

Jméno studenta:
UČO:

MUNI | RECETOX
SCI



Cvičení 10

Stanovení polymorfizmů v *MTHFR* genu

E2050 Laboratorní cvičení z molekulární biologie a mikrobiologie
Mateřský obor: Životní prostředí a zdraví

Vypracovala: Mgr. Natálie Mlčuchová

Garance: doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Jméno studenta:
UČO:

MUNI | RECETOX
SCI

Poznámky studenta

Tato práce/Část práce byla provedena za podpory Výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2023069).

Jméno studenta:
UČO:

Teoretický úvod

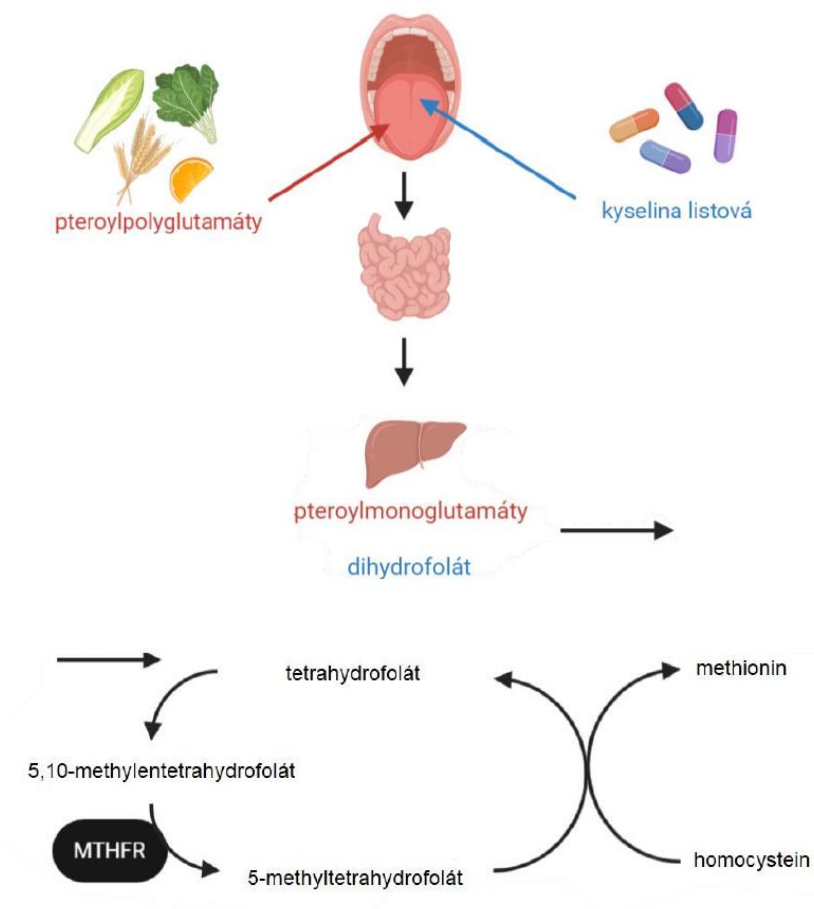
Klíčová slova: *MTHFR*, folát, qPCR, jednonukleotidový polymorfismus, genotyp, haplogenotyp

Foláty a methylenetetrahydrofolát reduktáza

Folát je obecný termín používaný k označení různých chemických forem ve vodě rozpustného vitamínu B9 a jeho derivátů. V některých potravinách, jako jsou například citrusy, luštěniny, játra, kvasnice a listová zelenina, se přirozeně vyskytují foláty ve formě tzv. pteroylpolyglutamátů. Ty jsou ve střevech hydrolyzovány na pteroylmonoglutamáty, které přecházejí do krevního řečiště a jsou konvertovány na tetrahydrofolát. Potravinové doplňky a potraviny uměle obohacené o foláty obsahují nejčastěji **kyselinu pteroyl-monoglutamovou**, známou pod označením **kyselina listová**. Ta musí být nejprve pomocí jaterního enzymu dihydrofolát reduktázy metabolizována na dihydrofolát a až následně na tetrahydrofolát. Metylací tetrahydrofolátu pak vzniká 5,10-methylenetetrahydrofolát, který je zapojen do methioninového cyklu. Redukcí této sloučeniny pomocí klíčového enzymu **methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR)** vzniká aktivní forma folátu, **5-methyltetrahydrofolát**, který slouží v následné reakci jako donor methylové skupiny, která je využita pro remethylaci homocysteinu a vznik esenciální aminokyseliny **methioninu**, viz Obrázek 1.

Onemocnění asociovaná s nedostatkem vitamínu B9 a enzymopatií MTHFR

V případě nedostatku folátů může docházet k rozvoji vrozených vývojových vad, kardiovaskulárních chorob, recidivující aftózní stomatitida, gingivitidy a zubního kazu. Vyšší potřeba bývá u žen, které užívají hormonální antikoncepci.



Obrázek 1: Zjednodušené schéma metabolizace přírodních a syntetických folátů

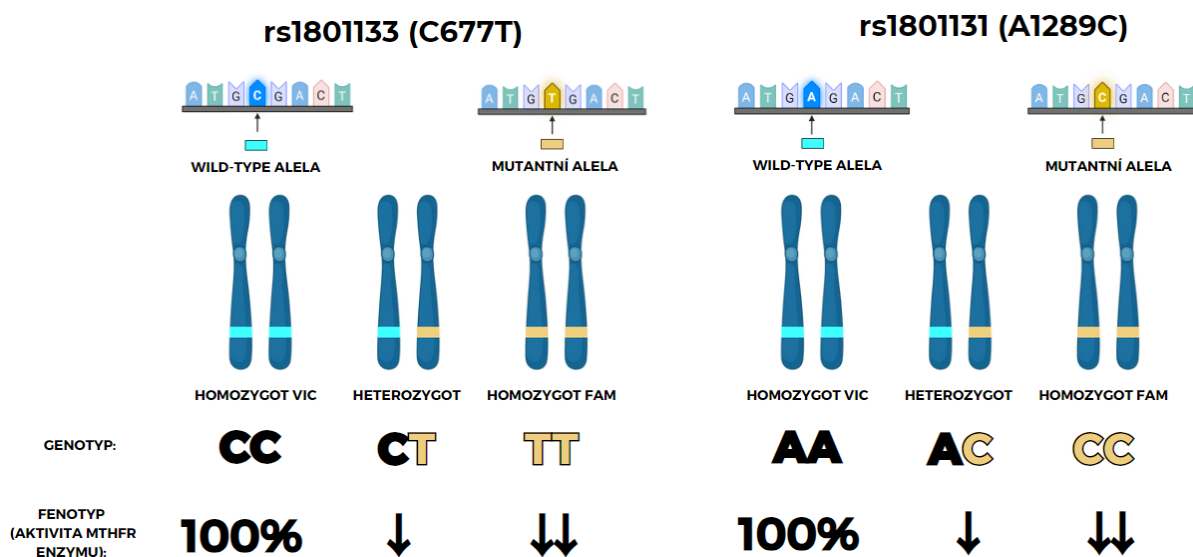
Jméno studenta:
UČO:

Foláty nejsme schopni sami syntetizovat a jsme tedy závislí na jejich příjmu z potravy. Pro dospělé osoby se doporučuje 400 µg ekvivalentu folátu denně, pro těhotné ženy až 600 µg. Typická strava většiny evropských zemí je však, co se týče obsahu folátů, deficitní. Navíc jejich vstřebatelnost ovlivňuje mnoho faktorů, především záleží na formě folátu (syntetické foláty se vstřebávají lépe než přírodní), dlouhodobém užívání některých léků a konzumaci alkoholu. Kromě toho jsou foláty termolabilní a citlivé na světlo. Situaci komplikuje také fakt, že někteří jedinci mají problém s jejich metabolizací.

Variabilita v genu pro MTHFR

Jednonukleotidový polymorfismus (SNP, single nucleotide polymorphism) je genetická varianta, která může být způsobena záměnou (substitucí) jednoho konkrétního nukleotidu na určitém místě v genomu, a jeho výskyt v dané populaci je $\geq 1\%$. Existují dva SNPs – **C677T (rs1801133)** a **A1289C (rs1801131)** v genu kódujícího enzym MTHFR. Protože se oba SNPs nacházejí v tzv. kódující oblasti DNA, mohou mít mutace vliv na výsledný genový produkt, tedy na samotný enzym MTHFR. Oba tyto SNPs jsou spojeny se sníženou enzymatickou aktivitou MTHFR, což negativně působí na přeměnu homocysteinu. V těchto dvou konkrétních případech se jedná o záměnu cytosinu (původní alela) za thymin (mutantní alela) na 677 pozici genu *MTHFR* (C677T) a záměnu adeninu (původní alela) za cytosin (mutantní alela) na 1298 pozici genu *MTHFR* (A1298C). Mutantní alela může vzniknout buď „de novo“ nebo ji můžeme zdědit od svých rodičů.

Každý gen je v diploidní buňce vyjádřen dvěma alelami (konkrétní forma genu), které dohromady tvoří genotyp. Nositelům stejných alel říkáme homozygoti, nositelé různých alel jsou označováni jako heterozygoti. U homozygotů CC (v případě polymorfismu C677T) a AA (v případě polymorfismu A1298C) zůstává enzymová aktivita MTHFR nezměněna. V případě heterozygotů, tedy jedinců, kteří mají jednu alelu mutantní, je enzymová aktivita MTHFR snížena. Homozygoti s oběma mutantními alelami, tedy s genotypem TT (v případě polymorfismu C677T) nebo genotypem CC (v případě polymorfismu A1298C) mívají aktivitu tohoto enzymu redukovanou až o 70 %, viz Obrázek 2. Navíc mají oba polymorfizmy na výsledný fenotyp aditivní efekt. To znamená, že jedinec s kombinací genotypů TT (C677T) a CC (A1298C), tedy haplogenotypem TTCC, má aktivitu enzymu MTHFR nejnižší.



Obrázek 2: Polymorfizmy v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (*MTHFR* C677T; A1298C) a jejich vliv na aktivitu enzymu MTHFR; 100 %, nezměněná funkce enzymu MTHFR; ↓, mírně snížená aktivita enzymu MTHFR; ↓ ↓, velmi snížená aktivita enzymu MTHFR

Jméno studenta:
UČO:

Potřebný materiál

- **reagencie:** FastStart Essential DNA Probes Master (komerční MasterMix), TaqMan® SNP Genotyping Assays (rs1801131, rs1801133), PCR grade voda
- **spotřební materiál:** 2x 1,5 ml zkumavka, 2 bílé stripy, 2 víčka ke stripům, stojánek na zkumavky a stripy, pipety a špičky (10 µl, 100 µl), koš, filtrační papír na stůl
- **přístroje:** spincentrifuga, vortex, LightCycler 480
- vzorek DNA z bukálního stěru, 3 pozitivní kontroly (tzn. homozygot VIC, homozygot FAM a heterozygot) pro oba polymorfizmy

Postup pro práci v laboratoři

1) Výpočet objemů reagensů

Tabulka 1: Reakční směs pro polymorfismus rs1801131

Reagencie – rs1801131	Finální koncentrace	Množství 1 reakce	Množství 9 reakce
FastStart Essential DNA Probes Master (<i>MasterMix</i>)	1x	5 ul	
PCR grade voda	-	3,8 ul	
TaqMan® SNP Genotyping Assays (rs1801131) *	1x	0,2 ul	
Namíchaný MasterMix	-	9 ul	
DNA vzorek	-	1 ul	-
Celkový objem	-	10 ul	-

Tabulka 2: Reakční směs pro polymorfismus rs1801133

Reagencie – rs1801133	Finální koncentrace	Množství 1 reakce	Množství 9 reakce
FastStart Essential DNA Probes Master (<i>MasterMix</i>)	1x	5 ul	
PCR grade voda	-	3,8 ul	
TaqMan® SNP Genotyping Assays (rs1801133) *	1x	0,2 ul	
Namíchaný MasterMix	-	9 ul	
DNA vzorek	-	1 ul	-
Celkový objem	-	10 ul	-

*reagencie již obsahuje DNA polymerázu, forward i reverse primery i dvě specifické sondy (jednu s přítomností jednonukleotidové záměny a druhou bez této záměny; obě sondy jsou značeny specifickým fluoroforem)

Jméno studenta:
UČO:

Tabulka 3: Schéma rozložení vzorků (VZ), pozitivních (PC) a negativních kontrol (NC) ve dvou stripech

		1. strip	2. strip
Číslo Vašeho vzorku		VZ_1	VZ_1
Označení jamek	A	VZ_1	VZ_1
	B	VZ_1	VZ_1
	C	PC_1	PC_1
	D	PC_2	PC_2
	E	PC_3	PC_3
	F	NC_1	NC_1
	G	NC_2	NC_2
	H	NC_3	NC_3
Poslední dvojčíslí polymorfizmu		31	33

2) Příprava reakční směsi a PCR

1. Popište si dvě 1,5 ml zkumavky pro přípravu reakčních směsí, jednu pro polymorfismus **rs1801131** a druhou pro polymorfismus **rs1801133** (na víčko napsat **MM** a poslední dvojčíslí polymorfizmu, tzn. **31** nebo **33**).
2. Popište si horní část bílého stripu dle vašeho **identifikačního čísla** (stejně jako na Vašem vzorku bukálního stěru) a dolní část bílého stripu posledním **dvojčíslem rs čísla** (tzn. na prvním stripu bude 31, na druhém 32) tak, aby bylo možné rozlišit, ve které zkumavce je **rs1801131** reakční směs a ve které je **rs1801133** reakční směs, viz Tabulka 3.
3. Připravte si reakční směs pro amplifikaci genu pro **rs1801131** do 1,5 ml zkumavky. Napipetujte dle Tabulky 1: FastStart Essential DNA Probes Master, PCR grade vodu a TaqMan® SNP Genotyping Assays (**rs1801131**).
Poznámka: Vždy se postupuje v pipetování od reagentie s největším objemem.
4. Připravte si reakční směs pro amplifikaci genu pro **rs1801133** do 1,5 ml zkumavky. Napipetujte dle Tabulky 2: FastStart Essential DNA Probes Master, PCR grade vodu a TaqMan® SNP Genotyping Assays (**rs1801133**).
Poznámka: Vždy se postupuje v pipetování od reagentie s největším objemem.
5. Roztoky v obou zkumavkách lehce promíchejte na vortexu.
6. Zkumavky po promíchání na vortexu bleskově stočte na spincentrifuze.
7. Z takto připravené směsi pro **rs1801131** přeneste 9 µl do každé jamky 1. stripu (popsaný 31).
8. Stejně postupujte u připravené směsi pro **rs1801133**, kdy opět přenesete 9 µl do každé jamky 2. stripu (popsaný 33).
9. Nachystejte si první strip a do jamek A a B přidejte 1 µl Vaší DNA, do jamek C, D a E přidejte 3 různé pozitivní kontroly (opět po 1 µl) a do jamek F, G a H napipetujte po 1 µl PCR-grade vody (slouží jako negativní kontrola).
10. Stejně opakujte u 2. stripu.
11. Stripy důkladně uzavřete průhlednými víčky.
12. Jemně promíchejte na vortexu a stočte po dobu alespoň 30 sekund.
13. Stripy vložte do LightCycler 480 a zapněte vhodný program s následujícím programem, viz Tabulka 4.
14. Po dokončení programu stripy z přístroje vyjměte a vyhodte, vypněte přístroj a uklidte pracovní místo.

Jméno studenta:
UČO:

Tabulka 4: Program pro stanovení polymorfizmů rs1801131 a rs1801133 na přístroji LightCycler

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Preinkubace	95 °C	10 min	1x
Dvoukroková amplifikace	95 °C	15 s	40x
	60 °C	30 s	
Chlazení	37 °C	30 s	1x
	4 °C	Hold	1x

3) Úklid

- Sáček s biologickým odpadem zalepte a vyhoďte do koše určeného na biologický odpad. Dejte nový sáček.
- Pipety otřete ethanolem.
- Pracovní plochu otřete ethanolem. Pokud je špinavý filtrační papír, vyměňte jej.
- Vypněte přístroje (vortex, centrifugu).

Vyhodnocení

Tabulka 5: Jednotlivé haplogenotypy *MTHFR* vzniklé kombinací genotypů obou SNP

SNP	A1298T genotyp AA	A1298T genotyp AC	A1298T genotyp CC
C677T genotyp CC	CCAA 100% aktivita MTHFR	CCAC 80%	CCCC 60%
C677T genotyp CT	CTAA 65%	CTAC 50%	CTCC 30%
C677T genotyp TT	TTAA <30%	TTAC <30%	TTCC <10% aktivita MTHFR

Dle výsledků qPCR vyhodnoťte alely a genotypy pro oba polymorfizmy C677T (rs1801133) a A1289C (rs1801131) v genu *MTHFR*. Následně vytvořte dle Tabulky 1 Váš haplogenotyp a okomentujte, co jste se na základě výsledku dozvěděli o funkci Vašeho jaterního enzymu MTHFR.

1. C677T (rs1801133) – genotyp 1

Alela 1: _____ (vyberte: původní/mutantní)

Alela 2: _____ (vyberte: původní/mutantní)

Genotyp (vytvoříte kombinací alely 1 a 2):

Funkce MTHFR (vyberte): snížená/nezměněná/zvýšená

2. A1289C (rs1801131) – genotyp 2

Alela 1: _____ (vyberte: původní/mutantní)

Alela 2: _____ (vyberte: původní/mutantní)

Genotyp (vytvoříte kombinací alely 1 a 2):

Funkce MTHFR (vyberte): snížená/nezměněná/zvýšená

Jméno studenta:
UČO:

3. Haplogenotyp

Haplogenotyp vytvoříte kombinací genotypu 1 a 2:
Aktivita enzymu MTHFR (vyjádřete v % dle Tabulky 5):
Okomentujte výsledek:

Jméno studenta:
UČO:

Protokol k vyplnění

- 1. Vyberte správné tvrzení o jednonukleotidovém polymorfizmu.**
 - a. Jedná se o genovou variantu, kterou označujeme zkratkou SNP a která se v dané populaci objevuje $\leq 1\%$.
 - b. Jedná se o změnu v konkrétním místě genomu, tzv. inverzi.
 - c. Jedná se o jednonukleotidovou záměnu na konkrétním místě v genomu, jejíž četnost v dané populaci je $\geq 1\%$.

- 2. K čemu slouží methylenetetrahydrofolát reduktáza?**
 - a. Jedná se o transportní protein, který přenáší folát do jater.
 - b. Jedná se o jaterní enzym, který redukuje 5,10-methylenetetrahydrofolát na 5-methyltetrahydrofolát.
 - c. Jedná se o jaterní enzym, který inaktivuje 5,10-methylenetetrahydrofolát.
 - d. Žádná odpověď není správná.

- 3. Jak nazýváme jedince, který je nositelem jedné variantní a druhé původní alely?**
 - a. Heterozygot.
 - b. Homozygot.
 - c. Žádná odpověď není správná.

- 4. Co může způsobit nedostatek folátů v organismu?**
 - a. Anémii.
 - b. Zvýšení rizika kardiovaskulárních chorob.
 - c. Zvýšení rizika vrozené vývojové vady plodu.
 - d. Všechny odpovědi jsou správné.

- 5. Vyberte správné tvrzení.**
 - a. Haplogenotyp se stanovuje pouze u genu *MTHFR*.
 - b. Haplogenotyp se stanoví jako kombinace alespoň dvou genotypů a může mít větší vypovídající hodnotu než samotný genotyp pro určení predikovaného fenotypu.
 - c. Genotyp se stanoví jako kombinace alespoň dvou alel a má větší vypovídající hodnotu než samotný haplogenotyp.