

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Hana Zahradníková

Folát a jeho role v časném embryonálním vývoji vyšších obratlovců

Folate and its role in early embryonic development of higher
vertebrates

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. za cenné rady a čas, který mně a této práci věnovala. Poděkovat bych také chtěla svým rodičům za jejich nekonečnou podporu, péči a trpělivost.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.05.2020

Hana Zahradníková

Abstrakt

Folát neboli vitamín B9 je ve vodě rozpustná esenciální živina uplatňující se v důležitých buněčných procesech, mezi něž patří metabolismus aminokyselin, methylace a syntéza nukleotidů. Poslední dva z těchto procesů hrají klíčovou roli v časném embryonálním vývoji. Před téměř 30 lety bylo potvrzeno, že suplementace kyselinou listovou pomáhá předcházet defektům nervové trubice embrya a od té doby je ženám v reprodukčním věku obecně doporučováno přijímat 400 µg folátu denně. Navzdory tomu je ale deficit folátu poměrně častým jevem a v těhotenství může vést ke vzniku vrozených vývojových vad a těhotenských komplikací. Tato práce shrnuje nejnovější poznatky o asociaci defektů nervové trubice a potratů s bodovými polymorfismy v genech kódujících enzymy metabolismu folátu u člověka, přičemž je zaměřena především na gen pro enzym 5,10-methylentetrahydrofolát reduktázu (MTHFR). Dále se tato práce věnuje i potenciálním mechanismům protektivního účinku folátu, jež by se mohly uplatňovat v prevenci defektů nervové trubice a jsou studovány převážně na modelových organismech.

Klíčová slova: folát, embryo, defekty nervové trubice, MTHFR, homocystein, potrat, bodové polymorfismy

Abstract

Folate or vitamin B9 is an essential water-soluble nutrient that takes part in important cellular processes. These include amino acid metabolism, methylation, and nucleotide synthesis, the last two of which play a key role in early embryonic development. It was approximately 30 years ago when folic acid supplementation was confirmed to help prevent embryonic neural tube defects and since then an intake of 400 µg of folate a day has been recommended to all women of childbearing age. Despite this, folate deficiency is a relatively common phenomenon and during pregnancy can lead to congenital malformations and pregnancy complications. This bachelor thesis summarizes the latest findings on the association of neural tube defects and miscarriages with single-nucleotide polymorphisms in genes encoding folate metabolism enzymes in humans, focusing mainly on the gene encoding the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Furthermore, this thesis deals with potential mechanisms of the folate's protective effect which could participate in the prevention of neural tube defects and are studied mainly on model organisms.

Key words: folate, embryo, neural tube defects, MTHFR, homocysteine, miscarriage, single-nucleotide polymorphisms

Seznam zkratek

1C	one-carbon jednouhlíkový
5-MeTHF	5-methyltetrahydrofolate 5-methyltetrahydrofolát
5,10-methylenTHF	5,10-methylenetetrahydrofolate 5,10-methylenetetrahydrofolát
CpG	5' – cytosine – phosphate – guanine – 3' 5' – cytosin – fosfát – guanin – 3'
DHF	dihydrofolate dihydrofolát
DHFR	dihydrofolate reductase dihydrofolát reduktáza
DNA	deoxyribonucleic acid deoxyribonukleová kyselina
Dnmt3	DNA methyltransferase 3 DNA methyltransferáza 3
FMN	flavine mononucleotide flavinmononukleotid
Folbp1	folate binding protein 1 protein vážící folát 1
FOLR1	folate receptor 1 folátový receptor 1
formyl-THF	formyltetrahydrofolate formyltetrahydrofolát
MS = MTR	methionine synthase methionin syntáza
MT	methyltransferase methyltransferáza

MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 methylenetetrahydrofolát dehydrogenáza 1
<i>Mthfd1S</i>	part of a gene encoding synthetase domain of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 část genu kódující syntetázovou doménu methylenetetrahydrofolát dehydrogenázy 1
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase methylenetetrahydrofolát reduktáza
MTRR	methionine synthase reductase reduktáza methionin syntázy
NMDA	N-methyl-D-aspartate N-methyl-D-aspartát
<i>Pax3</i>	paired box (gene)
RFC	reduced folate carrier přenašeč redukovaného folátu
rs číslo	reference SNP ID number referenční identifikační číslo SNP
SAH	S-adenosylhomocysteine S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionine S-adenosylmethionin
SHMT	serine hydroxymethyltransferase serin hydroxymethyltransferáza
SNP(s)	single-nucleotide polymorphism(s) bodové polymorfismy
<i>SOX18</i>	sex determining region Y-related high mobility group-box 18 (gene)
THF	tetrahydrofolate tetrahydrofolát
UTR	untranslated region nepřekládaná oblast

wt

wild-type

divoký (nemutovaný) typ

*pojem hyperhomocysteinémie je v této práci používán jako synonymum pro zvýšenou hladinu homocysteinu v krvi – není zde definován konkrétními hodnotami

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Kyselina listová vs. folát	2
3	Funkce folátu v organismu.....	3
3.1	Metabolismus folátu.....	3
3.2	Nedostatek folátu	4
4	Suplementy a fortifikace potravin kyselinou listovou.....	5
5	Genetické polymorfismy spojené s metabolismem folátu	7
5.1	MTHFR.....	7
5.1.1	Asociace s potraty.....	10
5.1.2	Asociace s defekty nervové trubice a další polymorfismy	13
6	Mechanismy prevence defektů nervové trubice pomocí folátu.....	17
6.1	Zajištění vstupu dostatečného množství folátu do buněk	17
6.2	Umožnění syntézy nukleotidů v potřebné míře	19
6.3	Snížení hladiny homocysteinu v krvi.....	20
6.4	Dostupnost methylových skupin pro methylační reakce	22
6.4.1	Methylace proteinů	22
6.4.2	Methylace DNA.....	23
7	Závěr.....	24
8	Seznam literatury.....	25

1 Úvod

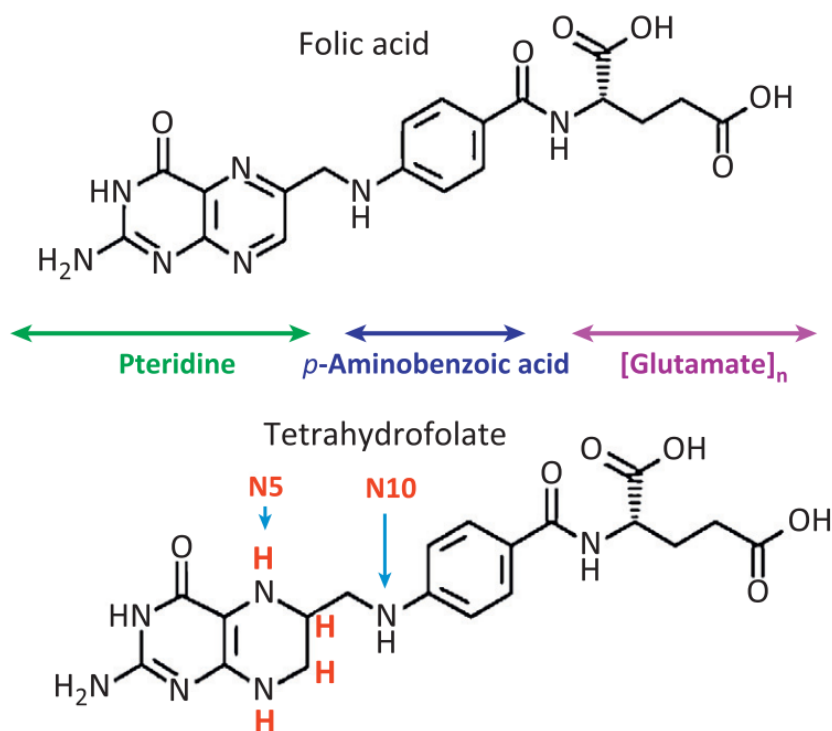
Folát je esenciálním ve vodě rozpustným B vitamínem vyskytujícím se v řadě různých potravin, jako jsou játra, zelenina, luštěniny nebo citrusy. Význam jeho dostatečného denního příjmu, ať už v potravě nebo v podobě suplementů, je velký, neboť se folát podílí hned na několika významných buněčných procesech, jimiž jsou methylační reakce, syntéza nukleotidů a metabolismus aminokyselin. Hodí se také podotknout, že přestože někdy dochází k zaměňování výrazů folát a kyselina listová, je mezi těmito látkami rozdíl. Ten bude v této práci vysvětlen a bude shrnuto i něco málo o fortifikaci potravin kyselinou listovou a dostupných folátových suplementech.

Poměrně častým problémem v lidské populaci je deficit tohoto vitamínu, obzvláště u těhotných žen, jejichž potřeba folátu roste z důvodu zvýšené mitotické aktivity tkání matky i buněk vyvíjejícího se embrya. Důsledkem nedostatku folátu v tomto období mohou být mnohé těhotenské komplikace a vývojové defekty, přičemž v centru pozornosti této práce jsou potraty a defekty nervové trubice. Posouzena bude asociace těchto jevů s bodovými polymorfismy v genech kódujících enzymy, jež se uplatňují v metabolismu folátu, s důrazem na gen pro 5,10-methyltetrahydrofolát reduktázu. Pro lepší orientaci v této problematice bude předem zjednodušeně představen i metabolismus folátu a protože s množstvím folátu je inverzně spojena hladina homocysteinu v krvi, bude zde zmíněno pár slov i o této neproteinogenní aminokyselině. Mimoto bude uvažována i možnost prevence potratů a defektů nervové trubice pomocí doplnění kyseliny listové či folátu. Celý tento úsek přitom bude vycházet ze studií lidské populace.

V poslední části práce budou nastíněny mechanismy, jimiž by folát mohl napomáhat správnému průběhu časného embryonálního vývoje a zabránit tak vzniku defektů nervové trubice. Vzhledem k tomu, že se jedná o experimentální oblast, budou zde uvedeny i poznatky získané ze zvířecích modelů, konkrétně myších a ptačích.

2 Kyselina listová vs. folát

Kyselina listová je syntetickou podobou ve vodě rozpustného vitamínu B₉. Savci jej nejsou schopni vytvořit *de novo*, tudíž je nutné tento vitamín přijímat v potravě nebo v podobě suplementů. Suplementy a fortifikované potraviny obsahují uměle vyrobenou kyselinu listovou, zatímco v potravě nalézáme přirozeně se vyskytující formu vitamínu B₉, kterou nazýváme folát. Tvar tohoto slova je odvozen od latinského výrazu pro list – *folium*, protože zdrojem folátu je mimo jiné listová zelenina. Pojem folát je však široký, neboť se používá obecně k označení sloučenin odvozených od chemické struktury kyseliny listové (Obr. 1). Kyselinu listovou i folát přijatý v jídle je navíc třeba nejprve redukovat na tetrahydrofolát (THF; Obr. 1) a až tato forma folátu může být buňkami využita k dalším procesům (Blom *et al.*, 2006; Greenberg *et al.*, 2011).



Obr. 1: Chemická struktura kyseliny listové a tetrahydrofolátu. Rozdíl mezi kyselinou listovou (nahore) a metabolicky aktivní formou folátu - THF (dole) je vyznačen červeně (převzato a upraveno z Guéant *et al.*, 2013).

(DHFR) na metabolicky aktivní THF, který vstupuje do folátového cyklu. Tam je na THF připojen 1C zbytek serin hydroxymethyltransferázou (SHMT) a vzniklý 5,10-methyltetrahydrofolát (5,10-methylenTHF) je poté upraven enzymem methyltetrahydrofolát reduktázou (MTHFR) na 5-methyltetrahydrofolát (5-MeTHF), jenž vystupuje z buněk a tvoří nejhojnější formu folátu v plasmě (>90 %). MTHFR tedy hraje důležitou roli v zajištění optimálního množství 5-MeTHF (Scaglione and Panzavolta, 2014). Krví je 5-MeTHF transportován ke tkáním, v jejichž buňkách se podílí na remethylaci homocysteinu na methionin (Imbard *et al.*, 2013). To se děje pomocí B₁₂-dependentního enzymu methionin syntázy (MS nebo také MTR), která je udržována v aktivním stavu činností reduktázy methionin syntázy (MTRR) (Wilson *et al.*, 1999). 5-MeTHF slouží jako donor methylu pro homocystein, což vede ke vzniku methioninu a THF a zároveň ke snížení hladiny homocysteinu v plasmě. Methionin je dále přeměněn v S-adenosylmethionin (SAM), který plní funkci univerzálního donora methylových zbytků a je proto využíván enzymy methyltransferázami k mnoha různým methylačním reakcím. Těmito reakcemi se SAM přeměňuje na S-adenosylhomocystein (SAH) a ten zpět na homocystein, čímž se uzavírá cyklus methioninu, označovaný také jako methylační cyklus. Existují i metabolické větve vystupující z folátového cyklu, jež vedou k syntéze pyrimidinů a purinů z 5,10-methylenTHF a z 10-formyltetrahydrofolátu (10-formylTHF). Poslední dvě sloučeniny jsou vytvářeny z THF enzymem methyltetrahydrofolát dehydrogenázou 1 (MTHFD1) (Scaglione and Panzavolta, 2014). K tomu se MTHFD1 ujímá jednouhlíkových jednotek v podobě formiátu, jímž mitochondrie zásobí cytosol. 1C metabolismus se totiž neodehrává jen v cytosolu, ale i v mitochondriích a jádře (Steele *et al.*, 2020).

3.2 Nedostatek folátu

Z výše popsaného metabolismu vyplývá, že přítomnost dostatečného množství folátu je nezbytná pro správný průběh řady buněčných procesů, jako je metabolismus aminokyselin, methylace deoxyribonukleové kyseliny (DNA), proteinů či lipidů, replikace DNA a buněčné dělení. V těhotenství, kdy tvořící se placenta i embryo prochází velkým množstvím buněčných dělení, se spotřeba folátu zvyšuje, aby mohl být zajištěn správný vývoj a růst. Zvýšením nároků na množství přijatého folátu lehce vzniká jeho nedostatek, jenž může mít nepříznivý vliv na těhotenství i vývoj plodu. S nedostatkem folátu jsou proto spojovány různé těhotenské komplikace včetně potratů, abrupce placenty a předčasného porodu, ale také nízká porodní váha novorozence, mentální retardace, Downův syndrom a malformace plodu, jakožto defekty nervové trubice, orofaciální rozštěpy a vrozené srdeční vady. Kromě defektů nervové trubice

není však asociace těchto jevů s nedostatkem folátu jasně prokázána, protože studie často obsahují malý počet účastníků, používají různé metody a dochází tak k protichůdným závěrům (Tamura and Picciano, 2006). Aktuálně se zdá, že nedostatek folátu v těhotenství by mohl mít negativní vliv i na celkový vývoj nervové soustavy a fungování mozku potomka, což může vést například k poruchám autistického spektra nebo schizofrenii (Naninck *et al.*, 2019). Nedostatek folátu nemusí být způsoben pouze jeho nedostatečným příjmem v potravě, nýbrž i špatnou absorpcí folátu ve střevech nebo může být dostupnost folátu snížena z důvodu narušení jeho metabolismu a transportu. Metabolismus folátu může být ovlivněn nedostatkem vitamínu B₁₂ fungujícího jako kofaktor MS, interakcí s léky inhibujícími DHFR či vlivem polymorfismů. Polymorfismy v genech kódujících enzymy zpracovávající folát anebo folátové transportéry totiž mohou mít za následek dysfunkci výsledných proteinů. V prvním případě tak folát sice vstupuje do buňky, ale enzymy jsou schopny zpracovat jen jeho omezené množství, čímž vzniká situace podobná celkovému nedostatku folátu v těle. V druhém případě dochází již k narušení vstupu folátu do buňky a proto jej nelze využít k potřebným účelům, přestože je folátu v těle dostatek (Scaglione and Panzavolta, 2014).

4 Suplementy a fortifikace potravin kyselinou listovou

V 90. letech 20. století bylo potvrzeno, zejména díky dvěma dostatečně velkými a důvěryhodnými studiím, že suplementace kyselinou listovou slouží neznámým mechanismem jako prevence defektů nervové trubice. První z nich byla randomizovaná dvojitě zaslepená mezinárodní studie provedena v roce 1991 a zúčastnilo se jí 1817 žen, jejichž alespoň jedno dřívější těhotenství bylo postiženo defekty nervové trubice. U skupiny žen, které užívaly 4000 µg kyseliny listové denně od doby okolo početí do 12. týdne těhotenství, bylo zabráněno 72 % případů defektů nervové trubice oproti skupině, jež kyselinu listovou neužívala (MRC Vitamin Study Research Group, 1991). Na základě těchto výsledků byl potvrzen pozitivní vliv kyseliny listové na opakovaný výskyt defektů nervové trubice. Druhá studie provedená o rok později v Maďarsku poté prokázala, že suplementací kyselinou listovou se dá předejít i defektům nervové trubice, jež by se objevily zcela poprvé. Šlo opět o randomizovanou dvojitě zaslepenou studii, ve které se u skupiny 2104 žen, každý den perikonceptčně užívajících multivitaminové doplňky s obsahem 800 µg kyseliny listové, nevyskytl žádný případ defektů nervové trubice. Na druhou stranu ve skupině 2052 žen, jež užívaly pouze stopové prvky, se objevilo 6 případů defektů nervové trubice bez předchozího výskytu v rodině (Czeizel and Dudás, 1992). Na základě těchto výsledků začala být ženám plánujícím těhotenství doporučována suplementace kyselinou listovou a o pár let později došlo v mnoha zemích také

k zavedení povinné fortifikace obilovin kyselinou listovou, jejímž účelem bylo pomoci navýšit denní příjem folátu a pokusit se tak předejít co nejvíce defektům nervové trubice. Zavedení fortifikace mělo opravdu kladný účinek, dobře patrný například v Kanadě, kde byl zaznamenán výrazný pokles ve frekvenci výskytu defektů nervové trubice z 1,13/1000 těhotenství před fortifikací (data z let 1994-1997) na 0,58/1000 těhotenství po zavedení fortifikace v roce 1998 (data z let 1998-2000) (Ray *et al.*, 2002).

Nyní je US Preventive Services Task Force doporučováno, aby prevence defektů nervové trubice, přijímat 400-800 μg kyseliny listové denně všem ženám v reprodukčním věku, aby se předešlo nedostatku folátu i v případech neplánovaného těhotenství. Ženám, u nichž se defekty nervové trubice v těhotenství již vyskytly, bývá doporučováno vyšší množství. Uvedená kritická doba pro užívání folátu je alespoň jeden měsíc před početím a trvá přibližně do konce prvního trimestru, čímž by měl být zajištěn dostatek folátu během klíčového procesu, kterým je uzavírání nervové trubice embrya časně v těhotenství. Je upozorňováno také na to, že většině žen se navzdory fortifikaci potravin nedaří dosáhnout doporučené hladiny folátu pouze běžnou stravou (US Preventive Services Task Force, 2017). Pro tuto skupinu žen by tedy bylo vhodné zvážit užívání suplementů. Jejich obsah může mít v dnešní době více podob: kyselina listová, kyselina folinová (5-formylTHF) či 5-MeTHF. Přičemž 5-MeTHF neboli aktivní forma folátu vyskytující se běžně v krevním oběhu je pro účely suplementace připravován uměle a zdá se být dobrou alternativou ke kyselině listové. Suplementací kyselinou listovou i 5-MeTHF se totiž podařilo dosáhnout podobného zvýšení množství folátu v plasmě, sloužícího jako krátkodobý indikátor příjmu folátu, a také v erytrocytech, kde se změna koncentrace folátu projeví až po delší době (Venn *et al.*, 2002). Nedávno bylo v Malajsii, kde není nařízena povinná fortifikace obilovin, dosaženo použitím desetkrát vyššího množství 5-MeTHF k suplementaci po 12. týdnech nejen stejného poklesu homocysteinu v plasmě, ale dokonce i vyšší hladiny folátu v plasmě a erytrocytech než při suplementaci kyselinou listovou (Henderson *et al.*, 2018). Měly by být ale provedeny další studie, které by mimo opětovné zhodnocení efektivity užívání 5-MeTHF také posoudily, zda je možné předcházet defektům nervové trubice i touto formou suplementace. Vzhledem k tomu, že dokáže zvýšit hladinu folátu v těle, tak se to jeví jako velmi pravděpodobné. Nicméně suplementace 5-MeTHF by měla být upřednostněna před kyselinou listovou minimálně u jedinců s polymorfismy v genech pro enzymy folátového metabolismu, jako je MTHFR, nebo užívajících léky, jež inhibují DHFR. Výhoda tohoto druhu suplementace tkví v tom, že jedinec získá již zredukovanou metabolicky aktivní formu folátu, a proto ji lze rovnou využít, aniž by musely být zapojeny reduktázy. To znamená, že se tím obejde případně inhibovaný enzym DHFR i dysfunkce

enzymu MTHFR, která je blíže popsána v kapitole 5.1. Dalším benefitem je, že se užíváním 5-MeTHF zabrání kolování velkého množství nemetabolizované kyseliny listové v krevním oběhu.

5 Genetické polymorfismy spojené s metabolismem folátu

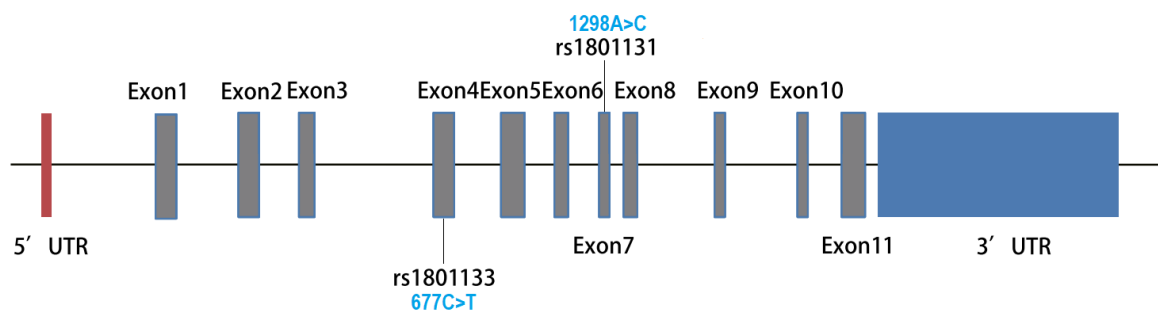
V genech pro enzymy folátového metabolismu bylo nalezeno několik bodových polymorfismů neboli single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Jak název napovídá, jedná se o záměnu jednoho nukleotidu na určité pozici v genomu. Pokud se bude nukleotidová záměna nacházet v exonu nějakého genu, může způsobit změnu genem kódované aminokyseliny a tím ovlivnit i funkci budoucího proteinu. Takto vzniklá funkční porucha enzymu zpracovávajícího folát vede nejen k narušení metabolismu folátu, ale může mít negativní vliv i na metabolismus homocysteinu, jelikož jsou vzájemně propojeny (Obr. 2). Důsledkem toho může být ohrožen průběh důležitých buněčných dějů, zmíněných výše.

Polymorfismy v genech pro enzymy uplatňující se v metabolismu folátu jsou již několik let podrobně zkoumány a dávány do souvislostí s mnoha zdravotními obtížemi. Patří mezi ně i nejrůznější těhotenské komplikace podobné těm, které jsou spojovány s nedostatkem folátu. Následující podkapitoly jsou zaměřeny na polymorfismy v genu pro MTHFR a jejich asociaci s potraty a defekty nervové trubice embrya.

5.1 MTHFR

Polymorfismy v genu pro MTHFR jsou zkoumány zdaleka nejvíce, neboť jsou v populaci poměrně časté a ovlivňují klíčový enzym metabolismu folátu. Pro připomenutí: když MTHFR funguje správně, zajistí vznik dostatečného množství 5-MeTHF, čímž je umožněno zpracování homocysteinu na methionin a následně i vznik SAM využívaného pro methylační reakce včetně methylace DNA.

Enzym MTHFR je tvořen 656 aminokyselinami a je kódován genem, jenž obsahuje 11 exonů a v lidském genomu se nachází na krátkém raménku chromozomu 1 (Goyette *et al.*, 1994). Je známo větší množství bodových polymorfismů objevujících se v tomto genu, avšak nejvíce studovány jsou z nich tyto dva: C677T a A1298C (Obr. 3).



Obr. 3: Grafické znázornění genu *MTHFR* s přibližným umístěním dvou významných SNPs.

Světle modře jsou vyznačeny bodové polymorfismy *MTHFR* C677T v exonu 4 a *MTHFR* A1298C v exonu 7. Uvedena jsou i příslušná rs čísla (reference SNP ID number), která jsou využívána v databázích SNPs.

UTR, nepřekládaná oblast; exon, kódující oblast (převzato a upraveno z Wang *et al.*, 2015).

Jako první byla v genu *MTHFR* identifikována substituce cytosinu za thymin na pozici 677, nacházející se v exonu 4. Tato tranzice způsobuje ve vznikajícím proteinu záměnu aminokyseliny alaninu za valin (A222V). Aminokyselinová záměna má za následek termolabilitu a značné snížení aktivity enzymu *MTHFR*, což je nejvíce patrné u mutantních homozygotů 677TT (30 % aktivity divokého typu (wt) enzymu a teplotní inaktivace již při nižší teplotě) a o něco méně i u heterozygotů 677CT (65 % aktivity). Výsledkem nižší funkce enzymu bylo zvýšení hladiny homocysteinu v plasmě, u homozygotů téměř dvojnásobné (Frosst *et al.*, 1995). To lze vysvětlit tím, že činností zmutovaného enzymu nevzniká dostatek 5-MeTHF pro remethylaci homocysteinu na methionin a nevyužitý homocystein se proto hromadí v krvi. Tento stav je označován jako hyperhomocysteinémie a představuje rizikový faktor pro kardiovaskulární onemocnění (Graham *et al.*, 1997). Dysfunkce enzymu *MTHFR* se u homozygotů projevila rovněž na hladině folátu, která byla snížena v plasmě (van der Put *et al.*, 1995; Molloy *et al.*, 1997) a pozměněna i v erytrocytech. Ve starší studii, kde nebyl vyhodnocen příjem folátu účastníků, byla u homozygotů naměřena vyšší koncentrace folátu v erytrocytech (van der Put *et al.*, 1995). Kdežto v rozsáhlejší studii provedené o dva roky později byla u zdravých homozygotních žen, které většinou neužívaly folátové suplementy, zjištěna nižší koncentrace folátu v erytrocytech oproti ženám s wt genotypem. Jelikož je hladina folátu v erytrocytech považována za ukazatel tkáňových zásob folátu, tento výsledek naznačuje, že *MTHFR* 677TT jedinci mohou mít zvýšené nároky na příjem folátu, než je obecně doporučováno lidem bez ohledu na možné genetické nebo metabolické abnormality (Molloy *et al.*, 1997). V erytrocytech TT homozygotů byla navíc pozorována změna v zastoupení forem folátu. Erytrocyty wt jedinců obsahují výhradně 5-MeTHF, kdežto u homozygotů tvořil 30 % formylovaný THF (Friso *et al.*, 2002).

Dalším bodovým polymorfismem, jenž byl v genu pro MTHFR popsán, je substituce adeninu za cytosin na pozici 1298, která se nachází v exonu 7. Tentokrát se jedná o transverzi, kterou ale opět dochází ke změně v aminokyselinové sekvenci vznikajícího enzymu, konkrétně k nahrazení kyseliny glutamové alaninem (E429A). Zatímco C677T se nachází přímo v katalytické doméně MTHFR, A1298C je součástí regulačního místa tohoto enzymu. Ačkoli je výsledkem substituce 1298A→C také snížená aktivita MTHFR u homozygotů i heterozygotů, nejedná se o tak výrazný pokles jako u substituce 677C→T. Na rozdíl od ní nezpůsobuje polymorfismus A1298C ani termolabilitu enzymu a sám o sobě měl zanedbatelný vliv na změny hladin folátu a homocysteinu. U jedinců heterozygotních pro oba zmíněné polymorfismy, tzv. složených heterozygotů, však již byla zaznamenána významně vyšší hladina homocysteinu v plasmě i změny hladin folátu v erytrocytech a plasmě, spolu s nižší aktivitou enzymu (van der Put *et al.*, 1998). Aktivita MTHFR složeného heterozygota činila 36 % z aktivity enzymu jedince s wt genotypem 677CC/1298AA, kdežto 60 % a 52 % u jedinců s genotypem 677CC/1298AC a 677CC/1298CC (Chango *et al.*, 2000). Vzhledem k tomu, že se důsledky těchto dvou SNPs u složených heterozygotů projeví do větší míry nežli u jedinců heterozygotních pouze pro jeden z nich, je předpokládána interakce polymorfismů C677T a A1298C (van der Put *et al.*, 1998). Zajímavé je, že homozygoti pro jeden z těchto bodových polymorfismů mívají většinou wt variantu toho druhého. V jedné studii byli mezi 164 testovanými jedinci přítomni jen 3 s více než dvěma mutantními alelami, a to pouze genotypu 677TT/1298AC (Nefic *et al.*, 2018). V jiných studiích nebyly genotypy se třemi nebo všemi čtyřmi mutantními alelami mezi zkoumanými jedinci přítomny vůbec (van der Put *et al.*, 1998; Chango *et al.*, 2000; Botto *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2019). Tento jev může být výsledkem působení negativního selekčního tlaku proti embryím s mnoha mutovanými alelami, které by snižovalo jejich životaschopnost z důvodu příliš příznivého výsledného fenotypu.

Co se týče četnosti polymorfismu C677T ve světové populaci, byly zaznamenány variace v distribuci T alely mezi různými geografickými oblastmi i etnickými skupinami. Výskyt jedinců s genotypem 677TT byl nejvyšší v Mexiku (32 %), kde alelu T nesla více než polovina testovaných subjektů. Nicméně homozygotů se vyskytovalo výrazně více i na jihu Itálie (26 %) a v severní Číně (20 %). V některých oblastech byl dokonce pozorován gradient rozmístění genotypu TT, například v Evropě jeho frekvence významně stoupala od severu (4 %) směrem k jihu (26 %), přičemž důvod těchto variací není přesně znám (Wilcken *et al.*, 2003). V některých oblastech může korelovat rozložení polymorfismů *MTHFR* s výskytem různých zdravotních problémů. Například Mexiko, s mnoha jedinci genotypu TT, bylo na přelomu 20. a 21. století považováno také za zemi s několikanásobně zvýšenou frekvencí defektů

nervové trubice (Mutchinick *et al.*, 1999). Zkoumání asociace genetického polymorfismu s určitou zdravotní komplikací je však ošemetné v tom, že genotyp se nemusí vždy projevit příslušným defektním fenotypem. Výsledky těchto studií jsou proto mnohdy odlišné. Na tom, zda se zdravotní komplikace projeví, může mít podíl více genetických faktorů a může záležet i na vlivu prostředí, včetně nutričních faktorů. Vliv výživy byl patrný například ve studii, kde se hladina homocysteinu u jedinců s polymorfismy *MTHFR* nijak významně nezvýšila, zato však byla pozorována poměrně vysoká hladina folátu v krvi. To naznačuje, že dodání potřebného množství folátu by mohlo zmírňovat efekty méně funkčního enzymu a potenciálně i jimi způsobené zdravotní potíže (Chango *et al.*, 2000).

5.1.1 Asociace s potraty

Existuje velké množství nejrůznějších příčin i možných rizikových faktorů potratů. Stále však v mnoha případech zůstává příčina potratu nejasná. Jedním z důvodů, proč by mohly mít polymorfismy v genu pro *MTHFR* vliv na potraty, je jimi způsobená zvýšená hladina homocysteinu v plasmě. Homocystein je totiž znám svým škodlivým vlivem na cévy, a ty jsou v těhotenství klíčové pro zajištění výměny látek mezi matkou a plodem. Toxickým účinkem velkého množství homocysteinu může dojít k poškození cévního endotelu, narušení jeho funkce a mimo jiné i ke zhoršení perfúze placenty. Z toho důvodu bývá hyperhomocysteinémie během těhotenství spojována s různými těhotenskými komplikacemi včetně žilní trombózy, abrupce placenty a zvýšeného rizika potratů (Tamura and Picciano, 2006; Gaiday *et al.*, 2018).

Pokud jde o asociaci polymorfismů v genu pro *MTHFR* s potraty, tak bylo provedeno velké množství studií. Výzkum na skupině 767 žen, jež užívaly před početím suplementy s obsahem 400 µg folátu, nenašel žádnou souvislost polymorfismů genu *MTHFR* s opakovanými potraty. Přítomnost C677T a A1298C byla u žen s opakovanými potraty i bez nich náhodná, a proto považována za nevhodnou pro diagnostické účely (Dell'Edera *et al.*, 2018). Nicméně o rok později byl u žen, jež neužívaly kyselinu listovou, vyhodnocen genotyp *MTHFR* 677TT jako rizikový. Tento genotyp byl totiž u žen s opakovanými potraty frekventovanější nežli v kontrolní skupině a zajímavé je, že naměřené hladiny homocysteinu u nich byly také celkově vyšší oproti kontrolní skupině. Alela T byla spojena se zvýšenou hladinou homocysteinu v krvi nehledě na skupinu a dle očekávání byla nejvyšší hladina homocysteinu zjištěna u homozygotů TT, kdežto nejnižší u wt jedinců. Na základě těchto výsledků se tedy zdá být pravděpodobné, že je C677T asociován s opakovanými potraty (Zarfeshan Fard *et al.*, 2019). K podobným souvislostem, které se týkají jedinců s polymorfismem C677T a hladiny homocysteinu u jednotlivých genotypů, došly i další studie. V jedné z nich byla ke genotypu TT rovněž přiřazena zvýšená hladina homocysteinu, která navíc korelovala se závažností

kardiovaskulárního onemocnění zkoumaných jedinců. Polymorfismus A1298C se zde však žádnou změnou hladiny homocysteinu či folátu v plasmě neprojevil (Botto *et al.*, 2003). Druhá z nich dále očekává, že genotyp TT právě skrze hyperhomocysteinémii nepřímo ovlivňuje atherosklerózu a trombózu (Park and Chang, 2014). Tento nepříznivý vliv velkého množství homocysteinu na funkci cévního systému by tedy mohl vysvětlovat mechanismus, jakým polymorfismus C677T přispívá ke vzniku různých těhotenských komplikací včetně potratů.

Zvýšená frekvence alely T v lokusu 677 genu pro MTHFR byla zaznamenána u žen s opakovanými potraty i ve studii Xu *et al.* z roku 2019. Souvislost polymorfismu *MTHFR* C677T s opakovanými potraty zde však nebyla sama o sobě shledána jako statisticky významná a je doporučen další výzkum. Určitou roli zde může hrát i fakt, že některé ženy užívaly folátové suplementy nepravidelně. U žen s opakovanými potraty byla dále nalezena nejen zvýšená frekvence alely C v lokusu 1298 genu pro MTHFR, ale i genotypů AC a CC oproti ženám bez potratu, takže polymorfismus A1298C byl označen za rizikový faktor a shledán jako vhodný k predikci opakovaných potratů. Zdaleka nejvyšší riziko opakovaných potratů však bylo pozorováno u žen se složeným heterozygotním genotypem 677CT/1298AC. Tyto ženy měly vzhledem k wt genotypu 677CC/1298AA riziko opakovaného potratu zvýšeno více než 6-krát (Xu *et al.*, 2019). Výzkumná skupina Mo *et al.* (2019) se na základě literatury domnívá, že polymorfismus *MTHFR* A1298C by mohl být asociován s nepříznivými výsledky těhotenství v čínské populaci. Zpracováním literárních dat bylo vyhodnoceno, že frekvence genotypu 1298CC byla ve dvou oblastech Číny vyšší u žen s nepříznivými výsledky těhotenství ve srovnání s kontrolní skupinou. Navíc byla pozorována odlišná frekvence výskytu jednotlivých genotypů v závislosti na geografii. Nicméně jimi provedená studie této asociace v jiho-západní oblasti Číny nenalezla významné zvýšení frekvence žádného z možných genotypů u žen s nepříznivým výsledkem těhotenství oproti kontrolní skupině (Mo *et al.*, 2019).

Vzhledem k tomu, že narušení metabolismu folátu může vést i k poruchám methylačních reakcí, zaměřují se některé studie místo hyperhomocysteinémie na propojení polymorfismů v genu pro MTHFR s těhotenskými komplikacemi skrze změny v methylaci DNA. Kanadská studie placent žen s předpokládaným dostatkem folátu v průběhu těhotenství došla k závěru, že rizikové genotypy *MTHFR* 677TT a 1298CC nejsou spojeny se změnami v methylaci DNA. Což by mohlo znamenat, že se tyto genotypy podílejí na těhotenských komplikacích jiným způsobem, anebo se změny v methylaci placentární DNA projeví až při současném nedostatku folátu. Byla ale zjištěna zvýšená frekvence genotypu *MTHFR* 677TT u těhotenství komplikovaných patologiemi placenty (Del Gobbo *et al.*, 2018).

Polymorfismus *MTHFR* C677T nebyl zkoumán jen u žen, které samovolně potratily, ale i u jejich partnerů. Bylo zjištěno, že genotyp muže má také souvislost s rizikem spontánních potratů. Se spontánním potratem ženy byla asociována nižší přítomnost wt genotypu u muže a zároveň se u partnerů žen s vyšším počtem spontánních potratů vyskytovaly častěji genotypy 677CT a 677TT. Vyšší riziko potratu autoři vysvětlují tím, že polymorfismus C677T mohl narušit metylaci DNA a tím i integritu DNA spermie (Liu *et al.*, 2019).

Byla také zkoumána asociace spontánního potratu s polymorfismy *MTHFR* C677T a A1298C přítomnými v embryu. Porovnáním genotypů vyskytujících se v potracených embryonálních tkáních a v živých jedincích byl posouzen vliv polymorfismů *MTHFR* na životaschopnost embrya. Jak již bylo řečeno v kapitole 5.1, v populaci se zdá být nízký výskyt jedinců se třemi mutantními alelami a nulový výskyt čtyř mutovaných alel pro tyto dva polymorfismy dohromady. Provedená studie podporuje názor, že genotyp 677TT/1298CC není slučitelný se životem, neboť tyto čtyři mutantní alely byly nalezeny pouze ve tkáních potracených embryí. Přítomnost tří mutantních alel u nich byla také častější než u žijících lidí, stejně jako genotypy 677CT a 677TT. Přítomnost tří nebo čtyř mutantních alel pro polymorfismy C677T a A1298C a jejich negativní vliv na životaschopnost embrya by tedy mohli být jednou z hlavních příčin spontánního potratu. Na druhou stranu wt genotyp 677CC embrya by měl mít silný protektivní účinek proti potratu, nehledě na to, jaká je přítomna varianta A1298C (Callejón *et al.*, 2007).

Jelikož může být vysoká hladina homocysteinu výsledkem nedostatku folátu použitelného k remethylaci homocysteinu na methionin z důvodu snížené aktivity *MTHFR*, bylo zkoumáno, zdali suplementace folátem nemůže hladinu homocysteinu snížit a zmírnit tím i riziko samovolných potratů. Jedna ze studií byla provedená na 16 ženách, jež byly homozygotními pro jeden z výše zmíněných polymorfismů *MTHFR* nebo složenými heterozygoty. Tyto ženy prodělaly 3 nebo více potratů a po 6 měsících užívání suplementů s vitamíny B₆, B₁₂ a vysokým obsahem 5-MeTHF (5 mg) u nich byl zaznamenán pokles homocysteinu v plasmě na normální hladinu. Do jednoho roku, během kterého ženy pokračovaly v suplementaci, sedm z nich porodilo zdravé dítě. Vzhledem k velmi malému počtu účastníků však nejsou výsledky studie příliš relevantní. Přesto se vhodná suplementace snižující hladinu homocysteinu jeví jako účinná možnost prevence potratů (Serapinas *et al.*, 2017). K podobnému závěru došla i mnohem větší dlouholetá studie zkoumající závislost příjmu folátu před početím s rizikem spontánního potratu, která měla k dispozici údaje o 15 950 těhotenstvích z nichž 2 756 skončilo spontánním potratem, čímž je myšlen zánik embrya/plodu před 20. dokončeným týdnem těhotenství. Příjem folátu byl vyhodnocován dotazníky a bylo rozlišeno mezi suplementy a příjmem folátu

z potravy. U žen užívajících folátové suplementy bylo pozorováno nižší riziko vzniku spontánního potratu až o 20 % oproti ženám, které suplementy neužívaly a vliv suplementů se také zdál silnější v porovnání s folátem získaným z potravy (Gaskins *et al.*, 2014). Užívání suplementů obsahujících folát by tedy mělo být účinné nejen v prevenci defektů nervové trubice, ale i spontánních potratů.

Ačkoli jsou některé výsledky shrnutých studií kontroverzní, zdá se, že určitá asociace by zde být mohla, alespoň tedy mezi potraty a přítomností vysokého počtu mutantních alel obou polymorfismů nebo případně i polymorfismem C677T. Nejnovější přehled o souvislosti opakovaných potratů s mateřskými polymorfismy v genu pro MTHFR z června 2019 potvrzuje asociaci s C677T a zároveň nenalézá významnou spojitost s A1298C (Du *et al.*, 2019). Odlišné výsledky studií by mohly být způsobeny rozdílným příjmem folátu nebo také jinými vlivy prostředí či genetickými faktory, které nebyly brány v úvahu. Pro získání průkaznějších výsledků by bylo vhodné provést studie s větším počtem účastníků a s jasně stanovenou hladinou folátu v krvi. Bylo by přínosné i detailněji prozkoumat možné mechanismy, jakými geneticky způsobená dysfunkce MTHFR přispívá k potratům a posoudit potenciální vzájemné interakce různých polymorfismů, které se vyskytují v genomu jedince současně.

K úplnému objasnění vlivu polymorfismů v genu pro MTHFR na potraty je tedy třeba další výzkum. Prozatím mohou detekované polymorfismy sloužit alespoň jako indikace k suplementaci folátem.

5.1.2 Asociace s defekty nervové trubice a další polymorfismy

Defekty nervové trubice jsou multifaktoriálně podmíněné vrozené malformace nervové soustavy, které jsou způsobeny selháním uzavření nervové trubice vyvíjejícího se embrya. Jedná se o časté vrozené vady s průměrným celosvětovým výskytem přibližně 1 z 1000 těhotenství, který se liší mezi populacemi. Za dvě nejčastější formy defektů nervové trubice jsou považovány anencefalie a spina bifida. U anencefalie, která je letální, nedojde k uzavření kraniální části nervové trubice, kdežto u spiny bifidy se jedná o kaudální konec a dítě přežít sice může, ale mívá celoživotní následky. Složitý a pečlivě regulovaný proces uzavírání nervové trubice probíhá již časně v embryogenezi a měl by být dokončen okolo 28. dne od početí. Příjem folátu je tedy klíčový v době, kdy žena nemusí o těhotenství ještě vědět. Nicméně některým případům defektů nervové trubice se z neznámých důvodů nedaří předejít ani suplementací kyselinou listovou (Blom *et al.*, 2006).

V populaci poměrně častá nukleotidová záměna 677C>T v genu pro MTHFR je považována za první nalezený genetický rizikový faktor spiny bifidy. Genotyp 677TT se v porovnání se zdravými jedinci vyskytoval častěji u dětí postižených spinou bifidou i u jejich rodičů.

Na riziku vzniku spiny bifidy se tedy nepodílí jen genotyp potomka, ale přispívají k němu i genotypy otce a matky (van der Put *et al.*, 1995). Za další rizikový genetický faktor defektů nervové trubice, avšak s menším vlivem než C677T, byl označen i polymorfismus *MTHFR* A1298C. Důvodem pro toto označení bylo, že se u složených heterozygotů prohluboval výše popsaný negativní vliv C677T na aktivitu enzymu a hladiny folátu i homocysteinu. Část případů defektů nervové trubice, kterou nelze vysvětlit přítomností genotypu 677TT, by tedy mohla být přičítána složeným heterozygotům (van der Put *et al.*, 1998).

Mimoto však byly v souvislosti s defekty nervové trubice zkoumány i polymorfismy v mnoha jiných genech důležitých pro metabolismus anebo transport folátu (Steele *et al.*, 2020). Jeden z polymorfismů, považovaný za další genetický rizikový faktor defektů nervové trubice, se nachází na krátkém raménku lidského chromozomu 5 v genu pro enzym reduktáza methionin syntázy (MTRR) (Leclerc *et al.*, 1998). Jedná se opět o SNP, ve kterém se substituce adeninu za guanin vyskytuje na pozici 66 a má za následek změnu kódované aminokyseliny izoleucinu na methionin (I22M). Tento bodový polymorfismus je v populaci velmi běžný a vyskytuje se v doméně enzymu MTRR, která váže jako kofaktor flavinmononukleotid (FMN). Úkolem enzymu MTRR je aktivovat methionin syntázu, aby byla schopna funkce, k níž navíc vyžaduje přítomnost vitamínu B₁₂. Kombinace nízké hladiny B₁₂ v krvi spolu s přítomností homozygotního genotypu 66GG výrazně zvýšila riziko defektů nervové trubice, což lze považovat za interakci mezi genem a živinou. Kromě folátu je tedy v těhotenství vhodné dbát i na dostatečný příjem vitamínu B₁₂. Dále byla pozorována i interakce mezi geny *MTRR* a *MTHFR*. Přítomnost dvojité homozygotního genotypu *MTHFR* 677TT/*MTRR* 66GG zvýšila riziko vzniku defektů nervové trubice čtyřikrát u dětí a třikrát u jejich matek (Wilson *et al.*, 1999). Druhý z rizikových SNPs se nachází na dlouhém raménku lidského chromozomu 14 v genu pro enzym MTHFD1, jenž dokáže katalyzovat tři různé po sobě jdoucí reakce a je tedy rovněž důležitý pro správný metabolismus folátu. Bodový polymorfismus se v tomto genu vyskytuje na pozici 1958, kde je guanin nahrazen adeninem a dochází tak ke změně původní kódované aminokyseliny argininu na glutamin (R653Q). Zaměněná aminokyselina je v enzymu MTHFD1 součástí C-terminální syntetázové domény (Hol *et al.*, 1998), jejíž aktivita je substitucí argininu za glutamin negativně ovlivněna a vede přibližně k 26% redukci syntézy purinů *de novo* (Christensen *et al.*, 2009). Nicméně právě ve studii Hol *et al.* (1998) se polymorfismus *MTHFD1* G1958A nezdál být asociovaný s defekty nervové trubice.

Výzkumy asociací SNPs v genech pro enzymy metabolismu folátu s defekty nervové trubice jsou prováděny převážně na matkách dětí s těmito defekty, některé ale vyhodnocují i genotypy dětí a jejich otců. Například v jedné čínské studii, jež analyzovala 52 SNPs v genu pro *MTHFR*,

byl polymorfismus *MTHFR* C677T u dítěte, určen za rizikový faktor vzniku defektů nervové trubice. Hladina folátu v krvi se však mezi skupinou dětí s defekty a kontrolní skupinou nelišila, což je neobvyklé (Yu *et al.*, 2014).

Co se týče matek, našla jiná čínská studie asociaci s defekty nervové trubice u *MTHFR* C677T i A1298C. Povaha asociace však byla u obou rozdílná. Zatímco C677T byl označen za rizikový faktor, A1298C se poměrně překvapivě ukázal být faktorem protektivním. To znamená, že riziko defektů bylo zvýšeno u wt jedinců a genotypy s mutantní alelou C riziko snižovaly. Asociace mateřského polymorfismu A1298C s defekty nervové trubice spolu s protektivním efektem byla nalezena i v provedené meta-analýze 11 asijských studií. C677T však v této meta-analýze nebyl asociován s defekty nervové trubice, což není v souladu s výsledky provedené studie. Mezi skupinou matek mající děti s defekty nervové trubice a matkami s potomky bez těchto defektů bylo nalezeno i několik dalších rozdílů. Například příjem i hladina folátu v krvi byly v první skupině nižší než ve druhé (Wang *et al.*, 2015). Menší venezuelská studie ze stejného roku našla asociaci mezi mateřským polymorfismem *MTHFR* 677C>T a rizikem defektů nervové trubice potomka. Rozdíly byly pozorovány mezi frekvencemi genotypů i alel, přičemž frekvence alely T činila 51,92 % ve skupině s výskytem defektů a 34,45 % ve skupině kontrolní (Morales de Machín *et al.*, 2015). V minulém roce byla provedena čínská studie, jež u matek prozkoumala i polymorfismy v jiných genech týkajících se metabolismu folátu než je *MTHFR*. Mutantní alely polymorfismů *MTHFR* C677T, *MTRR* A66G a *MTHFDI* G1958A byly více frekventované u matek dětí s defekty nervové trubice oproti kontrolní skupině a byly proto označeny za mateřské rizikové faktory stejně jako nedostatek folátu (Cai *et al.*, 2019).

Otcové byli zahrnuti ve výzkumu, který byl proveden loňského roku v Tunisku. Vyhodnocoval genotypy obou rodičů potomka s defekty nervové trubice a byl zaměřen na asociaci nejen s polymorfismy C677T a A1298C v genu pro *MTHFR*, ale i se zmíněným polymorfismem A66G v genu pro *MTRR*. Přítomnost všech tří wt alel C677/A1298/A66 u matek čtyřikrát zvyšovala riziko defektů nervové trubice. Zmíněné polymorfismy byly tedy určeny za mateřské faktory chránící proti vzniku defektů nervové trubice, což je u *MTHFR* C677T nevídané. Na druhou stranu u otců byl s rizikem asociován pouze *MTHFR* C677T, jenž zde hrál naopak roli rizikového faktoru. Tyto závěry jsou v rozporu jak samy se sebou, tak i s výsledky jiných studií a autoři proto doporučují další výzkum asociace těchto polymorfismů s rizikem vzniku defektů nervové trubice (Nasri *et al.*, 2019).

Jak lze vidět, výsledky nedávných studií jsou velmi rozporuplné a není pro to snadné vysvětlení. Příspěvek k tomu mohl například rozdílný příjem folátu účastníků nebo fakt, že

výsledky těchto studií se týkají všech defektů nervové trubice dohromady, avšak asociace s polymorfismy se může u jednotlivých typů lišit (Imbard *et al.*, 2013). Je také možné, že se příspěvky genetických, ale i jiných faktorů liší mezi populacemi. Výsledky mohl nepříznivě ovlivnit i nízký počet účastníků, což je poměrně častý problém těchto studií. Defekty nervové trubice ve spojení s konkrétními genotypy totiž nemusí být v populaci dostupné v takové míře, jaká by byla potřebná k získání průkazných výsledků (Molloy *et al.*, 2017). Z tohoto důvodu zde budou dále shrnuty i výsledky několika meta-analýz, jež mají díky zpracování většího množství dat vyšší stupeň věrohodnosti a mohly by tak asociaci polymorfismů s defekty nervové trubice pomoci alespoň do určité míry vyjasnit.

Meta-analýza z roku 2015 zahrnující 40 publikací byla zaměřena na asociaci polymorfismu *MTHFR* C677T s rizikem vzniku defektů nervové trubice a vyhodnotila genotypy dětí, matek i otců. Výskyt polymorfismu C677T u otce nebyl spojen s defekty nervové trubice potomka, což ale může být ovlivněno tím, že asociace s otcovským genotypem nebyla součástí mnoha studií a k dispozici tak bylo jen omezené množství dat. Na druhou stranu u zbylých dvou skupin problém s počtem studií nebyl a jejich vyhodnocením byl polymorfismus C677T u matek i u dětí shledán jako rizikový faktor pro vznik defektů nervové trubice (Yang *et al.*, 2015).

Co se týče asociace mateřských polymorfismů *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C a *MTRR* A66G s rizikem defektů nervové trubice potomka, byla na toto téma provedena meta-analýza obsahující 57 publikací. V této meta-analýze byla prokázána asociace mezi mateřskými polymorfismy *MTHFR* C677T a *MTRR* A66G a rizikem defektů nervové trubice, avšak u *MTHFR* A1298C asociace nalezena nebyla (Yadav *et al.*, 2015). Ke stejnému závěru dospěl i starší shrnující článek (van der Linden *et al.*, 2006). Mateřský polymorfismus *MTHFDI* G1958A je v meta-analýze, jež zpracovala data z deseti studií, také považován za asociovaný s rizikem vzniku defektů nervové trubice. Konkrétně genotyp 1958AA byl u matek spojen s vyšším rizikem vzniku těchto defektů (Zheng *et al.*, 2015). Asociaci *MTHFDI* G1958A podporuje i shrnující článek z letošního roku (Steele *et al.*, 2020).

Zdá se, že se stále příliš nedaří dospět k jasnému určení souvislosti mezi defekty nervové trubice a konkrétními SNPs. Existuje mnoho překážek, jež na tom mohou mít svůj podíl. Patří mezi ně nízký počet zkoumaných jedinců a s ním spojená nízká statistická síla studií, kvůli čemuž se musí provádět meta-analýzy. Výzkum ztěžuje také fakt, že na vzniku těchto vrozených defektů se podílí velké množství různých faktorů, genetických i týkajících se prostředí, které spolu navíc mohou interagovat. Z těchto důvodů je třeba komplexnějších výzkumů, které se zaměří i na vzájemné interakce mezi různými geny a interakce genů s živinami, jako je například folát či vitamín B₁₂, nebo s jinými vlivy prostředí (Yang *et al.*,

2015). Interakcí genů s folátem se již například zabývala studie z roku 2012, kde bylo mimo jiné pozorováno, že nízký příjem folátu matky zvýšil riziko defektů nervové trubice u potomka s polymorfismem *MTHFD1* G1958A (Etheredge *et al.*, 2012). Stejného roku byla také zaznamenána interakce mezi mateřským polymorfismem *MTHFR* C677T a hladinou folátu v krvi matky. Homozygotním ženám klesalo riziko anencefalie potomka o 18 % s každým 1 ng/ml přírůstkem folátu v krvi. Tento protektivní efekt rostoucího příjmu folátu však nebyl zaznamenán u žen heterozygotního nebo wt genotypu (Lacasaña *et al.*, 2012). Mohlo by být také přínosné nezaměřovat se na určení asociace jednoho bodového polymorfismu, ale spíše hodnotit ve větších studiích kombinace rizikových SNPs, které jsou přítomny v genomu jedince zároveň. Důvodem této úvahy je zjištění, že homozygotní genotyp pro každý z polymorfismů *MTHFR* C677T a *MTRR* A66G zvlášť nepředstavoval tak velké riziko jako jejich kombinace (Wilson *et al.*, 1999). Příspěvky různých SNPs přítomných v genomu najednou by se tedy mohly sčítat a výsledné projevy by mohly být snadněji detekovatelné než malé účinky jednotlivých bodových polymorfismů, které mohou být „přehlušeny“ působením jiných faktorů. Přístup k identifikaci rizikových SNPs se v současné době opravdu začíná měnit, neboť lze díky technologickým pokrokům získat více dat o genetické informaci z menších vzorků a za nižší cenu. Od hledání v jednotlivých genech se přechází k exomu a pomalu i k celému genomu, což by mohlo pomoci odhalit a vyhodnotit další rizikové bodové polymorfismy, případně i celkově lépe porozumět roli genetických faktorů v defektech nervové trubice (Molloy *et al.*, 2017).

6 Mechanismy prevence defektů nervové trubice pomocí folátu

Navzdory dlouholetému rozsáhlému výzkumu jsou přesné mechanismy, jakými folát pomáhá předejít vzniku defektů nervové trubice stále neznámé (Molloy *et al.*, 2017). V průběhu let však bylo alespoň nastíněno několik možností, jak by se tento jev dal vysvětlit.

6.1 Zajištění vstupu dostatečného množství folátu do buněk

Obecně je důležité, aby buňky měly k dispozici potřebné množství folátu k zajištění nejrůznějších buněčných procesů. Vyvíjející se embryo se skládá z mnoha buněk, jež mají zvýšené nároky na příjem folátu. V rychle rostoucích tkáních totiž dochází k velkému množství buněčných dělení a folát je využíván mimo jiné k syntéze nukleotidů pro replikaci DNA.

Folát vstupuje do savčích buněk například pomocí folátových receptorů. Jedním z nich je lidský folátový receptor 1 (FOLR1), homolog myšího proteinu vážícího folát 1 (Folbp1), který je specificky exprimován v různých tkáních a buňkách. Z pozorování proměnlivé exprese tohoto receptoru v čase i prostoru myšího embrya vyplývá, že je jeho funkce klíčová

pro uzavření nervové trubice. Během tohoto procesu je totiž víceméně postupně exprimován v místech, kde má dojít ke spojení neurálních valů. Navíc se zdá, že hraje roli i v následném vývoji centrální nervové soustavy a v růstu struktur odvozených od buněk neurální lišty (Saitou *et al.*, 2003), což podtrhuje důležitost tohoto folátového receptoru v embryogenezi. U myších embryí, jež měla inaktivovaný gen *Folbp1*, nedocházelo k uzavření nervové trubice a embrya předčasně zanikla *in utero* okolo 10. dne vývoje. Pokud však byla heterozygotním matkám těchto mláďat dodávána kyselina folinová v průběhu gestace, podařilo se fenotyp potomka zvrátit (Piedrahita *et al.*, 1999). Ačkoli se folátovou suplementací snížila i mortalita mláďat, část přeživších nadále zůstávala postižena malformacemi, přičemž jedno mládě mělo často více různých defektů zároveň. Přibližně polovina knock-out *Folbp1* mláďat, jejichž matky měly nízký příjem folátu ze suplementů, vykazovala defekty nervové trubice a více než polovina kraniofaciální malformace. Větší množství 5-MeTHF i 5-formylTHF ale pomohlo podobnou měrou snížit frekvenci těchto malformací a to tak, že čím vyšší byla mateřská dávka folátu, tím příznivější byl průběh vývoje embrya. Suplementace folátem se zdála být výhodná v období od početí po neurulaci (Spiegelstein *et al.*, 2004) a pomohla nejspíš proto, že se folát dostal do buněk embrya volnou difúzí (Saitou *et al.*, 2003). Tento princip by teoreticky mohl fungovat i u lidí s narušeným transportem folátu uskutečňovaného pomocí FOLR1, který má, podobně jako inaktivace genu *Folbp1* u myši, také souvislost s defekty nervové trubice, jak je uvedeno v následujícím odstavci.

Lidský FOLR1 ukotvený v membráně pomocí glykosylfosfatidylinositolu vykazuje vysokou afinitu k folátu a nachází se mimo jiné v placentě, kde hraje důležitou roli v transportu folátu z matčiny krve do placenty a plodu. Zdá se, že na základě zvýšené potřeby folátu v těhotenství je zahájena zvýšená exprese FOLR1 v placentě (Yasuda *et al.*, 2008). Autoprotilátky proti FOLR1, které mohou u citlivých matek vznikat, vytvořením komplexu s tímto receptorem zablokují vazbu folátu a jeho následný transport přes placentu k vyvíjejícímu se plodu. V pilotní studii byly tyto autoprotilátky identifikovány v krevním séru u devíti z dvanácti žen s těhotenstvím komplikovaným defekty nervové trubice (Rothenberg *et al.*, 2004). Větší čínská studie dále shledala, že čím vyšší koncentrace FOLR1 autoprotilátek byla v mateřském séru detekována, tím vyšší bylo i riziko vzniku defektů nervové trubice potomka, a to jak spiny bifidy, tak anencefalie (Yang *et al.*, 2016). Část defektů nervové trubice by tedy mohl mít na svědomí dysfunkční přenos folátu do buňky, způsobený zablokováním FOLR1 vazbou autoprotilátek. Autoři pilotní studie navrhuji dva způsoby, jakými by v tomto případě mohla fungovat suplementace kyselinou listovou: buď by kyselina listová po své redukci a methylaci využila ke vstupu do buňky místo FOLR1 přenašeč redukovaného folátu (RFC), jenž se rovněž

nachází v lidské placentě (Yasuda *et al.*, 2008), anebo by se kyseliny listové mohlo podařit vyvázat méně afinní autoprotilátky z FOLR1 (Rothenberg *et al.*, 2004).

6.2 Umožnění syntézy nukleotidů v potřebné míře

Jeden z mechanismů prevence pomocí kyseliny listové zdůrazňuje funkci folátu v buněčném 1C metabolismu a s ním spojenou syntézu nukleotidů *de novo* nezbytných k replikaci DNA. Pro rychle se dělicí buňky neuroepitelu embrya je klíčové mít k dispozici dostatek základních stavebních jednotek DNA a pokud tomu tak není, je možné, že se zpomalí replikace DNA v těchto buňkách a spolu s ní i vývoj neurálních valů, tzn. – nervová trubice se včas neuzavře a vzniknou tak defekty nervové trubice (Barber *et al.*, 1999). Je známo několik myších modelů defektů nervové trubice, které jsou v souladu s touto hypotézou. Příkladem může být myší embryo označované jako *Splotch* neboli skvrna podle fenotypu heterozygota pro gen *Pax3*, jenž má poruchu pigmentace pozorovatelnou jako bílé skvrny. Skvrny jsou způsobené absencí melanocytů odvozených od buněk neurální lišty, které do těchto oblastí migrují (Wlodarczyk *et al.*, 2006). Myší *Splotch* embryo homozygotní pro *Pax3* má narušenou syntézu pyrimidinů a defektům nervové trubice se u něj podařilo předejít dodáním kyseliny listové či thymidinu. Na druhou stranu po přidání methioninu došlo k rozvinutí defektů nervové trubice i u heterozygotů, kteří je normálně nemívají (Fleming and Copp, 1998). Methionin navíc vyvolal defekty kraniální oblasti nervové trubice i u outbredních myších embryí, a to nejspíš pomocí inhibice methylačního cyklu (Dunlevy *et al.*, 2006a) (viz kapitola 6.4). Taktéž v další studii zahrnující myší *Splotch* embryo byl pozorován nežádoucí vliv methioninu a byl potvrzen i protektivní účinek kyseliny listové a navíc i 5-MeTHF (Wlodarczyk *et al.*, 2006). Výsledky zkoumání *Splotch* modelu tedy naznačují, že by folát mohl napomáhat normálnímu průběhu neurulace zajištěním syntézy potřebného množství pyrimidinů. Tento mechanismus funguje zřejmě i u myšího embrya s nefunkčním genem pro enzym SHMT1, který za normálních okolností přispívá právě k syntéze pyrimidinů tvorbou 5,10-methylenTHF. Na rozdíl od *Splotch* homozygotů se však defekty nervové trubice u *Shmt1* homozygotů objevují pouze současně s nedostatečným příjmem folátu matky (Beaudin *et al.*, 2012). Rovněž bylo zjištěno, že prohloubení dysfunkce syntézy pyrimidinů vyřazením genu *Shmt1* u homozygotního *Splotch* embrya, má za následek vyšší frekvenci i závažnost defektů nervové trubice (Beaudin *et al.*, 2011). Znám je i myší model, u něhož jsou defekty nervové trubice embryí způsobeny inhibicí syntézy purinů *de novo*. Pro tento účel je nutný dostatek 10-formylTHF vytvářeného syntetázovou doménou enzymu MTHFD1, jejíž aktivita je u heterozygotních *Mthfd1S* myší snižena asi o 60 %. Úplná ztráta funkčnosti této domény u homozygotů má za následek

zpoždění embryonálního vývoje, včetně neuzavření nervové trubice, a je letální po deseti a půl dnech gestace. Zajímavé také je, že mateřský heterozygotní genotyp *Mthfd1S* +/- byl spojen s častějším výskytem vývojových abnormalit embrya než wt genotyp. Tento fakt je přičítán redukované syntéze purinů, v důsledku nedostatku 10-formylTHF, která vede k inhibici buněčné proliferace (Christensen *et al.*, 2013). *Mthfd1S* heterozygotní myš by mohla být dobrým modelem pro lidské jedince homozygotní pro výše zmíněný polymorfismus *MTHFD1* G1958A (Christensen *et al.*, 2013), jehož výsledkem je také snížená aktivita syntetázové domény a s ní související redukce syntézy purinů. Naznačen byl i kladný vliv folátu, neboť se pomocí něj podařilo zabránit teplem indukované ztrátě aktivity syntetázové domény mutantního enzymu MTHFD1 (Christensen *et al.*, 2009). Folát by tedy mohl pomáhat předcházet defektům nervové trubice korekcí syntézy pyrimidinů i purinů *de novo* a některé poznatky z myších modelů by nejspíš mohly být využity i k objasnění defektů nervové trubice u člověka. Je třeba však brát na vědomí, že myší modely mají většinou inaktivovaný pouze jeden gen, kdežto povaha defektů nervové trubice u člověka je multifaktoriální tzn., že je často zapojeno více genů najednou.

6.3 Snížení hladiny homocysteinu v krvi

Snížení hladiny homocysteinu v krevním oběhu pomocí folátu je dalším mechanismem jeho protektivního účinku. Kouzlo tkví v tom, že při dostatku 5-MeTHF lze homocystein bez problémů remetylovat na methionin enzymem MS, a proto ho ubývá. Toho se využívá například u prevence potratů, k nimž hyperhomocysteinémie přispívá především poškozením cév. U defektů nervové trubice se zdá být role homocysteinu o něco problematičtější.

Vzhledem k tomu, že byla u matek dětí s defekty nervové trubice pozorována zvýšená hladina homocysteinu v plasmě (van der Put *et al.*, 1997), nabízí se možnost, že příčinou těchto defektů by mohly být toxické účinky nahromaděného homocysteinu. Za jeden z potenciálních mechanismů toxicity homocysteinu by se dalo považovat například jeho působení na N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory, jež může vést k poškození neuronů (Lipton *et al.*, 1997). Jako další možný způsob toxického působení se jeví zabudovávání homocysteinu do proteinů, což podporuje výzkum z roku 2016 provedený na březích myších s nedostatečným příjmem folátu. Zvýšená hladina homocysteinu v krevním séru vyvolaná nedostatkem folátu vedla k homocysteinylaci proteinů a takto pozměněné proteiny byly pravděpodobně rozpoznány imunitním systémem myši a začaly se proti nim vytvářet autoprotilátky. Koncentrace autoprotilátek přitom korelovala s hladinou sérového homocysteinu. V průběhu gestace se podařilo dosáhnout i normalizace těchto hodnot přechodem ke stravě bohaté na folát, čímž

se zároveň předešlo výskytu vrozených vad včetně defektů nervové trubice (Denny *et al.*, 2016). Je možné, že homocysteinylace je také důvodem vzniku autoprotilátek proti FOLR1 u člověka (viz kapitola 6.1).

Zda je toxicita homocysteinu skutečně příčinou vzniku defektů nervové trubice bylo testováno v průběhu několika let na různých modelových organismech. Výsledky studie provedené na ptačích embryích podporují přímý teratogenní účinek homocysteinu, neboť u některých embryí vystavených homocysteinu během vývoje došlo k indukci defektů nervové trubice. Tomu se podařilo předejít současným dodáním folátu, jenž zabránil příliš velkému vzestupu hladiny homocysteinu v séru embrya (Rosenquist *et al.*, 1996). Embryotoxicita homocysteinu byla patrná i u myších embryí, jelikož měla za následek vývojové abnormality, zvýšenou letalitu a zpomalení vývoje, nicméně ke zvýšení výskytu defektů nervové trubice nevedla (Greene *et al.*, 2003). Indukce defektů nervové trubice homocysteinem se nezdařila ani v další studii, kde bylo použito více různých myších kmenů kvůli možným rozdílům v náchylnosti na účinky homocysteinu. Jedním z nich byl i zmiňovaný *Spotch* myší model, u něhož se četnost defektů nervové trubice podáním homocysteinu březí matce také nepovedla zvýšit (Bennett *et al.*, 2006). A co víc, ani hyperhomocysteinémie u knock-out *Mthfr* myši nevedla k defektům nervové trubice, nicméně byly u nich nalezeny abnormality mozečku (Chen *et al.*, 2001). Poznatky z těchto studií spolu s přihlédnutím k tomu, že myš jakožto savec vystihuje procesy probíhající u člověka o něco lépe než ptačí model, naznačují, že homocystein pravděpodobně nebude přímou příčinou defektů nervové trubice u myši ani u člověka. Podobný závěr vyplývá i ze studií provedených na lidech. Matky homozygotní pro *MTHFR* C677T měly sice vyšší hladinu homocysteinu v plasmě než matky heterozygotní nebo s wt genotypem, ale nebyl rozdíl v tom, jestli se jednalo o matky potomků s anencefalií nebo bez poškození. Interakce mezi množstvím homocysteinu v plasmě a *MTHFR* 677C>T, která by ovlivňovala riziko vzniku anencefalie, tedy nebyla nalezena (Lacasaña *et al.*, 2012). Rizikové polymorfismy *MTRR* A66G a *MTHFD1* G1958A dokonce nebyly spojeny se změnou hladiny homocysteinu vůbec (Hol *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1999), což naznačuje využití jiných způsobů, jimiž přispívají ke vzniku defektů nervové trubice.

Jakou roli tedy hraje hyperhomocysteinémie, jestliže přímo nezpůsobuje vznik defektů nervové trubice? Přítomnost zvýšeného množství homocysteinu v krvi by jednoduše mohla poukazovat na poškození methylačního cyklu a sloužit tak jako nepřímý ukazatel narušení methylačních reakcí (Chen *et al.*, 2001; Greene *et al.*, 2003). Kromě hyperhomocysteinémie totiž způsobil knock-out genu *Mthfr* u myši i zvýšení SAH a snížení SAM, donora methylových skupin, což následně vedlo ke globální hypomethylaci DNA. Tohoto myšího modelu by se tak

mohlo využít i dále ke studiu změn způsobených hypomethylací DNA (Chen *et al.*, 2001). Nižší methylační kapacita daná sníženým poměrem SAM:SAH byla pozorována spolu s nízkou hladinou folátu i v plasmě žen, jejichž potomci trpěli defekty nervové trubice (Cai *et al.*, 2019).

6.4 Dostupnost methylových skupin pro methylační reakce

Princip prevence folátové suplementace by se mohl skrývat i ve stimulaci methylačního cyklu, čímž se zajistí dostupnost methylových skupin pro rozmanité methylační reakce.

Průběhu transmethylačních reakcí nebrání jen nedostatek SAM, univerzálního donora methylových skupin, nýbrž i zvýšené množství SAH fungujícího jako inhibitor methyltransferáz. Poměr SAM:SAH tudíž slouží k vyjádření methylační kapacity. SAH přitom vzniká ze SAM v průběhu transmethylačních reakcí a poté je přeměňován na homocystein. Enzym, který tuto přeměnu provádí, ale preferuje opačný směr reakce. Zvýšená hladina homocysteinu tedy přispívá k tvorbě SAH a tím i k inhibici methylačních reakcí. Důležitost methylace v uzavírání nervové trubice byla demonstrována použitím inhibitorů methylačního cyklu. U kuřecího embrya vyvolaly tři různé inhibitory methylačního cyklu zvýšení SAH a snížení poměru SAM:SAH, což mělo za následek zpoždění uzavírání anteriorní části nervové trubice (Afman *et al.*, 2005). Funkční methylační cyklus je klíčový i pro savčí neurulaci, jak bylo ukázáno na myším embryu opět pomocí inhibitorů tohoto cyklu. V tomto případě se jednalo o ethionin a cykloleucin, jež zabraňují vzniku SAM. Vlivem těchto dvou aminokyselin došlo k trvalému selhání v uzavření kraniální části nervové trubice bez jiných morfologických abnormalit nebo zpoždění vývoje, což naznačuje určitou specifickou účinnost těchto inhibitorů (Dunlevy *et al.*, 2006b). Defekty nervové trubice by tedy mohly být způsobeny sníženou dostupností methylových skupin pro methylaci důležitých oblastí DNA a proteinů, které ovlivňují správné uzavření nervové trubice.

6.4.1 Methylace proteinů

Během uzavírání nervové trubice byly u embrya potkana jedny z nejvíce syntetizovaných proteinů aktin a tubulin, jež jsou v této době také methylovány. Tyto cytoskeletální proteiny se podílí na morfologii buněk a zdá se, že hrají roli i v uzavírání nervové trubice – aktin i tubulin je přítomen ve špičkách neurálních valů (Moephuli *et al.*, 1997) a aktinová mikrofilamenta jsou důležitá pro uzavření kraniální části nervové trubice myši (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999). Pokud byla embrya potkana kultivována bez methioninu, což pravděpodobně zabránilo methylaci aktinu a tubulinu, jejich nervová trubice se neuzavřela a buňky neuroepitelu ztratily svůj obvyklý sloupcovitý tvar (Moephuli *et al.*, 1997).

6.4.2 Methylace DNA

DNA savců je methylována zejména na cytosinu v CpG (5' – cytosin – fosfát – guanin – 3') dinukleotidech pomocí DNA methyltransferáz, jež využívají SAM jako donora methylových skupin. Jedná se o vratnou kovalentní modifikaci, která patří mezi epigenetické mechanismy regulující genovou expresi. Methylace DNA tudíž nemění její sekvenci, je dědičná a obvykle slouží k potlačení transkripce. Právě regulace exprese genů, jak v čase, tak v prostoru, je pro neurulaci nesmírně důležitá a zdá se tedy, že ke vzniku defektů nervové trubice může dojít změnou exprese genů uplatňujících se při uzavírání nervové trubice. Tuto možnost podporuje i fakt, že inhibicí methylačních reakcí nebylo u kuřecích embryí jen zpomaleno uzavírání anteriorní části nervové trubice, ale byly u nich pozorovány i změny v genové expresi (van der Linden *et al.*, 2008). Významnost methylace DNA v savčím vývoji dokládá například studie, jež se zabývala DNA methyltransferázami Dnmt3a a Dnmt3b. Bylo zjištěno, že tyto methyltransferázy jsou zodpovědné za metylaci genomové DNA *de novo*, která probíhá časně v embryogenezi a je podstatná pro další vývoj embrya. Současná inaktivace genů *Dnmt3a* a *Dnmt3b* u myších embryí, jež zablokovala metylaci *de novo*, tak vedla ke vzniku vývojových defektů a byla pro embrya letální. Mutace v genu *DNMT3B* měla navíc nepříznivý dopad i na zdravotní stav člověka (Okano *et al.*, 1999). Studie methylace genomu provedená na DNA leukocytů lidí postižených spinou bifidou odhalila změny methylace 75 CpG dinukleotidů ve 45 genech. Nejvýznamnější hypomethylace CpG míst spolu se zvýšenou genovou expresí se přitom týkala genu *SOX18*, jenž hraje roli v neurulaci. Hypomethylace tohoto lokusu však byla nalezena i u zdravých sourozenců, což naznačuje, že ke vzniku defektů nervové trubice samotná změna epigenetické modifikace v genu *SOX18* nestačila a je proto nutné spolupůsobení dalších faktorů. Přesto byl gen *SOX18* označen za rizikový pro vznik defektů nervové trubice (Rochtus *et al.*, 2016). Jak již bylo uvedeno výše, za rizikový faktor těchto defektů je považován i polymorfismus *MTHFR* C677T, jenž byl rovněž spojen se sníženou metylací genomové DNA (Friso *et al.*, 2002). Epigenetické značení genu *SOX18* však přítomností tohoto polymorfismu nebylo ovlivněno (Rochtus *et al.*, 2016). Pokles v množství methylovaných cytosinů byl přítomen pouze u *MTHFR* 677TT homozygotů, kteří měli zároveň nízkou hladinu folátu v plasmě a erytrocytech. Míra methylace genomové DNA tedy pozitivně korelovala s množstvím folátu (Friso *et al.*, 2002), což podporuje fakt, že folát může mít vliv na genovou expresi skrze zajišťování methylových skupin pro epigenetické značení DNA. Význam mateřské výživy, včetně příjmu folátu, v období okolo početí a její vliv na metylaci DNA zdůraznila studie provedená na gambijských venkovských ženách a jejich dětech. V období dešťů měly tyto ženy vyšší hladinu folátu a dle poměru SAM:SAH i vyšší

methylační kapacitu než v období sucha, což se projevilo i vyšší mírou methylace DNA dětí počatých v období dešťů. Naopak nižší methylace DNA potomka se dala předvídat mimo jiné na základě hyperhomocysteinémie matek, která se objevovala v období sucha spolu s nižší hladinou folátu (Dominguez-Salas *et al.*, 2014).

Z výsledků uvedených studií je patrné, že propojení folátu s defekty nervové trubice přes ovlivňování methylačních reakcí je vskutku možné a současný výzkum, s výhodou využívající epigenomového přístupu, tuto oblast hlouběji propátrává. Působení folátu na metylaci DNA se přitom jeví jako poměrně obecný mechanismus. Folát by tímto způsobem mohl ovlivňovat i mnoho jiných procesů, než je uzavírání nervové trubice, a podílet se i na vzniku různých chorob spojených s abnormální regulací genové exprese. V poslední době je také hojně zkoumán vliv příjmu folátu v těhotenství na kognici dítěte a bylo například zjištěno, že suplementace kyselinou listovou pokračující i v průběhu 2. a 3. trimestru ovlivnila metylaci genů spojených s vývojem a funkcí mozku (Caffrey *et al.*, 2018).

7 Závěr

Tato bakalářská práce podtrhuje význam příjmu dostatečného množství folátu během těhotenství pro správný průběh vývoje embrya. Jednou z možností navýšení příjmu folátu jsou doplňky stravy, při jejichž výběru se zdá být vhodnější volbou 5-MeTHF s komerčním označením Metafolin, namísto dříve hojně používané kyseliny listové.

Poznatky z nejnovějších studií zabývajících se asociací potratů se SNPs v genu pro *MTHFR* u člověka naznačují, že za rizikový faktor vzniku potratů by mohl být považován pouze *MTHFR* C677T, nikoli *MTHFR* A1298C. Navíc se zdá, že by folátová suplementace mohla sloužit nejen k prevenci defektů nervové trubice, ale i k prevenci potratů. Protektivním působením folátu by v tomto případě mohlo být snížení hladiny homocysteinu v krvi, jelikož jeho akumulace má negativní vliv na cévy.

Ačkoli si výsledky nejnovějších asociačních studií velmi protirečí, bodový polymorfismus *MTHFR* C677T by mohl být i mateřským rizikovým faktorem pro vznik defektů nervové trubice, spolu s *MTRR* A66G a *MTHFDI* G1958A. Výzkum se v této oblasti začíná ubírat směrem zahrnující pátrání v celém genomu, interakce mezi živinou a genem a interakce mezi geny. Očekává se objevení dalších rizikových SNPs a hlubší pochopení problematiky defektů nervové trubice. Příčiny těchto defektů, jakož i příčiny mnoha potratů totiž stále zůstávají neznámými.

I přes rozsáhlý výzkum se dosud nepodařilo objasnit ani přesné mechanismy, jimiž folát pomáhá v prevenci defektů nervové trubice. Lépe řečeno potenciální mechanismy již navržený

byly, ale není jasné, který z nich je relevantnější. Je známo, že nedostatek folátu bývá spojen se zvýšenou hladinou homocysteinu i se změnami v methylovači DNA. Jako lákavé možnosti protektivního účinku folátu se tedy jeví snížení hladiny homocysteinu či poskytnutí methylových skupin pro methylační reakce. Toxický vliv homocysteinu se sice nezdá být až tak příčinou defektů nervové trubice, nicméně autoprotilátky proti homocysteinylovaným proteinům byly spojeny se vznikem těchto defektů. Jak je ukázáno na myším modelu, dalším protektivním mechanismem by mohlo být i zajištění syntézy nukleotidů v takové míře, jaká je nutná pro probíhající buněčná dělení. Nejvíce je ale v současnosti zkoumán vliv folátu na methylovači DNA včetně exprese konkrétních genů. Opět je zde přitom vidět posun k informačně obsáhlejšími studiím, jež tentokrát berou v potaz celý epigenom. Je samozřejmě možné, že k prevenci pomocí folátu přispívají všechny uvedené mechanismy. Podíl jednotlivých procesů je patrně dost individuální a odvíjí se od stavu genetické informace jedince, jako je přítomnost bodových polymorfismů a epigenetických značek.

Vzhledem k tomu, že nezbytný příjem folátu může být pro lidi s narušeným metabolismem folátu vyšší, než je běžně doporučováno, například kvůli *MTHFR* C677T, otevírá se zde možnost určitého druhu personalizované medicíny. Sekvenací DNA pacienta a vyhodnocením krevní koncentrace látek spojených s metabolismem folátu, by mu tak možná v budoucnu mohla být doporučena optimální denní dávka folátu, tzv. „na míru“.

Oblast týkající se příjmu folátu během těhotenství a jeho roli v embryonálním vývoji je tedy nadále studována, přičemž největší pozornost je nyní věnována vlivu folátu na epigenetické mechanismy a vypadá to, že mateřský příjem folátu by tímto způsobem mohl ovlivnit i zdraví potomka v dospělosti. Zdá se proto, že pole působnosti folátu je ještě širší a další výzkumy snad povedou k vyjasnění a hlubšímu pochopení této spletité problematiky.

8 Seznam literatury

Hvězdičkou * jsou označeny shrnující články.

Afman, L. A., Blom, H. J., Driittij, M. J., Brouns, M. R., and van Straaten, H. W. (2005). Inhibition of transmethylačion disturbs neurulation in chick embryos. *Brain research. Developmental brain research*, 158(1-2), 59–65.

Barber, R. C., Lammer, E. J., Shaw, G. M., Greer, K. A., and Finnell, R. H. (1999). The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. *Molecular genetics and metabolism*, 66(1), 1–9.*

Beaudin, A. E., Abarinov, E. V., Noden, D. M., Perry, C. A., Chu, S., Stabler, S. P., Allen, R. H., and Stover, P. J. (2011). Shmt1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice. *The American journal of clinical nutrition*, 93(4), 789–798.

Beaudin, A. E., Abarinov, E. V., Malysheva, O., Perry, C. A., Caudill, M., and Stover, P. J. (2012). Dietary folate, but not choline, modifies neural tube defect risk in *Shmt1* knockout mice. *The American journal of clinical nutrition*, 95(1), 109–114.

Bennett, G. D., Vanwaeles, J., Moser, K., Chaudoin, T., Starr, L., and Rosenquist, T. H. (2006). Failure of homocysteine to induce neural tube defects in a mouse model. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 77(2), 89–94.

Blom, H. J., Shaw, G. M., den Heijer, M., and Finnell, R. H. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(9), 724–731.*

Bodnar, L. M., Himes, K. P., Venkataramanan, R., Chen, J. Y., Evans, R. W., Meyer, J. L., and Simhan, H. N. (2010). Maternal serum folate species in early pregnancy and risk of preterm birth. *The American journal of clinical nutrition*, 92(4), 864–871.

Botto, N., Andreassi, M. G., Manfredi, S., Masetti, S., Cocci, F., Colombo, M. G., Storti, S., Rizza, A., and Biagini, A. (2003). Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *European journal of human genetics: EJHG*, 11(9), 671–678.

Caffrey, A., Irwin, R. E., McNulty, H., Strain, J. J., Lees-Murdock, D. J., McNulty, B. A., Ward, M., Walsh, C. P., and Pentieva, K. (2018). Gene-specific DNA methylation in newborns in response to folic acid supplementation during the second and third trimesters of pregnancy: epigenetic analysis from a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 107(4), 566–575.

Cai, C. Q., Fang, Y. L., Shu, J. B., Zhao, L. S., Zhang, R. P., Cao, L. R., Wang, Y. Z., Zhi, X. F., Cui, H. L., Shi, O. Y., and Liu, W. (2019). Association of neural tube defects with maternal alterations and genetic polymorphisms in one-carbon metabolic pathway. *Italian journal of pediatrics*, 45(1), 37.

Callejón, G., Mayor-Olea, A., Jiménez, A. J., Gaitán, M. J., Palomares, A. R., Martínez, F., Ruiz, M., and Reyes-Engel, A. (2007). Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(12), 3249–3254.

Chango, A., Boisson, F., Barbé, F., Quilliot, D., Droesch, S., Pfister, M., Fillon-Emery, N., Lambert, D., Frémont, S., Rosenblatt, D. S., and Nicolas, J. P. (2000). The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *The British journal of nutrition*, 83(6), 593–596.

Chen, Z., Karaplis, A. C., Ackerman, S. L., Pogribny, I. P., Melnyk, S., Lussier-Cacan, S., Chen, M. F., Pai, A., John, S. W., Smith, R. S., Bottiglieri, T., Bagley, P., Selhub, J., Rudnicki, M. A., James, S. J., and Rozen, R. (2001). Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human molecular genetics*, 10(5), 433–443.

Christensen, K. E., Rohlicek, C. V., Andelfinger, G. U., Michaud, J., Bigras, J. L., Richter, A., Mackenzie, R. E., and Rozen, R. (2009). The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Human mutation*, 30(2), 212–220.

Christensen, K. E., Deng, L., Leung, K. Y., Arning, E., Bottiglieri, T., Malysheva, O. V., Caudill, M. A., Krupenko, N. I., Greene, N. D., Jerome-Majewska, L., MacKenzie, R. E., and Rozen, R. (2013). A novel mouse model for genetic variation in 10-formyltetrahydrofolate

synthetase exhibits disturbed purine synthesis with impacts on pregnancy and embryonic development. *Human molecular genetics*, 22(18), 3705–3719.

Czeizel, A. E., and Dudás, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England journal of medicine*, 327(26), 1832–1835.

Del Gobbo, G. F., Price, E. M., Hanna, C. W., and Robinson, W. P. (2018). No evidence for association of *MTHFR* 677C>T and 1298A>C variants with placental DNA methylation. *Clinical epigenetics*, 10, 34.

Dell'Edera, D., L'Episcopia, A., Simone, F., Lupo, M. G., Epifania, A. A., and Allegretti, A. (2018). Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Biomedical reports*, 8(2), 172–175.

Denny, K. J., Kelly, C. F., Kumar, V., Witham, K. L., Cabrera, R. M., Finnell, R. H., Taylor, S. M., Jeanes, A., and Woodruff, T. M. (2016). Autoantibodies against homocysteinylated protein in a mouse model of folate deficiency-induced neural tube defects. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 106(3), 201–207.

Dominguez-Salas, P., Moore, S. E., Baker, M. S., Bergen, A. W., Cox, S. E., Dyer, R. A., Fulford, A. J., Guan, Y., Laritsky, E., Silver, M. J., Swan, G. E., Zeisel, S. H., Innis, S. M., Waterland, R. A., Prentice, A. M., and Hennig, B. J. (2014). Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nature communications*, 5, 3746.

Du, B., Shi, X., Yin, C., and Feng, X. (2019). Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase in recurrent pregnancy loss: an overview of systematic reviews and meta-analyses. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(7), 1315–1328.*

Dunlevy, L. P., Burren, K. A., Chitty, L. S., Copp, A. J., and Greene, N. D. (2006a). Excess methionine suppresses the methylation cycle and inhibits neural tube closure in mouse embryos. *FEBS letters*, 580(11), 2803–2807.

Dunlevy, L. P., Burren, K. A., Mills, K., Chitty, L. S., Copp, A. J., and Greene, N. D. (2006b). Integrity of the methylation cycle is essential for mammalian neural tube closure. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 76(7), 544–552.

Etheredge, A. J., Finnell, R. H., Carmichael, S. L., Lammer, E. J., Zhu, H., Mitchell, L. E., and Shaw, G. M. (2012). Maternal and infant gene-folate interactions and the risk of neural tube defects. *American journal of medical genetics. Part A*, 158A(10), 2439–2446.

Fleming, A., and Copp, A. J. (1998). Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5372), 2107–2109.

Friso, S., Choi, S. W., Girelli, D., Mason, J. B., Dolnikowski, G. G., Bagley, P. J., Olivieri, O., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., Corrocher, R., and Selhub, J. (2002). A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5606–5611.

Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J., den Heijer, M., Kluijtmans, L. A., van den Heuvel, L. P. and Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*, 10(1), 111–113.

Gaiday, A. N., Tussupkaliyev, A. B., Bermagambetova, S. K., Zhumagulova, S. S., Sarsembayeva, L. K., Dossimbetova, M. B., and Daribay, Z. Z. (2018). Effect of homocysteine on pregnancy: a systematic review. *Chemico-biological interactions*, 293, 70–76.*

Gaskins, A. J., Rich-Edwards, J. W., Hauser, R., Williams, P. L., Gillman, M. W., Ginsburg, E. S., Missmer, S. A., and Chavarro, J. E. (2014). Maternal prepregnancy folate intake and risk of spontaneous abortion and stillbirth. *Obstetrics and gynecology*, 124(1), 23–31.

Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., Duncan, A. M., Rosenblatt, D. S., Matthews, R. G., and Rozen, R. (1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature genetics*, 7(2), 195–200.

Graham, I. M., Daly, L. E., Refsum, H. M., Robinson, K., Brattström, L. E., Ueland, P. M., Palma-Reis, R. J., Boers, G. H., Sheahan, R. G., Israelsson, B., Uiterwaal, C. S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Wittteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J. C., de Valk, H. W., Sales Lúis, A. C., ... and Andria, G. (1997). Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*, 277(22), 1775–1781.

Greenberg, J. A., Bell, S. J., Guan, Y., and Yu, Y. H. (2011). Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 4(2), 52–59.*

Greene, N. D., Dunlevy, L. P., and Copp, A. J. (2003). Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. *Anatomy and embryology*, 206(3), 185–191.

Guéant, J. L., Namour, F., Guéant-Rodriguez, R. M., and Daval, J. L. (2013). Folate and fetal programming: a play in epigenomics?. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24(6), 279–289.*

Henderson, A. M., Aleliunas, R. E., Loh, S. P., Khor, G. L., Harvey-Leeson, S., Glier, M. B., Kitts, D. D., Green, T. J., and Devlin, A. M. (2018). L-5-methyltetrahydrofolate supplementation increases blood folate concentrations to a greater extent than folic acid supplementation in Malaysian women. *The Journal of nutrition*, 148(6), 885–890.

Hol, F. A., van der Put, N. M., Geurds, M. P., Heil, S. G., Trijbels, F. J., Hamel, B. C., Mariman, E. C., and Blom, H. J. (1998). Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clinical genetics*, 53(2), 119–125.

Imbard, A., Benoist, J. F., and Blom, H. J. (2013). Neural tube defects, folic acid and methylation. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 4352–4389.*

Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Borja-Aburto, V. H., Aguilar-Garduño, C., Rodríguez-Barranco, M., Sierra-Ramirez, J. A., Galaviz-Hernandez, C., Gonzalez-Alzaga, B., and Garcia-Cavazos, R. (2012). Effect on risk of anencephaly of gene-nutrient interactions between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and maternal folate, vitamin B12 and homocysteine profile. *Public health nutrition*, 15(8), 1419–1428.

Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H. H., Rommens, J. M., Scherer, S. W., Rosenblatt, D. S., and Gravel, R. A. (1998). Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with

homocystinuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3059–3064.

van der Linden, I. J., Afman, L. A., Heil, S. G., and Blom, H. J. (2006). Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 65(2), 204–215.*

van der Linden, I. J., Heil, S. G., van Egmont Petersen, M., van Straaten, H. W., den Heijer, M., and Blom, H. J. (2008). Inhibition of methylation and changes in gene expression in relation to neural tube defects. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 82(10), 676–683.

Lipton, S. A., Kim, W. K., Choi, Y. B., Kumar, S., D'Emilia, D. M., Rayudu, P. V., Arnelle, D. R., and Stamler, J. S. (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), 5923–5928.

Liu, Y., Zhang, F., and Dai, L. (2019). C677T polymorphism increases the risk of early spontaneous abortion. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(8), 1737–1741.

Mo, H., Rao, M., Wang, G., Long, Y. X., Wang, H. W., and Tang, L. (2019). Polymorphism of MTHFR 1298A>C in relation to adverse pregnancy outcomes in Chinese populations. *Molecular genetics and genomic medicine*, 7(5), e642.

Moephuli, S. R., Klein, N. W., Baldwin, M. T., and Krider, H. M. (1997). Effects of methionine on the cytoplasmic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), 543–548.

Molloy, A. M., Daly, S., Mills, J. L., Kirke, P. N., Whitehead, A. S., Ramsbottom, D., Conley, M. R., Weir, D. G., and Scott, J. M. (1997). Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet (London, England)*, 349(9065), 1591–1593.

Molloy, A. M., Pangilinan, F., and Brody, L. C. (2017). Genetic risk factors for folate-responsive neural tube defects. *Annual review of nutrition*, 37, 269–291.*

Morales de Machín, A., Méndez, K., Solís, E., Borjas de Borjas, L., Bracho, A., Hernández, M. L., Negrón, A., Delgado, W., and Sánchez, Y. (2015). Polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en madres de niños afectados con defectos del tubo neural [C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mothers of children affected with neural tube defects]. *Investigacion clinica*, 56(3), 284–295.

MRC Vitamin Study Research Group. (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet (London, England)*, 338(8760), 131–137.

Mutchinick, O. M., López, M. A., Luna, L., Waxman, J., and Babinsky, V. E. (1999). High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Molecular genetics and metabolism*, 68(4), 461–467.

Naninck, E., Stijger, P. C., and Brouwer-Brolsma, E. M. (2019). The importance of maternal folate status for brain development and function of offspring. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(3), 502–519.*

Nasri, K., Midani, F., Kallel, A., Ben Jemaa, N., Aloui, M., Boulares, M., Lassoued, M., Ben Halima, M., Ben Wafi, S., Soussi, M., Mahjoubi, I., Baara, A., Ben Fradj, M. K., Omar, S., Feki, M., Jemaa, R., Gaigi, S. S., and Marrakchi, R. (2019). Association of MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and MTRR A66G polymorphisms with neural tube defects in Tunisian parents. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 86(4), 190–200.

Nefic, H., Mackic-Djurovic, M., and Eminovic, I. (2018). The frequency of the 677C>T and 1298A>C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in the population. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 72(3), 164–169.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–257.

Park, W. C., and Chang, J. H. (2014). Clinical implications of methylenetetrahydrofolate reductase mutations and plasma homocysteine levels in patients with thromboembolic occlusion. *Vascular specialist international*, 30(4), 113–119.

Piedrahita, J. A., Oetama, B., Bennett, G. D., van Waes, J., Kamen, B. A., Richardson, J., Lacey, S. W., Anderson, R. G., and Finnell, R. H. (1999). Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nature genetics*, 23(2), 228–232.

van der Put, N. M., Steegers-Theunissen, R. P., Frosst, P., Trijbels, F. J., Eskes, T. K., van den Heuvel, L. P., Mariman, E. C., den Heyer, M., Rozen, R., and Blom, H. J. (1995). Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet (London, England)*, 346(8982), 1070–1071.

van der Put, N. M., Thomas, C. M., Eskes, T. K., Trijbels, F. J., Steegers-Theunissen, R. P., Mariman, E. C., De Graaf-Hess, A., Smeitink, J. A., and Blom, H. J. (1997). Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, 90(8), 505–510.

van der Put, N. M., Gabreëls, F., Stevens, E. M., Smeitink, J. A., Trijbels, F. J., Eskes, T. K., van den Heuvel, L. P., and Blom, H. J. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *American journal of human genetics*, 62(5), 1044–1051.

Ray, J. G., Meier, C., Vermeulen, M. J., Boss, S., Wyatt, P. R., and Cole, D. E. (2002). Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *Lancet (London, England)*, 360(9350), 2047–2048.

Rochtus, A., Winand, R., Laenen, G., Vangeel, E., Izzi, B., Wittevrongel, C., Moreau, Y., Verpoorten, C., Jansen, K., Van Geet, C., and Freson, K. (2016). Methylome analysis for spina bifida shows *SOX18* hypomethylation as a risk factor with evidence for a complex (epi)genetic interplay to affect neural tube development. *Clinical epigenetics*, 8, 108.

Rosenquist, T. H., Ratashak, S. A., and Selhub, J. (1996). Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15227–15232.

Rothenberg, S. P., da Costa, M. P., Sequeira, J. M., Cracco, J., Roberts, J. L., Weedon, J., and Quadros, E. V. (2004). Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *The New England journal of medicine*, 350(2), 134–142.

Saitsu, H., Ishibashi, M., Nakano, H., and Shiota, K. (2003). Spatial and temporal expression of folate-binding protein 1 (Fbp1) is closely associated with anterior neural tube closure in mice. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 226(1), 112–117.

Scaglione, F., and Panzavolta, G. (2014). Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 44(5), 480–488.*

Serapinas, D., Boreikaite, E., Bartkeviciute, A., Bandzeviciene, R., Silkunas, M., and Bartkeviciene, D. (2017). The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 72, 159–163.

Spiegelstein, O., Mitchell, L. E., Merriweather, M. Y., Wicker, N. J., Zhang, Q., Lammer, E. J., and Finnell, R. H. (2004). Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 231(1), 221–231.

Steele, J. W., Kim, S. E., and Finnell, R. H. (2020). One-carbon metabolism and folate transporter genes: do they factor prominently in the genetic etiology of neural tube defects?. *Biochimie*, S0300-9084(20)30033-X.*

Tamura, T., and Picciano, M. F. (2006). Folate and human reproduction. *The American journal of clinical nutrition*, 83(5), 993–1016.*

US Preventive Services Task Force, Bibbins-Domingo, K., Grossman, D. C., Curry, S. J., Davidson, K. W., Epling, J. W., Jr, García, F. A., Kemper, A. R., Krist, A. H., Kurth, A. E., Landefeld, C. S., Mangione, C. M., Phillips, W. R., Phipps, M. G., Pignone, M. P., Silverstein, M., and Tseng, C. W. (2017). Folic acid supplementation for the prevention of neural tube defects: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*, 317(2), 183–189.*

Venn, B. J., Green, T. J., Moser, R., McKenzie, J. E., Skeaff, C. M., and Mann, J. (2002). Increases in blood folate indices are similar in women of childbearing age supplemented with [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid. *The Journal of nutrition*, 132(11), 3353–3355.

Wang, Y., Liu, Y., Ji, W., Qin, H., Wu, H., Xu, D., Turtuohut, T., and Wang, Z. (2015). Variants in MTHFR gene and neural tube defects susceptibility in China. *Metabolic brain disease*, 30(4), 1017–1026.

Wilcken, B., Bamforth, F., Li, Z., Zhu, H., Ritvanen, A., Renlund, M., Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B., Czeizel, A. E., Gelman-Kohan, Z., Scarano, G., Bianca, S., Ettore, G., Tenconi, R., Bellato, S., Scala, I., Mutchinick, O. M., López, M. A., de Walle, H., ... Botto, L. D. (2003). Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *Journal of medical genetics*, 40(8), 619–625.

Wilson, A., Platt, R., Wu, Q., Leclerc, D., Christensen, B., Yang, H., Gravel, R. A., and Rozen, R. (1999). A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Molecular genetics and metabolism*, 67(4), 317–323.

Wlodarczyk, B. J., Tang, L. S., Triplett, A., Aleman, F., and Finnell, R. H. (2006). Spontaneous neural tube defects in splotch mice supplemented with selected micronutrients. *Toxicology and applied pharmacology*, 213(1), 55–63.

Xu, Y., Ban, Y., Ran, L., Yu, Y., Zhai, S., Sun, Z., Zhang, J., Zhang, M., Hong, T., Liu, R., Ren, L., and Hu, L. (2019). Relationship between unexplained recurrent pregnancy loss and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Fertility and sterility*, 111(3), 597–603.

Yadav, U., Kumar, P., Yadav, S. K., Mishra, O. P., and Rai, V. (2015). "Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects: an updated meta-analysis". *Metabolic brain disease*, 30(1), 7–24.*

Yang, Y., Chen, J., Wang, B., Ding, C., and Liu, H. (2015). Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: a comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 103(6), 488–500.

Yang, N., Wang, L., Finnell, R. H., Li, Z., Jin, L., Zhang, L., Cabrera, R. M., Ye, R., and Ren, A. (2016). Levels of folate receptor autoantibodies in maternal and cord blood and risk of neural tube defects in a Chinese population. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 106(8), 685–695.

Yasuda, S., Hasui, S., Yamamoto, C., Yoshioka, C., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., and Iseki, K. (2008). Placental folate transport during pregnancy. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(9), 2277–2284.

Ybot-Gonzalez, P., and Copp, A. J. (1999). Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 215(3), 273–283.

Yu, Y., Wang, F., Bao, Y., Lu, X., Quan, L., and Lu, P. (2014). Association between MTHFR gene polymorphism and NTDs in Chinese Han population. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(9), 2901–2906.

Zarfeshan Fard, Y., Kooshkaki, O., Kordi Tammandani, D., and Anani Sarab, G. (2019). Investigation of the association between C677T polymorphism of the MTHFR gene and plasma homocysteine level in recurrent fetal miscarriage. *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 45(8), 1442–1447.

Zheng, J., Lu, X., Liu, H., Zhao, P., Li, K., and Li, L. (2015). MTHFD1 polymorphism as maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 36(4), 607–616.