

# Gen Polimorfizm Analizinde LightCycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması: Myeloid Lösemili Çocuk ve Yetişkin Hastalarda MTHFR C677T Gen Polimorfizm Dağılımının Belirlenmesi

THE APPLICATION OF THE LIGHTCYCLER FLUORESCENCE PCR IN  
POLYMORPHISM ANALYSIS: INVESTIGATION OF THE MTHFR C677T  
POLYMORPHISM IN CHILDHOOD AND ADULT PATIENTS WITH MYELOID LEUKEMIA

Dr. Uğur DELİGEZER, Dr. Ebru E. AKIŞIK, Dr. Nejat DALAY

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Abd

## ÖZET

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi folat metabolizmasında anahtar rol oynar. MTHFR geni normal popülasyonda yaygın olarak görülen iki polimorfizme sahiptir. Bunlardan 677. nükleotid pozisyonunda gerçekleşen ve daha yaygın olarak görülen C677T polimorfizmi enzim aktivitesinin azalmasına yol açar. Bu polimorfizm kardiyovasküler hastalıklar, yeni doğanlarda nöral tüp bozuklukları ve kanser riski ile ilişkili bulunmuştur. Çalışmamızda, MTHFR C677T polimorfizmi myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda incelenerek, lösemi riskine olan etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi. Polimorfizm analizi, LightCycler sisteminde "erime eğrisi analizi" yöntemi ile gerçekleştirildi. Bulgularımız, çocuk hasta grubunda heterozigot genotip sıklığının (%39), yetişkin grupta ise hem heterozigot (% 41), hem de homozigot varyant genotip (%5) sıklıklarının, kontrol grubuna göre (heterozigotlar % 45, homozigot varyantlar % 11) daha düşük olduğunu gösterdi. Ancak farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ). Çalışmamız, LightCycler ile yapılan erime eğrisi analizinin polimorfizm tayini için uygun bir metot olduğunu, ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen MTHFR C677T polimorfizmine ait heterozigot ve/veya homozigot varyant genotiplerin lösemi hastalarında daha seyrek olduğunu göstermektedir. Bu bulgular MTHFR polimorfizminin lösemi patogeneğinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** MTHFR C677T polimorfizmi, myeloid lösemi, LightCycler floresan PCR

## SUMMARY

The methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme plays a key role in the folate metabolism. The MTHFR gene displays two common genetic polymorphisms. Of these, the C677T polymorphism reduces the enzyme activity and has been implicated in cardiovascular diseases, neural tube defects in newborns and cancer risk. In the present study, we analysed the association of the common MTHFR C677T polymorphism with leukemia risk in children and adults patients with myeloid leukemia in a case-control study. The analysis was performed in LightCycler fluorescence PCR with melting curve analysis. In children, the frequency of the heterozygote genotype (677CT, 39 %), in adult patients the frequency of the both heterozygote (41 %) and homozygote variant genotypes (677TT, 5 %) were found lower than those in the control group (heterozygote 45 %, homozygote variant 11 %). However, the differences were statistically not significant ( $p>0.05$ ). Our results, although statistically not significant, indicate, consistently with literature, that the heterozygote and/or homozygote variant genotypes are less frequent in leukemia patients. These findings suggest a role for the MTHFR polymorphism for leukemia carcinogenesis.

**Key words:** MTHFR C677T polymorphism, myeloid leukemia, LightCycler fluorescence PCR

## GİRİŞ

Gen polimorfizmleri ("single nucleotide polymorphisms"), genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir.<sup>(1)</sup> Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Bir çok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır. Tek-baz değişimleri ile ilişkili olarak ortaya çıkan hastalıklara örnek olarak trombofil verilebilir.

Bir çok gen polimorfizmi, kanser riski ile ilişkilendirilmiştir; MTHFR buna örnek olarak verilebilecek polimorfik genlerden biridir. MTHFR geni, folat metabolizmasında görev almaktadır. Folat molekülünün primer fonksiyonu, DNA metilasyonu ve DNA sentez reaksiyonlarında metil grubu taşıyıcılığıdır. MTHFR geni, 5,10-metilentetrahidrofolat molekülünü (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metiltetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştüren enzimi kodlar. 5-metil-THF serum folatının primer formudur ve homosistein molekülünün metiyonine dönüştürülmesinde metil grubu vericisi olarak görev yapar. Metiyonin S-adenosilmetiyonine (SAM) dönüştürülür. SAM ise DNA üzerinde sitozin bazlarının metilasyonunda kullanılır. 5-metil THF eksikliği DNA hipometilasyonu ile sonuçlanır. 5,10-metilen THF formunda ise, folat, DNA sentezi sırasında urasil bazlarına metil grubu vererek timine dönüşmelerini sağlamaktadır.

MTHFR geninin 677. nükleotid pozisyonunda C→T baz dönüşümüyle ortaya çıkan polimorfizm (C677T, ala→val) enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmaktadır.<sup>2</sup> Bu polimorfizm ile ilişkili olarak enzim aktivitesinin azalması, 5,10-metilen THF miktarlarının artması ile sonuçlanmakta, ve serum homosistein miktarı artmaktadır.<sup>(3,4)</sup> Artmış serum homosistein düzeyleri kardiyovasküler hastalıklar<sup>(5,6)</sup> ve yeni doğan bebeklerde nöral tüp bozuklukları için<sup>(7,8)</sup> önemli bir risk faktörünü teşkil etmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar ve nöral tüp bozuklukları için risk oluşturması dışında, MTHFR gen polimorfizmi kanser riskini de etkiler.

MTHFR ile kanser riski arasındaki ilişki son yıllarda en yoğun araştırılan konulardan biridir.<sup>(9-16)</sup> Bulgular, MTHFR polimorfizminin kanser riski üzerine olan etkisinin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Kolon kanseri ve lenfoblastik lösemide MTHFR polimorfizmlerinin riski azaltıcı etkisi bildirilmiştir.<sup>(17-22)</sup> Kolon kanserinde, bu etkinin besin yoluyla yeterli miktarda folik asit alınımında söz konusu olduğu gösterilmiştir.<sup>(17,20)</sup> Besin yoluyla düşük oranda folik asit alan kişilerde, polimorfizmin kolon kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir.<sup>(17,19,23)</sup> Bunun dışında, bir çok kanser tipinde MTHFR polimorfizmleri ile kanser risk arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar yayınlanmıştır.<sup>(24)</sup>

Polimorfizm analizi, geleneksel olarak polimeraz zincir reaksiyonu-bağlantılı restriksiyon fragment polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal durum ile polimorfik allel arasında uzunluk farklılıklarının (veya polimorfizminin) izlenmesi esasına dayanır. Yöntem, birden fazla ara aşama içermesi, bazı restriksiyon enzimleri ile ilgili sorunların ortaya çıkması gibi dezavantajlara sahiptir. Son zamanlarda, floresan maddelerle işaretli problemler kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonunun floresan ölçümü sayesinde eş-zamanlı olarak izlenebildiği polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ("real-time fluorescence PCR") sıkça kullanılmaktadır. Çalışmamızda uyguladığımız LightCycler floresan PCR yöntemi nükleik asit miktarının kantitatif analizine olanak sağlaması yanında bilinen mutasyonların (veya polimorfizmlerin) analizini de gerçekleştirebilmektedir.<sup>(25,26)</sup> Bu çalışmada myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalar ile sağlıklı kontrollerde MTHFR C677T polimorfizminin dağılımı LightCycler PCR yöntemi ile incelenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Çalışma Grubu

Çalışma grubumuz myeloid lösemili çocuk (n=43, 23 erkek, 20 kız; ortalama yaş 9.9±5.1) ve yetişkin hastalardan (n=118; 52 erkek, 66 kadın; ortalama yaş 42±15.8) oluşmuştur. Çocuk hastaların 23'ü akut myeloid kösemi (AML), 20'si kronik

myeloid lösemi (KML) hastasıdır. Yetişkin hastalardan 43'ü AML, 75'i KML hastasıdır. Kontrol grubu, sağlıklı kişilerden oluşturulmuştur (n=96; 48 erkek, 48 kadın; ortalama yaş 37.5±11.2).

### LightCycler Floresan PCR Yöntemi ile Polimorfizm Analizi

LightCycler floresan PCR yöntemi (Roche, Mannheim, Almanya) alışılmış polimeraz zincir reaksiyonunu floresan ölçüm sistemi ile kombine ederek, DNA amplifikasyonunun eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde, normal PCR'da kullanılan primerlere ek olarak, floresan işaretli iki prob kullanılmıştır. Problardan bir tanesi, polimorfizm içeren bölgeye spesifik dizayn edilirken, diğeri hemen bunun yakınında (1 baz çifti uzaklıkta) yerleştirilmiştir. Bu yöntemde genotiplerin ayırt edilmesi "erime eğrisi analizi" ("melting curve analysis") ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için, PCR'da DNA amplifikasyonunun tamamlanmasından sonra, sıcaklık çok yavaş bir şekilde yükseltilerek her bir örnek için erime eğrisi oluşturulmuştur. Sıcaklık yükseltilmesi sırasında normal dizi ile polimorfizm içeren dizinin ayırımı gerçekleşmektedir. Polimorfizm içeren dizi ile floresan işaretli prob arasında oluşan dupleks yanlış bir eşleşme ("mismatch") içerdiğinden, normal dizi ile prob arasında oluşan duplekse oranla daha az stabildir. Bu durum, polimorfizm içeren dupleksin daha düşük bir erime noktasına ("melting point") sahip olmasına ve dolayısıyla sıcaklık yükseltilmesi sırasında daha düşük bir sıcaklıkta ayrışmasına yol açmaktadır. Matematiksel bir dönüşüm kullanılarak erime eğrilerinden floresan değerinin negatif türevinin sıcaklığa göre değişimini veren profiller elde edilmekte ve değişik allellere ait farklı erime sıcaklıkları gösteren tepeler izlenmektedir.

Çalışmamızda polimorfizm analizi için periferik lenfositlerden proteinaz K/izopropanol yöntemi ile elde edilen genomik DNA ve Nakamura ve ark.<sup>(27)</sup> tarafından dizayn edilen floresan-ışaretli prob kullanıldı. Primer dizileri doğru 5'-TGGCAGGTTACCCCAAAGG-3' ve ters yönde 5'-

TGATGCCCCATGT CCGTGC-3' şeklindedir (IDT, Coralville, ABD). Problardan biri 3' ucunda florescein (Flu) ile işaretli iken, diğeri 5' ucunda LC-640 ile işaretlenmiştir. Prob dizileri 5'-TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAA GGTGTCT-3'-Flu ve 5'-LC-640-CGGGAGCCGATTTCAT-CAT-3'-PHO (TIB Molbiol, Berlin, Almanya) şeklindedir. Hibridizasyon karışımı (Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı), MgCl<sub>2</sub>, primerler, problar ve genomik DNA toplam 20 µl hacimde karıştırılarak kapillere aktarıldı. PCR koşulları daha önce tanımlandığı gibi gerçekleştirildi.<sup>(28)</sup> Amplifikasyonun tamamlanmasından sonra, sıcaklığın saniyede 0.2°C artırılarak 40°C'den 85°C'ye yükseltilmesiyle erime eğrileri oluşturuldu. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle de, erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü. Pozitif kontroller PCR-RFLP yöntemi ile elde edildi.<sup>(29)</sup>

### İstatistiksel Analizler

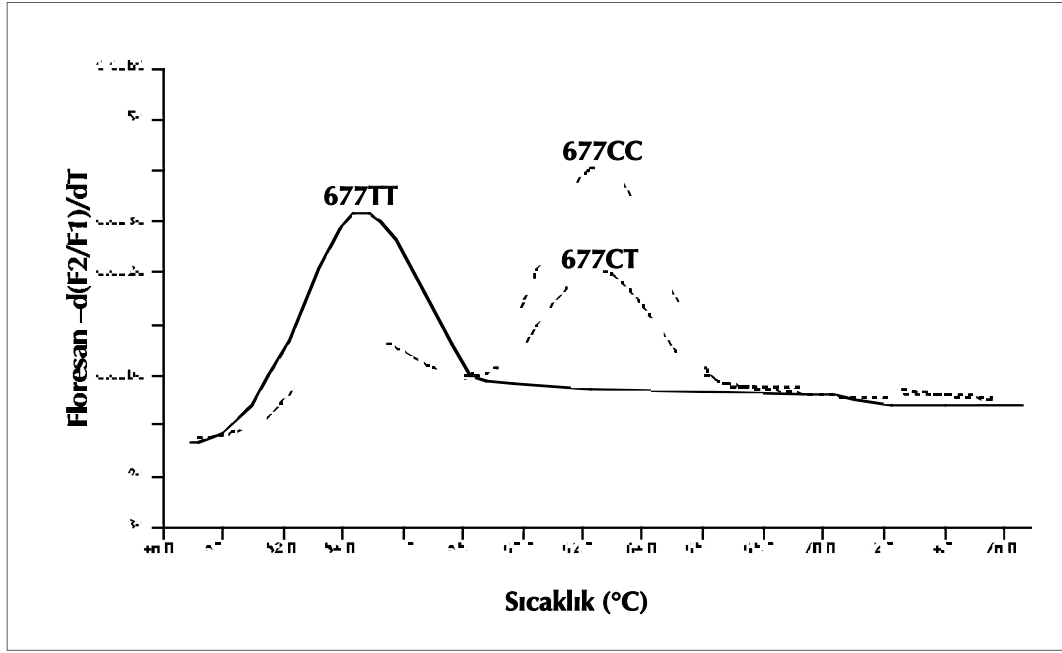
İstatistiksel analizler SPSS (11.5) istatistik analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Allel ve genotip frekansları Ki-kare testi ile karşılaştırıldı. p=0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

### BULGULAR

MTHFR geninin genotipleme hasta ve kontrollerden alınan örneklerde yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Allel ve genotip frekansları hesaplanarak Tablo 1'de özetlendi. Şekil 1'de görülen üç farklı eğri, MTHFR C677T polimorfizmine ait üç farklı genotipi temsil etmektedir. Normal olarak hasta ve kontrollerden alınan her bir örnek sadece bir eğri gösterir. Ancak genotiplerin kolayca karşılaştırılabilmeleri açısından üç farklı genotip üç farklı eğri halinde aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Homozigot normal genotipe (677CC) sahip bireylere ait eğri, en yüksek erime sıcaklığına (63°C) sahip olan tepe ile karakterize iken, homozigot varyant genotipe (677TT) sahip bireyler, iki polimorfik allele sahip olduklarından, normal ge-

**Tablo 1.** Lösemi Hastalarında ve Kontrollerde MTHFR C677T Allel ve Genotip Sıklıkları

	n	677CC	677CT	677TT	T frekansı
Kontrol grubu	96	42 (% 44)	43 (% 45)	11(% 11)	0.330
Çocuk myeloid lösemi	43	21 (% 49)	17 (% 39)	5 (% 12)	0.315
Yetişkin myeloid lösemi	118	64 (% 54)	48 (% 41)	6 (% 5)	0.255



**Şekil.** LightCycler PCR'da MTHFR C677T gen polimorfizm analizi. Şekilde görülen üç farklı eğri, MTHFR C677T polimorfizmine ait üç farklı genotipi temsil etmektedir. Genotiplerin kolayca karşılaştırılabilmeleri için üç farklı genotip üç farklı eğri halinde aynı şekil üzerinde gösterilmiş olmasına rağmen, her bir bireye ait örnek sadece bir eğri gösterir. Homozigot normal genotipe (677CC) sahip bireyler, en yüksek erime sıcaklığına (63°C) sahip olan tepe ile karakterize olan eğriyi gösterirler. Buna karşın, homozigot varyant genotipe (677TT) sahip bireyler, iki polimorfik allele sahip olduklarından, normal genotipe göre daha düşük bir (55°C) erime sıcaklığına sahip tepe ile karakterizedirler. Heterozigot genotip (677CT) örnekler ise normal ve polimorfik allel içermeleri nedeniyle her iki tepeye sahip bir eğri şeklinde ortaya çıkarlar.

notipe göre daha düşük bir (55°C) erime sıcaklığına sahip tepe ile karakterizedirler. Heterozigot genotipe (677CT) ait örnekler ise bir normal dizi ve bir polimorfik allele sahip olmaları nedeniyle her iki tepeyi de gösteren bir eğri ile ayırt edilirler.

Kontrol grubunda varyant allelin (677T) frekansı % 33 olarak belirlendi. Bu oran myeloid lösemili çocuklarda % 32, yetişkinlerde ise % 26 olarak bulundu. Yetişkin hastalarda önemli bir fark göze çarpmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ).

Genotip sıklıkları kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, homozigot normal genotip (677CC) sıklığının çocuk (%49) ve yetişkin (%54) lösemi hasta gruplarında kontrol grubuna göre (%44) arttığını izlendi. Bu artış yetişkin lösemili hastalarda daha belirgin durumdaydı. Normal genotip sıklığının artması, heterozigot (677CT) ve/veya homozigot varyant (677TT) genotip sıklıklarının hasta gruplarında azalmasını gerektirmektedir. Gerçekten, myeloid lösemili çocuk hasta grubunda sadece heterozigot genotipin sıklığı azalırken, yetişkin hasta grubunda her iki genotipin sıklığı da kontrollere göre daha düşük bulunmuş-

tur. Homozigot varyant genotip sıklığındaki azalma (% 6 oranında) daha belirgin durumdadır. Ancak kontrol ve hasta grupları arasında, MTHFR C677T polimorfizmine ait genotipleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

## TARTIŞMA

Çalışmamız, normal bireylerde daha yaygın olan MTHFR C677T polimorfizminin dağılımını myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalarda belirlemeyi hedeflemiştir. Polimorfizm analizi LightCycler PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntemin geleneksel PCR-RFLP yöntemine göre, genotiplerin kolay ve doğru analiz edilmesi, çabuk sonuç alınması gibi avantajları bulunmaktadır. Yöntem hızlı ve duyarlı olması nedeniyle klinik kullanım ve geniş-çaplı araştırmalar için uygun gözükmektedir.<sup>(26)</sup>

Bulgular çocuk hasta grubunda heterozigot genotip (677CT) sıklığının, yetişkin hasta grubunda ise heterozigot ve homozigot varyant (677TT) genotip sıklıklarının kontrol grubuna göre daha dü-

şük olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar literatür bulguları ile aynı doğrultudadır. Wiemels ve arkadaşları<sup>(29)</sup> akut myeloid lösemili çocuk hastalarda homozigot varyant genotip sıklığında kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma bulurken, bizim çalışmamızda heterozigot genotipin sıklığında bir azalma belirlenmiştir. Yetişkin hasta grubunda ise her iki varyant genotipin sıklığında gözlenen azalma, Skibola ve arkadaşlarının<sup>(21)</sup> AML'li yetişkin hastalarda elde ettikleri bulgularla uyum göstermektedir.

Çalışmamızda ve diğer gruplar tarafından yayınlanan çalışmalarda elde edilen sonuçlar C677T polimorfizminin myeloid lösemide daha seyrek olduğunu göstermekle birlikte ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşın akut lenfoid lösemili hastalarda homozigot varyant genotipe (677TT) ait risk azaltıcı yönde bir etki bildirilmiştir<sup>(21,22,30)</sup>, bu bulgular doğrultusunda, MTHFR'nin sadece lenfoid lösemide risk azaltıcı bir etkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak, 2003 yılında yayınladığımız bir çalışmada<sup>(28)</sup> akut lenfoid lösemili yetişkin hasta grubunda 677TT homozigot varyant genotip kontrol grubuna göre daha az bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İtalya'da yapılan ve yeni yayınlanan bir başka çalışma<sup>(31)</sup> da homozigot varyant genotipin akut lenfoid lösemide risk azaltıcı etkisini doğrulamaktadır. MTHFR C677T polimorfizminin lösemi riski ile ilişkisi hakkındaki bu çelişkili sonuçların etnik ve coğrafi değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Mannsmann U, Herzig M. The use of SNP profiles as clinical markers. IMBI, University of Heidelberg. <http://www.biometrie.uni-heidelberg.de/mitarbeiter/MannsmannUlrich>
2. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al et al. Candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Gen* 1995;10:111-113.
3. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
4. Kauwell GP, Wilsky CE, Cerda JJ, Herrlinger-Garcia K, Hutson AD, Theriaque DW, Boddie A, Rampersaud GC, Bailey LB. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C→T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. *Metabolism* 2000;49:1440-1443.
5. Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, Boers GH, Heil SG, Brusckhe AV, Jukema JW, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Boerma GJ, Verheugt FW, Willems F, Blom HJ. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997;96:2573-2577.
6. Kang SS, Wong PW, Bock HG, Horwitz A, Grix A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am J Hum Genet* 1999;48: 546-551.
7. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-1051.
8. Weitkamp LR, Tackels DC, Hunter AG, Holmes LB, Schwartz CE. Heterozygote advantage of the MTHFR gene in patients with neural-tube defect and their relatives. *Lancet*. 1998;351:1554-1555.
9. Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, Whiteside M, Heimburger DC, Giuliano A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res* 2000;20:1751-1757.
10. Kimura F, Franke KH, Steinhoff C, Golka K, Roemer HC, Anastasiadis AG, Schulz WA. Methyl group metabolism gene polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate* 2000 1;45:225-231.
11. Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, Kasinetz L, Kadouri E, Friedman E. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer* 2000; 36:2313-2316.
12. Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001;61:3272-3275.
13. Shen H, Spitz MR, Wang LE, Hong WK, Wei Q. Polymorphisms of methylene-tetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:397-401.
14. Gonzalez Ordenez AJ, Fernandez Carreira JM, Fernandez Alvarez CR, Martin L, Sanchez Garcia J, Medina Rodriguez JM, Alvarez MV, Coto E. Normal frequencies of the C677T genotypes on the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene among lymphoproliferative disorders but not in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2000;39:607-612.
15. Semenza JC, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast cancer risk and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77:217-223.

16. Lambropoulos AF, Agorastos T, Foka ZJ, Chrisafi S, Constantinidis TC, Bontis J, Kotsis A. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T is not associated to the risk of cervical dysplasia. *Cancer Lett.* 2003;191:187-191.
17. Chen J, Giovannucci E, Kelsey, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Hunter DJ. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56: 4862-4864.
18. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R, Rozen R. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825-829.
19. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y, Potter JD. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:659-668.
20. Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ. MTHFR polymorphism, methylene-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *J Nutr* 1999;129 (2S Suppl.): 560S-564S.
21. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12810-12815.
22. Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcao RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukemia. *British J Haematol* 2001;115:616-618.
23. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:657-663.
24. Bailey LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C→T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *J Nutr* 2003;133(11 Suppl 1):3748S-3753S.
25. Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, et al. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol* 1998;153:1055-1061.
26. Hiratsuka M, Narahara K, Kishikawa Y, et al. A simultaneous LightCycler detection assay for five genetic polymorphisms influencing drug sensitivity. *Clin Biochem* 2002; 35:35-40.
27. Nakamura S, Aoshima T, Ikeda M, et al. Simultaneous detection of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms, C677T and A1298C, by melting curve analysis with LightCycler. *Anal Biochem* 2002; 306:40-43.
28. Deligezer U, Akisik E, Dalay N. Genotyping of the MTHFR gene polymorphism, C677T in patients with leukemia by melting curve analysis. *Mol Diagn.* 2003;7 (3-4):181-185.
29. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4004-4009.
30. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della Porta M, Tognazzo S, Serino ML, Di Bona E, Rodeghiero F, Gilli G, Reverberi R, Caruso A, Pasello M, Pellati A, De Mattei M. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:787-794.
31. Chiusolo P, Reddiconto G, Cimino G, Sica S, Fiorini A, Farina G, Vitale A, Sora F, Laurenti L, Bartolozzi F, Fazi P, Mandelli F, Leone G. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes do not play a role in acute lymphoblastic leukemia pathogenesis in the Italian population. *Haematologica* 2004;89:139-144.