

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Určení frekvence mutací genu pro fumaráthydratázu u
pacientek s děložními myomy

MUDr. Kristýna Kubínová

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika

1. LF UK a VFN

Školitel: Doc. MUDr. Michal Mára, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Úvod	6
Hypotézy a cíle práce	7
Materiál a metodika	8
Výsledky	10
Diskuze	11
Závěry	14
Použitá literatura	15
Seznam publikací doktoranda	17

ABSTRAKT

Úvod: Na vzniku děložních myomů se spolupodílejí faktory genetické. Jedním ze studovaných genů je i gen pro fumaráthydratázu (FH), jehož mutace se vyskytují u dvou syndromů: Multiple smooth muscle tumors of the skin and uterus (MCUL1) a Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC). U postižených žen je typický výskyt děložních myomů v nízkém věku.

Metodika: Stanovit aktivitu fumaráthydratázy a provést mutační analýzu genu FH v lymfocytech u mladých pacientek se sporadickými myomy v porovnání se zdravými kontrolami, dále stanovit aktivitu a množství fumaráthydratázy ve tkáni myomů u těchto pacientek.

Výsledky: U 41 pacientek ve věku do 30 let a diagnózou sporadických děložních myomů byla stanovena aktivita fumaráthydratázy. Snížení aktivity bylo zaznamenáno ve 34,1 % případů. U 2 pacientek (4,9 %) byla mutační analýzou prokázána germinální mutace FH. Ve 22 vzorcích myomové tkáně byla v jednom případě zaznamenána snížená aktivita a množství fumarázy.

Závěr: Výskyt mutací FH u sporadických myomů je relativně nízký.

Klíčová slova: děložní myom, leiomyom, fumaráthydratáza, fumaráza, gen FH

ABSTRACT

Introduction: The onset of uterine fibroids is influenced by genetic factors. One of the genes in focus is the Fumarate hydratase (FH) gene. Germinal mutations of FH gene cause two syndromes: Multiple smooth muscle tumors of the skin and uterus (MCUL1) and Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC). Women affected by this syndrome typically present with uterine fibroids at early age.

Methods: To measure the activity of Fumarate hydratase and to perform mutation analysis of FH gene in lymphocytes in young patients with sporadic uterine fibroids and to compare the results with healthy controls. The further aim was to study the activity and amount of fumarase in a series of samples of uterine leiomyomas.

Results: Activity of Fumarate hydratase was measured in 41 patients up to 30 years of age with the diagnosis of sporadic uterine fibroids. Reduced activity was recorded in 34.1 % of cases. In two patients (4.9 %) mutation analysis revealed FH mutation. Reduced activity and amount of fumarase in leiomyoma tissue was detected in one sample out of 22.

Conclusion: The incidence of FH gene mutations in patients with sporadic fibroids is relatively low.

Key words: uterine fibroid, leiomyoma, Fumarate hydratase, Fumarase, FH gene

Úvod

Děložní myomy představují nejčastější nezhoubné onemocnění ženského pohlavního traktu. Incidence děložních myomů se popisuje mezi 30-40 % s vrcholem výskytu u žen po 40. roce života. Etiopatogeneze děložních myomů však není do dnešní doby jednoznačně objasněna. Mezi rizikové faktory řadíme časný nástup menarche, pozdní věk v době prvního těhotenství, obezitu, etnický původ a v neposlední řadě i faktory genetické. Cytogenetickými studiemi byly prokázány až u 50 % děložních myomů chromozomální abnormality. Mezi nejčastější patří aberace chromozomů 6, 7, 12 a 14. Ve výzkumu etiopatogeneze děložních myomů je v poslední době věnována pozornost mutacím genu pro fumaráthydratázu (Hodge, 2007; Okolo, 2008; Parker, 2008).

Fumaráthydratáza je klíčovým enzymem Krebsova cyklu. Je lokalizovaná v mitochondriální matrix a v cytosolu a katalyzuje přeměnu fumarátu na malát. Gen FH je lokalizován na chromozómu 1q42.3-43 (Toro, 2003).

Germinální heterozygotní mutace tohoto genu způsobují 2 syndromy: Multiple Smooth muscle tumors of the skin and uterus (MCUL1) a Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC), které jsou charakterizovány kožní leiomyomatózou, přítomností

děložních myomů u jedinců ženského pohlaví a v případě HLRCC i rizikem renálního papilárního karcinomu typu II. Děložní myomy se u postižených žen typicky vyskytují mezi 20-30 rokem života, jsou silně symptomatické a často mnohočetné. U pacientů s mutací FH nacházíme sníženou aktivitu fumaráthydratázy (fumarázy) v lymfocytech. V nádorech postižených jedinců se uplatňuje Knudsonův „two-hit“ model rozvoje tumoru, kdy dochází ke ztrátě heterozigosity genu FH (Eng, 2003; Tomlinson, 2002).

Hypotézy a cíle práce

Účelem této práce bylo prokázat, zda se mutace FH ve zvýšené míře podílí i na vzniku sporadických myomů u mladých pacientek. Vycházeli jsme z hypotézy, že děložní myomy se u pacientek v rámci syndromů MCUL1/HLRCC vyskytují v nižším věku než je výskyt popsáný u obecné populace. Cílem bylo stanovit, v definované populaci pacientek s děložními myomy diagnostikovanými do 30 let včetně a negativní osobní a rodinnou anamnézou na ostatní projevy MCUL1/HLRCC, aktivitu fumarázy v lymfocytech a frekvenci mutací FH. Dalším dílčím cílem bylo stanovení aktivity a množství fumarázy ve tkáni leiomyomů získaných v rámci myomektomie od těchto pacientek.

Materiál a metodika:

Do studie byly zařazeny pacientky s děložními myomy. Jako kontrolní skupina byly použity pacientky s absencí děložních myomů. Všechny ženy zařazené do studie včetně kontrol podepsaly informovaný souhlas se studií a provedení studie bylo schváleno etickou komisí VFN a 1. LF UK v Praze. Nábor pacientek probíhal v letech 2009-2010 retro- i prospektivně.

Pacientky zařazené do studie splňovaly vstupní kritéria: věk v době diagnózy děložního myomu do 30 let včetně, velikost děložního myomu nad 3 cm/nebo v případě retrospektivně vybraných pacientek údaj v operačním protokolu o odstranění myomu nad 3 cm a ultrazvukové vyšetření prokazující přítomnost myomu(ů), negativní rodinná anamnéza na výskyt kožní leiomyomatózy a renálního papilárního karcinomu.

Jako kontroly byly definovány ženy do 30 let s negativním nálezem v malé pánvi, tedy s absencí děložních myomů.

Stanovení aktivity fumaráthydratázy

Aktivita fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy byla v izolovaných lymfocytech stanovena spektrofotometricky a porovnána s aktivitou zjištěnou v lymfocytech zdravých kontrol. Jako významná redukce

aktivity fumaráthdratázy v lymfocytech bylo považováno snížení nejméně na 50 % aktivity kontrol.

DNA analýza

DNA k analýze byla izolována ze vzorku periferní krve pacientek. Všechny exony a přilehlé intronové oblasti byly amplifikovány pomocí PCR a následně sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). Analýza delecí jednoho nebo více genů byla provedena pomocí MLPA.

Stanovení aktivity fumarázy ve tkáni leiomyomů

Aktivita fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy byla v tkáni leiomyomu stanovena spektrofotometricky a porovnána s aktivitou zjištěnou v kontrolním vzorku. Kontrolním vzorkem byla tkáň myomu od starší pacientky. Jako významná redukce aktivity fumaráthdratázy ve vzorku myomové tkáně bylo považováno snížení nejméně na 60 % specifické aktivity zjištěné v kontrolním vzorku.

Určení množství fumarázy ve tkáni leiomyomů

Fumaráthdratáza byla detekována pomocí „Western blotu“ s následnou imunodetekcí. Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel byl použit protein β -aktin.

Statistická analýza

Pro testování kvantitativních parametrů (věk, počet myomů a velikost dominantního myomu) byl použit neparametrický test Mann-Whitneyův. Pro testování kvalitativních parametrů byl použit test závislosti χ^2 (chí-kvadrát) a při malých četnostech Fisherův test. Hladina významnosti p byla považována za statisticky významnou při hodnotách menších nebo rovných 0,05.

Výsledky

Stanovení aktivity fumarázy a mutační analýza FH v lymfocytech

Do studie bylo zařazeno 41 pacientek s děložními myomy. U všech pacientek bylo provedeno měření aktivity fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy v lymfocytech a porovnáno s aktivitami zjištěnými u kontrolní skupiny ($n=42$). U 14 pacientek (34,1 %) byla aktivita fumarázy snížena, u 11 z nich byl snížen i poměr fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy.

Ve všech vzorcích byla provedena mutační analýza FH. Mutace FH byla zjištěna u 2 pacientek (4,9 %). V jednom případě se jednalo o dosud nepopsanou mutaci c.892G>C u pacientky ve věku 28 let s diagnózou 2 děložních myomů o průměru 50 a 20 mm. V druhém případě byla detekována dříve popsaná mutace c.584.T>C. Jednalo se o 30letou pacientku s mnohočetnou děložní

myomatózou s dominantními myomy o průměru 160 a 65 mm. V parafínem fixovaném vzorku myomové tkáně této pacientky byla tato mutace přítomna v homozygotní formě. Obě pacientky měly sníženou aktivitu fumarázy v lymfocytech a zdědily mutace FH od svých matek.

Stanovení aktivity a množství fumarázy ve tkáni leiomyomů

Ve 22 vzorcích myomové tkáně získaných od pacientek, které ve sledovaném období podstoupily myomektomii na Gynekologicko-porodnické klinice VFN bylo provedeno měření aktivity a množství fumarázy a porovnáno se vzorkem myomu od pacientky ve věku 38 let.

Snížená aktivita a množství fumarázy bylo prokázána v jednom vzorku. Tato pacientka měla také v lymfocytech prokázanou sníženou aktivitu fumarázy, byla však mutační analýzou vyloučena jako nosička germinální mutace FH.

Diskuze

Penetrance mutací FH je v rámci syndromů MCUL1/HLRCC vysoká, mutace jsou popisovány u 71-93 % jedinců. Prvním a nejčastějším projevem toho syndromu bývá kožní leiomyomatóza. U žen s rodinným výskytem těchto syndromů byl popsán nižší věk výskytu děložních myomů u nosiček mutace FH (střední věk 28

let) ve srovnání s ženami negativními na přítomnost mutace FH (střední věk 38 let). Studie symptomů MCUL1/HLRCC odhalila, že 7 % FH_{poz} pacientek vykazuje děložní myomy jako jediný klinický projev tohoto syndromu a 9 % pacientů je klinicky zcela němých. Výskyt renálního papilárního karcinomu je v postižených rodinách relativně nízký, do 10 % (Alam, 2005; Stewart, 2008; Toro, 2003).

Určení frekvence výskytu mutací FH u pacientek se sporadickými myomy napříč celým věkovým spektrem se doposud věnovalo jen několik prací. Podíl mutací FH na vzniku sporadických děložních myomů je odhadován na 5 % (Barker, 2006).

Náš soubor je unikátní v tom, že systematicky analyzuje výskyt mutací FH u mladých pacientek se sporadickými děložními myomy. Snížená aktivita fumarázy v lymfocytech byla prokázána u 14 pacientek ze souboru (34,1 %), u 11 z nich byl snížen i poměr aktivit fumaráthydratázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy. U těchto pacientek bude dále provedena mutační analýza promotoru genu FH a analýza cDNA na přítomnost možných nestříhových mutací lokalizovaných v intronech genu.

U dvou pacientek ze souboru (4,9 %) byly identifikovány autozomálně dominantní heterozygotní mutace FH.

V případě pacientky 14 se jednalo o novou, dosud nepopsanou mutaci c.892G>C. Mutace p.Ala298Pro je lokalizována v blízkosti aktivního místa enzymu a pravděpodobně negativně ovlivňuje katalytický mechanismus (Picaud, 2011).

U druhé pacientky byla nalezena mutace c.584T>C dříve popsaná v rodině s hereditární leiomyomatózou (Toro, 2003). Mutace je lokalizovaná v centrálních helixech a má vliv na stabilitu enzymu (Picaud, 2011). V dostupném parafinem fixovaném vzorku leiomyomu byla mutace c.584T>C přítomná v homozygotním stavu, naznačujícím ztrátu heterozygoty v leiomyomu, která je v souladu s hypotézou aktivace pseudohypoxické odpovědi, umožňující růstovou výhodu buněk s deficem fumarázy (Lehtonen, 2004). Parafinem fixovaný vzorek myomu u pacientky 14 bohužel nebyl dostatečný k provedení mutační analýzy FH ve tkáni leiomyomu.

Obě pacientky zdědily mutace genu FH od svých matek, u kterých také došlo k rozvoji děložních myomů okolo 30. roku života a nebyl u nich zaznamenán výskyt ostatních symptomů MCUL1/HLRCC.

Vzhledem k relativně nízkému popisovanému riziku vzniku renálního papilárního karcinomu i v rámci syndromu HLRCC a vysoké radiační zátěži CT vyšetření není dosud jednoznačný konsensus o indikaci pravidelného screeningu renálního karcinomu u nosičů

mutací FH. Jako racionální se jeví pravidelný screening v případě výskytu renálního papilárního karcinomu v rodinné anamnéze (Alam, 2005).

Ve 22 vzorcích myomové tkáně byla prokázána snížená aktivita a množství fumarázy jen v jednom případě. Tato pacientka měla také sníženou aktivitu fumarázy v lymfocytech, byla však mutační analýzou vyloučena jako možná nosička heterozygotní germinální mutace FH.

Závěr

Naší prací se podařilo prokázat, že mutace FH se u pacientek se sporadickými děložními myomy, u nichž dojde k rozvoji onemocnění v mladém věku, vyskytují v cca 5 % případů. Zároveň jsme potvrdili ztrátu heterozigosity pro mutaci c.584T>C ve tkáni leiomyomu. Ukázali jsme, že nosiči mutací FH mohou být snadno identifikováni pomocí stanovení aktivity fumaráthydratázy v lymfocytech.

Použitá literatura

Alam NA, Olpin S, Leigh IM. Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer. *Br J Dermatol.* 2005;153:11-7.

Barker KT, Spendlove HE, Banu NS, et al. No evidence for epigenetic inactivation of fumarate hydratase in leiomyomas and leiomyosarcomas. *Cancer Lett.* 2006;235:136-40.

Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, et al. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:193-202.

Hodge JC, Morton CC. Genetic heterogeneity among uterine leiomyomata: insights into malignant progression. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R7-13.

Okolo S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:571-88.

Parker W. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertility and sterility.* 2007;87:725-36.

Picaud et al. Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *J Inherit metab Dis.* 2011;34:671-6.

Stewart L, Glenn GM, Stratton P, et al. Association of germline mutations in the fumarate hydratase gene and

uterine fibroids in women with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Arch Dermatol.* 2008;144:1584-92.

Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature Genetics.* 2002;30:406-10.

Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, Warren MB, Glenn GM, Turner ML et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet* 2003;73: 95-106.

Seznam publikací doktoranda

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace S IF:

1. **Kubinova K**, Tesarova M, Hansikova H, et al. Fumarate hydratase gene mutation in two young patients with sporadic uterine fibroids. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39:410-4 (**IF 0.94**).
2. **Kubinova K**, Mara M, Horak P, et al. Reproductive outcome after myomectomy: comparison of patients with and without second look hysteroscopy and laparoscopy. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2012;21:118-24 (**IF 1,33**).
3. Horak P, Mara M, Dundr P, **Kubinova K**, et al. Effect of a selective progesterone receptor modulator on induction of apoptosis in uterine fibroids in vivo. *Int J Endocrinol.* 2012 ;2012:436174. (**IF 1,867**).
4. Mara M, **Kubinova K**, Maskova J, et al. Uterine artery embolization versus laparoscopic uterine artery occlusion: the outcomes of a prospective, nonrandomized clinical trial. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2012;35:1041-52 (**IF 2.09**).

Bez IF

1. **Kubínová K**, Mára M, Horák P, et al. Genetické faktory v etiopatogeni děložních myomů. *Ceska Gynekol.* 2012;77:58-60.
2. **Kubínová K**, Mára M, Novotná M, et al. Laparoskopická konzervativní léčba děložních myomů. *Ceska Gynekol.* 2012;77:326-30.

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace
S IF

1. Mara M, Horak P, **Kubinova K**, et al. Hysteroscopy after uterine fibroid embolization: evaluation of intrauterine findings in 127 patients. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012;38:823-31 (**IF 0,94**).
2. Kuzel D, Mara M, Horak P, **Kubinova K**, et al. Comparative outcomes of hysteroscopic examinations performed after uterine artery embolization or laparoscopic uterine artery occlusion to treat leiomyomas. *Fertil Steril.* 2011;95:2143-5 (**IF 3,970**).
3. Kuzel D, Horak P, Hrazdírova L, **Kubinova K**, et al. "See and treat" hysteroscopy after missed abortion. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2011;20:14-7. (**IF 1,33**).
4. Kuzel D, Hrazdírova L, **Kubinova K**, et al. Hysteroscopic management of displaced levonorgestrel-releasing intrauterine system. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39:1014-8 (**IF 0,94**).

Bez IF

1. **Kubínová K**, Mára M, Horák P, et al. Novinky a perspektivy v radiologické léčbě děložních myomů. *Ceska Gynekol.* 2009;74:22-6.
2. **Kubínová K**, Kudrna K, Mašata J, Hájek Z. Spontánní ruptura symfýzy následovaná profúzním krvácením do dutiny břišní během vaginálního porodu. *Ces.Gynek.*,2009;74(1): 64-66.
3. Kužel D, Hrazdírová L, Mára M, Fanta M, Hrušková H, **Kubínová K**. Management a výsledky ambulantní hysteroskopie. *Ceska Gynekol.* 2012;77(4):308-13.
4. Mára M, Fanta M, Sláma J, Zikán M, **Kubínová K**, Kužel D, Cibula D. Laparoskopická lymfadenektomie

- v gynekologické operativě. *Ceska Gynekol.* 2012;77(4):320-6.
5. Horák P, Mára M, Dundr P, **Kubínová K.**, Hašlík L, Kužel D: Ischemizující metody léčby děložních myomů. *Ces.Gynekol.* 2009;74(4): 262-268
 6. Kužel D, Weiss P, **Kubínová K.**, et al. Sexuální funkce po laparoskopicky asistované vaginální hysterektomii (LAVH) a totální laparoskopické hysterektomii (TLH) u předoperačně asymptomatických žen. *Ces.Gynekol.* 2009;74(4): 130-137.
 7. Kuzel D, Tóth D, Fucíková Z, Bartosová L, Mára M, Hrusková H, Fanta M, Zizka Z, Sosna O, **Kubínová K.**, Dohnalová A.:Uterine arteries doppler velocimetry provides 3-years follow up endometrial ablation outcome. *Prague Med Rep.* 2008;109(2-3):166-74.