

DNA-MTHFR genotyp, Taqman alleldiskriminering

Gäller för
Klinisk kemi

LU

B-DNA MTHFR genotyp 7900 HT, LUND

Bakgrund, indikation och tolkning

Mild hyperhomocysteinemi har identifierats som en riskfaktor både för arteriell och venös trombosjukdom och anses öka risken för neurologiska skador. En av de vanligaste orsakerna till hyperhomocysteinemi är en mutation i genen för metylentetrahydrofolatreduktas (MTHFR), ett enzym som ingår i metionin-metabolismen. Hyperhomocysteinemi delas normalt in i tre olika typer: svår (>100 µmol/L), moderat (30-100 µmol/L) och mild (15-30 µmol/L). Det finns många olika förvärvade eller genetiska orsaker till hyperhomocysteinemi. Förvärvade orsaker är brist på någon av de essentiella kofaktorerna, folat, vitamin B₁₂, och vitamin B₆. En av de vanligaste genetiska orsakerna till mild hyperhomocysteinemi är den mutation som traditionellt har kallats "677 C>T mutationen" i litteraturen (HGVS-nomenklatur MTHFR:c.665C>T, p.Ala222Val) (**tabell 1**). Denna mutation leder till en termolabil variant av enzymet, som i homozygot form ger upphov till en 50% reduktion av aktiviteten. Cirka 10% av normalbefolkningen är homozygota för T-allelen och ca 33% är heterozygoter.

Ytterligare en vanlig MTHFR-variant "1298 A>C" (HGVS-nomenklatur c.1286A>C, p.Glu429Ala) upptäcktes senare (**tabell 1**). Homozygoter för 1298 C/C utan 677 mutationen har normal P-HCy och till synes normal folatomsättning. Individer som är dubbelheterozygoter, dvs 677 C/T + 1298 A/C, har samma funktionsnivå på MTHFR-enzymet, och liknande P-HCy nivåer som 677 T/T homozygoter (**tabell 2**). MTHFR "677 T-allelen" och C/T, A/C genotypen är vanligare hos nyfödda med neuralrörsdefekter än hos friska. Dessa 2 mutationer har ej återfunnits på samma allel (i cis) hos nyfödda eller vuxna, men 3 eller fyra mutationer har påvisats hos foster. Detta tolkas som bevis för en dödlig effekt av 3 eller 4 mutationer.

Tabell 1. Spårbarhet för MTHFR

Gen	Nomenklatur	dbSNP rs-nr	Referenssekvens
MTHFR	c.677C>T		Vedertagen nomenklatur men sannolikt felannoterat och ej spårbart till referenssekvens
	c.665C>T	rs1801133	NM_005957.4
	g.14783C>T		NG_013351.1
	p.Ala222Val		NP_005948.3
MTHFR	c.1298A>C p.Glu428Ala		Vedertagen nomenklatur men sannolikt felannoterat och ej spårbart till referenssekvens
	c.1286A>C	rs1801131	NM_005957.4
	g.16685A>C		NG_013351.1
	p.Glu429Ala		NP_005948.3

Inte alla homozygota (677T/T) eller komponent heterozygota (677C/T, 1298 A/C) individer uppvisar förhöjda plasmahomocysteinnivåer, vilket tyder på att andra faktorer har betydelse för utvecklandet av hyperhomocysteinemi. Man har bl.a. observerat att hyperhomocysteinemi hos individer som är

DNA-MTHFR genotyp, Taqman alleldiskrimineringGäller för
Klinisk kemi

LU

homozygota för T-allelen kan korrigeras genom extra tillskott av folsyra. Flera epidemiologiska undersökningar har visat att mild och moderat hyperhomocysteinemi är en riskfaktor för arteriell och venös trombosjukdom. De kliniska resultaten är dock inte entydiga om förekomst av två MTHFR mutationsalleler är en oberoende riskfaktor för trombosjukdom eller ej. Olika studier har visat att MTHFR genotypen kan interagera med andra gendefekter som orsakar venös trombosjukdom.

Tabell 2. Tolkning

MTHFR genotyp	Kommentar
MTHFR 677 C/C MTHFR 1298 A/A	Normal genotyp med avseende på MTHFR 677 och 1298 polymorfism.
MTHFR 677 C/C MTHFR 1298 A/C	Inga hållpunkter för temolabilt MTHFR. Heterozygoti för MTHFR 1298 A-C anses sakna klinisk betydelse.
MTHFR 677 C/T MTHFR 1298 A/A	Heterozygot för termolabilt MTHFR, liksom 33% av befolkningen. Detta medför risk för mild homocysteinemi och lätt ökat folatbehov.
MTHFR 677 C/T MTHFR 1298 A/C	Bärare av 2 variant alleler vilka tillsammans kan medföra homocysteinemi och ökat folatbehov.
MTHFR 677 C/C MTHFR 1298 C/C	Homozygoti för MTHFR 1298 A-C mutationen utan känd klinisk relevans.
MTHFR 677 T/T MTHFR 1298 A/A	Homozygoti för temolabilt MTHFR (ALA222VAL), vilket kan medföra homocysteinemi och ökat folatbehov.

Denna analys påvisar MTHFR: c.665C>T (vedertagen felaktig nomenklatur c.677C>T) samt MTHFR: c.1286A>C (vedertagen felaktig nomenklatur c.1298A>C).

Analysprincip

Metoden bygger på en PCR-reaktion där en specifik del av det genomiska DNA:t amplifieras. Dessutom ingår en hybridisering med en TaqMan probe som är komplementär till det sekvensavsnitt där den aktuella punktmutationen finns. Två olika prober finns – en för WT-allelen och en för den muterade allelen. Proberna binder mellan inbindningsställena för forward- och revers-primer - på DNA-templatet och är märkta med olika fluorescerande "reporter"- färg för respektive allel (ex. VIC™ eller FAM™) och en quencher som släcker fluorescensen hos en intakt probe. Under PCR-reaktionen i extensionssteget, degraderar Taq DNA- polymeraset proben, vilket gör att reporterfärgen frigörs och en ökad fluorescens kan mätas.

Referensintervall

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

DNA-MTHFR genotyp, Taqman alleldiskrimineringGäller för
Klinisk kemi

LU

Metodkaraktistika**Interferenser och felkällor**

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer ger detta förändrad signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. I valideringen har potentiella primerinterferenser värderats med hjälp av bioinformatik. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustering i mjukvaran.

Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för wild type (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av primers F och R samt detekteras med reporter 1 respektive 2 enligt nedan under rubrik Reagens.

Detektionsgräns

10 ng patient-DNA används i reaktionen. Nedre detektionsgräns har ej fastställts.

Mätosäkerhet

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till dessa sekvenser.

Gen	NCBI RefSeq
MTHFR	NM_005957.4
	NG_013351.1
	NP_005948.3

Imprecision

Se separat metodvalidering.

Ackrediterings-CV är ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Riktighet

Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvens, genom jämförelse mot annan validerad metod samt genom deltagande i Equalis externa kontrollprogram.

MTHFR 677 C>T

7 prover analyserades parallellt med tidigare använd RFLP-metod under perioden juli – aug 2003 med samstämmiga resultat. 96 tidigare körda prover plockades och analyserades på 7900HT. Se pärm Validering av analyser på 7900 HT.

MTHFR 1298 A>C

7 prover analyserades parallellt med tidigare använd RFLP-metod under perioden juli – aug 2003 med samstämmiga resultat. 96 tidigare körda prover plockades och analyserades på 7900HT. Se pärm Validering av analyser på 7900 HT.

Ackreditering

Metoden är ackrediterad. Införd i rutin 2003-11-04.

DNA-MTHFR genotyp, Taqman alleldiskriminering

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Referenser

1. Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., Duncan, A. M. V., Rosenblatt, D. S., Matthews, R. G. and Rozen, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics* 1994; 7: 195-200. (Errata in *Nature Genetics* 1994; 7: 551).
2. Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J. H., den Heijers, M., Kluijtmans, L. A. J., van den Heuvel, L. P. and Rozen, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1997; 10: 111-113.
3. Rozen, R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: Deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 523-526.
4. OMIM *236250, www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
5. Gene Bank accession numbers AF105980 (exon 4, incomplete) and AF105983 (exon 7).
6. MTHFR Expaty (SwissProt) P42898
A22V = 677 C-T dbSNP rs1801133
E428A = 1298 A-C dbSNP rs 1801131