

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

DETEKCE BODOVÝCH MUTACÍ V GENU PRO MTHFR
METODOU REAL-TIME PCR

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Martin Bunčeka, Ph.D.

Hradec Králové 2006

Alena Víšková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Martinu Bunčekovi, Ph.D. za odborné vedení při sestavování této diplomové práce. Děkuji také PharmDr. Radovanu Haluzovi, Ph.D. a všem ostatním pracovníkům GENERI BIOTECH s.r.o. za vytvoření pracovních podmínek pro experimentální část práce. Zvláštní poděkování patří PharmDr. Šárce Holasové, Ph.D., MUDr. Zdeňkovi Fiedlerovi, Ph.D. a paní Věře Ludvíkové za trpělivost a cenné praktické rady.

Na závěr bych chtěla poděkovat také PharmDr. Tomášovi Šimůnkovi, Ph.D. za jeho vstřícný přístup.

OBSAH

Použité zkratky	4
1. Úvod a cíle práce	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Real-time PCR.....	7
2.1.1. Základy PCR.....	7
2.1.2. Real-time PCR a DNA sondy	10
2.2. Methylentetrahydrofolátreduktáza.....	17
2.2.1. Homocystein	17
2.2.2. Struktura a funkce methylentetrahydrofolátreduktázy	20
2.2.3. Alelická varianta MTHFR 677C→T	21
2.2.3.1. Molekulární biologie.....	21
2.2.3.3. MTHFR 677C→T, defekty neurální trubice a další vrožené poruchy ..	23
2.2.3.5. MTHFR 677C→T a nádorová onemocnění	26
2.2.3.6. MTHFR 677C→T a psychická onemocnění	28
2.2.4. Alelická varianta MTHFR 1298A→C.....	28
3. Experimentální část	30
3.1. Přístroje a reagensie	30
3.2. Pracovní postupy.....	32
3.2.1. Odběr krevních vzorků	32
3.2.2. Izolace DNA	32
3.2.3. Analýza vzorků DNA	33
4. Výsledky	42
5. Diskuze	45
6. Závěr.....	48
7. Literatura	49
Přílohy	55

Použité zkratky

A	adenin
ATP	adenosintrifosfát
C	cytosin
CBS	cystathionin- β -syntáza
cDNA	copy deoxyribonukleová kyselina
DMG	N, N-dymethylglycin
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová DNA (double stranded DNA)
FAD	flavinadenindinukleotid
FAM	fluorescein
FRET	přenos fluorescenční rezonanční energie (fluorescence resonance energy transfer)
G	guanin
Hcy	homocystein
HEX	hexachlorofluorescein
hHcy	hyperhomocysteinémie
ICHS	ischemická choroba srdeční
kDa	kilodaltonů
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MTHFR	N ⁵ , N ¹⁰ -methylentetrahydrofolátreduktáza
MTR	methioninsyntáza
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NO	oxid dusnatý
NTD	defekty neurální trubice (neural tube defects)
OR	poměr šancí (odds ratio)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky \times min ⁻¹ (revolutions per minute)

SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (single nucleotide polymorphism)
T	thymin
T _m	teplota tání (melting temperature)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
WT	homozygot pro nemutovanou alelu (wild type)

1. Úvod a cíle práce

Genetická výbava každého lidského jedince (kromě jednovaječných dvojčat) je nezaměnitelná. Spontánní mutace mění genetickou informaci a pokud jsou v daných podmínkách příznivé pro životaschopnost jedince, začnou se v populaci šířit. Mutace, jejichž frekvence výskytu dosáhne hodnoty 0,01, označujeme jako polymorfizmy. Polymorfizmy typu SNP vznikají původně jako jednobodové mutace, čili jednonukleotidové záměny, inserce nebo delece vyskytující se v sekvenci DNA. Když se podmínky, které umožnily rozšíření mutace, změní, mohou se SNP projevit negativním způsobem. Protože ovlivňují funkce genů a následně proteinů, stávají se predispozičními faktory různých typů onemocnění včetně rakoviny. Mohou také způsobovat interindividuální rozdíly v odpovědi organismu na léčiva, proto se v současnosti výzkumu SNP věnuje značná pozornost.

Polymorfizmy v genu N^5, N^{10} -methylentetrahydrofolátreduktázy (MTHFR) zasahují metabolismus aminokyseliny homocysteinu a derivátů kyseliny listové. Homocystein je považován za jeden z faktorů vzniku aterosklerózy a trombózy, správná distribuce metabolitů kyseliny listové v buňkách je zase nutná pro vyváženou syntézu nukleotidů a metylaci DNA (Wald *et al.*, 2002; Hobbs *et al.*, 2000). Polymorfizmy MTHFR 677C→T a 1298A→C proto souvisí s poměrně širokou škálou patologických stavů. I když objektivní riziko plynoucí z přítomnosti či nepřítomnosti těchto SNP nebylo zatím jednoznačně stanoveno, stává se například detekce polymorfizmu MTHFR 677C→T rutinním vyšetřením v rámci screeningu trombofilních stavů. Požadavky na screeningové vyšetření, jako je rychlost, dostatečná senzitivita, specifita a přijatelná cena, splňuje metoda real-time PCR.

Cílem naší práce bylo vyšetřit skupinu náhodně vybraných jedinců na přítomnost polymorfizmů MTHFR 677C→T a 1298A→C. Vyšetření probíhalo v rámci validace metody detekce trombofilních mutací na termocykleru Rotor–Gene RG-3000 (Corbett Research) v laboratořích firmy GENERI BIOTECH s.r.o. v Hradci Králové.

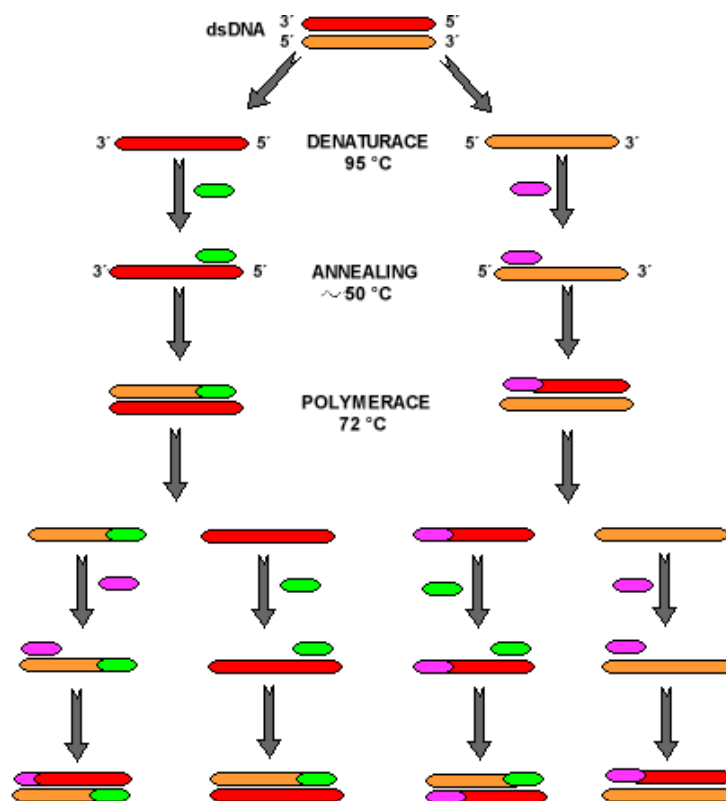
2. Teoretická část

2.1. Real-time PCR

2.1.1. Základy PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která dovoluje amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA. Vynález PCR byl umožněn rozvojem umělé syntézy oligonukleotidů počátkem 80. let. Princip PCR objevil koncem roku 1983 biochemik kalifornské firmy Cetus Corporation Kary B. Mullis. DNA byla syntetizována pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerázy I v přítomnosti syntetických oligonukleotidů sloužících jako primery. Vzhledem k tomu, že reakce je podmíněna cyklickým střídáním tepelných podmínek, docházelo k denaturaci DNA polymerázy a bylo nutno při každém cyklu tento enzym znovu dodávat. Významnou inovaci publikovali Innis *et al.* v roce 1988. Bylo to zavedení polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která je i při vysokých teplotách stabilní - dostala název *Taq* polymeráza. PCR se stala jednoduchou metodou, využívanou v klinických i výzkumných laboratořích (Zima *et al.*, 2004).

Typickou vlastností DNA polymeráz je schopnost rozpoznávat jednořetězovou DNA jako templát a současně se vázat na deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP). Jestliže je na jednovláknovou DNA navázán krátký oligonukleotid (primer), polymeráza se naváže těsně za tento segment a za využití energie vázané v dNTP katalyzuje syntézu komplementárního nukleotidového řetězce. Zahřátím dvouřetězové DNA (dsDNA) na vysokou teplotu (zpravidla nad 90°C) dojde k její denaturaci. Pokud jsou v roztoku přítomny primery, budou s nimi po snížení teploty na 45-60°C jednotlivé řetězce asociovat. Díky tomu, že primery jsou velmi krátké a navíc v nadbytku, přisednou na jednořetězovou DNA rychleji než komplementární vlákno. V posledním kroku jsou při teplotě 72°C (optimální teplota *Taq* polymerázy) syntetizovány nové řetězce podle sekvence templátů. Sekvence templátu je kopírována v několika po sobě jdoucích cyklech, přičemž v každém cyklu se počet kopií zdvojnásobí, protože fragmenty nasyntetizované v předchozích cyklech slouží současně jako matrice v cyklech následujících. Množství DNA tak narůstá geometrickou řadou (Zima *et al.*, 2004).



Obr. 1. Obecný princip PCR (Holasová *et al.*, 2006).

Základními komponentami pro PCR jsou templátová DNA, směs všech čtyř nukleotidů dNTP, dvojice primerů, termostabilní DNA polymeráza, pufr, Mg^{2+} ionty a kvalitní destilovaná voda. Amplifikační cyklus se podle výše popsaného principu musí skládat ze tří kroků:

- **Denaturace**, při které se roztok zahřeje na teplotu 92-95°C a kdy dochází k disociaci DNA templátu na jednotlivé řetězce.
- **Annealing**, čili zchlazení a navázání primerů. Teplota se obvykle pohybuje mezi 45 a 60°C. Doba trvání prvních dvou kroků je krátká, 15-60s, většinou kolem 30s.
- Posledním krokem cyklu je **extenze**, při které dochází k vlastní syntéze nových řetězců, navazujících na 3'-konce primerů. Reakce je katalyzována *Taq* polymerázou při teplotě 72°C (v případě jiných polymeráz může být teplota odlišná). Volné nukleotidy jsou začleňovány do vznikajícího řetězce přibližně rychlostí 35 za sekundu. Délka trvání této fáze závisí na délce syntetizovaného fragmentu.

Tyto tři kroky se pravidelně opakují, většinou 20-40×. Doba první denaturace bývá zpravidla o něco prodloužena, protože zpočátku musí být disociovány delší fragmenty templátové DNA, kdežto v dalších krocích již jako templát slouží převážně nově amplifikované kratší fragmenty. Většinou se také na konec posledního cyklu připojuje několik minut trvající finální extenze, abychom vyloučili výskyt neúplných fragmentů kratší délky. Celá PCR probíhá v programovatelném termocykleru, který je schopen rychle a s velkou přesností měnit teplotu dle zadaného programu (Zima *et al.*, 2004).

Abychom dosáhli maximální specifity a senzitivity reakce, je důležité každou PCR optimalizovat a zvolit vhodný teplotní profil reakce. Stěžejními parametry jsou koncentrace Mg^{2+} a teplota annealingu ve vztahu k T_m (teplota tání) obou primerů. Dále můžeme optimalizovat koncentrace jednotlivých komponent PCR směsi.

Parametry PCR:

- Nižší **teplota annealingu** než je teplota optimální může snížit specifitu reakce (primery se navážou i na místa s méně komplementární sekvencí), vyšší teplota vede ke snížení annealingu a tím k nižšímu výtěžku reakce.
- **Čistota a množství templátové DNA** ovlivňuje efektivitu PCR. Kontaminace vzorku molekulami RNA může snižovat výtěžek tím, že chelatuje Mg^{2+} ionty nezbytné pro činnost DNA polymerázy. Činidla používaná při izolaci DNA mohou polymerázu inhibovat také.
- **Vlastnosti a koncentrace primerů.** Optimální délka primerů je 18 - 24 bází, optimální zastoupení G/C párů v rozmezí 40 - 60%. Primery by neměly být navzájem komplementární a neměly by tvořit vnitřní sekundární struktury. Důležitým faktorem je T_m primerů. Je to teplota, kdy je 50% dsDNA zdenaturováno na jednořetězcovou DNA. Tato teplota je určena délkou a sekvencí primerů. T_m obou primerů by se neměly příliš lišit. Je také nutné zvolit vhodnou koncentraci primerů. Vyšší koncentrace mohou způsobit chybný annealing a kumulaci nepacifických produktů. Naopak nízké koncentrace primerů budou výtěžek reakce snižovat.
- **Koncentrace Mg^{2+} iontů.** Tyto ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP, čímž vzniká vhodný substrát pro DNA polymerázu. Protože Mg^{2+} ionty interagují

také s fosfátovými skupinami nukleotidů, musí být jejich koncentrace vyšší než koncentrace dNTP. Optimální koncentrace se stanovuje experimentálně a obvykle se pohybuje v rozmezí 1,5 – 6 mM (při vyšších koncentracích aktivita *Taq* polymerázy klesá). Jestliže je příliš nízká, PCR neproběhne, nebo je její výtěžek velmi nízký. Naopak příliš vysoké koncentrace mohou způsobit amplifikaci nespecifických úseků DNA.

- **Koncentrace dNTP** bývá obvykle v rozmezí 200 – 250 μM . Vysoká koncentrace dNTP působí jako inhibitor, pravděpodobně vychytáním Mg^{2+} iontů. Nižší koncentrací dNTP zpravidla dosáhneme vyšší specifčnosti a naopak nižší frekvence začlenění nesprávného nukleotidu.
- **Optimální pH** PCR reakce, které zajišťuje pufr, se pohybuje v rozmezí 8,3 – 9. (Při teplotě polymerace pH klesá přibližně na 7,2.)
- **Koncentrace DNA polymerázy** v reakci je 0,5 – 2,5 U v 25 – 50 μl směsi. Vyšší koncentrace může být příčinou nespecifických produktů (Holasová *et al.*, 2006; Zima *et al.*, 2004).

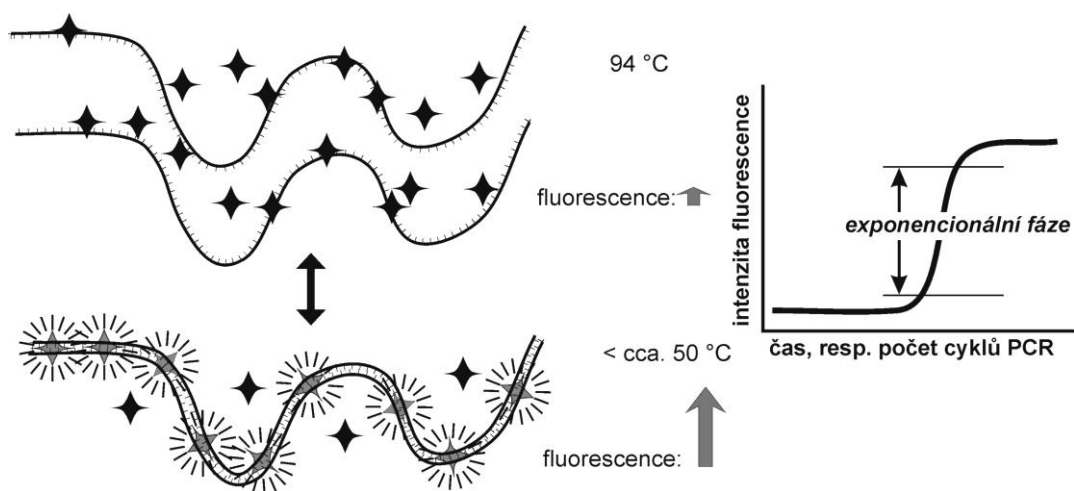
K potlačení některých nepříznivých faktorů a zvýšení efektivity PCR se do reakční směsi zpravidla přidávají i další činidla. Jde především o detergenty (např. Tween-20, Triton X-100), které potlačují tvorbu sekundárních struktur a mohou též zvýšit stabilitu enzymu. Ke stabilizaci enzymu se do roztoku přidává i albumin bovinního séra, nebo želatina. Přidání dimethylsulfoxidu, nebo glycerolu usnadňuje denaturaci a zlepšuje podmínky zchlazení. Většina těchto aditiv je již součástí speciálního pufru pro PCR, dodávaného výrobcem spolu s polymerázou (Zima *et al.*, 2004).

2.1.2. Real-time PCR a DNA sondy

Při klasickém provedení PCR následuje analýza amplifikované DNA až po proběhnutí reakce. Například lze vzorek naštěpit restričním enzymem a separovat vzniklé fragmenty gelovou elektroforézou (metoda RFLP, např. detekce mutací, určování paternitních vztahů), nebo lze vzorek (a standard) po elektroforetickém rozdělení kvantifikovat denzitometricky. Takové metody označujeme jako tzv. end-point. Naproti tomu tzv. real-time metody umožňují sledování amplifikované DNA v průběhu vlastní PCR (Holasová *et al.*, 2006).

Při real-time PCR tedy detekujeme amplikony již během jejich vzniku, většinou pomocí fluorescenčních barviv (fluoroforů). Termocykler, v němž reakce probíhá, musí být vybaven zdrojem excitačního záření a příslušným detektorem. Průběh PCR má klasický sigmoidální tvar. Odečítá se tzv. Ct hodnota (threshold cycle), což je počet cyklů PCR, při kterém dojde k signifikantnímu nárůstu fluorescence a protnutí stanoveného prahu. Tuto metodu lze využít například ke kvantifikaci DNA, kdy sestrojíme kalibrační křivku závislosti Ct na počtu molekul resp. koncentraci DNA. (Čím je výchozí koncentrace vyšší, tím dojde dříve k signifikantnímu růstu fluorescence.) Pokud při detekci DNA v průběhu reakce použijeme sekvenčně specifické fluorescenční sondy, můžeme určovat přítomnost či nepřítomnost určitého cílového místa (např. mutace) v našem vzorku. Výhodou real-time PCR je, že probíhá v uzavřeném systému (odpadá manipulace s produktem PCR) a že ji lze poměrně snadno optimalizovat a automatizovat (Holasová *et al.*, 2006).

Detekční metody lze rozdělit na specifické a nespecifické. Principem nespecifických metod je použití tzv. interkalačního barviva. Interkalace znamená vmezení určité látky do struktury dvouřetězcové DNA. Interkalační barviva (nejznámější je SybrGreen) nevydávají fluorescenci (nebo jen velmi nízkou), pokud jsou volně v roztoku. Jejich fluorescence výrazně vzroste po jejich interkalaci do dsDNA. Maximální množství dsDNA vzniká ve fázi extenze, proto se fluorescence zaznamenává právě na konci této části cyklu PCR. Nevýhodou této metody je nespecifita vazby, protože barvivo se interkaluje do jakékoli dsDNA a zaznamenaný signál může pocházet i od nespecifických produktů PCR nebo také dimerů primerů. Proto je po proběhnutí PCR ještě nutno provést analýzu teplotních křivek tání (melt curve analysis), která případná nespecifika odhalí. Amplifikovaný vzorek zahříváme a monitorujeme pokles fluorescence (barvivo se uvolňuje z denaturované DNA). Provedeme druhou derivaci a příslušná teplota tání se zobrazí jako pík. Pokud je detekována jediná T_m a souhlasí s hodnotou vypočítanou pro daný amplikon z jeho sekvence, pak je možné provést vlastní vyhodnocení. Přítomnost dalších hodnot T_m značí nespecifické produkty a případná kvantifikace by byla zatížena příliš velkou chybou (Holasová *et al.*, 2006).



Obr. 2. Princip použití dsDNA specifické interkalační barvy SybrGreen: Při teplotě denaturace DNA barva nefluoreskuje, protože není přítomna struktura dvouřetězce. Při nižší teplotě dojde k renaturaci, tj. vytvoření komplementárních dvouřetězců, do kterých je barva schopna interkalovat a po excitaci vydává výraznou fluorescenci. Intenzita fluorescence roste s množstvím molekul amplikonu (Holasová *et al.*, 2006).

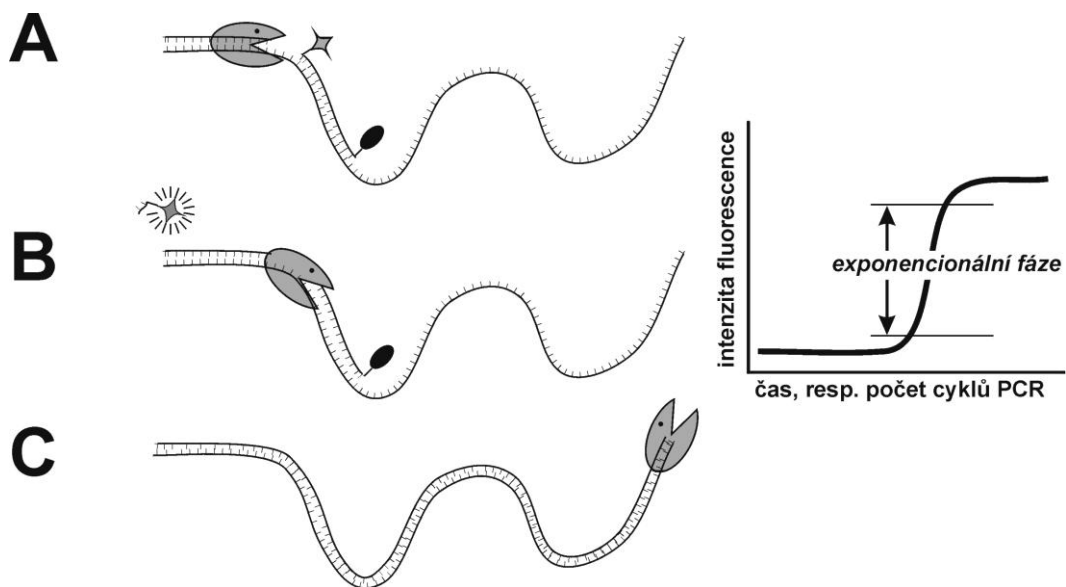
Specifické metody využívají fluorescenčních sond, které jsou komplementární k určité cílové sekvenci v analyzované DNA. Signál proto vzniká prakticky jenom amplifikací tohoto cílového úseku. Detekční systémy nejčastěji využívají efektu přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET). Při určité těsné blízkosti molekul může docházet k interakci jejich excitačních stavů. Absorpční spektrum příjemce (akceptoru) se musí překrývat s emisním spektrem molekuly dárce (donoru). Excitovaná molekula dárce předá energii příjemci a FRET se projeví buďto vznikem fluorescence příjemce (delší vlnové délky než má donor) nebo zhašením fluorescence dárce (Holasová *et al.*, 2006).

Existuje několik typů sond, které využívají princip FRET:

a) duálně značené hydrolyzační sondy

Hydrolyzační sondy jsou syntetické oligonukleotidy, komplementární k cílové sekvenci amplifikované DNA, označené na obou koncích (dual-labeled probes). Na 5'konci je navázán vhodný donor (reporter), na 3'konci je pak tlumič (quencher),

zhášec). Toto uspořádání mají například tzv. TaqMan sondy. Reporter po excitaci předá energii quencheru, pokud jsou obě molekuly dostatečně blízko sebe, což je dáno délkou sondy. Záření reporteru je utlumeno. Tento stav zůstává i po nasednutí sondy na vlákno DNA. Během extenze DNA polymeráza svou exonukleázovou aktivitou sondu postupně rozkládá. Reporter se odděluje od quencheru a na konci extenze můžeme detekovat maximum jeho záření (Pavlík a Pavlíková, 2004).



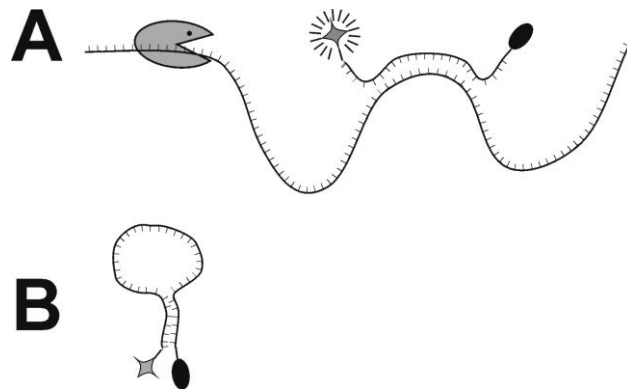
Obr. 3. Princip hydrolyzačních sond (TaqMan): Sonda je většinou navržena těsně za 3' konec jednoho z primerů a DNA polymeráza ji svou 5'→3' exonukleázovou aktivitou rozloží v průběhu amplifikace. Tím dojde k oddělení fluoroforu od zhášec (quencheru), který začne po excitaci vydávat výraznou fluorescence. Se zvyšujícím se množstvím molekul amplikonu vzrůstá i množství oddělených molekul fluoroforu a tím i detekované fluorescence (Holasová *et al.*, 2006).

b) duálně značené hybridizační sondy

Příkladem hybridizačních sond jsou tzv. Molecular Beacons. Obsahují krátké koncové sekvence, které jsou k sobě navzájem komplementární, takže sonda existuje ve tvaru vlásenky. Smyčka vlásenky obsahuje úsek komplementární k cílové sekvenci DNA. Konce sondy jsou opět označeny reporterem a quencherem, které jsou díky struktuře vlásenky v dostatečné blízkosti, a proto záření reporteru nemůže být

detekováno. Během annealingu sonda snadno hybridizuje s cílovou DNA, protože jednovláknový úsek sondy je mnohem delší než oba komplementární konce vlásenky. Dojde k oddálení reporteru a quencheru a maximum záření můžeme detekovat právě během annealingu (Pavlík a Pavlíková, 2004).

Molecular Beacons jsou navrhovány tak, aby stonek sondy ve volném stavu byl méně stabilní než dvouvlákno vznikající hybridizací sondy a cílové sekvence. Rozdíl jediného nukleotidu v cílové DNA, např. v důsledku bodové mutace, způsobí zachování stability vlásenkové formy sondy. Emise fluorescenčního signálu je tedy výhradně důsledkem komplementární vazby sondy na cílovou sekvenci. Tím je dána extrémní specifita reakce (Pavlík a Pavlíková, 2004).



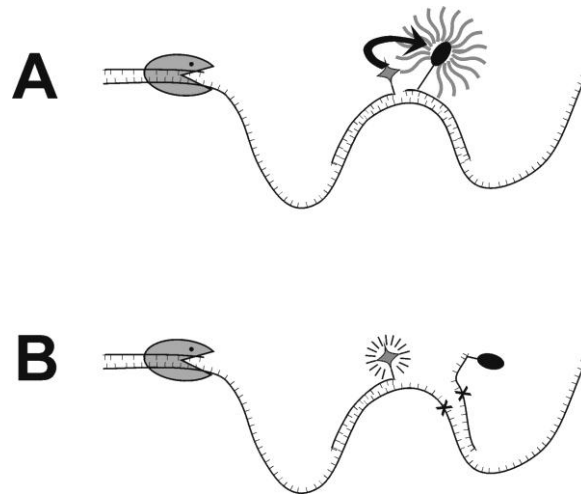
Obr. 4. Princip Molecular Beacons sond: Volná sonda existuje ve formě vlásenky s oběma konci vzájemně spojenými (B). V případě, že je přítomen specifický amplicon, sonda v průběhu fáze annealingu (A) hybridizuje ke své komplementární sekvenci, dojde k oddělení obou značících molekul a sonda vydává po excitaci intenzivní fluorescenci (Holasová *et al.*, 2006).

c) jednoduše značené sondy (FRET sondy)

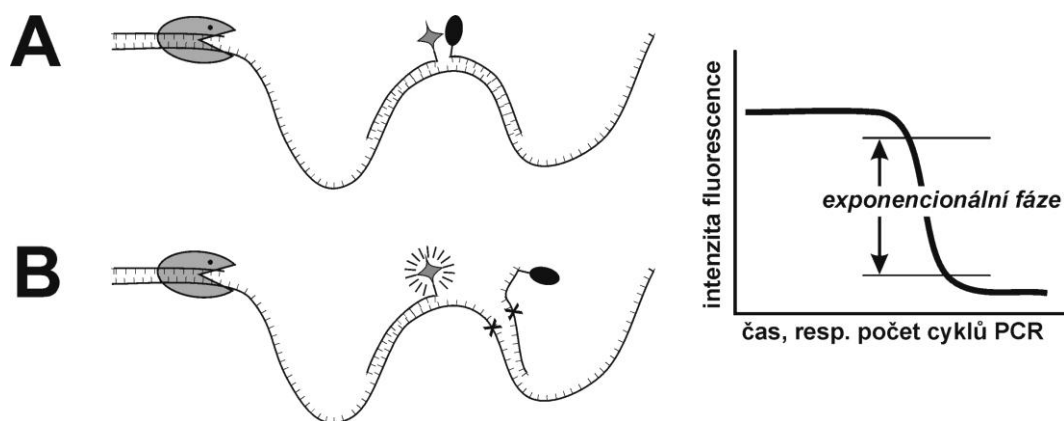
Jednoduše značené hybridizační sondy (mono-labeled probes) se používají ve dvojici. Každá z nich je komplementární k určitému úseku cílové DNA a tyto úseky jsou blízko sebe, obvykle s dvounukleotidovou mezerou. Tato vzdálenost umožňuje efektivní FRET. 5' konec jedné a 3' konce druhé sondy se tak během annealingu přiblíží.

Donor z jedné sondy pak po excitaci přenáší energii na akceptor na druhé sondě a fluorescenci akceptoru (o delší vlnové délce) detekujeme (Pavlík a Pavlíková, 2004).

Pokud hybridy tvořené každou z obou sond mají rozdílnou T_m (např. přítomnost mutace), při postupně stoupající teplotě se jedna z nich oddělí dříve a FRET se přeruší. (Totéž se stane, když je jedna ze sond rozložena polymerázou.) Jestliže na závěr PCR provedeme analýzu teplotních křivek tání (podobně jako při použití interkalačního barviva), můžeme v případě zdravého homozygota zaznamenat jeden pík o nižší T_m než v případě homozygota pro mutaci. V případě heterozygota detekujeme píky dva (Pavlík a Pavlíková, 2004; Holasová *et al.*, 2006).



Obr. 5. Princip použití FRET sond s jednou fluorescenční barvou jako donorem a druhou fluorescenční barvou jako akceptorem energie: K měření fluorescence dochází ve fázi annealingu, (A), kdy fluoreskují pouze navázané sondy. Se zvyšujícím se množstvím molekul amplikonu vzrůstá i množství molekul příjemce excitovaných energií dárce. V přítomnosti mutace není dosaženo úplné komplementarity, sonda s akceptorem se při závěrečném zahřívání vzorku odlučuje dříve než sonda s donorem (B) a její fluorescence zaniká (Holasová *et al.*, 2006).



Obr. 6. Princip použití FRET sond s fluorescenční barvou a quencherem: K měření fluorescence dochází ve fázi annealingu (A), kdy fluoreskují pouze nenavázané sondy. Se zvyšujícím se množstvím molekul amplikonu vzrůstá i množství zhasených molekul fluoroforu. Křivka má obrácený (klesající signál) sigmoidální tvar. V přítomnosti mutace se sonda s quencherem při závěrečném zahřívání vzorku odlučuje dříve než sonda s donorem (B), jejíž fluorescence se obnovuje (Holasová *et al.*, 2006).

Jako značící fluorofory se používají zejména fluorescein, hexachlorofluorescein, cyaninová barviva Cy3 a Cy5, rhodamin a další speciální barviva, jako je Oregon Green nebo LightCycler Red. Jako zhasěče se uplatňují např. dabcyll, dabsyl, „black hole quencher“ (BHQ) molekuly nebo barvivo TAMRA. Použití různých fluorescenčních barviv lišících se emisním spektrem umožňuje multiplexní reakce. Pak je možné v jediné zkumavce amplifikovat, detekovat a kvantifikovat několik různých sekvencí DNA najednou, záleží na počtu měřících kanálů v detektoru termocykleru (Pavlík a Pavlíková, 2004; Holasová *et al.*, 2006).

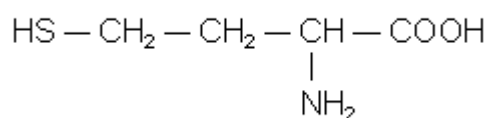
Novým typem sond jsou tzv. LNA (locked nucleic acid) sondy. LNA je typ analogu nukleových kyselin, který obsahuje 2' O, 4' C metylenový můstek uzamčený v tzv. C3'-endo konformaci, což omezuje flexibilitu ribofuranosového kruhu a zaručuje stabilní polohu jednotlivých bází. Tím je dána mimořádná specifita a stabilita hybridizace. T_m duplexu obsahujícího LNA monomery stoupá s každým zařazeným LNA nukleotidem o několik °C. LNA lze využít ve všech výše popsaných typech fluorescenčních sond. Vlastnosti sond obsahujících LNA monomery umožňují použít pro průkaz jednotlivých mutací při stejné teplotě podstatně kratších oligonukleotidů než u konvenčních DNA sond (Pavlík, 2004; Vester a Wengel, 2004).

2.2. Methylentetrahydrofolátreduktáza

N^5, N^{10} -methylentetrahydrofolátreduktáza (MTHFR) je jedním z enzymů účastnících se metabolismu homocysteinu (Hcy). Mutace mohou snížit aktivitu tohoto enzymu a tím ovlivnit i koncentrace homocysteinu v krvi. Hyperhomocysteinémie se zařadila mezi rizikové faktory aterosklerózy a trombózy. Kromě toho je postižena i metylace DNA, což má vztah k vrozeným defektům neurální trubice, rakovině a dalším onemocněním.

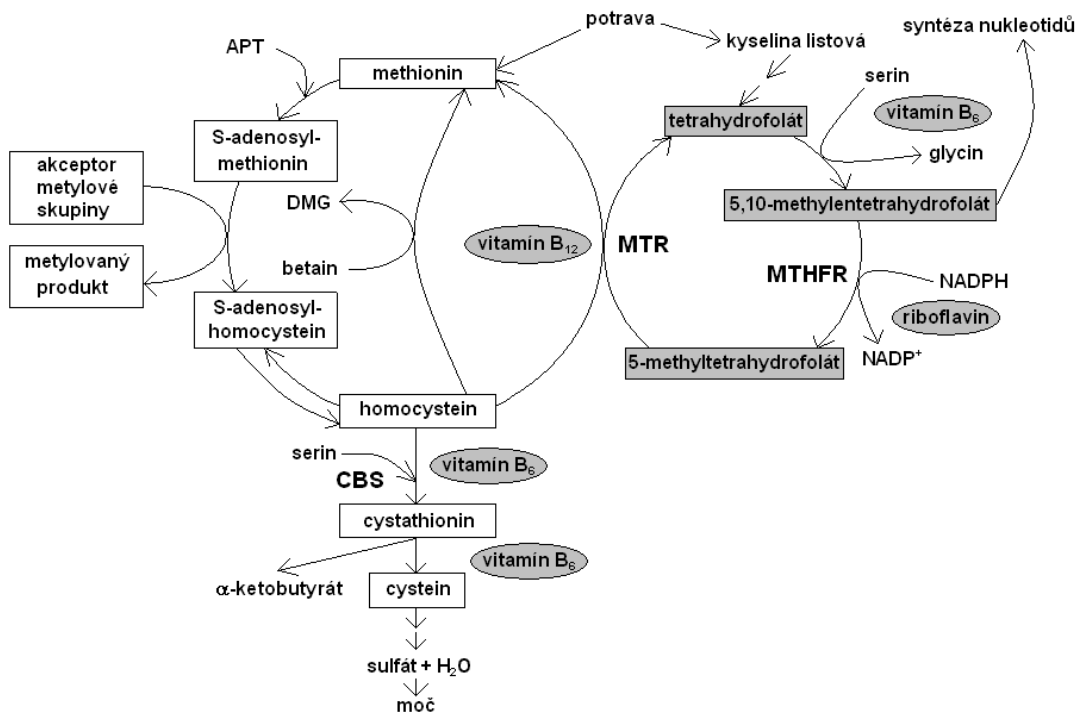
2.2.1. Homocystein

Homocystein (2-amino-4-thiomáselná kyselina) je neesenciální sirná aminokyselina, která vzniká jako meziprodukt metabolické přeměny methioninu na cystein. V biologických tekutinách se vyskytuje jako volný nebo vázaný na krevní bílkoviny disulfidickými či amidovými vazbami. Názvem homocyst(e)in je označován pool sestávající z redukovaného homocystieniu, homocystinu (oxidovaná forma), disulfidů a smíšených disulfidů homocysteinu. Za fyziologických podmínek činí podíl vázaného Hcy 70-90% (Zima, 2002).



Obr. 7. Strukturní vzorec homocysteinu (Zima, 2002).

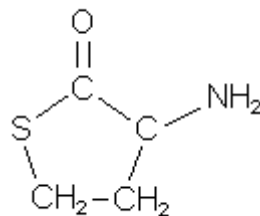
Hcy je buďto v remetylační dráze přeměněn na methionin, nebo transsulfurační cestou na cystathionin. První způsob vyžaduje kyselinu listovou (folát) a vitamin B_{12} (kobalamin), druhá reakce je závislá na přítomnosti pyridoxal-5'-fosfátu (derivát vitamínu B_6). Alternativní cesta přeměny Hcy na methionin vyžaduje jako substrát betain a omezuje se pouze na jaterní tkáň (Zima, 2002).



Obr. 8. Metabolismus homocysteinu (podle Robinsona, 2000).

Regulaci remetylační i transsulfurační dráhy zajišťuje intracelulární koncentrace S-adenosylmethioninu. Ten působí jako alosterický inhibitor MTHFR i jako alosterický aktivátor cystathionin- β -syntázy (CBS) (Zima, 2002).

Hcy také vytváří thiolakton (cyklický thioester), který je transportován do extracelulárního prostoru a je vysoce reaktivní. Tato reakce je spřažena s proteosyntézou a katalyzována methionin tRNA syntázou (Zima, 2002).



Obr. 9. Homocystein thiolakton (Zima, 2002).

V současné době se udávají fyziologické koncentrace celkového (volného i vázaného) homocysteinu v plazmě nalačno v rozsahu od 5 do 15 $\mu\text{mol/l}$. Když bazální koncentrace přesáhne tuto hladinu, mluvíme o hyperhomocysteinémii (hHcy). Rozlišují se tři stupně:

mírná hHcy	do 30 $\mu\text{mol/l}$
středně těžká hHcy	do 100 $\mu\text{mol/l}$
těžká hHcy	nad 100 $\mu\text{mol/l}$

Na manifestaci hyperhomocysteinémie se podílejí interakce exogenních a endogenních faktorů. Koncentrace Hcy obecně rostou s věkem, jsou vyšší u mužů než u žen a u žen se zvyšují po menopauze. Mezi exogenní příčiny hHcy patří nadměrný příjem živočišných bílkovin (přísun methioninu), deficit kyseliny listové a vitamínů B₂ (riboflavin), B₆ a B₁₂, nedostatek cholinu, zvýšená konzumace kávy a alkoholu, kouření a další. Mezi endogenními příčinami dominují genetické odchylky, například deficiencie MTHFR, CBS, MTR či poruchy transportu a metabolismu kobalaminu. I některá léčiva mohou způsobovat hHcy. Týká se to antikonvulziv (fenytoin, karbamazepin), cytostatik (metotrexát, azaribin), derivátů kyseliny nikotinové, diuretik, cyklosporinu nebo fibrátů (Robinson, 2000; Zima, 2002).

Souvislost mezi zvýšenými hladinami Hcy a kardiovaskulárními chorobami popsal poprvé Mc Cully v roce 1969. Předpokládá se, že hyperhomocysteinémie indukuje aterotrombózu řadou mechanismů, mezi něž patří funkční a morfologické poškození endoteliálních buněk (zvýšení proliferace, snížené uvolňování NO), zvýšená adhezivita a agregabilita krevních destiček, poruchy koagulační kaskády a fibrinolýzy (zvýšená aktivace faktorů XII a V, snížená aktivace proteinu C, inhibice exprese trombomodulinu) a modifikace lipoproteinů volnými radikály (vznikají při autooxidaci Hcy) (Matuška, 2003; Zima, 2002).

Z populačního hlediska se hHcy přisuzuje 10 % podíl na rizicích pro vznik ICHS. Zvýšení koncentrace Hcy o 5 $\mu\text{mol/l}$ představuje zvýšení rizika ICHS o 20 %, což je ekvivalentní nárůstu celkového cholesterolu v plazmě o 0,52 mmol/l (Boushey *et al.*, 1995). Wald *et al.* (2002) uvádějí, že snížení celkového Hcy o 3 $\mu\text{mol/l}$ vede ke snížení rizika infarktu myokardu o 24%. U nemocných s ICHS, systémovým lupus erythematoses, diabetes mellitus či renálním selháním je hHcy silným prediktorem mortality (Zima, 2002).

2.2.2. Struktura a funkce methylenetetrahydrofolátreduktázy

N^5, N^{10} -methylenetetrahydrofolát reduktáza (EC 1.5.1.20) je flavoprotein, který katalyzuje přeměnu N^5, N^{10} -methylenetetrahydrofolátu na N^5 -methyltetrahydrofolát. Enzymatické vlastnosti MTHFR poprvé popsali Kutzbach a Stokstad v roce 1971. MTHFR má dvě domény, katalytickou (na N-konci), která váže FAD, NADPH a methylenetetrahydrofolát, a regulační (na C-konci), která váže S-adenosylmethionin. Existují dvě izoformy enzymu o molekulové hmotnosti 77 resp. 70 kDa, přičemž kratší typ se nalézá jen v jaterní tkáni. MTHFR tvoří homodimer o celkové molekulové hmotnosti přibližně 150 kDa (Matthews *et al.*, 1998).

cDNA kódující lidskou MTHFR byla izolována a sekvenována v roce 1994. Zároveň byla stanovena primární struktura tohoto enzymu, který je složen z 656 aminokyselin. Vlastní gen byl lokalizován na konci krátkého raménka chromozomu 1 (oblast 1p36.3) a skládá se z 11 exonů. (Goyette *et al.*, 1998).

Methyltetrahydrofolát je kosubstrátem při remetylaci homocysteinu na methionin, který je dále přeměňován na S-adenosylmethionin (SAM). SAM slouží jako donor metylové skupiny v mnoha biosyntetických reakcích v organismu, přičemž z něj vzniká S-adenosylhomocystein (SAH) a následně homocystein. Aktivita MTHFR je alostericky regulována poměrem mezi S-adenosylmethioninem a S-adenosylhomocysteinem, protože SAM účinkuje jako inhibitor tohoto enzymu a SAH s ním soutěží o vazebné místo, ale sám jako inhibitor nepůsobí. Při dostatku SAM v buňce je tedy MTHFR inhibována, hladina intracelulárního methyltetrahydrofolátu je nízká a homocystein je degradován na cystathionin. V opačném případě MTHFR inhibována není a vznikající methyltetrahydrofolát je využíván při syntéze methioninu (Matthews *et al.*, 1998).

Deficience MTHFR, způsobená vzácnými recesivními mutacemi, patří mezi závažné metabolické poruchy a projevuje se obvykle hned po narození. Homocystinurii, hyperhomocysteinémií a hypomethioninémií doprovází opožděný vývoj, mikrocefalie, křeče, trombotické komplikace a mentální retardace.

Výhodou MTHFR je, že její funkci lze v případě snížené aktivity snadno podpořit dodáním substrátu, tedy kyseliny listové (nebo jejích derivátů). Také vitamíny B₂, B₆ a B₁₂ jsou důležité pro metabolismus homocysteinu a lze jimi úspěšně snižovat jeho hladiny. Rozdílný přísun těchto vitamínů v závislosti na stravovacích návycích obyvatel (podíl zeleniny ve stravě) také vysvětluje různý dopad mutací v genu pro MTHFR na zdravotní stav dané populace (Robinson, 2000).

2.2.3. Alelická varianta MTHFR 677C→T

2.2.3.1. Molekulární biologie

Objev substituce cytosinu thyminem v pozici 677 (exon 4) publikovali Frosst *et al.* (1995). Následkem je záměna aminokyseliny alaninu za valin v kodonu 222, která způsobuje termolabilitu a sníženou funkci MTHFR. Postižena je pravděpodobně katalytická oblast enzymu. Tato alelická varianta se považuje za polymorfismus, protože se vyskytuje s relativně vysokou frekvencí po celém světě. V Evropě se frekvence alely pohybuje mezi 0,20 a 0,53 (Botto a Yang, 2000). Vysoká frekvence polymorfismu je vysvětlována jako selekční výhoda v minulosti, kdy během hladomorů provázených deficitem vitamínu B₁₂ měli jedinci s redukovanou aktivitou MTHFR dostatek metylových skupin pro životně důležitou syntézu purinů a thymidinu. Nedostatek kobalaminu totiž blokuje remetylaci homocysteinu i folátový cyklus. Methyltetrahydrofolát se hromadí a další deriváty kyseliny listové z něj nemohou být syntetizovány (viz obr. 8). Termolabilní MTHFR chrání methyltetrahydrofolát před kompletní přeměnou na methyltetrahydrofolát, a díky tomu tento substrát zůstává dostupný pro syntézu nukleotidů (Blom, 1998).

Homozygoti pro mutantní variantu dosahují 30% *in vitro* aktivity nemutované MTHFR, u heterozygotů je to 60%. Homozygoti mají také přibližně o 25% vyšší hladiny homocysteinu v plazmě (Frosst *et al.*, 1995). Jacques *et al.* (1996) zjistili, že vliv mutované MTHFR závisí na hladině folátu v organizmu. V jejich studii měli jedinci s hladinou folátu v plazmě pod 15,4 nmol/l koncentrace Hcy o 24% vyšší, jestliže byly homozygoty pro variantu MTHFR 677C→T. Při koncentracích folátu nad 15,4 nmol/l nebyl rozdíl v koncentracích Hcy mezi různými genotypy pozorován.

Záměna aminokyseliny v bílkovinném řetězci zřejmě ovlivňuje stabilitu terciární a kvarterní struktury enzymu. Mutantní enzym totiž při teplotě nad 37°C třikrát rychleji disociuje na monomery a ztrácí svůj FAD kofaktor. Dostatečná hladina folátu v buňce pravděpodobně stabilizuje strukturu MTHFR a tím neutralizuje účinek mutace (Yamada *et al.*, 2001).

2.2.3.2. MTHFR 677C→T a kardiovaskulární choroby

Jestliže je hyperhomocysteinémie predispozičním faktorem aterosklerózy a trombotických stavů, pak by i mutace MTHFR 677C→T měla vykazovat takový vztah. Souvislost mezi termolabilní formou MTHFR, zvýšenou hladinou homocysteinu a ICHS poprvé publikovali Kang *et al.* (1993). Výsledky dalších studií nejsou ale jednoznačné, pravděpodobně zde hraje roli více faktorů.

Níže uvedené údaje pocházejí ze studií případů a kontrol (case-control study), což jsou observační analytické studie, do nichž jsou osoby vybírány podle toho, zda studované onemocnění mají (případy) nebo nemají (kontroly). Pro případy i kontroly jsou zjišťovány údaje o jejich expozici určitému rizikovému faktoru, v našem případě údaje o přítomnosti mutace. Relativní riziko plynoucí z přítomnosti či nepřítomnosti daného rizikového faktoru v tomto typu studií označujeme jako tzv. poměr šancí (odds ratio). Můžeme ho vypočítat např. podle vzorce $(A \times D) / (B \times C)$, kde A a B znamená počet exponovaných resp. neexponovaných nemocných jedinců a C resp. D značí počet exponovaných a neexponovaných zdravých jedinců v kontrolní skupině. Současně je vždy vhodné uvádět k odds ratio (OR) i interval spolehlivosti (confidence interval), obvykle to bývá 95%.

V metaanalýze, která zahrnovala 40 studií, Klerk *et al.* (2002) vypočítali souhrnný poměr šancí pro genotyp 677 TT ve vztahu k ICHS. OR bylo 1,16, což znamená o 16% vyšší riziko než u jedinců bez mutace. Výsledky se lišily při porovnání studií z Evropy a ze Severní Ameriky (OR 1,14 resp. 0,78). To je vysvětlováno interakcí mezi polymorfizmem MTHFR 677C→T a hladinou folátu v organizmu, která je dána mimo jiné stravovacími návyky. Autoři uvádějí, že jedinci s homozygotním genotypem mají vyšší riziko ICHS zvláště při nedostatku folátu.

Další metaanalýza se zaměřením na ICHS, hlubokou žilní trombózu a mozkovou mrtvici, přinesla podobné výsledky. U ICHS bylo OR pro homozygoty 1,21 a pro heterozygoty 1,06, u hluboké žilní trombózy 1,29 resp. 1,05, u mozkové mrtvice 1,31 a 1,15. Riziko při nárůstu tHcy o 5 $\mu\text{mol/l}$ bylo u každé ze studovaných patologických jednotek mnohem výraznější, než v přítomnosti samotné mutace (Wald *et al.*, 2002).

Nejnovější metaanalýza studií případů ICHS a kontrol udává OR pro homozygoty 1,14 a byla opět nalezena heterogenita mezi různými populacemi. Po rozdělení analyzovaných studií podle geografických regionů byla OR u evropské populace 1,08, v

Severní Americe 0,93, v Austrálii 1,04, na Středním východě 2,61, v Japonsku 1,71 a v Číně, Koreji a na Taiwanu 0,84. Průměrný rozdíl v koncentracích homocysteinu mezi genotypy 677 CC a TT byl 2,24 $\mu\text{mol/l}$. V evropské, australské a severoamerické populaci tedy nebyl nalezen dostatečný důkaz o příčinném vztahu mezi genotypem 677 TT, homocysteinem a ICHS. Autoři podporují domněnku, že výsledky studií v některých částech světa jsou ovlivněny příjmem folátu v potravinách. V USA, kde je mouka fortifikována folátem, byly mnohem menší rozdíly v hladinách Hcy v závislosti na genotypu, než v jiných regionech (Lewis *et al.* 2005).

Hackam a Anand (2003) konstatují, že důkazy pro zařazení polymorfizmu MTHFR 677C→T a hladiny Hcy v etiologii aterosklerózy zjištěné v prospektivních dlouhodobých studiích byly zatím méně přesvědčivé než důkazy z retrospektivních studií případů a kontrol. Na otázku, zda se homocystein účastní aterosklerózy jako příčinný faktor, či zda je pouze markerem onemocnění cév, bude možno odpovědět až po dokončení velkých randomizovaných kontrolovaných studií účinku vitaminů snižujících koncentraci homocysteinu.

Zpochybňován je i samotný negativní účinek Hcy na cévní stěnu a koagulační systém, například proto, že při *in vitro* experimentech byly použity nepřiměřeně vysoké koncentrace Hcy (Selhub a Angelo., 1997).

2.2.3.3. MTHFR 677C→T, defekty neurální trubice a další vrozené poruchy

Defekty neurální trubice (NTD) jsou skupinou onemocnění způsobenou nedokonalým uzavíráním neurální trubice během fetálního vývoje. Etiologie zahrnuje environmentální i genetické faktory. Nejběžnějšími formami NTD jsou rozštěp páteře (*spina bifida*), anencefalie a encefalokéla. Frekvence výskytu NTD je přibližně 1:1000, ale liší se v různých oblastech či etnických skupinách (Botto a Yang, 2000).

Zájem o metabolismus homocysteinu ve vztahu k NTD byl podnícen zjištěním, že matky takto postižených dětí mají zvýšené hladiny Hcy a že podávání folátu během těhotenství zmenšuje riziko vzniku NTD u dítěte (van der Put *et al.*, 2001). Snížená aktivita MTHFR vede k omezení remetylace homocysteinu a tím i úbytku SAM, který je využíván jako donor metylové skupiny v mnoha reakcích. Nedostatečná metylace klíčových metabolitů, změny v distribuci folátu i přímá toxicita homocysteinu jsou považovány za možné příčiny teratogeneze.

V první studii, která se zabývala defekty neurální trubice a výskytem alely 677 T, byl zjištěn přibližně trojnásobný nárůst rizika vzniku spiny bifidy u homozygotního jedince a stejný nárůst rizika narození takto postiženého dítěte homozygotní matce (van der Put *et al.*, 1995).

Christensen *et al.* (1999) uvádějí, že 20% případů NTD a 18% matek postižených dětí v jejich studii bylo homozygotních pro alelu 677 T ve srovnání s 11% zdravých dětí i zdravých matek. Riziko vzniku spiny bifidy bylo šestkrát vyšší, když byly matka i dítě homozygoti pro mutaci, než když měli oba genotyp 677 CC. Když byla homozygotní jen matka, bylo OR 2,0. Dále měli pacienti i jejich matky snížené hladiny folátu v erythrocytech, ty se ale nelišily v závislosti na jejich genotypu. Autoři konstatují, že interakce mezi nízkým stavem kyseliny listové v organizmu a polymorfizmem MTHFR 677C→T přináší vyšší riziko vzniku NTD než přítomnost samotné mutantní alely.

Botto a Yang (2000) shrnují výsledky ze studií případů a kontrol z let 1995 – 1999. Sdružené OR pro výskyt NTD mezi homozygoty bylo 1,8, mezi heterozygoty 1,2. OR pro narození dítěte s NTD homozygotní či heterozygotní matce bylo 2,0 resp. 1,2. Genotyp otce signifikantně neovlivňoval výskyt spiny bifidy u jeho potomků, což podporuje teorii, že genotyp matky nezávisle přispívá k riziku NTD u jejího dítěte. Donnelly a Isotalo (2001) uvádějí, že vznik NTD bude podmiňovat především hladina kyseliny listové u matky, protože mateřská MTHFR ovlivňuje kvantitu a formu folátu, který dostává plod, jehož genotyp rozhoduje pouze o utilizaci a distribuci dodaného folátu.

Uvažuje se také o vztahu alely 677 T a rozštěpových vad obličeje. Mills *et al.* (1999) zjistili třikrát častější výskyt homozygotního genotypu u jedinců s rozštěpem patra v porovnání s kontrolní skupinou. I v případě rozštěpových vad obličeje je patrný vliv mateřského genotypu, protože Martinelli *et al.* (2001) našli vyšší frekvenci alely 677 T mezi matkami takto postižených dětí než v kontrolní skupině.

Mnoho studií hledá souvislost mezi výskytem Downova syndromu a polymorfizmem MTHFR 677C→T. Příčinou trisomie chromozomu 21 je abnormální segregace během meiózy, která může být způsobena chybnou metylací v oblasti centromer. Metylace DNA je postižena právě při snížené funkci MTHFR a dalších enzymů účastnících se metabolismu homocysteinu a methioninu či vlivem nedostatku folátu (Hobbs *et al.*, 2000).

Ve studii 157 matek dětí s Downovým syndromem byl výskyt alely 677 T vyšší u těchto žen než u kontrolní skupiny matek zdravých dětí. OR pro heterozygotní matku

bylo 1,87 a pro matku s homozygotním genotypem 2,06 (Hobbs *et al.*, 2000). Naopak O'Leary *et al.* (2002) zjistili téměř stejnou frekvenci mutantní alely mezi pacienty z Downovým syndromem i kontrolní skupinou.

Hobbs *et al.* (2002) také zkoumali přenos alely 677 T z heterozygotních rodičů na potomky s Downovým syndromem. Ve 177 rodinách byla potomku s Downovým syndromem mutantní alela 677 T předána ve 106 případech a alela 677 C v 71 případech. Protože většina těhotenství s trisomií chromozomu 21 končí spontánním potratem, autoři zvýšený přenos mutantní alely přeživším plodům vysvětlují jako selekční výhodu. Plody s termolabilní MTHFR by mohly lépe přežívat díky příznivé distribuci folátu mezi syntézu DNA i metylační reakce v buňce. Snížená aktivita MTHFR zvýhodňuje syntézu purinových a thymidinových bazí DNA (je přebytek metylentetrahydrofolátu). Jedním z genů na chromozomu 21, který je díky třem kopiím exprimován v nadbytku, je i cystathionin- β -syntáza odstraňující homocystein z organismu. Dostatek metylentetrahydrofolátu pro syntézu DNA tedy může zajišťovat snížená aktivita MTHFR plodu a homocystein pro následnou syntézu SAM a metylační reakce může přicházet od matky s relativním nadbytkem Hcy, která je taktéž nositelkou mutantní alely 677 T.

Gueant *et al.* (2003) porovnal několik studií o vlivu polymorfismů v genech enzymů účastnících se metabolismu Hcy na riziko vzniku NTD a Downova syndromu. Vliv polymorfismus MTHFR 677C \rightarrow T na vývoj těchto poruch byl prokázán ve studiích z Holandska, Irska a Severní Ameriky, zatímco studie například z Francie a Sicílie toto nezjistily. Autoři rozdílné výsledky z různých geografických oblastí zdůvodňují odlišnými nutričními a genetickými charakteristikami zkoumaných populací.

Podobně jako u kardiovaskulárních chorob, ani v případech vrozených vývojových poruch nejsou výsledky studií jednoznačné. Příčiny těchto onemocnění jsou multifaktoriální, riziko roste vlivem nepříznivého nutričního stavu dané populace (nedostatečný přísun kyseliny listové a vitamínů skupiny B) i vlivem současného výskytu dalších mutací v genech, které kódují ostatní enzymy metabolismu homocysteinu a methioninu (methioninsyntáza, methioninsyntáza-reduktáza).

2.2.3.4. MTHFR 677C→T a komplikace v těhotenství

Je známo, že vaskulární choroby a trombofilie zvyšují riziko těhotenských komplikací u žen (Abbate *et al.*, 2002). Protože homocystein je jednou z příčin cévních onemocnění, pozornost získal i možný vliv mutace MTHFR 677C→T na vznik preeklampsie a dalších poruch v těhotenství. Výsledky některých studií tuto souvislost podporují, jiné nikoliv.

Vztah mezi hHcy, mutací MTHFR 677C→T a opakovanými potraty před 16. týdnem těhotenství uvádějí například Abbate *et al.* (2002).

Alfirevic *et al.* (2002) shrnuli výsledky několika studií, které se zabývaly prevalencí trombofilních faktorů u žen s preeklampsií, eklampsií, adrupcí placenty nebo s předčasným porodem dítěte. Mezi takovými ženami byl častější výskyt hyperhomocysteinémie i homozygotního genotypu 677 TT, ale vzhledem k malému rozsahu studií nebylo možné vypočítat objektivní riziko.

Wiwanitkin (2005) provedl metaanalýzu osmi studií případů opakovaných potratů. Frekvence alely 677 T byla 0,315 mezi pacientkami a 0,335 v kontrolní skupině. Nebyla nalezena ani asociace mezi genotypem pacientek a jejich etnickým původem.

2.2.3.5. MTHFR 677C→T a nádorová onemocnění

Jelikož funkce MTHFR ovlivňuje metabolismus folátu, jehož dostatečný přívod a správná distribuce jsou klíčové pro syntézu i metylaci DNA, byla mutace MTHFR 677C→T dána do souvislosti s nádorovým bujením. U některých druhů rakoviny je přítomnost této mutace považována za predispoziční faktor, u jiných má paradoxně ochranný význam.

Deficience folátu souvisí s inkorporací uracilu do DNA a následnými zlomy během excize uracilu v rámci reparací DNA. To zvyšuje riziko chromozomálních aberací. Snížená aktivita MTHFR směřuje distribuci intracelulárních metabolitů kyseliny listové k syntéze nukleotidů a proto by mohla mít určitý ochranný vliv. Buňky s vysokou replikační aktivitou, jako jsou hematopoetické buňky, jsou navíc pravděpodobně citlivější k dostupnosti folátu. U jedinců s termolabilní formou MTHFR bylo skutečně nalezeno nižší riziko vzniku lymfoidní leukémie. U myeloidní leukémie se taková asociace nevyskytla, což může znamenat rozdílné nároky na folát, nebo

rozdílnou náchylnost k chromozomálnímu poškození mezi myeloidními a lymfoidními buňkami (Robien a Ulrich., 2003).

Ochranný účinek polymorfizmu MTHFR 677C→T byl kromě některých druhů leukémie nalezen i u kolorektálního karcinomu. Duthie *et al.* (2004) vysvětlují tuto skutečnost ve své studii podobným mechanismem. Snížená hladina folátu v plazmě je rizikovým faktorem rakoviny tlustého střeva. Deficience folátu může snižovat metylaci DNA (a tím aktivovat protoonkogeny) a/nebo způsobovat nestálost DNA inkorporací uracilu. MTHFR rozhoduje o distribuci folátu mezi tyto metabolické cesty. Riziko kolorektálního karcinomu bylo opravdu sníženo u jedinců homozygotních pro termolabilní formu MTHFR, pravděpodobně proto, že většina methylenetetrahydrofolátu je dostupná pro syntézu nukleotidů (a konverzi uracilu na thymidin), čímž je DNA stabilizována.

Ulvik *et al.* (2001) zkoumali interakce mezi kouřením, hladinou folátu, mutací MTHFR 677C→T a výskytem rizikových polypů v tlustém střevě a konečniku. Nejrizikovější se jevíli kuřáci s nízkou hladinou folátu a genotypem 677 CT a TT nebo kuřáci s vysokou hladinou folátu a genotypem CC. Kouření a nedostatečný přívod kyseliny listové tedy snižují ochranný efekt polymorfizmu MTHFR 677C→T proti vzniku kolorektálního karcinomu.

Vznik rakoviny by mutace MTHFR 677C→T mohla vyvolávat narušením metylace DNA, protože regulace genové exprese je mimo jiné zajišťována právě stupněm metylace promotorových oblastí. Friso *et al.* (2002) měřili úroveň metylace DNA v závislosti na hladinách folátu v plazmě a erytrocytech a v závislosti na MTHFR genotypu. Methylace DNA byla určena jako obsah metylcytosinu v DNA z periferních mononukleárních leukocytů. Při hladině folátu nad 12 nmol/l byla úroveň metylace u genotypů 677 CC i TT podobná, ale při koncentracích pod 12 nmol/l byla metylace zřetelně snížena u homozygotů pro mutaci. Podobně úroveň metylace závisela na genotypu pouze u jedinců s nízkým obsahem intracelulárního folátu. Otázkou zůstává, jestli se hypomethylace nalezená v periferních mononukleárech objevuje také v ostatních tkáních.

Ve studii Heijmanse *et al.* (2003) bylo riziko vzniku rakoviny u zdravých mužů téměř dvakrát vyšší, jestliže byli homozygoty pro alelu 677 T, než když měli obě alely bez mutace. Riziko bylo signifikantní pro rakovinu prostaty, tlustého střeva a

konečníku, ledvin a močového měchýře, zvláště při nízké hladině kyseliny listové v plazmě.

Kromě nedostatku metylových skupin (ve formě SAM) vzniká při snížené aktivitě MTHFR také nadbytek homocysteinu. Při metylaci DNA využívají methyltransferázy SAM jako donor metylové skupiny a vedlejším produktem reakce je SAH, který má při nadbytku Hcy tendenci se akumulovat v buňce. SAH účinkuje jako inhibitor methyltransferáz. I tímto způsobem polymorfismus MTHFR ovlivňuje metylaci DNA. (Castro *et al.*, 2004).

2.2.3.6. MTHFR 677C→T a psychická onemocnění

Zvýšený výskyt hyperhomocysteinémie a homozygotního genotypu 677 TT byl zaznamenán i mezi pacienty s Alzheimerovou chorobou, schizofrenií nebo depresí. Uvažuje se o přímém toxickém působení homocysteinu v mozku, vaskulárním poškození či narušení metabolismu jednovuhlíkatých sloučenin, které jsou důležité pro správnou funkci neuronů. (Bejjland *et al.*, 2003; Sachdev, 2004).

2.2.4. Alelická varianta MTHFR 1298A→C

Van der Put *et al.* (1998) popsali další polymorfismus v genu MTHFR. V pozici 1298 nukleotidového řetězce (exon 7) je zařazen cytosin místo adeninu, což se v aminokyselinové sekvenci projeví záměnou glutamové kyseliny za alanin v kodonu 429. K záměně dochází pravděpodobně v regulační doméně enzymu. Aktivita MTHFR je opět snížena, u homozygotů dosahuje přibližně 60% aktivity nemutovaného enzymu, ale nedochází ke změnám koncentrací homocysteinu a folátu jako u varianty 677C→T. Ve studii Weisberga *et al.* (2001) dosahoval enzym s mutací 677C→T 45% aktivity nepostíženého enzymu, při současné přítomnosti obou polymorfizmů to bylo 41%. Koncentrace homocysteinu byla v případě jedinců heterozygotních pro obě mutace vyšší, než v přítomnosti samotné varianty 677C→T. Yamada *et al.* (2001) však nenalezli rozdíl mezi biochemickými vlastnostmi varianty 1298A→C a enzymu bez mutace.

Frekvence polymorfizmu je obdobná jako u varianty 677C→T, v Evropě se pohybuje od 0,22 do 0,36 (Robien a Ulrich, 2003). Klinické souvislosti mutace

1298A→C jsou také podobné, i když v porovnání s termolabilní variantou jsou rizika poněkud menší.

Zajímavé je srovnání frekvence společného výskytu jednotlivých alel obou polymorfizmů (frekvence haplotypů). Ogino a Wilson (2003) provedli metaanalýzu výsledků 16 studií, které dohromady zahrnovali 5 389 osob. Nejčastější genotyp byl 677 CC/1298 AC (1225 případů), genotyp 677 TT/1298 CC se vůbec nevyskytoval. Odhadované frekvence jednotlivých kombinací byly: 0,37 pro 677 C/1298 A, 0,31 pro 677 C/1298 C, 0,32 pro 677 T/1298 A a přibližně 0,003 pro 677 T/1298 C.

Isotalo *et al.* (2000) sledovali výskyt MTHFR genotypů u nedonošených plodů a zdravých novorozenců. Veškeré možné kombinace obou polymorfizmů byly nalezeny ve vzorcích DNA z fetálních tkání, kdežto genotypy 677 CT/1298 CC a 677 TT/1298 CC se nevyskytovaly ve vzorcích z pupečnickové krve novorozenců. To naznačuje sníženou životaschopnost plodů nesoucích tři nebo čtyři mutantní alely MTHFR. Přítomnost kombinace 677 TT/1298 AC v obou studovaných skupinách autoři vysvětlují jako pravděpodobný rozdíl v enzymatické aktivitě obou genotypů se třemi mutacemi *in vivo*.

3. Experimentální část

3.1. Přístroje a reagensie

Odběr krevních vzorků:

dezinfekční roztok Ajatin 50 ml, Profarma-Produkt (ČR)
sterilní jehly Sterican® 0,70×40 mm, Braun (Německo)
filtrační papír

Izolace DNA:

analytické váhy, BOECO (Německo)
laminární box Fatran (ČR)
chlazená centrifuga 4K15, SIGMA (Německo)
stolní centrifuga
třepačka TK3S, Techno Kartell (Itálie)
termocykler PTC 200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research (USA)
mikrotitrační destičky

Milli-Q voda, MILLIPORE (Francie)
izolační pryskyřice Chelex®100 Resin 100 g, BIO-RAD (USA)

PCR:

laminární box AURA 2000 BS, Bio Air Instruments (Itálie)
stolní centrifuga MINI MOUSE, Deville
třepačka Vortex V1 plus, BOECO (Německo)
UV transluminátor UVC508, ULTRA LUM (USA)
termocykler Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research (Austrálie)
Rotor-Gene Real-Time Analysis Software – verze 6, Corbett Research (Austrálie)

Milli-Q voda, MILLIPORE (Francie)
pufr: 10x iTaq™ Buffer 1,25 ml, BIO-RAD (USA)
nukleotidy: dNTP Mixture 1,28 ml (2,5 mM each), TaKaRa (Japonsko)
hořčík: Magnesium Chloride sol. 1,5 ml (Conc. 25 mM), AB gene

polymeráza: iTaq™DNA Polymerase 50 µl (5 units/µl), BIO-RAD (USA)

primery a sondy, Generi Biotech (ČR)

acetamid 5%

Ostatní pomůcky a zařízení:

mikropipety a pipetovací špičky

mikrozkumavky

podložky pod mikrozkumavky

nůžky

pinzety

latexové rukavice

buničitá vata

chladničky

mrazící box

3.2. Pracovní postupy

3.2.1. Odběr krevních vzorků

Vzorky jsme odebírali od dobrovolných dárců, převážně studentů Farmaceutické a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Každý dárcce vyplnil a podepsal informovaný souhlas a obdržel informace o účelu a klinických souvislostech vyšetření (viz přílohy). Po ošetření bříška prstu horní končetiny dezinfekčním roztokem jsme provedli vpich sterilní jehlou. Odebrali jsme dvě kapky kapilární krve na ústřížek filtračního papíru. Po zaschnutí se ústřížky s krevními skvrnami skladovaly v plastových sáčcích při laboratorní teplotě. Získali jsem celkem 150 krevních vzorků.

3.2.2. Izolace DNA

Izolaci DNA jsme provedli pomocí pryskyřice Chelex 100. Tato metoda byla vyvinuta pro získávání DNA z forenzních vzorků, je poměrně jednoduchá a rychlá, nevyužívá organická rozpouštědla a je stejně efektivní jako klasická fenol-chloroformová extrakce (Walsh *et al.*, 1991).

Postup izolace byl následující:

- Sterilní deionizovanou vodu jsme napipetovali po 150 μl do jamek v mikrotitrační destičce.
- Do každé jamky jsme přidali 9 – 25 mm^2 filtračního papíru nasáklého krví.
- Vzorky jsme důkladně protřepali (vortexovali) a inkubovali při laboratorní teplotě 30 minut.
- Na chlazené centrifuze jsme vzorky stočili při maximálních otáčkách (5100 rpm) 2 minuty.
- Supernatant jsme odsáli tak, aby v jamkách zbylo 20 – 30 μl sedimentu včetně zbytků materiálu.
- Do jamek jsme přidali po 100 μl 5% Chelexu 100 (0,5 g Chelexu 100 rozpuštěno v 10 ml sterilní deionizované vody).
- Směs jsme inkubovali 20 minut při 56°C v termocykleru PTC 200.

- Vzorčky jsme vortexovali a inkubovali dalších 8 minut při 100°C.
- Po zchlazení na laboratorní teplotu jsme vzorčky opět vortexovali a nakonec stočili na chlazené centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 20 minut.
- Supernatant jsme přepipetovali do sterilních mikrozkušavek a takto získaná DNA se skladovala v mrazicím boxu při -20°C.

3.2.3. Analýza vzorků DNA

Návrh a výroba sond i primerů a optimalizace PCR byly provedeny v laboratořích Generi Biotech. Při vlastní analýze jsme používali duálně značené hydrolyzační sondy, fluorescenčním barvivem HEX (hexachlorofluorescein) byla vždy označena sonda komplementární k mutované alele, barvivem FAM (fluorescein) potom sonda specifická pro alelu bez mutace. U obou typů byla jako zhášec použita molekula BHQ (black hole quencher). Určité baze v sekvenci sond byly nahrazeny nukleotidy typu LNA.

Zpracování izolované DNA bylo následující:

Nejprve jsme připravili tzv. master mix obsahující všechny složky PCR směsi kromě DNA. Objem reagentů v master mixu odpovídal celkovému objemu reagentů v určitém počtu mikrozkušavek (PCR zkumavek), použitých v dané sérii analýz. (V termocykleru Rotor–Gene RG-3000 lze najednou analyzovat maximálně 36 vzorků.) Směs z master mixu jsme rozpipetovali po 18 µl do příslušného počtu PCR zkumavek, přidali jsme 2 µl izolované DNA a vzorčky stočili na stolní centrifuze. Poté jsme vzorčky vložili do rotoru cykleru.

PCR směsi jsme připravovali podle následujících protokolů:

Vyšetření polymorfizmu MTHFR 677C→T:

Reagencie (konc. v reakci)	Objem/ μ l
Voda	4,95
Pufr	2,00
Směs nukleotidů	1,60
MgCl ₂ 25 mM (4,0 mM)	3,20
sense *222 R4 (600 nM)	1,00
antisense *222 R5 (600 nM)	1,00
FAM sonda *242 M8 (300 nM)	1,00
HEX sonda *242 M9 (300 nM)	1,00
polymeráza	0,25
DNA	2,00

Tab. 1. Složení PCR směsi pro analýzu MTHFR 677C→T (objem jedné reakce 20 μ l).

PCR měla tento teplotní profil:

- úvodní denaturace 95°C/3min
- 65 cyklů:
 - denaturace 95°C/15s
 - annealing 56°C/40s
 - (k polymeraci dochází během přechodu teploty od annealingu k denaturaci)

Vyšetření polymorfizmu MTHFR 1298A→C:

Reagencie (konc. v reakci)	Objem/ μ l
Voda	6,55
Pufr	2,00
Směs nukleotidů	1,60
MgCl ₂ 25 mM (4,5 mM)	3,60
sense * 262 C8 (300 nM)	1,00
antisense * 262 C9 (300 nM)	1,00
FAM sonda * 261 L6 (200 nM)	1,00
HEX sonda * 261 L7 (200 nM)	1,00
polymeráza	0,25
DNA	2,00

Tab. 2. Složení PCR směsi pro analýzu MTHFR 1298A→C (objem jedné reakce 20 μ l).

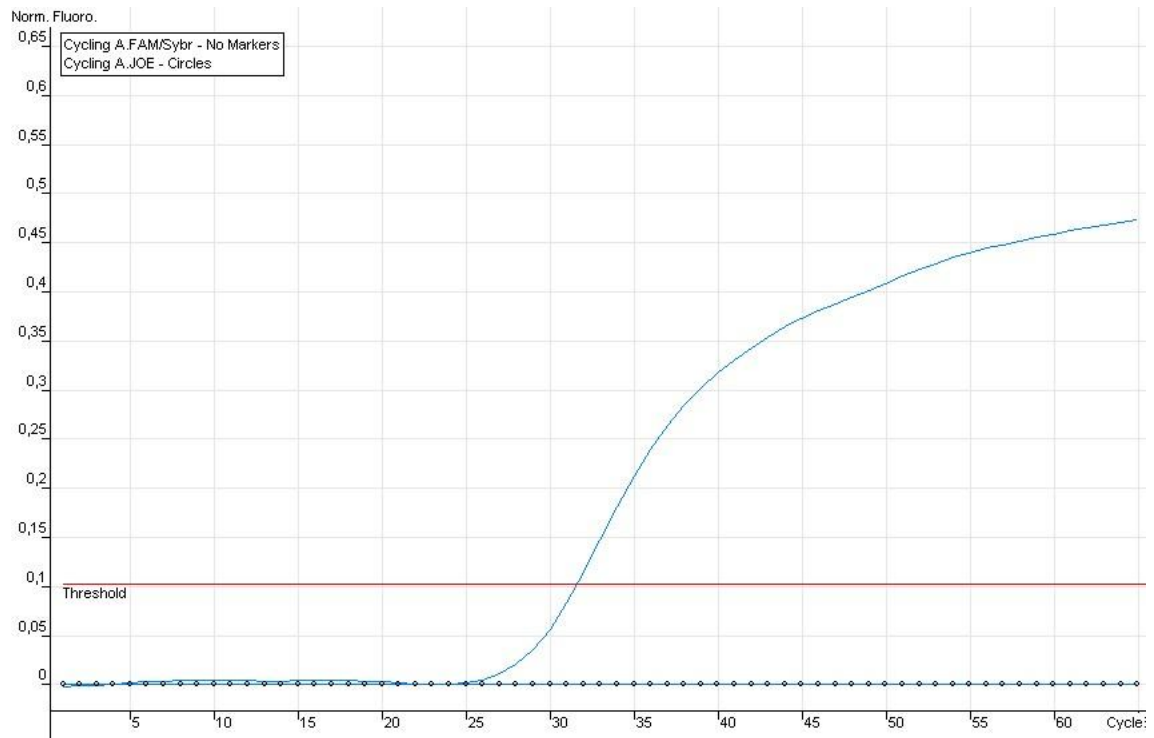
Teplotní profil reakce:

- úvodní denaturace 95°C/3min
- 55 cyklů:
 - denaturace 95°C/30s
 - annealing 60°C/60s

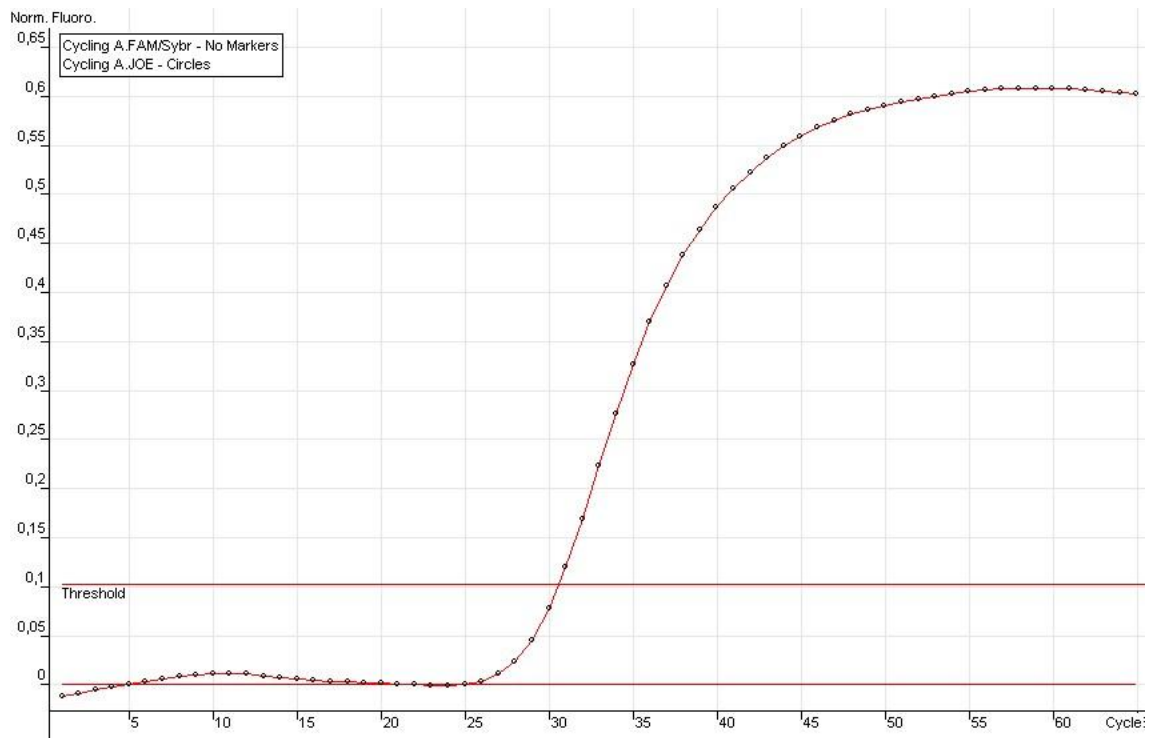
V každé sérii analýz jsme používali pozitivní a negativní kontroly pro zajištění správnosti výsledků a odhalení případné kontaminace vzorku během přípravy PCR směsi. Jako pozitivní kontroly sloužily vzorky DNA se známým genotypem, na kterých byla metoda původně optimalizována, negativní kontrolu představovala sterilní deionizovaná voda. Přítomnost či nepřítomnost mutace jsme vyhodnotili pomocí softwaru Rotor-Gene - verze 6 na základě průběhu PCR křivek, vzorky s nejednoznačným výsledkem jsme zopakovali.

Záznam real-time PCR:

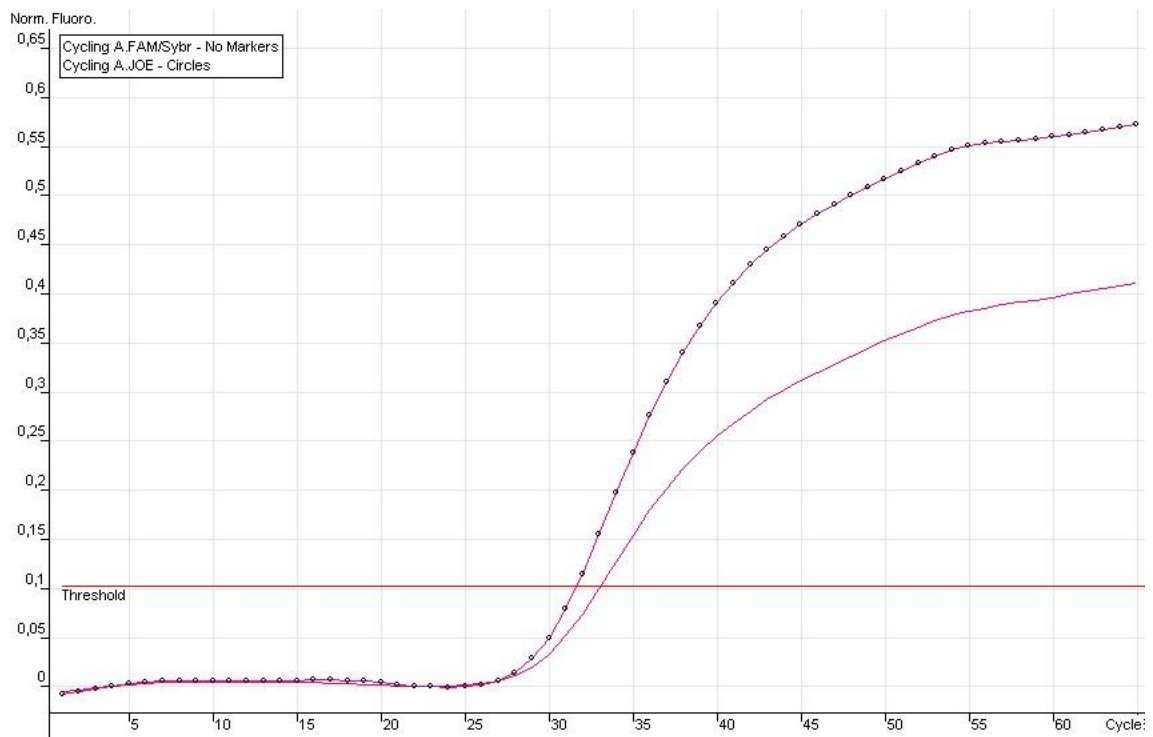
- MTHFR 677C→T



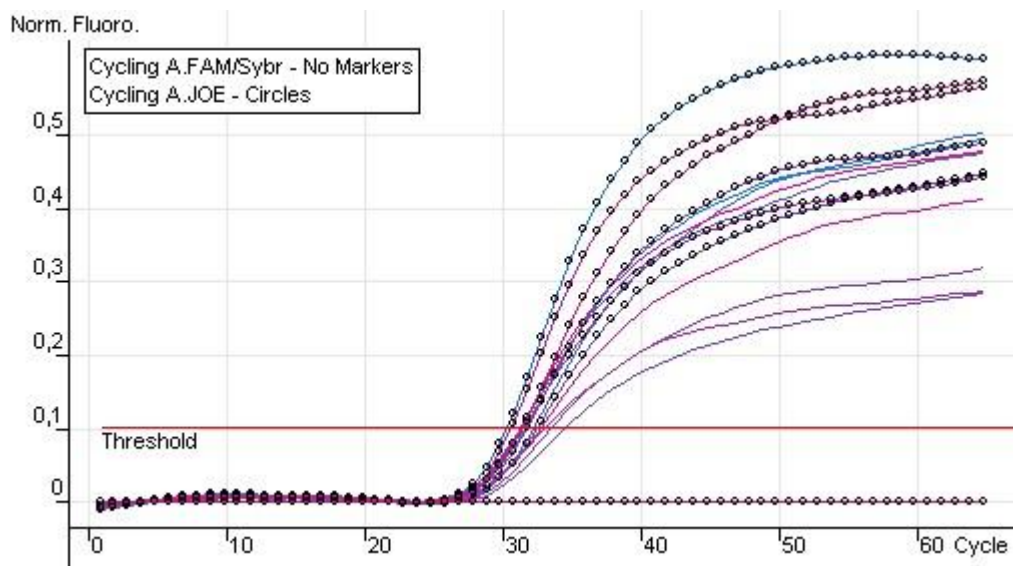
Obr. 10. Průběh PCR reakce u vzorku homozygotního pro nemutovanou alelu 677 C.



Obr. 11. Průběh PCR reakce u vzorku homozygotního pro mutovanou alelu 677 T.



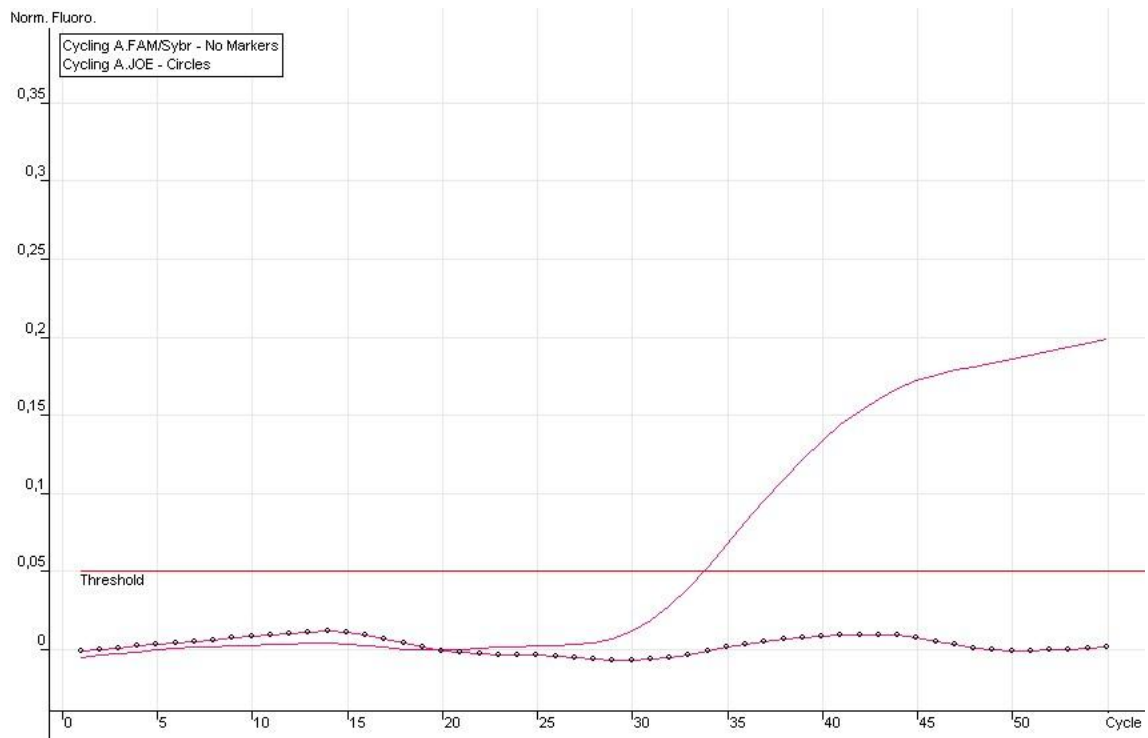
Obr. 12. Průběh PCR reakce u heterozygotního vzorku 677 CT.



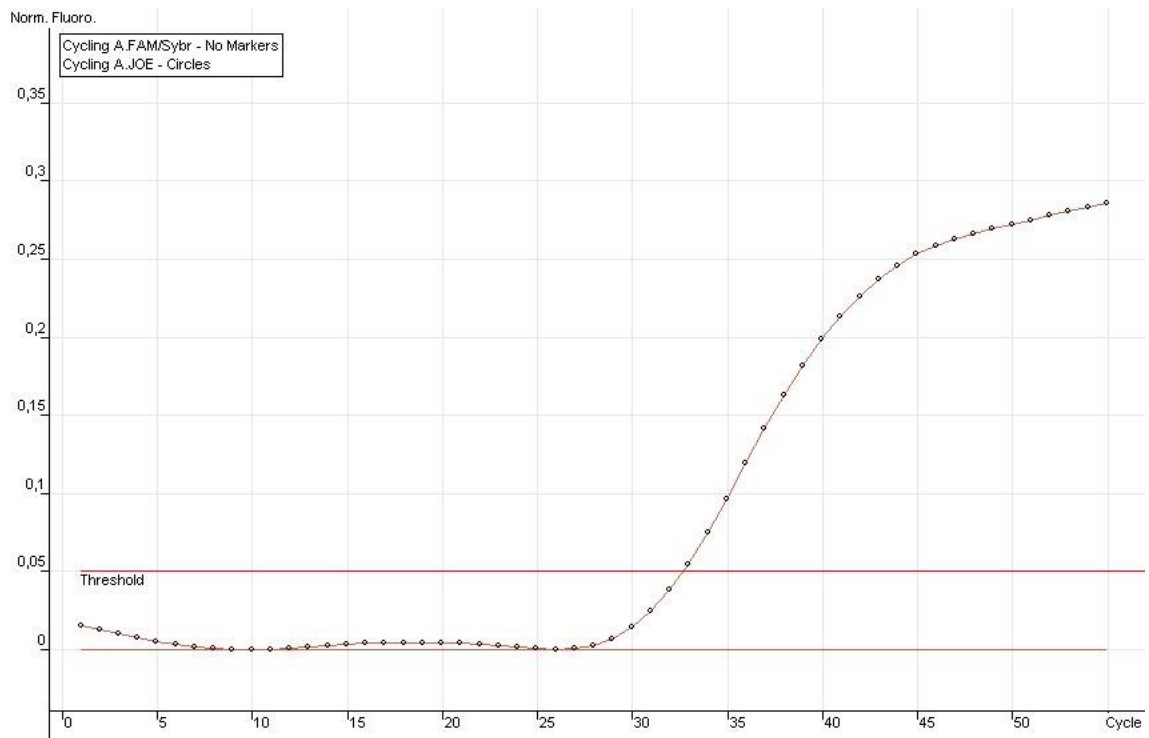
No.	Colour	Name	Genotype	Cycling A.FAM/Sybr	Cycling A.JOE
1	Blue	1	Wild Type	Reaction	No Reaction
2	Blue	2	Mutant	No Reaction	Reaction
3	Blue	3	Wild Type	Reaction	No Reaction
4	Blue	4	Wild Type	Reaction	No Reaction
5	Purple	5	Heterozygous	Reaction	Reaction
6	Purple	6	Heterozygous	Reaction	Reaction
7	Purple	7	Heterozygous	Reaction	Reaction
8	Purple	8	Mutant	No Reaction	Reaction
9	Purple	9	Heterozygous	Reaction	Reaction
10	Purple	10	Wild Type	Reaction	No Reaction

Obr. 13. Ukázka vyhodnocení analýzy deseti vzorků - polymorfismus MTHFR 677C→T.

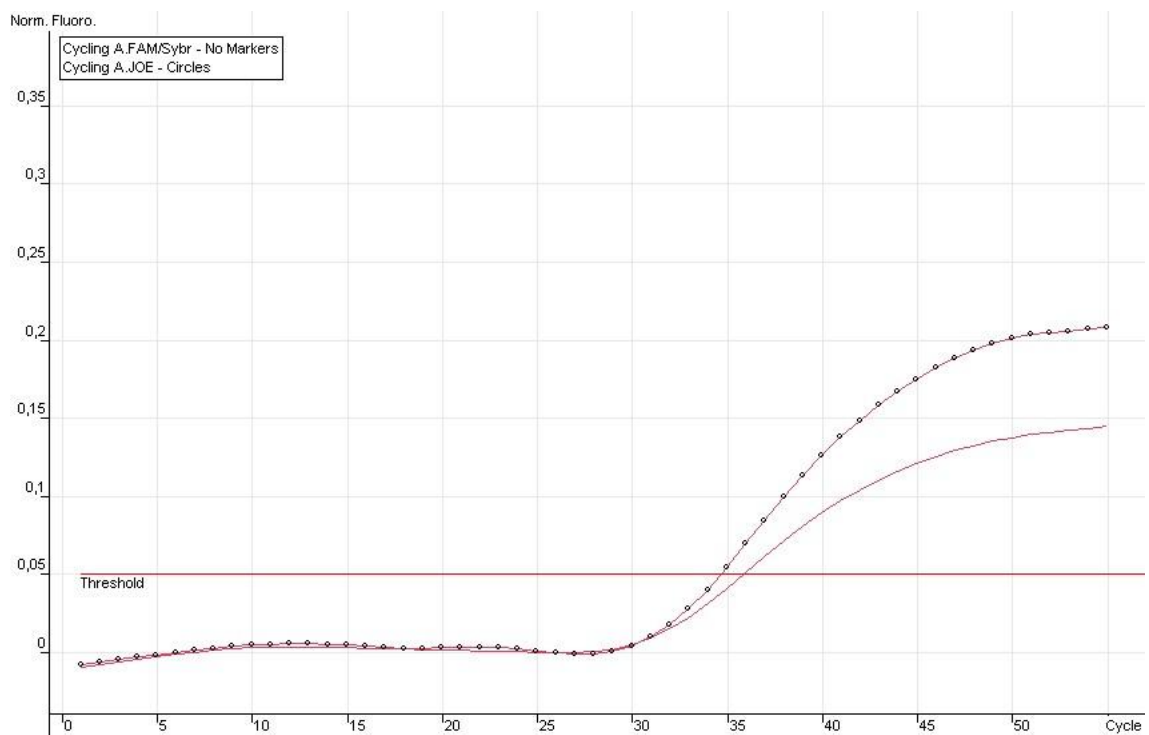
- MTHFR 1298A→C



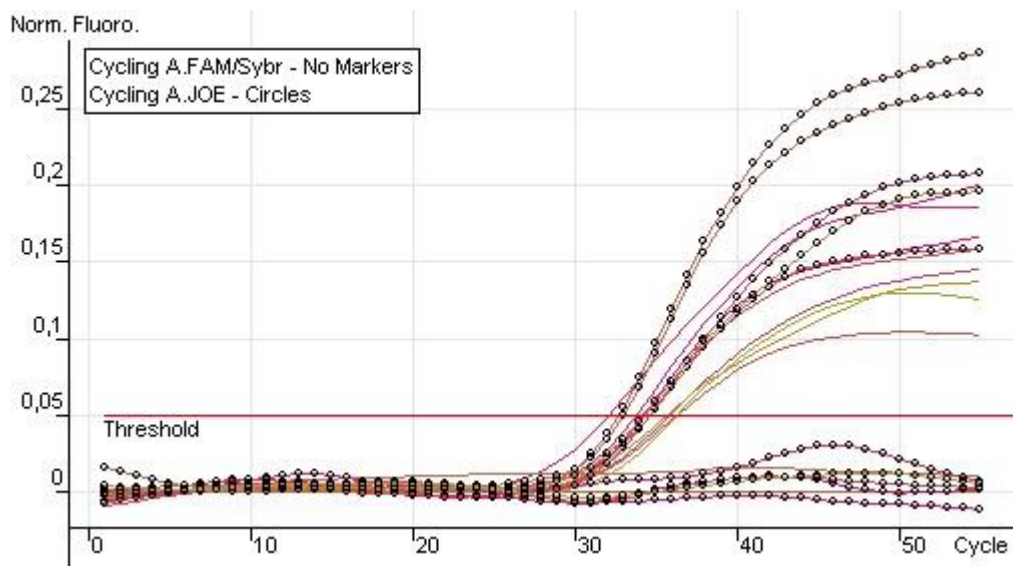
Obr. 14. Průběh PCR reakce u vzorku homozygotního pro nemutovanou alelu 1298 A.



Obr. 15. Průběh PCR reakce u vzorku homozygotního pro mutovanou alelu 1298 C.



Obr. 16. Průběh PCR reakce u heterozygotního vzorku 1298 AC.



No.	Colour	Name	Genotype	Cycling A.FAM/Sybr	Cycling A.JOE
2	■	2	Wild Type	Reaction	No Reaction
3	■	3	Wild Type	Reaction	No Reaction
4	■	4	Wild Type	Reaction	No Reaction
7	■	7	Heterozygous	Reaction	Reaction
8	■	8	Wild Type	Reaction	No Reaction
9	■	9	Heterozygous	Reaction	Reaction
10	■	10	Mutant	No Reaction	Reaction
11	■	11	Mutant	No Reaction	Reaction
15	■	15	Heterozygous	Reaction	Reaction
17	■	17	Wild Type	Reaction	No Reaction

Obr. 17. Ukázka vyhodnocení analýzy deseti vzorků - polymorfismus MTHFR 1298A→C.

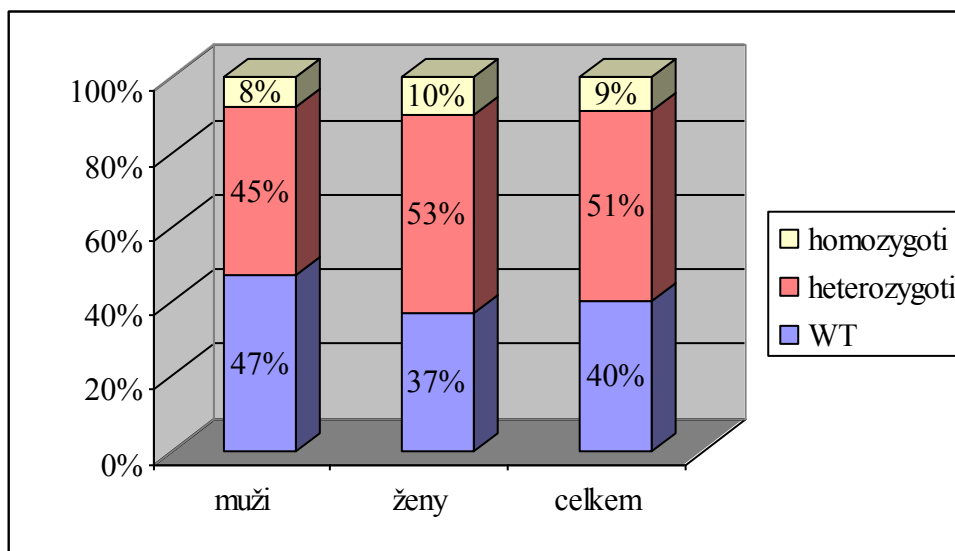
4. Výsledky

Na přístroji Rotor–Gene RG-3000 jsme vyšetřili 150 vzorků DNA na přítomnost polymorfizmů 677C→T a 1298A→C v genu pro MTHFR. Vzorky DNA pocházely od 103 osob ženského pohlaví a 47 osob mužského pohlaví.

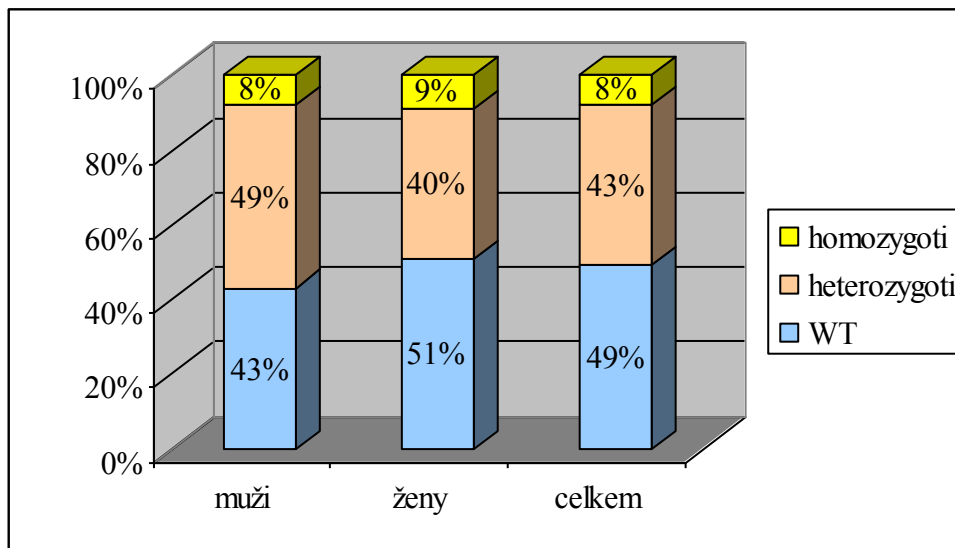
Zjištěné genotypy:

677C→T	WT	heterozygoti	homozygoti
muži	22	21	4
ženy	38	55	10
celkem	60	76	14
1298A→C	WT	heterozygoti	homozygoti
muži	20	23	4
ženy	53	41	9
celkem	73	64	13

Tab. 3. Počet jedinců s daným genotypem MTHFR 677C→T a 1298A→C.



Obr. 18. Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů MTHFR 677C→T.

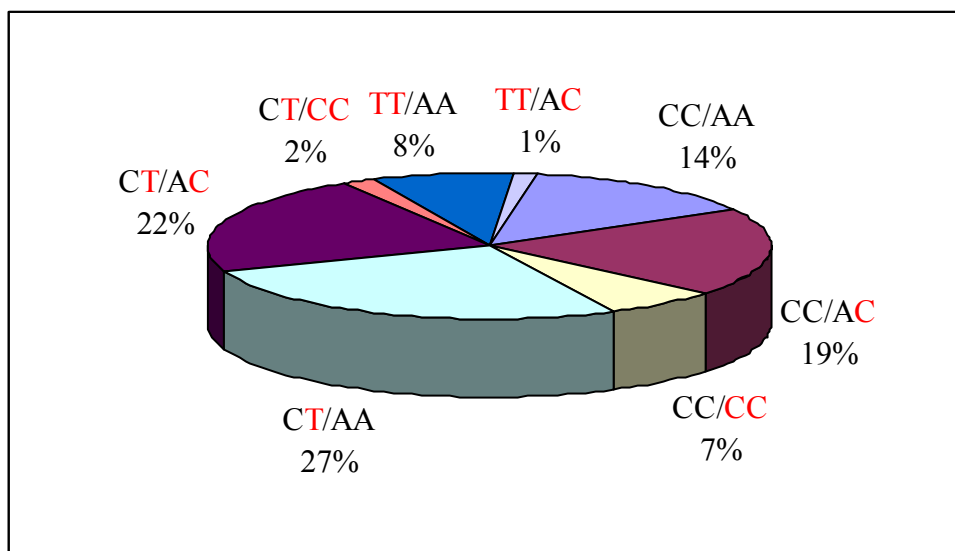


Obr. 19. Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů MTHFR 1298A→C.

Kombinace genotypů:

677 / 1298	WT	heterozygot	homozygot
WT	21	29	10
heterozygot	40	33	3
homozygot	12	2	0

Tab. 4. Počet jedinců s určitou kombinací genotypů MTHFR.



Obr. 20. Procentuální zastoupení jednotlivých kombinací alel MTHFR, uváděno v pořadí 677C→T /1298A→C. Červeně jsou označeny alely mutované.

Frekvence mutované alely:

výpočet podle vzorce:
$$\frac{(2A + B)}{2N}$$

A = počet jedinců homozygotních pro mutovanou alelu

B = počet jedinců heterozygotních pro mutovanou alelu

N = celkový počet jedinců (WT + heterozygoti + homozygoti)

677C→T	frekvence
muži	0,31
ženy	0,36
celkem	0,35
1298A→C	frekvence
muži	0,33
ženy	0,29
celkem	0,30

Tab. 5. Frekvence mutované alely polymorfizmů MTHFR 677C→T a 1298A→C.

5. Diskuze

Prevalence polymorfizmů MTHFR 677C→T a 1298A→C je různá v různých geografických oblastech a etnických skupinách. V naší populaci 150 náhodně vybraných jedinců byla frekvence alely 677 T 0,35 a podíl homozygotů dosáhl 9%. Frekvence alely 1298 C byla 0,30 a zastoupení homozygotů ve skupině bylo 8%. Frekvence odpovídají údajům v dostupné literatuře.

V Evropě byly zjištěny frekvence alely 677 T mezi 0,20 a 0,53. Průměrná frekvence je přibližně 0,35 a vyskytuje se například ve Velké Británii, Irsku a Holandsku. Nejméně homozygotů bylo zaznamenáno v Německu (8%), nejvíce naopak v Itálii (18%). Alela 677 T je vzácná mezi černochy v USA a v Brazílii, kde podíl homozygotů nedosahuje ani 2%, v subsaharské oblasti nebyl tento genotyp zaznamenán vůbec. Naopak v populaci Hispánců žijících v Kalifornii bylo nalezeno 21% homozygotů a frekvence alely tam dosahuje 0,42. Průměrná frekvence alely v populaci bělochů v USA je 0,34. Pokud jde o Asii, data dostupná zatím pouze z Japonska ukazují frekvenci alely 677 T podobnou jako v Evropě, tedy 0,35 (Botto a Yang, 2000).

Frekvence polymorfizmu MTHFR 1298A→C se v Evropě pohybuje od 0,22 (Polsko) do 0,36 (Holandsko). Poněkud odlišná prevalence oproti variantě MTHFR 677C→T je v Japonsku, frekvence alely 1298 C tam byla zjištěna 0,19. Mezi bělochy v USA je průměrná frekvence alely 0,31. Z oblasti Afriky a Jižní Ameriky je zatím publikováno minimum studií (Robien a Ulrich, 2003).

Většina studií neuvádí signifikantní rozdíl výskytu polymorfizmů MTHFR v závislosti na pohlaví. V naší práci se podíl heterozygotů i jedinců bez mutace lišil mezi muži a ženami až o 10%, ale výsledky byly ovlivněny malým počtem jedinců mužského pohlaví (47), ve srovnání s více než dvojnásobným počtem žen (103). Skupina mužů pravděpodobně nepředstavovala reprezentativní vzorek populace.

Porovnání společného výskytu alel obou polymorfizmů také odpovídá již publikovaným datům. Ogino a Wilson (2003) uvádějí ve své metaanalýze 16 studií, které dohromady zahrnovali 5 389 osob. Nejčastějším genotypem byla kombinace 677 CC/1298 AC (23%), naproti tomu genotyp 677 TT/1298 CC se nevyskytoval vůbec. V naší testované populaci byla nejběžnější kombinace 677 CT/1298 AA (27%), homozygot pro oba polymorfizmy nebyl taktéž nalezen. Současná přítomnost tří mutovaných alel nepřesáhla 2%. Isotalo *et al.* (2000) nenalezli genotypy 677 CT/1298

CC a 677 TT/1298 CC ve vzorcích z pupečnickové krve novorozenců, kdežto ve vzorcích DNA získaných z tkání potracených plodů ano, což naznačuje sníženou životaschopnost plodů nesoucích tři nebo čtyři mutantní alely MTHFR.

Hyperhomocysteinémie a polymorfizmy MTHFR patří mezi relativně nové rizikové faktory aterosklerózy. Nedávno provedené velké metaanalýzy varianty MTHFR 677C→T potvrdily mírné, ale statisticky významné zvýšení rizika ICHS u homozygotů (Klerk *et al.*, 2002; Wald *et al.*, 2002). Než budou nově zvažované rizikové faktory zařazeny do běžného screeningu, musí být splněno několik podmínek. Za prvé musí být k dispozici standardizovaný laboratorní test, dále musí být prokázáno, že měření těchto faktorů zvyšuje informační přínos již zavedených postupů ke stanovení kardiovaskulárního rizika, a za třetí musí být k dispozici prospektivní kontrolované studie, které prokážou, že léčebné intervence cílené na osoby se zvýšením tohoto rizikového faktoru (podávání kyseliny listové a vitamínů skupiny B) jsou účinnější než současné metody léčby (úprava hypercholesterolemie a hypertenze), nebo že selektivní snížení těchto rizikových faktorů vede ke snížení ukazatelů, jako je úmrtnost, výskyt infarktu myokardu nebo mrtvice (Hackam a Anand, 2003).

O skutečném podílu polymorfizmů MTHFR na riziku vzniku kardiovaskulárních a dalších chorob (defekty neurální trubice, spontánní potraty) se tedy stále vedou diskuze, ale první podmínka zavedení screeningu je již splněna, existují standardizované testy ke stanovení hladin homocysteinu i zjištění přítomnosti mutací v genu pro MTHFR. Indikací ke genetickému vyšetření je opakovaně zvýšená hladina plazmatického Hcy, rodinná anamnéza hyperhomocysteinémie, posouzení rizika aterosklerotického postižení cév a rizika trombóz, opakované a jinak nevysvětlitelné spontánní potraty, nebo léčba metotrexátem. Vyšetření by měl indikovat specialista ošetřující pacienta s těmito potížemi nebo s pozitivní rodinnou anamnézou (Riedlová *et al.*, 2006).

Jako materiál k vyšetření je u všech níže popsanych metod používána DNA izolovaná z lymfocytů periferní krve. Původní a základní metodou používanou k analýze zmíněných polymorfizmů je PCR-RFLP. DNA se amplifikuje pomocí PCR, následně štěpí restriční endonukleázou a vytvořené fragmenty definované délky se separují spolu s velikostním DNA markerem na agarózovém gelu s následným barvením ethidium bromidem. Detekce se provádí pomocí UV světla. Mutací MTHFR 677C→T vzniká cílové místo pro restriční endonukleázu HinfI, naopak

mutací MTHFR 1298A→C zaniká restrikční místo enzymu MboII (Riedlová *et al.*, 2006).

Novější metody detekce mutací v genu pro MTHFR využívají různé varianty real-time PCR. Real-time PCR je rychlá, levná a senzitivní metoda, která je díky svým vlastnostem vhodná pro screeningové vyšetření v laboratořích s velkým průtokem vzorků. Běžné je použití dvojice hybridizačních FRET sond s finální analýzou teploty tání. V naší práci jsme k detekci mutací použili variantu real-time PCR s duálně značenými hydrolyzačními sondami. Existují i další metody, jako je heteroduplexní analýza, DNA čipy, sekvenační techniky nebo hmotnostní spektrometrie (Riedlová *et al.*, 2006).

6. Závěr

Odebrali jsme 150 krevních vzorků od náhodně vybraných jedinců a izolovali z nich DNA. Vzorky jsme vyšetřili na přítomnost dvou polymorfizmů v genu pro MTHFR metodou real-time PCR s duálně značenými hydrolyzačními sondami a vypočítali jsme frekvence mutovaných alel. Frekvence alely 677 T a 1298 C byla 0,35 resp. 0,30 a podíl homozygotů v testované populaci byl 9% resp. 8%.

7. Literatura

Abbate R., Sofi F., Gensini F., Fatini C., Sticchi E. a Fedi S.: Thrombophilias as risk factor for disorders of pregnancy and fetal damage. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2002, **32**, 318-321

Alfirevic Z., Roberts D. a Martlew V.: How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2002, **101**, 6-14

Bjelland I., Tell G. S., Vollset S. E., Refsum H. a Ueland P. M.: Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C-T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch. Gen. Psychiat.*, 2003, **60**, 618-626

Blom H. J.: Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *Eur. J. Pediatr.*, 1998, **157**, 131-134

Botto L. D. a Yang Q.: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 2000, **151**, 862-877

Boushey C. J., Beresford S. A., Omenn G. S. a Motulsky A.G.: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, 1995, **274**, 1 049-1 057

Castro R., Rivera I., Ravasco P., Camilo M. E., Jakobs C., Blom H. J. a de Almeida I. T.: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J. Med. Genet.*, 2004, **41**, 454-458

Donnelly J. G. a Isotalo P. A.: Reply to Volcik et al. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, **69**, 1152-1153

- Duthie S. J., Narayanan S., Sharp L., Basten G. A Powers H.: Folate , DNA stability and colo-rectal neoplasia. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004, **63**, 571-578
- Friso A., Chio S.-W., Girelli D., Mason J. B., Dolnikowski G.G., Bagley P. J., Olivieri O., Jacques P. F., Rosenberg I. H., Corrocher R. a Selhub J.: A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2002, **99**, 5 606-5 611
- Frosst P., Blom H. J., Milos R., Goyette P., Sheppard C. A., Matthews R. G., Boers G. J., den Heijer M., Kluijtmans L. A., van den Heuvel L. P. a Rozen R.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.*, 1995, **10**, 111-113
- Goyette P., Pai A., Milos R., Frosst P., Tran P., Chen Z., Chan M. a Rozen R.: Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm. Genome.*, 1998, **9**, 652-656
- Gueant J. L., Gueant-Rodriguez R. M., Anello G., Bosco P., Brunaud L., Romano C., Ferri R., Romano A., Candito M. a Namour B.: Genetic determinants of folate and vitamin B₁₂ metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, **41**, 1 473-1 477
- Hackam D. G. s Anand S. S.. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease. A critical review of the evidence. *JAMA*, 2003, **290**, 932-940
- Heijmans B. T., Boer J. M., Suchiman H. E., Cornelisse C. J., Westendorp R. G., Kromhout D., Feskens E. J. a Slagboom P. E.: A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer. Res.*, 2003, **63**, 1 249-1 253
- Hobbs Ch. A., Cleves M. A., Lauer R. M., Burns T. L. a James S. J.: Preferential transmission of the MTHFR 677 T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, **113**, 9-14

- Hobbs Ch. A., Sherman S. L., Yi P., Hopkins S. E., Torfs C. P., Hine R. J., Pogribna M., Rozen R. a James S. J.: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, **67**, 623-630
- Holasová Š., Radilová H. a Bunčec M.: Praktická cvičení z molekulární genetiky, Praha, Karolinum, 2006, 29-32; 42-50
- Christensen B., Arbour L., Tran P., Leclerc D., Sabbaghian N., Platt R., Gilfix B. M., Rosenblatt D. S., Gravel R. A., Forbes P. a Rozen R.: Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, **84**, 151-157
- Isotalo P. A., Wells G. A. a Donnelly J. G.: Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, **67**, 984-990
- Jacques P.F., Bostom A. G., Williams R. R., Ellison R. C., Eckfeldt J. H., Rosenberg I. H., Selhub J. a Rozen R.: Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocystiene concentrations. *Circulation*, 1996, **93**, 7-9
- Kang S. S., Passen E. L., Ruggie N., Wong P. W. a Sora H.: Thermostabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*, 1993, **88**, 1 463-1 469
- Klerk M., Verhoef P., Clarke R., Blom H. J., Kok F. J. a Schouten E. G.: MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*, 2002, **288**, 2 023-2 031
- Lewis S. J., Ebrahim S. a Smith G. D.: Meta-analysis of MTHFR 677C→T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potetnial of folate? *BMJ*, 2005, 331, 1 053

- Matthews R. G., Sheppard C. a Goulding C.: Metylenetetrahydrofolate reductase and methylenetetrahydrofolate synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur. J. Pediatr.*, 1998, **157**, 54-59
- Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F., Carinci F., Carinci P., Stabellini G., Bisceglia L., Gombos F. a Tognon M.: C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am. J. Med. Genet.*, 2001, **98**, 357-360
- Matuška J.: Cardiosan, *FINCLUB Zpravodaj LG*, 2003, <http://www.finclub.cz/web/index.php?src=ref&id=34>
- Mills J. L., Kirke P. N., Molloy A. M., Burke H., Conley M. R., Lee Y. J., Mayne P. D., Weir D. G. a Scott J. M.: Metylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, **86**, 71-74
- Ogino S. a Wilson R. B.: Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677C→T and 1298A→C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J. Hum. Genet.*, 2003, **48**, 1-7
- O'Leary V. B., Parle-Mc Dermott A., Molloy A. M., Kirke P. N., Johnson Z., Conley M., Scott J. M. a Mills J. L.: MTRR and MTHFR polymorphisms: link to Down syndrome? *Am. J. Med. Gen.*, 2002, **107**, 151-155
- Pavlík E.: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – část 12. *Labor Aktuell*, 2004, č. 4, 10-13
- Pavlík E. a Pavlíková A.: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – část 11. *Labor Aktuell*, 2004, č. 3, 10-13
- Riedlová P., Bóday A., Kolaříková H., Richterová R. a Gumulec J: Směrnice pro správnou laboratorní praxi vyšetření mutací v genu MTHFR, http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/best_lab_practice/GLP_MTHFR, 2006

- Robien K. a Ulrich C. M.: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am. J. Epidemiol.*, 2003, **157**, 571-582
- Robinson K.: Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease. *Heart*, 2000, **83**, 127-130
- Sachdev P.: Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 2004, **26**, 49-55
- Selhub J. a D'Angelo A.: Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions. *Thromb. Haemost.*, 1997, **78**, 257-531
- Ulvik A., Evensen E. T., Lien E. A., Hoff G., Vollset S. E., Majak B. M. a Ueland P.M.: Smoking, folate and methylenetetrahydrofolate reductase status as interactive determinants of adenomatous and hyperplastic polyps of colorectum. *Am. J. Med. Genet.*, 2001, **101**, 246-254
- van der Put N. M., Gabreels F., Stevens E. M., Smeitink J. A., Trijbels F. J., Eskes T. K., van den Heuvel L. P. a Blom H. J.: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, **62**, 1 044-1 051
- van der Put N. M., Steegers-Theunissen R. P., Frosst P., Trijbels, F. J., Eskes, T. K., van den Heuvel, L. P., Mariman, E. C., den Heyer, M.; Rozen, R.; Blom, H. J.: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*, 1995, **346**, 1 070-1 071
- van der Put N. M., van Straaten H. W., Trijbels F. J. a Blom H. J.: Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp. Biol. Med.*, 2001, **226**, 243-270
- Vester B. a Wengel J.: LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, **42**, 13 233-13 241

- Wald D. S., Law M. a Morris J. K.: Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*, 2002, **325**, 1 202
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991, **10**, 506-513.
- Weisberg I. S., Jacques P. F., Selhub J., Bostom A. G., Chen Z., Curtis Ellison R., Eckfeldt J. H. a Rozen R.: The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*, 2001, **156**, 409-415
- Wiwanitkit V.: Roles of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in repeated pregnancy loss. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2005, **11**, 343-345
- Yamada K., Chen Z., Rozen R. a Matthews R. G.: Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2001, **98**, 14 853-14 858
- Zima T.: *Laboratorní Diagnostika*, Praha, Galén, 2002, 155-159
- Zima J., Macholán M., Munclinger P. a Piálek J.: *Genetické metody v zoologii*, Praha, Karolinum, 2004, 126-131

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=607093>

Přílohy

Příloha 1: Informovaný souhlas s odběrem krve pro účely analýzy DNA

Příloha 2: Informace pro dárce o klinických souvislostech vyšetření

Příloha 1:

Laboratoře GENERI BIOTECH

GENERI BIOTECH s. r. o.

Machkova 587

500 11 Hradec Králové 11

Informovaný souhlas s odběrem krve pro účel izolace, uchování a analýzy DNA

Jméno a příjmení.....

Jméno a příjmení zákonného zástupce, pokud je stanoven.....

Bytem v.....

Rodné číslo nebo datum narození.....

Souhlasím s odběrem krve pro účel izolace, uchování a analýzy DNA.

Analýza genetické informace metodami molekulární biologie se bude týkat výlučně následujících témat: detekce mutací v genech faktorů krevního srážení (FV, FII), v genech enzymů účastnících se přenosu metylové skupiny (MTHFR, MTRR, MTR) a genu molekuly HLA-G.

Jiná problematika nebude bez mého dalšího souhlasu zkoumána.

Pokud si budu přát, budou mi výsledky analýzy sděleny ústní a / nebo písemnou formou.

Bez mého výslovného souhlasu nebudou výsledky sdělovány jiným osobám.

Mé jméno, jakož i osobní údaje včetně adresy, data narození a rodného čísla, nebudou nikde uváděny a to v souladu se zněním zákona 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů.

Po skončení studie bude vzorek DNA a krve zlikvidován.

Byl / byla jsem plně informován / informována o podstatě prováděných testů a jejich zdravotních souvislostech.

V..... dne.....

Podpis.....

Příloha 2:

GENERI BIOTECH s. r. o.
Machkova 587
500 11 Hradec Králové 11
tel.: 495 056 353
odpovědný lékař: MUDr. Zdeněk Fiedler, Ph.D.

vyšetřované geny:

FV = faktor V

Je to plazmatický glykoprotein účastnící se krevního srážení (hemokoagulace). Mutace G1691A v jeho genu je příčinou tzv. rezistence na aktivovaný protein C. Tento protein za normálních okolností štěpí (inaktivuje) FV a tím brzdí hemokoagulaci. Přítomnost mutace brání této regulaci a následkem je náchylnost ke vzniku krevních sraženin (trombofilie).

FII = protrombin

Taktéž člen kaskády krevního srážení. Mutace G20210A je příčinou zvýšené hladiny tohoto glykoproteinu v plazmě, což opět vede k trombofilii.

MTHFR = methylentetrahydrofolátreduktáza

MTR = methioninsyntáza

MTRR = methioninsyntáza–reduktáza

Jde o enzymy účastnící se přeměny aminokyseliny homocysteinu na methionin. Mutace mohou poškodit funkci těchto enzymů a tím se zvyšuje hladina homocysteinu v krvi. Nadbytek homocysteinu je považován za jeden z rizikových faktorů aterosklerózy a trombózy.

HLA-G

Jedna z povrchových molekul lidských buněk. Je odpovědná za regulaci imunitních reakcí mezi matkou a plodem a tím za udržení těhotenství.