

# Primerjava alelnih frekvenc mutacij ključnih encimov presnove homocisteina med vzorci Slovencev in drugih narodov

## Allele frequency of mutations of homocysteine metabolism key enzymes in Slovene population in comparison to that in other populations

Nadja Plazar, Barbara Ostanek

**Povzetek:** V vzorcu 149 navidezno zdravih prostovoljcem smo proučevali pogostost mutacij genov: 677C>T 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze - MTHFR, 1947G>A katehol-O-metil transferaze – COMT in 1420C>T citosolne serin hidroksimetiltransferaze - cSHMT), ki določajo tri ključne encime presnove homocisteina in jih primerjali z že objavljenimi rezultati. Ugotovili smo, da pri alelni frekvenci mutacije 677C>T MTHFR med Slovenci in ostalimi evropskimi narodi (z izjemo Italijanov in Nemcev) ni statistično značilne razlike. Prav tako ni statistično značilne razlike pri mutaciji 1947G>A COMT (z izjemo Italijanov in Špancev). Alelne frekvence za 1420C>T cSHMT se med evropskimi narodi statistično značilno ne razlikujejo, so pa v pogostosti pojavljanja gena primerljive z Japonci. Primerjali smo pričakovane in za evropsko populacijo določene frekvence genotipov in ugotovili, da se statistično pomembno ne razlikujejo za vse tri preiskovane mutacije, iz česar sklepamo, da v evoluciji Evropejcev ni bilo očitne prednosti ali slabosti zaradi mutacij izbranih genov, kljub temu, da imajo mutirani homozigoti le 50 % ali manj aktivnosti nemutiranega encima.

**Ključne besede:** hiperhomocisteinemija, aktivnost encima, mutirani gen, alelni gen.

**Abstract:** In 149 apparently healthy volunteers we studied the frequency of gene mutations 677C>T 5.10-methylenetetrahydrofolate reductase - (MTHFR), 1947G>A catechol-O-methyltransferase - COMT and 1420C>T cytosol serine hydroxymethyltransferase –cSHMT) which define the three key enzymes essential for normal homocysteine metabolism, and compared them to already reported results. We concluded that there is no significant difference in the allele frequency of 677C>T MTHFR mutation in Slovene population comparable to that in European population (except Italian and Spanish). There is no significant difference in the frequency of the 1420C>T cSHMT allele in European population, whereas in comparison to that in the Japanese there is. We compared the expected and for the European population determined genotype frequency and came to the conclusion that there is no significant difference for any of the mutations examined. We thus conclude that the mutation of selected genes, even though the activity of the non-mutated enzyme in mutated homozygotes is only of 50% or less, was of no obviously positive or negative significance for the evolution of European populations.

**Key words:** hyperhomocysteinemia, enzyme activity, mutated gene, allele gene

## 1 Uvod

### 1.1 Hiperhomocisteinemija - dejavnik tveganja

Zmerna hiperhomocisteinemija je približno enako pomemben dejavnik tveganja za nastanek ateroskleroze kot kajenje in hiperlipidemija (1). Pri porastu koncentracije homocisteina za 5 mol/L se relativno tveganje poveča od 1,3 do 2,7 (2). Povišan homocistein

naj bi bil odgovoren za najmanj 10 % tveganja za razvoj aterosklerotične žilne bolezni (3). Dodatni dejavniki tveganja, kot so kajenje, povišan krvni tlak, sladkorna bolezen in hiperlipidemija lahko sinergistično delujejo s povišanim homocisteinom in ga še povečujejo (2).

Mehanizmi, s katerimi homocistein vpliva na nastanek aterosklerotične spremembe žilne stene, še niso povsem razjasnjeni, osnovani pa so na predpostavki, da homocistein pospešuje nalaganje

fibrina (nastanek tromba) na žilno steno ter da spremeni endotelijske celice in celice gladkega mišičja tako, da povzroči nastanek žilne bolezni ali pospeši njen razvoj. Verjetno homocistein deluje na žilno steno po več poteh: neposredno poškoduje celice žilnega endotelija, pospešuje proliferacijo celic gladkega mišičja in nalaganje kolagena ter oksidacijo lipoproteinov nizke gostote.

Možna sta dva mehanizma, po katerih naj bi homocistein spreminjal žilno funkcijo, ki vključujeta oksidativni stres in spremembe celične metilacije:

**Po mehanizmu oksidativnega stresa** oksidacija homocisteina v plazmi v homocistin, mešane disulfide in homocistein-tiolakton, vodi do nastanka reaktivnih oksidativnih vrst, kot so vodikov peroksid, superoksidni anion in hidroksilni radikal. Rezultati raziskav *in vitro* kažejo, da nastanejo poškodbe endotelijskih celic pri zmerni hiperhomocisteinemiji predvsem zaradi delovanja vodikovega peroksida (4).

Drugi možni mehanizem, ki vodi do motene žilne funkcije pri hiperhomocisteinemiji, je prepletenost presnove homocisteina z reakcijami **metilnega prenosa**. Presnova homocisteina je povezana s celičnim nivojem S-adenozil-metionina (SAM), ki se vpleta tako v transulfuracijsko kot remetilacijsko pot presnove. SAM je obenem dajalec metilnih skupin pri metilaciji DNA, beljakovin, fosfolipidov in biogenih aminov. Aktivnost metiltransferaz je torej odvisna od celične koncentracije SAM-a, pa tudi S-adenozil-homocisteina (SAH). Obenem pa visoke vrednosti homocisteina, ki zastajajo v celicah, inhibirajo reakcije metiliranja. Metilacija je bistvenega pomena za vzdrževanje strukture DNA; brez reparacije pride do mutacij in rušenja same strukture (5, 6). Tesna povezava med homocisteinom, SAM in SAH kažejo, da je spremenjena celična metilacija odgovorna za nekatere učinke homocisteina pri žilni disfunkciji (7).

### 1.2 Presnova homocisteina

Homocistein nastaja pri presnovi metionina v skoraj vseh celicah. V kri ga prehaja le del, največ iz hepatocitov, in sicer 5 do 10 % dnevno sintetiziranega homocisteina, kar je 1,2 mmol/dan. Tveganje za srčnožilne bolezni narašča sorazmerno z naraščanjem koncentracije homocisteina in zato jasne razmejite med normalnimi in povišanimi vrednostmi ni. Kljub temu so hiperhomocisteinemije razdelili po koncentraciji celokupnega homocisteina v plazmi, odvzeti na tešče v **zmerno** (koncentracija homocisteina 12-30  $\mu\text{mol/L}$ ), **srednjo** (koncentracija homocisteina 31-100  $\mu\text{mol/L}$ ) in **hudo hiperhomocisteinemijo** (nad 100  $\mu\text{mol/L}$ ) (4).

Homocistein nastaja iz esencialne aminokisliline metionina. V telo prihaja s hrano ali nastaja z razgradnjo endogenih beljakovin. Metilna skupina metionina se aktivira s prehodom v S-adenosil-metionin. Reakcijo katalizira ATP: L-metionin-S-adenoziltransferaza. Metionin se v reakciji poveže z adenozijskim delom molekule ATP preko žveplovega mostička (-S-) tako, da nastane vez med 5'-ogljikovim atomom riboze in žveplovim atomom metionina. S-adenozil-metionin je zaradi žveplovega mostička »visoko energetska« molekula in je glavni biološki dajalec metilne skupine, ki jo ob prisotnosti metilaz (**katehol-O-metiltransferaza, COMT; EC 2.1.1.6**) prenaša na kateholamine, nukleinske kisline, proteine, fosfolipide, mielin, polisaharide in številne druge molekule (slika 1). Po prenosu metilne skupine prehaja S-adenozil-metionin v tioester S-

adenozil-homocistein. S-adenozil-homocistein ima podobno strukturo kot S-adenozil-metionin, zato se lahko veže na ista vezalna mesta (vendar z drugačno afiniteto) in s tem zmanjšuje njegovo aktivnost. Razmerje med njima je kazalec metilacijskih procesov v telesu. Z merjenjem koncentracije so ugotovili, da je S-adenozil-homocisteina v jetrih normalnih odraslih podgan 13 nmol/g, S-adenozil-metionina pa 60 do 90 nmol/g, kar pomeni, da je njuno razmerje približno 1:4. Njuno razmerje je zaradi zaviralnega delovanja S-adenozil-homocisteina pomembno; če se poruši, se zmanjša aktivnost metiltransferaz, odvisnih od S-adenozil-metionina, za 10 do 60 %.

S-adenozil-homocistein nato hidrolizira v homocistein in adenzin z reverzibilno reakcijo, ki jo katalizira S-adenozil-homocistein hidrolaza.

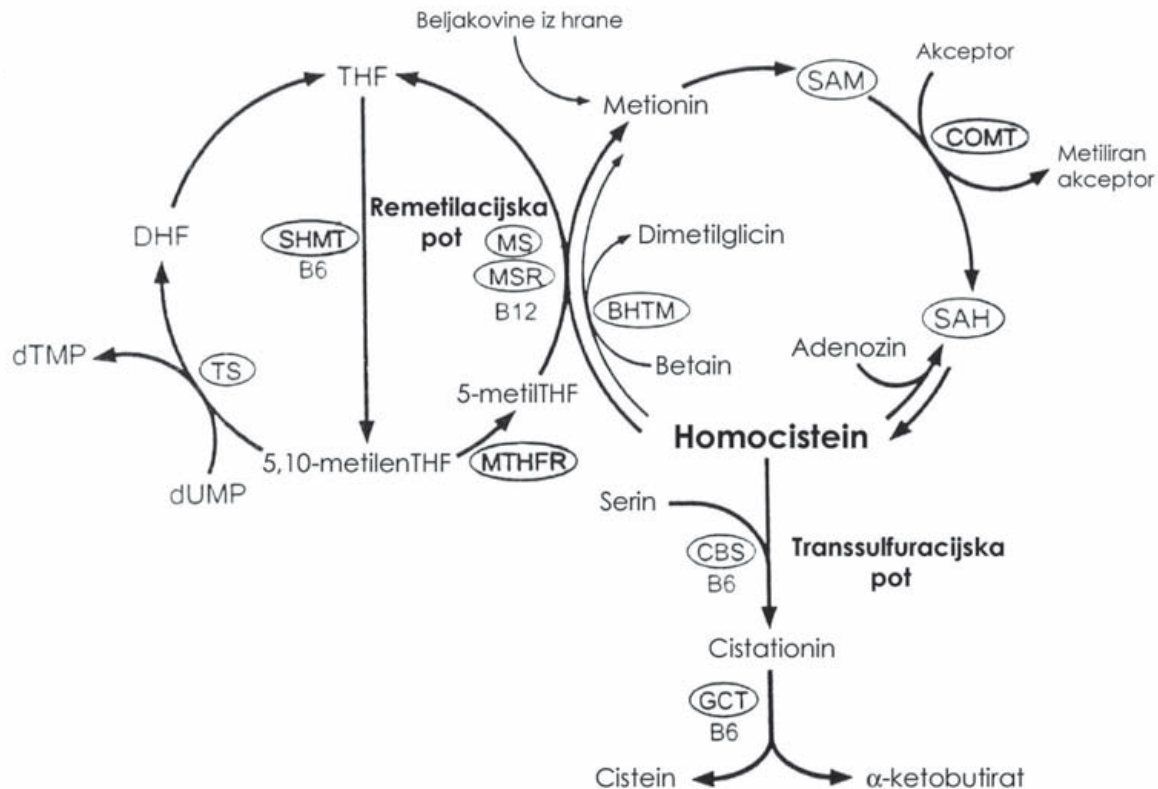
Homocistein se lahko presnavlja naprej po dveh poteh: remetilacijski ali transulfuracijski poti.

V večini tkiv se homocistein lahko **remetilira** v metionin. Pri remetilaciji homocisteina v metionin je v večini tkiv dajalec metilne skupine 5-metil-tetrahidro-folat. Reakcijo katalizira 5-metil-tetrahidrofolat-homocistein-metiltransferaza (metionin-sintaza, MS) s kofaktorjem vitaminom B12, kar je prikazano na sliki 1. Nastali tetrahidrofolat prehaja v 5,10-metil-tetrahidrofolat z encimom **5,10-metil-tetrahidrofolat-reduktazo, (MTHFR, EC 1.1.9.9)** in nato v 5-metil-tetrahidro-folat. V nekaterih tkivih, predvsem v jetrih, ledvicah pa tudi v očesnih lečah, poteka remetilacija homocisteina po poti, neodvisni od folatov in vitamina B12; dajalec metilne skupine je betain (trimetilglicin), ki prehaja v dimetilglicin. Reakcijo katalizira encim betain-homocistein-metiltransferaza. Dimetilglicin se lahko naprej demetilira z dimetilglicin dehidrogenazo do sarkozina in pri tem nastaja 5,10-metil-tetrahidrofolat. Sarkozin se razgradi s sarkozin dehidrogenazo do glicina, ki se lahko porabi za tvorbo 5,10-metil-tetrahidrofolata (4, 8).

Druga presnovna pot homocisteina je **transulfuracijska**, pri kateri homocistein s serinom prehaja v cistationin z encimom cistationin-sintazo (CBS) in s kofaktorjem vitaminom B6, nato v cistein z encimom-cistationazo (GCT).

Katerikoli proces v presnovi homocisteina (remetilacija, transulfuracija, metilacija) je lahko moten zaradi neustreznih aktivnosti sodelujočih encimov, do katerih lahko pridejo spremembe v genih za te encime ali neustrezne količine potrebnih kofaktorjev (vitamin B6, B12, folati, piridoksal-5 fosfat). Najbolj so raziskovane spremembe v genih za tiste encime, ki privedejo do hude hiperhomocisteinemije, na primer v genu za CBS ali v genu za GCT na transulfuracijski poti. V zadnjem času je vedno več objav o vzrokih, ki privedejo do srednje in zmerne hiperhomocisteinemije. Ti so lahko mutacije v genih za encime, ki sodelujejo v remetilacijski poti in z njo povezano presnovno potjo folata (predvsem MTHFR, cSHMT) in v metilacijskih procesih (predvsem COMT).

Domnevamo, da so za višjo koncentracijo homocisteina in s tem višjim tveganjem za razvoj srčnožilnih bolezni odgovorni tudi ali predvsem genetski dejavniki, zato smo ugotavljali pogostost mutacij pri treh izbranih genih encimov, ki sodelujejo na ključnih mestih v presnovi homocisteina in jih primerjali z že objavljenimi rezultati. Ti so 5,10-metil-tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), katehol-O-metil transferaza (COMT) in citosolna serin hidroksimetiltransferaza (cSHMT).



Slika 1: Presnova homocisteina

Figure 1: Homocysteine metabolic pathways

Okrajšave: 5-metilTHF – 5-metiltetrahydrofolat; 5,10-metilenTHF – 5,10-metilentetrahydrofolat; B<sub>6</sub> – vitamin B6; B12 – vitamin B12; BHMT – betain-homocistein metiltransferaza; CBS – cistationin β-sintaza; COMT – katehol-o-metiltransferaza; DHF – dihidrofolat; dUMP – deoksiuridin monofosfat; dTMP – deoksitimidin monofosfat; GCT – γ-cistationaza; MS – metionin sintaza; MSR – reduktaza metionin sintaze; MTHFR – 5,10-metilentetrahydrofolat reduktaza; SAH – s-adenozil homocistein; SAM – s-adenozil metionin; SHMT – serin hidroksimetiltransferaza; THF – tetrahydrofolat, TS-timidilat sintaza.

### 1.3 Gen za 5,10-metilentetrahydrofolat reduktazo (MTHFR)

Gen za MTHFR se nahaja na kromosomu 1, na koncu krajše ročice p, na položaju 1p36.32. Kodirajoča regija je dolga 1980 bp in kodira za protein molekulske mase 77 kDa. Gen je sestavljen iz 11 eksonov, dolžine od 102 bp do 432 bp, in intronov, dolžine od 250 bp do 1,5 kb, razen enega introna, ki ima 4,2 kb. (9, 10). Določa encim 5,10-metilentetrahydrofolat reduktazo (MTHFR), flavoprotein iz družine metilentetrahydrofolat reduktaz (EC:1.5.1.20). Človeški encim je homodimer, ki ga sestavljata dve podenoti, velikosti 77 kDa. Dolžina aminokislinskega zaporedja je 656. MTHFR je citoplazemski encim, ki katalizira redukcijo 5,10-metilentetrahydrofolata v 5-metiltetrahydrofolat. Encim veže koencim flavin adenin dinukleotid (FAD) in potrebuje NADPH kot elektronski dajalec. V fizioloških pogojih je reakcija ireverzibilna, encimsko aktivnost pa alosterično regulira glede na koncentracijo metionina v celici S-adenozil-metionin (SAM), ki je inhibitor encima (11, 12).

V genu za MTHFR so odkrili 34 redkih, a škodljivih mutacij in 9 pogostih polimorfizmov. Ena izmed prvih odkritih je bila mutacija 677C>T. Mutacija 677C>T se nahaja v eksonu 4, na mestu, ki kodira vezavno mesto za folat. Posledica je zamenjava 220 aminokislinske alanina (A) z valinom (V) na mestu 222. Pri homozigotni osebi z mutacijo je aktivnost encima znižana na 35 % normalne, kar je posledica povečane termolabilnosti. Ugotovili so tudi, da mutacija povzroči razpad dimernege encima v monomerni, slabšo vezavo FAD koencima in s tem manjšo aktivnost (12, 13).

### 1.4 Gen za katehol-O-metil transferazo (COMT)

Poznamo dve izoobliki encima, topno (S-COMT) in membransko vezano (MB-COMT), ki se v različnih tkivih različno izražata (14, 15). Kodira ju skupni gen na daljši ročici 22. kromosoma, na mestu 22q11.21-q11.23. Gen je sestavljen iz 6 eksonov, od katerih eksona 1 in 2 nista kodirajoča. Prepis COMT gena uravnava dva ločena promotorja P1 in P2. (16) Encim COMT katalizira prenos metilne

skupine iz SAM na –OH skupino kateholnega akceptorja (noradrenalin, adrenalin in drugi), pri čemer se SAM pretvori v SAH. Na ta način COMT sodeluje pri inaktivaciji kateholaminskih nevrottransmiterjev, kot so adrenalin, noradrenalin in dopamin ter razgradnji kateholnih estrogenov.

Proučevana mutacija 1947G>A na genu v COMT je točkasta mutacija, pri kateri se na 4. eksonu v 158. kodonu za MB-COMT, oziroma 108. kodonu za S-COMT, gvanin zamenja z adeninom. Posledica te mutacije je zamenjava amino kisline valina (GTG) z metioninom (ATG) v polipeptidu, kar zmanjša za 3 do 4-krat aktivnost nastalega encima. Aktivnost encima COMT s homozigotno mutacijo je od 25 do 35 % v primerjavi s homozigom z nemutiranimi aleloma. (17, 18)

## 1.5 Gen za citosolno serin hidroksimetiltransferazo (cSHMT)

Encim SHMT katalizira reverzibilno reakcijo, v kateri serin prehaja v glicin, medtem ko hidroksimetilna skupina prehaja na tetrahidrofolat in tako nastane 5,10-metilentetrahidrofolat. Na ta način ima SHMT ključno vlogo v metabolizmu folatov, ki so povezani z biosintezo purinov in pirimidinov in s tem nukleinskih kislin (19). Aktivnost encima SHMT je pogojena z vezavo koencima piridoksal-5'-fosfat (PLP) in spada v razred piridoksal-5'-fosfat encimov, čeprav ima manjšo sekvenčno podobnost z ostalimi encimi skupine, na primer z aspartat aminotransferazo (20).

Dva različna gena kodirata zapis za izoencima SHMT: gen SHMT1 (za encim cSHMT) in SHMT2 (za encim mSHMT). Nahajata se na dveh kromosomih: 17p11.2 in 12q13. Gen SHMT1 je dolg 23 kb in vsebuje 12 intronov ter 13 eksonov. Izrezovanje intronov poteka po pravilu gt/ag. Kodirajoči del gena je prekinjen z 10 introni, od katerih sta le 2 pozicijsko ohranjena v genu za mSHMT. Visoka stopnja identičnosti med obema genoma in prisotnost genov za keratin na obeh kromosomskih regijah kaže na možnost, da sta regiji kromosoma 12 in 17 nastali z duplikacijo, najverjetneje v filogenetskem razvoju po ločitvi razvojne poti prokariotov in evkariontov. (20, 21)

Mutacija 1420C>T v genu za cSHMT se nahaja v zadnjem, 13. eksonu, ki kodira C-terminalno domeno, pri čemer je mesto mutacije šteto od začetnega mesta translacije (AUG kodona). Posledica tranzicije citozina v timin je zamenjava aminokisline levcina (Leu) s fenilalaninom (Phe) na mestu 474 proteina (L474F) (22). Pri tem se zmanjša aktivnost encima in posledice so podobne kot pri pomanjkanju folatov. Zaradi znižanja aktivnosti mutirane cSHMT pride do motene remetilacije homocisteina in sinteze DNA (23). Lahko pa polimorfizem 1420C>T povzroči usmerjanje folatov v sintezo timidina zaradi interakcije (protein-protein) s timidilat sintazo ali zaradi povečane sinteze 5-formiltetrahidrofolata (24).

Izbrani geni kodirajo encime, ki sodelujejo v presnovi homocisteina. Mutacije različno znižujejo aktivnost encimov, običajno pri homozigotih pod 50 %. Namen naše študije je bil določiti, kakšna je alelna frekvenca določenih mutacij v slovenski populaciji, in jih primerjati z objavljenimi podatki o alelnih frekvencah drugih narodov. Ugotavljali smo prisotnosti naslednjih mutacij: 677C>T v genu za 5,10-metilretrahidrofolat reduktazo (MTHFR), 1947G>A v genu za katehol-O-metiltransferazo (COMT) in 1420C>T v genu za serin hidroksimetiltransferazo (SHMT).

Te mutacije vplivajo na aktivnost ključnih encimov v presnovi homocisteina (MTHFR), obenem pa povezujejo presnovo homocisteina s presnovo folatov in s sintezo nukleinskih kislin (SHMT) ter z glavno potjo presnove kateholaminskih nevrottransmiterjev (COMT).

## 2 Materiali in metode

**Vzorec:** 149 navidezno zdravim prostovoljcem, starih od 20 do 78 let, s povprečjem 43,9 (+,-13,7) let je bilo odvzete 4 ml venozne krvi z antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Med vključenimi prostovoljci je bilo 112 žensk (81,9 %) in 37 moških (18,1 %).

Študijo je odobrila Komisija za etična vprašanja Republike Slovenije (57/05/04). Privolitev so podpisali vsi prostovoljci vključeni v študijo.

### Analiza DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz levkocitov venske krvi, odvzete z antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA, pri čemer smo uporabili komplet FlexiGene DNA (Qiagen, Hilden, Germany). Za identifikacijo mutacij *MTHFR* 677C > T, *COMT* 1947G > A in *cSHMT* 1420C > T smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR), ki ji je sledila analiza dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP) ali analiza konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA (SSCP).

**Genotipizacija *MTHFR* 677 C > T.** PCR so izvedli tako, da smo v reakcijsko zmes s skupnim volumnom 20 µL smo dodali DNA vzorca (100 ng), 1 × PCR Gold pufer, 0,2 mM vsakega od štirih deoksiribonukleotidov, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 enote AmpliTaq Gold™ polimeraze (Applied Biosystems, Foster City, CA) in 0,2 mM vsakega oligonukleotidnega začetnika (F: (5'-TGA-AGG-AGA-AGG-TGT-CTG-CGG-GA-3', R: 5'-AGG-ACG-GTG-CGG-TGA-GAG-TG-3')). Uporabljene oligonucleotide začetnike je opisal Frosst et al. Optimizirani pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja so bili: začetek 10 minut na 95 °C, ki mu je sledilo 37 ponovitev po 30 sekund na 94 °C (denaturacija), 30 sekund na 62 °C (prileganje začetnikov) in 30 sekund na 72 °C (podaljševanje DNA) ter na koncu 7 minut na 72 °C (končno podaljševanje DNA).

Pet mL tako dobljenega PCR produkta (198 bp) smo čez noč inkubirali z 1 enoto *Hinf*I restriksijske endonukleaze (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). Uspešnost restrikcije smo preverili z elektroforezo (Mini-protean, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) na 4 % agaroznem gelu pri napetosti 85 V, času poteka 90 minut in z uporabo 1.0 × TAE pufru (4 mM Tris-HCl, 20 mM očetne kislina, 0,96 mM EDTA) ter barvanjem z etidijevim bromidom.

Fragment velikosti 198 bp je predstavljal CC genotip, 175- in 23-bp TT genotip in 198, 175- in 23-bp CT genotip.

**Genotipizacija *COMT* 1947 G > A.** Pri PCR smo v reakcijsko zmes s skupnim volumnom 20 µL smo dodali DNA vzorca (100 ng), 1 × PCR Gold pufru, 0,2 mM vsakega od štirih deoksiribonukleotidov, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 enote AmpliTaq Gold™ polimeraze in 0,2 mM vsakega oligonukleotidnega začetnika (F: 5'-CTC-ATC-ACC-ATC-GAG-ATC-AA-3' in R: 5'-CCA-GGT-CTG-ACA-ACG-GGT-CA-3'). Uporabljene oligonucleotide začetnike je opisal Malhotra et al. (26). Optimizirani pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja so bili: začetek 10 minut na 95 °C, ki mu je sledilo 37 ponovitev po 30 sekund na 94 °C, 30 sekund

na 55 °C in 30 sekund na 72°C ter na končnih 7 minut na 72°C. Pet mL PCR tako dobljenega PCR produkta (109 bp) smo čez noč inkubirali z 1 enoto *NlaIII* restrikcijske endonukleaze (New England Biolabs, Inc.).

Uspešnost restrikcije smo preverili z elektroforezo na 12 % poliakrilamidnem gelu pri napetosti 200 V, času poteka 40 minut in 0.5 x TAE pufru (50 mM Tris-borata, pH 8.3 in 0.5 mM EDTA) ter barvanjem z etidijevim bromidom. Fragment velikosti 87- in 22-bp je predstavljal GG genotip, 69-, 18- in 22-bp AA ter 87-, 69-, 18- in 22-pa GA genotip.

**Genotipizacija cSHMT1420 C > T.** Pri PCR smo v reakcijsko zmes s skupnim volumnom 20 µL smo dodali DNA vzorca (100 ng), 1 x PCR pufera II, 0.2 mM vsakega od štirih deoksiribonukleotidov, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 enote AmpliTaq Gold™ polimeraze in 0.25 mM vsakega oligonukleotidnega začetnika (F: 5'-AGA-GTT-CAA-GGA-GAG-ACT-GGC-AG-3' in R: 5'-GTC-AAC-AGT-TCC-CCT-TTG-GAG-3'), ki smo ju izbrali glede na sekvenco cSHMT, objavljeno v GenBank (NM-004169) s pomočjo računalniškega programa NetPrimer 3.

Optimizirani pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja so bili: začetek 10 min na 95 °C, ki mu je sledilo 37 ponovitev po 30 sekund na 94 °C, 30 sekund na 60 °C in 30 sekund na 72°C ter končnih 7 min na 72°C.

Za SSPS analizo smo 2 mL tako pridobljenega PCR produkta (220 bp) pomešali s 17 mnanašalnega LIS pufru (10 % saharoza, 0.01 % bromfenol-modro in 0.01 % ksilenciano) denaturirali v vodni kopeli pri 95 do 97°C 3 minute in nato takoj prenesli na led za 5 minut.

15 mL tako pripravljenega vzorca smo nanесли na on 8 % (37:1) poliakrilamidni gel. Elektroforeza je potekala na Protean II elektroforezni enoti (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), pri čemer smo uporabljali 0.5 x TBE pufer (50 mM Tris-borate, pH 8.3 in 0.5 mM EDTA) in konstanten električni tok 20 W pri temperaturi 22 °C in trajanju 2.5 ure. Sledilo je barvanje s srebrom nitratom.

### Statistika

Genotipsko in alelni frekvenco smo izračunali po prikazanih formulah:

$$f_A = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N} \quad \text{in} \quad f_a = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$$

$f_A$  ... frekvenca alela A v populaciji

$f_a$  ... frekvenca alela a v populaciji

$n_{AA}$ ,  $n_{Aa}$ ,  $n_{aa}$  ... števila posameznikov z genotipi AA, Aa in aa

N ... število vseh posameznikov

Alelni frekvenco mutacije genov smo preverili s pravili Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Številčnost genotipov smo primerjali s pomočjo testa  $\chi^2$  in Fischer Exact testa (SPSS za Windows 4.0).

## 3 Rezultati in razprava

Pogostost mutacije 677C>T v genu za MTHFR pri preiskovani skupini je bila: CC 52,5 %, CT 39,0 % in TT genotipa 8,5 %. Alelna frekvenca C alela je pa 67,8 %, alelna frekvenca T alela pa 32,2 %. S Fisherjevim

exact testom smo primerjali alelni frekvence C in T alela med Slovenci in objavljenimi rezultati za ostale narode v Evropi (preglednica 1).

Tabela 1: Alelna frekvenca T alela mutacije 677C>T v genu za MTHFR pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.

Table 1: Allele frequency of the 677C>T mutation in MTHFR gene T allele in diverse European populations in comparison with that in Slovenian population

Populacija	Število preiskovancev	Alelna frekvenca T alela (%)	Fisher Exact test (p)
Slovenci	149	32,2	/
Britanci	1046	35,4	0,299
Nizozemci	503	32,2	1,000
Francozi	133	36,1	0,374
Nemci	257	24,5	<b>0,022</b>
Irci	1309	32,5	0,948
Italijani	2053	43,8	<b>0,000</b>
Norvežani	391	28,0	0,178
Švedi	126	30,2	0,645
Hrvati	298	30,5	0,646

Alelni frekvence med Slovenci in ostalimi evropskimi narodi (z izjemo Italijanov in Nemcev) se statistično značilno ne razlikujejo. Italijani imajo najvišjo pojavnost T alela v Evropi (43,8 %), Nemci pa najnižjo (24,5 %). Razlika med Slovenci in Italijani ter Nemci je statistično značilna.

**Pogostost mutacije 1947G>A v genu za COMT** določena pri isti skupini je bila GG 24,2 %, GA 45,60 % in AA genotipa 30,2 %. Alelna frekvenca G alela je 47,0 % in A 53,0 %. S Fisher Exact testom smo primerjali alelni frekvence G alela med Slovenci in ostalimi narodi v Evropi in ugotovili statistično značilne razlike s Švedi, Italijani in Španci, ki imajo najvišjo pojavnost G alela v Evropi (preglednica 2).

Primerjali smo tudi pojavnost G alela med narodi različnih celin. Ker se podatki v virih nanašajo na G alel, smo temu prilagodili tudi naše podajanje, ne glede na to, da je A mutirani alel. Večje razlike v alelni frekvenci mutacije 1947G>A v genu za COMT opazimo v primerjavi s povprečnimi alelnimi frekvencami populacij drugih kontinentov, izračunanih iz podatkov v ALFRED bazi. Podatki so podani v preglednici 3.

Pogostost mutacije **mutacije 1420C>T v genu za cSHMT** preiskovane skupine je bila: CC 40,3 %, CT 50,3 % in TT genotipa 9,4 %. V slovenski populaciji je pojavnost T alela 34,6 %, kar je blizu alelni frekvenci drugih kavkaških narodov. S Fisher exact testom smo primerjali alelni frekvence T alela slovenske populacije z ostalimi objavljenimi raziskavami, katerih alelni frekvence so na voljo (Preglednica 4).

Med alelni frekvenco slovenske in alelnimi frekvencami drugimi kavkaških narodov ni statistično pomembnih razlik, obstaja pa z

Tabela 2: Alelna frekvenca G alela mutacije 1947G>A v genu za COMT pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.

Table 2: Allele frequency of the 1947G>A in COMT gene G allele in diverse European populations in comparison with that in Slovenian population

Populacija	Število preiskovancev	Alelna frekvenca G alela (%)	Primerjava s Slovenci Fisher Exact test (p)
Slovenci	149	47	/
<b>Švedski</b>	458	<b>56</b>	<b>0,007</b>
Nemci	328	49	0,530
<b>Italijani</b>	127	<b>61</b>	<b>0,001</b>
Rusi	96	49	0,711
Angleži	161	51	0,297
Danci	102	39	0,099
<b>Španci</b>	226	<b>57</b>	<b>0,007</b>
Irci	230	50	0,457
Američani (EP)	55	55	0,182

Oznake: EP – evropsko poreklo.

Denotation: EO – European origin

Tabela 3: Povprečne frekvence G alela mutacije 1947G>A v genu za COMT za populacije različnih kontinentov.

Table 3: Average frequency of the 1947G>A in COMT gene G allele in diverse continents populations

Celina	G alel
Evropa	52 ± 9 %
Afrika	75 ± 10 %
Azija	63 ± 7 %
Vzhodna Azija	75 ± 6 %
Severna Amerika	66 ± 14 %
Južna Amerika	82 ± 13 %
Oceanija	77 ± 8 %

Japonci (p=0,0001), ki imajo alelnu frekvenco T statistično pomembno nižjo (8,9 %).

Napravili smo povzetek številčnosti posameznih genotipov vseh treh genov za preiskovano skupino 149 prostovoljcev (Preglednica 5).

Po Hardy-Weinbergovih pravilih ( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , pri čemer sta p in q alelni frekvenci nevtralnih genov) smo iz povprečnih alelnih frekvenc treh proučevanih genov, izračunanih iz razpoložljivih virov (Preglednica 1, 2 in 4) izračunali teoretično pričakovane genske frekvence. Pričakovane in za evropsko populacijo določene frekvence genotipov smo primerjali s pomočjo  $\chi^2$  testa in ugotovili, da se statistično pomembno ne razlikujejo za vse tri preiskovane mutacije. Ker Hardy-Weinbergovo ravnovesje velja le za velike izolirane populacije, pri katerih je bilo parjenje naključno ter so imeli vsi genotipi enake možnosti preživetja in razmnoževanja, lahko

Tabela 4: Alelna frekvenca T alela mutacije 1420C>T v genu za cSHMT pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.

Table 4: Allele frequency of the 1420C>T in cSHMT gene T allele in European populations in comparison with that in Slovenian population

Populacija	Število preiskovancev	Alelna frekvenca T alela (%)	Primerjava s Slovenci Fisher Exact test (p)
Slovenci	149	34,6	/
Britanci	114	38,1	0,411
Nizozemci	411	32	0,428
Američani (Kavkazijci)	458	30,4	0,173
Američani (beli (ne)hispanci)	729	30,6	0,192
<b>Japonci</b>	411	<b>8,9</b>	<b>0,0001</b>

Tabela 5: Številčnost posameznih genotipov in kombinacije mutacij 677C>T gena za MTHFR, 1947G>A gena za COMT in 1420C>T gena za cSHMT pri skupini 149 prostovoljcev.

Table 5: Frequency of individual genotypes and mutation combinations of the 677C>T in MTHFR gene, 1947G>A in COMT gene, and 1420C>T in cSHMT gene in 149 volunteers.

MTHFR	COMT				cSHMT			
	AA	GA	GG	Skupaj	CC	CT	TT	Skupaj
CC	22	31	18	71	34	27	10	71
CT	18	29	13	60	21	36	3	60
TT	5	8	5	18	5	12	1	18
Skupaj	45	68	36	149	60	75	14	149

sklepamo, da v evoluciji Evropejcev ni bilo očitne prednosti ali slabosti zaradi mutacij izbranih genov. Iz tega lahko sklepamo, da mutacije proučevanih genov niso vplivale na preživetje in možnost razmnoževanja kljub temu, da imajo homozigoti mutiranih genov le od polovice do tretjine aktivnosti encimov nemutiranih genotipov. Sklepamo, da so imeli osebkii z mutiranimi genotipi neke druge prednosti. V naši raziskavi smo proučevali gene za ključne encime presnove homocisteina, ki povezujejo presnovo homocisteina s sintezo DNA (MTHFR-cSHMT). Znižana aktivnost encima MTHFR genotipa TT na približno 35 % in polna aktivnost encima cSHMT genotipa CC omogočata preusmeritev folatov iz presnove homocisteina v sintezo timidilata in s tem DNA (slika 1). Izmerjena pogostost T alela v genu za MTHFR v slovenski populaciji je 32 % (v Evropi od 24,5 do 43,8), kar je zelo visoka pogostost glede na to, da

ima encim TT genotipa le tretjino aktivnosti encima nemutiranega homozigota. V evoluciji je, po vsej verjetnosti, mutirani alel imel v določenih pogojih prednost in je omogočal boljše prilagoditev na pomanjkanje hrane živalskega izvora, ki vsebuje aminokislino metionin. Omogočal je preusmeritev folatov v sintezo timidilata (cSHMT) in s tem DNA. S tem je dajal evlucijsko prednost nosilcem T alela. (27)

## 4 Zaključek

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se ugotovljene frekvence genotipov v slovenski populaciji ne razlikujejo od pričakovanih. Zaključimo lahko, da v evoluciji Evropejcev ni bilo očitne prednosti ali slabosti zaradi mutacij v izbranih genih, ki vplivajo na presnovo homocisteina in s tem na razvoj srčnožilnih bolezni.

## 5 Literatura

1. Chen P, Poddar R, Tiba EV et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 1999; 39:93-109.
2. Biasioli S, Schiavon R. Homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Blood Purif*. 2000; 18:177-82. Review.
3. Clarke R, Levington S, Donald A et al. Understiation of the importance of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in epidemiological studies. *J Cardiovasc Risc* 2001 ;8:396-9.
4. Castro R et al. *Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview*. *J Inherit Metab Dis*, 2006. **29**(1): p. 3-20.
5. Stegnar M. Hiperhomocisteinemija in žilna bolezen. *Farm. Vestn* 2002; 343-346.
6. Weisberg IS, Park E, Ballman KV et al. Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003; 167(2): 205-214.
7. Marc J. Laboratorijska medicina pri obravnavi bolnika s končno ledvično boleznijo. *Farm vestn* 2004; 283-285.
8. Van der Put NMJ, Van Straaten HWM, Trijbels FJM et al: Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 2001; 226: 243-270.
9. Geisel J, Hübner U, Bodis M et al. The Role of Genetic Factors in the Development of Hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(11):1427-1434.
10. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. In: NCBI Books. Dostopno marca 2005 na internetu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eurekah.chapter.30251>.
11. Uni-prot podatkovna baza na internetu. Dostopno marca 2007 na internetu: [http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.do?proteinId=MTHR\\_HUMAN&pager.offset=0](http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.do?proteinId=MTHR_HUMAN&pager.offset=0).
12. Yamada K, Chen Z, Rozen R et al. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *PNAS* 2001; 98 (26): 14853-14858. Dostopno februarja 2007 na internetu: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.261469998>.
13. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *JNephrol* 2000; 13:20-33.
14. Voutilainen, S et al. Functional COMT Val158Met Polymorphism, Risk of Acute Coronary Events and Serum Homocysteine: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *PLoS ONE*, 2007. **2**: p. e181.
15. Munafo MR et al. Lack of association of the COMT (Val158/108 Met) gene and schizoprenia: a meta-analysis of case-control studies. *Mol Psychiatry*, 2005. **10**(8): p. 765-70.
16. Vidgren J, Svensson LA, Liljas A. Catechol: O-Methyltransferase; Deposition 5-Jan-96; Taxonomy: *Rattus norvegicus*. Dostopno maja 2007 na internetu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=4499>.
17. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) - COMT. Dostopno maja 2007 na internetu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=116790>.
18. ALFRED baza za COMT 1947G>A mutacijo. Dostopno maja 2007 na internetu: .
19. Costi MP, Ferrari S. Update on antifolate drugs targets. *Current Drugs Tarets* 2001; 2:135-166.
20. Renwick SB, Snell K, Baumann U. The crystal structure of human cytosolic serine hydroksymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy. *Structure* 1998; 6:1105-1116.
21. Chaturvedi S, Bhakuni V. Unusual structural, functional, and stability properties of serine hydroxymethyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biol Chem* 2003;78:40793-805.
22. Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM et al. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferase and chromosomal localization. *The journal of biological chemistry* 1993; 268:11910-6.
23. Sikibola CF, Smith MT, Hubbard M et al. Polymorphisms in the Thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99:3786-3791.
24. Hishida A, Matsuo K, Hamajima N et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003; 88:159-166.
25. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995 May;10(1):111-3.
26. Malhotra AK, Kestler LJ, Mazzanti C et al. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *Am J Psychiatry*. 2002 Apr;159(4):652-4.
27. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge, UK.1983.