

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZORICA PANOVSKA

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V IZBRANIH GENIH
FOLATNEGA CIKLA Z NAPAKAMI NEVRALNE CEVI**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN THE SELECTED GENES
OF THE FOLATE CYCLE WITH NEURAL TUBE DEFECTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, izr. prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete za izkazano zaupanje pri izdelavi diplomske naloge.

Iskrena hvala somentorici, doc. dr. Nataši Karas Kuželički, mag. farm. za strokovno vodstvo in napotke, številne nasvete, pomoč pri vrednotenju rezultatov, pridobljeno znanje pri izdelavi diplomske naloge in izkazano zaupanje.

Zahvaljujem se osebju Službe za patomorfološko in citološko diagnostiko UKC Ljubljana za vzorce plodov z napako nevralne cevi.

Hvala Barbari Rejc, mag. farm., za pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za pomoč, potrpežljivost in prijazen odnos.

Hvala moji družini za podporo in pomoč vsa leta pri študiju in izdelavi diplomske naloge, prijateljem ter vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri študiju.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorice doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm.

Podpis:

Ljubljana, 2010

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. NAPAKE NEVRALNE CEVI	1
1.1.1. Vrste napak nevralne cevi	3
1.1.2. Dejavniki tveganja za napake nevralne cevi.....	5
1.2. FOLNA KISLINA	6
1.2.1. Metabolizem folatov.....	7
1.3. GLICIN-N-METILTRANSFERAZA (GNMT)	9
1.3.1. Biološka funkcija.....	9
1.3.2. Alelne variante	10
1.4. 5,10-METILENTETRAHIDROFOLAT REDUKTAZA (MTHFR).....	11
1.4.1. Biološka funkcija.....	11
1.4.2. Alelne variante	12
1.5. TIOPURIN-S-METILTRANSFERAZA (TPMT)	13
1.5.1. Biološka funkcija.....	13
1.5.2. Alelne variante	13
1.6. GENOTIPIZACIJA S TAQMAN® ALELNO DISKRIMINACIJO	14
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. PREISKOVANCI	18
3.1.1. Kontrolna skupina.....	18
3.1.2. Skupina bolnikov.....	18
3.2. IZOLACIJA DNA.....	19
3.2.1. Kontrolna skupina.....	19
3.2.2. Skupina bolnikov.....	19
3.2.2.1. Merjenje koncentracije DNA v osnovni raztopini vzorcev.....	20
3.2.2.2. Redčenje osnovne raztopine DNA	20
3.2.3. REAGENTI, KEMIČALIJE, APARATURE	20
3.3. GENOTIPIZACIJA	21
3.3.1. REAGENTI, KEMIČALIJE, APARATURE	23
3.4. STATISTIČNA ANALIZA	23
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1. USPEŠNOST POMNOŽITVE PRI DOLOČANJU FREKVENCE POLIMORFIZMA GNMT1289C>T.....	26
4.2. DOLOČANJE FREKVENC POLIMORFIZMA GNMT1289C>T V SPLOŠNI SLOVENSKI POPULACIJI.....	26
4.3. PRIMERJAVA FREKVENC POLIMORFIZMA GNMT1289C>T MED KONTROLAMI IN PLODOVI Z NTD	27
4.4. PRIMERJAVA POLIMORFIZMOV TPMT MED KONTROLAMI IN PLODOVI Z NTD	29
4.5. PRIMERJAVA POLIMORFIZMOV MTHFR677C>T IN MTHFR1298A>T MED KONTROLAMI IN PLODOVI Z NTD.....	30
4.5.1. Primerjava med različnimi kombinacijami genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD	30
4.5.2. Primerjava teoretične aktivnosti encima MTHFR pogojena s kombinacijo genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD. 31	

4.6.	VPLIV ŠTEVILA MUTIRANIH LOKUSOV V GENIH ZA MTHFR, TPMT IN GNMT NA POVEČANO TVEGANJE ZA POJAV NTD	33
5.	SKLEP	36
6.	LITERATURA	37
7.	KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC	41

POVZETEK

Napake nevralne cevi (NTD) so skupina prirojenih napak, ki spadajo med najpomembnejše vzroke za umrljivost plodov in obolelost preživelih otrok v razvitih državah. So druge najpogostejše prirojene napake takoj za srčnimi. Njihova etiologija je kompleksna in vključuje tako genetske kakor tudi vplive okolja.

Močan dejavnik tveganja za nastanek NTD je povišana koncentracija homocisteina, ki je teratogen in embriotoksičen. Na njegovo koncentracijo vplivajo številni encimi, med katerimi so tudi 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT) in glicin-N-metiltransferaza (GNMT). Polimorfizmi v genih za te encime spremenijo njihovo aktivnost. Zmanjšana aktivnost encima MTHFR zviša koncentracijo homocisteina. Zmanjšanje aktivnosti encimov GNMT in TPMT pa spremeni ravnotežje S-adenozilmetionin (SAM)/S-adenozilhomocistein (SAH) in zviša koncentracijo SAM, ki inhibira MTHFR.

Namen študije je bil določiti frekvenco polimorfizma GNMT1289C>T v slovenski populaciji. Ugotovili smo, da se omenjeni polimorfizem porazdeljuje v skladu s Hardy – Weinberg-ovim ravnotežjem. Frekvenca CC genotipa je bila 25,5%, CT genotipa 48,5% in TT genotipa 26,0%.

Ugotavljali smo tudi povezanost polimorfizmov v izbranih genih folatnega cikla (GNMT, MTHFR, TPMT) z NTD. Skupino bolnikov so predstavljali plodovi z različnimi okvarami nevralne cevi. Vzorci so bili izolati DNA iz parafinskih rezin. Statistično značilno povezavo z NTD sta pokazala le polimorfizma v genu za MTHFR. Čeprav rezultati za povezanost polimorfizmov v genih za TPMT in GNMT s tveganjem za pojav napak nevralne cevi niso statistično signifikantni, kažejo določen trend. Tega nismo mogli potrditi zaradi premajhnega števila vzorcev plodov.

Ugotovili smo tudi, da večje število mutiranih lokusov v omenjenih genih poveča tveganje za pojav NTD, kar kaže na to, da ne gre zgolj za vpliv mutacij v enem izoliranem genu.

ABSTRACT

Neural tube defects (NTD) are congenital malformations that are among the most important causes of perinatal illness and infant mortality in developed countries. They are the second most common fetal defects, immediately after heart defects. Their etiology is complex and includes genetic and environmental factors.

Elevated homocysteine, which is teratogenic and embryotoxic, is a strong risk factor for NTD. Numerous enzymes, such as are methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), thiopurine S-methyltransferase (TPMT) and glycine N-methyltransferase (GNMT), affect its concentration. Polymorphisms in genes for those three enzymes affect their enzymatic activity. Decreased activity of MTHFR elevates homocysteine, while decreased activities of GNMT and TPMT change the S-adenosylmethionine (SAM) / S-adenosylhomocysteine (SAH) ratio and elevate SAM, which inhibits MTHFR.

The purpose of this study was to determine the frequency of the polymorphism GNMT 1289C>T in Slovenian population. We found that Slovenian population is in the Hardy-Weinberg equilibrium for the abovementioned polymorphism. The frequency of the CC genotype is 25.5%, CT genotype 48.5% and TT genotype 26.0%.

Furthermore, we studied the correlation of the polymorphisms in the selected genes of the folate cycle (GNMT, MTHFR and TPMT) with neural tube defects. The patient group consisted of embryos diagnosed with NTD. Analyzed samples were DNA isolates from formalin fixed paraffin embedded tissue sections. Only polymorphisms in the gene for MTHFR showed statistically significant association with NTD. Although the relation between polymorphisms in the genes for GNMT and TPMT was not statistically significant, the results showed a positive trend that indicates their potential importance in NTD pathology. We were unable to confirm this due to the small number of samples from NTD embryos.

We also found out that the higher number of mutated loci in the three abovementioned genes increases the risk of NTD. This emphasizes the complexity of the impact of the polymorphisms in these three genes rather than the effect of one isolated mutation.

SEZNAM OKRAJŠAV:

OKRAJŠAVA	RAZLAGA
5,10-metilenTHF	5,10-metilentetrahidrofolat
5-metil-THF	5-metiltetrahidrofolat
CŽS	centralni živčni sistem
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dUMP	deoksiuridin monofosfat
dTMP	deoksitimidin monofosfat
FRET	fluorescenčni resonančni prenos energije (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
GNMT	glicin-N-metil transferaza
H-W	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
Hcy	homocistein
MTHFR	5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaza
NTD	napake nevralne cevi (Neural Tube Defects)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (Polimerase Chain Reaction)
SAM	S-adenozilmetionin
SAH	S-adenozilhomocistein
THF	tetrahidrofolat
TPMT	tiopurin-S-metil transferaza

1. UVOD

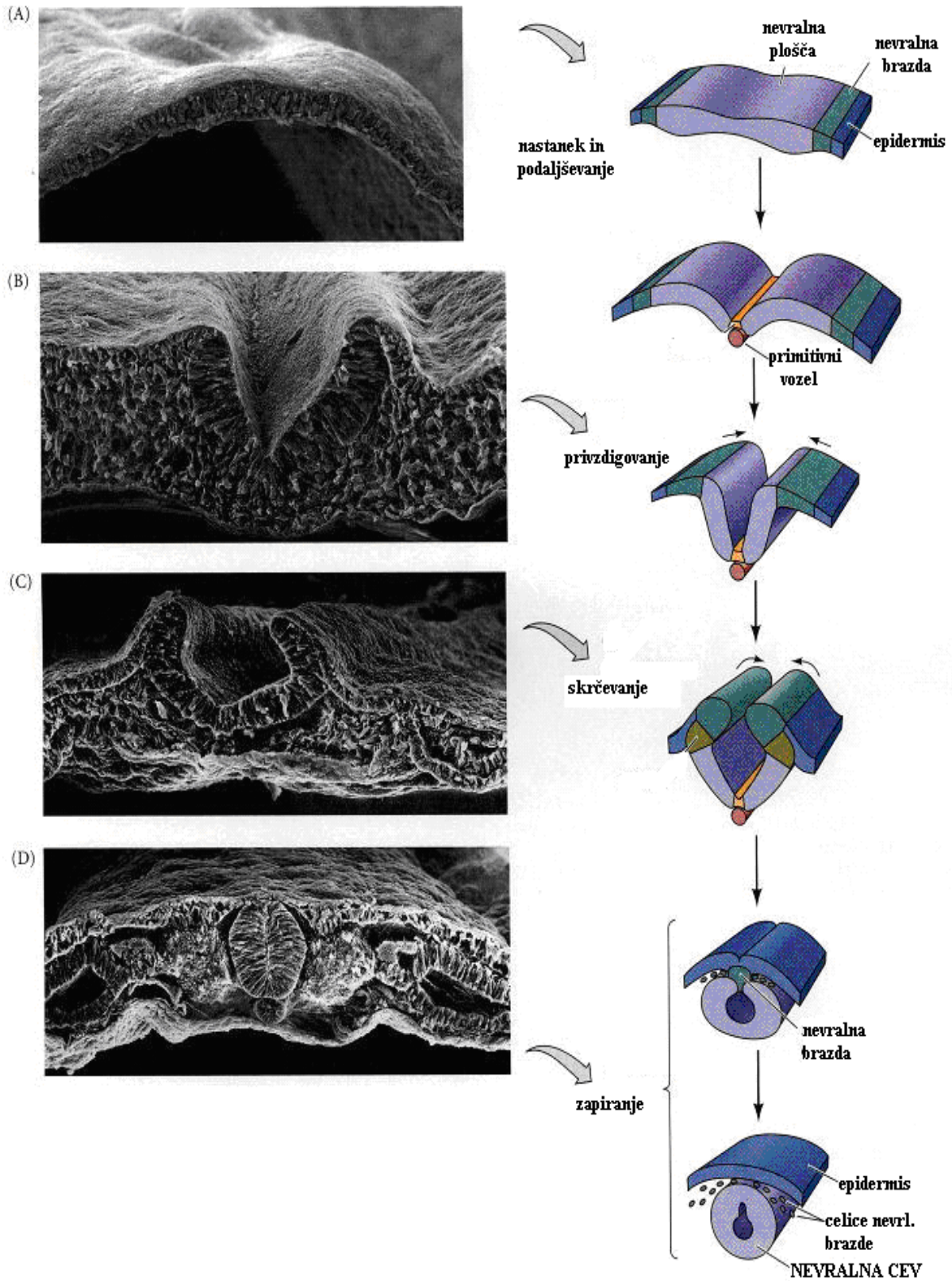
1.1. Napake nevralne cevi

Napake nevralne cevi (Neural Tube Defects – NTD) so skupina prirojjenih napak. Spadajo med najpomembnejše vzroke za umrljivost pri plodu in obolelost preživelih otrok v razvitih državah. NTD so druge najpogostejše prirojene napake, takoj za srčnimi (1). Nastanejo zaradi motnje v procesu nevrulacije tekom embrionalnega razvoja (2). Njihova etiologija je kompleksna in vključuje vplive okolja ter genetske faktorje, ki skupaj prispevajo k incidenci in resnosti stanja pri določenem fenotipu (3).

Incidenca NTD v Porodnišnici Ljubljana je bila v obdobju od leta 1994 do 2003 1,4/1000 rojstev. V tem času je bilo zabeleženih 135 plodov in otrok, ki so imeli ugotovljeno NTD; med novorojenčki je bilo 80 otrok z NTD, 55% je bilo mrtvorojenih, 45% pa živorojenih. Izračunana incidenca v Sloveniji je statistično primerljiva z incidenco v ostalih evropskih državah.

NTD **odkrijemo tekom nosečnosti** s pomočjo presejalnih testov in sicer z ultrazvokom in merjenjem koncentracije materinega alfa fetoproteina v serumu (4).

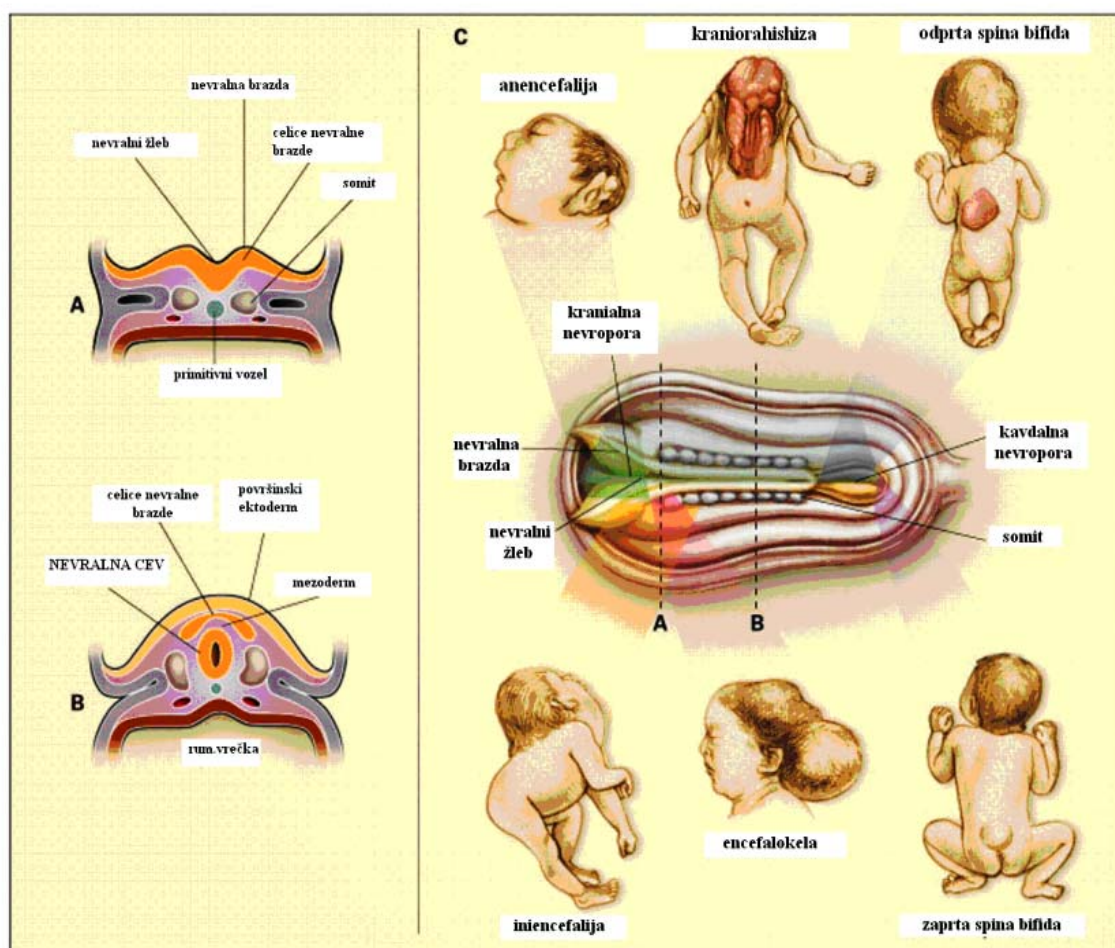
Večstopenjski embrionalni proces, ki je odgovoren za začetek nastanka centralnega živčnega sistema se **imenuje nevrulacija** (5). Zgodi se med tretjim in četrtem tednom po oploditvi. Je zelo zapleten razvojni proces pri katerem se nevralna plošča oblikuje v nevravno cev (4). Nevralna cev se začne zapirati 16. dan po oploditvi. Celoten proces nevrulacije traja 10 dni in normalno se zakluči v 28 - ih dneh po oploditvi (6). V prvi stopnji pride do nastanka in podaljšanja nevralne plošče. Druga in tretja stopnja vključujeta krčenje in privzdigovanje celic po sredinski osi plošče in formacijo nevralne brazde (greben). Celice iz obeh dorsolateralnih strani brazde se začnejo povečevati in povzdigovati ter oblikovati strukturo, ki je podobna cevi. V četrti stopnji se celice med sabo združijo in zaprejo nevravno cev (5). Če je prekinjen katerikoli izmed naštetih procesov pride do nastanka NTD (4).



slika 1. Primarna nevrulacija (7)

1.1.1. Vrste napak nevalne cevi:

- ❖ Anencefalija
- ❖ Encefalokela
- ❖ Kraniorahishiza
- ❖ Iniencefalija
- ❖ Odprta spina bifida
 - spina bifida occulta
 - meningokela
 - meningomielokela



Slika 2. Razvoj nevalne cevi in vrste NTD (6)

Anencefalija je najhujša oblika okvare nevralne cevi (8). Je motnja, pri kateri pride do nepopolnega zapiranja zgornjega dela nevralne cevi, kar vodi v odsotnost večjega dela lobanje in možganov (4). Zgodi se med 23. in 26. dnevom nosečnosti. Novorojenčki so ponavadi slepi, gluhi ter v komi. Stanje je vedno usodno; če ne gre za mrtvorodenost, otrok umre kmalu po rojstvu in sicer v roku nekaj ur ali dni (9).

Za **kraniorahishizo** je značilna anencefalija z večjim delom odprte nevralne cevi.

Encefalokela nastane pri nepopolnem zapiranju kranijalnega dela nevralne cevi (6). Motnja se kaže v obliki cistične tvorbe, ki izhaja iz glave. Pojavijo se nevrološke težave, paraliza okončin, težave z vidom, motnje v mentalnem in fizičnem razvoju. Potreben je kirurški poseg (9).

Iniencealija je stanje, pri katerem je glava nagnjena nazaj (6), koža obraza je direktno povezana s prsnim košem in lobanja je na zgornjem delu hrbta. Zanja je značilna odsotnost vratu. Diagnoza se postavi pri prenatalnem ultrazvočnem pregledu ali takoj po rojstvu saj je glava nagnjena nazaj in obraz navzgor. Stanje je usodno; otrok živi le nekaj ur (9).

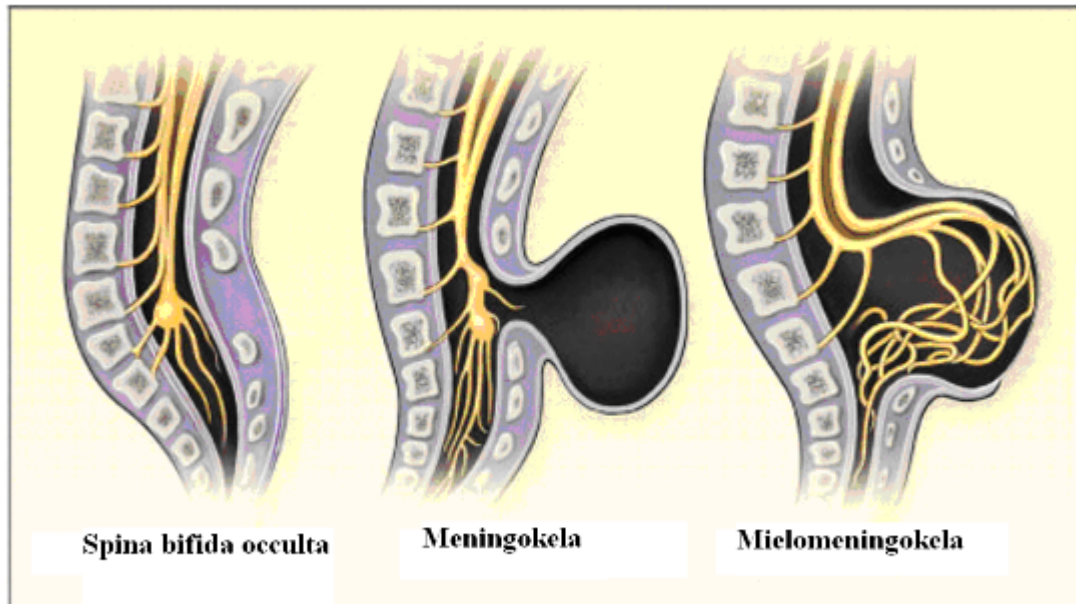
Spina bifida je stanje, pri katerem se spodnji del nevralne cevi ne zapre popolnoma. Okvara je lahko kjerkoli, najpogostejša je v spodnjem delu hrbta. Posledice so odvisne od tega kako huda je okvara (8). Lahko pride do pojava paralize spodnjih ekstremitet, inkontinence, konvulzij in pogostih infekcij centralnega živčnega sistema (10). Kirurški poseg takoj po rojstvu lahko izboljša kvaliteto življenja otrokom na dolgi rok. Spina bifida je, ne glede na kirurške posege, povezana s krajšo življenjsko dobo in visoko stopnjo prizadetosti (10). Poznamo:

- ❖ spina bifida occulta in
- ❖ spina bifida cystica:
 - ◆ meningokela
 - ◆ meningomielokela

Spina bifida occulta (ali skrita/prikrita) je najlažja oblika, pri kateri se eno ali več vretenc (S1 in/ali S2) nepopolno razvije, vendar pa so hrbtenjača in njene ovojnice (meninge) normalno pokrite s kožo (6). Na prizadetem mestu je lahko viden tudi šopek las (9).

Pri **meningokeli** vidimo izboklino skozi nepopolno razvita vretenca, ki jo tvorijo meninge in cerebrospinalna tekočina. Izboklina je pravtako pokrita s kožo (6).

Mielomeningokela predstavlja izboklina v katero so ujeti hrbtenjača, živci ali oboje. Je ponavadi anomalija, ki je odprta in so meningi ali živčno tkivo izpostavljeni zunajnosti (6). Zaradi tega je živčno tkivo izpostavljeno velikemu tveganju za okužbo, zato je potrebna takojšnja operacija, da se tkivo namesti znotraj telesa in pokrije s kožo (8).



Slika 3. Trije tipi spine bifide (6)

Pri **odprti spini bifidi** se pojavi defekt posteriornih lokov vretenc. Tako hrbtenjača v svojem hrbteničnem kanalu zadaj ni zaščiten s kostnim lokom vretenc, mišičjem, podkožjem in kožo (4).

1.1.2. Dejavniki tveganja za napake nevrnalne cevi

Predlaganih je bilo veliko število **kandidatnih genov**, ki bi bili povezani s tveganjem za nastanek NTD. Največji poudarek je na genih, ki so pomembni pri metabolizmu folne kisline. Poleg tega so bili predlagani geni, ki sodelujejo pri metabolizmu retinoidov in apoptozi, geni, ki regulirajo transkripcijo pri zgodnji embriogenezi in vzdržujejo polarnost planarnih celic ter geni, ki so bili raziskani na mišjih modelih (1, 2, 11, 12).

Homocistein (Hcy, inverzni pokazatelj koncentracije folata) je stranski produkt in potencialni marker reakcij metiliranja. Njegova povišana koncentracija je med drugim povezana tudi s pojavom NTD. Polimorfizmi v genih, ki so pomembni pri prenosu skupine z enim ogljikovim atomom, vplivajo na koncentracijo Hcy v plazmi in/ali zvišano tveganje za NTD. Primer je polimorfizem v genu za 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazo

(MTHFR). Poleg tega je lahko koncentracija Hcy odvisna tudi od encima glicin N-metil transferaze (GNMT) (13).

Med **vplivi okolja** ima ključno vlogo folat, saj jemanje folne kisline v zgodnji nosečnosti zmanjša tveganje za nastanek NTD. Vendar povezava med folati in NTD še vedno ostaja nepopolno razjasnjena; še več, nakaterih primerov NTD ni možno preprečiti z dodajanjem folne kisline (14).

Drugi faktor je **vitamin A** oz. njegov aktivni metabolit, retinojska kislina (RA). RA pa je znan teratogen, pri embriju povzroča poleg ostalih učinkov tudi NTD. Zanimivo pa je, da ima RA tudi pomembno funkcijo pri nevrulaciji, saj je razvijajoča se nevralna cev predel embrija, ki vsebuje največjo koncentracijo endogene RA. Njeno pomanjkanje v ključnem obdobju vpliva na morfolologijo in obnašanje celic pri razvoju nevralne cevi (12).

Študije navajajo tudi druge faktorje, ki lahko povzročijo nastanek NTD. **Diabetes in debelost matere** sta bila povezana s povečanim tveganjem za nastanek NTD. Živila z visokim glikemičnim indeksom ali z visoko glikemično obremenitvijo lahko fetus izpostavi večjemu tveganju za NTD, kar kaže na to, da ima hiperglikemija patološki pomen (15, 16, 17).

Jemanje nekaterih antiepileptičnih zdravil, kot je **valprojska kislina** vodi v nastanek NTD zaradi vpliva na metabolizem folata in Hcy (18).

Hipertermija v zgodnji nosečnosti je bila prav tako predlagana kot faktor rizičnosti. Povečana telesna temperatura lahko povzroči okvare CZS ploda, saj se takrat sinteza proteinov usmeri v sintezo zaščitnih proteinov, ki sicer rešijo embrij, vendar na račun normalnega razvoja (11).

Nagnjenost k NTD je dedna, vendar je dedovanje ponavadi bolj kompleksno kot le en dominanten ali recesivni gen. Variira v odvisnosti od etnične in socioekonomske skupine ter časa. Študije na miših kažejo na to, da k tveganju prispeva tudi zmanjšana penetracija in/ali zmanjšana odzivnost na hranila (19).

Manj kot 10% vseh NTD je posledica **kromosomskih nepravilnosti** (1).

Kljub številnim študijam molekularno in celično patogeno ozadje napak nevralne cevi še vedno ostaja v znatni meri nejasno (3).

1.2. Folna kislina

Folna kislina zmanjšuje možnost okvare nevralne cevi. V Sloveniji se priporoča dnevno jemanje 0,4 mg folne kisline za vse ženske v rodni dobi. Večje dnevne odmerke

priporočajo ženskam, ki so že imele otroka z okvaro nevralne cevi v prejšnjih nosečnostih, in sicer 4 mg folne kisline na dan. **Jemanje folne kisline** je smiselno v obdobju pred zanositvijo in v prvih 3 mesecih nosečnosti, saj se nevralna cev zapre po 4 tednih po oploditvi (4).

Nahaja se v organih kot so ledvice, jetra ter v sveži zeleni zelenjavi (pr. špinača, brokoli), stročnicah, žitaricah ter sadju v obliki folatov. Kuhanje povzroči izgubo 60 – 90% le teh, saj so folati občutljivi na toploto.

Folati predstavljajo skupino 10 ali več različnih oblik vitamina, ki je znan tudi pod imenom B₉. V svoji strukturi imajo pteridinski obroč vezan na para-aminobenzojsko kislino, ki pa je vezan na glutamat. Pteridinski obroč se nahaja v reduciranem stanju kot tetrahidrofolat ali dihidrofolat, na katerega je vezana metilna, formilna ali metilenska skupina. V naravi se folati nahajajo v obliki poliglutamatov, ki pa se pri procesu absorpcije v tankem črevesju razgradijo do monoglutamatov. Absorbira se le v obliki 5-metiltetrahidrofolata (5-metilTHF).

Folna kislina predstavlja sintetično obliko vitamina B₉, ki nima reduciranega pteridinskega obroča, se ne nahaja v naravi in je oblika provitamina. Pri absorpciji se prav tako pretvori v **5-metilTHF**.

Tako je 5-metilTHF monoglutamat edina oblika v kateri se folati absorbirajo in so na voljo celicam (20, 21). Nastanek 5-metilTHF katalizira encim **MTHFR**.

1.2.1. Metabolizem folatov

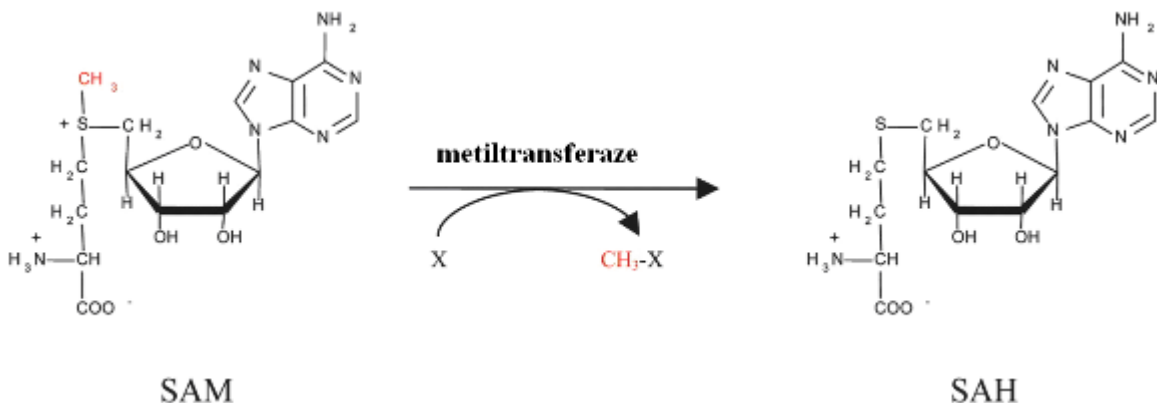
Ko folat vstopi v celico preko receptorjev sodeluje pri prenosu skupine z enim ogljikovim atomom, ki se porabi pri sintezi nukleotidov ali pri metilaciji številnih substratov (npr. DNA), preko pretvorbe Hcy v metionin. Ti procesi so regulirani s strani številnih molekul, med katere spadajo encimi in vitamini kot sta vitamin B₆ in B₁₂. Encimi in faktorji, ki bi lahko bili pomembni pri razvoju nevralne cevi so na spodnji shemi označeni s kvadrati. Med njimi so **MTHFR** in metiltransferaze, med katere sodita **GNMT** in **TPMT** (6).

ekspresije genov (22). Študije na miših navajajo, da naj bi spol vplival na tveganje za pojav NTD. Znano je, da je edina razlika med spoloma prisotnost dodatnega neaktivnega visokometiliranega X kromosoma, ki po vsaki celični delitvi mora ostati metiliran. Tako navajajo, da bi metilacija tega kromosoma lahko vplivala na proces metiliranja, kjer sodeluje folat (19).

1.3. GLICIN-N-METILTRANSFERAZA (GNMT)

1.3.1. Biološka funkcija

GNMT (EC 2.1.1.20) sodeluje pri večstopenjskih procesih razgradnje metionina, metabolizma folatov in metilnih skupin. Bolj natančno, katalizira reakcijo, ki pretvori glicin in SAM v N-metilglicin in SAH. Ta reakcija je pomembna pri **vzdrževanju koncentracije SAM in SAH**, saj je njuno razmerje pomembno pri mnogih procesih, med katerimi je tudi regulacija izražanja genov preko metiliranja. Prav tako sodeluje pri presnovi toksičnih snovi v jetrih (24, 25). **GNMT pretvori največji delež SAH** med vsemi metiltransferazami, ki jih je pri človeku okrog 60. Zato **aktivnost GNMT najbolj vpliva na koncentracijo SAH oz. razmerje SAM/SAH.** (47,48,49)



Slika 5: Od SAM odvisen prenos metilne skupine. "X" je akceptor (v primeru GNMT je to glicin), SAM donor metilne skupine, SAH ter CH₃-X produkta. SAH pogosto inhibira reakcijo. Njegova koncentracija je odvisna od aktivnosti encima (22)

Regulacija koncentracije SAM in razmerje SAM/SAH je odvisno od treh alosteričnih reakcij: (i): SAM inhibira MTHFR, ki katalizira tvorbo 5-metilTHF iz 5,10-metilen-THF; (ii): 5-metilTHF, produkt reakcije katalizirane z MTHFR in primarnih metil donorjev za remetilacijo Hcy, inhibira GNMT; (iii): GNMT ima, nekarakteristično za metiltransferaze, visok K_i za SAH in je le šibko inhibiran s strani SAH. Iz tega sledi, da visoka koncentracija SAM inhibira MTHFR, hkrati je zmanjšana tvorba 5-metilTHF, kar

omogoča večjo aktivnost GNMT in posledično zmanjšanje koncentracije SAM. Obratno, ko je koncentracija SAM znižana se tvorba 5-metilTHF zviša, GNMT je inhibiran in tako je več metilnih skupin v obliki SAM na razpolago za reakcije metiliranja (13).

Zvišan Hcy lahko povzroči okvare pri embriju preko spremenjenega razmerja med SAM in SAH in posledično lahko spremeni reakcije metiliranja, vključno s tistimi, ki imajo regulatorno vlogo pri ekspresiji genov (23).

Gen, ki kodira GNMT, je lociran na kratki ročici kromosoma 6 in sicer na poziciji 6p12. Sestavljen je iz 6 eksonov in je dolg 10kb (25).

1.3.2. Alelne variante

V genu za GNMT so do sedaj odkrili 37 polimorfizmov. Prvi dve klinično relevantni alelni varianti gena za GNMT, ki sta povezani z hipermetionemjo sta naslednji:

- Ena je 1487T>C tranzicija v eksonu 1, ki ima za posledico zamenjavo leucina s prolinom (leu49pro).
- Druga je 3715C>A transverzija v eksonu 4, ki ima za posledico zamenjavo histidina s asparaginom (his176asn).

Mudd in sodelavci (2001) so omenjeni mutaciji odkrili pri 4 letni punčki in njenem 9 letnem bratu iz Italije, ki sta imela izolirano hipermetionemijo. Mati je bila heterozigot za prvo mutacijo, oče pa za drugo. Ti dve mutaciji povzročita pomanjkanje encima GNMT (26).

Študija narejena na zdravih ženskah (n=114) od 18 do 46 let, je proučevala **možen vpliv polimorfizma 1289C>T v genu za GNMT na koncentracijo Hcy** v plazmi in folata v serumu pred in po 2-tedenski folatni restrikciji, ločeno in v kombinaciji s polimorfizmom MTHFR 677C>T. Raziskovala je tudi vpliv polimorfizmov MTRR 66A>G in MTHFR 1298A>C, ločeno ali v kombinaciji z MTHFR 677C>T. Na začetku je bila koncentracija Hcy v plazmi in folata v serumu enaka pri vseh genotipih GNMT. Po dveh tednih folatne restrikcije je bila koncentracija Hcy višja pri mutiranih homozitih 1289TT v primerjavi z nemutiranimi homozigoti 1289CC in 1289CT heterozigoti. Koncentracija folata v serumu se med genotipi ni razlikovala. Prav tako se na začetku koncentracije Hcy v plazmi in folata v serumu nista razlikovali med različnimi alelnimi kombinacijami GNMT C1289T/MTHFR C677T. Po dveh tednih folatne restrikcije je bila koncentracija Hcy v plazmi večja pri genotipu GNMT TT/MTHFR CC v primerjavi z GNMT CT/MTHFR CC in GNMT CC/MTHFR CC genotipi. Koncentracija Hcy v plazmi je bila pri GNMT

CC/MTHFR TT genotipu višja kot pri GNMT CC/MTHFR CC. Študija je pokazala, da TT genotip zmanjša aktivnost GNMT v primerjavi s CC ali CT in da polimorfizma GNMT 1289C>T in MTHFR 667C>T na podoben način vplivata na koncentracijo Hcy (13).

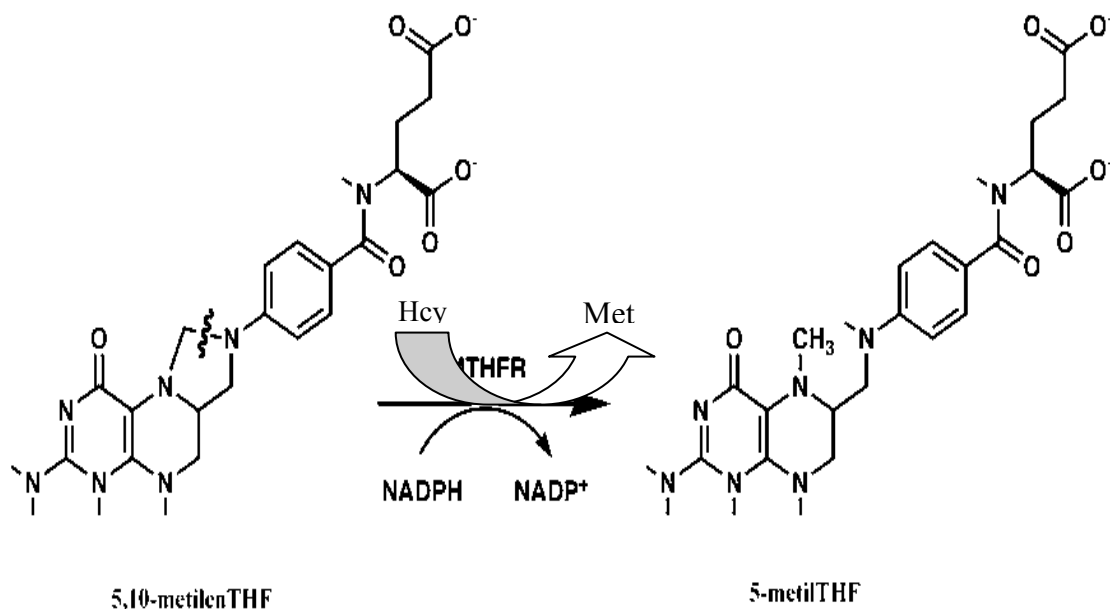


Slika 6 . Gen za GNMT, sestavljen iz šestih eksonov in polimorfizem 1289C>T v rdečem okvirčku v njegovi promotorski regiji (27).

1.4. 5,10-METILENTETRAHIDROFOLAT REDUKTAZA (MTHFR)

1.4.1. Biološka funkcija

MTHFR (EC 1.5.1.20) je pomemben encim pri metabolizmu folatov. Bolj natančno katalizira od NAD(P)H odvisno **pretvorbo 5,10-metilenTHF do 5-metilTHF**, pri čemer kot kofaktor nastopa FAD. Gre za večstopenjsko reakcijo **pri kateri se Hcy remetlira** do metionina, ki je pomemben pri izgradnji proteinov in drugih celičnih komponent (24, 28).



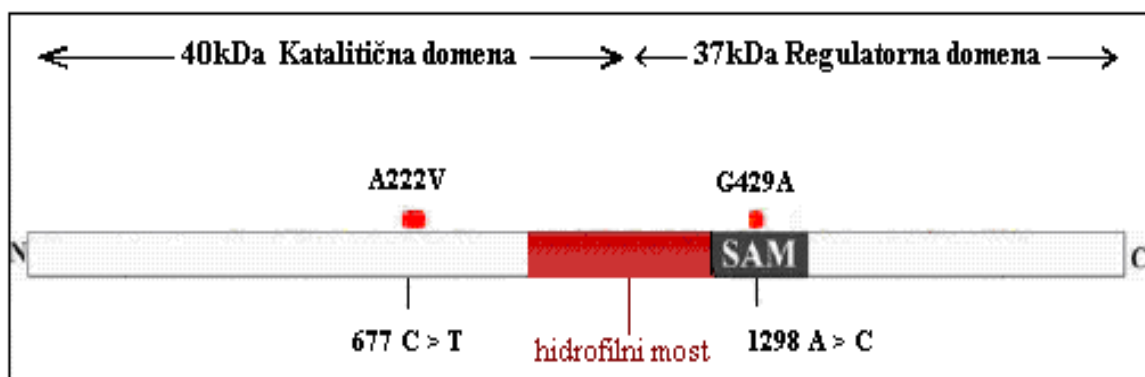
Slika 7. Reakcija redukcije 5,10- metilenTHF do 5-metilTHF, ki je katalizirana z MTHFR (29)

5,10-metilenTHF je donor metilne skupine pri reduktivni metilaciji dUMP v dTMP, ki pa je prekursor osnovnega gradnika v sintezi DNA, timidin trifosfata.

Gen, ki kodira MTHFR, je lociran na koncu kratke ročice kromosoma 1 na mestu 1p36.3. Sestavljen je iz 11 eksonov; struktura gena je podobna strukturi mišjega gena za MTHFR (28).

1.4.2. Alelne variante

Mutacijo **677C>T** je odkril Frosst s sodelavci leta 1995. Nastane v delu gena, ki kodira katalitično domeno encima in povzroči zamenjavo alanina z valinom na mestu 222 (A222V). Tako kot pri homozigotih, je tudi pri hetozigotih aktivnost encima zmanjšana, kar lahko privede do hiperhomocisteinemije, termolabilnost proteina pa je povišana. Folati stabilizirajo encim s tako mutacijo. Koncentracije folatov večje od 15,4 nM lahko nevtralizirajo posledice mutacije (Jacgues et al.(1996)) (52). Ta mutacija vpliva na DNA metilacijo preko vpliva na raven folata. Van der Put in sodelavci so leta 1998 odkrili mutacijo **1298A>C**, ki povzroči zamenjavo glutamata z alaninom na mestu 429 (E429A). Posledično je aktivnost encima zmanjšana. Mutacija se nahaja v delu gena, ki kodira regulatorno domeno encima in sicer mesto kamor se veže SAM. Polimorfizem sam ne povzroči spremembe v koncentraciji folata ali Hcy, vendar pa v kombinaciji z 677C>T pride do zmanjšanja aktivnosti encima, povišanja koncentracije Hcy in znižanja koncentracije folata. Redko se pojavljata obe mutaciji v cis položaju. Kombinirani genotipi s 3 ali 4 mutirani aleli verjetno zmanjšajo preživetje in utero, saj so omenjene kombinacije genotipov zelo redke v splošni populaciji ter pogoste pri spontano splavljenih plodovih (28, 30).



Slika 8. Struktura proteina MTHFR z označenima domenama in zamenjavama v aminokislinskem zaporedju (30)

1.5. TIOPURIN-S-METILTRANSFERAZA (TPMT)

1.5.1. Biološka funkcija

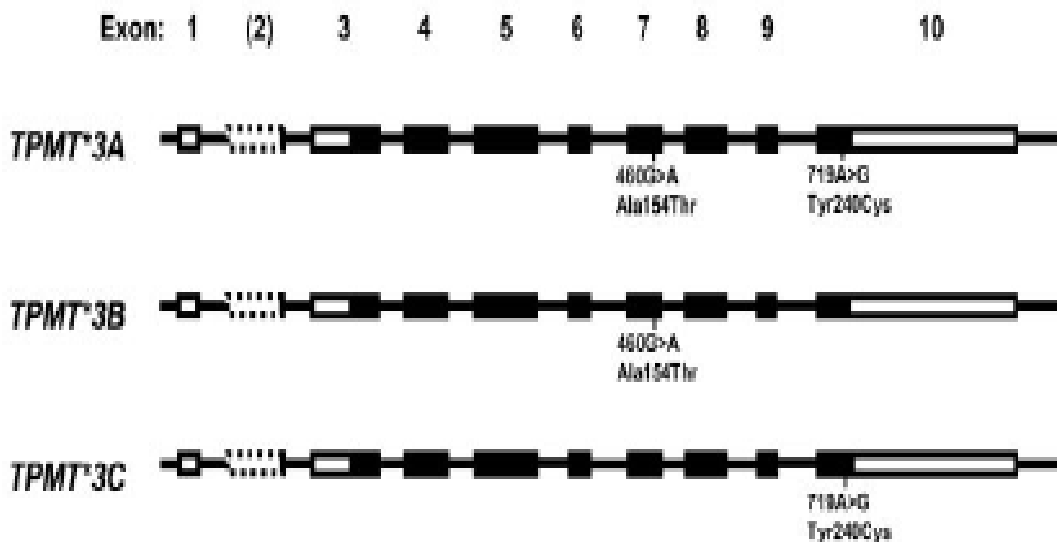
Tako kot GNMT je tudi TPMT (EC 2. 1. 1. 67) metiltransferaza. Katalizira reakcijo S-metiliranja tiopurinov. Donor metilne skupine je **SAM**, ki se pri tem pretvori v **SAH** (31). Biološka funkcija in endogeni substrat TPMT nista znana (32).

Gen, ki kodira TPMT, je lociran na kratki ročici kromosoma 6 na mestu 6p22.3 (33).

Na encimsko aktivnost v največji meri vplivajo polimorfizmi v tem genu in pogostost teh se med rasami razlikuje. Tako je med Kavzijci znana značilna trimodalna frekvenčna distribucija aktivnosti: 89–94 % posameznikov izkazuje visoko, 6–11 % srednjo in 0,33 % nizko encimsko aktivnost. Pri Kitajcih in drugih azijskih populacijah je aktivnost unimodalna. Posamezniki z visoko aktivnostjo TPMT so homozigotni za divji tip alela (TPMT*1), srednja aktivnost je posledica heterozigotnega genotipa z enim mutiranim alelom, posamezniki z nizko aktivnostjo pa so homozigotni za oba mutirana alela (32).

1.5.2. Alelne variante

Do danes je bilo odkritih več kot 20 mutacij v genu za TPMT. Večinoma gre za redke mutacije. Najbolj pogoste in klinično pomembne so alelne variante TPMT*3A, *3B in *3C (34).



Slika 9. Genska struktura in najpomembnejši polimorfizmi v genu za TPMT (36). Polni prostori predstavljajo eksone, linije introne, prazni prostori pa nekodirajoče regije. Ekson 2 je označen črtkano, kar pomeni, da se v večini primerov ne vključuje v proces transkripcije.

TPMT*3A alelna varianta vsebuje dve nukleotidni tranzicijski mutaciji: 460G>A in 719A>G, kar vodi v naslednjo substitucijo aminokislin: Ala154Thr in Tyr240Cys, kar ima za posledico znižan nivo TPMT in njegovo zmanjšano katalitično aktivnost (34). **TPMT*3B** alelna varianta vsebuje mutacijo 460G>A, ki zniža katalitično aktivnost proteina na 1/9 v primerjavi z divjim tipom. Pri alelni varianti **TPMT*3C** pa gre za mutacijo 719A>G, ki zmanjša količino proteina in njegovo aktivnost, vendar precej manj kot pri TPMT*3A (35).

1.6. GENOTIPIZACIJA S TaqMan® ALELNO DISKRIMINACIJO

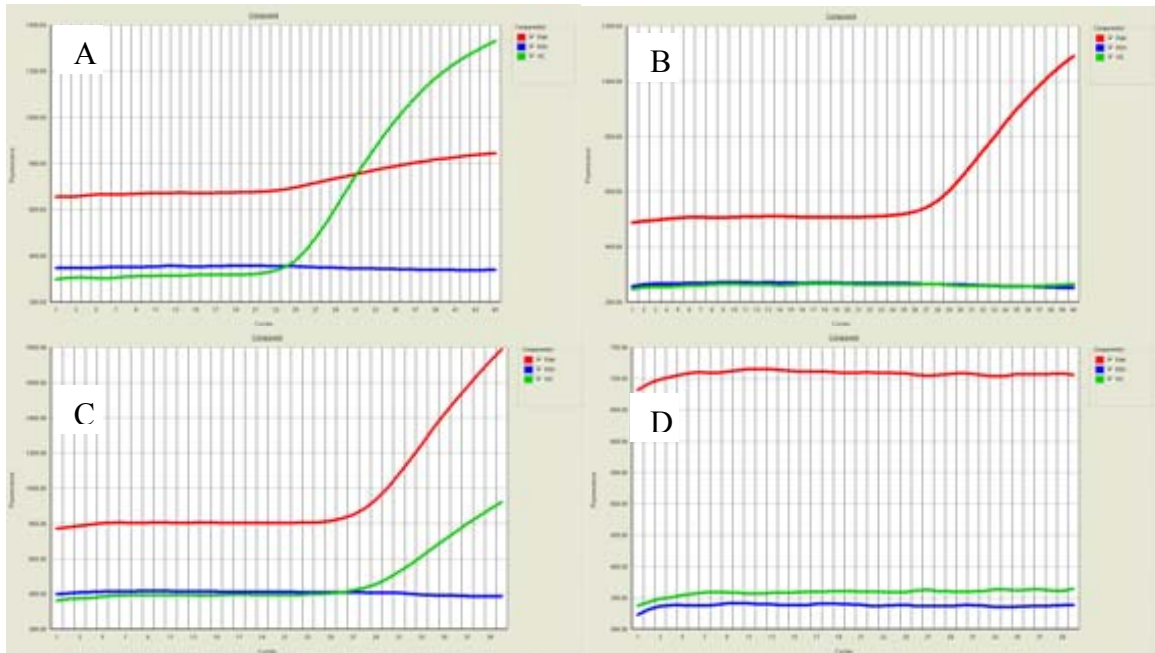
Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (sinonim je kvantitativni PCR (qPCR)) je metoda, ki se med drugim uporablja tudi za kvantifikacijo genov. Predstavlja nadgradnjo klasične PCR reakcije, saj omogoča enostavno in zanesljivo detekcijo in merjenje količine nastalega produkta v vsakem ciklu med reakcijo. Pomnoževanje in detekcija potekata istočasno in temeljita na merjenju fluorescence. Ločimo **nespecifični ter specifični način detekcije**. Pri nespecifičnem načinu je detekcija omogočena z uporabo nespecifičnih barvil, kot je SYBRGreen®. Barvilo se veže v vsako novonastalo dvojnovijačno DNA neodvisno od nukleotidnega zaporedja in posledično pride do povečanja fluorescence. Za razliko od tega, uporaba sond (TaqMan®) omogoča specifični način detekcije. Sonda je oligonukleotid z določenim nukleotidnim zaporedjem, zato je zmožna vezave na točno določen odsek vzorčne DNA. Na enem koncu ima vezano barvilo, ki oddaja fluorescenco (reporter), na drugem pa barvilo, ki to fluorescenco preseže (dušilec), ko je sonda intaktna. Med pomnoževanjem DNA polimeraza razgradi sondo, s tem se barvili ločita, dušilec ne preseže emisije reporterja in pride do porasta fluorescence. Ta način detekcije temelji na t.i. **FRET tehnologiji** (Fluorescence resonance energy transfer), od razdalje odvisni interakciji med molekulama barvil (37, 38).

TaqMan® sonda je oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezano reportersko barvilo, in sicer **VIC® barvilo za alel 1 in FAM™ za alel 2** (39). Vsaka izmed sond se veže samo na eno varianto alela (nemutirano ali mutirano)

Po denaturaciji DNA pride do vezave sonde na komplementarno zaporedje. Ko je sonda še intaktna, dušilec utiša reportersko barvilo po **FRET** principu. Tekom PCR reakcije *Taq* polimeraza podaljšuje začetnike vezane na vzorčno DNA in tvori novo komplementarno verigo DNA ter na svoji poti razgradi sonde, ki so vezane na tarčno DNA. S tem se

reportersko barvilo in dušilec ločita, kar ima za posledico porast fluorescence. Detektiran porast fluorescence indicira kateri alel je prisoten v vzorcu: porast fluorescence za **barvilo VIC®** pomeni, da je oseba homozigot za alel 1, porast fluorescence za **barvilo FAM®** pomeni, da je vzorec homozigot za alel 2, porast fluorescence tako za barvilo VIC kot FAM pa pomeni heterozigotni genotip, kjer sta prisotna oba alela (39,40).

Sprememba fluorescence barvil VIC® in FAM® pri različnih genotipih in slepem vzorcu brez DNA je prikazana na sliki 10.



slika 10. Sprememba fluorescence pri različnih genotipih. (A) porast fluorescence barvila VIC®, ki je homozigoten za alel 1, (B) porast fluorescence barvila FAM®, ki je homozigoten za alel 2, (C) porast fluorescence obeh barvil pri heterozigotnem vzorcu ter (D) odziv fluorescence za slepi vzorec.

Sama reakcija v splošnem poteka v treh stopnjah. Prvi dve stopnji se izvedeta le na začetku reakcije. Najprej pride do aktivacije encima, ki prepreči prenešeno kontaminacijo pri 50°C. Nato v drugi stopnji, tako imenovani Hot Start tehniki, pride do aktivacije DNA polimeraze, ki podaljšuje DNA verigo. Poteče pri 95°C. Potem sledijo cikli pomnoževanja in hkratna detekcija produktov. Vsak cikel je sestavljen iz dveh intervalov: 15 sekundnega intervala pri 95°C, pri katerem pride do denaturacije DNA, in 90 sekundnega intervala pri 60 °C za prileganje začetnih oligonukleotidov in sond ter izgradnjo komplementarne verige DNA. Ker je cepitev sonde in s tem detekcija produktov možna le, ko je le ta vezana na DNA, oba procesa prileganja in podaljševanja potekata v skupnem temperaturno prilagojenem intervalu (30).

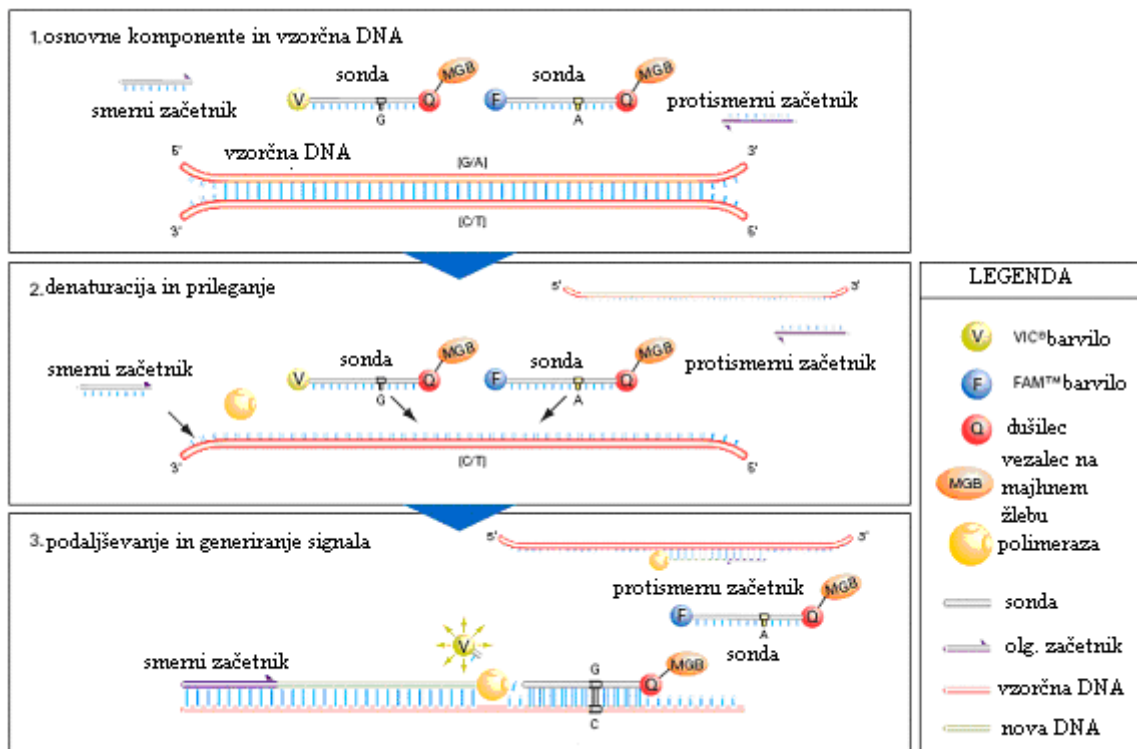
Sestavo reagentov za izvedbo alelne diskriminacije prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Komponente za izvedbo alelna diskriminacije (39, 41)

KOMPONENTE	SESTAVA KOMPONENT
PCR Univerzalna zmes	DNA polimeraza mešanica dNTP MgCL ₂ pasivno referenčno barvilo ROX optimiran pufer zaPCR
alelno specifična mešanica za genotipizacijo)	smerni in protismerni oligonukleotidni začetnik TaqMan® sonda označena z barvilom VIC® za alel 1 TaqMan® sonda označena z barvilom FAM® za alel 2
vzorec DNA	delovna raztopina DNA s koncentracijo 4 µg/ml

Podatkov o zaporedju posameznih oligonukleotidnih začetnikov in sond nimamo, ker so poslovna skrivnost podjetja Applied Biosystems.

Slika 11 prikazuje potek TaqMan® reakcije za alelno diskriminacijo.



Slika 11. Potek PCR reakcije v realnem času in za alelno diskriminacijo (39)

2. NAMEN DELA

Znano je, da so NTD povezane s pomanjkanjem folatov ter da folna kislina zmanjša možnost okvare nevralne cevi. Zato so geni za encime, ki sodelujejo pri metabolizmu folatov dobri kandidati za genetske markerje tveganja za NTD. Med njih sodijo tudi MTHFR, GNMT in TPMT. MTHFR je pomemben encim pri metabolizmu folatov in vpliva na koncentracijo Hcy. GNMT je metiltransferaza, ki katalizira pretvorbo SAM v SAH, ter kvantitativno pretvori največji delež SAM v organizmu glede na ostale metiltransferaze. Aktivnost tega encima je torej pomembna, ker najbolj od vseh metiltransferaz vpliva na koncentracijo SAM, ki vpliva na aktivnost MTHFR. TPMT je ravno tako metiltransferaza, ki katalizira pretvorbo SAM v SAH preko reakcije S-metiliranja tiopurinov. Njegova biološka funkcija in endogeni substrat nista znana. Polimorfizmi naštetih genov vplivajo na aktivnost pripadajočih encimov in posledično na koncentracijo Hcy. Predvidevamo, da je Hcy nevro- in embriotoksičen. Ugotovljeno je bilo, da je bila njegova koncentracija zvišana v plazmi mater, ki so imele otroka z NTD. Medtem, ko je povezava med polimorfizmi MTHFR in NTD že dokazana v nekaterih drugih populacijah, pa direktna povezava med GNMT oz. TPMT in NTD še ni bila raziskana.

Namen diplomskega dela je prvič v slovenski populaciji preučiti povezanost polimorfizmov v izbranih genih folatnega cikla (MTHFR, GNMT, TPMT) z napakami nevralne cevi ter določiti frekvenco polimorfizma GNMT 1289C>T v splošni slovenski populaciji.

Da bi ugotovili, ali izbrani polimorfizmi vplivajo na pojavnost NTD, bomo primerjali razlike v njihovi frekvenci med plodovi z NTD in skupino zdravih prostovoljcev v splošni slovenski populaciji. Razlika v njihovih frekvencah med omenjenima skupinama nakazuje, da določen polimorfizem zmanjša ali poveča tveganje za nastanek NTD. Dobljeni rezultati bodo prispevali k zmanjšanju pojavnosti NTD preko presejalnih testov genotipizacije ter ustreznih odmerkov folne kisline v obdobju pred zanositvijo in v prvih treh mesecih nosečnosti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 18 plodov z NTD in 210 zdravih prostovoljcev, ki predstavljajo kontrolno skupino.

3.1.1. Kontrolna skupina

Predstavljajo jo zdravi odrasli in vključuje 93 (44%) žensk in 106 (50%) moških s povprečno starostjo $23,0 \pm 5,0$ let. Pri tem je treba navesti, da nam manjkajo podatki o spolu 12 – ih oseb, za 8 pa nimamo podatka o starosti.

Vzorci so izolati DNA iz periferne venske krvi vsakega posameznika, od katerega je bil predhodno pridobljen obveščeni pristanek. Odvzem je potekal v Zdravstvenem domu za študente Univerze v Ljubljani ob rednih sistematskih pregledih. Za izolacijo je bila uporabljena kri, ki je preostala po rednih analizah v biokemijskem laboratoriju.

3.1.2. Skupina bolnikov

Skupino bolnikov predstavljajo plodovi z različnimi okvarami nevralne cevi. Vključuje 9 (50%) plodov moškega in 9 (50%) plodov ženskega spola s povprečno starostjo $19,8 \pm 4,7$ tednov gestacije. Pri 14 - ih plodovih je bila po postavitvi diagnoze nosečnost umetno prekinjena. Spodnja preglednica prikazuje odstotke obdukcijske diagnoze pri plodovih.

Preglednica 2: Procenti obdukcijske diagnoze pri plodovih

<i>OBDUKCIJSKA DIAGNOZA</i>	<i>%</i>
spina bifida - aperta lumbialis, hidrocefalus	11,1
hidrocefalus, subokcipitalna meningokela	5,6
anencefalija, akranija	27,8
Mielomeningokela	11,1
spina bifida	11,1
anencefalija, trisomija 21	5,6
spina bifida, Arnold Chiari sindrom	5,6
spina bifida, meningokela	5,6
lumbosakralna spina bifida, regresivna kvadratni sindrom	5,6
spina bifida, triplodija	5,6
Anencefalija	5,6

Vzorci so izolati DNA iz parafinskih rezin plodov. Priprava parafinskih rezin je opravila Služba za patomorfološko in citološko diagnostiko, UKC Ljubljana. Odrezali so 5-10 rezin debeline 10 mikrometrov tkiva vsakega ploda, ki je bilo shranjeno v parafinu.

3.2. IZOLACIJA DNA

3.2.1. Kontrolna skupina

DNA je bila predhodno izolirana po metodi z izsoljevanjem, prirejeni po postopku, ki ga je opisal Miller s sodelavci (1988) (30).

3.2.2. Skupina bolnikov

DNA smo izolirali iz parafinskih rezin s pomočjo kita High Pure PCR Template (Roche Applied Science). V prvem delu je potekala deparafinizacija in hidratacija tkiva (protokol iz Nemčije – Sigrid Müller, Institute of Pathology, University of Würzburg, Germany). Parafinskim rezinam v 1,5 mL epruveh smo dodali 1 mL ksilola, vorteksirali približno 30 s ter centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 12.500 rpm. Nato smo odlili ksilol ter postopek ponovili še enkrat. V epruvete smo dodali 1 mL absolutnega etanola, vorteksirali približno 30 s, centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 12.500 rpm ter nato etanol odlili. Deparafinizirano tkivo smo sušili v termobloku pri 55°C 1h. Med tem so bile epruvete odprte in pokrite s parafilmom, v katerega smo s sterilno iglo naredili luknjice, da preprečimo kontaminacijo med vzorci. Drugi del izolacije je bila proteoliza in čiščenje DNA (postopek po T. Fiksemer, University of Homburg-Saar, Germany). K tkivnemu vzorcu smo dodali 200 µL pufra za lizo tkiva in 40 µL proteinaze K, premešali in inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo v epruvete dodali 20 µL proteinaze K in inkubirali 1-2h pri 55 °C. Po inkubaciji smo dodali 200 µL vezavnega pufra, dobro premešali in inkubirali 10 min pri 72 °C, nato dodali 100 µL izopropanola in premešali. S čistim nastavkom smo prenesli tekoči del vzorca na kolono za izolacijo DNA (High Pure PCR Template kit) in centrifugirali 1 min pri 8000 rpm. Centrifugirko z ostankom smo zavrgli in prestavili kolono na novo centrifugirko, dodali 500 µL pufra za odstranjevanje inhibitorjev in centrifugirali 1 min pri 8000 rpm. Nato smo zavrgli centrifugirko z ostankom in prestavili kolono na novo centrifugirko, dodali 500 µL pufra za spiranje in centrifugirali 1 min pri 8000 rpm. To stopnjo smo še enkrat ponovili. Nato smo odlili centrifugat, kolono vrnili na isto centrifugirko in še enkrat centrifugirali 10 s pri 14000 rpm in s tem odstranili ostanke pufra za spiranje. Centrifugirko smo nato zavrgli in jo

zamenjali z novo 1,5 mL epruveto. Na kolono smo nato dodali 200 μ L elucijskega pufru segretega na 70 °C in centrifugirali 1 min pri 8000 rpm. V centrifugatu je bila izolirana DNA.

Pred začetkom izolacije smo proteinazo K raztopili v 4,5 mL ultra čiste vode in jo alikvotirano zmrznili pri -15 do -25 °C. Puftru za odstranjevanje inhibitorjev smo dodali 20 mL, puftru za spiranje pa 80 mL absolutnega etanola ter shranili na dobni temperaturi.

3.2.2.1. Merjenje koncentracije DNA v osnovni raztopini vzorcev

Za merjetnje koncentracije DNA v vzorcih smo uporabili aparat NanoDrop ND-1000 spektrofotometer. Spektrofotometer meri absorbanco pri 260 nm, pri kateri imajo organske baze DNA absorpcijski maksimum. Če vzorec ni onečiščen s proteini, na ta način neposredno določimo koncentracijo DNA. Čistoto vzorca pa preverimo z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm. Rezultat je podan kot razmerje A_{260} / A_{280} , ki za DNA znaša 1,8 ali več (42).

Praktična izvedba: Vzorce smo dobro premešali na vrtinčastem mešalu ter na optično vlakno aparata nanесли 1,5 μ L vzorca.

3.2.2.2. Redčenje osnovne raztopine DNA

Za izvedbo genotipizacije potrebujemo vzorce (delovne raztopine) s koncentracijami do 4,44 μ g/mL oz. do 20 ng DNA na vzorec, zato smo osnovne raztopine z višjimi koncentracijami DNA redčili na 4 μ g/mL. Pri tem smo uporabili avtoklavirano ultra čisto vodo.

3.2.3. REAGENTI, KEMIKALIJE, APARATURE

- zaščitne rokavice iz lateksa (Kimberly-Clark);
- polavtomatske pipete: 2-20 μ L, 20-200 μ L (EPPENDORF);
- nastavki za pipete: 10 μ L, 200 μ L (STARSTEDT);
- vrtinčasto mešalo VORTEX-GENIE 2;
- centrifuge: Centric 322A (TEHTNICA), 5415R Microcentrifuge (EPPENDORF)
- Eppendorfove epruvete 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL (STARSTEDT);
- parni sterilizator A-21 (avtoklav), program plastika: 0,1 MPa, 121 °C, 20 min (Kambič Laboratorijska oprema);
- nanodrop ND-1000 Spektrofotometer (NanoDrop Technologies Inc.)
- 2-propanol pro analysi (Merck)

- ksilol p.a. (Sigma – Aldrich)
- absolutni etanol (Merck)
- avtoklavirana ultra čista voda

3.3. GENOTIPIZACIJA

Za izvedbo genotipizacije smo pripravili reakcijsko zmes za vsako mutacijo posebej. Volumske količine posameznih komponent za genotipizacijo GNMT 1289C>T in MTHFR 677C>T ter 1298A>C so enake in navedene v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo GNMT 1289C>T, MTHFR 677C>T in MTHFR 1298A>T

KOMPONENTE ZA REAKCIJSKO ZMES	VOLUMEN ZA 1 VZOREC (μL)
5x Hot FirepPol Probe qPCR Mix Plus Rox (PCR univerzalna zmes)	2,0
TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix 40X (alelno specifična mešanica za genotipizacijo)	0,25
ultra čista voda	3,25
vzorec DNA	4,50
skupni volumen	10,0

Reakcijska zmes za genotipizacijo TPMT *3B in *3C je sestavljena iz komponent navedenih v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo TPMT*3B in TPMT*3C

KOMPONENTE ZA REAKCIJSKO ZMES	VOLUMEN ZA 1 VZOREC (μL)
5x Hot FirepPol Probe qPCR Mix Plus Rox (PCR univerzalna zmes)	2,0
TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix 20X (alelno specifična mešanica za genotipizacijo)	0,5
ultra čista voda	3,5
vzorec DNA	4,5
skupni volumen	10,0

Reagente in vzorce smo pred začetkom dela dobro premešali in centrifugirali. Najprej smo v 0,5 mL epruveto odpipetirali ustrezne količine reagentov za določeno število vzorcev, jih dobro premešali ter razdelili v niz optičnih epruvet (ABI prism optical tubes) in nato dodali še 4,5 µL vzorčne DNA v vsako epruveto. Nato smo epruvete dobro zatesnili, odstranili moteče mehurčke, centrifugirali ter dali v napravo ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems), s katero smo izvedli genotipizacijo. Nastavili smo ustrezen program in pripravili dokument za odčitavanje rezultatov. Pri vsaki analizi smo odpipetirali še volumen reagentov za 1/2 vzorca, ki je predstavljal rezervni prebitek. Prav tako smo naredili še slepo kontrolo, ki je mešanica reagentov brez vzorca DNA.

Časovni in temperaturni potek reakcije je prikazan v preglednici 5. Zadnji dve stopnji se ponovita 45-60 krat.

Preglednica 5: Časovni in temperaturni potek pomnoževanja

Proces	T (°C)	Čas	
aktivacija encima, ki prepreči preneseno kontaminacijo	50	2 min	
aktivacija DNA polimeraze	95	10 min	
denaturacija DNA	95	15 s	45 – 60 krat
prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige	60	1 min	

Pomnoževanje pri GNMT smo izvedli s 45 cikli, le pri določenih vzorcih smo to število povečali na 50. Pomnoževanje pri MTHFR je potekalo s 50, pomnoževanje pri TPMT pa s 60 cikli. Rezultati ob koncu pomnoževanja so bili podani v obliki grafikona, ki je prikazoval porast jakosti fluorescence barvil v vsakem ciklu.

Iz povečanja jakosti fluorescence ustreznih barvil lahko razberemo genotip posameznega vzorca. V preglednici 6 so navedena ustrezna barvila, ki ustrezajo določenim alelom pri vsaki izmed mutacij.

Preglednica 6: Barvila za detekcijo posameznega polomorfizma in pripadajoči aleli

Alel	Barvilo	
TPMT *3B	*1 = FAM	*3B = VIC
TPMT *3C	*1 = FAM	*3C = VIC
MTHFR 677C>T	T = FAM	C = VIC
MTHFR 1298A>C	A = FAM	C = VIC
GNMT 1289C>T	T = FAM	C = VIC

Z namenom zmanjševanja možnosti kontaminacije (morebitne prisotne molekule DNA) smo delali v komori za PCR in uporabili predhodno avtoklaviran pribor (nastavke za pipete, epice). Pri delu smo nosili zaščitno haljo in rokavice iz lateksa. Pred začetkom dela smo komoro sterilizirali 10 min z UV svetlobo. Po končanem delu smo očistili delovno površino, pribor (pipete, stojalo) ter aparaturo (stresalnik s centrifugo) z 0,5% raztopino hipoklorita.

3.3.1. REAGENTI, KEMIKALIJE, APARATURE

- avtoklavirana ultra čista voda
- 2-propanol pro analysi (Merck)
- ksilol p.a. (Sigma – Aldrich)
- absolutni etanol (Merck)
- pipete : 0,1 – 2,5 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L (EPPENDORF);
- nastavki za pipete: 0,1-10 μ L, 200 μ L (STARSTEDT)
- centrifuga Centric 322A (TEHTNICA)
- aparat za genotipizacijo ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems)
- PCR univerzalna zmes: 5x Hot FirepPol Probe qPCR Mix Plus Rox (Solis Biodyne)
- epruvete Micro Amp optical 8-tube strip 0,2 mL (Applied Biosystems)
- pokrovčki za epruvete Optical Caps 8 caps/strip (Applied Biosystems)
- analizna mešanica za genotipizacijo: TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems):
 - GNMT 1289C>T part number : C_11425842_10
 - TPMT *3B part number: C_30634116_20
 - TPMT *3C part number:C_19567_20
 - MTHFR 677C>T part number: C_1202883_20
 - MTHFR 1298A>T part number: C_850486_20

3.4. STATISTIČNA ANALIZA

Da bi ugotovili ali je populacija kontrolne skupine za mutacijo GNMT 1298C>T v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, smo primerjali opaženo in pričakovano število posameznikov z ustreznim genotipom s testom Fisher exact 2x5, ki je dostopen na spletni strani SISA

(Simple Interactive Statistical Analysis) (50). H-W ravnotežje nam pokaže ali je kontrolna skupina reprezentativna za splošno slovensko populacijo. V ta namen smo najprej izračunali dejanske alelni frekvenca za alel C in alel T, iz njih pa število pričakovanih posameznikov z ustreznim genotipom CC, CT ali TT. Nato smo dejansko in pričakovano število posameznikov z ustreznim genotipom primerjali med sabo. Če dobljena vrednost p presega izbrano stopnjo tveganja ($\alpha = 0,05$) rečemo, da je kontrolna skupina v skladu z H-W ravnotežjem.

Enačbe za izračun alelnih frekvenc:

$$p = \frac{2n_{AA} + n_{aA}}{2N} \quad (1)$$

$$q = \frac{2n_{aa} + n_{aA}}{2N} \quad (2)$$

p frekvenca alela A v populaciji;

q frekvenca alela a v populaciji;

N število vseh preiskovancev;

n_{aa} , n_{aA} in n_{AA} število posameznikov z genotipi aa, Aa in AA

Enačbe za izračun pričakovanega števila oseb s posameznim genotipom:

$$\text{pričakovano število (AA)} = p^2 N$$

$$\text{pričakovano število (aA)} = 2pqN$$

$$\text{pričakovano število (aa)} = q^2 N$$

Te enačbe izhajajo iz H-W ravnotežja, da se frekvenca treh genotipov izračunajo po binomskem pravilu $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, pri katerem $(p+q)^2$ izhaja iz $p + q = 1$, ki velja ker ima kromosom 2 alela.

Za ostale statistične analize smo uporabili program SPSS 16.0 for Windows.

Z namenom ugotavljanja povezave med določenim genotipom in tveganjem za NTD smo uporabili test Fisher exact. Pri tem smo primerjali frekvenco genotipov med kontrolno skupino in skupino bolnikov za vsak od treh genov posebej. V primeru, da je bila dobljena vrednost p večja od α , razlika med frekvencami ni statistično signifikantna, kar pomeni, da določen polimorfizem ne vpliva na povečano stopnjo tveganja za pojav NTD.

Da bi ugotovili, ali obstaja statistično signifikantna povezava med številom mutiranih lokusov v genih in povečano stopnjo tveganja za NTD, smo najprej preverili, ali se ti

podatki normalno porazdeljujejo. Za kontrolno skupino smo uporabili test Kolmogorov-Smirnov, ker je $N \geq 100$, za skupino bolnikov, kjer je $N < 100$ pa test Shapiro-Wilk. Ker smo ugotovili, da ne gre za normalno porazdelitev, smo to povezavo preverili z Mann-Whitneyevim testom. Dobljena vrednost $p < 0,05$ pomeni, da je razlika statistično signifikantna in da število mutiranih lokusov vpliva na povečano tveganje za pojav NTD (30, 36).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Uspešnost pomnožitve pri določanju frekvence polimorfizma GNMT1289C>T

Kontrolno skupino so sestavljali izolati DNA 210 preiskovancev. Od teh je bilo analiziranih 205. Pomnožitev je bila neuspešna le pri enem vzorcu. Uspešnost pomnožitve tako znaša 99,52%. Vzrok, da ostale vzorce nismo pomnožili, je pomanjkanje vzorca, saj so bili omenjeni vzorci uporabljeni že v več drugih študijah. Neuspešna pomnožitev vzorca bi lahko bila posledica staranja vzorca in s tem vprašljive kvalitete vzorca (možnost fragmentiranja DNA), saj so pogoji in količinsko razmerje komponent za izvedbo pomnožitve optimizirani in predpisani s strani proizvajalca. Pomnožitev najprej ni bila uspešna pri koncentraciji DNA 4,0 µg/mL in 45 ciklih. Nato smo pomnožitev ponovili pri različnih koncentracijah: z osnovno raztopino vzorca (neredčen vzorec), z vzorcem s koncentracijo 7,376 µg/mL in 4,0 µg/mL (ponovno redčenje iz osnovne raztopine) in redčenje v razmerju 50:50 pri 45 in 50 ciklih, vendar pomnožitev kljub temu ni bila uspešna.

Skupino bolnikov so sestavljali izolati DNA iz parafinskih rezin 18 – ih plodov z NTD. Uspešnost pomnožitve je znašala 94,44%, ker je bila pomnožitev uspešna pri 17 - ih vzorcih. Neuspešnost pomnožitve enega vzorca je lahko posledica ostankov parafina pri izolaciji DNA ter morebitna prisotnost drugih nečistot v zelo nizkih količinah, ki so bile izolirane skupaj z vzorčno DNA, čeprav je bila izmerjena čistost vzorca znotraj predpisane vrednosti. Te nečistoče bi lahko delovale kot inhibitorji pri pomnoževanju. Prav tako je možen vzrok nepopolna izolacija DNA. Pomnožitev pri neuspelemu vzorcu smo izvedli z osnovno raztopino vzorca, v kateri je bila koncentracija DNA 5,6 µg/mL, z redčenim vzorcem, ki je imel koncentracijo 4,0 µg/mL ter vzorcem, ki smo ga pripravili z redčenjem v razmerju 50:50 pri 45 in 50 ciklih, vendar je bila pomnožitev zopet neuspešna.

4.2. Določanje frekvenc polimorfizma GNMT1289C>T v splošni slovenski populaciji

Alelna frekvenca za **C alel** v slovenski populaciji znaša **49,8 %**, za **T alel** pa **50,2%**. Frekvence posameznih genotipov v kontrolni skupini preiskovancev so navedene v preglednici 7.

Preglednica 7: Ugotovljeno število posameznikov z določenim GNMT genotipom ter njihova pogostost (p=0,966)

genotip GNMT1289C>T	število preizkovanecv	%
CC	52	25,5
CT	99	48,5
TT	53	26,0
Skupaj	204	100%

Iz preglednice je razvidno, da je bilo v kontrolni skupini **največ heterozigotov CT**, nato sledijo mutirani (TT) in pa nemutirani homozigoti (CC), ki se po vrednostih nekoliko razlikujeta. **Pričakovane frekvence** genotipov za polimorfizem GNMT1289C>T smo izračunali s pomočjo enačb, ki so navedene v poglavju 3.4. in s Fisher exact testom ugotavljali ali je naša populacija 204 kontrol v H-W ravnotežju. **Vrednosti za posamezne frekvence, ki smo jih dejansko določili, se ne razlikujejo statistično značilno od pričakovanih vrednosti**, kar pomeni, da so kontrolni vzorci v H-W ravnotežju, saj znaša vrednost p 0,966 in je večja od $\alpha = 0,05$. Rezultati so prikazani v preglednici 8.

Preglednica 8: Pričakovano število posameznikov z določenim GNMT genotipom ter njihova pogostost (p=0,966)

genotip GNMT1289C>T	pričakovano število preizkovanecv	%
CC	51	24,8
CT	102	50,0
TT	51	25,2
Skupaj	204	100%

Za populacijo kontrolne skupine je bila za polimorfizme MTHFR 677C>T, 1298A>T, TPMT*1/*3B in TPMT*1/*3C že narejena statistična analiza v predhodnih študijah in ugotovljeno je bilo, da so v H-W ravnotežju (30, 36).

4.3. Primerjava frekvenc polimorfizma GNMT1289C>T med kontrolami in plodovi z NTD

Ugotovili smo, da se **frekvence genotipov GNMT1289C>T med skupino kontrolnih vzorcev in skupino plodov z NTD ne razlikujejo statistično značilno** (p = 0,372). To pomeni, da omenjeni polimorfizem v genu za GNMT ne vpliva na tveganje za pojav NTD.

Preglednica 9: Primerjava genotipov GNMT1289C>T med kontrolami in plodovi z NTD (p = 0,372)

GNMT genotip	kontrole	plodovi
CC	52 (25,5%)	4 (23,5%)
CT	99 (48,5%)	6 (35,3%)
TT	53 (26,0%)	7 (41,2%)
SKUPAJ	204 (100%)	17 (100%)

Odstotek primerov, ki so nemutirani homozigoti (CC) je v obeh skupinah dokaj podoben, medtem ko se odstotki heterozigotov (CT) in mutiranih homozigotov (TT) med skupinama dokaj razlikujejo. Odstotek plodov, ki so heterozigoti je manjši od istega za kontrolno skupino, odstotek plodov, ki so mutirani homozigoti pa je skoraj dvakrat večji. Čeprav ta razlika ni statistično značilna pa v zgornji preglednici lahko vidimo, da **obstaja določen trend povezave teh polimorfizmov s pojavom NTD**. Razvidno je, da je odstotek plodov, ki so heterozigoti (35,3%) kakor tudi tistih, ki so mutirani homozigoti (41,2%), večji v primerjavi z nemutiranimi homozigoti. Vendar pa je število vzorcev premajhno, da bi potrdili statistično signifikantno razliko.

Ta trend potrjuje tudi študija na zdravih ženskih prostovoljkah v Severni Kaliforniji, ki je bila narejena med drugim tudi z namenom ugotavljanja vpliva polimorfizma GNMT1289C>T na koncentracijo Hcy in folata ločeno ali v kombinaciji z MTHFR677 C>T. V raziskavi je sodelovalo 114 prostovoljk. Koncentracija Hcy in folata je bila spremljana pred in po dvotedenski folatni restrikciji. Rezultati so potrdili, da polimorfizem GNMT1289C>T vpliva na koncentracijo Hcy in sicer, da je ta največji pri genotipu TT (13).

Študijo, ki smo jo naredili bo potrebno v prihodnosti razširiti na večje število plodov z NTD.

V literaturi smo zasledili le eno študijo, kjer so določali pogostost GNMT1289C>T v zdravi populaciji. **Primerjali smo frekvence posameznih genotipov GNMT med Slovenijo in Severno Kalifornijo** (13). Podatki so v preglednici 10.

Preglednica 10: Primerjava frekvenc polimorfizmov v GNMT med Slovenijo in Severno Kalifornijo (p=0,004)

	Slovenija		Severna Kalifornija	
	N	%	N	%
CC	52	25,5	47	41
CT	99	48,5	51	45
TT	53	26,0	16	14
Skupaj	204	100	114	100

Iz zgornje preglednice je razvidno, da se odstotki mutiranih in nemutiranih homozigotov med obema populacijama dokaj razlikujejo, le pri heterozigotih so si podobni. Primerjava teh frekvenc s Fisher exact 2X5 testom je pokazal, da je vrednost $p = 0,004$ manjša od α in zaradi tega se **ti dve populaciji statistično signifikantno razlikujeta**. Vzroki za to so lahko etnična raznolikost populacij, saj se polimorfnost genov razlikuje med posameznimi etničnimi skupinami in rasami. Prav tako pa se različne prehranjevalne navade ter jemanje folne kisline kot dodatka prehrani razlikujejo med različnimi državami. Poleg tega je potrebno omeniti, da pri kalifornijski študiji ne gre za naključno izbrane preiskovanke ampak so to osebe, ki imajo določen MTHFR 677C>T genotip.

4.4. Primerjava polimorfizmov TPMT med kontrolami in plodovi z NTD

Pomnožitev in genotipizacija sta bili uspešni pri vseh 18 vzorcih plodov.

S primerjanjem frekvenc alelov TPMT*3B, TPMT*3C in TPMT*3A med kontrolami in plodovi z NTD smo ugotovili, da tudi **ti aleli nimajo vpliva na tveganje za pojav NTD**, saj ni bilo statistično signifikantne razlike (p= 0,392).

Preglednica 11: Primerjava genotipov TPMT*1/*1 in TPMT*1/*3 med kontrolami in plodovi z NTD (p=0,392)

TPMT genotip	kontrole	plodovi
*1/*1	193 (91,0%)	15 (83,3%)
*1/*3	19 (9,0%)	3 (16,7%)
SKUPAJ	212 (100%)	18 (100%)

Vidimo, da je tako pri kontrolah (91,0%) kot plodovih z NTD (83,3%) **največ primerov z normalnim genotipom TPMT *1/*1**, medtem ko je odstotek plodov z mutiranim

genotipom TPMT *1/*3 večji pri plodovih (16,7%) v primerjavi s kontrolami (9,0%). Čeprav gre za majhno število analiziranih plodov z NTD vidimo, da je **procent mutiranih genotipov pri plodovih skoraj dvakrat večji kot pri kontrolah, kar vsekakor kaže na možen vpliv te mutacije na tveganje za pojav NTD**. V tej študiji tega nismo mogli potrditi zaradi premajhnega števila vzorcev plodov, zato bi bilo treba študijo razširiti. Čeprav do zdaj še niso raziskali povezave polimorfizmov v genu za TPMT s pojavom NTD, je TPMT dober kandidatni gen za NTD tveganje, saj je tako kot GNMT, metiltransferaza in vpliva na koncentracijo Hcy preko pretvorbe SAM v SAH. Hcy pa je dejavnik tveganja povezan z pojavom NTD. Poleg tega verjetno vpliva na metilacijo DNA. Študije na miših navajajo, da ima verjetno metiliranje dodatnega X kromosoma v celicah ženskega spola pri embriju pomembno vlogo pri zvišanju odstotka pojava NTD pri miših ženskega spola (19).

Zanimivo je, da so odkrili **povezavo med NTD in HLA lokusom (6p21.3) (43)**, ki pa se nahaja zelo blizu gena za TPMT (6p22.3). To bi bilo lahko pomembno pri **vezanem dedovanju**, kjer je lahko mutacija v enem genu marker za mutacijo v drugem genu, ki je vzrok za nastanek določenega fenotipa.

4.5. Primerjava polimorfizmov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD

Genotipizacija je bila uspešna pri vseh 18 vzorcih. Po obdelavi podatkov smo ugotovili, da na povečano tveganje za pojav NTD vpliva sama kombinacija genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T in encimska aktivnost pogojena z genotipom.

4.5.1. Primerjava med različnimi kombinacijami genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD

Kontrole in plodove smo razvrstili v 6 skupin glede na kombinacijo genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T: 677CC/1298AA, 677CT/1298AA, 677TT/1298AA, 677CC/1298AC, 677CC/1298CC in 677CT/1298AC. Pri kontrolah so bile zastopane vse kombinacije genotipov, med plodovi z NTD pa samo dva (677CT/1298AA in 677CT/1298AC). Vendar pa to ne pomeni, da samo ti dve kombinaciji genotipov vplivata na tveganje za pojav NTD. Upoštevati moramo dejstvo, da gre za majhno število analiziranih vzorcev, zato je verjetnost, da ne zajamemo ostalih kombinacij genotipov dokaj velika. Potrebno je večje število vzorcev z NTD, da bi potrdili statistično

signifikantno razliko v frekvenci ostalih halotipov ter njihov vpliv na povečanje tveganja za pojav NTD.

Po statistični obdelavi podatkov smo ugotovili, da **kombinacija posameznih genotipov vpliva na povečano tveganje za pojav NTD**. Vrednot $p < 0,001$ je manjša od α , kar pomeni, da se frekvence genotipov med kontrolami in plodovi z NTD statistično signifikantno razlikujejo. Rezultati so podani v preglednici 12.

Preglednica 12: Primerjava frekvenc kombinacij genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD ($p < 0,001$)

MTHFR kombinacije	kontrole	plodovi
677CC/1298AA	19 (9,3%)	0 (0%)
677CT/1298AA	50 (24,4%)	7 (38,9%)
677TT/1298AA	24 (11,7%)	0 (0%)
677CC/1298AC	45 (22,0%)	0 (0%)
677CC/1298CC	24 (11,7%)	0 (0%)
677CT/1298AC	43 (21,0%)	11 (61,1%)
Skupaj	205 (100%)	18 (100%)

4.5.2. Primerjava teoretične aktivnosti encima MTHFR pogojena s kombinacijo genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD

Teoretične aktivnosti MTHFR glede na genotip prikazuje preglednica 13.

Preglednica 13: Teoretične aktivnosti MTHFR glede na genotip

MTHFR677/1298 genotip	teoretična aktivnost
CC/AA	100%
CC/AC	80%
CT/AA	65-75%
CC/CC	60%
CT/AC	45-55%
TT/AA	30-50%
CT/CC	30%
TT/AC	15-25%
TT/CC	0%

Kontrole in plodove z NTD smo razdelili v dve skupini glede na encimsko aktivnost pogojeno s kombinacijo genotipov. V eno skupino smo razvrstili genotipe, ki dajejo več kot 55% encimsko aktivnost, v drugo pa tiste genotipe, ki dajejo manjšo ali enako encimsko aktivnost kot 55%.

Preglednica 14: Razvrščene kombinacije genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T glede na encimsko aktivnost

encimska aktivnost	halotip MTHFR677/1298
> 55%	CC/AA; CT/AA; CC/AC; CC/CC
≤ 55%	TT/AA; CT/AC ter vse ostale kombinacije s 3 ali 4 mutiranimi aleli

Encimska aktivnost je klinično bolj relevanten pokazatelj kot genotip. Osebe, ki imajo več kot 55% ohranjeno encimsko aktivnost ponavadi ne kažejo kliničnih znakov bolezni oz. odstopanj od normalnega fenotipa. Ti se pokažejo, ko je aktivnost encima enaka ali manjša kot 55%, zato je razvrščanje podatkov na ta način in njihova obdelava pomembna, saj nam rezultati veliko povedo in lahko direktno potegnemo povezavo med boleznijo in kliničnimi znaki, ki se pri tej bolezni posledično kažejo.

Med kontrolnimi vzorci, ki smo jih analizirali, je bilo 32,7% takih, ki so imeli encimsko aktivnost enako ali manjšo kot 55%, medtem ko je bil ta procent med plodovi z NTD skoraj 2 krat večji (Preglednica 15). Po izvedenem Fisher exact testu smo ugotovili, da **kombinacija polimorfizmov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T lahko vpliva na povečano tveganje za pojav NTD** ($p = 0,002$).

Preglednica 15: Primerjava teoretične aktivnosti encima MTHFR med kontrolami in plodovi z NTD ($p=0,002$)

MTHFR aktivnost	kontrole	plodovi
MTHFR aktivnost > 55%	138 (67,3%)	7 (38,9%)
MTHFR aktivnost ≤ 55%	67 (32,7%)	11 (61,1%)
SKUPAJ	205 (100%)	18 (100%)

Povezava med polimorfizmi v genu za MTHFR in NTD, ki smo jo ugotovili, je bila pričakovana. Tudi številne druge študije so že potrdile to povezavo. Študija, ki so jo izvedli Gos M. in sodelavci je potrdila prispevek genotipa MTHFR677TT in halotipa 677CT/1298AC k genetski predispoziciji za pojav NTD. V študijo je bilo vključenih vzorcev 20-tih pacientov z NTD in 262 kontrol. Frekvenca halotipa 677CT/1298AC je bila

v primerjavi s kontrolno skupino večja med pacienti z NTD (44), tako kot v naši študiji. To je v skladu s študijo izvedeno na irski populaciji, v kateri je bilo ugotovljeno, da je kombinacija teh dveh polimorfizmov vodila v močno zmanjšanje aktivnosti MTHFR-e in da so jo označili kot dejavnik tveganja za nepravilno zapiranje nevralne cevi (Van der Put et al. 1998) (51). Ou in sodelavci so v svoji študiji leta 1996 povezali polimorfizem MTHFR677C>T s povečanim tveganjem za pojav NTD (53). Nato so Christensen in sodelavci leta 1999 objavili, da je polimorfizem MTHFR677C>T prvi genetični faktor tveganja za NTD določen na molekularnem nivoju. Število plodov in njihovih mater, ki so bili homozogoti za omenjeno mutacijo je bilo večje v primerjavi s kontrolno skupino (54). Rezultate, ki potrjujejo povezavo med polimorfizmi v genu za MTHFR in povečanim tveganjem za NTD, so objavili tudi Relton (55) in Isotalo (56) s sodelavci.

V nasprotju s tem pa nekatere študije niso potrdile povezavo med polimorfizmi MTHFR677C>T ter MTHFR1298A>T in NTD. Primer je študija na brazilski populaciji, ki so jo izvedli Perez in sodelavci. Vključenih je bilo 131 otrok do 5 let starosti s spino bifido in 126 zdravih otrok prav tako do 5 let starosti, ki so predstavljali kontrolno skupino. Vzorci iz obeh skupin so bili genotipizirani za oba polimorfizma in izmerjena jim je bila serumska koncentracija Hcy. Ugotovili so, da povečane koncentracije Hcy ne morejo pojasniti zgolj z mutiranim homozigotnim genotipom analiziranih vzorcev v njihovi populaciji in da ima zmanjšan vnos folatov v kombinaciji z drugo genetsko predispozicijo, kot je mutacija v drugih genih iz metabolizma Hcy, verjetno bolj pomemben vpliv (45). Študija, v kateri je bilo genotipiziranih 276 NTD triad (mama, oče in otrok z NTD) in 256 kontrol, v irski populaciji ni potrdila povezave med polimorfizmom MTHFR1298A>C in pojavom NTD (46). Za tak izid je možnih več razlag: različne prehranjevalne navade in s tem povečan vnos folne kisline, dodatno jemanje folne kisline kot prehranskega dopolnila in omejenost oz zaprtost populacije in razmnoževanja, kar posledično lahko vodi v povečanje enega in zmanjšanje frekvence drugega polimorfizma ter evolucijska prilagoditev.

4.6. Vpliv števila mutiranih lokusov v genih za MTHFR, TPMT in GNMT na povečano tveganje za pojav NTD

Za vsak vzorec posebej, tako iz kontrolne skupine kot iz skupine plodov z NTD smo prešteli skupno število mutiranih lokusov za vse tri preiskovane gene. Tako je lahko maksimalno število mutiranih lokusov za en vzorec 5, kjer so vsi lokusi iz vseh treh genov

mutirani in pa minimalno 0, kjer ni mutiran noben izmed lokusov. Med plodovi so vsi vzorci imeli vsaj en mutiran lokus.

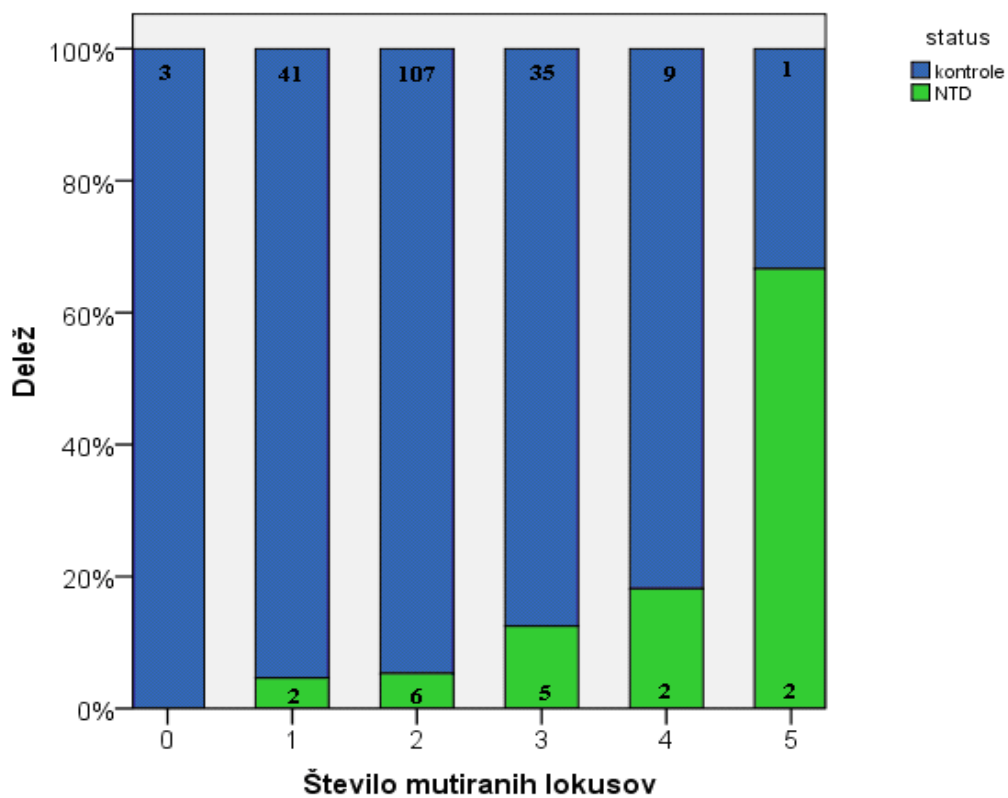
Najprej smo izvedli test normalne porazdelitve podatkov. Ker se podatki ne porazdeljujejo normalno, smo za analizo uporabili Mann - Withneyev neparametrični test. Statistična analiza je pokazala, da **število mutiranih lokusov poveča tveganje za pojav NTD** ($p = 0,008$). Rezultati so prikazani v preglednici 16.

Preglednica 16: Število mutiranih lokusov v kontrolni skupini in pri plodovih z NTD ($p=0,008$)

	N	število mutiranih lokusov*
kontrole	196	104,04
plodovi	17	141,15
Skupaj	213	

*povprečna vrednost pripiranega ranga (Mann-Withney)

Poleg tega vidimo, da je izračunana povprečna vrednost pripisanega ranga za število mutiranih lokusov med plodovi z NTD večja v primerjavi s kontrolno skupino, kar pomeni, da **imajo plodovi več mutiranih lokusov od kontrol**, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Ta analiza potrjuje dejstvo, da ima število mutiranih lokusov močan učinek pri tveganju za pojav NTD. Glede na podatek, da imajo vsi plodovi z NTD vsaj en mutiran lokus, lahko rečemo, da ima ta komponenta močnejši vpliv v primerjavi s tem ali gre za homozigotno/heterozigotno mutacijo oz ali je samo eden alel mutiran ali pa sta oba. Lahko sklepamo, da večje kot je število mutiranih lokusov, tveganje za pojav NTD narašča. To ponazarja slika 12, ki prikazuje delež kontrol in plodov z NTD v odvisnosti od števila mutiranih lokusov. Vidimo, da večje kot je število mutiranih lokusov večji je delež plodov z NTD in manjši delež kontrol. Omenjeni rezultati poudarjajo pomembnost vpliva učinka teh treh genov na tveganje za pojav NTD kot celote in kažejo na to, da ne gre le za učinek izolirane mutacije v enem genu. Tveganje za pojav NTD se povečuje z večanjem števila mutacij in to v različnih genih. Pri tem vsaka mutacija v enem izmed teh treh genov prispeva na različen način. Mutacija v genu za MTHFR zmanjša aktivnost encima za katerega kodira, to pa vodi v povečanje koncentracije Hcy, ki je dejavnik tveganja za pojav NTD. Mutacije v genih za GNMT in TPMT prav tako vodijo v zmanjšanje aktivnosti encimov za katere kodirajo, kar vodi v spremembo ravnotežja SAM/SAH tako, da se koncentracija SAM poveča. Slednji inhibira MTHFR, kar ponovno vodi v povečanje koncentracije Hcy.



Slika 12. Delež kontrol in plodov z NTD v odvisnosti od števila mutiranih lokusov. Številke v stolpcih predstavljajo število oseb v posamezni skupini

5. SKLEP

V naši študiji smo prišli do naslednjih ugotovitev:

♦ Mutacija **GNMT1289C>T** je v slovenski populaciji v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

♦ V splošni slovenski populaciji je frekvenca alela **T 50,2%**, frekvenca alela **C pa 49,8%**. Dejansko določeni GNMT genotipi so naslednji: CC = 52/204, CT = 99/204 in TT = 53/204, njihovi deleži v procentih pa: **CC = 25,5%, CT = 48,5% in TT = 26,0%**.

♦ **Statistično značilne rezultate o povezanosti polimorfizmov v izbranih genih folatnega cikla s povečanim tveganjem za pojav NTD je pokazal le gen za MTHFR.** Ugotovili smo, da na povečano tveganje vpliva tako sama kombinacija polimorfizmov 677C>T in 1298 A>T kot tudi s halotipom pogojena encimska aktivnost. V skupini plodov z NTD je bil procent analiziranih vzorcev, ki so imeli aktivnost $\leq 55\%$ večji v primerjavi s kontrolno skupino ($p=0,002$). Tudi **gena za GNMT in TPMT kažeta določen trend vpliva na tveganje za NTD**, vendar je število analiziranih vzorcev premajhno, da bi potrdili statistično značilne razlike. Tako pri GNMT kot TPMT je opažen trend povečane frekvence mutiranih alelov pri NTD v primerjavi s kontrolno skupino. Sklepamo, da je vpliv MTHFR na tveganje za NTD večji od morebitnega vpliva GNMT in TPMT.

♦ Plodovi z NTD so imeli več mutiranih lokusov v treh preiskovanih genih v primerjavi s kontrolami ($p=0,008$). Sklepamo, da je **število mutiranih lokusov v omenjenih genih močan dejavnik tveganja za pojav NTD**, kar kaže na interakcijo med geni.

6. LITERATURA:

1. Nicholas D.E. Greene, Philip Stanier, and Andrew J. Copp: Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R2): R113–R129
2. Au KS, Ashley-Koch A, Northrup H: Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Dev Disabil Res Rev* 2010;16(1):6-15
3. Bassuk AG, Kibar Z: Genetic basis of neural tube defects. *Semin Pediatr Neurol* 2009; 16(3):101-110
4. Steinbacher Kokalj T: Incidenca prirojenih napak nevralne cevi in dejavniki tveganja, ki vplivajo na njihov nastanek. *Mag. naloga*, Ljubljana, 2009
5. Brooker, Widmater, Graham, Stiling: *Biology*. Boston, McGraw-Hill Higher Education, cop. 2008
6. Lorenzo D. Botto, Cynthia A. Moore, Muin J. Khoury, and J. David Erickson: Neural-Tube Defects. *N Engl J Med* 1999; 341:1509-1519
7. Gilbert, *Developmental biology*. 6th ed.
8. Nathalie M.J., Van Der Put, Henny W.M. Van Straaten, Frans J.M. Trijbels and Henk J. Blom; Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview. *Exp Biol Med* 226(4):243–270, 2001
9. Wikipedia (Neural Tube Defects): http://en.wikipedia.org/wiki/Neural_tube_defect, 08.08.2010
10. Hannah Blencowe, Simon Cousens, Bernadette Modell and Joy Lawn: Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* 2010; 39(suppl_1): i110–i121
11. M. J. Edwards: Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links?. *Cell Stress Chaperones*. 1998; 3(4): 213–220
12. L Wilson, E Gale, and M Maden: The role of retinoic acid in the morphogenesis of the neural tube. *J Anat*. 2003; 203(4): 357–368
13. Brandon Beagle, Tai Li Yang, Jean Hung, Edward A. Cogger, David J. Moriarty, and Marie A. Caudill: NUTRIENT-GENE INTERACTIONS: The Glycine N-Methyltransferase (GNMT) 1289 C→T Variant Influences Plasma Total Homocysteine Concentrations in Young Women after Restricting Folate Intake. *J. Nutr.* 2005; 135: 2780 – 2785

14. Katie A. Burren, Dawn Savery, Valentina Massa, Robert M. Kok, John M. Scott, Henk J. Blom, Andrew J. Copp and Nicholas D.E. Greene: Gene–environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Hum Mol Genet* 2008; 17(23): 3675–3685
15. Yazdy MM, Liu S, Mitchell AA, Werler MM.: Maternal dietary glyceimic intake and the risk of neural tube defects. *Am J Epidemiol* 2010;171(4):407-414
16. Blomberg MI, Källén B.: Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(1): 35-40
17. Gabriela Pavlinkova, J Michael Salbaum and Claudia Kappen: Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genomics* 2009; 10:274
18. Marc Roy, Daniel Leclerc, Qing Wu, Sapna Gupta, Warren D. Kruger, and Rima Rozen: Valproic acid increases expression of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and induces lower teratogenicity in MTHFR deficiency. *J Cell Biochem.* 2008; 105(2): 467–476
19. Diana M. Juriloff and Muriel L. Harris: Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 2000; 9(6) 993 -1000
20. Klaus Krämer, Peter-Paul Hoppe, Lester Packer: *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*, New York, Basel: M. Dekker, cop. 2001, str: 47-91
21. Parveen Kumar, Michael Clark: *Clinical Medicine*, 7th Ed, Saunders Elsevier 2009, Elsevier Limited, str. 400,401
22. Clayton L. Ulrey, Liang Liu, Lucy G. Andrews and Trygve O. Tollefsboll: The impact of metabolism on DNA metilation. *Hum Mol Genet* 2005; 14(Review Issue 1); R139-R147
23. Lucock Mark; *Molecular Nutrition and Genomics: nutrition and the ascent of humankind*, John Wiley & Sons 2007, poglavje: 1.1.5, 2.4.2, 2.5.2, 7.1.1, 13.4
24. Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/>, 20.08.2010
25. OMIM: GLYCINE N-METHYLTRANSFERASE; GNMT
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/606628>, 08.08.2010
26. OMIM: Glycine N-methyltransferase deficiency:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/606664>, 08.08.2010
27. Yu-Chuen Huang, Cheng-Ming Lee, Marcelo Chen, Ming-Yi Chung, Yen-Hwa Chang, William Ji-Shian Huang, Donald Ming-Tak Ho, Chin-Chen Pan, Tony T. Wu, Stone Yang, Ming-Wei Lin, Jer-Tsong Hsieh, and Yi-Ming Arthur Chen: Haplotypes, Loss of

Heterozygosity, and Expression Levels of Glycine N-Methyltransferase in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(5) :1412-1420

28. OMIM: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/607093>, 08.08.2010

29. Wikipedia (MTHFR): http://en.wikipedia.org/wiki/File:MTHFR_RXN.png,
08.08.2010

30. Žager U: Farmakogenetska analiza polimorfizma 677C>T v genu za 5,10-metilentetrahidrofolatno reduktazo pri otrocih z akutno limfoblastno levkemijo. Dipl. naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007

31. Uniprot (TPMT): <http://www.uniprot.org/uniprot/P51580>, 20.08.2010

32. Lorbek G: Ugotavljanje vpliva S-adenozilmetionina na aktivnost tiopurin-S-metiltransferaze v eritrocitih zdravih preiskovancev. Dipl. naloga, Univ. v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010

33. OMIM: TPMT <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TPMT>, 08.08.2010

34. Hung-Liang Tai, Eugene Y. Krynetski Erin G. Schuetz, Yuri Yanishevski, and William E. Evans: Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (*TPMTp3A*, *TPMTp2*): Mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 6444–6449, 1997

35. T. Kubota, K. Chiba: Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, *3A, *3B and *3C) in 151 healthy Japanese subjects and the inheritance of TPMT*3C in the family of a propositus. *Br J Clin Pharmacol*. 2001; 51(5): 475–477

36. Hevir N: Ugotavljanje pogostosti alelov tiopurin-S-metiltransferaze pri levkemičnih bolnikih. Dipl. naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2006

37. Biološka zdravila Od gena do učinkovine, Borut Štrukelj, Janko Kos, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007, str: 55-58

38. NCBI (Real-Time qRT-PCR)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>, 20.08.2010

39. TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol, Applied Biosystems 2006

40. Real-Time PCR: the TaqMan® Method,
www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm,
20.08.2010

41. 5XHot FIREPPol® Probe qPCR Mix Plus (Rox) Protocol, Solis Biodyne

42. Thermo scientific (Nanodrop) [www. nanodrop.com](http://www.nanodrop.com), nanodrop ND1000, 15.08.2010
43. Amos BD, Ruderman N, Mendell N, Johnson AH. Linkage between HLA and soinal development. *Trasplant Proc* 1975; 7:93-95
44. Gos M, Šliwerska E, Szpecht-Potocka A: Mutation incidence in folate metabolism genes and regulatory genes in Polish families with neural tube defects. *J. App. Genet.* 45(3), 2004, pp. 363–368
45. Ana Beatriz Alvarez Perez, Va[^]nia D’Almeida, Naja Vergani, Allan C. de Oliveira, Fernanda Teresa de Lima, and Decio Brunoni: Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR): Incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *American Journal of Medical Genetics* 119A:20–25, 2003
46. Parle-McDermott A., Mills James L., Kirke Peadar N., O’Leary Valerie B., Swanson Deborah A., Pangilinan F., Conley M., Molloy Anne M., Cox C., Scott John M., Brody Lawrence C.: Analysis of the MTHFR 1298A>C and 677C>T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet* 2003; 48:190–193
47. Barić Ivo: Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:459-471
48. Zigmund L, Harvey Mudd S and Wagner C: Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *The Jurnal of Biological chemistry* 2009; 34:22507-22511
49. Kelly T. Williams and Kevin L. Schalinske: New Insighst into the Regulation of Methyl Group and Homocysteine Metabolism. *J. Nutr.* 2007; 137:311-314
50. SISA Sipmle Interactive Statistical Analysis: <http://www.quantitativeskills.com/sisa/>, 08. 09. 2010
51. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK: A secons sommon mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects?. *J Hum Genet* 62:1044-1051, 1998
52. Jacques PF, Boston AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JA, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R: Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93:7-9, 1996

7. KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC

Seznam preglednic:

<i>Preglednica 1: Komponente za izvedbo alelna diskriminacije</i>	16
<i>Preglednica 2: Procenti obdukcijske diagnoze pri plodovih</i>	18
<i>Preglednica 3: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo GNMT 1289C>T, MTHFR 677C>T in MTHFR 1298A>T.....</i>	21
<i>Preglednica 4: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo TPMT*3B in TPMT*3C</i>	21
<i>Preglednica 5: Časovni in temperaturni potek pomnoževanja.....</i>	22
<i>Preglednica 6: Barvila za detekcijo posameznega polomorfizma in pripadajoči aleli....</i>	22
<i>Preglednica 7: Ugotovljeno število posameznikov z določenim GNMT genotipom ter njihova pogostost.....</i>	27
<i>Preglednica 8: Pričakovano število posameznikov z določenim GNMT genotipom ter njihova pogostost.....</i>	27
<i>Preglednica 9: Primerjava genotipov GNMT1289C>T med kontrolami in plodovi z NTD</i>	28
<i>Preglednica 10: Primerjava frekvenc polimorfizmov v GNMT med Slovenijo in Severno Kalifornijo</i>	29
<i>Preglednica 11: Primerjava genotipov TPMT*1/*1 in TPMT*1/*3 med kontrolami in plodovi z NTD</i>	29
<i>Preglednica 12: Primerjava frekvenc kombinacij genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T med kontrolami in plodovi z NTD.....</i>	31
<i>Preglednica 13: Teoretične aktivnosti MTHFR glede na genotip.....</i>	31
<i>Preglednica 14: Razvrščene kombinacije genotipov MTHFR677C>T in MTHFR1298A>T glede na encimsko aktivnost.....</i>	32
<i>Preglednica 15: Primerjava teoretične aktivnosti encima MTHFR med kontrolami in plodovi z NTD.....</i>	32
<i>Preglednica 16: Število mutiranih lokusov v kontrolni skupini in pri plodovih z NTD.</i>	34

Seznam slik:

<i>Slika 1. Primarna nevrulacija.....</i>	2
<i>Slika 2. Razvoj nevralne cevi in vrste NTD.....</i>	3
<i>Slika 3. Trije tipi spine bifide.....</i>	5
<i>Slika 4. Metabolizem folatov.....</i>	8
<i>Slika 5: Od SAM odvisen prenos metilne skupine.....</i>	9
<i>Slika 6. Gen za GNMT, sestavljen iz šestih eksonov, in polimorfizmi v njegovih promotorski regiji.....</i>	11
<i>Slika 7. Reakcija redukcije 5,10- metilenTHF do 5-metilTHF, ki je katalizirana z MTHFR</i>	11
<i>Slika 8. Struktura proteina MTHFR z označenima domenama in zamenjavama v aminokislinskem zaporedju</i>	12
<i>Slika 9. Genska struktura in najpomembnejši polimorfizmi v genu za TPMT</i>	13
<i>Slika 10. Sprememba fluorescence pri različnih genotipih.....</i>	15
<i>Slika 11. Potek PCR reakcije v realnem času in za alelna diskriminacijo</i>	16
<i>Slika 12. Delež kontrol in plodov z NTD v odvisnosti od števila mutiranih lokusov.</i>	35

Tabela rezultatov: kontrole

št. vzorca	spol	starost	GNMT genotip	TMPT genotip	MTHFR 677/1298 genotip
1	M	22	TT	*1/*1	CC/CC
2	Ž	23	CT	*1/*1	CT/AA
4	M	24	CC	*1/*1	CC/AC
5	M	23	CT	*1/*1	CC/AA
6	M	23	TT	*1/*1	CT/AC
7	Ž	23	CT	*1/*1	TT/AA
8	M	26	CT	*1/*1	CC/CC
9	M	22	CT	*1/*1	TT/AA
10	Ž	24	CT	*1/*1	CT/AA
11	Ž	23	CT	*1/*1	CC/AC
12	Ž	26	CC	*1/*1	CT/AA
13	M	25	CC	*1/*3	CC/AC
14	Ž	23	CT	*1/*1	CC/AC
15	Ž	23	CT	*1/*1	CC/AC
16	M	/	CT	*1/*1	CC/AC
17	Ž	22	TT	*1/*3	CC/AC
19	M	23	CT	*1/*1	CT/AA
20	M	/	CC	*1/*1	CC/AA
21	M	/	CC	*1/*1	CT/AC
22	Ž	25	TT	*1/*1	CT/AC
23	Ž	19	TT	*1/*1	CT/AC
24	M	22	CT	*1/*1	CT/AA
26	M	22	CT	*1/*1	CC/AC
27	M	22	TT	*1/*1	CT/AA
28	M	21	CC	*1/*1	CC/AC
30	M	20	TT	*1/*1	TT/AA
31	M	25	CT	*1/*1	CT/AA
32	M	20	TT	*1/*1	TT/AA
33	M	23	CT	*1/*1	TT/AA
34	M	23	CT	*1/*1	CT/AA
35	M	21	CT	*1/*1	CT/AC
36	Ž	23	TT	*1/*3	CC/AC
37	Ž	/	TT	*1/*1	CT/AA
38	Ž	26	CT	*1/*1	CT/AC
39	Ž	20	CT	*1/*1	TT/AA
40	Ž	26	CT	*1/*1	CC/AC
41	Ž	23	CT	*1/*1	CT/AC
42	Ž	23	CT	*1/*1	CT/AC
43	Ž	20	CT	*1/*1	CT/AC

44	Ž	20	CT	*1/*1	TT/AA
45	Ž	20	TT	*1/*1	CC/AC
46	Ž	23	CT	*1/*3	CT/AA
47	Ž	24	TT	*1/*1	CC/AC
48	Ž	21	CC	*1/*1	CT/AA
49	Ž	20	TT	*1/*1	CT/AA
50	Ž	26	CC	*1/*1	CT/AA
51	Ž	26	CT	*1/*1	TT/AA
52	Ž	19	CT	*1/*1	CC/CC
53	Ž	20	CC	*1/*3	CT/AA
54	M	26	CC	*1/*1	CT/AA
55	M	25	CT	*1/*1	CT/AC
56	M	21	TT	*1/*1	CC/AA
57	M	26	CC	*1/*3	TT/AA
58	M	21	CT	*1/*1	CT/AA
59	M	24	CT	*1/*1	CT/AA
60	/	21	CT	*1/*1	CC/AA
61	Ž	23	CC	*1/*1	CT/AC
62	M	24	CT	*1/*3	CC/CC
63	M	24	CT	*1/*1	CC/CC
64	Ž	19	CT	*1/*1	CC/AA
65	M	24	CT	*1/*1	CC/CC
66	M	24	CC	*1/*1	CT/AC
67	Ž	24	TT	*1/*1	CC/CC
70	Ž	42	TT	*1/*1	CC/AC
71	/	21	CC	*1/*1	CC/AA
72	Ž	30	TT	*1/*1	CC/AC
73	Ž	31	TT	*1/*1	CT/AC
74	/	40	CC	*1/*1	CT/AC
75	/	36	CT	*1/*1	TT/AA
76	/	35	CT	*1/*1	TT/AA
77	/	39	TT	*1/*1	CC/AC
78	/	43	CT	*1/*1	CC/CC
80	/	37	CT	*1/*1	CT/AC
81	Ž	34	TT	*1/*1	CT/AC
82	/	25	CT	*1/*1	CC/AC
83	/	29	CT	*1/*1	CT/AA
84	Ž	24	CC	*1/*1	CC/AC
85	Ž	32	CT	*1/*1	CC/CC
86	Ž	31	CC	*1/*1	CC/AC
88	/	21	CT	*1/*1	CC/CC
89	/	36	CT	*1/*1	CC/CC

90	Ž	34	CT	*1/*3	CC/CC
91	Ž	33	CT	*1/*1	CT/AC
92	Ž	19	CT	*1/*1	CT/AC
94	M	19	TT	*1/*1	CT/AA
95	Ž	19	CC	*1/*1	CC/CC
96	M	19	TT	*1/*1	CT/AA
97	M	19	CT	*1/*1	CT/AA
99	M	19	TT	*1/*1	CC/AA
100	Ž	19	CC	*1/*3	CT/AC
101	M	19	TT	*1/*1	CC/CC
102	M	18	CC	*1/*1	CC/AC
103	M	19	CT	*1/*1	CT/AA
104	Ž	19	TT	*1/*3	CT/AA
105	Ž	20	CC	*1/*3	CC/CC
106	Ž	19	CC	*1/*3	CT/AA
107	Ž	21	CC	*1/*1	CT/AC
108	Ž	20	CT	*1/*1	CT/AA
109	Ž	19	CT	*1/*1	CC/AC
110	M	21	TT	*1/*1	CT/AC
111	Ž	19	CC	*1/*1	TT/AA
112	Ž	22	CC	*1/*1	CT/AA
114	M	19	CC	*1/*1	CT/AA
115	M	19	CT	*1/*1	CT/AA
116	M	19	CC	*1/*1	CT/AC
117	M	19	CT	*1/*1	CT/AA
118	M	19	CT	*1/*1	CT/AA
119	M	19	CT	*1/*1	CC/AC
121	Ž	19	CC	*1/*3	CT/AA
122	Ž	19	CT	*1/*1	CT/AA
123	Ž	19	TT	*1/*1	CC/AC
124	Ž	20	CC	*1/*1	CT/AA
125	Ž	19	CT	*1/*1	CC/AA
126	Ž	19	CT	*1/*1	CC/AC
127	Ž	19	CC	*1/*1	CC/AC
128	Ž	19	CT	*1/*1	CT/AA
129	Ž	20	TT	*1/*1	CC/AA
130	Ž	/	TT	*1/*1	CT/AC
131	Ž	23	CT	*1/*3	CT/AA
132	M	22	TT	*1/*1	TT/AA
134	M	23	TT	*1/*1	CC/AC
135	M	23	CC	*1/*1	CC/AC
136	Ž	23	CT	*1/*1	CT/AA

137	Ž	24	TT	*1/*1	CT/AC
138	M	23	CT	*1/*1	CT/AA
139	M	23	CT	*1/*1	CC/AC
140	M	23	CT	*1/*1	CT/AA
141	Ž	22	TT	*1/*1	CC/AC
142	Ž	23	CC	*1/*1	TT/AA
145	Ž	22	TT	*1/*1	CC/CC
146	M	23	CT	*1/*1	CC/AA
147	Ž	22	TT	*1/*3	CT/AC
148	Ž	22	CC	*1/*1	TT/AA
149	Ž	23	CT	*1/*1	CT/AC
151	Ž	18	CC	*1/*1	CC/CC
152	Ž	19	CT	*1/*1	CT/AC
153	Ž	19	CT	*1/*1	CT/AA
154	/	/	TT	*1/*1	CC/CC
155	Ž	/	CT	*1/*1	TT/AA
156	Ž	19	CT	*1/*1	CC/AC
158	Ž	19	TT	*1/*1	CC/AA
159	M	20	TT	*1/*1	TT/AA
160	Ž	20	CT	*1/*1	CT/AA
161	Ž	22	CC	*1/*1	CC/AC
162	Ž	20	CC	*1/*1	TT/AA
163	Ž	20	TT	*1/*1	CT7AA
164	M	20	TT	*1/*1	CC/AA
165	M	/	CT	*1/*1	CT/AC
166	M	/	CT	*1/*1	CC/AC
167	M	/	TT	*1/*1	CT/AC
168	M	/	TT	*1/*1	CC/CC
169	M	21	CC	*1/*1	CT/AA
170	M	18	CT	*1/*1	CC/AC
171	M	19	TT	*1/*1	CC/AC
172	M	20	CT	*1/*1	CC/AC
173	M	20	TT	*1/*1	CT/AC
174	M	20	CC	*1/*1	CC/AC
175	M	20	CC	*1/*1	CT/AC
176	M	32	CT	*1/*1	TT/AA
177	Ž	24	CC	*1/*1	CC/CC
178	Ž	24	CC	*1/*1	CC/AA
180	M	20	CT	*1/*1	CC/AA
181	M	21	CT	*1/*3	CT/AA
182	M	19	CT	*1/*1	CT/AA
183	M	20	CC	*1/*1	CT/AA

184	M	20	CT	*1/*1	CT/AA
187	M	29	TT	*1/*1	CC/CC
188	M	20	CT	*1/*1	CC/AC
189	M	23	CC	*1/*1	CT/AC
190	M	21	CT	*1/*1	CC/CC
192	M	23	TT	*1/*1	CC/AC
193	M	20	CT	*1/*1	CC/AA
194	M	20	TT	*1/*1	CC/CC
195	M	19	CT	*1/*1	CC/AC
196	M	21	CT	*1/*1	CC/AC
197	M	20	CT	*1/*1	CC/AA
198	M	20	CC	*1/*1	CT/AC
199	M	21	CC	*1/*1	CT/AA
200	M	22	CC	*1/*1	CT/AC
201	M	22	CT	*1/*3	CT/AC
202	Ž	20	CT	*1/*1	TT/AA
203	M	21	CT	*1/*1	CT/AA
204	M	20	CC	*1/*1	CT/AC
205	M	21	CT	*1/*1	CC/AA
207	M	20	CC	*1/*1	CT/AA
208	M	22	CT	*1/*1	CT/AC
209	M	20	CT	*1/*1	CT/AC
210	M	20	CC	*1/*1	TT/AA
212	Ž	25	CT	*1/*1	CC/AA
213	Ž	20	CT	*1/*1	CT/AA
214	Ž	20	TT	*1/*1	TT/AA
215	M	20	TT	*1/*1	CT/CC
216	Ž	21	CC	*1/*1	CT/AC
217	Ž	28	CT	*1/*1	CC/AC
218	Ž	20	CC	*1/*3	CC/AC
219	Ž	20	TT	*1/*1	CT/AC

Tabela rezultatov: plodovi z NTD

št. vzorca	spol	tedni gestracije	GNMT genotip	TMPT genotip	MTHFR 677/1298 genotip
55/05	Ž	26	TT	*1/*1	CT/AA
60/05	Ž	21	TT	*1/*1	CT/AA
06/04	M	17	CT	*1/*1	CT/AC
202/04	M	21	CC	*1/*1	CT/AA
209/03	Ž	18	TT	*1/*1	CT/AC
89/03	M	15	TT	*1/*1	CT/AC
106/03	Ž	25	CC	*1/*1	CT/AC
12/05	M	15	CT	*1/*1	CT/AA
195/03	Ž	23	CC	*1/*1	CT/AC
53/07	M	22	CT	*1/*1	CT/AC
136/07	M	22	CT	*1/*1	CT/AA
131/09	Ž	30	CT	*1/*1	CT/AC
222/09	M	24	CT	*1/*1	CT/AC
223/08	M	14	TT	*1/*3	CT/AC
61/06	Ž	14	TT	*1/*3	CT/AC
71/07	Ž	14	CC	*1/*1	CT/AA
2/08	Ž	15	TT	*1/*3	CT/AC