

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biochemie



**Kateřina Kedrová**

Fumaráthydratáza jako tumorový supresor  
Fumarate hydratase as tumor suppressor

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.  
Konzultant: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2012

Podpis

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Haně Hansíkové, CSc. a Ing. Markétě Tesařové Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři a za neocenitelné rady při sepisování této bakalářské práce. Za odbornou pomoc s prací v laboratoři bych chtěla ještě poděkovat Mgr. Hance Kratochvílové. Dále také děkuji prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. zastupující katedru biochemie PřF UK v Praze za cenné připomínky při sepisování této bakalářské práce.

Nakonec bych chtěla poděkovat skupině pracovníků Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch (Klinika dětského a dorostového lékařství 1.LF UK a VFN) za vytvoření příjemně přátelské atmosféry a svým rodičům za jejich podporu.

Tato bakalářská práce byla podpořena výzkumným projektem Univerzity Karlovy v Praze PRVOUK P24/LF1/3.

# Obsah

Abstract.....	1
Abstrakt.....	2
Seznam použitých zkratek .....	3
Úvod.....	5
1.1 Fumaráthydratáza .....	5
1.1.1 Třídy fumaráthydratázy .....	6
1.1.2 Cytosolická a mitochondriální fumaráthydratáza .....	7
1.2 Deficit fumaráthydratázy .....	8
1.3 Fumaráthydratáza jako tumorový supresor .....	8
2 Cíl práce.....	12
3 Materiál a metody .....	13
3.1 Materiál .....	13
3.1.1 Biologický materiál.....	13
3.1.2 Chemikálie .....	14
3.1.3 Použité přístroje .....	17
3.2 Metody .....	17
3.2.1 Homogenizace vzorku .....	17
3.2.2 Stanovení aktivity enzymů fumaráthydratázy a citrátsyntázy .....	18
3.2.3 Analýza množství fumaráthydratázy pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), „Western blotu“ a imunodetekce .....	20
4 Výsledky .....	24
4.1 Aktivita a množství fumaráthydratázy .....	24
4.1.1 Optimalizace měření aktivity fumaráthydratázy.....	24
4.1.2 Aktivita fumaráthydratázy .....	25

4.1.3	Množství fumaráthydratázy .....	27
4.1.4	Přehled vzorků leiomyomů se sníženým množstvím fumaráthydratázy a aktivity fumaráthydratázy .....	29
5	Diskuze .....	30
6	Souhrn.....	33
	Seznam použité literatury .....	34

## Abstract

Fumarate hydratase (fumarase, EC 4.2.1.2) catalyzes the reverse hydration of fumarate to S malate. In mammalian cells, it changes fumarate in the mitochondrial matrix as a part of the citric acid cycle and in the cytosol, where functions to metabolize fumarate the product of the degradation of some amino acids, of ammonia transformation to urea acid or of the purine nucleotide synthesis. .

In human cells, fumarase is encoded by *FH* gene localized on chromosome 1 (1q42.1). The *FH* gene consists of 10 exons and encodes for a 510 amino acids-long protein including the N-terminal mitochondrial signal sequence.

Germline heterozygous *FH* mutations were found in two autosomal dominant syndromes. These are multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis (MCUL1 or MCL) and hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC). In the most of tumors from these patients, loss of *FH* gene heterozygosity was also found. It has been suggested that fumarase acts as a tumor suppressor according to Knudson's two-hit hypothesis.

The aim of the bachelor thesis was to study the activity and amounts of fumarase in a series of 22 samples of uterine leiomyomas from 22 young women patients (21-31 years) with sporadic uterine leiomyomas. As a control sample, uterine leiomyoma from a 38-year-old patient was used. Activity of fumarase and a control enzyme citrate synthase as well as protein amounts of fumarase and a control protein  $\beta$ -actin was bellow detection limit of used methods. Of the remaining 19 leiomyoma samples, marked reduction of fumarase amounts and activity was found in one sample (sample 9).

In Czech

## Abstrakt

Fumaráthydratáza (fumaráza, EC 4.2.1.2) katalyzuje reverzibilní hydrataci fumarátu na S-malát. U savců přeměňuje fumarát v mitochondriální matrix, jako součást citrátového cyklu, a v cytosolu, kde vzniká například při odbourávání skeletu některých aminokyselin, při přeměňování amoniaku na močovinu nebo při syntéze purinových nukleotidů.

V lidských buňkách je fumaráza kódovaná genem *FH* lokalizovaným na chromosomu 1 (1q42.1). Gen *FH* obsahuje 10 exonů a kóduje protein o velikosti 510 aminokyselin včetně signální sekvence na N-konci polypeptidového řetězce.

Zárodečné heterozygotní mutace genu *FH* byly nalezeny u dvou autozomálně dominantních syndromů. Jedná se o mnohonásobnou kožní a děložní leiomyomatózu (MCUL1 nebo MCL) a dědičnou leiomyomatózu a rakovinu ledvinných buněk (HLRCC). Ve většině nádorů těchto pacientů byla nalezena také ztráta heterozygoty genu *FH*, která naznačuje, že se zde může jednat o Knudsonův „two-hit“ model rozvoje tumoru. Gen *FH* se tedy v těchto případech chová jako tumor supresorový.

Cílem bakalářské práce bylo v souboru 22 vzorků děložních leiomyomů od pacientek ve věku 21-31 let stanovit množství a aktivitu fumaráthydratázy. Jako kontrolní vzorek byl použit děložní leiomyom od pacientky, jejíž věk byl 38 let.

Ve třech vzorcích nebyla aktivita fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy vůbec detekována a dále množství fumarázy a kontrolního enzymu  $\beta$ -aktinu bylo velmi nízké nebo na hranici detekce použité metody. Ze zbylých 19 vzorků leiomyomů bylo v jednom (vzorek 9) zjištěno výrazně snížené množství a aktivity fumarázy.

## **Seznam použitých zkratek**

APS - peroxodisíran amonný

BSA - hovězí sérový albumin

DTNB - 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoát), Ellmanovo reagens

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

EPO - Erythropoetin

*FH* - gen pro fumaráthydratázu

HIF - hypoxii indukující faktor

HLRCC - dědičná leiomyomatóza a rakovina ledvinných buněk („hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer“)

HPH - prolyl hydroxylázy HIF

KTEA – „KCl-Tris-EDTA-aprotinin“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufrы, strana 15)

MCUL1 - mnohonásobná kožní a děložní leiomyomatóza („multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis“)

MCL - mnohonásobná kožní a děložní leiomyomatóza („multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis“)

PHD – proteiny obsahující prolyl hydroxylázovou doménu

PVDF - polyvinyliden difluorid

RIPA - „Radio-Immunoprecipitation Assay“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufrы, strana 15)

ROS - volné kyslíkové radikály

SDS- dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného



TBE - „Tris-borate-EDTA“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 15)

TBS - „Tris-buffered saline“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 16)

TBST - „Tris-buffered saline - tween“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 16)

TEMED - N,N,N',N'-tetramethyl-ethylen-1,2-diamin

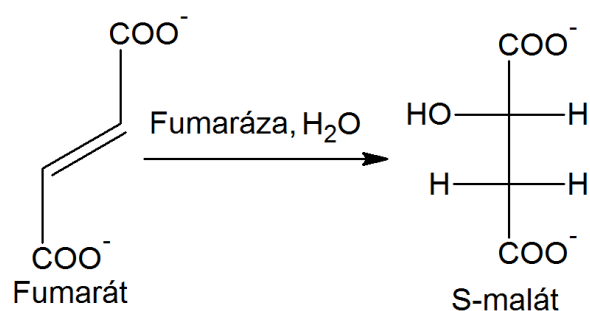
VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

VHL - protein „von Hippel-Lindau“

# Úvod

## 1.1 Fumaráthydratáza

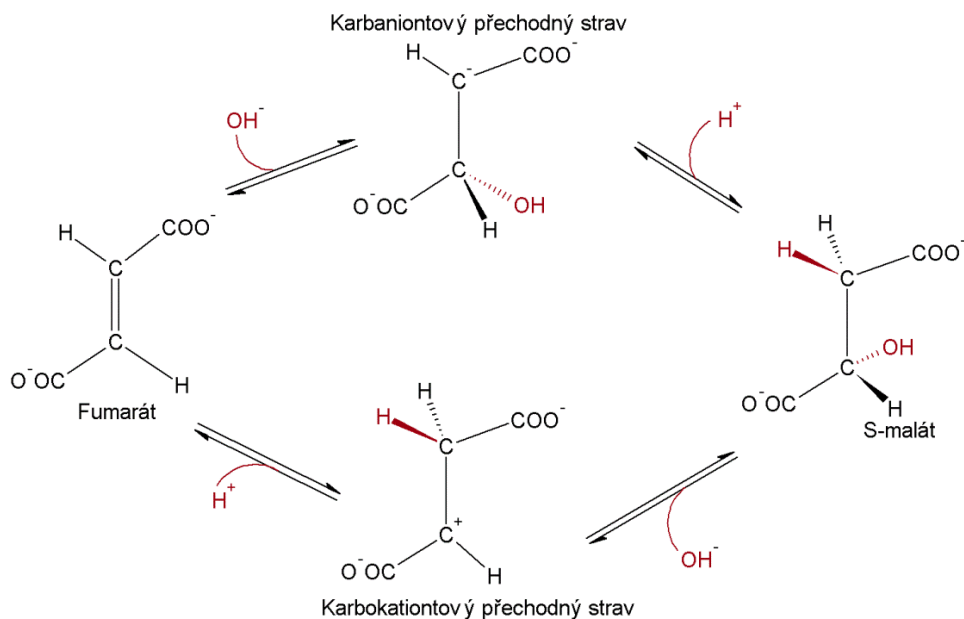
Fumaráthydratáza (fumaráza, EC 4.2.1.2) je enzym, který katalyzuje reverzibilní hydrataci fumarátu (dianiont kyseliny trans-butendiové) na S-malát (dianiont kyseliny hydroxybutandiové, někdy značen také jako L-malát), podle schématu na obrázku 1.1. [1-2].



Obrázek 1.1.: **Reakce katalyzovaná fumaráthydratázou (fumarázou).** S-malát je na obrázku zobrazen pomocí Fischerovy projekce.

Reakční mechanismus této reakce není úplně znám. První výzkumy naznačovaly, že vznik S-malátu z fumarátu vede přes tvorbu karbokationtu. Nejprve dochází k adici H<sup>+</sup> iontu na molekulu fumarátu za tvorby karbokationtu a až následně dochází k adici OH<sup>-</sup> skupiny a tak k vytvoření S-malátu (viz obrázek 1.2.) [3-4].

Další výzkum pak ukázal, že reakce běží přes karboaniontový intermediát (viz obrázek 1.2.). Tento mechanismus začíná adicí OH<sup>-</sup> iontu na molekulu fumarátu za vzniku karboaniontu, a následně dochází k adici H<sup>+</sup> iontu na tento karboaniont za tvorby S-malátu [4-5]. Tento výzkum a nová interpretace prvních provedených pokusů se přiklání k tomu, že mechanismus této reakce skutečně probíhá přes karboaniont [4, 6].



**Obrázek 1.2.: Reakční mechanismus hydratace fumarátu na S-malát katalyzovaný fumarázou.** V horní části obrázku je znázorněna tvorba S-malátu z fumarátu přes karboniontový přechodový stav a v dolní části obrázku je znázorněna přes karbokationtový přechodový stav. Upraveno podle [4].

### 1.1.1 Třídy fumaráthydratázy

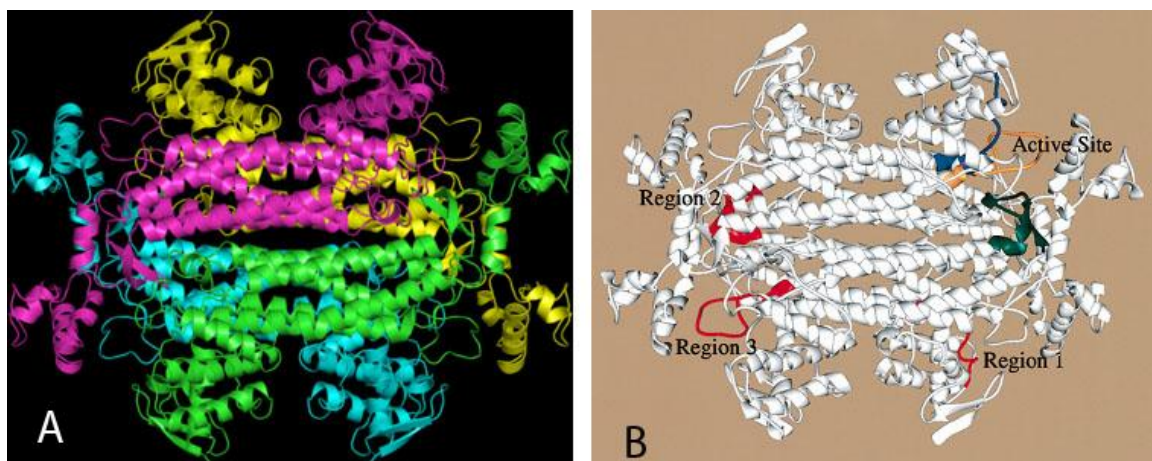
U prokaryontních organismů byly objeveny dvě třídy enzymu fumarázy především pomocí klonování a sekvenování genů fumarázy *Escherichia coli*. Tento organismus obsahuje tři geny pro tři enzymy fumarázy - fumarázy A a fumarázy B, které patří do enzymové třídy I, a fumarázy C patří do enzymové třídy II [7-13]. Klasifikace těchto tříd závisí na uspořádání jejich podjednotek, jejich závislostech na přítomnosti iontů kovů a na jejich tepelné stabilitě. Fumarázy třídy I a třídy II vykazují nízký stupeň sekvenční homologie (méně než 20%) [8, 14]. Zajímavé je, že fumaráza třídy II vykazuje výraznou homologii s enzymem aspartázou (např. 38% identických aminokyselin mezi fumarázou C *Escherichia coli* a aspartázou) [15].

Fumarázy třídy I (fumaráza A a fumaráza B) jsou homodimerní enzymy (molekulová hmotnost jedné podjednotky je 60 kDa), které ve své struktuře obsahují aniont síry ( $S^{II}$ ). Jedná se o enzymy, které jsou za podmínek vysokého množství kyslíku nebo vysoké teploty neaktivní [8, 12, 16]. U fumarázy A bylo nalezeno, že ještě obsahuje ionty  $Fe^{2+}$  [16-17].

Fumarázy třídy II jsou fumaráza C a další fumarázy nalezené také v *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* a savcích. Jedná se o termostabilní enzymy, které neobsahují

žádné ionty kovů. Aktivní forma těchto enzymů má strukturu homotetrametu (molekulová hmotnost jedné podjednotky je 48-50 kDa) [12].

Vyřešení krystalové struktury fumarázy kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (viz obrázek 1.3) ukázalo, že každý monomer tetrameru se skládá ze tří oblastí označených jako D1, D2 a D3. D1 leží na N-konci a D3 se nachází na C-konci polypeptidového řetězce. Centrální doména D2 se skládá z pěti alfa-helixů. Asociace domén D2 vede ke vzniku tetrameru s jádrem 20 alfa-helixů, které jsou téměř rovnoběžné. Aktivní místo fumarázy se nachází v prostoru mezi doménou D1 jedné podjednotky a doménou D3 druhé podjednotky. Toto aktivní místo také obsahuje tři regiony, značené čísly 1-3, které obsahují stejnou sekvenci aminokyselin jako další enzymy, které mají jako substrát fumarát (například aspartáza). Každý monomer obsahuje tyto tři regiony (viz obrázek 1.3.) [18].



**Obrázek 1.3.:** Kvartérní struktura fumaráthydratázy kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, převzato a upraveno z [18-19].

**A:** Podjednotková struktura fumaráthydratázy. Fumaráza se skládá ze čtyř stejných podjednotek asociovaných pomocí centrální domény D2 každé z podjednotek, která se skládá z pěti alfa-helixů. Vzniká tak jádro homotetrameru o 20 alfa-helixech, které jsou téměř rovnoběžné. Každá podjednotka dále obsahuje ještě doménu D1 na N-konci a doménu D3 na C-konci polypeptidového řetězce.

**B:** Kvartérní struktura fumaráthydratázy, na které je v horním pravém rohu vyznačeno aktivní místo enzymu. V tomto aktivním místě se nacházejí tři regiony značené čísly 1-3 (Region 1-fialová, region 2-zelená, region 3-žlutá). Tyto tři regiony bychom našli na každé podjednotce enzymu (vyznačeny červeně na jedné z podjednotek) a stejná sekvence aminokyselin se nachází i v dalších enzymech s fumarátem jako substrátem.

### 1.1.2 Cytosolická a mitochondriální fumaráthydratáza

U eukaryotních organismů se fumaráza nachází v mitochondriální matrix. Zde je součástí citrátového cyklu. Citrátový cyklus je jednou z hlavních součástí energetického metabolismu, také ale poskytuje intermediáty pro biosyntézu aminokyselin, porfyrinů, aj.

V citrátovém cyklu je rovnovážná reakce, kterou katalyzuje fumaráza, posunuta ve prospěch tvorby S-malátu, protože koncentrace fumarátu je stále vyšší než S-malátu díky neustálé tvorbě fumarátu v předchozím kroku a odčerpávání S-malátu v následujícím kroku citrátového cyklu [4].

Fumaráza ale byla u eukaryotních organismů nalezena i v cytosolu [20-22], kde také přeměňuje zde vznikající fumarát na S-malát. V cytosolu savčích buněk vzniká fumarát například při odbourávání skeletu některých aminokyselin, při odbourání amoniaku na močovinu nebo při syntéze purinových nukleotidů.

Ve většině organismů, včetně člověka a dalších savců, jsou tyto formy fumarázy (cytosolická a mitochondriální) kódovány jedním genem pro fumarázu (genem *FH*) [21, 23-25]. Mechanismus distribuce byl zkoumán u velmi málo organismů. A zdá se, že dvojí lokalizace fumarázy je dosaženo v různých organismech různými způsoby [26].

V savčích buňkách se předpokládá, že dvojí lokalizace fumarázy je zprostředkována dvěma translačními produkty genu pro fumarázu. Určení fumarázy jako mitochondriální je dáno přítomností signální sekvence na N-konci polypeptidového řetězce. Zatímco pokud polypeptidový řetězec tuto signální sekvenci neobsahuje, dojde k využití enzymu v cytosolu [26-27].

V lidských buňkách je gen *FH* lokalizován na chromosomu 1 (1q42.1). Tento gen obsahuje 10 exonů a kóduje protein o velikosti 510 aminokyselin včetně signální sekvence na N-konci polypeptidového řetězce.

## **1.2 Deficit fumaráthydratázy**

Fumarová acidurie (fumarázová deficience) je vzácná autozomálně recesivní porucha způsobená mutacemi v genu *FH*. Výrazně snížená aktivita fumarázy vede k hypotonii, mikrocefalii, opožděnému psychomotorickému vývoji jedince a výrazné akumulaci kyseliny fumarové v moči. Klinické projevy tohoto onemocnění se objevují během prvních týdnů života [28]. Poprvé byla popsána v osmdesátých letech minulého století [29-30].

## **1.3 Fumaráthydratáza jako tumorový supresor**

Kromě fumarové acidurie byly ještě nalezeny dva syndromy spojené s mutacemi v genu pro fumaráthydratázu. Jedná se o mnohonásobnou kožní a děložní leiomyomatózu („multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis“, MCUL1 nebo MCL) a dědičnou

leiomyomatózu a rakovinu ledvinných buněk („hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer“, HLRCC) [31-32]. Kožní leiomyomy jsou nádory vznikající z hladké svaloviny „vzpřimovače“ vlasu (*musculus erector pili*), obvykle do čtvrté dekády života na trupu a končetinách. Děložní leiomyomy jsou benigní nádory hladké svaloviny děložní stěny [33]. U pacientů s MCL a HLRCC byly nalezeny zárodečné heterozygotní mutace v genu *FH* a dále byla v nádorech těchto pacientů nalezena ztráta heterozygoty genu *FH*, což naznačuje, že se jedná o Knudsonův „two-hit“ model rozvoje tumoru [31-32]. Alfred G. Knudson formuloval teorii, že u některých genů není nezbytné pro rozvoj tumoru poškození pouze jedné alely daného genu, ale poškození obou alel genu („two-hit“) [34]. V nádorech a zdravé tkáni byly dále tyto genetické údaje potvrzeny odpovídajícím snížením aktivity fumarázy [31-32]. Zajímavá je skutečnost, že neexistuje žádný rozdíl ve spektru nalezených mutací u jedinců s MCL a s HLRCC. To naznačuje, že při vzniku náchylnosti k rakovině ledvin způsobené mutací v genu *FH* hrají roli jiné genetické nebo enviromentální faktory [35]. Poškození fumaráthydratázy bylo nalezeno i v jiných nádorech, jako je „ovarian mucinous cystadenoma“ [36], v nádorech Leydigových buněk [37], nebo „cerebral cavernoma“ [38].

Mechanismus rozvoje nádorů s deficitní fumarázovou aktivitou je zřejmě spojen s aktivací hypoxii indukujícího faktoru (HIF) [39]. Nádory související se sníženou aktivitou fumaráthydratázy vykazují zvýšenou expresi tohoto transkripčního faktoru - HIF [40-42]. Zvýšená aktivace HIF byla nalezena i v celé řadě dalších typů nádorů [43].

Aktivací HIF dochází k aktivaci hypoxemického metabolismu, což je spojeno s procesy probíhajícími při kancerogézi podporující růst nádoru, jako je například angiogeneze [39].

HIF je transkripční faktor, který kontroluje syntézu mnohých mRNA indukovaných v případě nízké koncentrace kyslíku v buňkách (hypoxie) [44-45]. HIF je funkční jako heterodimer, který se skládá z jedné nestabilní  $\alpha$ -podjednotky (HIF $\alpha$ ) a jedné stabilní  $\beta$ -podjednotky (HIF $\beta$ ). Byly objeveny tři  $\alpha$ -podjednotky a tři  $\beta$ -podjednotky [46-47].

Protože inaktivace fumaráthydratázy narušuje oxidační metabolismus mitochondrií, bylo předpokládáno, že sama porucha energetického metabolismu, může přispět přímo či nepřímo k aktivaci HIF [48]. V buňkách s nedostatkem sukcinátdehydrogenázy je aktivace HIF spojována se zvýšenou tvorbou volných kyslíkových radikálů (ROS) způsobenou špatnou funkcí mitochondrií [49]. Podobné mechanismy byly navrženy i pro buňky

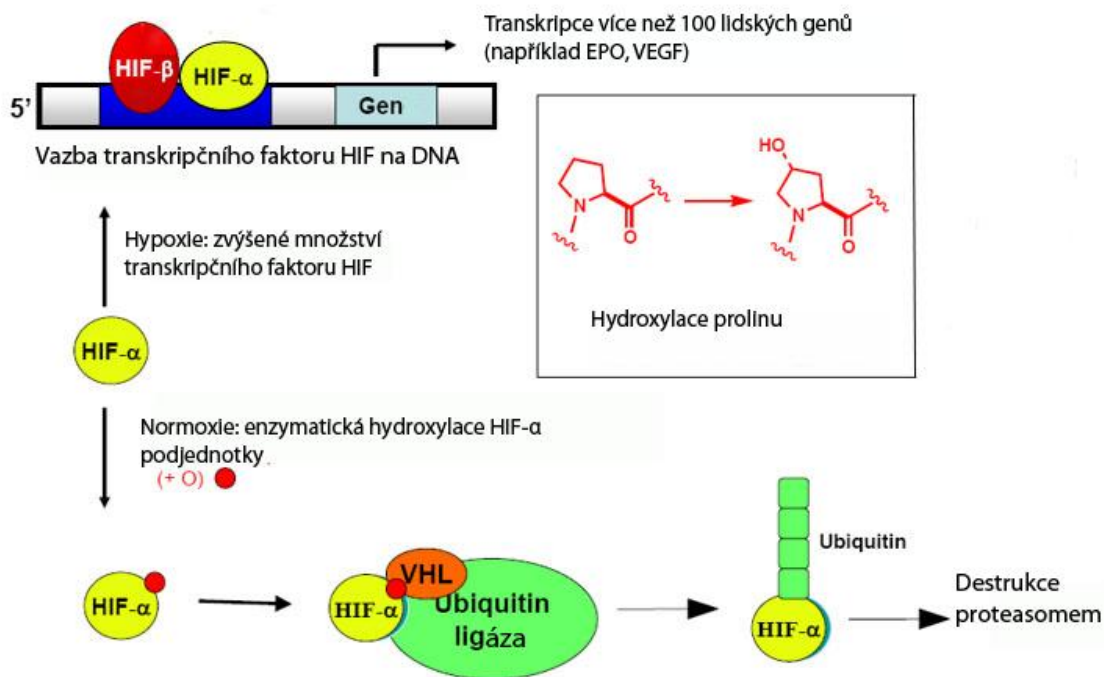
s nedostatkem fumaráthydratázy [50]. Zvýšená produkce ROS jako výsledek zvýšeného metabolismu glukózy byla také navržena jako možný příspěvek k aktivaci HIF v deficitu fumaráthydratázy [51]. Byl ale nalezen i mechanismus aktivace HIF v důsledku hromadění fumarátu v buňce. Zdá se tedy, že akumulace fumarátu sama o sobě je klíčovým krokem v rozvoji nádoru [40, 52-54].

V prostředí dostatečného množství kyslíku je podjednotka HIF $\alpha$  hydroxylována na jednom z prolinových zbytků. Tato hydroxylace je zprostředkována enzymy z rodiny HIF prolylhydrogenáz (HPH, proteiny obsahující PHD-prolylhydroxylázovou doménu), jejichž aktivita je regulována dostupností kyslíku [55-60]. Hydroxylovaná podjednotka HIF $\alpha$  je rozeznávána ubiquitinligázovým komplexem obsahujícím i protein zvaný „von Hippel-Lindau“, který HIF $\alpha$  označí (pomocí polyubiquitinace) a určí tak pro destrukci proteasomem [61-67]. V případě hypoxického stresu je tato aktivita enzymů HPH, které hydroxyloují podjednotku HIF $\alpha$ , snížena a to způsobí stabilitu podjednotky HIF $\alpha$  a umožní tak vznik transkripčního faktoru HIF (viz obrázek 1.4.) [68]. Jako senzor nedostatku kyslíku hrají roli i mitochondrie, které za nedostatku kyslíku zvyšují v buňce množství volných kyslíkových radikálů, které snižují aktivitu enzymů HPH a tím zvyšují stabilitu podjednotky HIF $\alpha$  [69-70].

Fumarát je kompetitivním inhibitorem prolylhydrogenáz HIF (HPH), které regulují množství a činnost podjednotek HIF. Akumulace fumarátu v buňce vede ke snížení aktivity těchto enzymů a tím dojde k zabránění hydroxylace podjednotky HIF $\alpha$ . Důsledkem je pak stabilita této podjednotky, která umožňuje vznik transkripčního faktoru HIF. Takže akumulace fumarátu navozuje pseudohypoxemický stav, což zřejmě přispívá k onkogenezi [40, 52-54].

Pokud by takovýto mechanismus aktivace HIF, jako důsledek hromadění fumarátu v buňce, byl klíčový v rozvoji nádoru, mohl by být tento mechanismus cílem terapeutického zásahu [54].

Je zajímavé, že gen pro enzym „von Hippel-Lindau“ funguje také jako tumorsupresorový gen [71].



**Obrázek 1.4. Regulace množství podjednotky HIF $\alpha$  a tím regulace transkripčního faktoru HIF**, převzato a upraveno z [72]. V prostředí dostatečného množství kyslíku je podjednotka HIF $\alpha$  hydroxylována enzymy z rodiny proteinů obsahující prolylhydroxylázovou doménu (PHD) na jednom z prolinových zbytků (v rámečku v pravém horním rohu je znázorněna hydroxylace tohoto prolinu). Hydroxylovaná HIF $\alpha$  je rozeznávána a označena (pomocí polyubiquitinace) pro destrukci proteasomem ubiquitinligázovým komplexem obsahujícím i protein zvaný „von Hippel-Lindau“. V prostředí nedostatku kyslíku je aktivita enzymů PHD snížena a to způsobí stabilitu podjednotky HIF $\alpha$  a umožní tak vznik transkripčního faktoru HIF, který indukuje syntézu mnohých mRNA, důležitých pro hypoxický metabolismus.



## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo v souboru 22 vzorků děložních leiomyomů od 22 pacientek ve věku 21-31 let stanovit aktivitu a množství fumaráthydratázy.

Specifickým cílem práce bylo:

- Stanovit vhodnou koncentraci proteinů pro spektrofotometrické měření aktivity fumaráthydratázy ve vzorcích děložních leiomyomů.
- Spektrofotometricky stanovit specifickou aktivitu fumaráthydratázy a citrátsyntázy jako kontrolního enzymu ve vzorcích děložních leiomyomů.
- Stanovit množství fumaráthydratázy a  $\beta$ -aktinu ve vzorcích děložních leiomyomů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), „Western blotu“ a imunodetekce.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

Soubor, včetně kontrolních vzorků, byl získán po informovaném souhlasu ve spolupráci s Gynekologicko-porodnickou klinikou 1 LF a VFN.

*Tabulka 3.1: Charakteristiky souboru pacientek a kontroly. Vzorky, u nichž nebyly měřeny specifické aktivity, jsou označeny ND.*

Leiomyom	Věk pacientky [roky]	Specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrát syntázy v lymfocytech [% kontroly]
kontrola	38	ND
1	24	90
2	27	72
3	30	78
4	31	84
6	27	53
7	29	ND
8	31	93
9	28	43
10	21	31
11	30	1
12	30	151
13	30	17,0
14	32	161
15	31	132
16	32	56
17	26	64
18	ND	135
19	29	18
20	31	30
21	22	77
22	27	121
23	26	ND

##### 3.1.1.1 Vzorky pacientů

22 děložních nádorů, histologicky určených jako leiomyomy, od pacientek ve věku 21-31 let (značené jako myom 1-4, 6-23). Vzorky byly před analýzou mrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C.

### 3.1.1.2 Kontrolní vzorek

Děložní nádor (histologicky určený jako leiomyom) od pacientky, jejíž věk byl 38 let (značený jako kontrola). Vzorek byl před analýzou mražen v tekutém dusíku a skladován při -80°C.

## 3.1.2 Chemikálie

### 3.1.2.1 Čisté chemikálie

Acetyl koenzym A, Sigma (USA)	Hydrogenuhlíčan sodný, Lachema (ČR)
Akrylamid, Sigma (USA)	Hydroxid sodný, Penta (ČR)
Bisakrylamid, Sigma (USA)	Chlorid sodný, Penta (ČR)
Bromfenolová modř, Sigma (USA)	Kyselina boritá, Penta (ČR)
Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma (USA)	Kyselina chlorovodíková, Penta (ČR)
Denaturovaný ethanol, Penta (ČR)	Kyselina octová, Penta (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta (ČR)	n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, Sigma (USA)
Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma (USA)	L-Malát, Sigma (USA)
5,5-dithiobis-2-nitrobenzoát (DTNB), Sigma (USA)	2-merkaptoethanol, Sigma (USA)
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma (USA)	Methanol, Penta (ČR)
Ethanol 96%, Penta (ČR)	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Sigma-Aldrich (USA)
Glycerol, Penta (ČR)	Oxalacetát, Sigma (USA)
Glycin, Sigma (USA)	Peroxosíran amonný, Sigma (USA)
Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma (USA)	Síran měďnatý, Penta (ČR)
	Propan-1-ol, Penta (ČR)
	Tricine, Sigma (USA)
	Tris, Sigma (USA)

Tween, Sigma (USA)

### 3.1.2.2 Roztoky a pufrы

#### Směsi připravené z chemikálií v laboratoři

Anodový pufr [100 mM Tris-HCl pH 8,9]

Barvicí roztok [0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová]

Gelový pufr [3 x koncentrován: 3 M Tris-HCl pH 8,45; 0,3 % (w/v) dodecylsulfát sodný]

Katodový pufr [100 mM Tris-HCl pH 8,25; 100 mM tricín; 0,1 % (w/v) dodecylsulfát sodný]

Odbarvovací roztok [25,5% (v/v) denaturovaný ethanol, 8% (v/v) kyselina octová]

„Radio-Immunoprecipitation Assay“ (RIPA) pufr [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid; 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 % (w/v) sodium deoxycholát; 0,1 % (w/v) dodecylsulfát sodný; 1 % (v/v) koktejl inhibitorů proteáz (PIC, od společnosti Roche )]

Roztok acetyl koenzymu A [10 mM acetyl koenzym A]

Roztok 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoátu) (DTNB) [1 M Tris-HCl pH 8,1; 1 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoát]

Roztok „KCl-Tris-EDTA-aprotinin“ (KTEA) pufr [150 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM kyselina ethylendiamintetraoctová; 0,002 mg/ml aprotinin]

Roztok Lowry A [0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]

Roztok Lowry B [0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub>]

Roztok Lowry C [1% (w/v) vínan sodnodraselný]

Roztok oxaloacetátu [0,1 M Tris-HCl pH 8,1; 10 mM oxaloacetát sodný]

„Tris-borate-EDTA“ (TBE) pufr [89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM kyselina

ethylendiamintetraoctová]

„Tris-buffered saline“ (TBS) pufr [20 mM Tris-HCl pH 7,5; 137 mM NaCl]

„Tris-buffered saline - tween“ (TBST) pufr [20 mM Tris-HCl pH 7,5; 137 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween]

Transferový pufr [25 mM Tris-HCl; 192 mM glycin; 10% (v/v) metanol; 0,02% (w/v) dodecylsulfát sodný]

Vzorkový pufr [4 x koncentrovaný: 50 mM Tris-Cl pH 6,8; 12 % (v/v) glycerol; 4 % (w/v) dodecylsulfát sodný; 2 % (v/v)  $\beta$ -merkaptoetanol; 0,01 % (w/v) bromfenolová modř]

### **Komerčně dodávané směsi**

Bradfordové reagens, Bio-Rad (USA)                      Sušené odtučněné mléko Laktimo, Promil (ČR)

Folinovo reagens, Sigma (USA)

Koktejl inhibitorů proteáz (PIC), Roche (Švýcarsko)

SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate, ThermoScientific (USA)

SeeBlue Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen (USA)

### **3.1.2.3 Protilátky**

Protilátka proti fumaráthydratáze („FH monoclonal antibody raised against full-length recombinant FH“), Abnova (Taiwan)

Protilátka proti králičím IgG konjugovaná s peroxidázou („anti-rabbit IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat“), Sigma-Aldrich (USA)

Protilátka proti myším IgG konjugovaná s peroxidázou („anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat“), Sigma-Aldrich (USA)

Protilátka proti  $\beta$ -aktinu („monoclonal antibody detects endogenous levels of total  $\beta$ -actin protein“), Cell Signaling (USA)

### **3.1.3 Použité přístroje**

Analytické váhy ABT 220-50M, Kern (Německo)

Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad (USA)

Automatické pipety Hermo Elektron (USA), Eppendorf (Německo), Gilson (USA)

Blotovací aparatura TE77X Semidry blotter, Hoefer (USA)

Centrifuga Biofuge 28RS Heraeus Sepatech (Německo)

Centrifuga mikro 200, Hettich Zentrifugen (Německo)

Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen (Německo)

Elektrforetický zdroj PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

Homogenizátor s teflonovým pístem typ: K2G7

Homogenizátor Ultra-turrax T8, IKA labortechnik (Německo)

pH metr 774, Metrohm (Švýcarsko)

Spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu (Japonsko)

Sušička gelů, Biometra (Německo)

System gelové dokumentace VersaDoc imaging systém, BioRad (USA)

Termoblok, LABNet, LABNet Int. (USA)

Třepačka Polymax 1040, Heidolph (Německo)

Vodní lázeň, Julabo (Německo)

Vortex, IKA (Německo)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Homogenizace vzorku**

Zmražená tkáň byla zvážena a bylo k ní přidáno takové množství vychlazeného roztoku KTEA, aby výsledný homogenát byl přibližně 5% (w/v).

Tkáň byla poté za stálého chlazení rozstříhána nůžkami na malé kousky (stříhnuto nejméně 50 x) a přenesena do vychlazené skleněné nádoby homogenizátoru. Směs byla homogenizována 3 x 15 s na homogenizátoru Ultra-turrax na stupeň 4 a poté 15 x homogenizována teflonovým pístem za neustálého chlazení. Takto připravený homogenát byl použit na přípravu vzorků pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného a na přípravu vzorků pro měření aktivity.

### **3.2.2 Stanovení aktivity enzymů fumaráthydratázy a citrátsyntázy**

#### **3.2.2.1 Stanovení koncentrace proteinu Lowryho metodou [73]**

Z homogenátu vzorku ředěného vodou v poměru 1:1 bylo odebráno 2 x 10 µl pro dvě nezávislá měření (výsledná koncentrace proteinu v daném vzorku poté byla vypočítána jako průměr těchto dvou měření). 10 µl ředěného homogenátu bylo doplněno destilovanou vodou na objem 200 µl. K takto připraveným vzorkům byl přidán 1 ml směsi, vzniklé smícháním zásobních roztoků Lowry A:B:C v poměru 48:1:1. Vzorky byly promíchány pomocí „vortexu“ a inkubovány při laboratorní teplotě 15 min. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 100 µl čerstvě ředěného Folinova reagens s destilovanou vodou v poměru 1:1, promícháno pomocí „vortexu“ a inkubováno při laboratorní teplotě 30 min. Následně byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru UV-2401PC při 700 nm.

Jako kalibrační křivka pro odečtení koncentrace proteinu byla použita koncentrační řada hovězího sérového albuminu: 5, 10, 15, 20, 25 µg.

#### **3.2.2.2 Solubilizace vzorku**

K 100 µl homogenátu bylo přidáno 10 µl 15% (w/v) laurylmaltosidu. Vzniklá směs byla inkubována 15 min na ledu. Poté byla směs centrifugována 2 min při 380 g a laboratorní teplotě. Následně byl odebrán supernatant, ve kterém byla zjištěna aktivita fumaráthydratázy a citrátsyntázy.

#### **3.2.2.3 Stanovení aktivity fumaráthydratázy upravená metoda podle Hilla [74]**

Nejprve byla zjištěna vhodná koncentrace proteinů pro stanovení aktivity fumaráthydratázy. Předem připravené roztoky  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1M, upravený na pH 7,4 pomocí NaOH), S-malátu (0,5M, upravený na pH 7,4 pomocí NaOH) a destilovaná voda, stejně jako kyvetový prostor spektrofotometru UV-2401PC, byly temperovány na 37 °C. Do kyvety bylo pipetováno v daném pořadí: 50 µl roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 µl roztoku S-malátu,

takové množství vody, aby s objemem nakonec přidaného vzorku tvořilo objem 400  $\mu\text{l}$  a kontrolní vzorek leiomyomu. Výsledný objem v kyvetě byl 0,5 ml. Směs byla promíchána pomocí ploché plastové tyčinky a následně byla měřena její absorbance při 250 nm po dobu 5 min. Postupně bylo množství přidaného vzorku měněno tak, aby množství proteinu v kyvetě bylo: 5, 10, 25, 75, 100  $\mu\text{g}$ . Ze závislosti změny absorbance na množství proteinu (viz obrázek 4.1., str. 18) byl hledán úsek, kde je závislost lineární. Jako nejvhodnější rozmezí bylo vybráno 40-70  $\mu\text{g}$  proteinu/ objem reakční směsi.

Aktivita fumaráthydratázy ve 22 vzorcích leiomyomů byla stanovena výše uvedeným postupem. Do kyvety bylo přidáváno 10-50  $\mu\text{l}$  vzorku podle jeho koncentrace tak, aby množství proteinu v kyvetě bylo 40-70  $\mu\text{g}$ .

Aktivita byla vypočítána podle vzorce:

$$A [\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{\Delta A [\text{min}] V [\text{ml}]}{V_{\text{vzorek}} [\mu\text{l}] c_{\text{vzorek}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \varepsilon_{250 \text{ nm}} [\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}]} \cdot 10^6$$

$\Delta A$  – změna absorbance

$V$  – objem reakční směsi

$V_{\text{vzorek}}$  – objem přidaného vzorku

$c_{\text{vzorek}}$  – koncentrace přidaného vzorku

$\varepsilon_{250 \text{ nm}, \text{ fumarát}}$  – molární absorpční koeficient fumarátu = 4,88  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$

$d$  – délka kyvety = 1 cm

#### 3.2.2.4 Stanovení aktivity citrát syntázy upravená metoda podle Srere [75]

Předem připravené roztoky 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoátu) (1 mM), acetyl CoA (10 mM), čerstvě připravený roztok oxaloacetátu (10 mM) a destilovaná voda, stejně jako kyvetový prostor spektrofotometru UV-2401PC, byly temperovány na 37 °C. Do kyvety bylo pipetováno v daném pořadí: 100  $\mu\text{l}$  roztoku 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoátu), 50  $\mu\text{l}$  roztoku acetyl CoA, příslušné množství vody (tvořící se vzorkem objem 800  $\mu\text{l}$ ) a 30-50  $\mu\text{l}$  vzorku podle jeho koncentrace tak, aby množství proteinu v kyvetě bylo 60-120  $\mu\text{g}$ . Výsledný objem v kyvetě byl 950  $\mu\text{l}$ . Toto množství bylo zvoleno na základě protokolu vytvořeného Laboratoří pro studium mitochondriálních poruch (Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN). Směs byla promíchána pomocí ploché plastové tyčinky



a následně bylo měřeno pozadí při 412 nm po dobu 2 min. Poté bylo do kyvety přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku oxaloacetátu (objem v kyvetě byl 1 ml) a opět byla měřena její absorbance při 412 nm po dobu 2 min.

Aktivita byla vypočítána podle vzorce:

$$A [\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{\Delta A [\text{min}] V [\text{ml}]}{V_{\text{vzorek}} [\mu\text{l}] C_{\text{vzorek}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \epsilon_{250 \text{ nm}} [\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}]} \cdot 10^6$$

$\Delta A$  – změna absorbance za jednu minutu

V – objem reakční směsi

$V_{\text{vzorek}}$  – objem přidaného vzorku

$C_{\text{vzorek}}$  – koncentrace přidaného vzorku

$\epsilon_{250 \text{ nm}, \text{TNB}}$  – molární absorpční koeficient 5-thio-2-nitrobenzoové

$$\text{kyseliny} = 13,6 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$$

d – délka kyvety = 1 cm

### **3.2.3 Analýza množství fumaráthydratázy pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), „Western blotu“ a imunodetekce**

#### **3.2.3.1 Příprava buněčného lyzátu**

500  $\mu\text{l}$  připraveného homogenátu bylo centrifugováno 10 min při 15 000g a 4 °C. Následně byl odebrán supernatant a k získané peletě byl přidán 2 x větší objem pufru RIPA, než byl objem pelety. Směs byla inkubována 20 min na ledu a během inkubace byla 3 x promíchána pomocí „vortexu“. Následně byla směs centrifugována 20 min při 51 000g a 4 °C. Supernatant, obsahující buněčný lyzát, byl následně použit na přípravu vzorků aplikovaných na gel, případně skladován při -80 °C.

#### **3.2.3.2 Stanovení koncentrace proteinu metodu podle Bradfordové [76]**

Z každého vzorku buněčného lyzátu bylo odebráno 2 x 2  $\mu\text{l}$  a 2 x 3  $\mu\text{l}$  na čtyři nezávislá měření. 2  $\mu\text{l}$  (respektive 3  $\mu\text{l}$ ) homogenátu bylo doplněno na objem 800  $\mu\text{l}$  (výsledná koncentrace poté byla vypočítána jako průměr těchto čtyř měření). K takto připraveným

vzorkům bylo přidáno 200 µl Bradfordova reagens, promícháno pomocí „vortexu“ a inkubováno 10 min na ledu. Poté byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru UV-2401PC při 595 nm. Jako kalibrační křivka pro určení koncentrace proteinu byla použita koncentrační řada hovězího sérového albuminu: 1, 2, 3, 4, 5 µg/µl.

### 3.2.3.3 Příprava vzorku aplikovaného na gel

30 µg proteinu buněčného lyzátu bylo promícháno se vzorkovým pufrém v poměru 4:1 (v/v). Pro kontrolní vzorek byly připravovány tři druhy „nanášek“ o obsahu proteinů 7,5 µg; 15 µg; a 30 µg. Směs byla zahřívána na 37 °C po dobu 30 min a poté nanášena na gel.

### 3.2.3.4 Příprava gelu

Byl připraven dvouvrstvý polyakrylamidový gel (4% zaostřovací gel, 12% separační gel), složení je uvedeno v tabulce 3.1. Polymerace separačního gelu probíhala 1 h při laboratorní teplotě pod převrstvením destilovanou vodou a zaostřovací gel polymeroval 30 min při laboratorní teplotě.

*Tabulka 3.2.: Složení gelu použitého pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného.*

Složka	Množství [ml]	
	4 % gel	12 % gel
<b>Zásobní roztok akrylamidu a bisakrylamidu (48% akrylamid; 1,5% bisakrylamid)</b>	0,8	2,4
<b>Gelový pufr (3 x koncentrovaný)</b>	3,33	3,33
<b>Destilovaná voda</b>	5,8	4,2
<b>APS 10%</b>	0,12	0,05
<b>TEMED</b>	0,012	0,005
<b>Celkový objem</b>	10,062	9,985

### 3.2.3.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného

Po promytí jamek bylo do první jamky aplikováno 4 µl žebříčku molekulových hmotností (SeeBlue Plus 2 Prestained Standard), do následujících třech jamek byla nanášena kontrola, v množství proteinu v jednotlivých jamkách v pořadí 7,5 µg; 15 µg; a 30 µg (značeno jako kontrola 25%, kontrola 50% a kontrola 100%). Do zbylých jamek byly

aplikovány připravené vzorky, množství proteinu v každé jamce bylo 30 µg. Elektroforéza probíhala za laboratorní teploty a následujících podmínek: 40 V cca 20 min a 100 V 2,5 h.

### **3.2.3.6 „Western blot“**

Po ukončení elektroforézy byla odstraněna vrstva zaostřovacího gelu a vrstva koncentračního gelu byla inkubována v transferovém pufru 30 min na 3D třepače. Polyvinyliden difluoridová membrána (Immobilon-P, Milipore, USA) o rozměrech gelu byla aktivována 15 s v methanolu, poté 2 min hydratována v destilované vodě a nakonec 15 min ekvilibrována v transferovém pufru.

Na anodě byly naskládány na sebe v daném pořadí: 3 kusy filtračních papírů Whatman o rozměrech gelu, membrána, gel a 3 kusy filtračních papírů Whatman. Všechny složky byly při skládání dostatečně nasáklé transférovým pufrem. Poté byly z vzniklého „sendviče“ pomocí skleněné tyčinky vytlačeny vzduchové bubliny. „Sendvič“ byl přikryt katodou, která byla předtím opláchnuta destilovanou vodou. Přenos probíhal 1 h při uvedeném napětí: [(obsah povrchu gelu) x 0,6] mA.

Po ukončení přenosu byl „sendvič“ rozebrán a polyvinyliden difluoridová membrána usušena volně na vzduchu za laboratorní teploty. Pro vizuální kontrolu kvality přenosu byl gel inkubován v barvicím roztoku přes noc třepat na 3D třepače a druhý den odbarven odbarvovacím roztokem. Následně byl gel vložen na cca 1 min do destilované vody (kvůli omytí odbarvovacího roztoku) a usušen na sušičce gelů.

### **3.2.3.7 Imunodetekce**

Usušená polyvinyliden difluoridová membrána byla aktivována 15 s v methanolu a poté přemístěna do destilované vody, kde byla ponechána v klidu na laboratorním stole 5 min. Poté byla voda vylita a byl přidán TBS pufr na 10 min. Mezitím byl připraven blokovací roztok suspendováním 2,5 g sušeného mléka v 50 ml TBS pufru [5% (w/v) roztok mléka]. Poté byl odstraněn TBS pufr a bylo přidáno 50 ml připraveného blokovacího roztoku, membrána byla takto inkubována za laboratorní teploty a třepána na 3D třepače 2 h.

Všechny následující inkubace a omývání byly prováděny na 3D třepače při laboratorní teplotě. Po ukončení blokování byl vylit blokovací roztok a membrána byla omyta TBS pufrem 3 x za sebou po dobu 10 min. Následně byla membrána inkubována 2 h v roztoku primární protilátky. Roztok primární protilátky byl připraven následovně: 0,4 g sušeného mléka bylo suspendováno ve 20 ml TBST pufru [2% (w/v) roztok mléka], dále byla

přidána protilátka: 4  $\mu$ l protilátky proti fumaráthydratáze (ředěna 1:5000), 15  $\mu$ l protilátky proti  $\beta$ -aktinu (ředěna 1:1333). Připravený roztok protilátky byl použit vícekrát a byl skladován při -20 °C. Po inkubaci v roztoku primární protilátky byla membrána opláchnuta TBST pufrem 3 x za sebou po dobu 10 min. Následně byla membrána inkubována 1 h v roztoku sekundární protilátky. Roztok sekundární protilátky byl připraven přidáním protilátky (12  $\mu$ l „anti-mouse IgG-peroxidase antibody produced in goat“, 10  $\mu$ l „anti-rabbit IgG-peroxidase antibody produced in goat“) do 2% roztoku mléka (0,4 g sušeného mléka rozpuštěného ve 20 ml TBST pufre).

Poté byla membrána opláchnuta 3 x TBST pufrem a 1 x TBS pufrem vždy po dobu 10 min.

Následně byla detekce proteinů provedena chemiluminiscencí, na membránu položenou na transparentní fólii byla nanášena směs substrátu pro peroxidázu (SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate, od společnosti ThermoScientific). Směs byla připravena smícháním dvou přiložených roztoků v komerčně dodávaném kitu v poměru 1:1. Fólie s membránou byla umístěna do komory přístroje VersaDoc 4000, kde byla vyfocena při vhodném expozičním čase pomocí programu Quantity One (od společnosti BioRad).

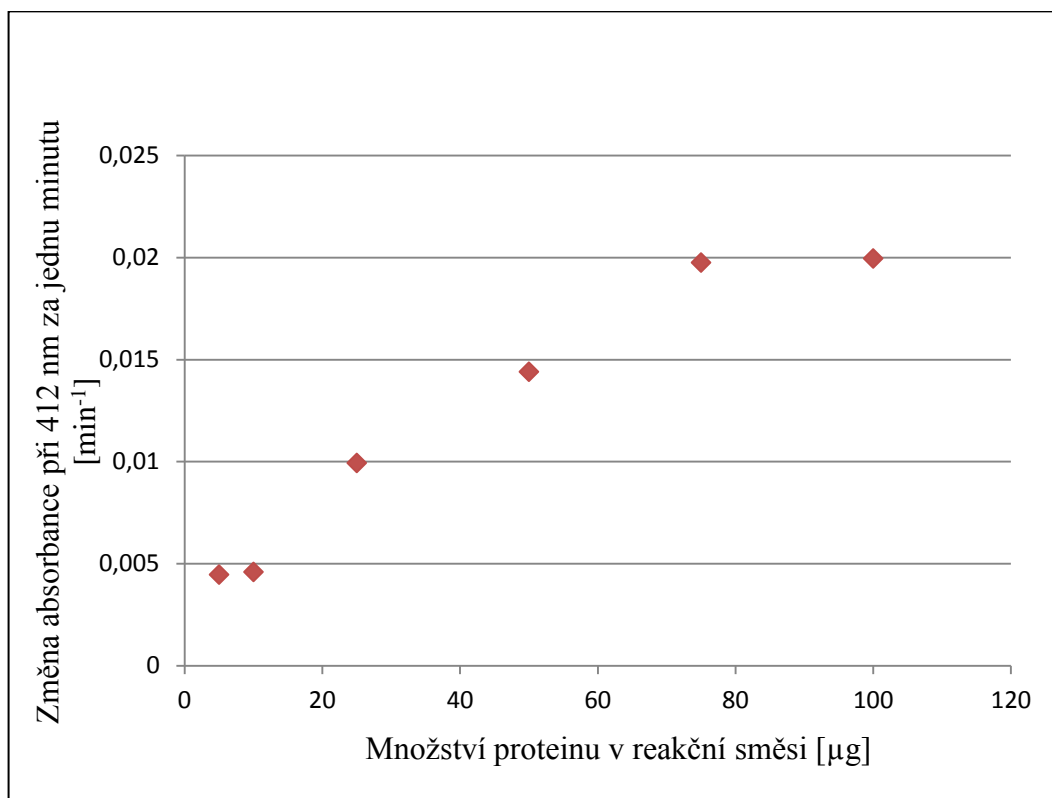
## 4 Výsledky

### 4.1 Aktivita a množství fumaráthydratázy

V souboru 22 vzorků děložních leiomyomů od pacientek ve věku 21-31 let, byla stanovena aktivita a množství fumaráthydratázy. Jako kontrolní vzorek byl použit děložní leiomyom od pacientky, jejíž věk byl vyšší (let 38, značený jako kontrola).

#### 4.1.1 Optimalizace měření aktivity fumaráthydratázy

Pro stanovení aktivity fumaráthydratázy v děložním leiomyomu bylo nutné optimalizovat vstupní množství proteinu použitého v reakci specifické pro danou tkáň. Bylo hledáno takové rozmezí množství proteinu v kvěťě, při kterém je hodnota specifické aktivity nezávislá na koncentraci proteinu. Byla měřena aktivita fumaráthydratázy při různých množstvích proteinu v reakční směsi. Ze závislosti změny absorbance na množství proteinu (viz obrázek 4.1.) byl hledán úsek, kde je závislost lineární. Jako nejvhodnější rozmezí bylo vybráno 40-70  $\mu\text{g}$  proteinu/objem reakční směsi.



Obrázek 4.1. Závislost aktivity fumaráthydratázy na koncentraci proteinu ve vzorku kontrolního děložního leiomyomu.

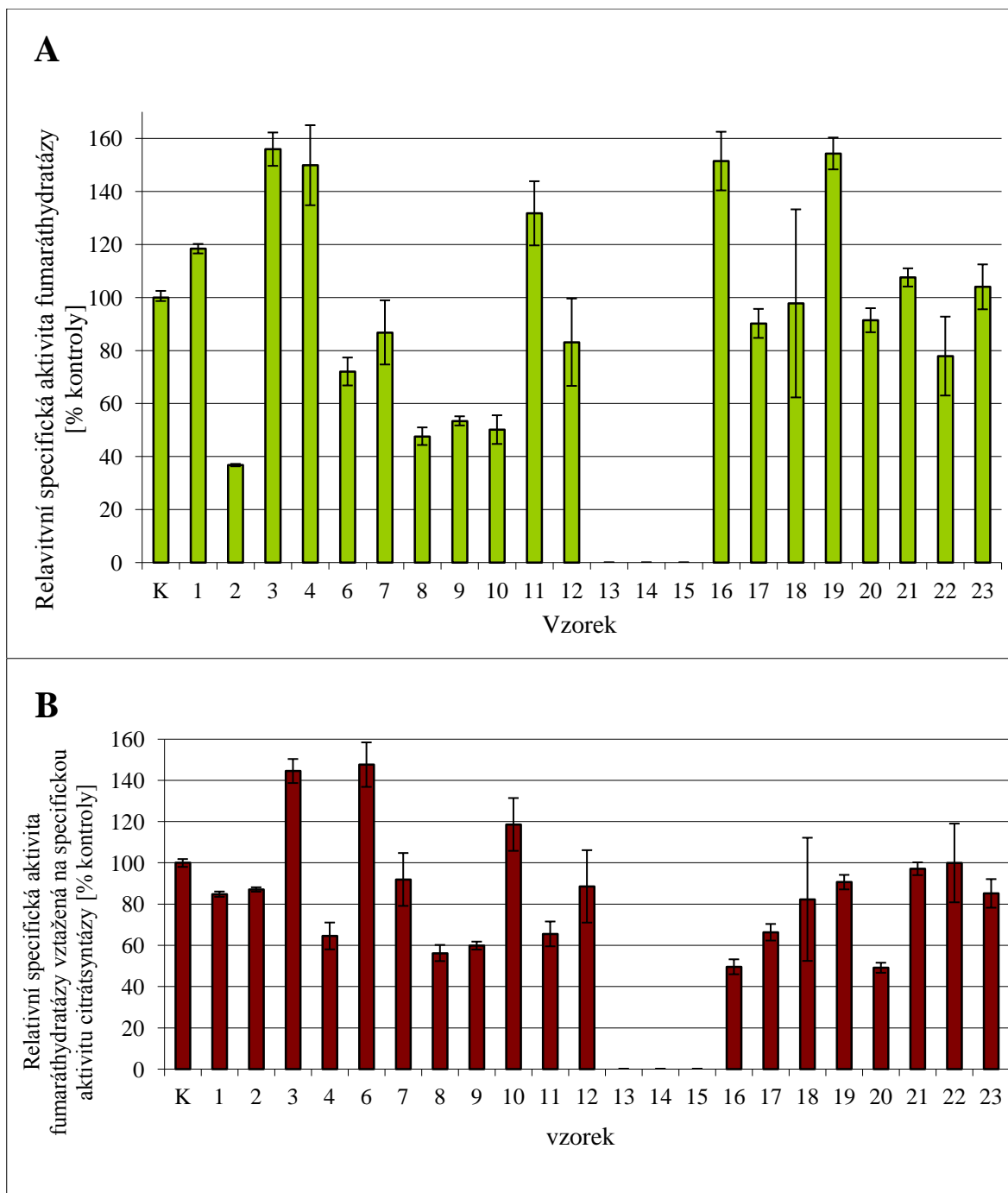
#### 4.1.2 Aktivita fumaráthydratázy

V 22 vzorcích leiomyomů byla stanovena specifická aktivita fumaráthydratázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy. Hodnoty specifické aktivity fumaráthydratázy citrátsyntázy jsou uvedeny v tabulce 4.1. Specifická aktivita fumaráthydratázy a specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy jsou znázorněny na obrázku 4.2.

*Tabulka 4.1.: Hodnoty specifické aktivity fumaráthydratázy, citrátsyntázy a jejich poměru.*

vzorek	Specifická aktivita [nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> ]*		Poměr specifických aktivit: fumaráthydratáza/citrátsyntáza
	fumaráthydratáza	citrátsyntáza	
<b>Kontrola</b>	29,4	42,9	0,69
<b>1</b>	34,8	59,5	0,59
<b>2</b>	10,8	18,0	0,60
<b>3</b>	45,8	46,0	1,00
<b>4</b>	44,1	99,0	0,45
<b>6</b>	21,2	20,8	1,02
<b>7</b>	25,5	40,2	0,63
<b>8</b>	14,0	36,1	0,39
<b>9</b>	15,7	38,0	0,39
<b>10</b>	14,7	18,0	0,78
<b>11</b>	38,7	85,7	0,45
<b>12</b>	24,4	40,0	0,61
<b>13</b>	0,0	0,0	0,00
<b>14</b>	0,0	3,5	0,00
<b>15</b>	0,0	0,0	0,00
<b>16</b>	44,5	130,1	0,34
<b>17</b>	26,5	57,9	0,46
<b>18</b>	28,7	50,6	0,57
<b>19</b>	45,4	72,5	0,61
<b>20</b>	26,9	79,3	0,34
<b>21</b>	31,6	47,2	0,67
<b>22</b>	22,9	33,2	0,69
<b>23</b>	30,6	52,0	0,59

\*hodnoty průměru ze 2 měření



Obrázek 4.2.: *Specifická aktivita fumaráthydratázy (obrázek A) a specifická aktivita fumaráthydratázy vztahovaná na specifickou aktivitu citrát syntázy (obrázek B). Na obrázku jsou vzorky leiomyomů vyznačeny příslušným číslem leiomyomu. Kontrolní leiomyom je na obrázcích vyznačen jako K.*

Ve vzorcích 13-15 nebyla aktivita fumaráthydratázy vůbec detekována. Aktivita citrát syntázy byla v těchto vzorcích také na hranici detekce použité metody.

Bylo zjištěno, že aktivita fumarázy v lymfocytech od rodičů pacientů s fumarovou acidurií (heterozygoti pro patogenní mutaci v genu *FH*) se pohybuje v rozmezí 40-60 % kontrolních

hodnot (nepublikovaná data RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a spol., Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN). Vzhledem k tomuto faktu, a také k heterogenitě tkání různých leiomyomů, bylo za významné snížení specifické aktivity fumarázy v daném vzorku leiomyomu považováno snížení nejméně na 60 % specifické aktivity kontrolního leiomyomu.

Ke snížení specifické aktivity fumarázy pod 60 % kontroly došlo, jak je vidět z obrázku 4.2. A, ve vzorcích: 2, 8, 9 a 10. K největšímu snížení specifické aktivity vůči kontrole došlo ve vzorku 2, kde byla specifická aktivita fumarázy 37 % kontroly. U vzorků 8-10 byla specifická aktivita fumarázy 47-53 % kontroly.

Snížení poměru specifických aktivit fumarázy a citrát syntázy pod 60 % kontroly je patrné (viz obrázek 4.2. B) ve vzorcích 8, 9, 16 a 20. V těchto vzorcích je poměr specifických aktivit mezi 50 a 60 %. Ve vzorcích 16 a 20 byl poměr specifických aktivit cca 50 % kontroly, zatímco ve vzorcích 8 a 9 byl poměr o něco vyšší, blížil se 60 % kontroly.

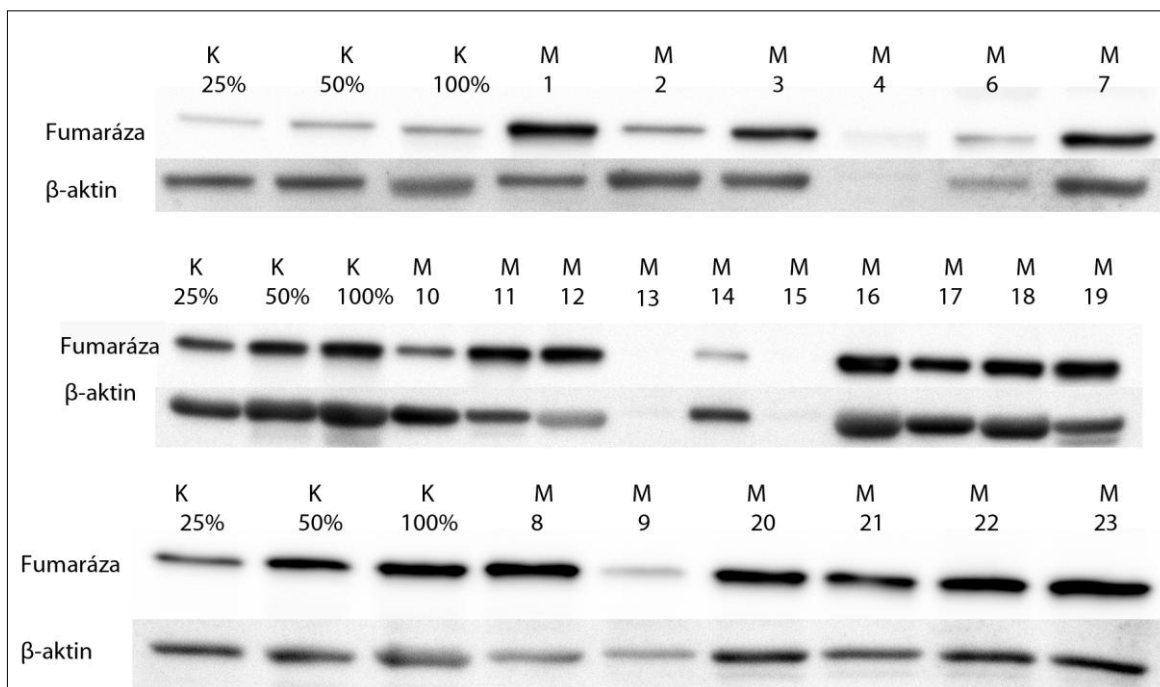
Snížení poměru specifických aktivit je patrné také ve vzorcích 4, 11 a 17, zde je ale snížení menší: 65-70 % kontroly.

### **4.1.3 Množství fumaráthydratázy**

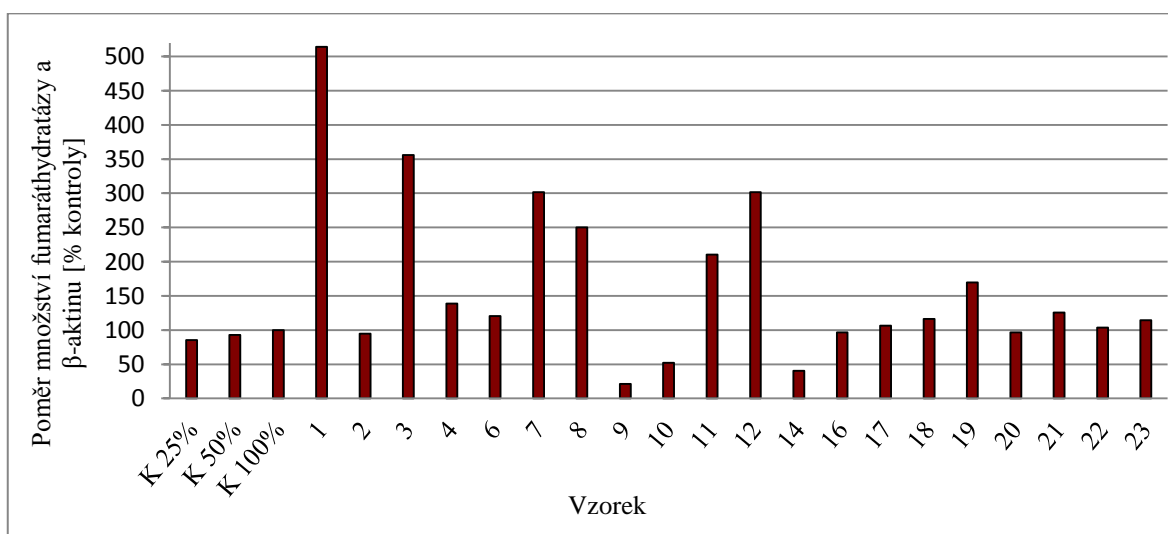
30  $\mu$ g buněčného lyzátu bylo separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), fumaráthydratáza byla detekována pomocí „Western blotu“ s následnou imunodetekcí. Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel byl použit protein  $\beta$ -aktin (viz obrázek 4.3). Pro vyhodnocení intenzity signálu byl použit program AlhaEaseFC Stand Alone (Alpha Innotech). Intenzita signálu fumaráthydratázy byla vztažena na intenzitu signálu  $\beta$ -aktinu (graficky znázorněno na obrázku 4.4.).

Jak je patrné ze signálu odpovídajícímu kontrolnímu proteinu  $\beta$ -aktinu (viz obrázek 4.3) jeho množství v jednotlivých vzorcích bylo odlišné, přestože množství proteinu nanášeného na gel bylo stejné. To je zřejmě způsobeno heterogenitou tkáně v různých vzorcích leiomyomů (jiný poměr buněk a vaziva). U vzorků 13 a 15 byla intenzita signálu fumarázy a  $\beta$ -aktinu na hranici detekce použité metody a proto jejich intenzita nebyla vyhodnocována.





Obrázek 4.3. Stanovení množství fumaráthydratázy pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a “Western blotu” s následnou imunodetekcí. Na obrázcích jsou vzorky leiomyomů vyznačeny: M a příslušné číslo leiomyomu. Kontrolní leiomyom je na obrázcích vyznačen jako K 25%, K 50% a K 100%.



Obrázek 4.4. Poměr množství fumaráthydratázy a β-aktinu v procentech. Na obrázku jsou vzorky leiomyomů vyznačeny příslušným číslem leiomyomu. Kontrolní leiomyom je na obrázcích vyznačen jako K 25%, K 50% a K 100%.

Z obrázku 4.4. je vidět, že výrazné snížení množství fumarázy vztahované na množství β-aktinu je detekováno ve vzorcích 9, 10 a 14. K největšímu snížení poměru množství fumarázy a β-aktinu vůči kontrole došlo ve vzorku 9, kde byl poměr 22 % poměru kontroly. U vzorků 10 a 14 byl poměr snížen méně - na 52 % kontroly (vzorek 10) a 41 %

kontroly (vzorek 14). Pouze minimální snížení poměru množství fumarázy a  $\beta$ -aktinu (na 95-97 % kontroly) bylo detekováno ve vzorcích 2, 16 a 20.

#### 4.1.4 Přehled vzorků leiomyomů se sníženým množstvím fumaráthydratázy a aktivity fumaráthydratázy

Vzorek 14 nebyl do vyhodnocování zahrnut, i když v něm bylo nalezeno snížené množství fumaráthydratázy, z důvodu nekrotického poškození tkáně.

Jak výrazné snížení aktivity (60% kontroly), tak i množství fumaráthydratázy (21% kontroly) bylo nalezeno pouze u jednoho vzorku a to vzorku číslo 9. V lymfocytech této pacientky byla nalezena také snížená aktivita fumaráthydratázy (viz tabulka 4.2).

*Tabulka 4.2.: Přehled vzorků se sníženým množstvím fumaráthydratázy a aktivity fumaráthydratázy v děložních leiomyomech a aktivita stanovená v lymfocytech těchto pacientů.*

Leiomyom	Specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy v leiomyomu [% kontroly]	Specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy v lymfocytech [% kontroly] *	Množství fumaráthydratázy v leiomyomu [% kontroly]
2	87	72	95
<b>9</b>	<b>60</b>	<b>43</b>	<b>21</b>
10	118	31	52
16	50	56	96
20	49	30	96

\* Specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy stanovená v lymfocytech těchto pacientek kolegy z Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch (Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN).

## 5 Diskuze

Děložní leiomyomy jsou benigní nádory hladké svaloviny děložní stěny. Jsou nejčastějšími nádory ženského reprodukčního ústrojí [77].

Příčiny růstu a vývoje děložních leiomyomů zůstávají do značné míry neznámy, i když genetická závislost byla doložena různými epidemiologickými, molekulárně-genetickými a cytogenetickými studiemi. Analýzy ukazují, že první příbuzní žen postižených děložními leiomyomy mají 2,5-krát vyšší riziko vzniku děložního leiomyomu a poměr šancí se zvýší na 5,7 po výběru žen s nástupem onemocnění v dřívějším věku [33]. Nalezeny byly i rodiny s vyšším výskytem počtu žen s děložními leiomyomy [78]. Další důkaz o genetické závislosti choroby je objev dvou vzácných autozomálně dominantních syndromů - mnohonásobná kožní a děložní leiomyomatóza a dědičná leiomyomatóza a rakovina ledvinných buněk [33]. V lymfoblastech těchto pacientů byla nalezena snížená aktivita fumaráthydratázy jako důsledek zárodečné mutace *FH* a ve většině kožních a děložních leiomyomů těchto pacientů byla nalezena ztráta heterozygoty genu *FH* podporující teorii, že se jedná o Knudsonův „two-hit“ model rozvoje tumoru. V nádorech byly dále tyto genetické údaje potvrzeny odpovídajícím snížením aktivity fumarázy [31-32]. Studie Stewarta a jeho spolupracovníků [79] také poskytuje důkazy, že ženy se zárodečnou mutací v *FH* a s klinickými HLRCC mají zvýšené riziko vývoje děložních leiomyomů. Střední věk výskytu děložního leiomyomu u žen, u kterých byla nalezena mutace fumaráthydratázy (28 let), byl podstatně nižší než u žen, u kterých nebyla nalezena mutace fumaráthydratázy (38 let) [79].

Cílem bakalářské práce bylo v souboru 22 vzorků děložních leiomyomů od pacientek ve věku 21-31 let, které nemají diagnostikováno HLRCC ani MCL, stanovit množství a aktivitu fumaráthydratázy. Jako kontrolní vzorek byl použit děložní leiomyom od pacientky, jejíž věk byl vyšší, než věk pacientek ve studovaném souboru (let 38).

Vzorky 13-15 nebyly do vyhodnocování zahrnuty, protože aktivita fumaráthydratázy ani citrátsyntázy nebyla vůbec detekována. Množství fumarázy a  $\beta$ -aktinu bylo velmi nízké nebo na hranici detekce použité metody a v tkáních těchto tří vzorků leiomyomů byly navíc patrné známky nekrózy (dle dostupných výsledků histologického vyšetření). Zdá se

tedy, že se jednalo o poškozené tkáně, a nejspíše je tedy nulová aktivita a snížené množství fumaráthydratázy v těchto vzorcích způsobena rozsáhlým poškozením těchto tkání.

Skutečnost, že ve vzorcích 2 a 10 byla snížená specifická aktivita fumarázy i specifická aktivita citrát syntázy (viz obrázek 4.2 str. 26), takže výsledný poměr specifických aktivit byl srovnatelný nebo dokonce vyšší než u kontrolního vzorku, se zdá být způsobená heterogenitou tkáně. Zřejmě byl v těchto tkáních jiný poměr buněk a vaziva než v kontrolním vzorku, a tak bylo do reakce přidáno menší množství obsahu buněk než v případě kontrolního vzorku. Vzorek 10 ještě vykazuje výrazné snížení množství fumarázy (viz obrázek 4.4 str. 28). Snížení množství fumarázy a specifických aktivit ve vzorku by mohlo být také dáno menším množství mitochondriálních proteinů ve vzorku.

Fakt, že ve vzorcích 16 a 20 je poměr specifických aktivit redukován pod 60 % kontroly, přestože specifická aktivita fumarázy ve vzorcích snížena nebyla (viz obrázek 4.2 str. 26), je zřejmě způsoben heterogenitou tkáně (jiný poměr buněk a vaziva v těchto tkáních než v kontrolním vzorku). Pokles množství fumarázy byl sice v těchto vzorcích detekován (viz obrázek 4.4 str. 28), ale jednalo se o pokles malý (96 % kontroly). Příčina snížení poměru specifické aktivity fumarázy a citrát syntázy ve vzorcích mohla být částečně dána snížením jejího množství. Takovýto pokles aktivity se zdá být způsoben spíše poškozením nativní struktury tohoto enzymu v tkáni jako důsledek poškození tkáně samotné než poškozením genu *FH*.

Ve vzorcích 8 a 9 byla specifická aktivita fumarázy zmenšena na cca polovinu, zatímco specifická aktivita citrát syntázy byla téměř srovnatelná s kontrolním vzorkem (viz obrázek 4.2 str. 26). Výsledný poměr specifických aktivit fumarázy a citrát syntázy je tedy 55-60 % poměru specifických aktivit kontrolního vzorku. Takovéto snížení aktivity fumarázy by bylo očekáváno v případě mutace jedné z alel genu *FH* v tkáni (nepublikovaná data RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a spol., Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN).

Ve vzorku 9 je dále patrné i snížení množství fumarázy (viz obrázek 4.4 str. 28). Jedná se tedy o vzorek leiomyomu, ve kterém je podezření na specifické poškození fumarázy v leiomyomu. Ověření tohoto předpokladu bude předmětem dalšího výzkumu. U vzorku 9 byla mými kolegy již vyloučena germinální mutace v exonech genu *FH* pomocí sekvenční analýzy v lymfocytech pacientky. Je možné, že mutace je pouze v nádorové

tkáni, a proto by bylo vhodné analyzovat mutace v exonech fumarázy i v nádorové tkáni. Mutace by se ale mohly nacházet také v intronech nebo promotoru. Dále bychom tedy chtěli pomocí PCR a následné sekvenace analyzovat možnost mutací v oblasti promotoru genu *FH*. Také plánujeme vyloučit sestřihové mutace pomocí analýzy fragmentů mRNA v nádorové tkáni. Nakonec by bylo vhodné analyzovat možnost ztráty jedné z alel ve vzorku leiomyomu, takovou analýzu by bylo možné provést například metodou MLPA.

Četnost výskytu mutací *FH* v děložních leiomyomech (či leiomyosarkomech) i v dalších typech nádorů byla zkoumána několika studii. V nádorech jiného typu než děložní leiomyomy či leiomyosarkomy byl výskyt mutací velmi vzácný nebo nulový [80-82].

Kiuru a spol. [81] analyzovali 41 děložních leiomyomů a 18 děložních leiomyosarkomů. Pozitivní byl pouze jeden leiomyosarkomu, kde byly nalezeny dvě mutace a jedna z nich byla nalezena i ve zdravé tkáni (1,7 %) [81]. Ve své pozdější práci analyzovali možnost alelické ztráty genu *FH* u 153 děložních leiomyomů od 46 pacientů a byla nalezena v pěti leiomyomech od pěti pacientů [80]. V těchto pěti leiomyomech byla dále hledána mutace *FH* na zbývající druhé alele a byla nalezena u dvou leiomyomů (4,3 %), u kterých už nebyla nalezena mutace genu *FH* ve zdravé tkáni [80]. Dále analyzovali 67 tumorů (většinou děložních) získaných od pacientů, kteří měli diagnostikovaný leiomyosarkom ve věku mladším než 45 let [83]. V daném souboru našli pouze jednu mutaci v *FH*, která byla i germinální, ale žádná další mutace na druhé alele nalezena nebyla. Z daného souboru v 52 tumorech analyzovali ztrátu heterozygoty, která byla nalezena v 9 případech. Mutace *FH* na obou alelách tedy nalezena nebyla (0%) [83].

Barker a spol. [84] analyzovali 129 děložních leiomyomů od 21 pacientek ve věku 37-50 let a 26 děložních leiomyosarkomů [84]. Mutace byly nalezeny ve třech leiomyosarkomech a v jednom leiomyomu, kde byla mutace potvrzena i ve zdravé tkáni pacienta. V sedmi dalších leiomyomech byla nalezena ztráta heterozygoty v oblasti obsahující gen *FH*, ale v těchto případech nebyla nalezena žádná další somatická mutace genu *FH*. Mutace na obou alelách *FH* tedy nalezena nebyla (0 %) [84]. Dále analyzovali ve 45 děložních leiomyomech od pacientek ve věku 32-53 let a 9 děložních leiomyosarkomech rovněž množství fumarázy, a snížení bylo nalezeno pouze v jednom leiomyomu, kde byla nalezena germinální mutace a alelická ztráta druhé nemutované alely (1,9 %) [85].

## 6 Souhrn

V bakalářské práci byla optimalizována metoda měření aktivity fumaráthydratázy v nádorové tkáni a jako vhodné množství proteinu v reakční směsi bylo stanoveno rozmezí 40-70  $\mu\text{g}$ .

Dále byla spektrofotometricky stanovena specifická aktivita fumaráthydratázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy ve 22 vzorcích děložních leiomyomů. Snížení poměru specifické aktivity fumaráthydratázy a citrátsyntázy nejméně na 60 % kontroly bylo nalezeno ve vzorcích 8, 9, 16 a 20.

Pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) s následným „Western blotem“ a imunodetekcí bylo ve 22 vzorcích děložních leiomyomů od pacientek ve věku 21-31 let stanoveno množství enzymu fumaráthydratázy, optimalizované na množství  $\beta$ -aktinu, který byl při vyhodnocování použit jako kontrola nanášeného množství proteinu na gel. Výrazné snížení množství fumarázy bylo nalezeno ve dvou vzorcích a to vzorcích 9 a 10.

Výrazné snížené množství a aktivity enzymu fumaráthydratázy bylo nalezeno v jednom vzorku leiomyomu (leiomyom 9). V lymfocytech této pacientky byla také již dříve zjištěna snížená aktivita fumaráthydratázy.

## Seznam použité literatury

1. Battelli F. a Stern M.L., Regarding the comments of Mr. Abelous on the nature of oxidant and reducing ferments, *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, 84: s. 102-103 (1921).
2. Dakin H.D., The action of muscle tissue on fumaric, maleic, glutaconic, and malic acids, *Journal of Biological Chemistry*, 52(1): s. 183-189 (1922).
3. Alberty R.A., Miller W.G., a Fisher H.F., Studies of the enzyme fumarase .6. study of the incorporation of deuterium into L-malate during the reaction in deuterium oxide, *Journal of the American Chemical Society*, 79(15): s. 3973-3977 (1957).
4. Voet D a Voetová J.G., *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, (1995).
5. Porter D.J.T. a Bright H.J., 3-carbanionic substrate-analogs bind very tightly to fumarase and aspartase, *Journal of Biological Chemistry*, 255(10): s. 4772-4780 (1980).
6. Blanchard J.S. a Cleland W.W., Use of isotope effects to deduce the chemical mechanism of fumarase, *Biochemistry*, 19(19): s. 4506-4513 (1980).
7. Acuna G., Ebeling S., a Hennecke H., Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *Bradyrhizobium japonicum* /wmc-like gene: evidence for the existence of two different fumarases, *Journal of General Microbiology*, 137: s. 991-1000 (1991).
8. Reaney S.K., Bungard S.J., a Guest J.R., Molecular and enzymological evidence for two classes of fumarase in *Bucillus stearothermophilus* (var. non-diastaticus), *Journal of General Microbiology*, 139: s. 403-416 (1993).
9. Guest J.R., Miles J.S., Roberts R.E., a Woods S.A., The fumarase genes of *Escherichia coli*: location of the *fumB* gene and discovery of a new gene (*fumC*), *Journal of General Microbiology*, 131(NOV): s. 2971-2984 (1985).
10. Guest J.R. a Roberts R.E., Cloning mapping and expression of the fumarase gene of *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology*, 153(2): s. 588-596 (1983).
11. Miles J.S. a Guest J.R., Complete nucleotide-sequence of the fumarase gene *FumA* of *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research*, 12(8): s. 3631-3642 (1984).
12. Woods S.A., Schwartzbach S.D., a Guest J.R., Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 954(1): s. 14-26 (1988).
13. Bell P.J., Andrews S.C., Sivak M.N., a Guest J.R., Nucleotide sequence of the FNR-regulated fumarase gene (*FumB*) of *Escherichia coli* K12, *Journal of Bacteriology*, 171(6): s. 3494-3503 (1989).
14. Colombo S., Grisa M., Tortora P., a Vanoni M., Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a *Sulfolobus solfataricus* gene encoding a class II fumarase, *Febs Letters*, 340(1-2): s. 151-153 (1994).
15. Woods S.A., Miles J.S., Roberts R.E., a Guest J.R., Structural and functional relationships between fumarase and aspartase. Nucleotide sequences of the fumarase (*fumc*) and aspartase (*aspA*) genes of *Escherichia coli* K12, *Biochemical Journal*, 237(2): s. 547-557 (1986).
16. Ueda Y., Yumoto N., Tokushige M., Fukui K., a Ohyanishiguchi H., Purification and characterization of two types of fumarase from *Escherichia coli*, *Journal of Biochemistry*, 109(5): s. 728-733 (1991).
17. Flint D.H., Emptage M.H., a Guest J.R., Fumarase A from *Escherichia coli*: purification and characterization as an iron-sulfur cluster containing enzyme, *Biochemistry*, 31(42): s. 10331-10337 (1992).

18. Weaver T., Lees M., Zaitsev V., Zaitseva I., Duke E., Lindley P., McSweeney S., Svensson A., Keruchenko J., Keruchenko I., Gladilin K., a Banaszak L., Crystal structures of native and recombinant yeast fumarase, *Journal of Molecular Biology*, 280(3): s. 431-442 (1998).
19. The european bioinformatics institute, Recombinant yeast fumarase. dostupné z <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1yfm/quaternary.html> (k 1. 1. 2012).
20. Akiba T., Hiraga K., a Tuboi S., Intracellular-distribution of fumarase in various animals, *Journal of Biochemistry*, 96(1): s. 189-195 (1984).
21. Tolley E. a Craig I., Presence of two forms of fumarase (fumarate hydratase E.C. 4.2.1.2) in mammalian cells: immunological characterization and genetic analysis in somatic cell hybrids. Confirmation of the assignment of a gene necessary for the enzyme expression to human chromosome 1, *Biochemical Genetics*, 13(11-1): s. 867-883 (1975).
22. Edwards Y.H. a Hopkinson D.A., Futher characterization of the human fumarase variant, FH-2-1, *Annals of Human Genetics*, 43(OCT): s. 103-108 (1979).
23. Stein I., Peleg Y., Evenram S., a Pines O., The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 14(7): s. 4770-4778 (1994).
24. Suzuki T., Sato M., Yoshida T., a Tuboi S., Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single gene, *Journal of Biological Chemistry*, 264(5): s. 2581-2586 (1989).
25. Wu M. a Tzagoloff A., Mitochondrial and cytoplasmic fumarases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single nuclear gene FUM1, *Journal of Biological Chemistry*, 262(25): s. 12275-12282 (1987).
26. Yogevev O., Naamati A., a Pines O., Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions, *Febs Journal*, 278(22): s. 4230-4242 (2011).
27. Ono H., Yoshimura N., Sato M., a Tuboi S., Translocation of proteins into rat liver mitochondria. Existence of two different precursor polypeptides of liver fumarase and import of the precursor into mitochondria, *Journal of Biological Chemistry*, 260(6): s. 3402-3407 (1985).
28. John Fernandes, Jean-Marie Saudubray, Georges van den Berghe, a Walter J.H., Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle, v knize *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* 4th edition, Springer-Verlag, New York, s. 161-174 (2006).
29. Zinn A.B., Kerr D.S., a Hoppel C.L., Fumarase deficiency - a new cause of mitochondrial encephalomyopathy, *New England Journal of Medicine*, 315(8): s. 469-475 (1986).
30. Whelan D.T., Hill R.E., a McClorry S., Fumaric aciduria: a new organic aciduria, associated with mental retardation and speech impairment, *Clinica Chimica Acta*, 132(3): s. 301-308 (1983).
31. Tomlinson I.P.M., Alam N.A., Rowan A.J., Barclay E., Jaeger E.E.M., Kelsell D., Leigh I., Gorman P., Lamlum H., Rahman S., Roylance R.R., Olpin S., Bevan S., Barker K., Hearle N., Houlston R.S., Kiuru M., Lehtonen R., Karhu A., Vilkki S., Laiho P., Eklund C., Vierimaa O., Aittomaki K., Hietala M., Sistonen P., Paetau A., Salovaara R., Herva R., Launonen V., Aaltonen L.A., a Multiple Leiomyoma C., Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer, *Nature Genetics*, 30(4): s. 406-410 (2002).



32. Alam N.A., Rowan A.J., Wortham N.C., Pollard P.J., Mitchell M., Tyrer J.P., Barclay E., Calonje E., Manek S., Adams S.J., Bowers P.W., Burrows N.P., Charles-Holmes R., Cook L.J., Daly B.M., Ford G.P., Fuller L.C., Hadfield-Jones S.E., Hardwick N., Highet A.S., Keefe M., MacDonald-Hull S.P., Potts E.D.A., Crone M., Wilkinson S., Camacho-Martinez F., Jablonska S., Ratnavel R., MacDonald A., Mann R.J., Grice K., Guillet G., Lewis-Jones M.S., McGrath H., Seukeran D.C., Morrison P.J., Fleming S., Rahman S., Kelsell D., Leigh I., Olpin S., a Tomlinson I.P.M., Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency, *Human Molecular Genetics*, 12(11): s. 1241-1252 (2003).
33. Hodge J.C. a Morton C.C., Genetic heterogeneity among uterine leiomyomata: insights into malignant progression, *Human Molecular Genetics*, 16: s. R7-R13 (2007).
34. Knudson A.G., Mutation and cancer - statistical study of retinoblastoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4): s. 820-& (1971).
35. Alam N.A., Olpin S., a Leigh I.M., Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer, *British Journal of Dermatology*, 153(1): s. 11-17 (2005).
36. Ylisaukko-oja S.K., Cybulski C., Lehtonen R., Kiuru M., Matyjasik J., Szymanska A., Szymanska-Pasternak J., Dyrskjot L., Butzow R., Orntoft T.F., Launonen V., Lubinski J., a Aaltonen L.A., Germline fumarate hydratase mutations in patients with ovarian mucinous cystadenoma, *European Journal of Human Genetics*, 14(7): s. 880-883 (2006).
37. Carvajal-Carmona L.G., Alam N.A., Pollard P.J., Jones A.M., Barclay E., Wortham N., Pignatelli M., Freeman A., Pomplun S., Ellis I., Poulson R., El-Bahrawy M.A., Berney D.M., a Tomlinson I.P.M., Adult Leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(8): s. 3071-3075 (2006).
38. Campione E., Terrinoni A., Orlandi A., Codispoti A., Melino G., Bianchi L., Mazzotta A., Garaci F.G., Ludovici A., a Chimenti S., Cerebral cavernomas in a family with multiple cutaneous and uterine leiomyomas associated with a new mutation in the fumarate hydratase gene, *Journal of Investigative Dermatology*, 127(9): s. 2271-2273 (2007).
39. Harris A.L., Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth, *Nature Reviews Cancer*, 2(1): s. 38-47 (2002).
40. Isaacs J.S., Jung Y.J., Mole D.R., Lee S., Torres-Cabala C., Chung Y.L., Merino M., Trepel J., Zbar B., Toro J., Ratcliffe P.J., Linehan W.M., a Neckers L., HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability, *Cancer Cell*, 8(2): s. 143-153 (2005).
41. Pollard P., Wortham N., Barclay E., Alam A., Elia G., Manek S., Poulson R., a Tomlinson I., Evidence of increased microvessel density and activation of the hypoxia pathway in tumours from the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome, *Journal of Pathology*, 205(1): s. 41-49 (2005).
42. Pollard P.J., Briere J.J., Alam N.A., Barwell J., Barclay E., Wortham N.C., Hunt T., Mitchell M., Olpin S., Moat S.J., Hargreaves I.P., Heales S.J., Chung Y.L., Griffiths J.R., Dalglish A., McGrath J.A., Gleeson M.J., Hodgson S.V., Poulson

- R., Rustin P., a Tomlinson I.P.M., Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations, *Human Molecular Genetics*, 14(15): s. 2231-2239 (2005).
43. Zhong Hua, M. D.M.A., a E. L., Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases, *Cancer Research*, 59: s. 5830-5835 (1999).
  44. Schofield C.J. a Ratcliffe P.J., Oxygen sensing by HIF hydroxylases, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5): s. 343-354 (2004).
  45. Semenza G.L., HIF-1 and human disease: one highly involved factor, *Genes & Development*, 14(16): s. 1983-1991 (2000).
  46. Kaelin W.G., The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1): s. 627-638 (2005).
  47. Majmundar A.J., Wong W.H.J., a Simon M.C., Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress, *Molecular Cell*, 40(2): s. 294-309 (2010).
  48. Gottlieb E. a Tomlinson I.P.M., Mitochondrial tumour suppressors: A genetic and biochemical update, *Nature Reviews Cancer*, 5(11): s. 857-866 (2005).
  49. Guzy R.D., Sharma B., Bell E., Chandel N.S., a Schumackerl P.T., Loss of the SdhB, but not the SdhA subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis, *Molecular and Cellular Biology*, 28(2): s. 718-731 (2008).
  50. Sudarshan S., Linehan W.M., a Neckers L., HIF and fumarate hydratase in renal cancer, *British Journal of Cancer*, 96(3): s. 403-407 (2007).
  51. Sudarshan S., Sourbier C., Kong H.S., Block K., Romero V.A.V., Yang Y.F., Galindo C., Mollapour M., Scroggins B., Goode N., Lee M.J., Gourlay C.W., Trepel J., Linehan W.M., a Neckers L., Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1alpha stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species, *Molecular and Cellular Biology*, 29(15): s. 4080-4090 (2009).
  52. Hewitson K.S., Lienard B.M.R., McDonough M.A., Clifton I.J., Butler D., Soares A.S., Oldham N.J., McNeill L.A., a Schofield C.J., Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates, *Journal of Biological Chemistry*, 282(5): s. 3293-3301 (2007).
  53. Koivunen P., Hirsila M., Remes A.M., Hassinen I.E., Kivirikko K.I., a Myllyharju J., Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates - Possible links between cell metabolism and stabilization of HIF, *Journal of Biological Chemistry*, 282(7): s. 4524-4532 (2007).
  54. O'Flaherty L., Adam J., Heather L.C., Zhdanov A.V., Chung Y.L., Miranda M.X., Croft J., Olpin S., Clarke K., Pugh C.W., Griffiths J., Papkovsky D., Ashrafian H., Ratcliffe P.J., a Pollard P.J., Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism, *Human Molecular Genetics*, 19(19): s. 3844-3851 (2010).
  55. Bruick R.K. a McKnight S.L., A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science*, 294(5545): s. 1337-1340 (2001).
  56. Epstein A.C.R., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., Tian Y.M., Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., Barstead R., Hodgkin J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Schofield C.J., a Ratcliffe P.J., C-elegans EGL-9 and mammalian homologs define

- a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*, 107(1): s. 43-54 (2001).
57. Ivan M., Haberberger T., Gervasi D.C., Michelson K.S., Gunzler V., Kondo K., Yang H.F., Sorokina I., Conaway R.C., Conaway J.W., a Kaelin W.G., Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21): s. 13459-13464 (2002).
  58. Taylor M.S., Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family, *Gene*, 275(1): s. 125-132 (2001).
  59. Aravind L. a Koonin E.V., The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases, *Genome Biology*, 2(3) (2001).
  60. Hirsila M., Koivunen P., Gunzler V., Kivirikko K.I., a Myllyharju J., Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor, *Journal of Biological Chemistry*, 278(33): s. 30772-30780 (2003).
  61. Ivan M., Kondo K., Yang H.F., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., a Kaelin W.G., HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O-2 sensing, *Science*, 292(5516): s. 464-468 (2001).
  62. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., a Ratcliffe P.J., Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O-2-regulated prolyl hydroxylation, *Science*, 292(5516): s. 468-472 (2001).
  63. Masson N., Willam C., Maxwell P.H., Pugh C.W., a Ratcliffe P.J., Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation, *EMBO Journal*, 20(18): s. 5197-5206 (2001).
  64. Hon W.C., Wilson M.I., Harlos K., Claridge T.D.W., Schofield C.J., Pugh C.W., Maxwell P.H., Ratcliffe P.J., Stuart D.I., a Jones E.Y., Structural basis for the recognition of hydroxyproline in alpha IF-1 alpha by pVHL, *Nature*, 417(6892): s. 975-978 (2002).
  65. Min J.H., Yang H.F., Ivan M., Gertler F., Kaelin W.G., a Pavletich N.P., Structure of an HIF-1 alpha-pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling, *Science*, 296(5574): s. 1886-1889 (2002).
  66. Yu F., White S.B., Zhao Q., a Lee F.S., HIF-1 alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17): s. 9630-9635 (2001).
  67. YU F., White S.B., Zhao Q., a Lee F.S., Dynamic, site-specific interaction of hypoxia-inducible factor-1 alpha with the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, *Cancer Research*, 61(10): s. 4136-4142 (2001).
  68. Kaelin W.G. a Ratcliffe P.J., Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway, *Molecular Cell*, 30(4): s. 393-402 (2008).
  69. Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C.E., Simon M.C., a Schumacker P.T., Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20): s. 11715-11720 (1998).

70. Brunelle J.K., Bell E.L., Quesada N.M., Vercauteren K., Tiranti V., Zeviani M., Scarpulla R.C., a Chandel N.S., Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation, *Cell Metabolism*, 1(6): s. 409-414 (2005).
71. Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh F.M., Orcutt M.L., Stackhouse T., Kuzmin I., Modi W., Geil L., Schmidt L., Zhou F.W., Li H., Wei M.H., Chen F., Glenn G., Choyke P., Walther M.M., Weng Y.K., Duan D.S.R., Dean M., Glavac D., Richards F.M., Crossey P.A., Fergusonsmith M.A., Lepaslier D., Chumakov I., Cohen D., Chinault A.C., Maher E.R., Linehan W.M., Zbar B., a Lerman M.I., Identification of the Vonhappel-Lindau disease tumor-suppressor gene, *v knize Science*, s. 1317-1320 (1993).
72. Chemistry research laboratory Oxford University, Studies on the molecular mechanism of the hypoxic response. dostupné z <http://www.chem.ox.ac.uk/oc/cjschofield/HIF.htm> (k 1. 1. 2012).
73. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., a Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): s. 265-275 (1951).
74. Hill R. a Bradshaw R., Fumarase, *Methods in Enzymology*, 13: s. 91-99 (1996).
75. Srere P., Citrate synthase, *Methods in Enzymology*, 13: s. 3-11 (1969).
76. Bradford M.M., A rapid and sensitive metod for the qantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: s. 248-254 (1976).
77. Walker C.L. a Stewart E.A., Uterine fibroids: The elephant in the room, *Science*, 308(5728): s. 1589-1592 (2005).
78. Okolo S., Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids, *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 22(4): s. 571-588 (2008).
79. Stewart L., Glenn G.M., Stratton P., Goldstein A.M., Merino M.J., Tucker M.A., Linehan W.M., a Toro J.R., Association of Germline Mutations in the Fumarate Hydratase Gene and Uterine Fibroids in Women With Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer, *Archives of Dermatology*, 144(12): s. 1584-1592 (2008).
80. Lehtonen R., Kiuru M., Vanharanta S., Sjoberg J., Aaltonen L.M., Aittomaki K., Arola J., Butzow R., Eng C., Husgafvel-Pursiainen K., Isola J., Jarvinen H., Koivisto P., Mecklin J.P., Peltomaki P., Salovaara R., Wasenius V.M., Karhu A., Launonen V., Nupponen N.N., a Aaltonen L.A., Biallelic inactivation of fumarate hydratase (FH) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors, *American Journal of Pathology*, 164(1): s. 17-22 (2004).
81. Kiuru M., Lehtonen R., Arola J., Salovaara R., Jarvinen H., Aittomaki K., Sjoberg J., Visakorpi T., Knuutila S., Isola J., Delahunt B., Herva R., Launonen V., Karhu A., a Aaltonen L.A., Few FH mutations in sporadic counterparts of tumor types observed in hereditary Leiomyomatosis and renal cell cancer families, *Cancer Research*, 62(16): s. 4554-4557 (2002).
82. Morris M.R., Maina E.N., Morgan N.V., Gentle D., Astuti D., Moch H., Kishida T., Yao M., Schraml P., Richards F.M., Latif F., a Maher E.R., Molecular genetic analysis of FIH-1, FH, and SDHB candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma, *Journal of Clinical Pathology*, 57(7): s. 706-711 (2004).
83. Ylisaukko-oja S.K., Kiuru M., Lehtonen H.J., Lehtonen R., Pukkala E., Arola J., Launonen V., a Aaltonen L.A., Analysis of fumarate hydratase mutations in a population-based series of early onset uterine leiomyosarcoma patients, *International Journal of Cancer*, 119(2): s. 283-287 (2006).

84. Barker K.T., Bevan S., Wang R., Lu Y.J., Flanagan A.M., Bridge J.A., Fisher C., Finlayson C.J., Shipley J., a Houlston R.S., Low frequency of somatic mutations in the FH/multiple cutaneous leiomyomatosis gene in sporadic leiomyosarcomas and uterine leiomyomas, *British Journal of Cancer*, 87(4): s. 446-448 (2002).
85. Barker K.T., Spendlove H. E., Banu N. S., Bridge J. A., Fisher C. , Shipley J., Garrett M., Manyonda I., Houlston R. S., No evidence for epigenetic inactivation of fumarate hydratase in leiomyomas and leiomyosarcomas, *Cancer Letters*, 235(1): s. 136-140 (2006).

