

NUTRIGENOMIC ANALYSIS OF C677T MUTATION OF MTHFR GENE IN SLOVAK POPULATION.

Radoslav Židek, Jozef Golian, Jozef Bulla

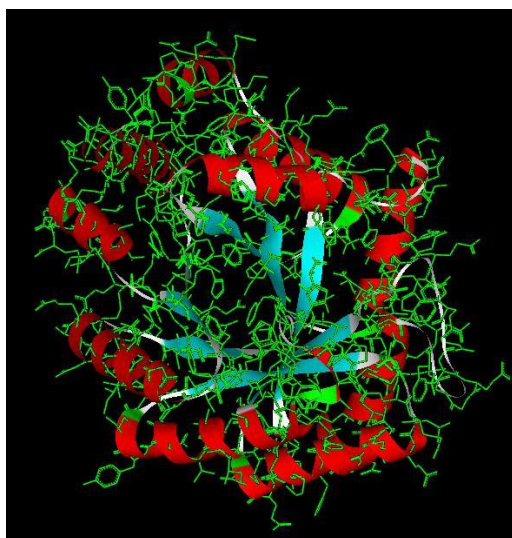
ABSTRACT

Total of 124 individuals originated from Slovak Republic has been nutrigenomically analysed. Analysis was focused to mutation C677T of MTHFR gene detection and analysis of mutant genotypes frequency. Observed frequency of allele 677C was 0.6998 and allelic frequency of mutant variant 677T was 0.3992. Genotype frequency of mutant heterozygotes with 71% activity of MTHFR enzyme was 0,391 and mutant homozygotes with 33% MTHFR enzyme activity was 0.153. Result shows 64% of Slovak has decreased activity of enzyme MTHFR, and 14.3% of Slovak has predisposition to cancer, cardio vascular diseases, loss of fertility and many others complications according to improper nutrition, low folic acid and B12 vitamin intake.

Keywords: MTHFR, nutrigenetics, C677T

ÚVOD

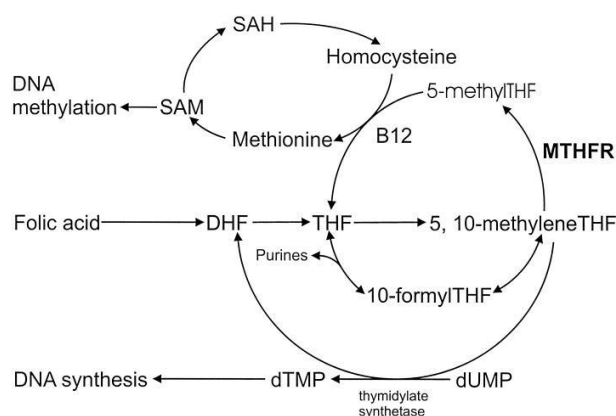
Nutrigenomika je pomerne nový vedný odbor študujúci vzťahy medzi genómom, stravou a zdravím jedinca. Jedným z postupov je nutrigenetická analýza zameraná na štúdium vzťahov jednotlivých foriem génov a ich vplyvu na zdravie pri rôznych spôsoboch stravovania.



Obrázok 1 Počítačová simulácia proteínovej štruktúry enzýmu MTHFR (Rao et al., 2010)

Najznámejším génom s jasným a dokázaným vzťahom k spôsobu stravovania je gén kódujúci enzým 5,10 metyléntetrahydrofolát reduktáza nazývaný aj MTHFR (Obrázok 1). Prvá informácia o tomto enzýme bola publikovaná začiatkom deväťdesiatych rokov, kedy bol pozorovaný vzťah medzi MTHFR a zvýšenou hladinou homocysteínu v moči (Harpey et al., 1981). Gén kódujúci tento enzým bol sekvenovaný na základe primerov odvodených od proteínového poradia enzýmu pozorovaného u ošipaných, pričom bol okamžite pozorovaný polymorfizmus (Goyette et al., 1994). V súčasnosti je na stránkach NCBI evidovaných 33 jednobodových mutácií, z ktorých niektoré dokážu zmeniť aktivitu enzýmu. Najznámejšou z detegovaných mutácií je zámena cytozínu za tymín na pozícii 677 evidovaná pod číslom rs1801133. Od prvého publikovania a asociácie tejto mutácie s termolabilitou enzýmu MTHFR (Frosst et al., 1995) bol analyzovaný jej vzťah k mnohým

komplikačiam s plodnosťou a ochoreniam ako je leukémia (Skibola et al., 1999; Kamel et al., 2007; Sood et al., 2010), rakovina hrubého čreva (Ma et al., 1997; Levine et al., 2010; WU et al., 2010), schizofrénia (Roffman et al., 2007; Roffman et al., 2008) a mnohým iným. Mutácia spôsobuje u heterozygotov (CT) pokles aktivity enzýmu MTHFR na 71% a u jedincov s oboma mutovanými alelami (TT) pokles aktivity na úroveň 33% oproti nemutovanému genotypu (CC) (Saffroy et al., 2008). Znížená aktivita enzýmu znižuje úspešnosť spracovania kyseliny listovej z potravy. U jedincov s mutáciou (TT) sa pri nedostatočnom príjme kyseliny listovej a vitamínu B12 naruší okrem syntézy DNA aj proces tvorby metionínu a s tým súvisiaca metylácia DNA (Obrázok 2). Proces syntézy DNA je nevyhnutý pri delení bunky a opravných mechanizmoch a jeho narušenie vedie k destabilizácii DNA a následnému riziku chromozómových aberácií (Saffroy et al., 2004). Nedostatočná metylácia spôsobená nedostatkom kyseliny listovej a zníženou aktivitou MTHFR môže viesť k nesprávnej proliferácii buniek a poškodeniu opravných mechanizmov a apoptózy (Jones, 2001; Friedrich et al., 2004).



Obrázok 2 Spracovanie kyseliny listovej a funkcia MTHFR (Skibola et al., 1999)

Cieľom predkladanej práce je nutrigenomická analýza alelových variant génu kódujúceho enzým MTHFR na Slovensku, s následným výpočtom alelových a genotypových frekvencií.

MATERIÁL A METÓDY

Do nutrigenomickej analýzy bolo zaradených 124 dobrovoľníkov pochádzajúcich z rôznych regiónov Slovenska vo veku od 16 do 72 rokov. Za účelom genetickej analýzy bol pripravený hrubý bunkový lyzát odobratý z bukálnej sliznice, ktorý bol použitý v objeme 2 µl do PCR reakcie. Samotná PCR reakcia prebiehala v objeme 30 µl s použitím nasledovaných finálnych koncentrácií jednotlivých zložiek: 1x GoTaq® pufor, 1,5 nmol. µl⁻¹ MgCl₂, 0,2 nmol. µl⁻¹ dNTPs, 0,5 pmol. µl⁻¹ primerov (Skibola et al., 1999) a 0,5 jednotiek GoTaq® Hotstart polymerázy. Reakcia prebehla v cykléri MJ Mini s úvodnou denaturáciou pri 94°C po dobu 5 minút. Následných 40 cyklov prebiehalo s 30 sekundovou denaturáciou pri 94°C, nasadením primerov pri 62°C po dobu 30 sekúnd a elongačným krokom pri teplote 72°C po dobu 30 sekúnd. Finálne predĺžovanie úsekov DNA prebehlo pri teplote 71°C po dobu 7 minút. Z celkovej reakcie bolo odobratých 10 µl PCR produktov, ktoré boli nanosené na gél za účelom preukázania špecifickej amplifikácie génu MTHFR. Po úspešnom monitoringu bolo 10 µl PCR produktov štiepených pomocou reštrikčnej endonukleázy FastDigest® *HinfI*. Získaný produkt bol elektroforeticky separovaný na 2% agarózovom géle pri napätí 150 V po dobu 45 minút. Získané genotypy boli štatisticky analyzované programom PowerMarker 3.25.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzou PCR produktov 124 vzoriek ľudskej DNA sa nám podarilo detegovať PCR produkt o dĺžke 198 bp. Po použití reštrikčného enzýmu *HinfI* sa PCR produkt v prípade heterozygotného usporiadania alel rozdelil na dve frakcie o veľkosti 198 a 175 bp. Ak v sledovanom géne nebola prítomná mutácia, enzým *HinfI* nebol schopný nájsť väzobné miesto a teda nebol schopný rozdeliť PCR produkt na dve frakcie. V prípade mutovaného homozygota bola pozorovaná len jedna frakcia s veľkosťou 175 bp. Vzorka Slovenskej populácie vykazovala frekvenciu nemutovanej alely 677C s hodnotou 0,6008 a alely 677T 0,3992 (Tabuľka 1). Na

základe alelových frekvencií sa v populácii sformovali genotypové kombinácie.

Tabuľka 1 Alelová frekvencia foriem mutácie na pozícii 677 génu MTHFR

Alela	Počet pozorovaní	Frekvencia (smer. odchýlka)
677C	149	0,6008 (0,0307)
677T	99	0,3992 (0,0307)

Tabuľka 2 Genotypová mutácie na pozícii 677 génu MTHFR

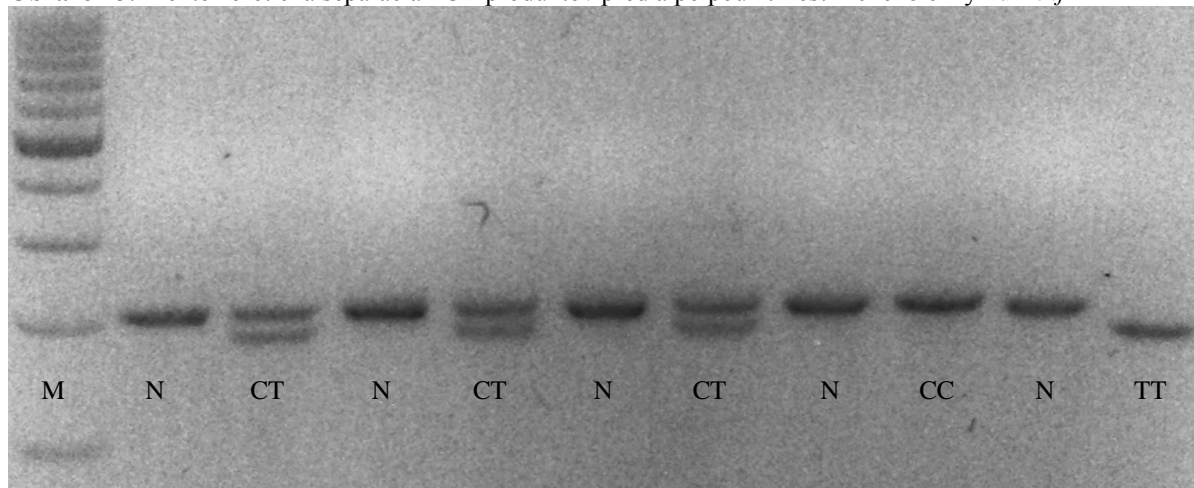
Genotyp	Počet pozorovaní	Frekvencia (smer. odchýlka)
677CC	44	0.354 (0,03)
677CT	61	0.491 (0,03)
677TT	19	0.153 (0,03)

Zastúpenie nemutovaných homozygotov v Slovenskej populácii je 35,4%, heterozygotov 49,1% a jedincov nesúcich po oboch rodičoch mutovanú alelu pre enzým MTHFR je 15,3%. Naše výsledky sú vyššie ako v Kanadskej populácii v ktorej sa frekvencia výskytu genotypov 677TT pohybovala s frekvenciou 10% (Weisberg et al., 1998). Nižšiu frekvenciu výskytu môžeme pozorovať aj v Kaukazskej populácii, kde 11,04 % jedincov prezentuje tento genotyp (Almawi et al., 2004). Naše výsledky boli rovnako vyššie ako v Ukrajinskej populácii, kde frekvencia genotypov 677TT nepresiahla hodnotu 7,5% (Tatarsky, Kucherenko, and Livshits, 2010). Slovenská populácia má podobné percento výskytu genotypu 677TT ako Čínska populácia, ktorá bola ako kontrola zapojená do prieskumu rakoviny žalúdka (Shen et al., 2001).

ZÁVER

Zistené výsledky poskytujú alarmujúci fakt, že 64% Slovenskej populácie zaradenej do pozorovania má zníženú aktivitu enzýmu MTHFR na úroveň 71% a približne 15% Slovenskej populácie dokáže

Obrázok 3. Elektroforetická separácia PCR produktov pred a po použití reštrikčného enzýmu *HinfI*



M = molekulárny marker 100 bp, N = neštiepený PCR product, CT= heterozygot, CC= nemutovaný homozygot, TT= mutovaný homozygot

metabolizovať kyselinu listovú len s 33% aktivitou enzýmu MTHFR. Znížený príjem kyseliny listovej spôsobený nízkym príjmom čerstvej zeleniny, ovocia a potravín obsahujúcich živé bakteriálne kultúry môže u 64% Slovenskej populácie viesť k zvýšeniu rizika kardiovaskulárnych ochorení, rakoviny, zníženiu plodnosti a k ďalším ochoreniam súvisiacim s MTHFR a zníženým príjmom kyseliny listovej.

LITERATÚRA

- ALMAWI, W. Y., FINAN, R. R., TAMIM, H., DACCACHE, J. L., IRANI-HAKIME, N. 2004. Differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene among the Lebanese population. In *American Journal of Hematology*, vol. 76, 2004, no. 1, p. 85-7.
- FRIEDRICH, M. G., WEISENBERGER, D. J., CHENG, J. C., CHANDRASOMA, S., SIEGMUND, K. D., GONZALGO, M. L., TOMA, M. I., HULAND, H., YOO, C., TSAI, Y. C., NICHOLS, P. W., BOCHNER, B. H., JONES, P. A., LIANG, G. 2004. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. In *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 10, 2004, no. 22, p. 7457-65.
- 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. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. In *Nature Genetics*, vol. 10, 1995, no. 1, p. 111-3.
- GOYETTE, P., SUMNER, J. S., MILOS, R., DUNCAN, A. M., ROSENBLATT, D. S., MATTHEWS, R. G., ROZEN, R. 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. In *Nature Genetics*, vol. 7, 1994, no. 2, p. 195-200.
- HARPEY, J. P., ROSENBLATT, D. S., COOPER, B. A., LE MOËL, G., ROY, C., LAFOURCADE, J. 1981. Homocystinuria caused by 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: a case in an infant responding to methionine, folinic acid, pyridoxine, and vitamin B12 therapy. In *The Journal of Pediatrics*, vol. 98, 1981, no. 2, p. 275-8.
- JONES, P. A. 2001. Cancer. Death and methylation. In *Nature*, vol. 409, 2001, no. 6817, p. 141, 143-4.
- KAMEL, A. M., MOUSSA, H. S., EBID, G. T., BU, R. R., BHATIA, K. G. 2007. Synergistic effect of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphism as risk modifiers of pediatric acute lymphoblastic leukemia. In *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, vol. 19, 2007, no. 2, p. 96-105.
- LEVINE, A. J., FIGUEIREDO, J. C., LEE, W., CONTI, D. V., KENNEDY, K., DUGGAN, D. J., POYNTER, J. N., CAMPBELL, P. T., NEWCOMB, P., MARTINEZ, M. E., HOPPER, J. L., LE MARCHAND, L., BARON, J. A., LIMBURG, P. J., ULRICH, C. M., HAILE, R. W. 2010. A candidate gene study of folate-associated one carbon metabolism genes and colorectal cancer risk. In *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 19, 2010, no. 7, p. 1812-21.
- MA, J., STAMPFER, M. J., GIOVANNUCCI, E., ARTIGAS, C., HUNTER, D. J., FUCHS, C., WILLETT, W. C., SELHUB, J., HENNEKENS, C. H., ROZEN, R. 1997. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Dietary Interactions, and Risk of Colorectal Cancer. In *Cancer Res.*, vol. 57, 1997, no. 6, p. 1098-1102.
- RAO, D. M., NAYARISSERI, A., YADAV, M., KS, S., PATEL, D. 2010. Comparative modeling of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme and its mutational assessment: in silico approach. In *International Journal of Bioinformatics Research*, vol. 2, 2010, no. 1, p. 5-9.
- ROFFMAN, J. L., WEISS, A. P., DECKERSBACH, T., FREUDENREICH, O., HENDERSON, D. C., PURCELL, S., WONG, D. H., HALSTED, C. H., GOFF, D. C. 2007. Effects of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism on executive function in schizophrenia. In *Schizophrenia Research*, vol. 92, 2007, no. 1-3, p. 181-8.
- ROFFMAN, J. L., WEISS, A. P., PURCELL, S., CAFFALETTE, C. A., FREUDENREICH, O., HENDERSON, D. C., BOTTIGLIERI, T., WONG, D. H., HALSTED, C. H., GOFF, D. C. 2008. Contribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. In *Biological Psychiatry*, vol. 63, 2008, no. 1, p. 42-8.
- SAFFROY, R., BENYAMINA, A., PHAM, P., MARILL, C., KARILA, L., REFFAS, M., DEBUIRE, B., REYNAUD, M., LEMOINE, A. 2008. Protective effect against alcohol dependence of the thermolabile variant of MTHFR. In *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 96, 2008, no. 1-2, p. 30-6.
- SAFFROY, R., PHAM, P., CHIAPPINI, F., GROSS-GOUPIL, M., CASTERA, L., AZOULAY, D., BARRIER, A., SAMUEL, D., DEBUIRE, B., LEMOINE, A. 2004. The MTHFR 677C > T polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. In *Carcinogenesis*, vol. 25, 2004, no. 8, p. 1443-8.
- SHEN, H., XU, Y., ZHENG, Y., QIAN, Y., YU, R., QIN, Y., WANG, X., SPITZ, M. R., WEI, Q. 2001. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. In *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, vol. 95, 2001, no. 5, p. 332-6.
- SKIBOLA, C. F., SMITH, M. T., KANE, E., ROMAN, E., ROLLINSON, S., CARTWRIGHT, R. A., MORGAN, G. 1999. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, 1999, no. 22, p. 12810-5.
- SOOD, S., DAS, R., TREHAN, A., AHLUWALIA, J., SACHDEVA, M. U., VARMA, N., BANSAL, D., MARWAHA, R. K. 2010. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: association with risk for

pediatric acute lymphoblastic leukemia in north Indians. In *Leukemia & lymphoma*, vol. 51, 2010, no. 5, p. 928-32.

TATARSKYY, P., KUCHERENKO, A., LIVSHITS, L. 2010. Allelic polymorphism of F2, F5 and MTHFR genes in population of Ukraine. In *Šitologĭa i genetika*, vol. 44, 2010, no. 3, p. 3-8.

WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., SIBANI, S., ROZEN, R. 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. In *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 64, 1998, no. 3, p. 169-72.

WU, H.-C., CHANG, C.-H., TSAI, R.-Y., LIN, C.-H., WANG, R.-F., TSAI, C.-W., CHEN, K.-B., YAO, C.-H., CHIU, C.-F., BAU, D.-T., LIN, C.-C. 2010. Significant Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase Single Nucleotide Polymorphisms with Prostate Cancer Susceptibility in Taiwan. In *Anticancer Res*, vol. 30, 2010, no. 9, p. 3573-3577.

Acknowledgments:

This work was supported by grant KEGA 3/7255/09 and VEGA 1/0619/10.

Contact address:

Ing. Radoslav Źidek, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: radoslav.zidek@uniag.sk

doc. Ing. Jozef Golian, Dr. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.golian@af.uniag.sk

prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.bulla@uniag.sk