


9 Přílohy

Příloha I

Plakát prezentovaný 8. - 11. 11. 2012 na konferenci Ovarian Club II: The fertilization process of the oocyte and embryo development in relation to various clinical conditions, Praha.



Distribution of the insLQ variant in luteinizing hormone receptor (LHCGR) in fertile Czech male and female controls

Chrudimská Jana, Křenková Petra, Macek Milan jr., Macek Milan sr.

Department of Biology and Medical Genetics, Charles University Prague – 2. Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Introduction

Luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene (LHCGR) belongs to the essential factors for human reproduction. The insLQ polymorphism is one of the most important of LHCGR polymorphisms with verified impact on LHCGR activity and sensitivity. The insLQ is characterized by 6 nucleotides insertion in the first exon of the LHCGR gene that results in the leu-gln insertion in the extracellular domain near the N-tail of the protein (insLQ, rs58356637).

The insLQ variation probably affects the synthesis of this protein and its linkage to the cytoplasmic membrane, due to its position next to the assumed signal sequence (Kerkela, E. *et al.*, 2007). The presence of insLQ increases LHCGR sensitivity, associated for example with lower age of onset of the breast cancer (Piersma, D. *et al.*, 2006) and shorter, ie. disease-free, survival in breast cancer patients (Piersma, D. *et al.*, 2007).

The prevalence of the insLQ variant vary in different populations from 0% in Japan (Rodien, P. *et al.*, 1998) to 29% in the healthy Caucasian population (Simoni, M. *et al.*, 2008).

The aim of this study was the determination of the insLQ prevalence in Czech fertile male and female controls and comparison with different European populations for further association studies in dysfertility, ovarian hyperstimulation syndrome and hormone-dependent cancers.

Results and Discussion

Table 1: Frequency of the insLQ polymorphism in the LHCGR gene in Czech population

	Females (N=99)	Males (N=95)	P (χ ²)
wt/wt	51.58% (51)	56.8% (54)	0.4567
wt/insLQ	40.4% (40)	34.7% (33)	0.4154
insLQ/insLQ	8.1% (8)	8.4% (8)	0.9314
wt allele	71.7% (142)	74.2% (141)	0.5805
insLQ allele	28.3% (56)	25.8% (49)	0.5805

No difference in allele/genotype frequencies were detected in fertile Czech males and females.

Table 2: Distribution of insLQ variation in LHCGR gene in Europe

	Our results Czech republic (N=194)	Rodien, 1998 Belgium (N=102)	Kerkela, 2007 Sweden (N=51)	Simoni, 2008 Germany (N=271)	Valkenburg, 2009 Denmark (N=2344)
wt/wt	54.4% (106)	55.8% (57)	51.0% (26)	48.7% (132)	52.0% (1220)
wt/insLQ	37.4% (73)	35.4% (36)	43.1% (22)	44.3% (120)	39.8% (934)
insLQ/insLQ	8.2% (16)	8.8% (9)	5.9% (3)	7.0% (19)	8.1% (190)
wt allele	72.9% (283)	74% (151)	72.5% (74)	70.8% (384)	72.0% (3374)
insLQ allele	27.1% (105)	26% (53)	27.5% (28)	29.2% (158)	28.0% (1314)

No difference in allele/genotype frequencies were detected in Czech population and other European studies.

Presented study brings for the first time the prevalence of insLQ genotypes in fertile Czech males and females for further clinical associated studies.

Materials and Methods

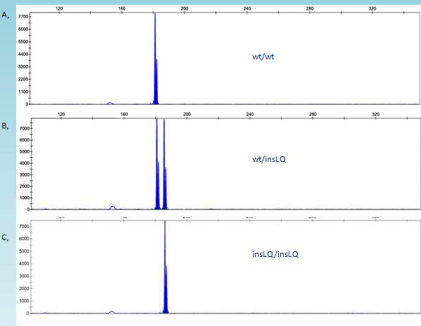
Post-PCR fragmentation analysis was performed by the capillary electrophoresis using custom-designed fluorescence-labeled primers using ABI Prism 3130xl capillary electrophoresis (Figure 1).

Forward primer: 6-FAM-GCAAGCCGAGAGCCCACT (5'→3')
 Reverse primer: TCGAGTGAGACCGCCGTGG (5'→3')

The 95 fertile men and 99 women were analyzed. The fertility was confirmed by the documentation of delivery at least two children.

Association studies were analyzed by chi-square (χ²) test where p-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Figure 1: InsLQ fragmentation analysis.



DNA fragments with 6 nucleotide insertion (insLQ genotype) have different electrophoretographic position in the capillary electrophoresis comparing fragments without insertion (wild-type genotype). We can read the length of amplified fragments from the graphs after the software evaluation and distinguish thus analyzed genotypes. The wt homozygote is characterised by one peak with fragments 181 nucleotides in length (A), heterozygote by two peaks - for each allele one (B) and homozygote for insLQ by one peak with all fragments 187nt in length (C).

Conclusions

- There were found no differences in genomic or allelic frequencies between Czech males and females.
- Our results are in accordance with other European studies from Germany, Denmark, Belgium and Sweden.
- Detected distribution of the insLQ polymorphism in Czech fertile males and females will be used for further association studies in dysfertility, ovarian hyperstimulation syndrome and hormone-dependent cancers.

References

- KERKELA, E., SNOTTMAN, H., FROEN, B., BURESTEN, K., KERE, J. & HOVATTA, O. (2007) Exclusion of Coding-Region Mutations in Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Receptor Genes as the Cause of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Fertility and Sterility*, **87**, 603-606.
- PIERSMA, D., BEENS, E., VEHOF-POST, M., UITTERLINDEN, A.G., BRAAKMAN, I., POLS, H.A.P. & THIMMEN, A.P.N. (2006) A Common Polymorphism Renders the Luteinizing Hormone Receptor Protein More Active by Improving Signal Peptide Function and Predicts Adverse Outcome in Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **91**, 1470-1476.
- PIERSMA, D., THIMMEN, A.P., LOK, M.P., KUIJ, J.G., FOSSIES, J.A., UITTERLINDEN, A.G., AP POOS, H. & BEENS, E.W. (2007) Gln and Lhr Gene Variants Predict Adverse Outcome in Premenopausal Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Research*, **9**.
- RODIEN, P., CETANI, F., COSTAGLIOLA, S., TONACCHERA, M., DUPREZ, L., MINIGISHI, T., GOVARTS, C. & VASSART, G. (1998) Evidence for an Allelic Variant of the Human LHCG Receptor Rather than a Gene Duplication: Functional Comparison of Wild-Type and Variant Receptors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **83**, 4431-4434.
- SIMONI, M., TUTTELMANN, F., MICHEL, C., BOCKENFELD, Y., NESCHLAG, E. & GROMOLL, J. (2008) Polymorphisms of the Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor Gene: Association with Mal descended Testes and Male Infertility. *Pharmacogenetics and Genomics*, **18**, 193-200.
- VALKENBURG, O., UITTERLINDEN, A.G., PIERSMA, D., HOFMAN, A., THIMMEN, A.P.N., DE JONG, F.H., FAUSER, B. & LAVEN, J.S.E. (2009) Genetic Polymorphisms of GnRH and Gonadotrophic Hormone Receptors Affect the Phenotype of Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction*, **24**, 2014-2022.

Acknowledgment

This work was supported by IGA NT13770-4/2012 (Ministry of Health, Czech Republic) and by project for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Czech Republic).

Contact

macek.sekretariat@fnmotol.cz

Příloha II

Plakát prezentovaný 13. - 14. 11. 2012 na 11. Česko-slovenská konference Reprodukční medicíny - 22. sympoziu Asistované reprodukce 2012, Brno

Distribuce polymorfismu insLQ v genu pro receptor luteinizačního hormonu (LHCGR) v České populaci

Chrudimská Jana, Křenková Petra, Macek Milan jr., Macek Milan sr.

Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Fakultní nemocnice v Motole, Praha, Česká republika



Úvod

Receptory společně pro luteinizační hormon (LH) a lidský choriový gonadotropin (hCG, LHCG) zajišťují fyziologickou aktivitu mužských i ženských gonád. U homozygotů recesivních mutací LHCG dochází k poruše normálního pubertálního vývoje. Mimo to se v genu pro LHCG nachází polymorfismy, které nemají zásadní vliv na fertilitu. Jedinec ani v homozygotním stavu. Jedním z nejednodušších je insLQ, jenž významně ovlivňuje senzitivitu a aktivitu tohoto receptoru. Tato varianta je charakterizována insercí 6 nukleotidů v 1. exonu genu, jejímž důsledkem je inserce leucinu a glycinu za 18. aminokyselinu u N-konce tohoto proteinu (rs58356637).

Polymorfismus insLQ je umístěn v těsném sousedství předpokládané signální sekvence. Je proto pravděpodobné, že ovlivňuje syntézu receptoru a jeho umístění na cytoplazmatickou membránu (Kerkela, E. et al., 2007). insLQ ovlivňuje funkci extracelulární domény receptoru a je asociován např. se zvýšenou agresivitou hormonálně dependentního karcinomu prsu (Piersma, D. et al., 2006).

Populační frekvence insLQ je etnicity závislá. U Japonců tato varianta úplně chybí (Rodien, P. et al., 1998), zatímco u kaňkazské populace se vyskytuje až ve 25% (Simoni, M. et al., 2008).

Cílem této studie bylo zjistit výskyt polymorfismu insLQ u českých fertálních mužů a žen a získané hodnoty porovnat s výsledky z ostatních evropských studií. Stanovené frekvence umožní ověřit význam insLQ při vzniku a prevenci dyfertility, kontrolované ovarální hyperstimulace (COH), ovarálního hyperstimulačního syndromu (OHS) a hormonálně-dependentních nádorů.

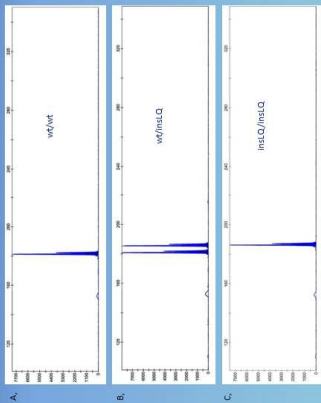
Materiál a metody

Do studie bylo celkem zahrnuto 194 fertálních jedinců (95 mužů a 99 žen) s nejméně dvěma potomky.

Vzorky byly genotypovány pomocí fragmentační analýzy: po PCR s nově navrženými fluorescenčně značenými primery byly fragmenty rozděleny podle velikosti na kapilární elektroforéze ABI Prism 3130xl (obr.č.1).

Statistická významnost získaných výsledků byla ověřena chí-kvadrát (χ^2) testem, jako statisticky významné byly považovány hodnoty $\leq 0,05$.

Obr. č. 1. Výsledné grafy z fragmentační analýzy



Fragmenty DNA bez inverze (wt genotyp) doputují oproti fragmentům s 6 nukleotidovou insercí (insLQ genotyp) při kapilární elektroforéze do jiné vzdálenosti od startu. Na výsledných grafech lze po softwarovém vyhodnocení odečíst délku amplifikovaných fragmentů a rozlišit tak jednotlivé genotypy: homozygot wt s jedním peakem s fragmenty o velikosti 181 nt (A), heterozygot se dvěma peaky fragmentů o velikostech 181nt (wt alela) a 187nt (insLQ alela); B) a homozygot insLQ se všemi fragmenty o velikosti 187nt (C).

Výsledky a diskuse

Tabulka č.1: Frekvence polymorfismu insLQ v genu pro LHCGR v české populaci

	Ženy (n=99)	Muži (n=95)	P (χ ²)
wt/wt	51,58% (51)	56,8% (54)	0,4567
wt/insLQ	40,4% (40)	34,7% (33)	0,4154
insLQ/insLQ	8,1% (8)	8,4% (8)	0,9314
wt alela	71,7% (142)	74,2% (141)	0,5805
insLQ alela	28,3% (56)	25,8% (149)	0,5805

Prevalence genotypu insLQ mezi fertálními muži a ženami se statisticky neliší.

Tabulka č.2: Frekvence polymorfismu insLQ v genu pro LHCGR v Evropě

	Itálie vzhledy (n=124)	Rodien, 1998 (n=122)	Heršeli, 2007 (n=53)	Simoni, 2008 (n=271)	Valkenburg, 2009 (n=244)
wt/wt	54,4% (108)	55,8% (57)	51,0% (26)	48,7% (132)	52,0% (122)
wt/insLQ	37,4% (73)	35,4% (36)	45,1% (22)	44,3% (120)	39,8% (93)
insLQ/insLQ	8,2% (16)	8,8% (9)	5,9% (3)	7,0% (19)	8,1% (19)
wt alela	72,8% (143)	74% (74)	72,5% (34)	70,8% (184)	72,0% (174)
insLQ alela	27,1% (53)	26% (26)	27,5% (13)	29,2% (77)	28,0% (67)

Frekvence studovaných alel/genotypů v české populaci se shodují s výsledky ostatních evropských studií.

Zjištěné frekvence genotypů insLQ u českých fertálních mužů a žen jsou zcela původní a umožňují další klinicky významné asociativní studie.

Závěr

1. Zastoupení genotypu insLQ u českých fertálních mužů a žen a alelické frekvence se statisticky neliší.
2. Srovnání prevalence genotypů wt/wt, wt/insLQ a insLQ/insLQ a alelických frekvencí u českých mužů a žen se plně shoduje s dosud publikovanými údaji z Belgie, Švédska, Německa a Nizozemí.
3. Získané výsledky umožní společně ověřit možné asociace insLQ u českých dyfertálních mužů a žen, individualizaci hormonální stimulace při COH a u starších žen snížit rizika hormonálně-dependentních nádorů, zejména karcinomu prsu.

Reference

1. Kerkela, E., Jormann, H., Metz, B., Blumstein, K., Kretz, J. & Hovatta, O. (2007) Exclusion of Coding Region Mutations in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Receptor Genes as the Cause of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Fertility and Sterility*, 87, 655-656.
2. Piersma, D., Brink, E., Vreugde-Poort, M., Urrutia-Arenas, A.G., Blaauw, L., Pool, H.P. & Teunissen, A.P.N. (2006) A Common Polymorphism in the Luteinizing Hormone Receptor Gene is Associated with Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Human Reproduction*, 21, 1527-1533.
3. Rochy, P., Czuch, F., Tomascova, M., Duraz, L., Miesova, T., Govaers, C. & Massas, G. (1998) Evidence for an Allelic Variant of the Human LH Receptor Gene in the Czech Population. *Journal of Molecular Endocrinology*, 12, 147-153.
4. Simoni, M., Urrutia-Arenas, A.G., Blumstein, K., Metz, B., Blumstein, K., Tomascova, M., Duraz, L., Miesova, T., Govaers, C. & Massas, G. (2008) Polymorphisms of the Luteinizing Hormone Receptor Gene: Association with Maldecidual Tissue and Fetal Intrauterine Growth Restriction. *Human Reproduction*, 23, 1202-1211.
5. Valkenburg, O., Urrutia-Arenas, A.G., Piersma, D., Hovatta, A., Teunissen, A.P.N., de Jong, F.H., Fauser, B. & Lavenex, J.E. (2009) Genetic Polymorphisms of the Luteinizing Hormone Receptor Affect the Phenotype of Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction*, 24, 2282-2291.

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory IGA M13770/4/2012 (Ministerstvo zdravotnictví) a grantu V0001/0001/0001 (Fakultní nemocnice v Motole, ČR).

Kontakt

macek.sekretariat@fmotol.cz