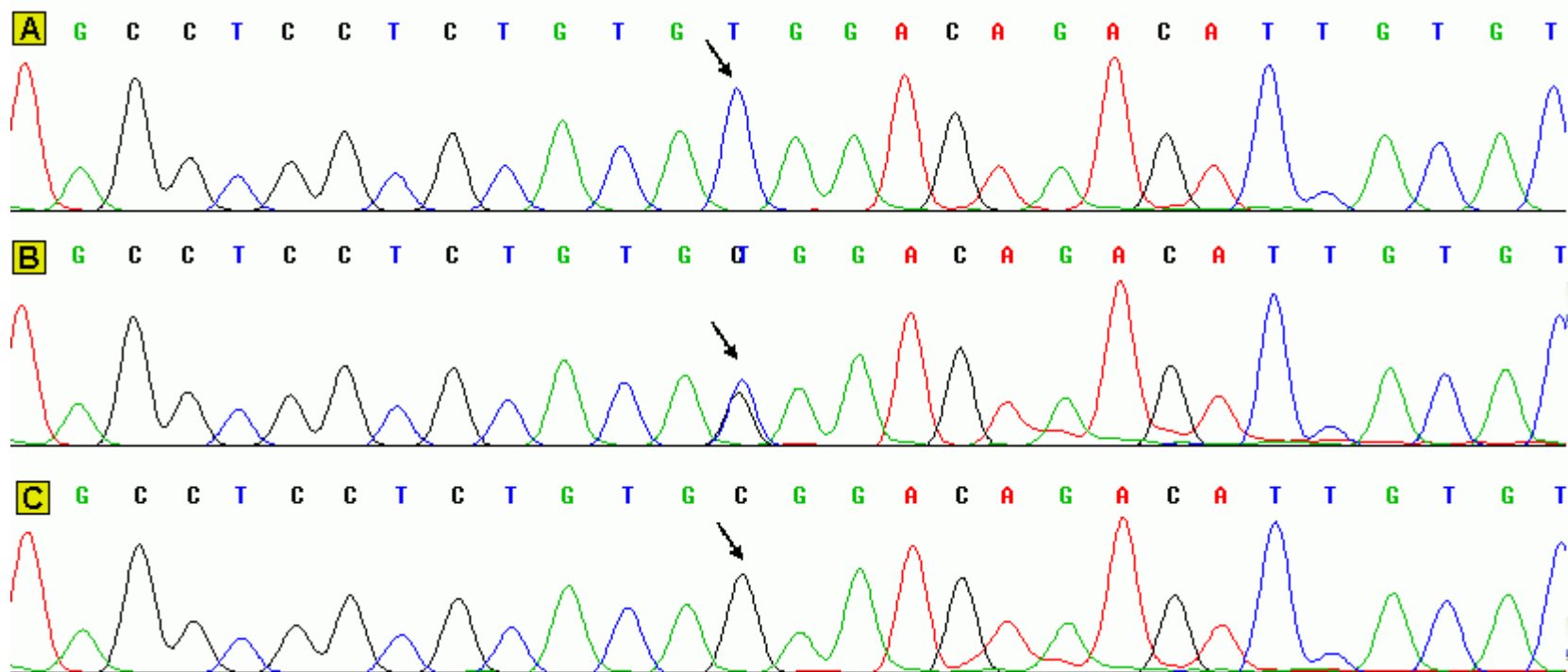
Podrobně viz příloha 1 a 2 [76, 77].

**Tabulka 4-1.** Frekvence alel sledovaných polymorfizmů genu *PAPP-A* u pacientek s komplikacemi v těhotenství.

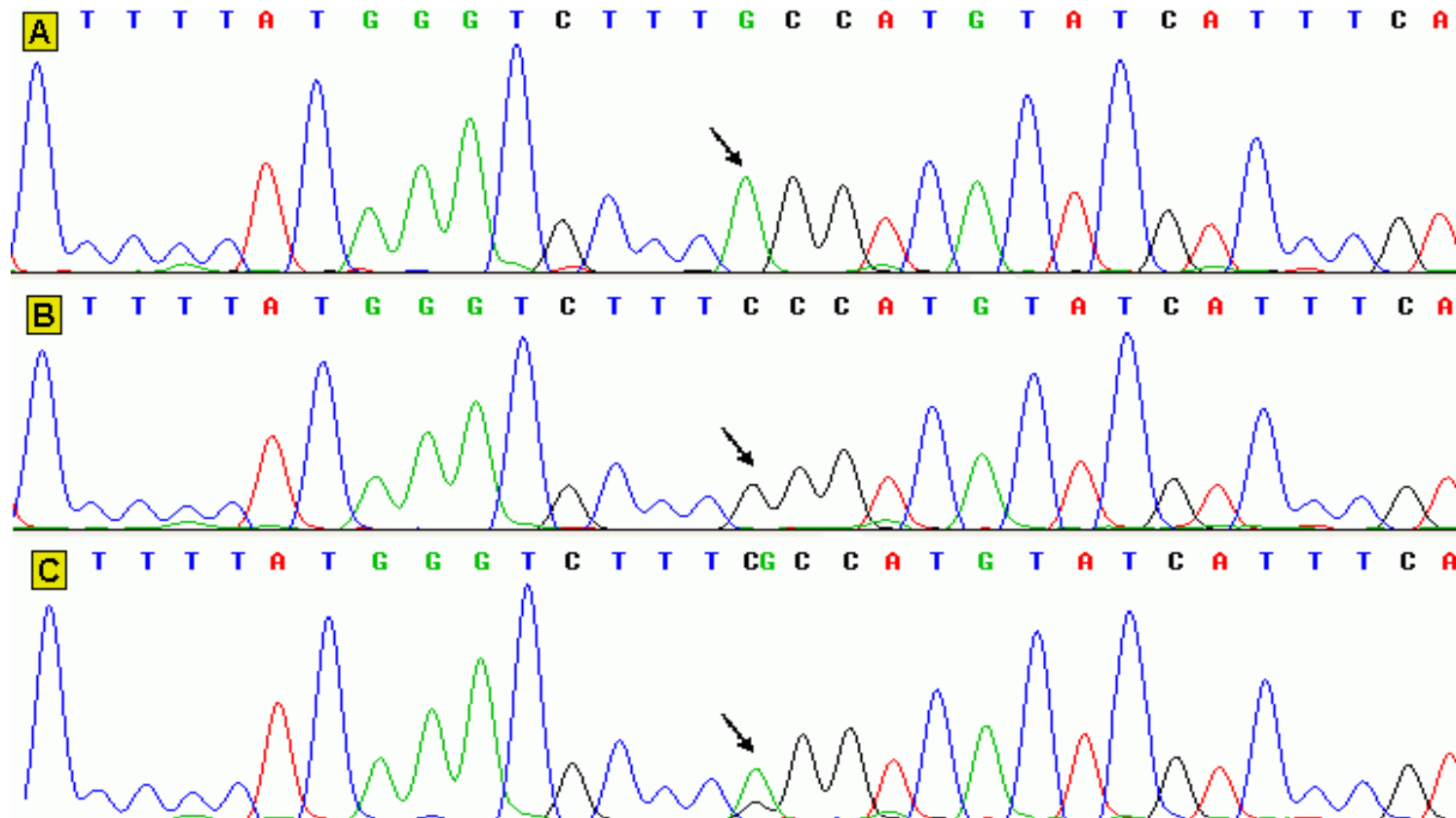
	Počet pacientek	Polymorfizmus	dbSNP označení	Wild-type alela (frekvence)	Mutovaná alela (frekvence)
<b>Exon 2</b>	165	Pro324Leu	rs445154	C (1.00)	T (0.00)
		Pro325Leu	rs445159	C (1.00)	T (0.00)
		Cys327Cys	rs12375498	C (0.74)	T (0.26)
<b>Exon 5</b>	103	Arg654Lys	rs432500	G (1.00)	A (0.00)
		Ala678Pro	rs34371232	G (1.00)	C (0.00)
		Thr686Ala	rs35578777	A (1.00)	G (0.00)
<b>Exon 6</b>	165	Glu715Glu	rs35407884	A (1.00)	G (0.00)
<b>Intron 6</b>	165	C/G	rs13290387	G (0.57)	C (0.43)
<b>Exon 7</b>	103	Phe802Leu	rs1063409	T (1.00)	C (0.00)
		Ser827Ser/Leu	rs34087604	TC (1.00)	C/-- (0.00)

dbSNP – databáze polymorfizmů Národního centra biotechnologických informací NCBI.

**Obrázek 4-1.** Grafické znázornění tří možných genotypů polymorfizmu C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A*: homozygot T (A), heterozygot CT (B) a homozygot C (C).



**Obrázek 4-2.** Grafické znázornění tří možných genotypů polymorfizmu Cys327Cys na exonu 2 genu *PAPP-A*: homozygot G (A), homozygot C (B) a heterozygot CG (C).



#### 4.2.1.1 Polymorfismus Cys327Cys (rs12375498) genu *PAPP-A*

Alelické a genotypové frekvence polymorfizmu Cys327Cys genu *PAPP-A* se mezi celou skupinou pacientek s komplikacemi v těhotenství a zdravými těhotnými ženami signifikantně nelišily a současně byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou HWE (*Hardy-Weinberg Equilibrium*).

Wild-type alela C byla nalezena u 73.2% pacientek s komplikovaným těhotenstvím a 78.5% kontrol. Naproti tomu byla mutovaná alela T nalezena u 26.8% pacientek a u 21.5% kontrol. Genotypové frekvence jsou zobrazeny v Tabulce 4-2.

Po rozdělení pacientek do skupin podle podrobnější klinické charakteristiky byl u pacientek s preeklamsií nalezen signifikantně zvýšený výskyt TT genotypu v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0.01$ ). Navíc, výskyt T alely ve stejné skupině pacientek byl v porovnání se skupinou zdravých kontrol rovněž zvýšen, byť tento trend byl méně výrazný ( $p = 0.056$ ) (Tabulka 4-3, Graf 4-1, strana 63).

Podrobně viz příloha 2 [77].

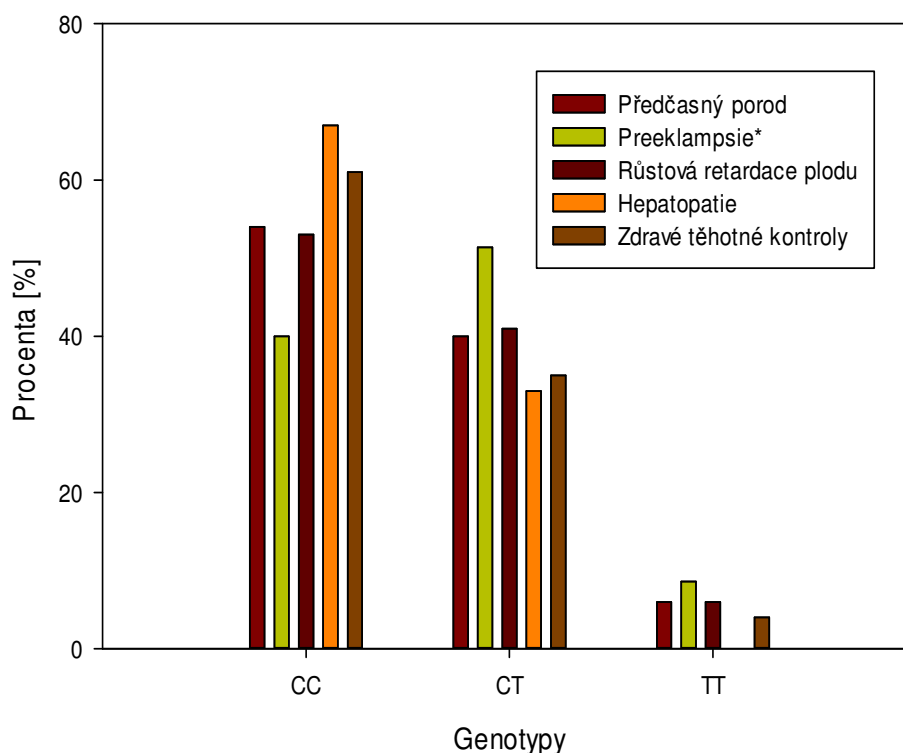
**Tabulka 4-2.** Genotypové frekvence polymorfizmu Cys327Cys genu *PAPP-A* u pacientek s komplikacemi v těhotenství a zdravých těhotných žen – zjištěné frekvence a očekávané frekvence dle Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

	<i>Cys327 Cys (rs12375498) exon 2</i>			
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<b>Pacientky s patologickým těhotenstvím (N=165)</b>	52.0	42.0	6.0	
HWE	53.6	39.2	7.2	n.s.
<b>Zdravé těhotné kontroly (N=114)</b>	61.0	35.0	4.0	
HWE	61.6	33.8	4.6	n.s.

**Tabulka 4-3.** Genotypové a alelické frekvence polymorfizmu Cys327Cys genu *PAPP-A* ve skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky a u zdravých kontrol.

<i>Cys327Cys (rs12375498) exon 2</i>	<i>Genotypy [%]</i>			<i>Alely [%]</i>		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
<b>Předčasný porod (N=98)</b>	54	40	6	74	26	
<b>Preeklampsie (N=35)</b>	40	51.4	8.6	* 66	34	+
<b>Růstová retardace plodu (N=34)</b>	53	41	6	74	26	
<b>Hepatopatie (N=15)</b>	67	33	0	83	17	
<b>Zdravé těhotné kontroly (N=114)</b>	61	35	4	78	22	

Porovnání bylo provedeno mezi skupinami pacientek s patologických těhotenstvím versus kontroly. Byl použit  $\chi^2$  (chi-kvadrát) test, \* $p < 0.01$  vs. kontroly, <sup>+</sup> $p = 0.056$  vs. kontroly.



**Graf 4-1.** Grafické znázornění genotypových frekvencí polymorfizmu Cys327Cys genu *PAPP-A* ve skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky (k Tabulce 4-3, \* $p < 0.01$  vs. kontroly).

#### 4.2.1.2 Polymorfismus C/G (rs13290387) genu *PAPP-A*

Alelické a genotypové frekvence polymorfizmu C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A* se mezi celou skupinou pacientek s komplikacemi v těhotenství a zdravými těhotnými ženami signifikantně nelišily a současně byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou.

Wild-type alela C byla nalezena u 59.5% pacientek s komplikovaným těhotenstvím a 56.5% kontrol. Naproti tomu byla mutovaná alela G nalezena u 40.5% pacientek a u 43.5% kontrol. Genotypové frekvence jsou zobrazeny v Tabulce 4-4.

Při porovnání jednotlivých skupin pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky jsme žádné signifikantní rozdíly v genotypových a alelických frekvencích v porovnání s kontrolní skupinou zdravých těhotných žen nenašli (Tabulka 4-5, Graf 4-2, strana 65).

Podrobně viz příloha 2 [77].

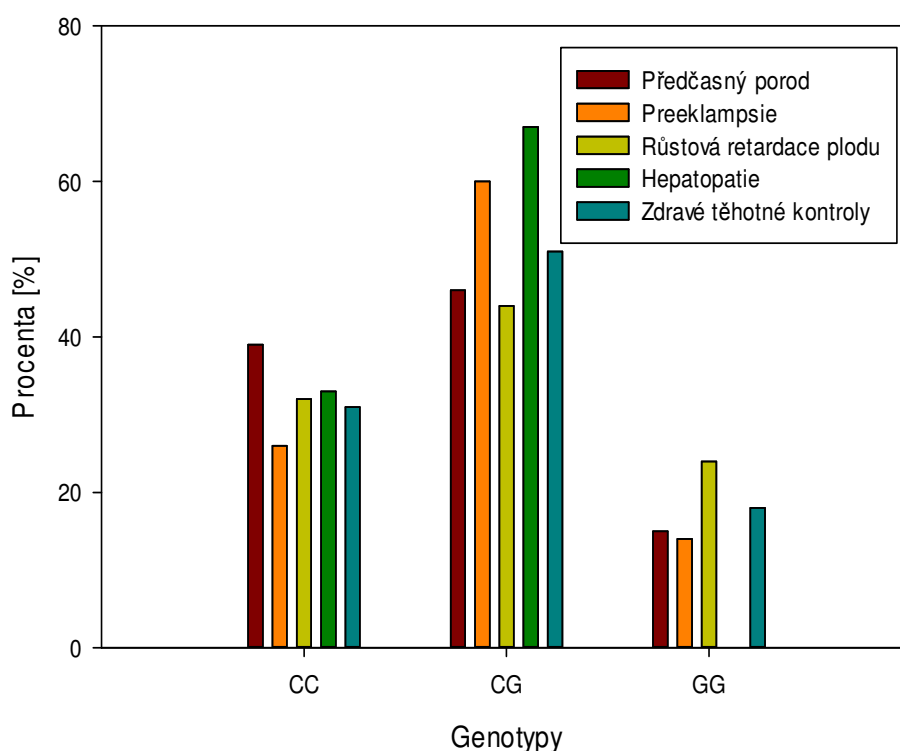
**Tabulka 4-4.** Genotypové frekvence polymorfizmu C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A* u pacientek s komplikacemi v těhotenství a zdravých těhotných žen – zjištěné frekvence a očekávané frekvence dle Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

	<i>C/G (rs13290387) intron 6</i>			
	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<b>Pacientky s patologickým těhotenstvím (N=165)</b>	36.0	47.0	17.0	
HWE	35.4	48.2	16.4	n.s.
<b>Zdravé těhotné kontroly (N=114)</b>	31.0	51.0	18.0	
HWE	31.9	49.2	18.9	n.s.



**Tabulka 4-5.** Genotypové a alelické frekvence polymorfizmu C/G (rs13290387) genu *PAPP-A* ve skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky a zdravých těhotných kontrol.

<i>C/G (rs13290387) intron 6</i>	<i>Genotypy [%]</i>			<i>Alely [%]</i>	
	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	<i>C</i>	<i>G</i>
<b>Předčasný porod (N=98)</b>	39	46	15	62	38
<b>Preeklampsie (N=35)</b>	26	60	14	56	44
<b>Růstová retardace plodu (N=34)</b>	32	44	24	54	46
<b>Hepatopatie (N=15)</b>	33	67	0	67	33
<b>Zdravé těhotné kontroly (N=114)</b>	31	51	18	57	43



**Graf 4-2.** Grafické znázornění genotypových frekvencí polymorfizmu C/G (rs13290387) genu *PAPP-A* ve skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky (k Tabulce 4-5).

## 4.2.2 Biochemické parametry

Tabulka 4-6 (strana 68) zobrazuje výsledky základních biochemických parametrů v jednotlivých skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky a ve skupině zdravých těhotných kontrol. Věk sledovaných žen v těchto skupinách se signifikantně nelišil.

### 4.2.2.1 PAPP-A protein

V Tabulce 4-7 (strana 69) jsou obsaženy hodnoty sérových koncentrací PAPP-A proteinu ve skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky a u zdravých kontrol. Z těchto hodnot jsou patrné signifikantně zvýšené koncentrace PAPP-A u pacientek s preeklampsií v porovnání s kontrolami (Graf 4-3, strana 69). Když jsme rozdělili preeklamptické pacientky do podskupiny pacientek s proteinurií (N=21, PAPP-A: 128.7±83.7 IU/l) a podskupiny pacientek, které vyvinuly preeklampsii později nebo měly zvýšené hladiny kys. močové nad 320 μmol/l (N=14, PAPP-A: 108.4±69.6 IU/l), rozdíl mezi preeklamptickými pacientkami s proteinurií a kontrolami (N=114, PAPP-A: 82.8±49.4 IU/l) byl ještě statisticky výraznější (p<0.01, porovnání všech tří skupin ANOVA testem: p=0.0025). Skupina pacientek bez proteinurie v čase odběru se od kontrolní skupiny signifikantně nelišila.

Skupina pacientek s hepatopatií vykazovala trend k zvýšeným sérovým hladinám PAPP-A, kdežto u pacientek s hrozícím předčasným porodem měly tendenci spíše klesat, tyto rozdíly však v porovnání s kontrolami nebyly signifikantní (Tabulka 4-7, Graf 4-3, strana 69).

Korelační analýza prokázala signifikantní vztah sérových hladin PAPP-A k CRP u pacientek s růstovou retardací plodu (r=0.49, p=0.007).

Podrobně viz příloha 2 [77].

### 4.2.2.2 PIGF

Tabulka 4-7 (strana 69) udává hodnoty PIGF faktoru ve skupinách pacientek rozdělených dle klinické charakteristiky a u zdravých kontrol. Ve skupinách pacientek s preeklampsií a růstovou retardací plodu (IUGR) byly pozorovány signifikantně snížené hladiny PIGF v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 4-4, strana 70).

Po rozdělení preeklamptických pacientek do podskupiny pacientek s proteinurií v čase odběru (N=21, PIGF: 92.2±67.4 pg/ml) a podskupiny pacientek, které vyvinuly

preeklampsii později nebo měly zvýšené hladiny kys. močové nad hodnotu 320  $\mu\text{mol/l}$  (N=11, P/IGF: 132.5 $\pm$ 94.4 pg/ml), byl rozdíl mezi preeklamptickými pacientkami s proteinurií a kontrolami (N=41, P/IGF: 224.7 $\pm$ 152.6 pg/ml) ještě výraznější (pacientky s proteinurií vs. kontroly:  $p < 0.001$ , porovnání všech tří skupin ANOVA testem:  $p = 0.0006$ ). Skupina pacientek bez proteinurie v čase odběru se od kontrolní skupiny signifikantně nelišila.

Při korelačních analýzách byla nalezena pozitivní korelace P/IGF s hladinami PAPP-A u skupiny zdravých těhotných kontrol. U pacientek s hrozícím předčasným porodem byl nalezen negativní vztah P/IGF s hladinami erytrocytů a hemoglobinu v oběhu matky. U pacientek s IUGR byla nalezena negativní korelace P/IGF s kreatininem.

#### **4.2.3 Asociace genotypů a biochemických parametrů**

Sérové hladiny PAPP-A proteinu byly porovnávány ve skupinách pacientek a zdravých těhotných kontrol rozdělených podle genotypů polymorfizmu Cys327Cys (exon 2) a C/G (intron 6) genu *PAPP-A*.

Zdravé těhotné kontroly s TT genotypem polymorfizmu Cys327Cys měly zvýšené sérové hladiny PAPP-A v porovnání se skupinou zdravých těhotných kontrol s wild-type genotypem CC ( $p = 0.048$ , TT vs. CC t-test, ANOVA – nesignifikantní). Tento trend nebyl nalezen v žádné další námi studované skupině.

Nenašli jsme žádné signifikantní rozdíly v sérových hladinách PAPP-A proteinu ve skupinách pacientek a kontrol rozdělených podle genotypů polymorfizmu C/G (rs13290387) genu *PAPP-A* (Tabulka 4-8, strana 70).

Podrobně viz příloha 2 [77].

**Tabulka 4-6.** Biochemické parametry u pacientek s patologickým těhotenstvím a zdravých kontrol ve třetím trimestru gravidity.

	<b>Předčasný porod</b> n=98	<b>Preeklampsie</b> n=35	<b>IUGR</b> n=34	<b>Hepatopatie</b> n=15	<b>Těhotné kontroly</b> n=114	<b>p-hodnota</b>
<b>Věk [roky]</b>	30.7 ± 5.1	31.3 ± 4.1	31.1 ± 4.6	31.7 ± 3.4	30.1 ± 4.3	n.s.
<b>Erytrocyty [<math>\times 10^{12}/l</math>]</b>	3.57 ± 0.42***	3.98 ± 0.46###	3.93 ± 0.39###	3.92 ± 0.26##	4.02 ± 0.32	<0.0001
<b>Hemoglobin [g/l]</b>	111.84 ± 13.26***	119.43 ± 14.56##	124.32 ± 12.08###	119.60 ± 7.90	119.63 ± 8.47	<0.0001
<b>Trombocyty [<math>\times 10^9/l</math>]</b>	250.24 ± 62.06	201.54 ± 68.08###	220.88 ± 54.34	214.33 ± 51.83	231.94 ± 53.88	0.0003
<b>Neutrofilů relativní [%]</b>	76.97 ± 9.38***	66.18 ± 11.20*,###	68.84 ± 8.72###	71.20 ± 8.56	71.73 ± 8.51	<0.0001
<b>Lymfocyty [%]</b>	15.48 ± 7.12***	24.53 ± 8.68***,###	22.69 ± 6.91###	20.67 ± 7.30	19.16 ± 4.88	<0.0001
<b>C-reaktivní protein [mg/l]</b>	15.68 ± 25.40	8.57 ± 14.94	5.82 ± 4.85	5.56 ± 6.20#	n.m.	0.032
<b>Močovina [mmol/l]</b>	1.94 ± 1.32	3.99 ± 3.68###	3.21 ± 0.92#	3.09 ± 1.06	n.m.	0.0001
<b>Kreatinin [<math>\mu</math>mol/l]</b>	44.88 ± 19.15	61.54 ± 13.60###	55.87 ± 14.42	56.86 ± 9.88	n.m.	0.0002
<b>Kyselina močová [<math>\mu</math>mol/l]</b>	187.47 ± 83.16	347.34 ± 94.62###,++	308.97 ± 78.77###	264.93 ± 72.04	n.m.	< 0.0001
<b>Bilirubín [<math>\mu</math>mol/l]</b>	7.01 ± 4.12 <sup>+</sup>	6.97 ± 4.86 <sup>++</sup>	6.54 ± 2.66 <sup>++</sup>	10.96 ± 4.14	n.m.	0.0018
<b>ALT [<math>\mu</math>kat/l]</b>	0.29 ± 0.15 <sup>+++</sup>	0.52 ± 0.93 <sup>+++</sup>	0.41 ± 0.93 <sup>+++</sup>	2.94 ± 1.94	n.m.	< 0.0001

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (směrodatná odchylka). Pro statistické zpracování byla použita analýza rozptylu (*One-way ANOVA*) s následnou analýzou post testem (Bonferroni). ALT – alaninaminotranferáza, n.m. – neměřeno, n.s. – nesignifikantní.

\*p<0.05, \*\*\*p<0.001, vs. kontroly,

#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs. předčasný porod,

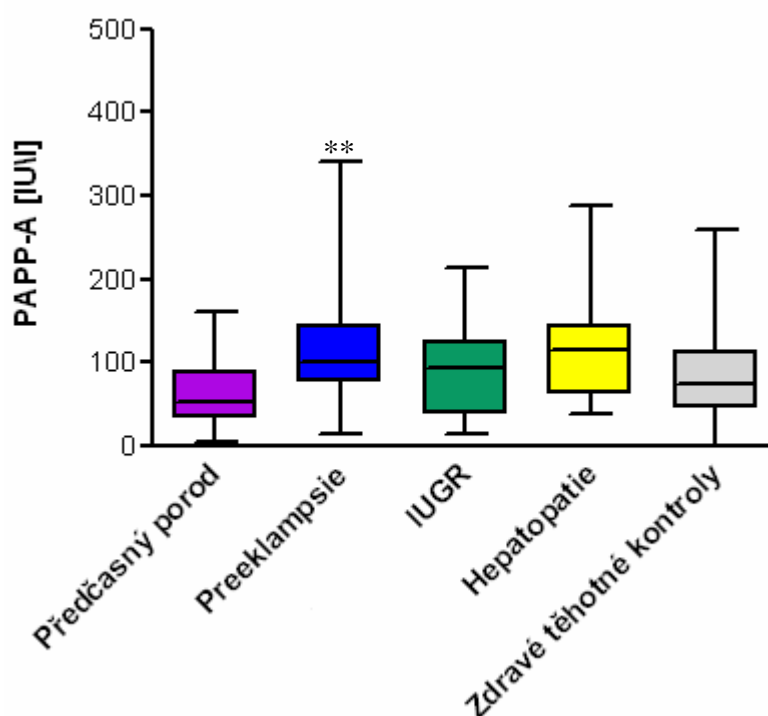
<sup>+</sup>p<0.05, <sup>++</sup>p<0.01, <sup>+++</sup>p<0.001 vs. hepatopatie.

**Tabulka 4-7.** Hodnoty PAPP-A a PlGF u pacientek s patologickým těhotenstvím a u zdravých kontrol ve třetím trimestru gravidity.

	<i>PAPP-A [IU/l]</i>	<i>N (počet)</i>	<i>PlGF [pg/ml]</i>	<i>N (počet)</i>
<b>Předčasný porod</b>	65.15±44.27	98	218.6±170.47	35
<b>Preeklampsie</b>	120.92±78.18**	35	106.04±78.64**	32
<b>IUGR</b>	94.16±79.79	34	103.38±99.17**	30
<b>Hepatopatie</b>	118.35±67.23	15	197.65±138.35	13
<b>Zdravé těhotné kontroly</b>	82.8±49.9	114	224.71±152.60	41
<b>ANOVA (p)</b>	<0,0001		<0,0001	

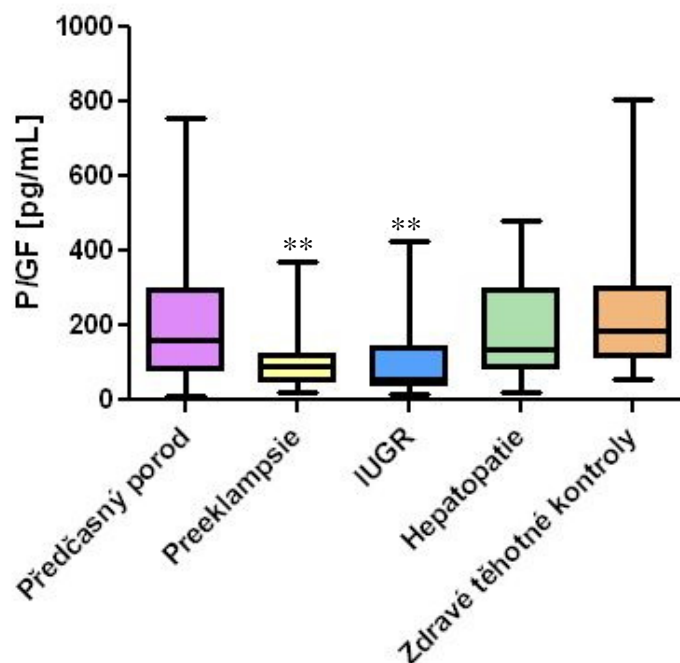
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (směrodatná odchylka). Pro statistické zpracování byla použita analýza rozptylu (*One-way ANOVA*) s následnou analýzou post testem (Bonferroni).

\*\*p<0.01, vs. kontroly.



**Graf 4-3.** Sérové koncentrace PAPP-A proteinu u pacientek s komplikacemi v těhotenství a zdravých těhotných kontrol ve třetím trimestru gravidity (k Tabulce 4-7).

Legenda: Whiskerovo znázornění (min. - max.) s hodnotami mediánu; \*\*p<0.01, vs. kontroly.



**Graf 4-4.** Sérové hladiny P/IGF u pacientek s komplikacemi v těhotenství a u zdravých těhotných kontrol ve třetím trimestru gravidity (k Tabulce 4-7).

Legenda: Whiskerovo znázornění (min. - max.) s hodnotami mediánu; \*\* $p < 0.01$ , vs. kontroly.

**Tabulka 4-8.** Hodnoty sérových hladin PAPP-A proteinu ve skupinách pacientek rozdělených na základě klinické charakteristiky a u kontrol.

	PAPP-A [IU/l]				Zdravé těhotné kontroly
	Předčasný porod	Preeklampsie	IUGR	Hepatopatie	
<i>Cys327Cys (exon 2)</i>					
CC	61.4±44.1	101.5±59.4	91.9±81.4	122.5±72.9	74.8±48.3
CT	72.5±47.1	137.5±90.2	104.7±110.6	110.1±61.1	78.1±51.8
TT	54.3±20.2	117.7±88.2	89.3±71.9	-	129.5±74.2*
<i>C/G (intron 6)</i>					
CC	63.0±40.9	109.4±63.8	133.2±126.9	92.9±53.3	84.1±59.0
CG	71.0±51.8	119.7±85.7	72.6±36.5	113.8±50.1	80.2±40.7
GG	55.3±22.9	144.7±75.1	112.9±77.7	286.9	88.8±56.8

Pro statistické zpracování byla použita analýza rozptylu (*One-way ANOVA*) s následnou analýzou post testem (Bonferroni) a nepárový t-test. ANOVA test byl nesignifikantní, \* $p = 0.048$ , TT vs. CC zdravé těhotné kontroly (t-test).

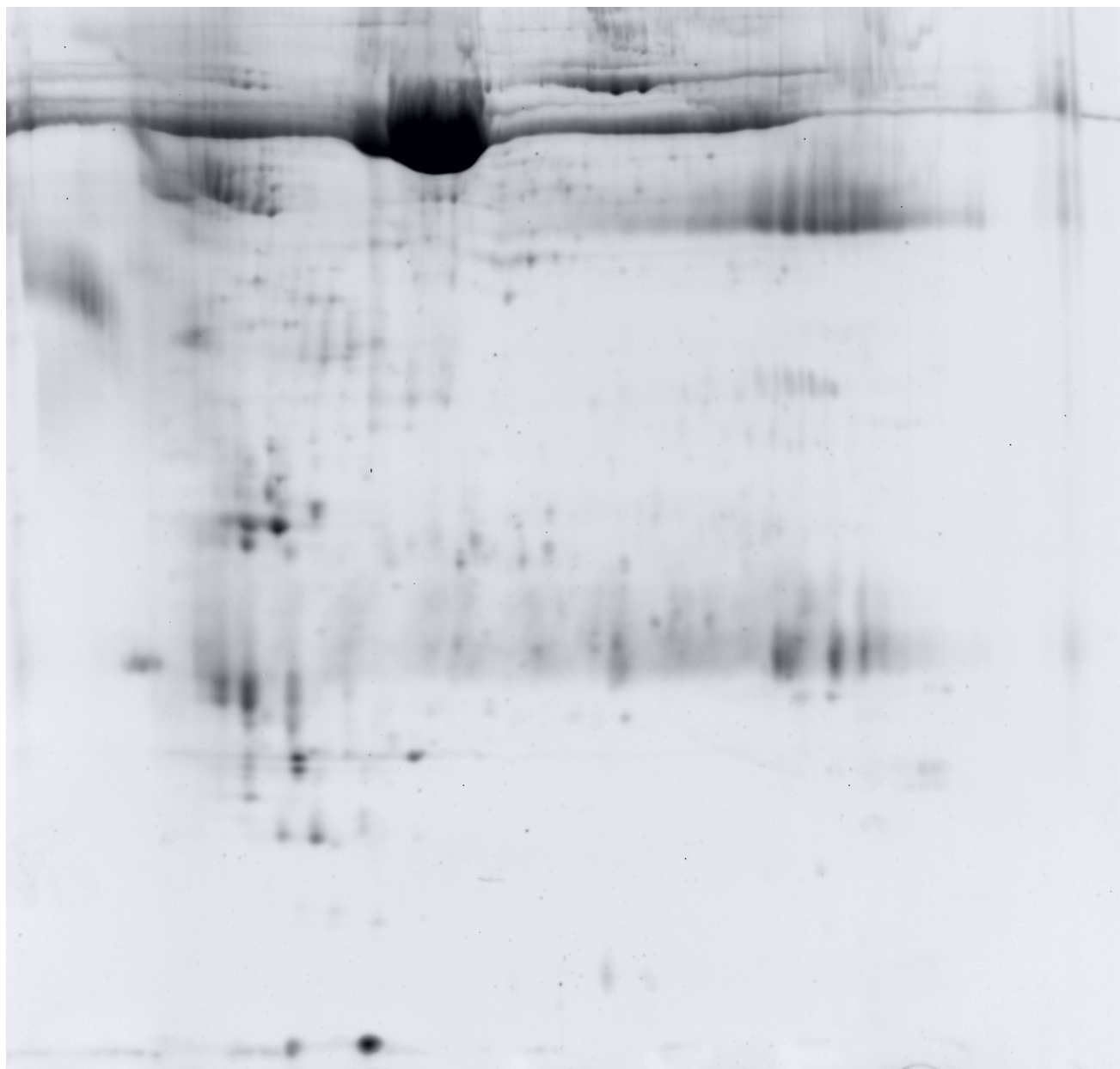
### 4.3 Dvourozměrná elektroforéza plodové vody

V rámci této disertační práce jsem zavedla metodiku analýzy proteinů plodové vody. Práce na této metodě probíhala na Oddělení interní medicíny – Sekce Biochemie, University of Perugia, Perugia, Itálie, pod vedením prof. Luciana Binaglii. Postup práce je zaznamenán v kapitole 3.5, strana 51.

Cílem práce bylo primárně zavést a optimalizovat metodiku dvourozměrné elektroforézy plodové vody, přičemž bylo analyzováno 15 vzorků plodové vody od pacientek s blíže nespecifikovanou klinickou charakteristikou.

Obrázek 4-3 (strana 72), znázorňuje výslednou 2D proteinovou mapu získanou analýzou jednoho ze vzorků plodové vody. Černé body na mapě odpovídají jednotlivým proteinům plodové vody, které se dále identifikují pomocí hmotnostní spektrometrie. Velký černý bod v horní části mapy představuje albumin, který je hlavní proteinovou složkou plodové vody.

V souhrnu, v rámci této práce byly analyzovány 4 exony (a části intronu) genu *PAPP-A*, které zahrnují celkově 10 jednonukleotidových polymorfizmů. V naší sledované skupině pacientek a kontrol jsme však zachytili pouze polymorfismus Cys327Cys (rs12375498) na exonu 2 a C/G (rs 13290387) na intronu 6. U pacientek s preeklampsií byla nalezena signifikantně vyšší frekvence TT genotypu polymorfizmu Cys327Cys v porovnání s kontrolami. Pacientky s hepatopatií měly zvýšené sérové koncentrace PAPP-A v porovnání s kontrolami. Ve skupinách pacientek s preeklampsií a IUGR byly pozorovány signifikantně snížené hladiny PIGF v porovnání s kontrolami, u pacientek s hrozícím předčasným porodem a hepatopatií byly tyto hladiny porovnatelné s kontrolní skupinou. Korelační analýza odhalila pozitivní korelaci mezi PAPP-A a CRP u pacientek s IUGR a u zdravých těhotných žen byla pozorována pozitivní korelace mezi PAPP-A a PIGF. Negativní korelace PIGF s hladinami hemoglobinu a erytrocytů byla pozorována u pacientek s hrozícím předčasným porodem. Sérové hladiny PAPP-A proteinu byly u zdravých těhotných kontrol s TT genotypem polymorfizmu Cys327Cys genu *PAPP-A* zvýšené v porovnání s kontrolami s CC genotypem. V rámci této práce byla zavedena metoda analýzy proteinů plodové vody pomocí dvourozměrné elektroforézy.



**Obrázek 4-3.** 2-D proteinová mapa plodové vody – vzorek č.1.



## 5 DISKUZE

V rámci této disertační práce jsme jako první zavedli metodiky analýzy polymorfizmů genu *PAPP-A* lokalizované na exonech 2,5,6,7 a intronu 6 založené na přímém sekvenování DNA. Tyto polymorfizmy jsme studovali u pacientek s patologickým těhotenstvím (předčasný porod, preeklampsie, IUGR, hepatopatie) a zdravých těhotných kontrol ve třetím trimestru gravidity. U těchto žen byly stanoveny sérové hladiny proteinu PAPP-A a plazmatické hladiny PIGF. Dále byla v rámci této studie zavedena také metodika dvourozměrné elektroforézy plodové vody.

Výsledky této studie prioritně ukázaly na možnou asociaci polymorfizmu Cys327Cys (změna nukleotidu C/T) genu *PAPP-A* s preeklampií. Poprvé v naší studii byly u pacientek s hepatopatií nalezeny zvýšené sérové hladiny PAPP-A v porovnání s kontrolami, plazmatické hladiny PIGF byly u těchto pacientek porovnatelné s kontrolní skupinou. V naší studii jsme nenašli signifikantní rozdíl v hladinách PIGF u pacientek s hrozícím předčasným porodem v porovnání s kontrolní skupinou, na rozdíl od další studie. Potvrdili jsme zvýšené sérové hladiny PAPP-A u pacientek s preeklampií a snížené plazmatické hladiny PIGF u pacientek s preeklampií a IUGR.

Korelační analýza odhalila pozitivní korelaci mezi PAPP-A a CRP u pacientek s IUGR a u zdravých těhotných žen byla pozorována pozitivní korelace mezi PAPP-A a PIGF. Negativní korelace PIGF s hladinami hemoglobinu a erytrocytů byla pozorována u pacientek s hrozícím předčasným porodem.

### 5.1 Metodická část

Sekvenace DNA je metodou založenou na principu terminace syntézy vyvinutého Frederikem Sangerem a A. R. Coulsonem v roce 1975 [111]. K ukončení syntézy se používají fluorescenčně značené dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTPs). Tato metoda umožňuje „přečíst“ pořadí nukleotidů v námi zvolené oblasti DNA a analyzovat tak všechny genetické odchylky v této oblasti. Délka čtených fragmentů dosahuje velikosti 700-800 bp. Z těchto důvodů je tato metoda celosvětově využívána pro screening genetických markerů různých onemocnění a proto byla také použita pro naši studii.

Časově a finančně nejméně náročnou metodou pro detekci polymorfizmů je metoda RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Pro rozvoj této metody byl nutným předpokladem objev restrikčních enzymů [112]. Ty štěpí molekulu DNA v tzv. restrikčním místě, které je definováno konkrétní kombinací nukleotidů. Když dojde ke změně nukleotidu v daném místě, může dojít buď ke vzniku nového restrikčního místa, nebo naopak k jeho zániku. Zásadní limitací této metody je fakt, že v jedné reakci je možné analyzovat pouze jedno polymorfnní místo. Naopak velkou výhodou je její finanční nenáročnost a rychlost. Aby však tato metoda byla aplikovatelná, musí být splněna podmínka, že při změně nukleotidu dojde ke vzniku/zániku restrikčního místa, což v našem případě splněno nebylo.

Nejnovější molekulárně-biologické metody jsou schopny analyzovat až stovky polymorfizmů různých genů v jedné reakci (*DNA microarray* techniky). Sekvenační metody druhé generace využívají zcela nové technologické postupy. Metoda *Ion Torrent* pro analýzu DNA využívá hodnocení změn na úrovni pH, ke kterému dochází v průběhu sekvenační reakce probíhající na speciálním polovodičovém čipu. Další metoda využívá oktamerční sondy označené na 5'-konci fluorescenčními barvivy. Celkem čtyři různá barviva označují šestnáct možných kombinací na prvních dvou pozicích templátu. Metoda přinesla zjednodušení dosavadních postupů s vyšší přesností detekce polymorfizmů. Navíc metoda umožňuje sekvenování celého exomu daného pacienta. Velkou nevýhodou je finanční náročnost těchto metod pokud jde o přístrojové vybavení [113].

## 5.2 Výsledky klinické studie

### 5.2.1 Polymorfizmy genu *PAPP-A*

V rámci této studie bylo analyzováno celkově deset polymorfizmů ležících v oblastech exonu 2, 5, 6 (a části intronu 6) a 7 genu *PAPP-A* u pacientek s hrozícím předčasným porodem, preeklampsií, růstovou retardací plodu a hepatopatií (benigní těhotenskou cholestázou). Podle databáze jednonukleotidových polymorfizmů (dbSNP) Národního centra biotechnologických informací NCBI [73] tyto oblasti čítají celkově 10 polymorfizmů - Pro324Leu (rs445154), Pro325Leu (rs445159), Cys327Cys (rs12375498) na exonu 2; Arg654Lys (rs432500), Ala678Pro (rs34371232), Thr686Ala (rs35578777) na exonu 5; Glu715Glu (rs35407884) na exonu 6 a C/G (rs 13290387) na

intronu 6; a Phe802Leu (rs1063409), Ser827Ser/Leu (rs34087604) na exonu 7 – v naší sledované skupině pacientek s patologickým těhotenstvím a u zdravých těhotných a netěhotných žen jsme zachytili pouze polymorfismus Cys327Cys na exonu 2 a C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A*. U zbylých polymorfizmů jsme našli toliko jejich wild-type formu s frekvencí výskytu 1.00. Z těchto hodnot vyplývá, že polymorfizmy Pro324Leu, Pro325Leu, Arg654Lys, Ala678Pro, Thr686Ala, Glu715Glu, Phe802Leu a Ser827Ser/Leu nejsou asociovány s naší sledovanou skupinou kavkazského původu.

Polymorfizmy na exonu 5 a 7 genu *PAPP-A* byly analyzovány u 103 pacientek s komplikacemi v těhotenství, 52 zdravých těhotných kontrol a 48 zdravých netěhotných kontrol. Jelikož jsme v tomto počtu 203 sledovaných jedinců nenašli mutovanou alelu u žádného ze sledovaných polymorfizmů [76], pro analýzu těchto exonů jsme dále nerozšiřovali sledovaný soubor jedinců. Polymorfizmy na exonu 2 a 6 genu *PAPP-A* byly analyzovány u 165 pacientek s komplikacemi v těhotenství a u 114 zdravých těhotných kontrol [77].

Rozložení genotypových i alelických frekvencí polymorfizmů Cys327Cys a C/G (intron 6) genu *PAPP-A* bylo u pacientek i kontrol v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, což dokazuje, že sledované skupiny byly vhodně vybrány.

Vyšší výskyt mutované alely T ( $p=0.056$ ) a signifikantně častější výskyt ( $p<0.01$ ) genotypu TT polymorfizmu Cys327Cys (rs12375498) na exonu 2 genu *PAPP-A* byl prokázán u pacientek s preeklampsií v porovnání s kontrolami. Tyto výsledky však mohou být ovlivněny relativně malým souborem pacientek s preeklampsií (N=35).

Do současné doby nebyla vydána žádná studie zabývající se polymorfizmem Cys327Cys genu *PAPP-A* u pacientek s preeklampsií. Na druhé straně však mnoho studií potvrzuje význam různých genů v rozvoji této nemoci [92].

Co se týče polymorfizmu C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A*, naše výsledky neodhalily žádný vztah tohoto polymorfizmu k hrozícímu předčasnému porodu, preeklampsií, IUGR nebo hepatopatii. Tento polymorfizmus byl studován skupinou Parka et al. [75] u 170 pacientů s akutním infarktem myokardu. I když původ pacientů nebyl v práci uveden, předpokládá se, že se jednalo o korejskou populaci. Vyšetřeny byly čtyři polymorfizmy genu *PAPP-A*: Ser1224Tyr (rs702078) na exonu 14 a polymorfizmy rs13290387 (c/g), rs3747823 (g/a) a rs 3827669 (t/c) ležící v intronových oblastech genu *PAPP-A*. Dále bylo analyzováno sedm polymorfizmů

cytokiny-kódujících genů, u kterých byl prokázán funkční význam u akutního infarktu myokardu (RANTES G-403A, MCP1 G-2518A, CRP A2147G, CRP G-717A, RAGE 557G/A, LTA Thr26Asn, IL6 C-572G). Studie definovala C alelu polymorfizmu C/G (rs13290387) genu *PAPP-A* jako nezávislý rizikový faktor akutního infarktu myokardu.

Další studie poukázala na možnou asociaci polymorfizmu Ser1224Tyr (rs7020782, exon 14) genu *PAPP-A* s rizikem opakovaného potratu. Studovanou skupinou bylo 215 pacientek původem z Japonska, které prodělaly dva a více po sobě se opakujících potratů. Jako kontroly sloužilo 420 zdravých žen, které prodělaly minimálně jedno fyziologické těhotenství a neměly v anamnéze potrat nebo infertilitu. Ze studie vyplývá, že u žen nesoucích C alelu polymorfizmu Ser1224Tyr je zvýšené riziko opakovaného potratu po 9. týdnu těhotenství. Studie má však několik limitujících bodů, mimo jiné i reprezentativnost studované skupiny z důvodu, že CC genotyp se vyskytoval u pacientek velmi raritně. Funkční důsledek polymorfizmu Ser1224Tyr není dosud znám, první studie však naznačují, že tato mutace může ovlivňovat proteolytickou aktivitu, stabilitu nebo expresi PAPP-A proteinu [74].

Sérové hladiny PAPP-A proteinu u zdravých těhotných žen byly rozděleny do podskupin na základě genotypů polymorfizmu Cys327Cys (exon 2) genu *PAPP-A*. I když analýza ANOVA testem neodhalila žádný signifikantní rozdíl, hladiny PAPP-A proteinu u podskupiny kontrol s TT genotypem byly zvýšeny v porovnání s podskupinou kontrol s CC genotypem ( $p=0.048$ , TT vs. CC t-test). Tento trend nebyl nalezen u žádné další námi studované skupiny i navzdory tomu, že sérové hladiny PAPP-A proteinu byly u pacientek s preeklamsií a hepatopatií proti kontrolám zvýšené, přičemž u pacientek s preeklamsií byly tyto rozdíly signifikantní. Vzhledem k tomu, že tento polymorfizmus je tzv. *synonymní* (nezpůsobuje změnu aminokyseliny v řetězci proteinu), vysvětlení je obtížné a vyžaduje další studium.

## 5.2.2 Biochemické parametry

### *Těhotenský protein PAPP-A*

Naše studie potvrdila signifikantně zvýšené hladiny PAPP-A proteinu u pacientek s preeklamsií ve třetím trimestru gravidity v porovnání se zdravými těhotnými kontrolami v témže trimestru gravidity, zatímco tyto hladiny se u skupiny pacientek s růstovou retardací plodu ve srovnání s kontrolní skupinou výrazně nelišily. Mnohé studie již prokázaly, že snížené hladiny PAPP-A proteinu v séru matky v prvním

trimestru gravidity souvisejí s následným rozvojem komplikací jako preeklampsie, předčasný porod nebo IUGR [114-118]. Pokud jde o druhý a třetí trimestr, podobně jako naše studie již předešlé publikace poukázaly na zvýšené sérové hladiny PAPP-A v posledním měsíci gestace u preeklamtických těhotenství [2, 6]. Na druhou stranu však Bersinger a Ødegård [118] nenašli žádné signifikantní rozdíly v sérových hladinách PAPP-A mezi pacientkami s preeklampsií a zdravými těhotnými kontrolami ve 25. a 33. týdnu těhotenství. Navíc tato studie potvrdila stejné výsledky u těhotenství komplikovaných IUGR, což je v souladu s našimi výsledky. V naší studii měly pacientky s hrozícím předčasným porodem spíše snížené sérové hladiny PAPP-A ( $p=0.01$  vs. kontroly, t-test) ve třetím trimestru gravidity, i když, na rozdíl od t-testu, analýza ANOVA testem při srovnávání všech skupin neodhalila, že by tyto rozdíly byly signifikantní. Ve studii z roku 1984 se sérové hladiny PAPP-A ve druhém a třetím trimestru gravidity pacientek s předčasným porodem nelišily v porovnání s odpovídajícími hodnotami v těhotenství s fyziologickým průběhem [119].

Poprvé v naší studii poukazujeme na zvýšené sérové hladiny PAPP-A u pacientek s benigní těhotenskou cholestázou (hepatopatií) v porovnání se zdravými těhotnými kontrolami ( $p=0.01$ , t-test) ve třetím trimestru gravidity. Rozdíl může být považován spíše za méně zásadní, jelikož analýza ANOVA testem nebyla významná, nicméně dvouvýběrový t-test vyhodnotil rozdíl mezi těmito dvěma skupinami jako vysoce signifikantní. Další limitací je relativně malá skupina pacientek s hepatopatií ( $N=15$ ).

V rámci korelační analýzy jsme pozorovali pozitivní vzájemnou souvislost mezi sérovými hladinami PAPP-A a CRP u pacientek s IUGR ( $r=0.49$ ,  $p=0.007$ ). Stejná pozitivní korelace byla zjištěna u pacientů se selháním ledvin nebo po transplantaci ledvin [120-122] a u pacientů s akutním koronárním syndromem [7]. Hladiny CRP v séru matky se konstantně zvyšují v celém průběhu těhotenství a kulminují v období porodu [123], aniž by procházely placentární bariérou [124].

### ***Placentární růstový faktor PIGF***

V této studii se poprvé zabýváme porovnáním koncentrací placentárního růstového faktoru PIGF v krvi žen s různými patologickými stavy v těhotenství (předčasný porod, preeklampsie, IUGR a hepatopatie) a u zdravých těhotných kontrol. V naší studii jsme nenašli signifikantní rozdíl v hladinách PIGF u pacientek s hrozícím předčasným porodem v porovnání s kontrolní skupinou, na rozdíl od další studie.

Poprvé v naší studii byly stanoveny hladiny *P/IGF* u pacientek s hepatopatií ve třetím trimestru gravidity. Potvrdili jsme snížené hladiny *P/IGF* u pacientek s preeklampsí a IUGR ve třetím trimestru gravidity. Dále jsme potvrdili pozitivní korelaci *P/IGF* s PAPP-A proteinem u zdravých těhotných žen ve třetím trimestru gravidity. U pacientek s IUGR byla nalezena negativní korelace *P/IGF* s kreatininem a u pacientek s předčasným porodem jsme poprvé ukázali negativní korelaci *P/IGF* s hladinami hemoglobinu a erytrocytů.

Patologické stavy jako preeklampsie a IUGR úzce souvisí s dysfunkcí placenty, což ovlivňuje hladiny *P/IGF* v krvi. Více studií již potvrdilo snížené hladiny *P/IGF* u pacientek s preeklampsí v průběhu celé gestace [118, 125, 126]. Preeklamptické pacientky, u kterých byla diagnostikována růstová retardace plodu měly tyto hodnoty ještě nižší než pacientky s preeklampsí bez IUGR [127]. Naše studie potvrdila snížené hodnoty *P/IGF* u pacientek s preeklampsí ve třetím trimestru gravidity, stejné výsledky byly pozorovány také ve skupině pacientek s IUGR. Snížené hladiny *P/IGF* byly popsány u pacientek s růstovou retardací plodu způsobenou placentární dysfunkcí po 20. týdnu gestace a u pacientek a plodů s IUGR v období před porodem [64, 128]. Z výsledků další studie vyplývá, že *P/IGF* je slabým prognostickým markerem růstové retardace plodu v prvním trimestru gravidity [129].

Placentární dysfunkce může hrát svou roli také v patofyziologii spontánního předčasného porodu, přičemž změny v hodnotách *P/IGF* byly zaznamenány pouze v období bezprostředně před manifestací nemoci a předčasným porodem [130, 131]. Hladiny *P/IGF* se v naší skupině pacientek s hrozícím předčasným porodem nelišily od hodnot kontrolní skupiny, i když všechny pacientky porodily do 24 hodin po odběru krve pro biochemické analýzy. Další studie předpokládá souhru placentární dysfunkce a zánětu v etiologii předčasného porodu [132].

Naše studie jako první poukazuje na to, že hodnoty *P/IGF* se u pacientek s hepatopatií (benigní těhotenskou cholestázou) neliší od hodnot kontrolní skupiny.

Korelační analýzy poukázaly na pozitivní korelaci *P/IGF* s hladinami PAPP-A u zdravých těhotných kontrol ve třetím trimestru gravidity. Tyto výsledky doplňují studii, která potvrdila pozitivní korelaci *P/IGF* k PAPP-A u zdravých těhotných žen v prvním trimestru gravidity [133, 134]. Pozitivní korelace *P/IGF* k PAPP-A byla nalezena také u matek s těhotenstvím postiženým trizomií 21 v prvním trimestru gravidity [134].

U pacientek s IUGR byla nalezena negativní korelace P/IGF s kreatininem. Stejná negativní korelace byla nalezena u pacientek s preeklampsií [127], i když naše skupina s preeklampsií tyto výsledky nepotvrdila.

U pacientek s hrozícím předčasným porodem byla nalezena negativní korelace P/IGF s hladinami erytrocytů a hemoglobinu v séru matek. U těchto pacientek byla hladina erytrocytů a hemoglobinu signifikantně snižena proti kontrolní skupině. Stejná negativní korelace byla popsána u pacientů se srpkovitou anémií, u kterých se vyvinula plicní hypertenze [135], z toho důvodu studie předpokládá význam hemolýzy v rozvoji hypertenze u pacientů se srpkovitou anémií. Vysvětlení vztahu hladin erytrocytů a hemoglobinu s předčasným porodem vyžaduje další podrobnější analýzu.

Naše výsledky přispívají k pochopení patologických mechanismů u těchto stavů a mohou pomoci k efektivnější identifikaci rizikových pacientek s cílem včas zajistit vhodnou péči. Nicméně, pro potvrzení našich výsledků je potřeba další studium s větším počtem pacientek s patologickým těhotenstvím.

### **5.3 Dvourozměrná elektroforéza plodové vody**

Proteomické studie mají velký potenciál pro objev nových biomarkerů v různých biologických materiálech jako je krev, moč, likvor, plodová voda a tkáně, které by mohly přinést významný převrat v diagnostice mnoha onemocnění.

V popředí zájmu stojí především získávání nových znalostí v oblasti fetálních aneuploidií. V práci z roku 2006 byly porovnávány vzorky plodové vody pacientek, jejichž plod byl postižen Downovým syndromem (DS) a zdravých kontrol s fyziologickým průběhem těhotenství použitím 2DE a MS. Sedm proteinů bylo označeno jako potenciální biomarkery:  $\alpha$ 1-mikroglobulin,  $\alpha$ 1-kolagen typ I, III a V, heparan sulfát proteoglykan 2, IGFBP a pre-mRNA-splicing faktor SRP75 [136]. Další studie popsala proteiny APOA1, serpin peptidase inhibitor, clade A, prealbumin a transferin jako rozdílně exprimované u DS těhotenství proti zdravým kontrolám [137].

Preeklampsie, IUGR, předčasný porod a benigní těhotenská cholestáza jsou nejčastějšími příčinami mortality a morbidity plodu a matky celosvětově. Patofyziologický mechanismus těchto nemocí stále zůstává neobjasněn, předpokládá se však, že se jedná o nemoci s multifaktoriální etiologií. Objev relevantních biomarkerů je proto důležitý pro včasnou predikci a diagnózu těchto stavů.

Skupina Vascotta [138] porovnávala proteomické mapy plodové vody pěti pacientek s preeklampií a pěti kontrol. Proteiny byly posléze identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. Výsledky ukázaly signifikantně zvýšené množství monomérní formy transthyretinu u pacientek s preeklampií proti kontrolám, pravděpodobně v důsledku zvýšeného oxidačního stresu souvisejícího s preeklampií. Transthyretin je protein zodpovědný za transport hormonu thyroxinu a retinol-vazajícího proteinu.

Na základě proteomických analýz bylo navrženo několik kandidátních biomarkerů infekce u těhotných žen, které by mohly pomoci k časnému odhalení zvýšeného rizika předčasného porodu: calgranulin B a proteolytická podjednotka IGFBP-1 [139, 140]; defensin-1, defensin-2, calgranulin C a calgranulin A [139, 141].

Proteomické analýzy byly využity také ve studiích, které se zabývaly popisem proteomického/metabolického profilu plodové vody u pacientek s předčasným porodem [142, 143].

Metoda dvourozměrné elektroforézy byla zavedena jako výchozí krok pro proteomickou analýzu plodové vody. Výsledky proteomických studií mohou pomoci zlepšit prenatální diagnostiku nebo současné screeningové metody. Nelze vyloučit, že objev specifických markerů patologických stavů v těhotenství v plodové vodě posune výzkum v oblasti rozvoje diagnostických metod těchto markerů v séru matky. Je však třeba si uvědomit, že toho lze dosáhnout pouze tehdy, když budou využívány standardní protokoly, vhodné analytické techniky a statistické analýzy důležité pro reprodučibilitu těchto studií [144].



## 6 ZÁVĚRY

- V rámci této disertační práce jsem zavedla metodiky analýz celkově deseti polymorfizmů genu *PAPP-A* - Pro324Leu, Pro325Leu, Cys327Cys na exonu 2; Arg654Lys, Ala678Pro, Thr686Ala na exonu 5; Glu715Glu na exonu 6 a C/G (rs 13290387) na intronu 6; Phe802Leu a Ser827Ser/Leu na exonu 7 – založené na přímém sekvenování genomické DNA.
- V námi sledovaných skupinách 114 zdravých kontrol a 165 pacientek s patologickým těhotenstvím (hrozící předčasný porod, preeklampsie, růstová retardace plodu, hepatopatie) jsme zachytili pouze polymorfizmus Cys327Cys (C/T, rs12375498) na exonu 2 (frekvence výskytu C alely u pacientek 0.74) a polymorfizmus C/G (rs13290387) na intronu 6 genu *PAPP-A* (frekvence výskytu G alely u pacientek 0.57). Polymorfizmy na exonu 5 a 7 byly vyšetřeny u menší skupiny osob a v tomto souboru nebyly nalezeny.
- Vyšší výskyt mutované alely T a signifikantně častější výskyt genotypu TT polymorfizmu Cys327Cys na exonu 2 genu *PAPP-A* v porovnání s kontrolami jsme našli u pacientek s preeklampií.
- U všech pacientek a zdravých těhotných kontrol byly změřeny sérové koncentrace *PAPP-A* proteinu pomocí metody TRACE a u vybraných pacientek a kontrol byly změřeny plasmatické koncentrace *PIGF* metodou ELISA.
- Pacientky s preeklampií ve 3. trimestru gravidity mají signifikantně zvýšené sérové koncentrace *PAPP-A* v porovnání s kontrolní skupinou. Skupina pacientek s hepatopatií vykazovala podobný trend k zvýšeným hladinám *PAPP-A*, kdežto u pacientek s hrozícím předčasným porodem měly tyto hodnoty tendenci spíše klesat. U pacientek s preeklampií a IUGR byly nalezeny signifikantně snížené hladiny *PIGF* v porovnání s kontrolní skupinou, u pacientek s hrozícím předčasným porodem a hepatopatií se tyto hladiny nelišily.
- Při korelačních analýzách byla nalezena pozitivní korelace *PIGF* s hladinami *PAPP-A* u skupiny zdravých těhotných kontrol. U pacientek s hrozícím předčasným porodem byl nalezen negativní vztah *PIGF* s hladinami erytrocytů a hemoglobinu v oběhu matky. U pacientek s IUGR byla nalezena negativní korelace *PIGF* s kreatininem.

- V rámci této disertační práce jsem zavedla metodu dvourozměrné elektroforézy plodové vody.

## 7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Lin TM, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterization of four pregnancy-associated plasma proteins. *Amer J Obstet Gynecol* 1974; 118: 223-36.
2. Lin TM, Halbert SP, Spellacy WN, Berne HB. Plasma concentrations of four pregnancy proteins in complications of pregnancy. *Amer J Obstet Gynecol* 1977; 128: 808-10.
3. Brambati B, Lanzani A, Tului L. Ultrasound and biochemical assessment of first trimester of pregnancy. In: Chapman M, Grudzinskas JG, Chard T, eds. *The Embryo: Normal and Abnormal Development and Growth*. London, Springer Verlag; 1990: 181-94.
4. Wald NJ, Kennard A, Hackshaw AK. First trimester serum screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn* 1995; 15: 1227-40.
5. Kirkegaard I, Ulbjerg N, Oxvig C. Biology of pregnancy-associated plasma protein-A in relation to prenatal diagnostics: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89: 1118-25.
6. Deveci K, Sogut E, Evliyaoglu O, Duras N. Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 94-8.
7. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, et al. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *New Engl J Med* 2001; 345: 1022-9.
8. Kalousová M, Sulková S, Fialová L, Soukupová J, Malbohan IM, Špaček P, et al. Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Neprol Dial Transplant* 2003; 18: 2577-81.
9. Kalousová M, Hořejší M, Fialová L, Soukupová J, Sulková S, Malbohan IM, et al. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein A are associated with mortality in hemodialysis patients: preliminary results. *Blood Purif* 2004; 22: 298-300.
10. Bonno M, Oxvig C, Kephart GM, Wagner JM, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, et al. Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger Ribonucleic acid in placenta. *Lab Invest*

- 1994; 71: 560-6.
11. Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Lawrence JB, Conover ChA, Gleich GJ, et al. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: Expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999; 61: 1083-9.
  12. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17: 10-8.
  13. Laursen LS, Overgaard MT, Weyer K, Boldt HB, Ebbesen P, Christiansen M, et al. Cell surface targeting of pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity. Reversible adhesion is mediated by two neighboring short consensus repeats. *J Biol Chem* 2002; 277: 47225-34.
  14. Conover CA, Harrington SC, Bale LK, Oxvig C. Surface association of pregnancy-associated plasma protein-A accounts for its colocalization with activated macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H994-1000.
  15. Haaning J, Oxvig C, Overgaard MT, Ebbesen P, Kristensen T, Sottrup-Jensen L. Complete cDNA sequence of the preproform of human pregnancy-associated plasma protein-A. Evidence for expression in the brain and induction by cAMP. *Eur J Biochem* 1996; 237: 159-63.
  16. Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB, Olsen IM, Laursen LS, Christiansen M, et al. Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *J Biol Chem* 2000; 275: 31128-33.
  17. Kristensen T, Oxvig C, Sand O, Muller NP, Sottrup-Jensen L. Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. *Biochemistry* 1994; 33: 1592-8.
  18. Rudenko G, Hohenester E, Muller YA. S domains: multiple functions – one business end? *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 363-8.
  19. Boldt HB, Glerup S, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Definition, expression, and characterization of a protein domain in the N-terminus of pregnancy-associated plasma protein-A distantly related to the family of laminin G-like modules. *Protein Expr Purif* 2006; 48: 261-73.
  20. Artavanis-Tsakonas , Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-6.

21. Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J* 2001; 358: 359-67.
22. Soares DC, Gerloff DL, Syme NR, Coulson AF, Parkinson J, Barlow PN. Large-scale modelling as a route to multiple surface comparisons of the CCP module family. *Protein Eng Des Sel* 2005; 18: 379-88.
23. Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 21849-53.
24. Tallant C, García-Castellanos R, Seco J, Baumann U, Gomis-Rüth FX. Molecular analysis of ulilysin, the structural prototype of a new family of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* 2006; 281: 17920-8.
25. Soe R, Overgaard MT, Thomsen AR, Laursen LS, Olsen IM, Sottrup-Jensen L, et al. Expression of recombinant murine pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and a novel variant (PAPP-Ai) with differential proteolytic activity. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2247-56.
26. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3149-53.
27. Durham SK, Kiefer MC, Riggs BL, Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor binding protein 4 by a specific insulin-like growth factor binding protein 4 proteinase in normal human osteoblast-like cells: implications in bone cell physiology. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 111-7.
28. Byun D, Mohan S, Yoo M, Sexton C, Baylink DJ, Qin X. Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 847-54.
29. Ortiz CO, Chen BK, Bale LK, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Transforming growth factor-beta regulation of the insulin-like growth factor binding protein-4 protease system in cultured human osteoblasts. *Bone Miner Res* 2003; 18: 1066-72.

30. Conover CA, Durham SK, Zapf J, Masiarz FR, Kiefer MC. Cleavage analysis of insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 proteolysis and expression of protease-resistant IGF-binding protein-4 mutants. *J Biol Chem* 1995; 270: 4395-400.
31. Byun D, Mohan S, Kim C, Suh K, Yoo M, Lee H, et al. Studies on human pregnancy-induced insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteases in serum: determination of IGF-II dependency and localization of cleavage site. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 373-81.
32. Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T, Maurel MC, Manière S, Zapf J, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biol Reprod* 2003; 68: 77-86.
33. Rivera GM, Fortune JE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 2003; 144: 437-46.
34. Laursen LS, Overgaard MT, Sjøe R, Boldt HB, Sottrup-Jensen L, Giudice LC, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett* 2001; 504: 36-40.
35. Boldt HB, Kjaer-Sorensen K, Overgaard MT, Weyer K, Poulsen CB, Sottrup-Jensen L, et al. The Lin12-notch repeats of pregnancy-associated plasma protein-A bind calcium and determine its proteolytic specificity. *J Biol Chem* 2004; 279: 38525-31.
36. Bergmann U, Tuuttila A, Stetler-Stevenson WG, Tryggvason K. Autolytic activation of recombinant human 72 kilodalton type IV collagenase. *Biochemistry* 1995; 34: 2819-25.
37. Oxvig C, Sand O, Kristensen T, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L. Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfidebridged to the proform of eosinophil major basic protein. *J Biol Chem* 1993; 268: 12243-6.
38. Barker RL, Gleich GJ, Pease LR. Acidic precursor revealed in human eosinophil

- granule major basic protein cDNA. *J Med* 1988; 168: 1493–8.
39. Wasmoen TL, Bell MP, Loegering DA, Gleich GJ, Prendergast FG, McKean DJ. Biochemical and amino acid sequence analysis of human granule major basic protein. *J Biol Chem* 1988; 263: 12559–63.
  40. Popken-Harris P, Checkel J, Loegering D, Madden B, Springett M, Kephart G, et al. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood* 1998; 92: 623-31.
  41. Oxvig C, Haaning J, Kristensen L, Wagner JM, Rubin I, Stigband T, et al. Identification of angiotensinogen and complement C3dg as novel proteins binding the proform of eosinophil major basic protein in human pregnancy serum and plasma. *J Biol Chem* 1995; 270: 13645-51.
  42. Christiansen M, Jaliashvilli I, Overgaard MT, Ensinger C, Obrist P, Oxvig C. Quantification and characterization of pregnancy-associated complexes of angiotensinogen and the proform of eosinophil major basic protein in serum and amniotic fluid. *Clin Chem* 2000; 46: 1099-105.
  43. Gleich GJ, Loegering DA, Maldonado JE. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J Exp Med* 1973; 137: 1459–71.
  44. Peters MS, Rodriguez M, Gleich GJ. Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1986; 54: 656–62.
  45. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993; 44: 85–101.
  46. Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Voipio-Pulkki LM, Pettersson K. Molecular distinction of circulating pregnancy-associated plasma protein A in myocardial infarction and pregnancy. *Clin Chem* 2005; 51: 75-83.
  47. Lin TM, Halbert SP, Spellacy WN, Gall S. Human pregnancy-associated plasma proteins during the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 124: 382-7.
  48. Conover CA. PAPP-A: a new anti-aging target? *Aging Cell* 2010; 9: 942-6.
  49. Chen BK, Leiferman KM, Pittelkow MR, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Localization and regulation of pregnancy-associated plasma protein a expression in healing human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4465-71.
  50. Bonno M, Oxvig C, Kephart GM, Wagner JM, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, et al. Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil

- granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta. *Lab Invest* 1994; 71: 560-6.
51. Hourvitz A, Widger AE, Filho FL, Chang RJ, Adashi EY, Erickson GF. Pregnancy-associated plasma protein- A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4916–20.
  52. Mazerbourg S, Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Conover CA, Laurendeau I, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology* 2001; 142: 5243-53.
  53. Sangiorgi G, Mauriello A, Bonanno E, Oxvig C, Conover CA, Christiansen M, et al. Pregnancy-associated plasma protein-a is markedly expressed by monocyte-macrophage cells in vulnerable and ruptured carotid atherosclerotic plaques: a link between inflammation and cerebrovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 2201-11.
  54. McColl BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004; 112: 463-80.
  55. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 9267-71.
  56. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Maglione D, Battisti M, Tucci M, et al. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 2001; 276: 12153-61.
  57. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993; 8: 925-31.
  58. Makrydimas G, Sotiriadis A, Savvidou MD, Spencer K, Nicolaides KH. Physiological distribution of placental growth factor and soluble Flt-1 in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2008; 28: 175-9.
  59. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis:



- a historical review. *Angiogenesis* 2008; 11: 215-21.
60. Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 493-8.
  61. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 2003; 60: 53-60.
  62. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936-43.
  63. DiPalma T, Tucci M, Russo G, Maglione D, Lago CT, Romano A, et al. The placenta growth factor gene of the mouse. *Mamm Genome* 1996; 7: 6-12.
  64. Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, et al. Can placental growth factor in maternal circulation identify fetuses with placental intrauterine growth restriction? *Am J Obstet Gynecol* 2011 Sep 24. [Epub ahead of print]
  65. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine* 2001; 7: 575–83.
  66. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 25646–54.
  67. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, et al. Placenta Growth Factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 2002; 1: 99–108.
  68. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998; 159: 459-67.

69. Ford EB. Polymorphism and taxonomy. In: Huxley J (Ed.). The new systematics. Clarendon Press, Oxford, 1940. pp 493-513.
70. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-86.
71. Silahtaroglu AN, Tümer Z, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, Tommerup N. Assignment of the human associated plasma protein A (PAPPA) to 9q33.1 by fluorescence in situ hybridization to mitotic and meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 62: 214-6.
72. Overgaard MT, Sorensen ES, Stachowiak D, Boldt HB, Kristensen L, Sottrup-Jensen L, et al. Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. *J Biol Chem* 2003; 278: 2106-17.
73. Webová stránka Národního centra biotechnologických informací <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
74. Suzuki K, Sata F, Yamada H, Saijo Y, Tsuruga N, Minakami H, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2006; 70: 99-108.
75. Park S, Youn JC, Shin DJ, Park CM, Kim JS, Ko YG, et al. Genetic polymorphism in the pregnancy-associated plasma protein-A associated with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 2007; 18: 417-22.
76. Germanová A, Jáchymová M, Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Zima T, et al. Pregnancy-associated plasma protein A polymorphism in patients with risk pregnancies. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57: 82-5.
77. Muravská A, Germanová A, Jáchymová M, Hájek Z, Švarcová J, Zima T, et al. Association of Pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia – A pilot study. *Clin Biochem* 2011; 44: 1380-4.
78. Loucký J, Springer D, Zima T. Možnosti screeningu Downova syndromu v České republice. *Česká gynekologie* 2008; 73: 160-2.
79. Zima T. Laboratorní diagnostika. 2.doplňené a přepracované vydání. Galén – Karolinum, Praha, 2007. 906 s.
80. Nicolaidis KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers

- of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 45-67.
81. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 1999; 71: 482-9.
  82. Wunder DM, Kretschmer R, Bersinger NA. Concentrations of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. *Hum Reprod* 2005; 20: 1266-71.
  83. Liberatori S, Bini L, De Felice C, Magi B, Marzocchi B, Raggiaschi R, et al. A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation. *Electrophoresis* 1997; 18: 2816-22.
  84. Nilsson S, Ramstrom M, Palmblad M, Axelsson O, Bergquist J. Explorative study of the protein composition of amniotic fluid by liquid chromatography electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Proteome Res* 2004; 3: 884-9.
  85. Queloz PA, Crettaz D, Thadikkaran L, Sapin V, Gallot D, Jani J, et al. Proteomic analyses of amniotic fluid: potential applications in health and diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 850: 336-42.
  86. Michaels JE, Dasari S, Pereira L, Reddy AP, Lapidus JA, Lu X, et al. Comprehensive proteomic analysis of the human amniotic fluid proteome: gestational age-dependent changes. *J Proteome Res* 2007; 6: 1277-85.
  87. Cho CK, Shan SJ, Winsor EJ, Diamandis EP. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1406-15.
  88. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308: 1592-4.
  89. Report of the National High Blood Pressure Education Program, Working group report on high bloodpressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-S22.
  90. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-99.
  91. Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid

- peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60: 807-16.
92. Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and preeclampsia syndrome. *J Perinat Med* 2008; 36: 38-58.
  93. Srinivas SK, Morrison AC, Andrela CM, Elovitz MA. Allelic variations in angiogenic pathway genes are associated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 445.e1-11.
  94. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-80.
  95. Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, et al. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 308-12.
  96. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 3-8.
  97. Jáchymová M, Horký K, Bultas J, Kožich V, Jindra A, Peleška J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphis in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 426-30.
  98. Čech E, Hájek Z, Maršál K, Srp B a kolektiv. *Porodnictví*. Grada Publishing, Praha, 1999. 432 stran.
  99. Giarratano G. Genetic influences on preterm birth. *MCN Am J Matern Child Nurs* 2006; 31: 169–75.
  100. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr Res* 2009; 65: 1-9.
  101. Robinson R, Hsu CD, Chesebro AL, Nguyen J, Ali N, Maramreddy H, et al. A single-nucleotide polymorphism (-670) of the maternal Fas gene is associated with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 620.e1-4.
  102. Uma R, Forsyth JS, Struthers AD, Fraser CG, Godfrey V, Murphy DJ. Polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in relation to intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89: 1197-201.

103. Seremak-Mrozikiewicz A, Dubiel M, Drews K, Gudmundsson S, Mrozikiewicz PM. TNF-alpha gene polymorphism and fetal Doppler velocimetry in intrauterine growth restriction. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29: 493-9.
104. Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, et al. A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 49-53.
105. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfeld P, Vial Y, Witkin SS, et al. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol* 2007; 74: 143-51.
106. Kokrdová Z, Hůlek P. Intrahepatální cholestáza těhotných. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 19-23.
107. Geenes V, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2049-66.
108. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 11: 1215.
109. Lodish H. *Molecular cell biology*. 5<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2004. 1052 pp.
110. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72: 248-54.
111. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94: 441-8.
112. Smith HH a Wilcox K. Restriction endonuclease from *Haemophilus influenzae*. *J Mol Biol* 1970; 51: 379-91.
113. Webová stránka Applied Biosystems <http://www.appliedbiosystems.com>
114. Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol* 2011; 157: 48-52.
115. Ong CY, Liao AW, Spencer K, Munim S, Nicolaides KH. First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *BJOG* 2000; 107: 1265-70.
116. Goetzinger KR, Cahill AG, Macones GA, Odibo AO. Association of first-trimester

- low PAPP-A levels with preterm birth. *Prenat Diagn* 2010; 30: 309-13.
117. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1762-7.
118. Bersinger NA, Ødegård RA. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 37-45.
119. Westergaard JG, Teisner B, Hau J, Grudzinskas JG. Placental protein measurements in complicated pregnancies. III. Premature labour. *Br J Obstet Gynaecol* 1984; 91: 1230-3.
120. Fialová L, Kalousová M, Soukupová J, Sulková S, Merta M, Jelínková E, et al. Relationship of pregnancy-associated plasma protein-a to renal function and dialysis modalities. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27: 88-95.
121. Lauzurica R, Pastor C, Bayés B, Hernández JM, Romero R. Pretransplant pregnancy-associated plasma protein-a as a predictor of chronic allograft nephropathy and posttransplant cardiovascular events. *Transplantation* 2005; 80: 1441-6.
122. Coskun A, Duran S, Apaydin S, Bulut I, Sariyar M. Pregnancy-associated plasma protein-A: evaluation of a new biomarker in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2007; 39: 3072-6.
123. Watts DH, Krohn MA, Wener MH, Eschenbach DA. C-reactive protein in normal pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 176-80.
124. Nielsen FR, Bek KM, Rasmussen PE, Qvist I, Tobiassen M. C-reactive protein during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990; 35: 23-7.
125. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 9-23.
126. Erez O, Romero R, Espinoza J, Fu W, Todem D, Kusanovic JP, et al. The change in

- concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 279-87.
127. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Szucs E, Nagy B, Rigó J Jr. Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. *Hypertens Res* 2010; 33: 892-8.
128. Wallner W, Sengenberger R, Strick R, Strissel PL, Meurer B, Beckmann MW, et al. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 51-7.
129. Vandenberghe G, Mensink I, Twisk JW, Blankenstein MA, Heijboer AC, van Vugt JM. First trimester screening for intra-uterine growth restriction and early-onset pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 2011; 31: 955-61.
130. Chaiworapongsa T, Romero R, Tarca A, Kusanovic JP, Mittal P, Kim SK, et al. A subset of patients destined to develop spontaneous preterm labor has an abnormal angiogenic/anti-angiogenic profile in maternal plasma: evidence in support of pathophysiologic heterogeneity of preterm labor derived from a longitudinal study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22: 1122-39.
131. Beta J, Akolekar R, Ventura W, Syngelaki A, Nicolaides KH. Prediction of spontaneous preterm delivery from maternal factors, obstetric history and placental perfusion and function at 11-13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31: 75-83.
132. Bastek JA, Brown AG, Anton L, Srinivas SK, D'addio A, Elovitz MA. Biomarkers of inflammation and placental dysfunction are associated with subsequent preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; 24: 600-5.
133. Wortelboer EJ, Koster MP, Kuc S, Eijkemans MJ, Bilardo CM, Schielen PC, et al. Longitudinal trends in fetoplacental biochemical markers, uterine artery pulsatility index and maternal blood pressure during the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 38: 383-8.
134. Cowans NJ, Stamatopoulou A, Tørring N, Spencer K. Early first-trimester maternal serum placental growth factor in trisomy 21 pregnancies. *Ultrasound Obstet*

- Gynecol 2011; 37: 515-9.
135. Sundaram N, Tailor A, Mendelsohn L, Wansapura J, Wang X, Higashimoto T, et al. High levels of placenta growth factor in sickle cell disease promote pulmonary hypertension. *Blood* 2010; 116: 109-12.
  136. Tsangaris GT, Karamessinis P, Kolialexi A, Garbis SD, Antsaklis A, Mavrou A, et al. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics* 2006; 6: 4410-9.
  137. Wang TH, Chao AS, Chen JK, Chao A, Chang YL, Cheng PJ, et al. Network analyses of differentially expressed proteins in amniotic fluid supernatant associated with abnormal human karyotypes. *Fertil Steril* 2009; 92: 96-107.
  138. Vascotto C, Salzano AM, D'Ambrosio C, Fruscalzo A, Marchesoni D, di Loreto C, et al. Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia. *J Proteome Res* 2007; 6: 160-70.
  139. Park SJ, Yoon WG, Song JS, Jung HS, Kim CJ, Oh SY, et al. Proteome analysis of human amnion and amniotic fluid by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics* 2006; 6: 349-63.
  140. Gravett MG, Novy MJ, Rosenfeld RG, Reddy AP, Jacob T, Turner M, et al. Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers. *JAMA* 2004; 292: 462-9.
  141. Buhimschi IA, Christner R, Buhimschi CS. Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *BJOG* 2005; 112: 173-81.
  142. Bujold E, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Gotsch F, Chaiworapongsa T, et al. Proteomic profiling of amniotic fluid in preterm labor using two-dimensional liquid separation and mass spectrometry. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 697-713.
  143. Romero R, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Gomez R, et al. Metabolomics in premature labor: a novel approach to identify patients at risk for preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23: 1344-59.
  144. Kolialexi A, Anagnostopoulos AK, Mavrou A, Tsangaris GT. Application of proteomics for diagnosis of fetal aneuploidies and pregnancy complications.



J Proteomics 2009; 72: 731-9.

## SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

### Publikace týkající se tématu disertační práce (s IF):

1. Germanová A, Jáchymová M, Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Zima T, Kalousová M. Pregnancy associated plasma protein-A polymorphisms in patients with risk pregnancies. Folia Biologica 2011; 57: 82-85. **IF = 0.729**
2. Muravská A, Germanová A, Jáchymová M, Hájek Z, Švarcová J, Zima T, Kalousová M. Association of Pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia – A pilot study. Clin Biochem 2011; 44: 1380-1384. **IF = 2.043**

### Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Kalousová M, Germanová A, Jáchymová M, Mestek O, Tesař V, Zima T. A419C (E111A) polymorphism of the glyoxalase I gene is associated with vascular complications in chronic hemodialysis patients. Ann N Y Acad Sci 2008; 1126: 268-271. **IF = 2.303**
2. Germanová A, Germanová A, Tesařová P, Jáchymová M, Zima T, Kalousová M. Glyoxalase I Glu111Ala polymorphism in patients with breast cancer. Cancer Invest 2009; 27: 655-660. **IF = 2.105**
3. Kalousová M, Jáchymová M, Germanová A, Kuběna AA, Tesař V, Zima T. Genetic predisposition to advanced glycation end products toxicity is related to prognosis of chronic hemodialysis patients. Kidney Blood Press Res 2010; 33: 30-36. **IF = 1.500**
4. Škrha jr. J, Kalousová M, Švarcová J, Muravská A, Kvasnička J, Landová L, Zima T, Škrha J. Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and

EN-RAGE to endothelial dysfunction in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocr Diab* 2011, *in press*. **IF = 1.826**

5. Jáchymová M, Muravská A, Paleček T, Kuchyňka P, Řeháková H, Magage S, Král A, Zima T, Horký K, Linhart A. Genetic variation screening of TNNT2 gene in a cohort of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Physiol Res* 2012, *in press*. **IF = 1.646**

**Publikace týkající se jiných témat (bez IF):**

1. Jáchymová M, Brabcová I, Germanová A, Slatinská J, Mestek O, Matl I, Zima T, Viklický O, Kalousová M. A419C polymorphism of glyoxalase I gene, renal function and histological finding at 12 months after renal transplantation. *Int J Nephrol Urol* 2010; 2: 504-513.

# PŘÍLOHY

## **Příloha 1:**

Germanová A, Jáchymová M, Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Zima T, Kalousová M. Pregnancy associated plasma protein-A polymorphisms in patients with risk pregnancies. *Folia Biologica* 2011; 57: 82-85.

## **Příloha 2:**

Muravská A, Germanová A, Jáchymová M, Hájek Z, Švarcová J, Zima T, Kalousová M. Association of Pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia – A pilot study. *Clin Biochem* 2011; 44: 1380–1384.

## Short Communication

# Pregnancy-Associated Plasma Protein A Polymorphisms in Patients with Risk Pregnancies

(pregnancy-associated plasma protein A / PAPP-A / pregnancy / preeclampsia / preterm labour / single nucleotide polymorphism / SNP / gene sequencing)

A. GERMANOVÁ<sup>1</sup>, M. JÁCHYMOVÁ<sup>1</sup>, A. GERMANOVÁ<sup>1</sup>, M. KOUCKÝ<sup>2</sup>, Z. HÁJEK<sup>2</sup>, T. ZIMA<sup>1</sup>, M. KALOUSOVÁ<sup>1</sup>

Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and General University Hospital, <sup>1</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Prague, Czech Republic

**Abstract.** Pregnant women are often threatened by hypertension, symptoms of preterm labour, hepatopathy, and other. These complications might be the consequence of genetic factors together with involvement of environmental factors. We were searching for three polymorphisms Arg654Lys, Ala678Pro and Thr686Ala in exon 5, and two polymorphisms Phe802Leu, Ser827Ser/Leu in exon 7, and for the new mutations in exons 5 and 7 of the pregnancy-associated plasma protein A gene in the studied group consisting of 203 women – 79 pregnant women in time of preterm labour, 24 pregnant women suffering from preeclampsia, and 100 healthy pregnant and non-pregnant women serving as controls. We did not find any divergence from wild-type form of these polymorphisms in any of the studied groups, which led us to the hypothesis that these polymorphisms are not associated with our studied group of Caucasian origin. However, further studies with a larger group of subjects are needed to confirm our results.

## Introduction

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) is a homotetrameric glycoprotein originally found by Lin et al. (1974) in the plasma of pregnant women. PAPP-A exists in pregnancy serum as a heterotetrameric 2 : 2 complex with the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), called PAPP-A/proMBP complex (Oxvig et al., 1993). This insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) proteinase (Lawrence et al., 1999) belongs to the metzincin superfamily of metalloproteinases (Bode et al., 1993) and is mainly produced by the placental syncytiotrophoblast during pregnancy. PAPP-A is also expressed in ovarian granulosa cells, and in non-reproductive tissues, such as fibroblasts, osteoblasts and vascular smooth muscle cells (Overgaard et al., 1999).

PAPP-A is one of the most important biochemical markers of foetal aneuploidies in pregnancies. Its low maternal serum level in the first trimester of pregnancy is characteristic for Down syndrome foetus development (Brambati et al., 1990). On the contrary, PAPP-A serum levels are significantly increased in preeclamptic pregnancies (Lin et al., 1977). Klopper (1982) showed that the change is most marked in more severe grades of preeclampsia, and the higher level of PAPP-A preceded the advent of hypertension and albuminuria. Moreover, Bayes-Genis et al. (2001) hypothesised that PAPP-A might be a promising marker of acute coronary syndromes.

The human *PAPPA* gene is located on chromosome 9q33.1, spans over 200 kb of DNA, and contains 22 exons (Overgaard et al., 2003).

In the present study, we analysed five *PAPPA* polymorphisms (Arg654Lys, Ala678Pro, Thr686Ala, Phe802Leu, Ser827Ser/Leu) and searched for the new mutations in exons 5 and 7 of the *PAPPA* gene in the pregnancies complicated with preeclampsia or preterm labour, and in healthy pregnant and non-pregnant women as controls to improve our understanding of the genetic background of these complications in pregnancy.

---

Received May 31, 2010. Accepted August 12, 2010.

The study was supported by grants GAUK 258051–41508 and SVV-2010-260512.

Corresponding author: Marta Kalousova, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Na bojišti 3, 120 00 Prague 2, Czech Republic. Phone: (+420) 224 966 620; Fax: (+420) 224 962 848; e-mail: marta.kalousova@seznam.cz, mkalousova@hotmail.com

Abbreviations: AGT – angiotensinogen, AMI – acute myocardial infarction, eNOS – endothelial nitric oxide synthase, IGFBP – insulin-like growth factor-binding protein, NCBI – The National Center for Biotechnology Information, PAPP-A – pregnancy-associated plasma protein A, PCR – polymerase chain reaction, proMBP – proeosinophil major basic protein, RPL – recurrent pregnancy loss.

## Material and Methods

### Patients

The studied group consisted of 203 women – 79 pregnant women in time of preterm labour, 24 pregnant women suffering from preeclampsia, and 100 healthy pregnant and non-pregnant women.

One hundred and three Caucasian women (mean age  $30.1 \pm 4.8$  years) from the Czech Republic were included in this single-centre study. Seventy-nine women with symptoms of threatening preterm labour (contraction, vaginal dilatation, premature preterm rupture of membranes, bleeding) and 24 patients with hypertension in pregnancy were enrolled into the study. Hypertension in pregnancy was diagnosed in previously normotensive women with two repeated diastolic blood pressure measurements of 90 mm Hg or more and systolic blood pressure of 140 mm Hg or more. Eleven women had proteinuria higher than 300 mg per day; 13 women did not suffer from proteinuria. The women were between 24<sup>th</sup> and 40<sup>th</sup> week of pregnancy.

Fifty-two healthy pregnant women (mean age  $29.4 \pm 4.6$  years) were followed up during prenatal care at the Department of Gynaecology and Obstetrics of the General University Hospital in Prague and studied as controls. The women were between 8<sup>th</sup> and 41<sup>st</sup> week of pregnancy.

Forty-eight healthy non-pregnant women served as controls. Mean age of non-pregnant controls was  $26.1 \pm 4.2$  years.

The study was performed in accordance with principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethical Committee. All patients have given their informed consent prior to entering the study.

### Samples

Blood of the patients was collected via puncture of the cubital vein simultaneously with blood collection for other routine examinations. Tubes with ethylene diamine tetraacetic acid were used for DNA analysis.

Blood samples were stored at 4 °C and isolation of DNA was performed by the modified salting-out procedure according to Miller et al. (1998) within a week.

### PAPPA gene sequencing

Both exons 5 and 7 of the *PAPPA* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primers and annealing temperatures summarized in Table 1. Products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel, excised from the gel and purified with spin columns (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Purified DNA was then sequenced in genetic analysis system CEQ 8000 (Beckman Coulter, Brea, CA) according to the manufacturer's protocol.

The primers were predicted by Primer3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu>).

## Results and Discussion

We were searching for three polymorphisms Arg654Lys (dbSNP: rs432500), Ala678Pro (dbSNP: rs34371232) and Thr686Ala (dbSNP: rs35578777) in exon 5, and two polymorphisms Phe802Leu (dbSNP: rs1063409), Ser827Ser/Leu (dbSNP: rs34087604) in exon 7, but we did not find any divergence from the wild-type form of these polymorphisms in any patients or controls. Consequently, we did not find any difference in the subgroup of patients with preeclampsia and preterm labour as well as in the subgroup of pregnant and non-pregnant controls (Tables 2, 3).

Beside that, we were looking for new mutations in exons 5 and 7 of the *PAPPA* gene, but again, we did not find any divergence from reference sequences in any of the patients or controls.

In this study, we for the first time analysed overall five polymorphisms localized in exons 5 and 7 of the *PAPPA* gene.

SNPs in these areas are described in The National Center for Biotechnology Information (NCBI) variation database (dbSNP); however, no study focused on *PAPPA*

Table 1. Primers and PCR conditions

Exon	Primer sequence 5' → 3'	Annealing T (°C)	Product size (bp)
5	F: cgg ctt ggt gct tat ctc tc R: aca ggg cac act cac ctt tc	60.0	245
7	F: gct ctt tcc cca aga act ca R: acc tca cgt tcc tcc aca ac	59.7	602

F – forward, R – reverse, T – temperature

Table 2. Alleles of the studied *PAPPA* gene polymorphisms and their frequencies in our studied group

Exon	SNP	Wild-type allele (frequency)	Mutant allele (frequency)
5	<i>Arg654Lys</i>	G (1.00)	A (0.00)
	<i>Ala678Pro</i>	G (1.00)	C (0.00)
	<i>Thr686Ala</i>	A (1.00)	G (0.00)
7	<i>Phe802Leu</i>	T (1.00)	C (0.00)
	<i>Ser827Ser/Leu</i>	TC (1.00)	C/-- (0.00/0.00)

Table 3. Genotype distribution in patients and healthy controls (number of patients)

SNP	Patients			Controls	
	Preeclampsia	Preterm labour	Pregnant	Non-pregnant	
<b>Arg654Lys</b>					
GG	24	79	52	48	
GA	0	0	0	0	
AA	0	0	0	0	
<b>Ala678Pro</b>					
GG	24	79	52	48	
GC	0	0	0	0	
CC	0	0	0	0	
<b>Thr686Ala</b>					
AA	24	79	52	48	
AG	0	0	0	0	
GG	0	0	0	0	
<b>Phe802Leu</b>					
TT	24	79	52	48	
TC	0	0	0	0	
CC	0	0	0	0	
<b>Ser827Ser/Leu</b>					
TC	24	79	52	48	
C-	0	0	0	0	
--	0	0	0	0	

polymorphisms located both in exon 5 – Arg654Lys, Ala678Pro, Thr686Ala, and exon 7 – Phe802Leu, Ser827Ser/Leu has been published to date.

Both preeclampsia and preterm labour are conditions influenced by multiple genes together with involvement of environmental factors. In our study, we tried to find any association between polymorphisms in exons 5 and 7 of the *PAPPA* gene and these complications in pregnant women. We were searching for Arg654Lys, Ala678Pro, Thr686Ala, Phe802Leu and Ser827Ser/Leu polymorphisms of the *PAPPA* gene, but we did not find any divergence from the wild-type form of these polymorphisms either in patients or in healthy subjects serving as controls. Consequently, we did not find any difference in the subgroup of patients with preeclampsia and preterm labour as well as in the subgroup of pregnant and non-pregnant controls.

Studies of more than 50 candidate genes have reported their potential role in pathophysiology of preeclampsia, including several genes involved in the blood pressure regulation and vascular remodelling (Mütze et al., 2008). Genes like *AGT*, rennin, *eNOS*, and other were studied and found to be related to essential hypertension in common population as well (Jeunemaitre et al., 1992; Jáchymová et al., 2001; Hasimu et al., 2003).

Similarly, many studies have shown the potential role of the particular genes in the process of normal and pathological labour. These genes fall into two major groups including those involved in the host response to infection/inflammation, and those involved in the synthesis and degradation of the extracellular matrix (Anum et al., 2009). As yet, no study focused on *PAPPA* polymorphisms in patients with preeclampsia or preterm labour has been published.

Only two studies have focused on the polymorphisms of the *PAPPA* gene so far. Suzuki et al. (2006) investigated whether the maternal *PAPPA* polymorphism Ser1224Tyr (dbSNP: rs7020782, exon 14) could be associated with the risk of recurrent pregnancy loss (RPL). He found out that women carrying the C allele have an increased risk of RPL with at least one pregnancy loss after 9-week gestation. All patients and the controls involved in the study were native Japanese women.

Another study showed association of *PAPPA* polymorphism with an increased risk of acute myocardial infarction (AMI) in Korean population. Park et al. (2007) analysed four *PAPPA* polymorphisms and seven other polymorphisms of cytokine genes that have been reported to have functional significance, and they defined C allele of the *PAPPA* SNP rs13290387 (6.intron) as an independent risk factor for AMI. Furthermore, they did not find any significant association between AMI and *PAPPA* polymorphism Ser1224Tyr.

Although biochemical studies have brought many important findings of clinical aspects of the pregnancy-associated plasma protein A not only in prenatal screening of Down syndrome, but also in patients with acute coronary syndrome or renal diseases (Lin et al., 1977; Brambati et al., 1990; Bayes-Genis et al., 2001; Kalousová et al., 2004), focus on the genetic background of the *PAPPA* gene could be a new promising trend, helpful in better understanding of the pathological mechanisms in which PAPP-A is involved.

In summary, in this study we were searching for overall five polymorphisms localized in exons 5 and 7 of the *PAPPA* gene and for new mutations. We did not find any divergence from the wild-type form of these polymorphisms in any of the studied groups, which led us to the

hypothesis that these polymorphisms are not associated with our studied group of Caucasian origin. However, further studies with a larger group of subjects are needed to confirm our results.

### Acknowledgement

None of the authors declared conflict of interest.

### References

- Anum, E. A., Springel, E. H., Shriver, M. D., Strauss, J. F. (2009) Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr. Res.* **65**, 1-9.
- Bayes-Genis, A., Conover, C. A., Overgaard, M. T., Bailey, K. R., Christiansen, M., Holmes, D. R., Virmani, R., Oxvig, C., Schwartz, R. S. (2001) Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *New Engl. J. Med.* **345**, 1022-1029.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., Stockler, W. (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit zinc-binding environments and topologies and should be grouped into a common family the "metzins". *FEBS Lett.* **331**, 134-140.
- Brambati, B., Lanzani, A., Tului, L. (1990) Ultrasound and biochemical assessment of first trimester of pregnancy. In: *The Embryo: Normal and Abnormal Development and Growth*. Eds. Chapman, M., Grudzinskas, J. G., Chard, T. pp. 181-194. Springer Verlag, London.
- Hasimu, B., Nakayama, T., Mizutani, Y., Izumi, Y., Asai, S., Soma, M., Kokubun, S., Ozawa, Y. (2003) Haplotype analysis of the human rennin gene and essential hypertension. *Hypertension* **41**, 308-312.
- Jáchymová, M., Horký, K., Bultas, J., Kožich, V., Jindra, A., Peleška, J., Martásek, P. (2001) Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension to conventional therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 426-430.
- Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y. V., Lifton, R. P., Williams, C. S., Charru, A., Hunt, S. C., Hopkins P. N., Williams R. R., Lalouel, J. M., Corvol P. (1992) Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* **71**, 169-180.
- Kalousová, M., Hořejší, M., Fialová, L., Soukupová, J., Sulková, S., Malbohan, I., Tesař, V., Zima, T. (2004) Increased levels of pregnancy-associated plasma protein A are associated with mortality in hemodialysis patients: preliminary results. *Blood Purif.* **22**, 298-300.
- Klopper, A. (1982) Biological and clinical aspect of PAPP-A. In: *Pregnancy Proteins*. Eds. Grudzinskas, J. G., Teisner, B., Seppala, M. pp. 333-344: Academic Press, Australia.
- Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. L., Hays, L. G., Yates, J. R., Conover, Ch. A. (1999) The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3149-3153.
- Lin, T. M., Halbert, S. P., Kiefer, D., Spellacy, W. N., Gall, S. (1974) Characterization of four pregnancy-associated plasma proteins. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **118**, 223-236.
- Lin, T. M., Halbert, S. P., Spellacy, W. N., Berne, H. B. (1977) Plasma concentrations of four pregnancy proteins in complications of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **128**, 808-810.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1215.
- Mütze, S., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., Rath, W. (2008) Genes and preeclampsia syndrome. *J. Perinat. Med.* **36**, 38-58.
- Overgaard, M. T., Oxvig, C., Christiansen, M., Lawrence, J. B., Conover, Ch. A., Gleich, G. J., Sottrup-Jensen, L., Haaning, J. (1999) Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: Expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol. Reprod.* **61**, 1083-1089.
- Overgaard, M. T., Sorensen, E. S., Stachowiak, D., Boldt, H. B., Kristensen, L., Sottrup-Jensen, L., Oxvig, C. (2003) Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. *J. Biol. Chem.* **278**, 2106-2117.
- Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Gleich, G. J., Sottrup-Jensen, L. (1993) Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 12243-12246.
- Park, S., Youn, J. C., Shin, D. J., Park, C. M., Kim, J. S., Ko, Y. G., Choi, D., Ha, J. W., Jang, Y., Chung, N. (2007) Genetic polymorphism in the pregnancy-associated plasma protein-A associated with acute myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.* **18**, 417-422.
- Suzuki, K., Sata, F., Yamada, H., Saijo, Y., Tsuruga, N., Minakami, H., Kishi, R. (2006) Pregnancy-associated plasma protein-A polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *J. Reprod. Immunol.* **70**, 99-108.





## Association of pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia – A pilot study

Alexandra Muravská<sup>a</sup>, Anna Germanová<sup>a</sup>, Marie Jáchymová<sup>a</sup>, Zdeněk Hájek<sup>b</sup>, Jana Švarcová<sup>a</sup>, Tomáš Zima<sup>a</sup>, Marta Kalousová<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, U nemocnice 2, 128 08 Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Apolinářská 18, 128 51 Prague, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 July 2011

Received in revised form 11 September 2011

Accepted 22 September 2011

Available online 2 October 2011

#### Keywords:

Intrahepatic cholestasis of pregnancy

PAPP-A

Preeclampsia

Pregnancy-associated plasma protein A

Single nucleotide polymorphism

Gene

Intrauterine growth restriction

Preterm labor

### ABSTRACT

**Objectives:** The aim of the study was to investigate genetic and biochemical background of PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) in patients with risk pregnancies.

**Design and methods:** Five PAPP-A gene polymorphisms and PAPP-A maternal serum levels were studied together in 165 women in third trimester pregnancies complicated with threatening preterm labor (n = 98), preeclampsia (n = 35), intrauterine growth restriction (n = 34) and ICP (intrahepatic cholestasis of pregnancy) (n = 15). 114 healthy pregnant women served as controls.

**Results:** Preeclamptic patients had significantly higher frequency of TT genotype of Cys327Cys polymorphism compared to controls (p < 0.01). Patients with ICP had increased serum levels of PAPP-A compared to controls and correlation analysis showed significant relationship between PAPP-A and CRP (C-reactive protein) in the patients with intrauterine growth restriction (r = 0.49, p = 0.007).

**Conclusion:** Our study indicates the association of TT genotype of Cys327Cys polymorphism of the PAPP-A gene with preeclampsia. However, further study with larger groups of preeclamptic patients is needed to confirm our results.

© 2011 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) is a zinc-binding metalloproteinase, originally found in the plasma of pregnant women in 1974 [1]. Following research revealed positive correlation between PAPP-A serum levels and preeclamptic pregnancies [2]. Klopper [3] showed that the change is most marked in more severe grades of preeclampsia and the higher level of PAPP-A preceded the advent of hypertension and albuminuria. In 1990, Brambati et al. have published, that low maternal serum level of PAPP-A in first trimester of pregnancy is characterized for Down syndrome fetus development [4]. Since then, PAPP-A molecule is considered to be one of the most important biochemical markers of fetal aneuploidies. Its levels can be detected in very low concentrations even in healthy individuals (both non-pregnant women and men). Bayes-Genis et al. [5] hypothesised, that PAPP-A might be a promising marker of acute coronary

syndromes. Increased PAPP-A serum levels were detected in patients with renal failure [6] and were found to be related to prognosis of hemodialysis patients [7].

The PAPP-A gene is located on chromosome 9q33.1 and contains 22 exons. 200 kb long gene encodes for metalloproteinase of metzincin superfamily [8,9], which specifically cleaves IGF-binding protein (IGFBP) 4, resulting in release of IGF bound to IGFBP-4 [10]. Expression of PAPP-A during pregnancy is located to placental syncytiotrophoblast. PAPP-A is also expressed in ovarian granulosa cells, and in non-reproductive tissues, such as fibroblasts, osteoblasts and vascular smooth muscle cells [11] in concentrations 100–1000 times lower than in placenta.

Preeclampsia, preterm labor, intrauterine growth restriction (IUGR) and intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) in pregnancy are leading cause of maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide, but the underlying pathogenetic mechanisms of these diseases still remain unknown.

Preeclampsia occurs only in pregnant women and is characterized as a development of hypertension after 24th week of pregnancy, in most cases accompanied with proteinuria. Although pathogenesis of the disease is not fully described yet, immune maladaptation, placental ischemia and increased oxidative stress are believed to be of

\* Corresponding author at: Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Na bojišti 3, 120 00 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420 2249642848.

E-mail addresses: [marta.kalousova@seznam.cz](mailto:marta.kalousova@seznam.cz), [mkalousova@hotmail.com](mailto:mkalousova@hotmail.com) (M. Kalousová).

etiologic importance. It is likely that preeclampsia is a multifactorial disease, combining both genetic and environmental factors. Research of the genetic background of preeclampsia is mainly focused on candidate genes related to thrombophilia, oxidative stress, lipid metabolism and renin–angiotensin system, including fms-like tyrosine kinase 1 (*Flt-1*) gene [12,13]. Genes like *AGT*, renin, *eNOS* and other were studied and found to be related to essential hypertension in common population as well [14–17].

Preterm labor refers to the birth of a baby of less than 37 weeks gestational age. Infections play a major role in the pathogenesis of preterm labor, and as in the case of preeclampsia, it involves both environmental and genetic factors. Many studies have shown the potential role of the particular genes in the process of normal and pathological labor. Investigators have evaluated two major groups of genes involved in the pathophysiology of the preterm labor: first one includes genes associated with the host response to infection/inflammation, second one includes genes associated with the synthesis and degradation of the extracellular matrix [18].

Intrauterine growth restriction is most often caused by placental dysfunction and manifests as a variable syndrome of suboptimal growth and body disproportions. Together with cholestasis of mother in pregnancy, IUGR syndrome is one of the most serious diseases causing perinatal morbidity and mortality worldwide.

In the present study, our aim was to study selected *PAPP-A* polymorphisms and their relationship to *PAPP-A* serum levels in patients with risk pregnancies and healthy pregnant women as controls.

## Materials and methods

### Patients

165 Caucasian women (mean age  $30.8 \pm 4.7$  years) from Czech Republic were included in this single center study. All studied patients were in the third trimester of pregnancy. Ninety-eight women (mean age  $30.7 \pm 5.1$  years) with symptoms of threatening preterm labor (contraction, vaginal dilatation, premature preterm rupture of membranes, bleeding) and thirty-five patients (mean age  $31.3 \pm 4.1$  years) with hypertension in pregnancy or preeclampsia were enrolled in the study. Hypertension in pregnancy was diagnosed in previously normotensive women with two repeated systolic blood pressure of 140 mm Hg or more and diastolic blood pressure measurements of 90 mm Hg or more. Twenty-one women had hypertension and proteinuria more than 300 mg per day. Fourteen women with hypertension had no proteinuria at the time of blood collection, but either they finally developed it during follow up or had increased serum levels of uric acid above  $320 \mu\text{mol/L}$ . Therefore all these patients were evaluated together in preeclampsia group. Thirty-four women (mean age  $31.1 \pm 4.6$  years) had a fetus with intrauterine growth restriction and fifteen women (mean age  $31.7 \pm 3.4$  years) suffered from intrahepatic cholestasis of pregnancy. IUGR was defined as a newborn child that was less than 3rd percentile of birth weight for gestational age. ICP was characterized as an increase of mothers' serum levels of both, AST and ALT enzymes, above  $0.72 \mu\text{kat/L}$  (reference range  $0.1\text{--}0.72 \mu\text{kat/L}$ ) and  $0.78 \mu\text{kat/L}$  (reference range  $0.1\text{--}0.78 \mu\text{kat/L}$ ), after exclusion of other causes of elevated liver enzymes (e.g. hepatitis type A, B, C; CMV or EBV virus infection). Patients suffered from pruritus.

114 healthy pregnant women (mean age  $30.1 \pm 4.3$  years) were followed up during prenatal care in the Department of Obstetrics and Gynaecology of the General University Hospital in Prague and studied as controls. The women were in the third trimester of pregnancy at the time of joining the study and all of them finally delivered at term.

The study was performed in accordance with principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Institution Ethics Review Board. All patients gave their informed consent prior to entering the study.

### Samples

Blood samples were collected via puncture of the cubital vein simultaneously with blood collection for other routine examination. Routine biochemical parameters were determined in fresh samples. For biochemical analysis, blood was collected into tubes without anticoagulant, centrifuged for 10 min at 3000 rpm and serum was frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until the time of assay.

For DNA analysis, blood was collected into tubes with ethylenediaminetetraacetic acid. Tubes were stored at  $4^\circ\text{C}$  and isolation of DNA was performed by modified salting out procedure according to Miller et al. [19] within a week of collection.

### PAPP-A assay

PAPP-A was assessed immunochemically, using the TRACE method (time resolved amplified cryptate emission), based on nonradiating energy transfer. Commercial kit KRYPTOR-PAPP-A (Brahms, Germany) was used for determination of the PAPP-A level in the maternal serum. The results are expressed in IU/L.

### Routine laboratory parameters

Routine biochemical parameters were assessed by commercially available kits using certified biochemical techniques. C-reactive protein (CRP) was determined turbidimetrically (Roche Diagnostics, Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Serum creatinine was determined using Jaffe's method (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Total protein measurement on the 24-h urine sample was performed on the Roche Modular System (benzethonium chloride) on the same day as collections were completed. Serum ALT and AST levels were determined with the IFCC modified method at  $37^\circ\text{C}$  with addition of the pyridoxal-5-phosphate (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Uric acid was evaluated enzymatically (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Urea serum levels were determined by enzymatic UV assay with urease (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany) and total bilirubin was assessed by the method with stabilized diazonium salt (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Blood count was measured with an automated hematological Beckman Coulter LH750 Hematology analyzer (Beckman Coulter, USA).

### PAPP-A gene analysis

Two DNA fragments containing exon 2 (323 bp) and exon 6 with the part of intron 6 (387 bp) of the *PAPP-A* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primers summarized in Table 1. The PCR proceeded with initial denature at  $94^\circ\text{C}$  for 2 min, followed by 33 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $60^\circ\text{C}$  for 45 s and  $72^\circ\text{C}$  for 1 min, and additionally  $72^\circ\text{C}$  for 7 min. The primers were predicted by Primer3 Input web application (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

Products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel, excised from the gel and purified with spin columns (NucleoSpin

**Table 1**  
Primers and PCR conditions.

Exon	Primer sequence 5' → 3'	Annealing T ( $^\circ\text{C}$ )	Product size (bp)
2	Forward: gga ctc agc ggg aga tac tg	60.0	323
	Reverse: cac cgt cgg gtt ctt atg at		
6	Forward: cta gtc cca tca gtt gct cat tc	60.0	387
	Reverse: tgt tag gat agt gca agt gct ca		

Extract II, Macherey-Nagel). Nucleotide sequences of purified DNA fragments were then detected with a CEQ 8000 genetic analysis system (Beckman Coulter) according to the manufacturer's protocol.

### Statistical analysis

Results of biochemical parameters are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis of group differences was performed by ANOVA (one-way analysis of variance) followed by post test analysis. Concerning evaluation of PAPP-A polymorphisms, the significances of differences from Hardy–Weinberg equilibrium as well as those in the genotype distribution and allelic frequencies were tested using the  $\chi^2$  (chi-square) test. Association between parameters was determined by using Pearson's coefficients. For statistical analyses, the software "Prism 5", GraphPad Software Inc, was used.

The results were considered as statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Laboratory parameters

The results of basic laboratory parameters among the studied groups are shown in Table 2.

Patients with preeclampsia had significantly increased levels of PAPP-A compared to controls ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). When we divided preeclamptic patients into subgroup of patients with proteinuria ( $128.7 \pm 83.7$  IU/L) and subgroup of patients without proteinuria ( $108.4 \pm 69.6$  IU/L) at the time of blood collection and compared to control group ( $82.8 \pm 49.4$  IU/L) of healthy pregnant women, we found even stronger difference in PAPP-A levels between subgroup of preeclamptic patients with proteinuria and control group ( $p < 0.01$ , ANOVA  $p = 0.0025$ ). We did not find any statistical significant difference in PAPP-A levels between two subgroups divided based on presence of proteinuria and neither between subgroup of patients without proteinuria and control group.

Group of patients with ICP showed increased levels of PAPP-A as well ( $p = 0.01$  vs. controls,  $t$ -test), whereas patients with preterm labor had a tendency ( $p = 0.01$  vs. controls,  $t$ -test) to lower levels of PAPP-A (Fig. 1).

Correlation analysis showed significant relationship between PAPP-A and CRP in the patients with IUGR ( $r = 0.49$ ,  $p = 0.007$ ).

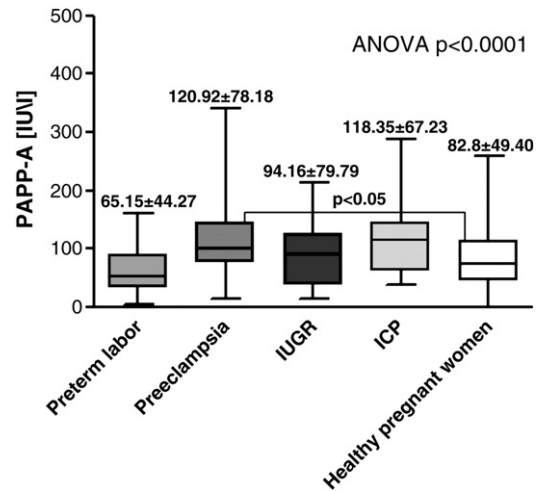
**Table 2**

Biochemical parameters in patients with risk pregnancy and healthy pregnant controls in 3rd trimester.

	Preterm labor n = 98	Preeclampsia n = 35	IUGR n = 34	ICP n = 15	Pregnant controls n = 114	p-value
Age [years]	30.7 $\pm$ 5.1	31.3 $\pm$ 4.1	31.1 $\pm$ 4.6	31.7 $\pm$ 3.4	30.1 $\pm$ 4.3	n.s.
Ery [ $\times 10^{12}$ /L]	3.57 $\pm$ 0.42***	3.98 $\pm$ 0.46###	3.93 $\pm$ 0.39###	3.92 $\pm$ 0.26##	4.02 $\pm$ 0.32	<0.0001
Hb [g/L]	111.84 $\pm$ 13.26***	119.43 $\pm$ 14.56##	124.32 $\pm$ 12.08###	119.60 $\pm$ 7.90	119.63 $\pm$ 8.47	<0.0001
Plt [ $\times 10^9$ /L]	250.24 $\pm$ 62.06	201.54 $\pm$ 68.08###	220.88 $\pm$ 54.34	214.33 $\pm$ 51.83	231.94 $\pm$ 53.88	0.0003
Neu rel [%]	76.97 $\pm$ 9.38***	66.18 $\pm$ 11.20*###	68.84 $\pm$ 8.72###	71.20 $\pm$ 8.56	71.73 $\pm$ 8.51	<0.0001
Lym rel [%]	15.48 $\pm$ 7.12***	24.53 $\pm$ 8.68*###	22.69 $\pm$ 6.91###	20.67 $\pm$ 7.30	19.16 $\pm$ 4.88	<0.0001
CRP [mg/L]	15.68 $\pm$ 25.40	8.57 $\pm$ 14.94	5.82 $\pm$ 4.85	5.56 $\pm$ 6.20#	n.a.	0.032
Urea [mmol/L]	1.94 $\pm$ 1.32	3.99 $\pm$ 3.68###	3.21 $\pm$ 0.92#	3.09 $\pm$ 1.06	n.a.	0.0001
Creatinine [ $\mu$ mol/L]	44.88 $\pm$ 19.15	61.54 $\pm$ 13.60###	55.87 $\pm$ 14.42	56.86 $\pm$ 9.88	n.a.	0.0002
Uric acid [ $\mu$ mol/L]	187.47 $\pm$ 83.16	347.34 $\pm$ 94.62###,++	308.97 $\pm$ 78.77###	264.93 $\pm$ 72.04	n.a.	<0.0001
Bilirubin [ $\mu$ mol/L]	7.01 $\pm$ 4.12+	6.97 $\pm$ 4.86++	6.54 $\pm$ 2.66++	10.96 $\pm$ 4.14	n.a.	0.0018
ALT [ $\mu$ kat/L]	0.29 $\pm$ 0.15+++	0.52 $\pm$ 0.93+++	0.41 $\pm$ 0.93+++	2.94 $\pm$ 1.94	n.a.	<0.0001

Results are means  $\pm$  SD. One-way ANOVA was performed followed by Bonferroni's multiple comparison test. n.a. – not assessed, n.s. – not significant.

- \*  $p < 0.05$ .
- \*\*\*  $p < 0.001$  vs. controls.
- #  $p < 0.05$  vs. preterm labor.
- ##  $p < 0.01$  vs. preterm labor.
- ###  $p < 0.001$  vs. preterm labor.
- +  $p < 0.05$  vs. ICP.
- ++  $p < 0.01$  vs. ICP.
- +++  $p < 0.001$  vs. ICP.



**Fig. 1.** Third trimester's PAPP-A serum levels in patients with risk pregnancies and healthy pregnant women. Legend: whiskers plot (min. to max.) with median values. One-way ANOVA was performed followed by Bonferroni's multiple comparison test.

### Genotype and allelic distribution of PAPP-A polymorphisms

We were searching for Pro324Leu (rs445154), Pro325Leu (rs445159), Cys327Cys (rs12375498) polymorphisms in exon 2 and Glu715Glu (rs35407884) and C/G (rs13290387) polymorphisms in exon 6 and intron 6, respectively. Among our studied group, we have found only Cys327Cys (rs12375498) polymorphism in exon 2 and C/G (rs13290387) polymorphism in intron 6.

The allelic and genotype frequencies between the entire group of patients with risk pregnancies and healthy pregnant women did not differ both in Cys327Cys polymorphism (exon 2) and C/G polymorphism (intron 6) and they both were in Hardy–Weinberg equilibrium (Table 3). Concerning the Cys327Cys polymorphism of the PAPP-A gene (exon 2), patients with preeclampsia had significantly higher frequency of mutated TT genotype compared to controls ( $p < 0.01$ ). Moreover, this result was supported by the weaker but the same trend of T allele in patients with preeclampsia compared to controls ( $p = 0.056$ ). We did not find any significant differences among the genotypes or alleles of the C/G polymorphism (intron 6) in subgroups of

**Table 3**

Genotype frequencies of rs12375498 and rs13290387 polymorphisms of the *PAPP-A* gene in patients with risk pregnancies and healthy pregnant controls – determined frequencies and expected frequencies according to Hardy–Weinberg equilibrium (HWE).

	rs12375498 exon 2			n.s.	rs13290387 intron 6			n.s.
	CC	CT	TT		CC	CG	GG	
Patients (N = 165)	52.0	42.0	6.0	n.s.	36.0	47.0	17.0	
HWE	53.6	39.2	7.2		35.4	48.2	16.4	n.s.
Healthy pregnant controls (N = 114)	61.0	35.0	4.0		31.0	51.0	18.0	
HWE	61.6	33.8	4.6	n.s.	31.9	49.2	18.9	n.s.

$\chi^2$  (chi-square) test was used, n.s. – not significant.

patients with pathological pregnancy and healthy pregnant controls (Table 4).

#### Association of genotypes with biochemical parameters

We established PAPP-A serum levels in subgroups of healthy pregnant controls based on genotype of Cys327Cys (exon 2) and C/G (intron 6) polymorphism of the *PAPP-A* gene. Healthy pregnant controls with TT genotype of Cys327Cys polymorphism had increased serum levels of PAPP-A compared to healthy pregnant controls with wild-type CC genotype ( $p=0.048$ , TT vs. CC *t*-test, ANOVA – n.s.) (Table 5). This trend was not found in any of the studied groups of patients. We did not observe any significant difference in PAPP-A serum levels between C/G (intron 6) polymorphism genotypes in our patients and controls neither.

In summary, we analyzed two exons (with the intron parts) of the *PAPP-A* gene. We were looking for together five polymorphisms of the *PAPP-A* gene, but we have found only two of them – Cys327Cys (rs12375498) in exon 2 and C/G (rs13290387) in intron 6. Patients with preeclampsia had significantly higher frequency of TT genotype of Cys327Cys polymorphism (exon 2) compared to controls. In healthy pregnant women, PAPP-A levels in mutated TT genotype of Cys327Cys polymorphism were increased compared to wildtype CC genotype. Patients with ICP had increased serum levels of PAPP-A. Correlation analysis showed significant relationship between PAPP-A and CRP in the patients with IUGR.

**Table 4**

Genotype and allelic frequencies in subgroups of patients with risk pregnancies divided based on clinical characteristics.

	Genotypes [%]			Alleles [%]	
	CC	CT	TT	C	T
rs12375498 exon 2 (Cys327Cys)					
Preterm labor (N = 98)	54	40	6	74	26
Preeclampsia (N = 35)	40	51.4	8.6	66	34
IUGR (N = 34)	53	41	6	74	26
ICP (N = 15)	67	33	0	83	17
Healthy pregnant controls (N = 114)	61	35	4	78	22
rs13290387 intron 6 (C/G)					
Preterm labor (N = 98)	39	46	15	62	38
Preeclampsia (N = 35)	26	60	14	56	44
IUGR (N = 34)	32	44	24	54	46
ICP (N = 15)	33	67	0	67	33
Healthy pregnant controls (N = 114)	31	51	18	57	43

Comparison was performed between subgroups of patients with pathological pregnancy versus controls.  $\chi^2$  (chi-square) test was used, \* $p<0.01$  vs. controls,  $^{\dagger}p=0.056$  vs. controls.

**Table 5**

PAPP-A serum levels in each genotype of rs12375498 (exon 2) and rs13290387 (intron 6) polymorphism of the *PAPP-A* gene in healthy pregnant women in 3rd trimester.

	rs12375498 (exon 2)	PAPPA [IU/L]	rs13290387 (intron 6)	PAPPA [IU/L]
CC (N = 75)		74.8 ± 48.3	CC (N = 38)	84.1 ± 59.0
CT (N = 43)		78.1 ± 51.8	CG (N = 63)	80.2 ± 40.7
TT (N = 5)		129.5 ± 74.2*	GG (N = 22)	88.8 ± 56.8

One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test and unpaired *t*-test was used. ANOVA test was not significant, \* $p=0.048$ , TT vs. CC (*t*-test).

## Discussion

This is the first study dealing with the case of Cys327Cys polymorphism of pregnancy-associated plasma protein A gene in patients with risk pregnancies and showing the association of mutated TT genotype with preeclampsia.

In our study, we were searching for overall five polymorphisms in exon 2 and exon 6 (with the part of intron 6) of the *PAPP-A* gene in the patients with threatening preterm labor, preeclampsia, IUGR and ICP. Although *The National Center for Biotechnology Information (NCBI) variation database (dbSNP)* describes five polymorphisms in these areas – Pro324Leu (rs445154), Pro325Leu (rs445159), Cys327Cys (rs12375498) in exon 2 and Glu715Glu (rs35407884) and C/G (rs 13290387) in exon 6 and intron 6, respectively – among our studied group, we have found only Cys327Cys (rs12375498) polymorphism in exon 2 and C/G (rs 13290387) polymorphism in intron 6. These results suggest that Pro324Leu, Pro325Leu and Glu715-Glu polymorphisms are not associated with our studied group of Caucasian origin. We recently demonstrated a similar results concerning exon 5 and 7 of *PAPP-A* gene in patients with preterm labor and preeclampsia [20].

The allelic and genotype frequencies of patients with risk pregnancies and healthy pregnant women were in Hardy–Weinberg equilibrium in both Cys327Cys and C/G (intron 6) polymorphisms.

Our results indicate for the first time the connection of mutated TT genotype of Cys327Cys polymorphism of the *PAPP-A* gene with preeclampsia ( $p<0.05$ ). This result was supported by the weaker but the same trend of T allele in patients with preeclampsia compared to controls ( $p=0.056$ ). However, these results can be affected by the relatively small group of patients with preeclampsia (N = 35). Since yet, no study focused on Cys327Cys polymorphism of the *PAPP-A* gene in patients with preeclampsia has been published. On the other hand, many studies have revealed the association of particular gene to preeclampsia [12].

We did not find any association of C/G (rs13290387) polymorphism with preterm labor, preeclampsia, IUGR or ICP. Nevertheless, this polymorphism was found to be connected to an increased risk of acute myocardial infarction in Korean population [21]. Another study showed the possible association of Ser1224Tyr (dbSNP: rs7020782, exon 14) polymorphism of the *PAPP-A* gene with the risk of recurrent pregnancy loss (RPL). Women carrying the C allele have an increased risk of RPL with at least one pregnancy loss after 9 weeks gestation. All patients and controls involved in the study were native Japanese women [22].

We established PAPP-A serum levels in subgroups of healthy pregnant controls based on genotype of Cys327Cys (exon 2) polymorphism of the *PAPP-A* gene. Although ANOVA analysis did not reveal any significant difference, PAPP-A levels in mutated TT genotype were increased compared to wildtype CC genotype ( $p=0.048$ , TT vs. CC *t*-test). This trend was not found in any of the other studied groups, although PAPP-A serum levels were significantly increased in group of patients with preeclampsia and its levels were elevated in patients with ICP as well. Since this polymorphism does not cause aminoacid change, the explanation is difficult and requires further studies.

Our study has shown significantly increased levels of PAPP-A in patients with preeclampsia in third trimester compared to healthy pregnant controls. When concerning subgroup of preeclamptic patients with proteinuria, this trend was even stronger. The group of patients with IUGR did not differ from control group. Many studies have shown that decreased PAPP-A maternal serum levels in first trimester of pregnancy are associated with subsequent complications like preeclampsia, preterm labor or IUGR [23–27]. Concerning second and third trimester, previous studies have already shown similarly to our study elevated serum levels of PAPP-A in the last month of gestation in preeclamptic pregnancies [2,28]. On the other hand, Bersinger and Ødegård [27] did not find any significant difference in PAPP-A serum levels between the patients with preeclampsia and healthy pregnant controls at 25 and 33 week of pregnancy. Moreover, Bersinger et al. reported the same results in pregnancies complicated with IUGR [27], which is in accordance with our results. In our study, patients with preterm labor had a tendency to lower levels of PAPP-A ( $p=0.01$  vs. controls,  $t$ -test) in third trimester, although ANOVA analysis was not significant. In a study from 1984, PAPP-A levels did not change in the second and third trimesters in patient with preterm labor compared to corresponding values in normal pregnancy [29].

We demonstrate for the first time elevated PAPP-A serum levels in patients with ICP compared to healthy pregnant controls ( $p=0.01$ ,  $t$ -test) in third trimester of pregnancy. The difference between the groups can be considered as weak, since the ANOVA analysis was not significant, however the unpaired  $t$ -test showed a strong significance when concerning only these two groups. Another limitation is a relatively small number of patient with ICP ( $N=15$ ).

We observed a positive correlation between serum PAPP-A and CRP among patients with IUGR ( $r=0.49$ ,  $p=0.007$ ). The same positive correlation has been observed in patients with renal failure or after renal transplantation [30–32], and patients with acute coronary syndromes [5]. Maternal CRP values consistently increase throughout pregnancy as compared to the non-pregnant state and culminating during labor [33], without crossing the placental barrier [34].

## Conclusions

Our pilot study indicates the association of mutated TT genotype of Cys327Cys polymorphism of the PAPP-A gene with preeclampsia. However, further study with larger groups of patients with preeclampsia is needed to confirm our results.

## Conflict of interest

None declared.

## Acknowledgment

The study was supported by research project MZO 0000VFN2005 and SVV-2011-262513. Authors are thankful to Mrs. Hudcová, Mrs. Řeháková, Mrs. Pourová and Mrs. Němcová for technical assistance.

## References

- Lin TM, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterization of four pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol* 1974;118:223–36.
- Lin TM, Halbert SP, Spellacy WN, Berne HB. Plasma concentrations of four pregnancy proteins in complications of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1977;128:808–10.
- Klopper A. Biological and clinical aspect of PAPP-A. In: Grudzinskas JG, Teisner B, Seppala M, editors. *Pregnancy proteins*. Australia: Academic Press; 1982. p. 333–44.
- Brambati B, Lanzani A, Tului L. Ultrasound and biochemical assessment of first trimester of pregnancy. In: Chapman M, Grudzinskas JG, Chard T, editors. *The embryo: normal and abnormal development and growth*. London: Springer Verlag; 1990. p. 181–94.
- Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, et al. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345:1022–9.
- Kalousova M, Sulkova S, Fialova L, et al. Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2577–81.
- Kalousova M, Hořejší M, Fialová L, et al. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein A are associated with mortality in hemodialysis patients: preliminary results. *Blood Purif* 2004;22:298–300.
- Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit zinc-binding environments and topologies and should be grouped into a common family the “metzins”. *FEBS Lett* 1993;331:134–40.
- Overgaard MT, Sorensen ES, Stachowiak D, et al. Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. *J Biol Chem* 2003;278:2106–17.
- Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3149–53.
- Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, et al. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999;61:1083–9.
- Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and preeclampsia syndrome. *J Perinat Med* 2008;36:38–58.
- Srinivas SK, Morrison AC, Andrela CM, Elovitz MA. Allelic variations in angiogenic pathway genes are associated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:445.e1–445.e11.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsov YV, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71:169–80.
- Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, et al. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension* 2003;41:308–12.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3–8.
- Jáchymová M, Horký K, Bultas J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:426–30.
- Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr Res* 2009;65:1–9.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- Germanová A, Jáchymová M, Germanová A, et al. Pregnancy-associated plasma protein A polymorphisms in patients with risk pregnancies. *Folia Biol (Praha)* 2011;57:82–5.
- Park S, Youn JC, Shin DJ, et al. Genetic polymorphism in the pregnancy-associated plasma protein-A associated with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 2007;18:417–22.
- Suzuki K, Sata F, Yamada H, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2006;70:99–108.
- Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol* 2011, doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.03.004.
- Ong CY, Liao AW, Spencer K, Munim S, Nicolaides KH. First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *BJOG* 2000;107:1265–70.
- Goetzinger KR, Cahill AG, Macones GA, Odibo AO. Association of first-trimester low PAPP-A levels with preterm birth. *Prenat Diagn* 2010;30:309–13.
- Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1762–7.
- Bersinger NA, Ødegård RA. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:37–45.
- Deveci K, Sogut E, Evliyaoglu O, Duras N. Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. *J Obstet Gynaecol Res* 2009;35:94–8.
- Westergaard JG, Teisner B, Hau J, Grudzinskas JG. Placental protein measurements in complicated pregnancies. III. Premature labour. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:1230–3.
- Fialová L, Kalousová M, Soukupová J, et al. Relationship of pregnancy-associated plasma protein-A to renal function and dialysis modalities. *Kidney Blood Press Res* 2004;27:88–95.
- Lauzurica R, Pastor C, Bayés B, Hernández JM, Romero R. Pretransplant pregnancy-associated plasma protein-A as a predictor of chronic allograft nephropathy and posttransplant cardiovascular events. *Transplantation* 2005;80:1441–6.
- Coskun A, Duran S, Apaydin S, Bulut I, Sariyar M. Pregnancy-associated plasma protein-A: evaluation of a new biomarker in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2007;39:3072–6.
- Watts DH, Krohn MA, Wener MH, Eschenbach DA. C-reactive protein in normal pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991;77:176–80.
- Nielsen FR, Bek KM, Rasmussen PE, Qvist I, Tobiassen M. C-reactive protein during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;35:23–7.

