



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ταυτοποίηση πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με
το μεταβολισμό του Φυλλικού οξέος**



ΧΡΥΣΑ Γ. ΚΟΝΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

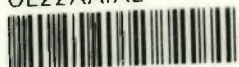
ΛΑΡΙΣΑ 2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7365/1
Ημερ. Εισ.: 20-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΟΝ

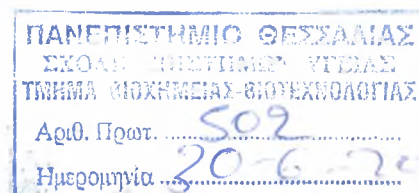
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087214

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη διάρκεια των μηνών Οκτώβριο του 2008 έως Μάιο του 2009. Επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής του Τμήματος κ. Ζήσης Μαμούρης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με το δικό τους τρόπο στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αναθέτοντας μου ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό έργο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Αιμιλία Ζίφα για την παροχή των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τη Λέκτορα κα. Θεολογία Σαραφίδου, τους υποψήφιους Διδάκτορες, Κώστα Σταμάτη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη καθώς και τον Μεταπτυχιακό φοιτητή του τμήματος Θεμιστοκλή Γιαννούλη, για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.



Η τριμελής εξεταστική επιτροπή απαρτίζεται από τους:

κ. Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. *δύτ αυτου 202*

κα. Αικατερίνη Μούτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. *δύτ αυτου 202*

κα. Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. *Σα*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
Περίληψη	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
Πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP)	7
Διατροφογενωμική.....	8
Φυλλικό οξύ.....	9
Φυλλικό οξύ και μεταβολισμός της ομοκυστεΐνης.....	12
Πολυμορφισμοί γονιδίων MTHFR και MTR	13
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	14
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
Υλικά.....	16
Μέθοδοι	17
Απομόνωση γενωμικού DNA	17
Ποσοτικός έλεγχος του γενωμικού DNA	19
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	20
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης.....	23
Τεμαχισμός του DNA με ένζυμα περιορισμού.....	25
Μέθοδος RFLP	26
Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης	28
Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

Περίληψη

Στην εργασία αυτή προσδιορίστηκαν οι συχνότητες πολυμορφισμών των γονιδίων αναγωγή του μεθυλεν-τετραϋδροφυλλικού *MTHFR* και συνθάση της μεθειονίνης *MTR* που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν σε άτομα ελέγχου του ελληνικού πληθυσμού ήταν οι εξής: α) ο C677T του γονιδίου *MTHFR* και β) ο A2756G του γονιδίου *MTR* και η ταυτοποίησή τους έγινε με τη μέθοδο PCR-RFLP. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η συχνότητα των πολυμορφισμών αυτών στον γενικό πληθυσμό, αποτέλεσμα που μελλοντικά θα χρησιμοποιηθεί σε μελέτες πιθανής συσχέτισής τους με μεταβολικές διαταραχές, όπως επίσης και η δυνατότητα της αντιστάθμισης της επίδρασής τους μέσω της σωστής διατροφής, όπως προβλέπεται από τη διατροφογενωμική.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP)

Πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP) είναι η υποκατάσταση μιας μόνο βάσης στην αλληλουχία του DNA. Η συχνότητά του είναι μία φορά ανά 1.000-2.000 νουκλεοτίδια και στην περίπτωση που εντοπίζεται μέσα σε γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μιας, έστω και ελάχιστα, τροποποιημένης πρωτεΐνης ή ενζύμου, γεγονός το οποίο μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη βιοχημεία ή το μεταβολισμό του ατόμου. Πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε ρυθμιστικά στοιχεία που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων, όπως ο υποκινητής, μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών σε σημαντικό βαθμό. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται και σε περιοχές του DNA που δεν αντιστοιχούν σε γονίδια και μάλιστα σ' αυτές τις περιοχές η συχνότητά τους είναι υψηλότερη. Η μελέτη των SNPs έχει πολλές εφαρμογές στην ιατρική και στη βιολογική έρευνα, καθώς τα πολυπαραγοντικά νοσήματα, που είναι και τα πιο συχνά στον πληθυσμό, μπορούν να συσχετιστούν με την εμφάνιση συγκεκριμένων SNPs, τα οποία αυξάνουν την προδιάθεση των ατόμων που τα φέρουν για εμφάνιση των συγκεκριμένων ασθενειών. Έχουν αναπτυχθεί γενετικά τεστ που βασίζονται σε SNPs για τα οποία έχει ταυτοποιηθεί η λειτουργικότητά τους, ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις και καθώς οι αντίστοιχες μελέτες περιορίζονται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς υπάρχουν και τεστ χωρίς ιδιαίτερα μεγάλη κλινική εγκυρότητα στη συσχέτιση με πολυπαραγοντικές νόσους .

Η συμβολή των προγραμμάτων αλληλούχησης του γονιδιώματος του ανθρώπου (HGP, International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, Venter *et al*, 2001) και της ταυτοποίησης των SNPs σε επίπεδο γονιδιώματος, στον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλότητας ήταν καθοριστική. Ο αριθμός των SNPs που έχουν ταυτοποιηθεί ανέρχεται σε περισσότερα από 3 εκατομμύρια (IHGSC, 2004) και σημαντικό μέρος της παγκόσμιας έρευνας στοχεύει στον προσδιορισμό των λειτουργικών SNPs, δηλαδή αυτών που τροποποιούν τα επίπεδα έκφρασης ή τη λειτουργία ενός γονιδίου και στη συσχέτιση συγκεκριμένων SNPs με πολυπαραγοντικές διαταραχές. Οι συσχετίσεις που έχουν ταυτοποιηθεί σε συγκεκριμένους πληθυσμούς μπορεί να οφείλονται είτε σε λειτουργικά αίτια, όπως στο ότι πράγματι η συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αντικατάσταση έχει κάποιο λειτουργικό αποτέλεσμα, το οποίο συμμετέχει στην εκδήλωση του φαινοτύπου, είτε σε φαινόμενο ανισορροπίας σύνδεσης, δηλαδή, της μη τυχαίας συσχέτισης δύο ή

περισσότερων συνδεδεμένων αλληλομόρφων. Στην τελευταία περίπτωση το SNP που ταυτοποιήθηκε δεν είναι πράγματι το λειτουργικό αλλά βρίσκεται πολύ κοντά στο λειτουργικό.

Διατροφογενωμική

Όλοι οι άνθρωποι δεν ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στην ίδια διατροφική αλλαγή και πλέον είναι αποδεκτό ότι η απόκριση σε μια δίαιτα έχει και γενετικό υπόβαθρο (Chavez *et al*, 2003). Η διαφοροποίηση αυτή εξαρτάται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια και εμφανίζουν τροποποιημένη λειτουργικότητα ή διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των ατόμων λόγω πολυμορφισμών στα αντίστοιχα γονίδια και στα ρυθμιστικά στοιχεία τους. Έτσι, η παρουσία διαφορετικών αλληλομόρφων στα άτομα σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό των διαφορετικών γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών, συντελούν στη μεγάλη πολυπλοκότητα και ποικιλότητα της απόκρισης στην ίδια δίαιτα.

Με τον όρο διατροφογενωμική εννοούμε την επιστήμη που ερευνά τον τρόπο με τον οποίο αντιδρούν οι άνθρωποι στις διάφορες τροφές και το ρόλο που παίζουν τα θρεπτικά συστατικά των τροφών που καταναλώνουμε στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων μας, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο αντιδρά ο οργανισμός στα διάφορα θρεπτικά συστατικά ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο. Απώτερος στόχος της διατροφογενωμικής είναι η κατανόηση του συσχετισμού μεταξύ διατροφής, γονιδίων και ασθενειών. Έτσι, για παράδειγμα η παρουσία ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου μπορεί να σχετίζεται με αυξημένες τιμές χοληστερίνης αν καταναλωθούν μεγάλες ποσότητες κορεσμένων λιπαρών οξέων. Επίσης, σε άτομα με μειωμένη ενεργότητα συγκεκριμένου ενζύμου μπορεί να χρειαστεί η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής.

Η επιστήμη αυτή, λοιπόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο επίπεδο της πρόληψης των ασθενειών μέσω διαιτητικής καθοδήγησης σε άτομα που την έχουν ανάγκη και θα ωφεληθούν περισσότερο από αυτή.

Οι διατροφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση κατηγοριοποιούνται σε:

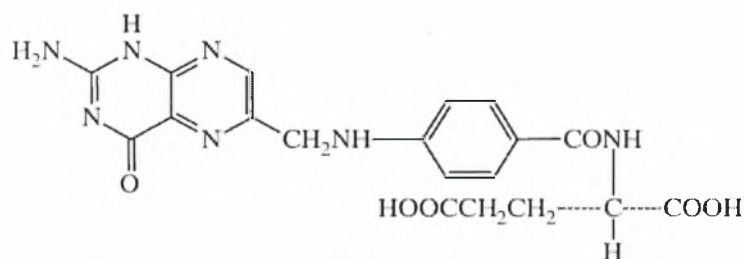
- Θρεπτικά συστατικά

- Μεταβολίτες των θρεπτικών συστατικών που παράγονται κατά το μαγείρεμα
- Παράγωγα μεταβολισμού των εντεροβακτηρίων

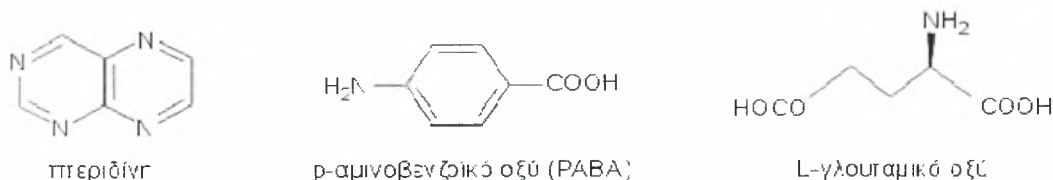
Εκτός από τα οφέλη στη δημόσια υγεία θα υπάρξουν και οικονομικά οφέλη, ιδιαίτερα όταν η αξιοποίηση μιας τέτοιας γνώσης στοχεύει σε νοσήματα ευρέως διαδεδομένα όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η οστεοπόρωση, η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος και για τα οποία το κόστος αντιμετώπισής τους τόσο σε φάρμακα όσο και σε περίθαλψη είναι μεγάλο. Επίσης τα άτομα θα είχαν και οφέλη στον ψυχολογικό τομέα, αφού η συνεχής λήψη φαρμάκων δεν είναι επιθυμητή από τον ασθενή.

Φυλλικό οξύ

Το φυλλικό οξύ (φολικό οξύ ή φολασίνη, Εικόνα 1) είναι ένωση αποτελούμενη από τρία διακριτά τμήματα: ένα υδροξυ-αμινο-παράγωγο της πτεριδίνης, π-αμινοβενζοϊκό οξύ και L-γλουταμικό οξύ (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Φυλλικό οξύ.



Εικόνα 2: Τα 3 βασικά τμήματα του φυλλικού οξέος.

Μια χημική ονομασία του φυλλικού οξέος είναι πτεροϋλο-L-γλουταμικό οξύ (PGA). Είναι η πλέον οξειδωμένη μορφή της κατηγορίας των φυλλικών (ή -σπανιότερα- φολικών) ενώσεων και ανήκει στο σύμπλεγμα των βιταμινών B (βιταμίνη B₉ ή Bc ή M), δηλαδή είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, με ευαισθησία στη

θερμότητα και στο φως και απεκκρίνεται από το σώμα μέσα σε 24 ώρες. Είναι επίσης ένα απαραίτητο συνένζυμο για τη διάσπαση (το μεταβολισμό) και τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Είναι σημαντικό για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, τη σύνθεση, τη λειτουργία και την προστασία του DNA, καθώς για την ανάπτυξη των ιστών και τη λειτουργία των κυττάρων. Επίσης, αυξάνει την όρεξη και ενισχύει το σχηματισμό πεπτικών οξέων (Sharp *et al*, 2004).

Ο μεταβολισμός του φυλλικού οξέος περιλαμβάνει την παρακάτω σειρά αντιδράσεων: φυλλικό οξύ → διυδροφυλλικό (DHF) → τετραϋδροφυλλικό (THF) → μεθυλενοτετραϋδροφυλλικό (μεθυλενο-THF) → μεθυλτεταϋδροφυλλικό (μεθυλ-THF) (Sharp *et al*, 2004). Το φυλλικό οξύ ανάγεται προς διυδροφυλλικό, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται προς τετραϋδροφυλλικό. Το ένζυμο που καταλύει το τελευταίο βήμα είναι η αναγωγή του διυδροφυλλικού. Η βιταμίνη B₃ υπό μορφή NADPH είναι απαραίτητη ως συμπράγοντας και για τα δυο στάδια. Το φυλλικό οξύ και τα ενδιάμεσα παράγωγα του μεταβολισμού του συμμετέχουν στο μεταβολισμό διάφορων αμινοξέων, όπως της σερίνης, της ιστιδίνης, της γλυκίνης και της μεθειονίνης. Συγκεκριμένα, το φυλλικό οξύ με τη μορφή του τετραϋδροφυλλικού (THF) λειτουργεί ως συνένζυμο το οποίο μπορεί να μεταφέρει μεθυλομάδες, μεθυλενομάδες, φορμυλομάδες και φορμινομάδες (Nathan *et al*, 2008). Οι μεθυλομάδες που μεταφέρει το THF προέρχονται από 3 δότες άνθρακα, οι οποίοι είναι η φορμαλδεΰδη, η γλυκίνη και η σερίνη (Sharp *et al*, 2004). Επιπλέον, ο ρόλος του είναι πολύ σημαντικός για τη σύνθεση των βάσεων, των πουρινών και των πυριμιδινών και κατά συνέπεια του DNA. Συγκεκριμένα, κατά τη σύνθεση των πυριμιδινών, το ένζυμο θυμιδική συνθετάση χρησιμοποιεί το τετραϋδροφυλλικό οξύ για να μετατρέψει το dUMP σε dTMP, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA (Nathan *et al*, 2008).

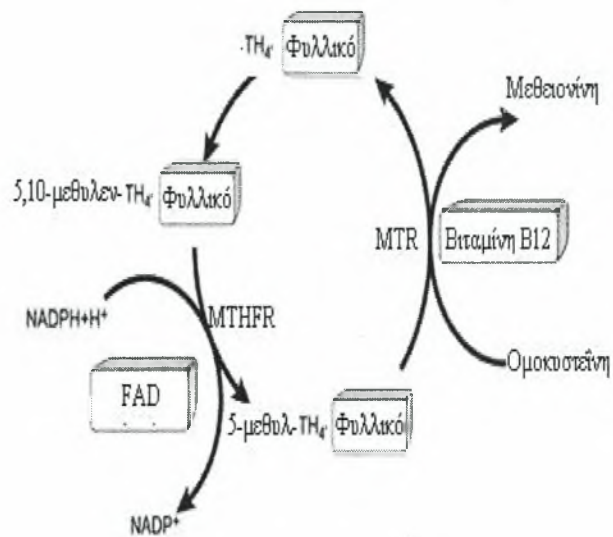
Η λήψη του φυλλικού οξέος από τον άνθρωπο γίνεται κατ' αποκλειστικότητα από τις τροφές, όπως τα λαχανικά, τα φασόλια, τα εσπεριδοειδή, το συκώτι, τα δημητριακά ολικής άλεσης, το σπανάκι, τα γογγύλια, τους χυμούς φρούτων, τα μπιζέλια, τον κρόκο του αυγού, το γάλα και τη μύρα, καθώς δεν παράγεται ενδογενώς από τον οργανισμό (Meshkin *et al*, 2007). Το φυλλικό οξύ συναντάται στις τροφές σε ελεύθερη μορφή ή συνδεδεμένο με μόρια γλουταμικού οξέος. Η απορρόφησή του γίνεται από τα επιφανειακά κύτταρα της τελικής μοίρας του ειλεού (Rasmussen *et al*, 2001). Η ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα φυλλικού οξέος για ενήλικες είναι περίπου 0,4 mg και αυτή πρέπει να αυξάνεται κατά 50% κατά την

εγκυμοσύνη και κατά την περίοδο γαλουχίας. Δεν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή κάποιων κινδύνων σε περιπτώσεις λήψης σχετικά μεγάλων ποσοτήτων φυλλικού οξέος, αν και αναφέρεται ότι πρέπει να αποφεύγεται η λήψη ποσοτήτων μεγαλύτερων από 1 mg ημερησίως. Επίσης αναφέρεται ότι μεγαλύτερες από τις συνιστώμενες ποσότητες μπορούν να εντείνουν τις κρίσεις των επιληπτικών ατόμων (Nathan *et al*, 2008).

Η ανεπάρκεια σε φυλλικό οξύ αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή έλλειψης βιταμίνης Β. Η ανεπάρκειά του σχετίζεται με ανωμαλίες στη σύνθεση του DNA και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του σώματος και ιδιαίτερα τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Το πιο σύνηθες σύμπτωμα είναι η μεγαλοβλαστική αναιμία (Nathan *et al*, 2008). Ακόμη μπορεί να προκαλέσει κατάθλιψη, απώλεια της μνήμης, ανορεξία, διάρροια, ωχρότητα και κόπωση. Επίσης, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς και με την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο πιθανός μηχανισμός είναι ο εξής: η ανεπάρκεια του φυλλικού μειώνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της S-αδενοσυλο μεθειονίνης, ένζυμο το οποίο συμμετέχει στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη. Το γεγονός αυτό μπορεί να τροποποιήσει τη μεθυλίωση της κυτοσίνης στο DNA και συνεπώς να επηρεάσει της δραστηριότητα των πρωτοογκογονιδίων και να επάγει καρκινογένεση. Άλλη μια εκδοχή είναι ότι πρόκειται για αποτέλεσμα ανισορροπίας στα πρόδρομα μόρια του DNA, στην αδυναμία ενσωμάτωσης της ουρακίλης στο DNA και στο χρωμοσωμικό σπάσιμο. Τέλος η ανεπάρκεια των φυλλικών έχει συσχετιστεί και με τη νόσο Αλτςχάιμερ. Τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης του πλάσματος οδηγούν προοδευτικά στη δημιουργία μικρών θρόμβων στον εγκέφαλο (Wickramasinghe, 2006). Οι ανεπάρκειες οφείλονται σε ελαττωμένη απορρόφηση στην τελική μοίρα του ειλεού, με αλλοιώσεις του βλεννογόνου του στομάχου ή του λεπτού εντέρου που μπορεί να προκληθεί είτε λόγω απουσίας του ενδογενούς παράγοντα, είτε από ειλεοεκτομή, ή γαστρεκτομή, ή τοπική εντερίτιδα και παρασιτώσεις (Rasmussen *et al*, 2001).

Φυλλικό οξύ και μεταβολισμός της ομοκυστεΐνης

Ο μεταβολισμός της ομοκυστεΐνης, ενός αμινοξέος που προέρχεται από τη μεθειονίνη της τροφής, ακολουθεί δυο οδούς: αυτή της επαναμεθυλίωσης, στην οποία δρουν τα ένζυμα συνθάση της μεθειονίνης (methionine synthase, MS) το οποίο είναι προϊόν του γονιδίου *MTR* και η αναγωγή του N5,N10-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού (metylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MTHFR*. Η αναγωγή του N5,N10-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού συμμετέχει στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος και μετατρέπει το 5,10 μεθυλεν-τετραϋδροφυλλικό σε 5-μεθυλεν-τετραϋδροφυλλικό. Η μετατροπή αυτή είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης στο αμινοξύ μεθειονίνη, την οποία χρησιμοποιεί ο οργανισμός μας για να συνθέσει τις απαραίτητες πρωτεΐνες και άλλες σημαντικές ενώσεις (Reljic *et al*, 2007). Υπό κανονικές μεταβολικές συνθήκες περίπου το 50% της ομοκυστεΐνης επαναμεθυλιώνεται σε μεθειονίνη.



Εικόνα 3 : Μεταβολισμός φυλλικού και επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης.

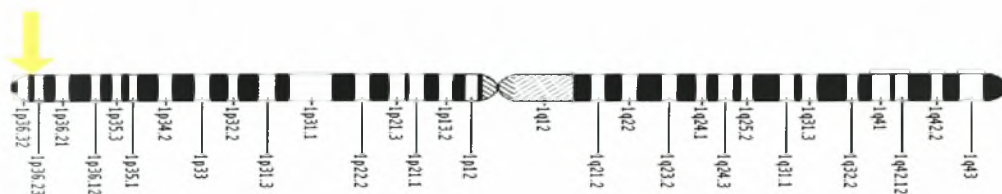
Η δεύτερη οδός είναι εκείνη της διαθειώσης, με τη δράση των ενζύμων β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (cystathionine-β-synthase, CBS) και συμμετοχή της βιταμίνης B₆ (Chen *et al*, 2008). (Εικόνα 3)

Οι φυσιολογικές τιμές της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα είναι 5-15 mmol/l, ενώ η αύξησή της σε επίπεδα 15-39 mmol/l, 30-100 mmol/l και άνω των 100 mmol/l χαρακτηρίζουν, αντίστοιχα, την ήπια, τη μέτρια και τη βαριά υπερομοκυστεϊναιμία.

Ενζυμικές ανεπάρκειες, κυρίως της CBS και της MTHFR, στην ομόζυγη μορφή προκαλούν βαριά και στην ετερόζυγη ήπια-μέτρια υπερομοκυστεϊναιμία, ενώ η παρουσία της θερμοασταθούς μορφής της MTHFR συνδέεται με μέτρια υπερομοκυστεϊναιμία. Η αύξηση της ομοκυστεΐνης έχει συνδεθεί με την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και θρομβοεμβολικών επεισοδίων (Reljic *et al*, 2007).

Πολυμορφισμοί γονιδίων MTHFR και MTR

Το γονίδιο *MTHFR* χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1 στη ζώνη 1p36.3 (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 : Χαρτογράφηση του γονιδίου *MTHFR* στο χρωμόσωμα 1.

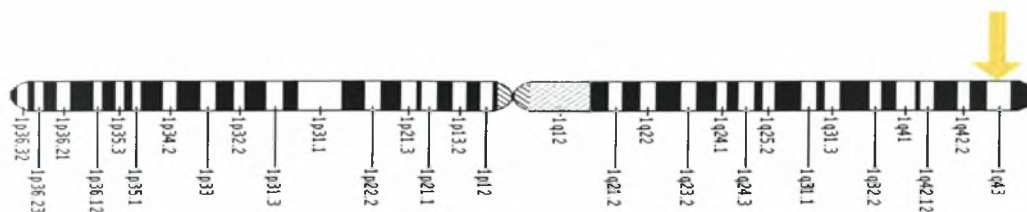
Μεταλλαγές νουκλεοτιδικής αντικατάστασης στο γονίδιο *MTHFR* έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη λειτουργία του ενζύμου και έτσι η ομοκυστεΐνη δεν μετατρέπεται στην απαραίτητη μεθειονίνη, αλλά αποβάλλεται από τα ούρα. Επιπλέον πολυμορφισμοί του *MTHFR* έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση διαβήτη τύπου II (Reljic *et al*, 2007).

Για το *MTHFR* έχουν ταυτοποιηθεί δύο SNPs, τα C677T και A1298C, που οδηγούν σε αντικατάσταση των αμινοξέων A222V και E429A, αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα τα SNPs :

- C677T, εντοπίζεται στο εξόνιο 4 και σχετίζεται με μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου και επίσης με αυξημένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης. Η αντικατάσταση C677T έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων και τη στεφανιαία νόσο και το εγκεφαλικό επεισόδιο σε ενήλικες και με εμφάνιση υψηλής αρτηριακής πίεσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τα άτομα που είναι ομόζυγα για τον πολυμορφισμό (T/T) έχουν χαμηλότερα επίπεδα φυλλικού οξέος στο πλάσμα και επομένως και χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης, δηλαδή παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό υπομεθυλίωσης του DNA σε σχέση με τους ομόζυγους για τον άγριο τύπο (C/C) (Meshkin *et al*, 2007).
- A1298C, εντοπίζεται στο εξόνιο 7, ωστόσο τα αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει ότι τα άτομα με τον πολυμορφισμό αυτό φέρουν στο πλάσμα τους συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης και φυλλικού οξέος σε φυσιολογικά επίπεδα (Meshkin *et al*, 2007).

Το γονίδιο *MTR* χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1 στη ζώνη 1q43 (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Χαρτογράφηση του γονιδίου *MTR* στο χρωμόσωμα 1.

Ο πιο καλά μελετημένος πολυμορφισμός για το γονίδιο *MTR* είναι ο A2756G που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθους λεμφώματος και καρκίνου του παχέος εντέρου. Περισσότεροι από 15 πολυμορφισμοί για το γονίδιο *MTR* έχουν εντοπιστεί σε άτομα με ομοκυστεϊνουρία. Κάποιοι από αυτούς διαταράσσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, όπως η αντικατάσταση της προλίνης από τη λευκίνη στη θέση 1173 (Pro1173Leu). Μειωμένη ενεργότητα της συνθάσης της μεθειονίνης, έχει ως αποτέλεσμα η ομοκυστεϊνη να μην μπορεί να μετατραπεί σε μεθειονίνη και να συσσωρεύεται στο αίμα, ενώ η μεθειονίνη να εξαντλείται. Μέρος της ομοκυστεϊνης εκκρίνεται στα ούρα (Chen *et al*, 2008).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η συχνότητα των πολυμορφισμών C677T, του γονιδίου *MTHFR* και A2756G του γονιδίου *MTR* σε άτομα ελέγχου του ελληνικού πληθυσμού, με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα, τα οποία δεν παρουσίαζαν κλινικά συμπτώματα. Τα αποτελέσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν σε επόμενες μελέτες διατροφογενωμικής ώστε να προσδιοριστεί η πιθανή συσχέτιση των παραπάνω πολυμορφισμών με μεταβολικές διαταραχές καθώς και η δυνατότητα αντιμετώπισής τους μέσω κατάλληλης διατροφικής αγωγής.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Απομόνωση DNA	Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
Πιπέττες ακριβείας (Gilson)	Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
Φιαλίδια erpendorf των 1,5 & 2 ml	Ποσοτικός προσδιορισμό του εξαγόμενου DNA
Στατώ	Πλαστικές κυβέττες φωτομέτρησης οπτικής διαδρομής 10 mm
Πρωτεΐνάση K (10μg/μl)	Φάσματοφωτόμετρο UV-VIS
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	Αντίδραση PCR
Sodium Chloride-Citrate (SSC)	Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer)
Φαινόλη 100%	Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl ₂) 50mM
Χλωροφόρμιο	Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM το καθένα
Ισοαμυλική Αλκοόλη	Εκκινητές (Primers)
Οξικό νάτριο NaOAc 3M, pH 5,2	Taq DNA πολυμεράση 5U/μl
Αιθανόλη 100%	Θερμικοί κυκλοποιητές
Αιθανόλη 70%	Αντίδραση RFLP
ddH ₂ O	Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης (Buffer) ανάλογα για το κάθε ένζυμο 10×
Κυκλικός αναδευτήρας	Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: <i>HaeIII</i> (10units/μl), <i>HinfI</i> (10units/μl)
Ψυχόμενη φυγόκεντρος	Ηλεκτροφόρηση των RFLP σε Πηκτική Πολυακρυλαμίδης
Απαγωγός εστία εργασίας	Ποτήρι ζέσεως των 200ml
Ηλεκτροφόρηση DNA σε Πηκτική (gel) Αγαρόζης	Μαγνήτης ανάδευσης
Κωνική φιάλη των 100 ml	Ογκομετρικοί κύλινδροι των 15 & 100ml
Ογκομετρικός κύλινδρος των 50ml	Χωνί μετάγγισης
Αγαρόζη	Χαρτί διήθησης
TAE 1X	Ουρία
Βρωμιούχο Αιθίδιο 10mg/ml	Ακρυλαμίδη 99%
Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)	Δις-ακρυλαμίδη
Συσκευή παρασκευής του gel	TBE 10X
Φούρνος μικροκυμάτων	Tetramethylethylenediamine (TEMED)

Συσκευή U.V. ακτινοβολίας	Ammonium Persulfate 20% w/v (APS)
Ηλεκτροφόρηση των RFLP σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης (συνέχεια)	Αιθανόλη 100 %
Μάρτυρας μοριακών βαρών των 100bp	Οξικό οξύ
Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης	Νιτρικός άργυρος (AgNO ₃)
Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας	Υδροξείδιο του Νατρίου
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (και τροφοδοτικό)	Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH ₄)
Χρώση νιτρικού αργύρου Silverstaining	Φορμαλδεΰδη (Formaldehyde)
Μεταλλικό δοχείο χρώσης	Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης – Ανακινούμενη πλάκα
Ογκομετρικοί κύλινδροι των 1000 ml	Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
Ποτήρι ζέσεως των 500 ml	Συσκευή προβολής πηκτής πολυακρυλαμίδης
Μαγνήτης ανάδευσης	Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

Μέθοδοι

Δείγματα

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα αίματος από άτομα με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα, χωρίς κλινικά συμπτώματα ή διαταραχές.

Απομόνωση γενωμικού DNA

- **Αρχή της μεθόδου**

Όσον αφορά το ρόλο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο ισχύουν τα εξής: Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και το οποίο χρησιμοποιείται για τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης, καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για

την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου στη συνέχεια έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμμετέχει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και στη συνέχεια η πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA παραμένει αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

Η παρασκευή των διαλυμάτων της απομόνωσης γίνεται ως εξής :

SSC 1x

Sodium Chloride: 150 mM

Sodium Citrate: 15 mM

CH₃COONa 3M pH 5,2

CH₃COONa 24,6 gr

ddH₂O ως τα 100 ml

Ρύθμιση του pH στο 5,2 με διάλυμα υδροχλωρίου

SDS 5% w/v

Sodium dodecyl sulphate 5 gr

ddH₂O ως τα 100 ml

• Πρωτόκολλο

Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε βάσει του κλασικού πρωτοκόλλου επώασης με πρωτεϊνάση K (Budowle, 1990).

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιείται 0,5 ml αίματος και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Τοποθετούμε 0,5 ml αίματος σε σωλήνα eppendorf και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος SSC 1x.
2. Αναδεύουμε έντονα στη συσκευή vortex και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στις 13.000 rpm για 3 min.
3. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος SSC 1x και επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2.

4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και προσθέτουμε 0,5 ml CH_3COONa 0,2M, 50 μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
5. Ακολουθεί επώαση για 1h στους 55°C, όπου ανακινούμε τα δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
6. Προσθέτουμε 0,5 ml διαλύματος φαινόλης και 0,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου και ακολουθεί vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 rpm.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf όπου προσθέτουμε 1 ml χλωροφορμίου και ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
8. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος ισοπροπανόλης.
9. Αναδεύουμε και επωάζουμε τα δείγματα στους -20 °C για 15 min.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στις 13.000 rpm στους 4 °C.
11. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος αιθανόλης 70%.
12. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 13.000 rpm στους 4 °C.
13. Αφαιρούμε το υπερκείμενο πολύ προσεκτικά χωρίς να αγγίζουμε το ίζημα.
14. Στεγνώνουμε τα ιζήματα με επώαση στους 37 °C
15. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100 μl ddH₂O.
16. Το DNA φυλάσσεται στους 4 °C για άμεση χρήση ή στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Ποσοτικός έλεγχος του γενωμικού DNA

Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του δείγματος πραγματοποιείται με φωτομέτρηση και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται μέσω της μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm και 280nm με φασματοφωτόμετρο. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά την αραιώση 1 μl δείγματος DNA σε 49 μl ddH₂O. Η τιμή της απορρόφησης στα 260nm (OD_{260}) αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του DNA στο δείγμα. Η τιμή της απορρόφησης στα 280nm (OD_{280}) μετράει τις προσμίξεις του δείγματος σε πρωτεΐνες. Ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ αποτελεί δείκτη

καθαρότητας του απομονωμένου DNA και πρέπει να έχει τιμές μεταξύ 1,80 – 2,00. Στην περίπτωση που είναι αισθητά μικρότερος το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή φαινόλη και η μέτρηση του DNA δεν είναι ακριβής. Επίσης, η απορρόφηση στα 230nm (OD_{230}) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση οργανικών υπολειμμάτων ή αλάτων και ο λόγος OD_{260}/OD_{230} πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5. Η σύγκριση των λόγων των απορροφήσεων καθώς και η απορρόφηση στα 230nm γίνονται αυτόματα από το φωτόμετρο UV-Vis της Eppendorf και εμφανίζονται αυτόματα στην οθόνη κατά την φωτομέτρηση των δειγμάτων.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR εφαρμόστηκε για την ενίσχυση τμημάτων 355 bp και 198 bp των γονιδίων *MTR* και *MTHFR* αντίστοιχα.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε 3 στάδια-φάσεις και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA στόχου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Έπεται το δεύτερο στάδιο, κατά το οποίο τα δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια υβριδοποιούνται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου, δηλαδή τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός του DNA με τη χρήση θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων, οπότε οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητικών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση γίνεται πάντα με κατεύθυνση 5' → 3'.

Το σύνολο των 3 φάσεων, α) αποδιάταξης, β) υβριδοποίησης των εκκινητών και γ) πολυμερισμού αποτελούν έναν κύκλο της PCR. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση του τμήματος DNA στόχου εκατομμύρια φορές σε λίγες ώρες. Ο βέλτιστος αριθμός των κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από το βέλτιστο μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μη ειδικών προϊόντων. Το κύριο προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95 °C για 30

sec, ο υβριδισμός στους 50-65⁰ C για 1-2 min ανάλογα με τη σύσταση των εκκινητών σε A/T, G/C και ο πολυμερισμός στους 70-78⁰ C για 1-2 min και εξαρτάται από τη βέλτιστη θερμοκρασία της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα



να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 30 sec για αυξομείωση θερμοκρασίας 40⁰C (Εικόνα 6).

Εικόνα 6: Θερμοκυκλοποιητής Eppendorf- Mastercycler S

Για κάθε αντίδραση απαιτούνται: εκμαγείο DNA, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ένζυμο *Taq* πολυμεράση, ιόντα Mg⁺⁺ με τη μορφή MgCl₂, απαραίτητα για την ενζυμική δράση, BSA 100x (Bovine serum albumine) και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8,2 για τη δράση του ενζύμου. Η BSA αυξάνει τη συγκέντρωση της *Taq* DNA πολυμεράσης στην αντίδραση.

Το ένζυμο *Taq* είναι μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους 95⁰C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου, επί 40 τουλάχιστον λεπτά.

Κατά την πραγματοποίηση της PCR, πραγματοποιείται παράλληλα και μια αντίδραση αρνητικού ελέγχου με τη χρήση των ίδιων αντιδραστηρίων πλην του εκμαγείου DNA, ώστε να μπορεί να διαπιστωθεί η ύπαρξη μολύνσεων με DNA σε κάποιο από τα αντιδραστήρια, οι οποίες θα δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην αντίδραση.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων ήταν οι εξής (Diwakar *et al*, 2008):

- Για το *MTR*:

MTR Forward

5'-GTG TTC CCA GCT GTT AGA TGA AA-3'

MTR Reverse

5'-GCA CAG CCC CTA ACA CCT ACT GGG-3'

- Για το *MTHFR*:

MTHFR Forward

5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA -3'

MTHFR Reverse

5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συστατικά PCR.

	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Εκμαγείο DNA	4 μ l (~200ng)	
dNTPs 10mM το καθένα	1 μ l	0,2mM το καθένα
Εκκινητής Fw 50pmol/ μ l	1 μ l	1 pmol/ μ l
Εκκινητής Rw 50pmol/ μ l	1 μ l	1 pmol/ μ l
MgCl ₂ (50mM)	2 μ l	2mM
Buffer 10 \times	5 μ l	1x
BSA 100 \times	0,5 μ l	1x
Taq DNA πολυμεράση 5U/ μ l	0,2 μ l	1Unit
ddH ₂ O	35,3 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος μήκους 355 bp του *MTR* ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη: 95⁰ C για 4 min

Αποδιάταξη: 95⁰ C για 40 sec

Υβριδοποίηση εκκινητών: 57⁰ C για 45 sec

Επιμήκυνση: 72⁰ C για 40 sec

Τελική επιμήκυνση: 72⁰ C για 10 min

} 35 κύκλοι

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος μήκους 152 bp του *MTHFR* ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη: 95 ° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95 ° C για 40 sec

Υβριδοποίηση εκκινητών: 56 ° C για 45 sec

Επιμήκυνση: 72 ° C για 40 sec

Τελική επιμήκυνση: 72 ° C για 10 min

} 35 κύκλοι

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 2%.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης

Ο σκοπός της ηλεκτροφόρησης είναι η ποσοτικοποίηση και ο έλεγχος της ποιότητας των προϊόντων της PCR.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και την απομόνωση τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης. Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης του γενωμικού DNA, όσο και των προϊόντων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της PCR. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα μας δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα του απομονωμένου DNA αλλά επίσης και μία σχετική εκτίμηση της ποσότητας η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται εφόσον συγκριθεί με τον μάρτυρα μοριακών βαρών (ladder) για τον οποίο είναι γνωστές οι ποσότητες κάθε τμήματος DNA του. Όσον αφορά το προϊόν PCR, εκτός από την οπτικοποίηση της ποσότητάς του, εκτιμάμε και το μέγεθός του συγκρίνοντάς το με τον ladder, αλλά και για την καθαρότητά του σε περίπτωση που υπάρχει επιμόλυνση στην αντίδραση αρνητικού ελέγχου.

Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα κομματιών DNA που διαφέρουν τουλάχιστον κατά 50 bp. Επιπλέον, τα τμήματα DNA μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα, καθώς συνδέονται με το βρωμιούχο αιθίδιο, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις και υπό υπεριώδες φως τα καθιστά ορατά. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου είναι της τάξεως των 10ng DNA και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος, καθώς μεγαλύτερα τμήματα δεσμεύουν περισσότερη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από 4 παραμέτρους; α) το μέγεθος του DNA, β) τη συγκέντρωση αγαρόζης, γ) τη στερεοδιάταξη του DNA και δ) την ένταση του ρεύματος. Η κίνηση πραγματοποιείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο γιατί το DNA είναι φορτισμένο αρνητικά.

Η παρασκευή των διαλυμάτων που χρησιμοποιούμε για την ηλεκτροφόρηση γίνεται ως εξής :

TAE 50x (500ml)

Tris base 121 gr

Acetic acid 28,5 ml

EDTA 0,5M 50 ml

ddH₂O ως τα 500 ml

Για την παρασκευή διαλύματος TAE 1x, αραιώνουμε το διάλυμα 50x

(49 όγκοι ddH₂O:1 όγκος TAE 50x)

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1% w/v 1 ml

TBE 10× 1 ml

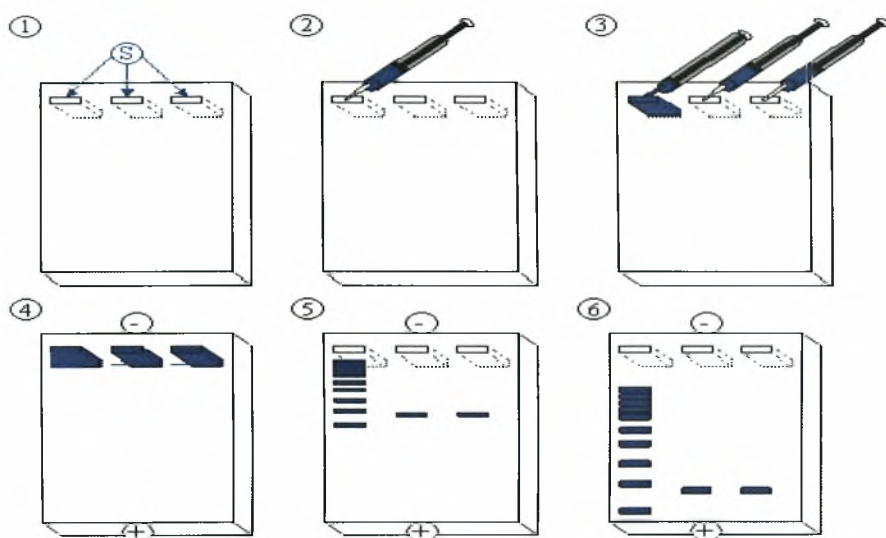
Glycerol 100% 5 ml

ddH₂O ως τα 10 ml

Για την προετοιμασία της πηκτής 2% και βάσει του όγκου του διαλύματος που χρειαζόμαστε, ζυγίζουμε την αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης και την τοποθετούμε σε μια κωνική φιάλη μαζί με τον απαιτούμενο όγκο διαλύματος TAE 1x. Αφού θερμανθούν με ανάδευση κατά διαστήματα και διαλυθεί η αγαρόζη, κρυώνουμε το διάλυμα και προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Τέλος μεταφέρουμε το διάλυμα στο ειδικό καλούπι όπου η πηκτή πολυμερίζεται.

Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν και κυμαίνεται από 0,8-2,5%. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη σε αυτά του loading buffer, το οποίο προσδίδει βάρος στο δείγμα ώστε να είναι εφικτή η τοποθέτησή του στα πηγάδια του πηκτώματος και ο χρωματισμός του ώστε να είναι δυνατή η

παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, σε 5 μl δείγματος προσθέτουμε 3 μl loading buffer. Το loading buffer χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση μεγαλύτερη του 1x ώστε να εξασφαλίσουμε ότι το δείγμα θα αποκτήσει το επιθυμητό βάρος για να μην διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Ταυτόχρονα με τα δείγματα ηλεκτροφορούμε και έναν ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 V, ακολουθεί παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους φωτός και φωτογράφιση.



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αгарόζης. Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος (S) και στη συνέχεια εφαρμόζοντας το κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινούνται με βάση το φορτίο τους (από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο).

Τεμαχισμός του DNA με ένζυμα περιορισμού

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας «ξένο» προς αυτά DNA (π.χ. DNA των φάγων), αναστέλλοντας έτσι την ικανότητά του να μολύνει το βακτηριακό κύτταρο.

Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, όπου υπάρχουν επίσης στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται από τον τεμαχισμό λόγω της μεθυλίωσης μίας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης. Όταν οι αλληλουχίες, που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού, βρίσκονται σε «ξένο» ως προς το βακτήριο DNA, δεν είναι γενικώς μεθυλιωμένες και συνεπώς

τεμαχίζονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Πολλές τέτοιες ενδονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη βακτηρίων, αναγνωρίζουν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και είναι διαθέσιμες εμπορικά.

Η δράση του ενζύμου μετά την αναγνώριση εξαρτάται από τον τύπο του. Υπάρχουν 3 τύποι ενζύμων, τα ένζυμα τύπου I, τύπου II και τύπου III. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα ένζυμα τύπου II, τα οποία αναγνωρίζουν αλληλουχίες μήκους 4-8 βάσεων. Επίσης, είναι ανεξάρτητα από δραστηριότητες μεθυλίωσης και τεμαχίζουν το DNA σε σημεία που βρίσκονται εντός ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Τέλος, χρειάζεται ένα μόνο μόριο ένζυμου τύπου II για τον τεμαχισμό και των 2 κλώνων του DNA (όπως και στην περίπτωση των τύπου III), σε αντίθεση με τα ένζυμα τύπου I, που χρειάζονται 2 μόρια για τον τεμαχισμό και των δύο κλώνων του DNA. Στις κατηγορίες τύπου I και III η δραστηριότητα περιορισμού και μεθυλίωσης διεκπεραιώνεται από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο. Παρ' όλο που αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα ακριβή σημεία που τέμνουν το DNA βρίσκονται σε ποικίλες αποστάσεις από αυτά τα σημεία αναγνώρισης και μπορεί να είναι ακόμα και εκατοντάδες νουκλεοτίδια μακριά.

Οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της πέψης του DNA είναι η ποσότητα του ενζύμου, η καθαρότητα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα πέψης και η σωστή συντήρηση του ενζύμου κατά τη μεταφορά και αποθήκευση. Για τον αποτελεσματικότερο τεμαχισμό, χρησιμοποιείται συνήθως περίσσεια ενζύμου, δηλαδή περισσότερο από 1 unit. Τα units αποτελούν μονάδα ενεργότητας του ενζύμου και 1 unit χρειάζεται για τον τεμαχισμό 1μg DNA. Επιπλέον, επειδή τα ένζυμα περιορισμού φυλάσσονται παρουσία γλυκερόλης, η οποία χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας, ο όγκος του ενζύμου που προστίθεται δεν πρέπει να ξεπερνάει το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, ώστε αυτή να μην αναστέλλεται.

Μέθοδος RFLP

Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό κατά κύριο λόγο των SNPs. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας και της μοριακής ταυτοποίησης διαφόρων οργανισμών. Η ανάλυση RFLP βασίζεται στο ότι τα τμήματα περιορισμού που προκύπτουν από μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση σε

ένα τμήμα DNA εξαρτώνται από την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο και σε περίπτωση που αυτή τροποποιηθεί, το ένζυμο παύει να την αναγνωρίζει και επομένως αλλάζει το πρότυπο τεμαχισμού. Δηλαδή, ο πολυμορφισμός των τμημάτων περιορισμού προκύπτει από τις διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των σημείων αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού μεταξύ διαφορετικών ατόμων ή αλληλομόρφων, που οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού διαφορετικού μεγέθους τα οποία μπορούν να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης μετά από κατάλληλη χρώση. Ένας σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της εφαρμογής RFLP είναι η πλήρης πέψη των τμημάτων DNA που θέλουμε να αναλύσουμε, ώστε τα προϊόντα μερικής πέψης να μην παρεμβαίνουν στη σωστή ανάλυση των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική παρατίθενται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Συστατικά αντίδρασης τεμαχισμού.

Αντιδραστήρια		Ποσότητα	Τελικές συγκεντρώσεις
PCR προϊόν		15 μl	
Buffer 10×		2 μl	1x
Ένζυμο 10u/μl	<i>Hae III</i> (<i>MTR</i>)	0,5 μl	5 units
	<i>Hinf I</i> (<i>MTHFR</i>)		
ddH ₂ O		2,5 μl	-
Τελικός όγκος		20 μl	-

Το ένζυμο *Hae III* αναγνωρίζει και κόβει την ακολουθία 5'...GG[▼]CC...3'
3'...CC[▲]GG...5'

Το ένζυμο *Hinf I* αναγνωρίζει και κόβει την ακολουθία 5'...G[▼]ANTC...3'
3'...C[▲]TNAC...5'

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Η πηκτική πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR τα οποία έχουν υποστεί πέψη με ένζυμα περιορισμού. Η συγκέντρωση της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που αναλύονται και στη μελέτη αυτή ήταν 8%. Για την παρασκευή των πηκτών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% (100ml)

Ακρυλαμίδη 99% 29gr

Δις-ακρυλαμίδη 1gr

ddH₂O ως τα 100ml

TBE 10x (2 lt)

Tris base 216gr

Boric acid 110g

EDTA 0,5M 80 ml

ddH₂O ως τα 2lt

APS 20% w/v (10ml)

Ammonium persulfate 2gr

ddH₂O ως τα 10 ml

TEMED

Για την παρασκευή μίας πηκτής διαστάσεων 20x20cm και πάχους 2mm παρασκευάζονται 62,5ml διαλύματος ακρυλαμίδης 8%. Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml προσθέτουμε 13,3 ml από το διάλυμα ακρυλαμίδης 30%, 6,4 gr ουρίας και 6,25 ml TBE 10x σε 30ml ddH₂O. Στη συνέχεια αναδεύουμε ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουρία και διηθούμε το διάλυμα με τη χρήση διηθητικού χαρτιού. Στη συνέχεια συμπληρώνουμε το διάλυμα με ddH₂O ως τον τελικό όγκο. Τέλος, για τον πολυμερισμό της πηκτής προσθέτουμε 50 μl TEMED και 300 μl APS 20%, αναδεύουμε και την τοποθετούμε στη συσκευή για ~30 min. Μετά τον πολυμερισμό ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε κάθετη συσκευή με χρήση ρυθμιστικού

διαλύματος TBE 1x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε RT, για 3 h περίπου και με τάση 220 volts.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έναντι της ηλεκτροφόρησης σε αгарόζη είναι η μεγαλύτερη ευκρίνεια που παρέχει, καθώς διαχωρίζει αποτελεσματικότερα τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους ακόμη και 20 bp. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, ανιχνεύοντας ποσότητα DNA της τάξεως των λίγων ng.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται προκειμένου να εμφανιστούν τα τμήματα DNA μετά την ηλεκτροφόρηση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και εν συνεχεία αντιδρά με τη φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζώνες του DNA εμφανίζονται σκούρες καφέ πάνω στο κίτρινο πήκτωμα (Sambrook *et al*, 1989). Για τη χρώση με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα 1: αιθανόλη 100% 10 ml
οξικό οξύ 99% 0,5 ml
ddH₂O ως τα 400 ml

Διάλυμα 2: 200 ml διαλύματος AgNO₃ 1gr/lit

Διάλυμα 3: NaOH 3 gr
NaBH₄ 0,01 gr
Formaldehyde 1 ml
ddH₂O ως τα 200 ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200 ml του 1^{ου} διαλύματος και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 στη συνέχεια αποχύνεται και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία. Στη συνέχεια ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1 min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το 2^ο διάλυμα και οι πηκτές αναδεύονται για 15 min. Έπειτα ακολουθούν 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό για 1 min η καθεμία, με σκοπό να απομακρυνθεί εντελώς το διάλυμα του AgNO₃. Στο

τρίτο στάδιο προστίθεται το 3^ο διάλυμα και πραγματοποιείται ανάδευση για 10 min περίπου, μέχρι να εμφανιστούν οι ζωνώσεις του DNA στις πηκτές. Τέλος παρατηρούμε την πηκτή σε φως (light box) για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη αυτή εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-RFLP με σκοπό την ταυτοποίηση των πολυμορφισμών A2756G και C677T στα γονίδια *MTR* και *MTHFR* αντίστοιχα και την εκτίμηση των συχνοτήτων τους στον ελληνικό πληθυσμό.

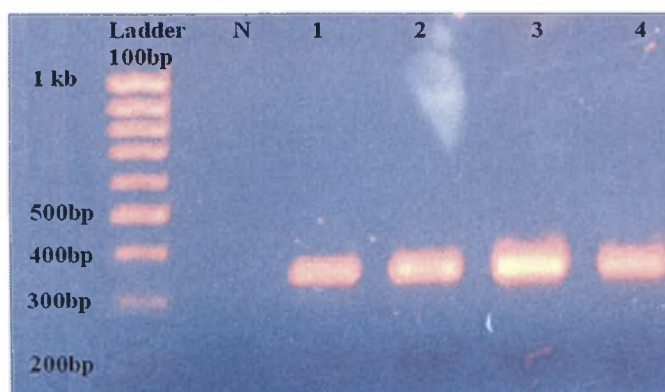
Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από αίμα 50 ατόμων με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα. Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, αντίστοιχα. Η φωτομέτρηση έδειξε ότι η ποσότητα που λήφθηκε ήταν 50-200ng/μl, που είναι αρκετή για την πραγματοποίηση τουλάχιστον 50 αντιδράσεων PCR, δεδομένου ότι σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 100-200ng. Το υλικό αυτό ήταν αρκετά καθαρό, όπως φαίνεται και από το λόγο των απορροφήσεων 260/280nm (~2) και ικανό να δώσει ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έδειξε ότι το γενωμικό DNA ήταν μεγαλομοριακό και χωρίς θραύσματα μικρών μεγεθών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 .

Γενωμικό DNA
mtDNA



Εικ. 1: Απομόνωση DNA. Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πήκτη αγαρόζης (1%) του DNA που απομονώθηκε από δείγματα αίματος.

Με την PCR ενισχύθηκαν τμήματα 355 bp και 198 bp των γονιδίων *MTR* και *MTHFR* αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση, το 10% του τελικού προϊόντος ελέγχονταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



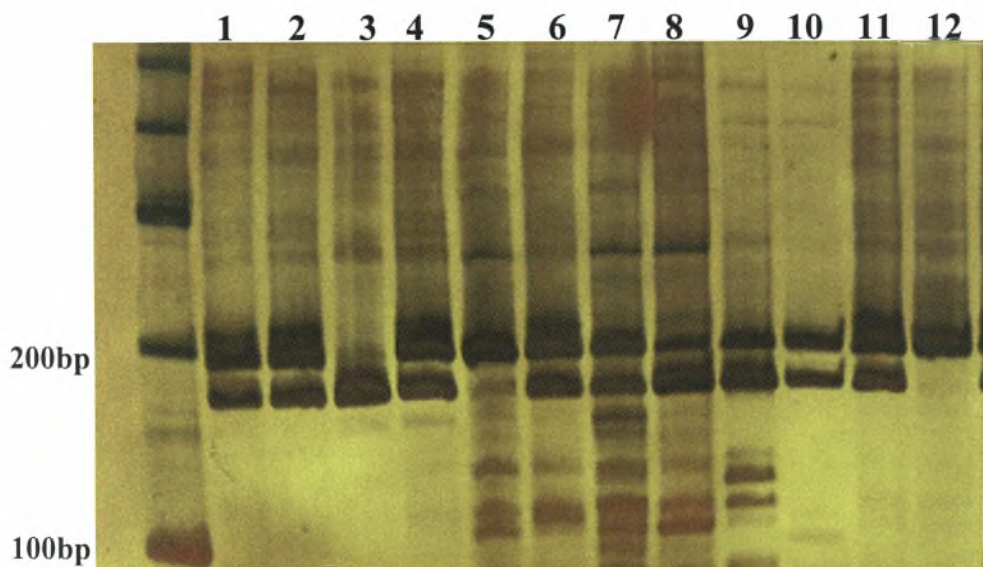
Εικόνα 8: Προϊόντα PCR του γονιδίου *MTR*. Τα δείγματα 1-4 αντιστοιχούν σε τέσσερα άτομα ελέγχου και το N στον αρνητικό έλεγχο της αντίδρασης.

Στη συνέχεια και εφόσον το προϊόν της PCR ήταν ικανοποιητικό, δηλαδή παρουσίαζε μόνο μία ζώνη του αναμενόμενου μεγέθους, χωρίς την εμφάνιση παραπροϊόντων, η ποσότητα ήταν διακριτή με το βρωμιούχο αιθίδιο και ο αρνητικός μάρτυρας δεν εμφάνιζε ζώνες, πραγματοποιήθηκε πέψη με ένζυμα περιορισμού (RFLP), για τη ταυτοποίηση του πολυμορφισμού. Η εφαρμογή της PCR-RFLP στα 50 άτομα ελέγχου έδειξε 2 γονοτύπους για το γονίδιο *MTR* (A/A και A/G) και 3 για το γονίδιο *MTHFR* (C/T, T/T και C/C).

Μετά την πέψη του *MTR* και *MTHFR* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HaeIII* και *HinfI* αντίστοιχα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση.

Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά από τα πρότυπα που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της RFLP για το τμήμα του γονιδίου *MTHFR*. Για τον προσδιορισμό των συχνοτήτων των πολυμορφισμών του συγκεκριμένου τμήματος πραγματοποιήθηκε πέψη με τη χρήση του ενζύμου *HinfI*, το οποίο πέπτει το τμήμα του γονιδίου σε 176 και 22 bp.

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους τα άτομα είναι ετερόζυγα (C/T) για τον πολυμορφισμό. Στη συνέχεια, παρατηρούμε ότι το άτομο 3 είναι ομόζυγο (T/T) και φέρει τον πολυμορφισμό, ενώ το 5^ο άτομο είναι ομόζυγο (C/C) και δεν φέρει τον πολυμορφισμό.

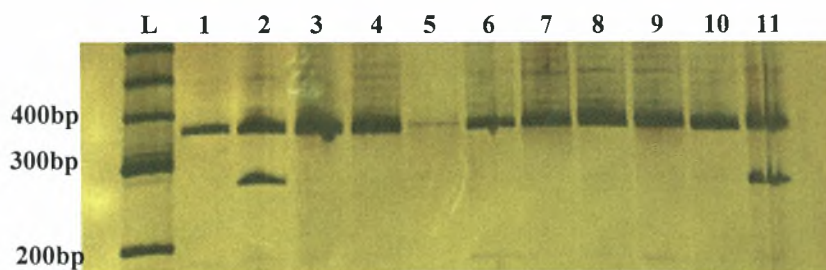


Εικόνα 9: Ανάλυση RFLP του γονιδίου *MTHFR*. Τα δείγματα 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 και 11 είναι ετερόζυγα (C/T), τα δείγματα 5 και 12 είναι ομόζυγα (C/C) και το 3^ο άτομο είναι ομόζυγο για το SNP (T/T).

Στην εικόνα 10 παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά από τα πρότυπα που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της RFLP για το τμήμα των 355 bp του γονιδίου *MTR*. Για τον προσδιορισμό των συχνοτήτων των πολυμορφισμών του συγκεκριμένου τμήματος πραγματοποιήθηκε πέψη με τη χρήση του ενζύμου *HaeIII*, το οποίο πέπτει το τμήμα του γονιδίου σε 274 και 81 bp.

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους τα άτομα είναι ομόζυγα (A/A) για τον πολυμορφισμό. Στη συνέχεια, παρατηρούμε ότι το 2^ο και το 11^ο άτομο είναι ετερόζυγα (A/G), ενώ στη μελέτη δεν βρέθηκαν άτομα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό.

Συγκεκριμένα, για το γονίδιο *MTR*, το 78% του πληθυσμού βρέθηκε να είναι ομόζυγο (A/A) και το 22% να είναι ετερόζυγο (A/G) για τον πολυμορφισμό και για το γονίδιο *MTHFR* 55% του συνολικού πληθυσμού ήταν ετερόζυγοι (C/T), 11% ήταν ομόζυγοι (T/T) και το 34% ήταν ομόζυγοι (C/C).



Εικόνα 10: Ανάλυση RFLP του γονιδίου *MTR*. Τα δείγματα 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 και 10 είναι ομόζυγα (AA) και τα δείγματα 2 και 11 είναι ετερόζυγα (AG).

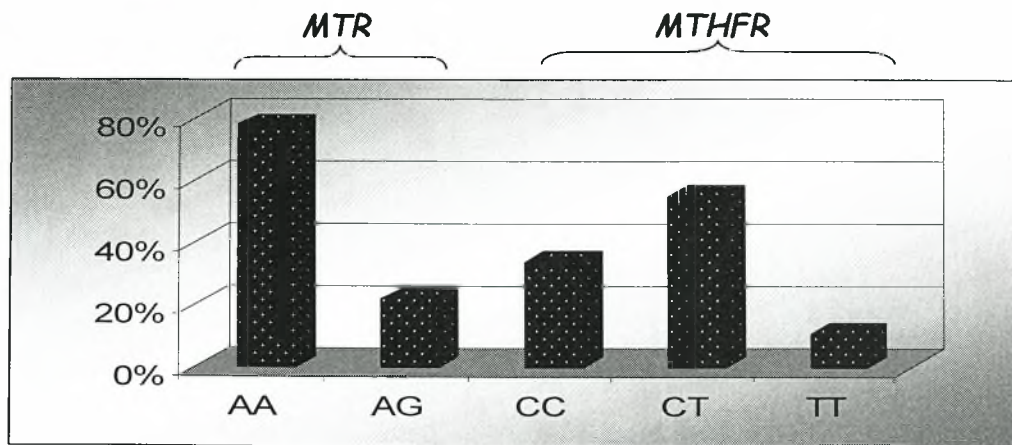
Πίνακας 3: Συνολικά αποτελέσματα για το γονίδιο MTR.

Κωδικός Δείγματος	Γονότυποι	Κωδικός Δείγματος	Γονότυποι
22/02/07: 2	AA	01/03/07: 23	AG
22/02/07: 3	AA	01/03/07: 7	AG
22/02/07: 8	AA	28/02/07: 6	AA
22/02/07: 9	AA	28/02/07: 18	AA
22/02/07: 10	AA	23/02/07: 7	AG
22/02/07: 16	AA	23/02/07: 16	AA
02/02/07: 5	AA	23/02/07: 5	AA
02/02/07: 7	AA	23/02/07: 2	AA
02/02/07: 9	AA	23/02/07: 8	AG
02/02/07: 11	AA	16/02/07: 18	AA
02/02/07: 12	AA	16/02/07: 14	AA
02/02/07: 17	AA	16/02/07: 12	AA
02/02/07: 18	AG	16/02/07: 1	AA
02/02/07: 20	AA	16/02/07: 6	AA
02/02/07: 23	AA	16/02/07: 8	AA
02/02/07: 24	AA	16/02/07: 13	AG
02/02/07: 25	AA	18/02/07: 12	AA
02/02/07: 26	AA	18/02/07: 4	AG
02/02/07: 28	AG	18/02/07: 14	AG
02/02/07: 29	AA	18/02/07: 2	AA
01/03/07: 6	AA	09/10/08: I	AA
01/03/07: 1	AA	09/10/08: II	AG
01/03/07: 16	AA	09/10/08: III	AA
01/03/07: 2	AG	09/10/08: IV	AA
01/03/07: 4	AA	09/10/08: V	AA

Πίνακας 4: Συνολικά αποτελέσματα για το γονίδιο *MTHFR*.

Κωδικός Δείγματος	Γονότυποι	Κωδικός Δείγματος	Γονότυποι
22/02/07: 2	CT	28/02/07: 3	CT
22/02/07: 3	CT	28/02/07: 6	TT
02/02/07: 5	CT	28/02/07: 18	CT
02/02/07: 7	TT	23/02/07: 7	CT
02/02/07: 9	CC	23/02/07: 16	TT
02/02/07: 11	CT	23/02/07: 5	CT
02/02/07: 12	TT	23/02/07: 2	CT
02/02/07: 17	CC	23/02/07: 8	CC
02/02/07: 18	CC	16/02/07: 18	CT
02/02/07: 20	CC	16/02/07: 14	CC
02/02/07: 23	CT	16/02/07: 12	CC
02/02/07: 24	CT	16/02/07: 1	TT
02/02/07: 25	CC	16/02/07: 6	CT
02/02/07: 26	CT	16/02/07: 8	CT
02/02/07: 28	CT	16/02/07: 13	CT
02/02/07: 29	CT	18/02/07: 12	CC
01/03/07: 14	CC	18/02/07: 4	CT
01/03/07: 6	CT	18/02/07: 14	CC
01/03/07: 1	CC	18/02/07: 2	CC
01/03/07: 16	CC	18/02/07: 3	CC
01/03/07: 2	CT	09/10/08: I	CT
01/03/07: 4	CC	09/10/08: II	TT
01/03/07: 23	CT	09/10/08: III	CT
01/03/07: 7	CT	09/10/08: IV	TT
28/02/07: 14	CT	09/10/08: V	CT

Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκεντρώνονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 11: Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *MTR* και *MTHFR*. Στις δύο πρώτες στήλες παρουσιάζονται τα ποσοστά του γονιδίου *MTR* με γονότυπους AA και AG, ενώ στις επόμενες 3 τα ποσοστά του γονιδίου *MTHFR* με γονότυπους CC, CT και TT.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί είναι οι κύριες διαφορές που μας κάνουν να ξεχωρίζουμε, αλλά και να εμφανίζουμε προδιάθεση για κάποια νόσημα. Κάποιοι από τους πολυμορφισμούς αυτούς αλληλεπιδρούν με τη διατροφή και τον τρόπο ζωής επηρεάζοντας έτσι την κατάσταση της υγείας. Η ταυτοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και πολυμορφισμών και ο τρόπος με τον οποίο αυτά επηρεάζουν τον μεταβολισμό συγκεκριμένων τροφών αποτελεί το αντικείμενο έρευνας της διατροφολογίας. Ένα άτομο μπορεί να έχει γονιδιακούς πολυμορφισμούς που να το καθιστούν πιο ευάλωτο σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, αλλά χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά στη διατροφή του, μπορεί να προλάβει την έλευση αυτών.

Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή επηρεάζουν την ομοιόσταση του φυλλικού οξέος στον οργανισμό μας. Επιπλέον, τα επίπεδα αυτά επηρεάζονται και από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως είναι η κατανάλωση του αλκοόλ και το κάπνισμα, οι οποίοι αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη διάφορων τύπων καρκίνου (Reljic *et al*, 2007). Όταν υπάρχει έλλειψη φυλλικού οξέος στον οργανισμό, τότε η ομοκυστεΐνη δεν μπορεί να μετατραπεί προς μεθειονίνη, οπότε η πρώτη αθροίζεται στο αίμα και οι τιμές της αυξάνονται (Van Der Put *et al*, 1997). Η ομοκυστεΐνη είναι ένα θειούχο αμινοξύ, σχηματιζόμενο κατά το μεταβολισμό της μεθειονίνης που προσλαμβάνεται με την τροφή. Τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης του αίματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση καρδιακού εμφράγματος και εγκεφαλικού επεισοδίου καθώς και θρόμβωσης των φλεβών (Shrubsole *et al*, 2006).

Η μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη, η οποία είναι πρόδρομος ουσία που λειτουργεί ως δότης μεθυλομάδας στην S-αδενοσυλ-μεθειονίνη, μπορεί να επηρεαστεί από τους πολυμορφισμούς των 3 ενζύμων-κλειδιά σ' αυτή τη διαδικασία: α) MTHFR, β) MTR και γ) MTRR, το οποίο έχει ως λειτουργία να διατηρεί το MTR σε ενεργή κατάσταση.

Ο πιο συχνός και καλά μελετημένος πολυμορφισμός του γονιδίου *MTHFR* που έχει εντοπιστεί είναι ο C677T (12% στη λευκή φυλή και 13% στον παγκόσμιο πληθυσμό), που τροποποιεί το ένζυμο σε σχέση με τη θερμοευαισθησία του και ο οποίος έχει παρατηρηθεί ότι στην εγκυμοσύνη προκαλεί υπερομοκυστεϊναιμία, που ρυθμίζεται με χορήγηση φυλλικού οξέος. Επιπλέον, οι κλινικές συνέπειες του συγκεκριμένου πολυμορφισμού περιλαμβάνουν αυξημένο κίνδυνο για διάφορες

ασθένειες, όπως αγγειακές, και νευρολογικές και με καρδιαγγειακά νοσήματα (Shrubsole *et al*, 2006, Dedoussis *et al*, 2005).

Τα ετερόζυγα άτομα με γονότυπο C/T εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ τα άτομα που είναι ομόζυγα T/T εμφανίζουν 50% μείωση της δραστηριότητας. Η συχνότητα των ομόζυγων ατόμων εμφανίζεται αυξημένη στους Μεξικανούς, στους Κινέζους και στους Ιταλούς και σε χαμηλότερες στους Δυτικούς Αφρικανούς (Chen *et al*, 2008). Στα άτομα τα οποία φέρουν τον παραπάνω πολυμορφισμό για το γονίδιο *MTHFR* ενισχύεται το διαιτολόγιο τους με δότες μεθυλίου, όπως με B₁₂, B₆, φυλλικό οξύ και τριμεθυλγλυκίνη (Chen *et al*, 2008).

Σε έρευνα που έχει διεξαχθεί στην Ελλάδα, αξιολογήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ της υιοθέτησης μιας μεσογειακής διατροφής και του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου *MTHFR* στις συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στους υγιείς ενήλικους. Άτομα τα οποία τρέφονταν με τροφές πλούσιες σε φυλλικό οξύ παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα τους, σε αντίθεση με άτομα που στερούσαν το διατροφολόγιό τους σε πηγές φυλλικού οξέος. Στην έρευνα επίσης μελετήθηκε ο τρόπος ζωής, οι κλινικές, βιοχημικές και γενετικές πληροφορίες από 322 άνδρες και 252 γυναίκες, που δεν είχαν κανένα κλινικό στοιχείο καρδιαγγειακής ή οποιασδήποτε άλλης πάθησης. Η συχνότητα των γονοτύπων *MTHFR* ήταν η ακόλουθη: ομόζυγα άτομα C/C 41%, ετερόζυγα άτομα C/T 48% και ομόζυγα άτομα T/T 11%. Η συκέντρωση της ομοκυστεΐνης ήταν υψηλότερη στα άτομα με τον γονότυπο T/T απ' ότι σε εκείνους με τους γονότυπους C/C και C/T (Dedoussis *et al*, 2005).

Τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης αυξάνονται όταν υπάρχει ανεπάρκεια φυλλικού οξέος και βιταμίνης B₁₂ (Sharp *et al*, 2004). Τα αυξημένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης του αίματος είναι ένα σύνηθες φαινόμενο στον γενικό πληθυσμό των Δυτικών χωρών. Υπολογίζεται ότι ένας στους τρεις Έλληνες έχει αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης και επομένως εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για καρδιακά και εγκεφαλικά επεισόδια. Υψηλότερες τιμές ομοκυστεΐνης έχουν οι καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, οι άντρες σε σχέση με τις γυναίκες, οι ηλικιωμένοι σε σύγκριση με τους νεότερους και τα άτομα που καταναλώνουν αρκετές ποσότητες οινοπνεύματος και καφέ. Η κύρια όμως αιτία των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης είναι η έλλειψη φυλλικού οξέος στον οργανισμό, κυρίως όταν υπάρχει ανωμαλία ενός ενζύμου που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλλικού. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί

υπολογίστηκε ότι το 11% του ελληνικού πληθυσμού έχουν αυτόν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία με γονότυπο T/T (Dedoussis *et al*, 2005).

Η κλινική σημασία της πολυμορφισμού, όσον αφορά τις καρδιαγγειακές νόσους, έχει αποτελέσει αντικείμενο διχογνωμίας, αν και σε πρόσφατες γενετικές μελέτες υπογραμμίζεται η σημασία του T/T γονοτύπου του ενζύμου MTHFR αναφορικά με τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβοφιλίας. Πάντως οι ομοζυγώτες της μεταλλαγής αυτής εμφανίζουν μετρίως αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, κυρίως σε συνδυασμό με ελαττωμένες τιμές φυλλικού οξέος. Η συχνότητα ανεύρεσης της θερμοασταθούς αυτής μορφής του ενζύμου κυμαίνεται στο 5-10% για την Καυκάσια φυλή, ενώ πρόσφατες μελέτες ανεβάζουν το ποσοστό στο 35% του γενικού πληθυσμού της Βόρειας Αμερικής, με κατανομή 12% ομοζυγωτών και 40-45% ετεροζυγωτών (Sharp *et al*, 2004).

Σχετικές μελέτες έχουν γίνει και σε ομάδες Αμερικανών με έμφραγμα του μυοκαρδίου και σε Καναδούς γαλλικής καταγωγής, ενώ πληθυσμιακές μελέτες έχουν διεξαχθεί και στην Ιαπωνία, Ολλανδία, Νορβηγία, Ιταλία και άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, με μικρές αλλά χαρακτηριστικές διακυμάνσεις στα ποσοστά ανεύρεσης του πολυμορφισμού του ενζύμου. Οι χαμηλότερες συχνότητες (0,5%) βρέθηκαν στους Αφρο- και Ισπανο-αμερικανούς (Botto *et al*, 2000).

Η υπερομοκυστεϊναιμία και οι διαταραχές του νευρικού σωλήνα (NTD) συσχετίζονται με την ανεπαρκή λειτουργία της MS και της MTHFR, που οδηγούν σε συσσώρευση της ομοκυστεΐνης. Η συχνότητα του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου MTHFR σε συνδυασμό με τις διαιτητικές συνήθειες ενός πληθυσμού έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση NTD σε διάφορους πληθυσμούς. Έτσι, στον ολλανδικό πληθυσμό οι ομόζυγοι T/T έχουν 10-16% κίνδυνο για NTD σε σχέση με το 5% της ομάδας ελέγχου (Mornet *et al*, 1997). Αργότερα ταυτοποιήθηκε ένας ακόμη πολυμορφισμός στο MTHFR, ο A1298T, με παρόμοια ποσοστά αύξησης του κίνδυνου για NTD σε περίπτωση ομοζυγωτίας (Mornet *et al*, 1997). Επιπλέον, η αυξημένη συχνότητα της πολυμορφισμού C677T σε γυναίκες με προεκλαμψία, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν και αυτός να αποτελεί γενετικό παράγοντα προδιάθεσης εμφάνισης της προεκλαμψίας (Dekker *et al*, 1995). Τέλος, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση της τρισωμίας 21 (σύνδρομο Down), (Bosco *et al*, 2003).

Το MTR είναι κύριο ένζυμο της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης, των αντιδράσεων μεθυλίωσης και της αναγέννησης THF, που είναι απαραίτητα για τη

βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων. Οι τροποποιήσεις αυτού του ενζύμου επηρεάζουν τη λειτουργία του με σημαντικές επιπτώσεις στη σύνθεση, την επιδιόρθωση και τη μεθυλίωση του DNA. Ο πολυμορφισμός A2756G χαρακτηρίζεται ως επιβλαβής και οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα του αίματος (Diwakar *et al*, 2008). Σε έρευνα που έχει διεξαχθεί στη Νότια Ινδία σε 171 άτομα ηλικίας 15-45 ετών βρέθηκε ότι το 28,65% των ατόμων ήταν ετερόζυγα A/G και το 10,53% ομόζυγα G/G (Diwakar *et al*, 2008). Σε άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη και στην Αμερική βρέθηκε ότι ο γονότυπος G/G αντιστοιχεί σε ποσοστό 3% και 6% αντίστοιχα. Σε Κινέζους, Ιάπωνες και Κορεάτες η συχνότητα του δεδομένου γονότυπου αντιστοιχεί σε 2-3%, ενώ σε έρευνες σε Καναδούς αναφέρθηκαν οι υψηλότερες συχνότητες της τάξης των 10-11% (Sharp, 2004).

Στην μελέτη αυτή, που πραγματοποιήθηκε σε άτομα του ελληνικού πληθυσμού με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό C677T του γονιδίου *MTFHR* ήταν: 55% ετερόζυγα C/T, 11% ομόζυγα T/T και 34% ομόζυγα C/C. Αυτές οι συχνότητες κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με τις ήδη καταγεγραμμένες συχνότητες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για άλλες ομάδες, στις οποίες πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη έρευνα, τόσο στον ελληνικό, όσο και σε άλλους πληθυσμούς.

Για τον πολυμορφισμό A2756G του γονιδίου *MTR* οι συχνότητες των πολυμορφισμών ήταν: 78% ομόζυγα με γονότυπο A/A και 22% ετερόζυγα με γονότυπο A/G. Ομόζυγα άτομα με γονότυπο G/G δεν ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Γενικά, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό, οπότε τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μια πρώτη εκτίμηση για την συχνότητα των γενοτύπων του ελληνικού πληθυσμού.

Εφόσον αυτοί οι πολυμορφισμοί συνδέονται με μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα και με μειωμένα επίπεδα του φυλλικού οξέος στον οργανισμό, πιθανώς θα πρέπει τα άτομα που φέρουν αυτούς τους πολυμορφισμούς να λαμβάνουν το απαραίτητο φυλλικό οξύ, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος για την εμφάνιση διάφορων ασθενειών. Αυτό βέβαια, θα πρέπει να γίνεται συμπληρωματικά με τις αντίστοιχες βιοχημικές εξετάσεις με τις οποίες μπορούν να μετρηθούν τα επίπεδα του φυλλικού οξέος στον οργανισμό. Κατ' αυτές, λαμβάνεται αίμα από το άτομο, το οποίο βρίσκεται προηγουμένως σε νηστεία για 10 με 12 ώρες. Στην εξέταση αυτή

προσδιορίζονται τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης. Σε υγιή άτομα η ομοκυστεΐνη γρήγορα μετατρέπεται σε άλλα προϊόντα.

Η έλλειψη του φυλλικού οξέος αντικαθίσταται είτε από τις τροφές, είτε από διάφορα συμπληρώματα διατροφής, είτε σε εξαιρετικές περιπτώσεις με τη χορήγηση φαρμάκων. Τροφές οι οποίες είναι πλούσιες σε φυλλικό οξύ είναι κυρίως τα πράσινα λαχανικά, όπως το μαρούλι, το μπρόκολο, τα σπανάκια, τα σπαράγγια, το αβοκάντο, οι μπανάνες, τα φιστίκια, τα φασόλια και γενικά τα όσπρια, οι χυμοί των εσπεριδοειδών, οι φράουλες, το ψωμί και τα δημητριακά που είναι εμπλουτισμένα με βιταμίνες καθώς και τα εντόσθια αποτελούν πλούσιες πηγές φυλλικού οξέος. Η λήψη συμπληρωμάτων διατροφής ενδείκνυται κυρίως λόγω της μεγάλης απορρόφησης φυλλικού οξέος από τον οργανισμό που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα σκευάσματα. Όλα αυτά που αναφέρθηκαν για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, για το πώς αυτοί εμπλέκονται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος αλλά και για το πώς η διατροφογενωμική μπορεί να «προλάβει» την πιθανή εμφάνιση κάποιας ασθένειας ανοίγουν νέους δρόμους για την πρόληψη και τη θεραπεία ακόμη και χρόνιων ασθενειών. Η παρούσα μελέτη θα θέσει τη βάση για περαιτέρω έρευνα και μελέτη του συγκεκριμένου θέματος, καθώς τα αποτελέσματα που συγκεντρώθηκαν από αυτή την εργασία θα αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου σε μελέτες που θα γίνουν μετέπειτα σε άτομα με παθολογικές καταστάσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Biselli, J.M., Goloni-Bertollo, E.M., Haddad, R., Eberlin, M.N., Pavarino Bertelli, E.C.,** (2008). The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with Down syndrome, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41: 34-40.
2. **Bosco, P., Gueant-Rodriguez, R., Anello, G., Barone, C., Namour, F., Caraci, F., Romano, A., Romano, C., Gueant, J.,** (2003). Methionine Synthase (MTR) 2756 (A/G) Polymorphism, Double Heterozygosity Methionine Synthase 2756 AG/Methionine Synthase Reductase (MTRR) 66 AG, and Elevated Homocysteinemia Are Three Risk Factors for Having a Child With Down Syndrome, *American Journal of Medical Genetics* 121A:219-224.
3. **Botto, LD., Yang Q.,** (2000). Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 151: 862-877. 44.
4. **Budwole, B., Allen, RC.,** (1990). Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments, *Molecular Biology in Medicine*, Volume 7
5. **Caulfield, T.,** (2009). Nutrigenomics Patents and Commercialization: Old Wine in a New Bottle?, *Review*, Volume 13, Number 1.
6. **Chavez, A., Munoz de Chavez, M.** (2003). Nutrigenomics in public health nutrition: short-term perspectives. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57 (Suppl.1) 97-100.
7. **Chen, M., Laurent Peyrin-Biroulet, L., Xia, B., Guéant-Rodriguez, R., Jean-Pierre Bronowicki, J.P., Marc-André Bigard, M.A., Guéant J.,** (Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China, *BMC Medical Genetics* 2008, 9:78
8. **Dedoussis, GV., Panagiotakos, DB., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Skoumas, J., Choumerianou, D., Stefanidis, C.,** (2005) ATTICA Study Group. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol*, 100: 409- 414.
9. **Diwakar, L., Kumar, R., Bachnalkar, A., Ravindranath, V., Christopher, R., Nagaraja, D.,** (2008). The influence of MTR A2756G polymorphism on

- plasma homocysteine in young south Indians, *Clinica Chimica Acta* 395, 172-174.
10. **Ferguson, L.R.**, (2009). *Nutrigenomics Approaches to Functional Foods*, Journal of the American Dietetic Association.
 11. **Finnell, R.H., Shaw, G.M., Lammer, E.J., Brandl, K.L., Carmichael, S.L., Rosenquist, T.H.** (2004). Gene-nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis, *Toxicology and Applied Pharmacology* 198, 75-85.
 12. **Meshkin, B., Blum, K.**, (2007). Folate Nutrigenetics: A Convergence of Dietary Folate Metabolism, Folic Acid Supplementation, and Folate Antagonist Pharmacogenetics, *Drug Metabolism Letters*. 1, 55-60.
 13. **Mornet, E., Muller, F., Lenvoisé-Furet, A., Delezoide, AL., Col, JY., Simon-Bouy, B., Serre, JL.**, (1997). Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with NTD, *Biochemical and Life Sciences*, Volume 100, Number 5-6.
 14. **Morton, N.**, (2005) Linkage disequilibrium maps and association mapping, *The Journal of Clinical Investigation*. 115(6): 1425-1430.
 15. **Nathan, D.G., Oski, F.A.**, (2008). *Hematology of infancy and childhood* (5th edition). Megaloblastic anemia.
 16. **Ozdemir, V., Motulsky, A.G., Kolker, E., Godard, B.**, (2009). *Genome-Environment Interactions and Prospective Technology Assessment: Evolution from Pharmacogenomics to Nutrigenomics and Ecogenomics*, Volume 13, Number 1.
 17. **Rasmussen, S.A., Fernhoff, P.M., Scanlon, K.S.**, (2001). Vitamin B12 deficiency in children and adolescents. *J Pediatr* 138:10-17.
 18. **Reljic, A., Simundic, A., Topic, E., Nikolac, N., Justinic, D., Stefanovic M.**, (2007). The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and cancer risk: The Croatian case-control study, *Clinical Biochemistry* 40 981-985.
 19. **Sciona, J.F.**, (2008). *Your Personalized Mycelif Integrated Genetic, Nutrition and lifestyle analysis*.
 20. **Sharp, L., Little, J.**, (2004). Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review Volume 159, Number 5.

21. **Shrubsole, M.J., Gao, Yu-T., Cai, Q., Xiao Ou Shu, Qi Dai, Fan Jin, Wei Zheng** (2006). MTR and MTRR Polymorphisms, Dietary Intake, and Breast Cancer Risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 15(3).
22. **Sutton, K.H.**, (2007). Nutrigenomics New Zealand: Considerations for the successful development and launch of personalised nutrigenomic foods. *Mutation Research* 622, 117-121.
23. **Van Der Put, N., Van Der Molen, E., Klui Jtmans, L., Heil, S., Trijbels, J., Eskesi, T., Van Oppenraaij-Emmerzaal, D., Banerjee, R., Blom, H.**, (1997). Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease, *Q J Med*, 90:511-517.
24. **Wickramasinghe, S.N.**, (2006). Diagnosis of megaloblastic anaemias. *Blood reviews* volume 20, issue 6.

