

Raziskovalni prispevek/Research article

GENETSKI POLIMORFIZMI ENCIMOV V PRESNOVNI POTI FOLATA V ZDRAVI SLOVENSKI POPULACIJI

GENETIC POLIMORPHISMS OF ENZYMES INVOLVED IN FOLATE METABOLISM IN HEALTHY SLOVENIAN POPULATION

Petra Bohanec, Vita Dolžan

Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-07-02, sprejeto 2004-09-06; ZDRAV VESTN 2004; 73: 807-13

Ključne besede: metilentetrahidrofolat reduktaza; timidilat sintaza; genotipizacija

Izvleček – Izhodišča. V presnovni poti folata imajo pomembno vlogo encimi 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), timidilat sintaza (TS), metionin sintaza (MS) in metionin sintaze reduktaza (MTRR). Polimorfizmi v pripadajočih genih spremenijo encimsko aktivnost. Namen raziskave je bil določiti pogostnost polimorfnihi genotipov MTHFR in TS v slovenski populaciji in s tem oceniti, kolikšen delež posameznikov bi lahko bil bolj izpostavljen nekaterim boleznim in toksičnim učinkom antagonistov folata.

Metode. Polimorfizme genov v presnovni poti folata smo določali z metodo genotipizacije, ki temelji na pomnoževanju dela genomske DNK z verižno reakcijo s polimerazo in cepitvi pomnoženega odseka z ustreznim encimom. Za analizo smo uporabili vzorce DNK 122 nesorodnih zdravih odraslih oseb, ki smo jih dobili na Centru za tipizacijo tkiv in na Pediatrični kliniki v Ljubljani.

Rezultati. Kar 62,3% preiskovancev je imelo vsaj en polimorfen alel MTHFR 677T, 52,5% pa vsaj en polimorfen alel 1298C. Le 12% preiskovancev ni imelo nobenega od analiziranih polimorfizmov v genu za MTHFR. Primerjava naših rezultatov z izsledki drugih študij je pokazala, da na frekvence polimorfnihi genotipov MTHFR vpliva starost preiskovancev. Frekvenca genotipa TS 3R/3R je bila v našem vzorcu nižja kot pri drugih populacijah.

Zaključki. Polimorfizmi v presnovni poti folata so v slovenski populaciji pogosti in vplivajo na tveganje za nekatere oblike raka. Ker ti polimorfizmi lahko vplivajo tudi na uspešnost zdravljenja z antagonisti folata, bi lahko z opisanimi metodami genotipizacije prispevali k individualizaciji zdravljenja z metotreksatom in 5-fluorouracilom.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase; thymidylate synthase; genotyping

Abstract – Background. Enzymes that play a major role in folate metabolism are 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), thymidylate synthase (TS), methionine synthase (MS) and methionine synthase reductase (MTRR). Polymorphisms in their corresponding genes alter their enzymatic activity. The aim of this study was to determine the frequencies of polymorphic MTHFR and TS genotypes in healthy adults from Slovenian population in order to estimate the proportion of individuals that may be at risk for certain diseases or increased toxicity if treated with antifolate drugs.

Methods. MTHFR and TS polymorphisms were studied by a genotyping technique, based on polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction enzyme analysis. DNA samples from 122 unrelated adult healthy subjects were obtained from the Tissue Typing Center and University Children's Hospital in Ljubljana.

Results. In the analyzed group 62.3% of individuals carried at least one polymorphic MTHFR 677T allele and 52.5% carried at least one polymorphic 1298C allele. Only 12% of individuals had no polymorphic MTHFR allele. The frequencies of MTHFR genotypes were influenced by the age of the subjects under investigation. The frequency of the TS 3R/3R genotype in Slovenian population was significantly lower than in some other populations.

Conclusions. Genetic polymorphisms in folate metabolic pathway occur with high frequency in Slovenian population and modify cancer risk. Regarding the influence of these polymorphisms on the efficacy of treatment with antifolate drugs the introduced genotyping method could contribute to the individualization of treatment with methotrexate and 5-fluorouracil.

Uvod

Folat je vodotopen vitamin, ki se nahaja predvsem v listnati zelenjavi, stročnicah in žitu. Molekula folata je zgrajena iz pteridinskega obroča, p-aminobenzojske kisline ter glutamata. Sintetizirajo ga bakterije in višje rastline, sesalci pa pteridinskega obroča ne morejo konjugirati z ostalimi enotami. Dobi jo ga s hrano rastlinskega izvora v obliki folata, s hrano živalskega izvora kot tetrahidrofolat (THF), nekaj pa ga sintetizirajo mikroorganizmi v debelem črevesu (1).

Tetrahidrofolat (THF) je vir funkcionalnih skupin z enim ogljikom. N^{10} -formil-THF in N^5 , N^{10} -metenil-THF prispevata atoma C2 in C8 v sintezi *de novo* purinskega obroča. N^5 , N^{10} -metilen-THF je vir metilne skupine pri pretvorbi deoksiuridilat monofosfata (dUMP) v deoksitimidilat monofosfat (dTMP). N^5 -metil-THF pa je vir metilne skupine za remetilacijo homocisteina v metionin (2).

Na sliki 1 so prikazane reakcije, ki jih katalizirajo nekateri ključni encimi v presnovni poti folata: 5, 10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), metionin sintaza (MS), metionin sintaze reduktaza (MTRR) in timidilat sintaza (TS). Geni, ki nosijo zapise za te encime, so polimorfni. O genskem polimorfizmu govorimo, kadar sta v populaciji prisotna najmanj dva alela in ima redkejši frekvenco vsaj 1%. Zaradi genskih polimorfizmov se lahko spremeni aktivnost oziroma stabilnost encimov.

5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)

MTHFR katalizira ireverzibilno redukcijo N^5 , N^{10} -metilen-THF v N^5 -metil-THF in s tem uravnava razmerje med obema oblikama THF. Če je to razmerje visoko, se bo funkcionalna skupina iz THF usmerjala predvsem v sintezo dTMP, pri nizkem razmerju pa v sintezo metionina (2).

Gen za MTHFR se nahaja na koncu kratke ročice kromosoma 1, na mestu 1p36.3, in ima 11 eksonov. V genu za MTHFR je znanih več polimorfizmov, od katerih sta najpogostejša C677T (3) in A1298C (4). Vpliv zelo redkih polimorfizmov, T1317C in G1793A, na encimsko aktivnost še ni znan (4, 5).

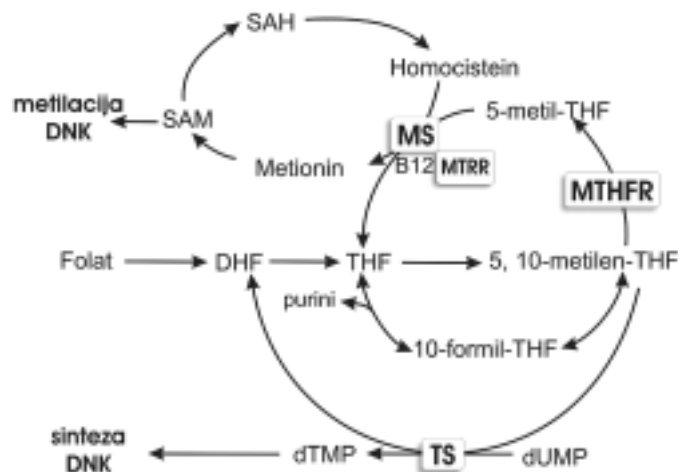
Polimorfizem C677T povzroči zamenjavo alanina v kodonu 222 z valinom (ekson 4) in spremeni vezavno mesto za kofaktor flavin adenin dinukleotid (FAD). Nastali encim je termolabilen in ima zmanjšano aktivnost. V pogojih *in vitro* imajo posamezniki z genotipom MTHFR 677TT ohranjene 30%, heterozigoti z genotipom 677CT pa 60% aktivnosti encima glede na normalni genotip 677CC (3). Zmanjšana aktivnost encima se odraža v manj učinkoviti remetilaciji homocisteina v metionin, kar pri homozigotih lahko privede do hiperhomocisteinemije.

Polimorfizem A1298C povzroči zamenjavo glutamata v kodonu 429 z alaninom (ekson 7) in spremeni regulacijsko domeno encima. V pogojih *in vitro* imajo homozigoti za polimorfizem (genotip 1298CC) ohranjene 60% aktivnosti encima v primerjavi s homozigoti za normalni alel (genotip 1298AA) (6). Polimorfizem sam se ne odraža na povišani ravni homocisteina v plazmi, v povezavi s polimorfizmom na mestu 677 pa lahko privede do hiperhomocisteinemije.

Timidilat sintaza (TS)

TS katalizira metilacijo dUMP v dTMP. Donor metilne skupine je N^5 , N^{10} -metilen-THF, ki se pretvori v dihidrofolat (DHF). TS ima osrednjo vlogo pri oskrbi z nukleotidi za sintezo in popravljanje DNK, saj je dTMP edini *de novo* vir timidilata v celicah (2).

Gen za TS se nahaja na kromosomu 18p11.32. V 5' neprepisanem promotorskem področju gena je cis-ojačevalno zaporedje, ki je polimorfno (7). Polimorfizem se odraža v številu 28



Sl. 1. Reakcije v presnovni poti folata. Zaužiti folat se reducira do tetrahidrofolata (THF). Funkcionalna skupina z enim ogljikovim atomom se lahko iz 5,10-metilentetrahidrofolata (5,10-metilen-THF) usmeri v sintezo timidilata (dTMP) in nukleotidov ali pa se po redukciji v 5-metiltetrahidrofolat (5-metil-THF) usmeri v sintezo metionina in nadalje v reakcije metilacije. Ključni encimi v presnovni poti folata so: MTHFR - 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza, TS - timidilat sintaza, MS - metionin sintaza, MTRR - metionin sintaze reduktaza.

Figure 1. Folate metabolic pathway. Dietary folate is reduced to tetrahydrofolate (THF). One carbon group of 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-methylene-THF) is either directed toward thymidylate and nucleotide synthesis or reduced to 5-methyltetrahydrofolate (5-methyl-THF) and directed toward methionine synthesis and biologic methylation reactions. The key enzymes in folate-metabolizing pathways are: MTHFR - 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, TS - thymidylate synthase, MS - methionine synthase, MTRR - methionine synthase reductase.

bp dolgih ponovitev, lahko sta prisotni dve (2R) ali tri (3R), opisali pa so tudi promotorje s petimi ponovitvami (5R) (8). Prisotnost večjega števila ponovitev v promotorski regiji se odraža v povečanem prepisovanju encima in v večji pretvorbi dUMP v dTMP. Nižja aktivnost encima pri homozigotih z genotipom 2R/2R se odraža v zvišanem razmerju dUMP/dTMP, kar lahko poveča tveganje za napačno vgradnjo uracila v DNK, poškodbe kromosomov in nastanek lomljivih mest na DNK. Pri homozigotih z genotipom 3R/3R je razmerje dUMP/dTMP nižje, zato je število napačno vgrajenih uracilov v DNK manjše, s tem pa je tudi manjše tveganje za okvare DNK, še zlasti v hitro delečih se tkivih.

Metionin sintaza (MS) in metionin sintaze reduktaza (MTRR)

MS katalizira prenos metilne skupine z N^5 -metil-THF preko vitamina B₁₂ na homocistein. Nastali metionin je izhodiščna spojina za sintezo S-adenozil metionina (SAM), ki je najpomembnejši celični donator metilne skupine za reakcije metilacije molekul DNK, RNK in proteinov (1). Metionin je zlasti v obdobju rasti esencialna aminokislina, ki jo večinoma pridobimo s hrano, homocistein pa je nestandardna aminokislina, ki je ne dobimo s hrano, zato se njena raven ohranja z vnosom metionina.

Gen za MS se nahaja na kromosomu 1p142.3-43. Polimorfizem A2756G privede do zamenjave asparginske kisline z glicinom v domeni, ki je vključena v metilacijo in reaktivacijo kofaktorja B₁₂. Zaradi zmanjšane aktivnosti encima se zviša raven homo-

cisteina in zniža raven metionina. Frekvenca homozigotov z genotipom MS 2756GG je pri beli rasi 15–20% (9).

MTRR katalizira regeneracijo kofaktorja metionin sintaze, metilkobalamina (10). Gen za MTRR se nahaja na kromosomu 5p15.2-15.3. Polimorfizem A66G privede do zamenjave izolevcina z metioninom. Frekvenca genotipa MTRR 66GG je pri beli rasi zelo visoka in znaša približno 50% (11).

Vpliv genskih polimorfizmov v presnovni poti folata na tveganje za nastanek bolezni

Iz epidemioloških študij je znano, da pomanjkanje znotrajceličnega folata zaradi zmanjšane vnosa folata s hrano privede do povečanega nastanka lomljivih mest na DNK in povečanega tveganja za različne vrste raka, kot so rak debelega črevesa, rak endometrija in levkemija. Pomanjkanje metionina je dejavnik tveganja za bolezni srca in ožilja in venske tromboze (12). Podobno kot zmanjšan vnos folata, metionina in vitamina B₁₂ s hrano so tudi polimorfizmi v presnovni poti folata dejavnik tveganja za številne bolezni.

Polimorfizmi v genu za MTHFR zvišajo razmerje N^5 , N^{10} -metilen-THF/ N^5 -metil-THF, zato se zmanjša tveganje, da bi se určil vgrajeval v molekule DNK. Podoben zaščitni vpliv ima tudi polimorfizem gena za TS. Homozigoti MTHFR 677TT naj bi imeli manjše tveganje za levkemijo (13) in raka debelega črevesa (14, 15), želodca (16) in požiralnika (17). Tudi polimorfizem v genu za TS zmanjša tveganje za levkemijo (18) in raka debelega črevesa (19). Znižana raven N^5 -metil-THF pa lahko zaradi manj učinkovite metilacije homocisteina v metionin privede do hiperhomocisteinemije. Podoben vpliv ima tudi polimorfizem gena za MS. Hiperhomocisteinemija je lahko tudi posledica drugih genskih polimorfizmov v razgradnji homocisteina ali zmanjšane vnosa folata, metionina ali vitaminov B₁₂ ali B₆. Povišana koncentracija homocisteina v plazmi je lahko dejavnik tveganja za bolezni srca in ožilja (20), tromboembolije (12), nevrološke motnje, motnje v razvoju okostja, kot so okvare nevrone celi (21) in volčje žrelo (22), in osteoporozo pri starostnikih (23, 24).

Vpliv polimorfizmov v presnovni poti folata na zdravljenje z antagonistom folata

V zadnjem času se vse bolj uveljavlja spoznanje, da na odzivnost posameznika na zdravljenje oziroma stopnjo neželenih ali celo toksičnih učinkov pomembno vplivajo tudi genetski polimorfizmi encimov, ki so udeleženi v presnovi zdravila ali so tarča delovanja zdravila (25). Polimorfizmi genov v presnovni poti folata lahko vplivajo na uspešnost zdravljenja z metotreksatom in 5-fluorouracilom.

Metotreksat je analog folata, ki kompetitivno inhibira encim dihidrofolat reduktazo, posredno pa tudi TS in MTHFR. Visoke odmerke metotreksata v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki uporabljajo za zdravljenje nekaterih vrst raka. To zdravljenje ima veliko neželenih učinkov, kot so bruhanje, krči, driska, bolečine v trebuhu in vnetje sluznic prebavne poti. Dokazali so, da so toksični učinki metotreksata odvisni od polimorfizmov v genu za MTHFR. Pri bolnikih z akutno limfatično levkemijo (ALL) in genotipom 677TT so se pogosteje izrazili tako hudi toksični učinki metotreksata, da je bilo potrebno znižati odmerek metotreksata ali ga začasno umakniti iz zdravljenja (26). Na učinek zdravljenja ALL z metotreksatom je vplival tudi polimorfizem gena za TS, in sicer so se bolniki z genotipom TS 3R/3R slabše odzvali na zdravljenje (27).

Metotreksat v nizkih, enkrat tedenskih odmerkih uporabljajo tudi pri zdravljenju revmatoidnega artrisa (RA). Med zdravljenjem več kot 50% bolnikov izkusi neželene učinke s strani

sluznic, kože, kostnega mozga, jeter ali centralnega živčnega sistema. Ker ni zanesljivih napovednih dejavnikov, na podlagi katerih bi lahko predvideli neželene učinke, je med zdravljenjem potrebno pogosto klinično in laboratorijsko spremljanje bolnika, kar 30% bolnikov pa zaradi neželenih učinkov opusti zdravljenje. Rezultati raziskav pri beli rasi kažejo, da je polimorfizem v kodonu 667 gena za MTHFR povezan z večjim tveganjem za toksičnost nizkih odmerkov metotreksata, polimorfizem v kodonu 1298 pa vpliva na učinkovitost zdravljenja (28). Pri japonskih bolnikih z RA polimorfizem gena za MTHFR ni značilno vplival na pogostnost toksičnih učinkov, medtem ko so bolniki s polimorfizmom gena za TS potrebovali večje odmerke metotreksata (29).

5-fluorouracil je analog uracila in po aktivaciji v 5-fluoro-2-deoksiuridin monofosfat (5-FdUMP) kompetitivno inhibira TS. Polimorfizem v promotorskem področju gena za TS vpliva na učinkovitost kemoterapije s 5-FU. Pri bolnikih z rakom debelega črevesa in s polimorfnim genotipom TS 3R/3R je bila kemoterapija s 5-FU manj uspešna (30).

Namen dela

Namen raziskave je bil določiti pogostnost polimorfnih genotipov genov za MTHFR in TS v slovenski populaciji in na ta način oceniti delež posameznikov, ki bi lahko bili bolj izpostavljeni nekaterim boleznim in toksičnim učinkom pri zdravljenju z antagonistom folata.

Preiskovanci in metode

V analizo smo vključili vzorce DNK 122 nesorodnih, zdravih oseb iz slovenske populacije. Vzorci DNK so bili izolirani iz venske krvi krvodajalcev in osebja Kliničnega centra na Centru za tipizacijo tkiv ($n = 33$) oziroma na Pediatrični kliniki v Ljubljani ($n = 89$). Povprečna starost krvodajalcev je bila 40 (± 8) let, podatki o starosti ostalih preiskovancev pa zaradi zgodnje anonimizacije vzorcev niso bili dostopni. Študijo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko dne 19. 2. 2002 (št. 60/02/02).

Polimorfizem genov za MTHFR in TS smo določali z metodo genotipizacije, ki je temeljila na pomnoževanju specifičnih fragmentov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

V genu za MTHFR smo prisotnost polimorfizmov C677T in A1298C ugotavljali s hkratnim pomnoževanjem ustreznih fragmentov, velikih 198 in 128 bp, z dvema paroma začetnih oligonukleotidov (31). Ker polimorfizem C677T uvede restrikcijsko mesto za *Hinf*I, polimorfizem A1298C pa izniči eno od dveh restrikcijskih mest za *Mbo*II, smo alikvota dobljenih produktov cepili s tema restrikcijskima encimoma. Cepljene fragmente DNK smo ločili z elektroforezo na 3-odstotnem agaroznem gelu.

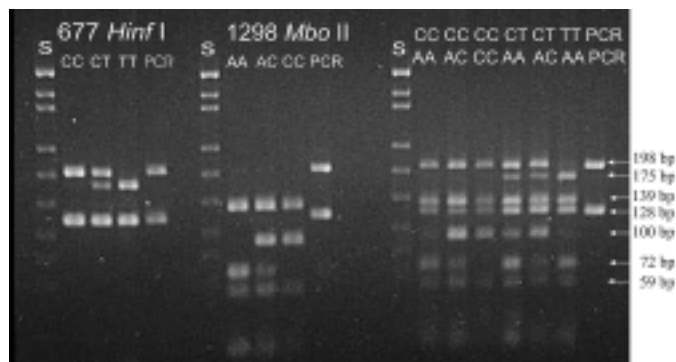
V genu za TS smo določali število 28 bp dolgih ponovitev s pomnoževanjem promotorskega področja z enim parom začetnih oligonukleotidov (30). Produkto smo ločili z elektroforezo na 3-odstotnem agaroznem gelu.

Rezultati

Analiza polimorfizma v genu za MTHFR

S hkratnim pomnoževanjem dveh polimorfnih predelov gena za MTHFR ter s cepljenjem z encimoma *Hinf*I oziroma *Mbo*II smo določili genotipe MTHFR 677 in MTHFR 1298 v vseh vzorcih. Na sliki 2 so prikazani rezultati cepljenja pri različnih genotipih. Produkt PCR, ki vključuje mesto 677, je bil dolg 198bp. Kjer je polimorfizem 677T uvedel cepitveno mesto za *Hinf*I, se je produkt PCR razcepil na dva fragmenta, dolga 175bp in 23bp. Produkt PCR, ki vključuje mesto 1298, je bil dolg 128bp.

Znotraj tega zaporedja obstajata dve prepoznavni mesti za encim *Mbo* II, zato se je produkt normalnega alela 1298A razcepil na tri fragmente, dolge 72bp, 28bp in 28bp. Ker je polimorfizem 1298C izničil eno od cepitvenih mest za *Mbo* II, se je produkt PCR razcepil na dva fragmenta, dolga 100 bp in 28bp. Ker je ta produkt PCR vseboval tudi cepitveno mesto za encim *Hinf* I, ga nismo mogli hkrati cepiti z obema encimoma. Kot je prikazano na sliki 2, pa smo produkte obeh reakcij cepljenja lahko sočasno analizirali na gelu.



Sl. 2. Restriksijska analiza pomnoženih fragmentov gena za *MTHFR*. Oba polimorfna predela smo hkrati pomnožili z reakcijo PCR. Genotipe *MTHFR* 677 smo določali po cepljenju 198 bp dolgega fragmenta z encimom *Hinf* I, genotipe *MTHFR* 1298 pa po cepljenju 128 bp dolgega fragmenta z encimom *Mbo* II. Prikazan je vzorec potovanja fragmentov, značilnih za posamezne genotipe, pri ločenem oziroma hkratnem nanosu produktov reakcij cepljenja na 3-odstotni agarozni gel. S – dolžinski standard; DNK pUC18 cepljena s *Hpa* II; PCR – necepljen produkt PCR.

Figure 2. Restriction enzyme analysis of amplified *MTHFR* gene. Both polymorphic regions of *MTHFR* gene were simultaneously amplified by PCR. *MTHFR* 677 genotypes were analyzed by *Hinf* I digestion of 198 bp fragment. *MTHFR* 1298 genotypes were analyzed by *Mbo* II digestion of 128 bp fragment. All fragments were separated on 3% agarose gel, separately for each digestion reaction, or combined. S – Molecular weight marker: pUC18 DNA digested by *Hpa* II; PCR – undigested PCR product.

V razpredelnici 1 so prikazane frekvence genotipov *MTHFR* v našem vzorcu zdrave odrasle slovenske populacije. Kar 62,3% preiskovancev je imelo vsaj en polimorfen alel 677T, 52,5% pa vsaj en polimorfen alel 1298C. Ugotovljene frekvence posameznih polimorfnih genotipov se niso značilno razlikovale od pričakovanih frekvenc, kar pomeni, da je bil izbrani vzorec v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Kljub višjim pričakovanim frekvencam med preiskovanci nismo zasledili nobenega homozigota *MTHFR* 677TT, ki bi imel polimorfizem tudi na mestu 1298. Le 12% preiskovancev je bilo homozigotov z obema normalnima genotipoma *MTHFR*.

Naše rezultate smo primerjali s podatki iz drugih slovenskih in tujih raziskav. Iz razpredelnice 2 je razvidno, da so bile frekvence polimorfne genotipa 677TT v različnih skupinah preiskovancev med 12,3 in 19,2%. V slovenski po-

Razpr. 1. Genotipi *MTHFR* pri odrasli zdravi slovenski populaciji.

Table 1. *MTHFR* genotypes in healthy adult Slovenian population.

Genotip <i>MTHFR</i> C677T <i>MTHFR</i> C677T genotype	Število Number	Ugotovljena frekvenca (%) Observed frequency (%)	Pričakovana frekvenca* (%) Predicted frequency* (%)
CC	46	37,7	38,3
CT	60	49,2	47,0
TT	16	13,1	14,2
Skupaj / Total	122	100	100
Genotip <i>MTHFR</i> A1298C <i>MTHFR</i> A1298C genotype			
1298AA	58	47,5	48,6
1298AC	54	44,3	42,2
1298CC	10	8,2	9,2
Skupaj / Total	122	100	100
<i>MTHFR</i> C677T in A1298C <i>MTHFR</i> C677T and A1298C			
CC + AA	15	12,3	18,9
CC + AC	21	17,2	16,4
CC + CC	10	8,2	3,6
CT + AA	27	22,1	22,8
CT + AC	33	27,1	19,8
CT + CC	0	0	4,3
TT + AA	16	13,1	6,9
TT + AC	0	0	6,0
TT + CC	0	0	1,3
Skupaj / Total	122	100	100

* Pričakovane vrednosti so bile izračunane po Hardy-Weinbergovi enačbi.
Predicted frequencies were calculated according to the Hardy-Weinberg equation.

populaciji je bila frekvenca homozigotov s tem genotipom najvišja v vzorcu študentov, starih do 25 let (32), saj je za 2,8% presegala frekvenco tega genotipa pri zdravih poročinah (povprečna starost 33,9 [$\pm$ 5,8] leta [33]), kar za 6,1% pa je presegala frekvenco tega genotipa v našem vzorcu, ki so ga sestavljali zdravi ljudje v aktivni dobi. Tudi v drugih populacijah so bile frekvence genotipa 677TT višje pri otrocih kot pri odraslih (18, 34–36). Frekvence homozigotnega genotipa 1298CC so bile v različnih populacijah med 2,8 in 15%. Tudi frekvenca tega polimorfizma je v vzorcu slovenskih študentov višja kot v našem vzorcu, pa tudi višja kot v drugih populacijah (18, 32–36).

Razpr. 2. Porazdelitev frekvenc genotipov *MTHFR* pri zdravih osebah iz različnih populacij.

Table 2. The distribution of *MTHFR* genotype frequencies in healthy individuals from different populations.

Populacija Population	Število Number	Genotip <i>MTHFR</i> C677T (%) <i>MTHFR</i> C677T genotype (%)			Genotip <i>MTHFR</i> A1298C (%) <i>MTHFR</i> A1298C genotype (%)			Literatura Reference
		677CC	677CT	677TT	1298AA	1298AC	1298CC	
Slovenija – zdravi odrasli Slovenia – healthy adults	122	37,7	49,2	13,1	47,5	44,3	8,2	Pričujoča študija Present study
Slovenija – porodnice Slovenia – pregnant women	30	56,4	27,3	16,4	-	-	-	Meglić et al. (33)
Slovenija – študenti Slovenia – students	104	45,2	35,6	19,2	45,2	39,4	15,4	Bohanec (32)
Kanada – zdravi odrasli Canada – healthy adults	300	42,0	42,7	15,3	50,0	39,7	10,3	Krajinovic et al. (34)
Brazilijska – otroci Brazil – children	71	31,0	50,0	18,0	56,9	38,9	2,78	Franco et al. (35)
Velika Britanija – zdravi odrasli Great Britain – healthy adults	491	53,5	34,2	12,3	43,0	47,4	9,6	Skibola et al. (18)
Velika Britanija – dojenčki Great Britain – babies	200	44,5	39,5	16,0	47,0	42,0	12,0	Wiemels et al. (36)

Analiza polimorfizma v genu za TS

Pri pomnoževanju promotorskega področja gena za TS je bila dolžina produktov PCR odvisna od števila ponovitev 28bp dolgega zaporedja. Če se je to zaporedje ponovilo dvakrat (genotip 2R/2R), je bil produkt PCR dolg 116 bp, če se je ponovilo trikrat (genotip 3R/3R), pa 144 bp. Pri heterozigotih (genotip 2R/3R) sta bila prisotna produkta obeh dolžin. Značilni rezultati analize produktov PCR so prikazani na sliki 3. Iz razpredelnice 3 je razvidno, da je bila v našem vzorcu zdrave odrasle slovenske populacije frekvenca normalnega genotipa TS 2R/2R 19,5%, frekvenca genotipa 2R/3R 52,2% ter frekvenca genotipa 3R/3R 28,3%. Ugotovljene frekvence polimorfnihi genotipov se niso razlikovale od pričakovanih frekvenc.

Razpr. 3. Genotipi TS pri zdravi odrasli slovenski populaciji.

Table 3. TS genotypes in healthy adult Slovenian population.

Genotipi TS TS genotypes	Število Number	Ugotovljena frekvenca (%) Observed frequency (%)	Pričakovana frekvenca* (%) Predicted frequency* (%)
2R/2R	22	19,5	20,8
2R/3R	59	52,2	49,6
3R/3R	32	28,3	29,6
Skupaj / Total	113	100	100

* Pričakovane vrednosti so bile izračunane po Hardy-Weinbergovi enačbi. Predicted frequencies were calculated according to the Hardy-Weinberg equation.

Iz razpredelnice 4 vidimo, da med posameznimi populacijami obstajajo bistvene razlike v frekvencah polimorfnihi genotipov TS. Frekvence polimorfne genotipa 3R/3R so bile med 23,1% in 70,4%, najnižje so bile v skupini slovenskih študentov (32), najvišje pa v japonski populaciji, kjer so zasledili tudi osebe z genotipi 2R/4R in 2R/5R, 3R/4R, 3R/5R (8). Frekvence normalnega genotipa so bile najnižje, le 2%, pri Japoncih in Kitajcih (8, 37), najvišje pa v skupini slovenskih študentov (32).

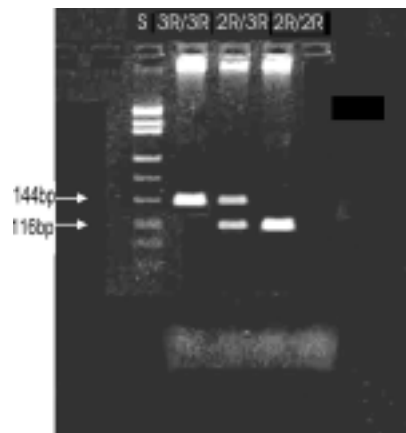
Razpr. 4. Porazdelitev frekvenc genotipov TS pri zdravih osebah iz različnih populacij.

Table 4. The distribution of TS genotype frequencies in healthy individuals from different populations.

Populacija Population	Število Number	Genotip TS / TS genotype			Literatura Reference
		2R/2R (%)	2R/3R (%)	3R/3R (%)	
Slovenija - zdravi odrasli Slovenia - healthy adults	113	19,5	52,2	28,3	Pričujoča študija Present study
Slovenija - študenti Slovenia - students	104	29,8	47,1	23,1	Bohanec (32)
Velika Britanija - zdravi odrasli Great Britain - healthy adults	96	19	43	38	Marsh et al. (37)
Kitajska - zdravi odrasli China - healthy adults	96	2	31	67	Marsh et al. (37)
Indija - zdravi odrasli India - healthy adults	95	16	44	40	Marsh et al. (37)

Razpravljanje

Z genotipizacijo smo ugotavljali pogostnost polimorfizmov genov za MTHFR in TS pri zdravih odraslih Slovencih. V genu za MTHFR smo ugotavljali prisotnost normalnega alela 677C in 1298A ter polimorfnihi alelov 677T in 1298C. Rezultati naše študije so pokazali, da je imelo skoraj dve tretjini preiskovancev vsaj en polimorfen alel 677T, več kot polovica preisko-



Sl. 3. Analiza pomnoženih fragmentov gena za TS. Produkt PCR z dvema ponovitvama polimorfnega zaporedja je bil dolg 116 bp (genotip 2R/2R), produkt s tremi ponovitvami (genotip 3R/3R) pa 144 bp. Pri heterozigotih (genotip 2R/3R) sta bila prisotna produkta obeh dolžin. Pomnožene fragmente smo ločili na 3-odstotnem agaroznem gelu. S – dolžinski standard: DNK pUC18 cepljena s HpaII.

Figure 3. Analysis of amplified TS gene. PCR product containing two polymorphic repeats (genotype 2R/2R) was 116 bp long, PCR product with three polymorphic repeats (genotype 3R/3R) was 144 bp long. Heterozygotes (genotype 2R/3R) had products of both lengths. Amplified fragments were separated on 3% agarose gel. S – Molecular weight marker: pUC18 DNA digested by HpaII.

vancev pa vsaj en polimorfen alel 1298C. Samo 12% preiskovancev ni imelo nobenega polimorfizma v genu za MTHFR. Pri določanju kombinacij genotipov MTHFR 677 in 1298 smo ugotovili, da v našem vzorcu ni bilo takšnih homozigotov za polimorfizem na mestu 677, ki bi imeli hkrati tudi polimorfizem na mestu 1298 (genotip TT + CC). To se ujema z rezultati drugih študij, ki so pokazale, da takšna kombinacija polimorfizmov neugodno vpliva na preživetje zarodka (38). Homozigoti za polimorfizem 1298 pa so imeli na mestu 677 normalen ali polimorfen alel.

Ugotovili smo, da so se frekvence homozigotov za oba polimorfizma v genu za MTHFR med skupinami preiskovancev različnih starosti razlikovale. Tako v slovenski kot tudi v drugih populacijah se je frekvenca homozigotov 677TT zniževala z naraščanjem starosti preiskovancev. To bi lahko razložili z ugotovitvijo, da polimorfizmi v genu za MTHFR povečajo tveganje za nastanek bolezni srca in ožilja (20). Ker se te bolezni večinoma razvijejo po 35. letu starosti, se še niso izrazile v skupini otrok oziroma študentov, starejše osebe s tovrstnimi boleznimi pa so bile izvzete iz vzorcev zdravih odraslih, zato je bila v tej skupini frekvenca genotipa MTHFR 677TT nižja. Ti rezultati kažejo na pomembnost pravilne izbire kontrolne skupine pri asociacijskih študijah.

Z molekulo analizo gena za TS smo ugotavljali število ponovitev 28bp dolgega zaporedja v promotorskem področju gena za TS. Rezultati naše študije so pokazali, da je v slovenski populaciji frekvenca genotipa 3R/3R veliko nižja kot v drugih proučevanih populacijah (8, 37). Visoko frekvenco tega polimorfizma pri Japoncih in Kitajcih razlagajo s tem, da bi

lahko večja encimska aktivnost TS pri osebah z genotipom 3R/3R zagotavlja zadostno raven dTMP za sintezo DNK kljub nizkemu vnosu folata s prehrano, s čimer bi pomenila prednost pri naravni selekciji (37).

Genski polimorfizmi v presnovni poti folata so v slovenski populaciji zelo pogosti. Ker so dejavnik tveganja za številne bolezni, so zelo zanimivi za preučevanje. V slovenski populaciji je bilo opravljenih že več študij. Ugotovili so, da polimorfni genotip MTHFR 677TT ni vplival na plazemsko koncentracije homocisteina in da ni povečal tveganja za tromboembolije pri nosečnicah (33). Genotip MTHFR 677TT je v slovenski populaciji zaščitno vplival na tveganje za raka debelega črevesa (15) in ALL pri otrocih (32). Ostali polimorfizmi v presnovni poti folata niso bili dejavnik tveganja za ALL (32), polimorfizem gena za MS pa je zvišal tveganje za sporadično obliko raka debelega črevesa (39).

Številne vrste raka zdravijo s kombinirano kemoterapijo, ki vključuje tudi antagonist folata. Na toksične učinke metotreksata ali rezistenco nanj lahko vplivajo tudi polimorfizmi genov v presnovni poti folata, zlasti MTHFR (26, 27). Dokazan je bil tudi vpliv polimorfizma gena za TS na slabšo učinkovitost kemoterapije s 5-FU pri zdravljenju raka debelega črevesa (30). V Sloveniji potekata dve študiji o vplivu polimorfizmov v presnovni poti folata na zdravljenje z metotreksatom. V sodelovanju s Pediatrično kliniko v Ljubljani preučujemo vpliv teh polimorfizmov na zdravljenje ALL pri otrocih, v sodelovanju s KO za revmatologijo pa vpliv na zdravljenje revmatoidnega artritisa. Predvidevamo, da bi z opisanimi postopki genotipizacije lahko napovedali, kateri bolniki so bolj izpostavljeni tveganju za pojav toksičnih učinkov, pri katerih pa je večja verjetnost, da bo zdravljenje manj učinkovito. Tako bi glede na genske polimorfizme v presnovni poti folata bolnikom v prihodnosti morda lahko prilagodili odmere zdravila, zmanjšali toksične učinke zdravljenja ter izboljšali preživetje oziroma kakovost življenja.

Zahvala

Za vzorce DNK se zahvaljujemo dr. Blanki Vidan-Jeras, mag. farm., iz Centra za tipizacijo tkiv ter dr. Tadeju Battelinu, dr. med., in Mirjam Stopar-Obreza, dr. med., s Pediatrične klinike v Ljubljani.

Literatura

- Matthews RG et al. Folate and pterins. In: Blakley RL, Benkovic SJ eds. Chemistry and biochemistry of folates. New York: Wiley Interscience, 1984: 497–553.
- Marks DB, Marks AD, Smith CM. Basic medical biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins, 1996: 613–22.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Net Genet* 1995; 10: 111–3.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169–72.
- Rady PL, Szucs S, Grady J et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet* 2002; 107: 162–8.
- Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044–51.
- Horie N, Aiba H, Oguro K et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191–7.
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Hematologica* 2003; 88: 159–66.
- Jacques PF, Bostom AG, Selhub J et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2003; 166: 49–55.
- Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 269–313.
- Gaughan DJ, Kluijtmans LAJ, Barbaux S et al. The methionine synthase reductase A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentration. *Atherosclerosis* 2001; 157: 451–66.
- Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2001: 3897–933.
- Skibola CF, Smith MT, Kane E et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13217–20.
- Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ et al. MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example for gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *J Nutr* 1999; 129: 560S–4S.
- Dolžan V, Ravnik-Glavač M, Golouh R, Breskvar K. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to colorectal cancer. In: Javornik B, Lutar Z eds. Genetika 2003. Proceedings of 3rd congress of the genetic society of Slovenia with international participation. Ljubljana: Genetic society of Slovenia, 2003: 153–4.
- Shen H, Xu Y, Zheng Y et al. Polymorphisms of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int J Cancer* 2001; 95: 332–6.
- Song C, Xing D, Tan W et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001; 61: 3272–5.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute leukemia. *Blood* 2002; 99: 3786–91.
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1322–7.
- Refsum H, Ueland PM, Nygard O et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31–62.
- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; 345: 149–51.
- Van Rooij IALM, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LAJ et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 583–91.
- van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350: 2033–41.
- Bathum L, Von Bornemann Hjelmborg J, Christiansen L, Madsen JS, Skytthe A, Christensen K. Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporos Int* 2004; 15: 659–64 [Epub ahead of print].
- Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics – drugs disposition, drug targets and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348: 538–49.
- Chiusolo P, Reddicono G, Casorelli I et al. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol* 2002; 13: 1915–8.
- Krajinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of TS gene and outcome of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2002; 359: 1033–4.
- Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 183–90.
- Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 2003; 11: 593–600.
- Iacopetta B, Grieco F, Joseph D et al. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Brit J Cancer* 2001; 85: 827–30.
- Yi P, Pogribny IP, James SJ. Multiplex PCR for simultaneous detection of 667C → T and 1298A → C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. *Cancer Letters* 2002; 181: 209–13.
- Bohanec P. Vpliv genskih polimorfizmov v presnovni poti folata na tveganje za akutno limfatično levkemijo pri otrocih. Diplomsko delo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2004: 39–54.
- Meglić L, Stegnar M, Milanez T et al. Factor V Leiden, prothrombin 2010G → A, methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T and plasminogen activator inhibitor 4G/5G polymorphism in women with pregnancy-related venous thromboembolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 111: 157–63.
- Krajinovic M, Lemiex-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal* 2004; 4: 66–72.
- Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcao RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 115: 616–8.

36. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4004–9.
 37. Marsh S, Collie-Duguid ESR, Li T et al. Ethnic variation in thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 1999; 58: 310–2.
 38. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 986–90.
 39. Tršan T. Analiza polimorfizma gena za metionin sintazo in vpliva na tveganje za nastanek raka debelega črevesa pri Slovencih. Diplomsko delo. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 2004: 30–39.
-