

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastalarda RFC G80A Polimorfizmi ve MTHFR Polimorfizmleri ile İlişkilendirilmesi

The RFC G80A Polymorphism in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Correlation with MTHFR Polymorphisms

Dilara Fatma AKIN, Yrd. Doç. Dr. ¹, Ahmet Emin KÜREKÇİ, Prof. Dr. ²
Mehmet Nejat AKAR, Prof. Dr. ³

1. Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, Niğde
2. Lössante Çocuk ve Yetişkin Hastanesi, Ankara
3. TOBB-ETU Hastanesi, Ankara

ÖZET

Amaç: Folat metabolik yolağı nükleotid sentezi ve DNA metilasyonu için gerekli olduğundan lösemi gelişimde önemli rol oynamaktadır. Folat eksikliği, DNA kırıklarına sebep olmaktadır. Bu yüzden folatla ilişkili polimorfizmler; çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisine (ALL) neden olabilmektedir. MTHFR (Metilentetrahydrofolat Redüktaz), DHFR (Dehidrofolat Redüktaz), CBS (Sistationin Beta Sentaz), TYMS (Timidilat Sentaz) ve RFC (Reduces Factor Carrier-1) bulunan değişimler; folat seviyesi ve DNA sentezini etkilediğinden dolayı, folat yolağında önemli role sahiptirler. Bu çalışmadaki amacımız, folat metabolik yolağı ile ilişkili olan RFC ve MTHFR genlerdeki polimorfizmlerin çocukluk çağı lösemisi üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

Gereçler ve Yöntem: Çalışmaya Lössante Çocuk ve Yetişkin hastanesinde 103 akut lenfoblastik lösemi tanısı almış çocuk hasta dâhil edildi. RFC geni G80A ve MTHFR geni polimorfizmleri genotipleme işlemi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve Real Time PCR yöntemleri ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Genotip ve allel frekanslarının sonuçlarına göre, hasta ve kontrol grubu arasında herhangi bir istatistiksel farklılık görülmemiştir. RFC G80A ve MTHFR polimorfizmleri birlikteliği, ANOVA testi ile yapılan analiz sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Sonuç: Çalışmamız, Türk çocukluk çağı ALL hastalarında, RFC ve MTHFR polimorfizmlerle lösemi patogenezi arasındaki ilişkiyi tanımlayan ve frekansını tespit eden ilk tarama sonuçları olarak anlamlı bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili, polimorfizm, RFC, MTHFR

ABSTRACT

Objective: Folate metabolic pathway plays a significant role in leukemogenesis because of its necessity for nucleotide synthesis and DNA methylation. Folate deficiency causes DNA damage. Thus polymorphisms of folate-related genes may affect the susceptibility to childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). MTHFR (Methylenetetrahydrofolate Reductase), DHFR (Dihydrofolate reductase), CBS (Cystathionine β -synthase), TYMS (Thymidylate Synthase) and RFC have an important role in folate pathway because of their activated variants modulate synthesis of DNA and levels of folate. In this study, we aimed to investigate whether polymorphisms in genes related to folate metabolic pathway influence the risk to childhood ALL.

İletişim Bilgileri

Sorumlu Yazar: Dilara Fatma AKIN

Yazışma Adresi: Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Niğde, Türkiye

E-posta: dilarafatmaakin@gmail.com

Tel: +90 (536) 302 68 16

Makale Geliş Tarihi: 16.01.2018

Makale Kabul Tarihi: 26.03.2018

DOI: <http://dx.doi.org/10.16948/zktpb.379688>

Materials and Method: The patient groups who were diagnosed with 103 childhood ALL at Losante Children and adult Hospital were included to the study. RFC G80A and MTHFR genotyping was performed by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis and Real Time-PCR.

Results: No statistical difference was observed among the patient and control group according to results of genotype and allele frequencies. The association of RFC G80A and MTHFR polymorphisms was not statistically significantly.

Conclusion: Our study displays also importance because of the first screening results to identify association with the RFC and MTHFR polymorphisms in Turkish patients with childhood ALL and determination of the frequency in Turkish population.

Keywords: childhood acute lymphoblastic leukemia, polymorphism, RFC, MTHFR

GİRİŞ

Folat, DNA'nın sentez, onarım ve metilasyonunda görev alan tek karbonlu suda çözünen bir B vitamini'dir. Folat metabolik yolağında görev alan enzimleri kodlayan birden çok gen mevcuttur. Bu genlerde olan polimorfizmler folat miktarını ve dağılımını etkileyebilecek özellikte olabilirler. Folat eksikliği DNA zincirinde kırıklara, kromozomal anomalilere, DNA tamir mekanizmasında olabilecek muhtemel sorunlara ve anormal DNA metilasyonuna neden olabilmektedir. Folatın, SAM (S-adenozilmetiyoninin) düzeyinin korunmasındaki ve DNA sentezi için gerekli deoksitimidin monofosfat üretimindeki rolü nedeniyle, eksikliğinde karsinogenezi artırabileceği düşünülmektedir. Özellikle bu metabolizmadaki anomalilerin çocukluk çağı lösemi gelişimine neden olan etkenlerden biri olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Lösemi gelişiminden; lenfosit ya da miyeloid seri de görev alan genlerde olan DNA translokasyonları, kırıkları ve mutasyonları sorumlu olduğu gösterilmiştir. Lösemi de gerçekleşen translokasyonların sebebinin, DNA çift zincir kırıkları bunun neden olduğu, rekombinasyon aktivitesinin ve DNA tamir mekanizmalarının yokluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde folat metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan genlerde olan polimorfizmler tanımlanmıştır (1-3).

Metilentetrahydrofolat redüktaz (MTHFR), folat metabolizmasında görev alan önemli bir enzimdir.

Kromozom 1p36.3'te lokalize insan MTHFR geni, 656 amino asitten oluşan MTHFR enzimini kodlamaktadır. MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde görev yapar. MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilenTHF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürmektedir. MTHFR geninde meydana gelen nükleotid değişimlerinin enzim aktivitesini azaltmakta olduğu rapor edilmiştir. MTHFR defektleri folat metabolizmasındaki en sık görülen doğuştan kalıtılan bir bozukluktur ve gende meydana gelen değişimlerin, DNA sentezi ve DNA tamir mekanizması yolaklarını olumsuz etkilediği daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Gende MTHFR 677 C-T değişimi tanımlanmış ve ülkemizde sağlıklı popülasyonda homozigot mutant birey görülme sıklığı ise % 5-9 arasında olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Diğer enzim aktivitesini değiştirdiği rapor edilen değişim ise 1298 A-C nükleotid değişimidir ve enzimin C-uç düzenleyici bölgesinde etkili olduğu bilinmektedir (4-6). Diğer önemli enzim ise Reduced Folate Carrier-1 (RFC-1) folat analogu ve lösemi tedavisinde de kullanılan kemoteröpatik ilaç olarak kullanılan Metotreksat (MTX)'in metaboliz edilmesinde ve hücre içi folat taşınmasında görev almaktadır. RFC genindeki, 80. Kodonda bulunan Guanin nükleotidinin Adenine değişmesi enzim seviyesini düşürmekte olduğu ve düşen enzim seviyesi, pürin ve pirimidin metabolizmasını bozarak DNA sentezini engellemekte olduğu rapor edilmiştir. Kromozom 21 uzun kolunda lokalize olan RFC-1 geni ve 591 amino asit uzunluğunda olan enzim ürününü kodlamaktadır. RFC-1 G80A polimorfizmi sağlıklı bireylerde sıklığı %35-45 arasında değişmekte olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (7-11).

Bu çalışmanın amacı folat metabolizmasında görev alan, RFC ve MTHFR enzimlerini kodlayan genlerdeki değişimlerin, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi hastalığında birlikte olan etkisinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu etik izin tarihi 11.06.2012 /karar no 10-310-12 karar numarası ile kabul edildi Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerin yasal vâsilerinden çalışmaya katıldıklarına dair onam formları alındı. Çalışma grubumuzu Özel Lösante Çocuk ve Yetişkin hastanesinde tedavi gören akut lenfoblastik lösemi tanısı almış 1-15 yaş arasında 103 hasta ve aynı yaş grubundan 68 sağlıklı kontrol grubu oluştu.

RFC G80A Polimorfizmi Tespiti İçin: DNA izolasyon işlemi MagNa Pure Otomatik İzolasyon sistemi (Roche Diagnostics, Germany) ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA örnekleri RFC geni 230 baz çiftlik promotör bölgesinin amplifikasyonu; dizayn edilen "forward primer": 5'- AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC -3' ve "reverse primer": 5' CTC CCG CGT GAAGTT CTT -3' uygun primer çiftleri ile PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

PCR ürünleri HhaI (Fermentas, Litvanya) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile elde edilen bant profilleri % 3 lük agaroz jelde görüntülenerek gen değişimleri saptanmıştır.

MTHFR C677T ve A1298C Polimorfizmleri Tespiti İçin: İzole edilen DNA örnekleri Real-Time PCR Tekniği kullanılarak Light Cyclers(Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) cihazı ile çalışılmış, mutasyon varlığı, erime eğrisi analizi ile tespit edilmiştir. MTHFR C677T polimorfizmi için "forward primer" 5'-TGG CAG GTT ACC CCA AAG G-3';reverse primer: 5'-TGA TGC CCA TGT CGG TGC-3'; anchor hibridizasyon prop: 5'-LC-640-CGG GAG CCG ATT TCA TCA T-3'-PHO; Mutasyon Prop:m50- CTT CAA AGA CAC TTT CTT CAC TGG TC -30-Flu.) (TIB MOLBION, Almanya). MTHFR A1298C polimorfizmi forward primer: 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C -3';reverse primer: 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCGGTT TG -3'; anchor hibridizasyon prop: 5'-LC-640- CTC CTC CCC CCA CAT CTT CAG CAG -3'-PHO; Mutasyon Prob: 5'- CTT CAA AGA CAC TTT CTT CAC TGG TC -3'-Flu.) (TIB MOLBION, Berlin, Almanya).

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler DNA boyutunda gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde, ortaya konulan mutasyonların ve gen değişimlerinin ne kadar risk getirdiğinin saptanması amacıyla Chi-Square programı kullanılmıştır. Chi-Square tablolarında farklılık var mı sorusunu test ederken %5 yani 0,05 yanılma payı ile çalışılarak anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

RFC G80A, MTHFR C677T ve A1298C gen değişimlerine ait haplotip dağılımının ve gen polimorfizmlerinin birlikte lösemi üzerindeki etkisi incelenmiş ve istatistiksel analizi ANOVA testi ile yapılmış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hasta ve Sağlıklı kontrol grubu gen değişimlerine ait genotip dağılımı ve allel frekansı hesaplanmıştır {MTHFR 677 C-T [p= 0,76], MTHFR 1298 A-C [p=0,56]}. Sırasıyla MTHFR 677C-T, MTHFR 1298 A-C ve RFC G80A polimorfizmlerinin genotip dağılımları %9,7;%10,6;%2,9 olarak bulunmuştur. Tablo 1-8 de istatistiksel olarak değerlendirme sonuçları verilmektedir.

Tablo 1: Gen değişimlerine ait Haplotip Dağılımı.

MTHFR 677 C-T	MTHFR 1298 A-C	Patient n:103 (%)
CC	AA	14 (13,5)
CC	AC	23 (22)
CC	CC	8 (7,8)
CT	AA	19 (18,4)
CT	AC	27 (26,2)
CT	CC	-
TT	AA	9 (8,7)
TT	AC	-
TT	CC	1 (0,9)

Tablo 2: Gen Değişimlerine ait genotip ve allel frekansı.

MTHFR 677 C-T n:103 %	MTHFR 1298 A-C n:103 %	RFC 80 G-A n:103 %
CC 47 (48)	AA 41 (39,8)	GG 68 (66)
CT 46 (44,6)	AC 51 (49,5)	GA 32 (31)
TT 10 (9,7)	CC 11 (10,6)	AA 3 (2,9)

Tablo 3: RFC ve MTHFR polimorfizmleri birliktelikleri.

MTHFR 677 C-T	RFC 80 G-A	Patient n:103 (%)	MTHFR 1298 A-C	RFC 80 G-A	Patient n:103 (%)
CC	GG	28 (27,1)	AA	GG	29 (28,1)
CC	GA	18 (17,4)	AA	GA	12 (11,6)
CC	AA	1 (0,9)	AA	AA	1 (0,9)
CT	GG	33 (32)	AC	GG	34 (33)
CT	GA	11 (10,6)	AC	GA	15 (14,5)
CT	AA	2 (1,9)	AC	AA	2 (1,9)
TT	GG	8 (7,7)	CC	GG	6 (5,8)
TT	GA	2 (1,9)	CC	GA	5 (4,8)
TT	AA	-	CC	AA	-

Tablo 4: MTHFR 677CT polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda dağılımı

Hasta MTHFR 677 C-T n:103 %	Kontrol MTHFR 677 C-T n:68 %	OR	P value
CC 47 (48)	CC 39 (57,3)	1	1
CT 46 (44,6)	CT 23 (33,8)	0,6 (0,3-1,16)	0.12
TT 10 (9,7)	TT 6 (8,8)	0,7 (0,2-2,1)	0.76

Tablo5: MTHFR1298AC polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda dağılımı

Hasta MTHFR 1298 n:103 %	Kontrol MTHFR 1298 n:68 %	OR	P value
AA 41 (39,8)	AA 31 (45,5)	1	1
AC 51 (49,5)	AC 32 (47)	0,8(0,4-1,5)	0.58
CC 11 (10,6)	CC 5 (7,3)	0,6 (0,1-1,9)	0.56

Tablo 6: MTHFR ve RFC polimorfizmlerinin hasta grubunda allel frekansı dağılımı

Allel Frekansı		
Hasta MTHFR 677 C-T	Hasta MTHFR 1298 A-C	Hasta RFC 80 G-A
C 0,67	A 0,64	G 0,81
T 0,32	C 0,36	A 0,19

Tablo 7: MTHFR polimorfizmlerinin kontrol grubunda allel frekansı dağılımı

Allel Frekansı	
Kontrol MTHFR 677 C-T	Kontrol MTHFR 1298 A-C
C 0,74	A 0,69
T 0,26	C 0,31

Tablo 8: RFC G80A, MTHFR C677T ve A1298C gen değişimlerine ait haplotip dağılımının, ANOVA dağılımı.

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,518519	2	0,259259	0,001903	0,998099	1,722358
Gruplar İçinde	3270	24	136,25			
Toplam	3270,519	26				

TARTIŞMA

Pediyatrik dönemin en sık görülen malign hastalığı olan lösemi, etiyolojisi kesin olarak bilinmeyen geniş bir hastalık grubudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çoğalma, farklılaşma ve apoptozisde görev alan genlerde oluşan anomalilerin etiyolojide rol aldığı öne sürülmektedir. Lösemilerde saptanan farklı yollardaki genetik anomaliler, hücrenin biyolojisini, dolayısıyla da hastalığın klinik seyir ve prognozunu etkilemektedir (12).

Bu çalışmamızda, çocukluk çağı ALL'li hastalarda RFC G80A ve MTHFR polimorfizmleri ayrı ayrı ve birbirleri arasındaki ilişki açısından değerlendirildi. Çalışma sonuçlarımıza göre genotip ve allel frekanslarının açısından hastalar ve kontroller arasında herhangi bir istatistiksel farklılık görülmemiştir. MTX ile tedavi edilen lösemi hastalarında RFC G80A polimorfizminin yüksek MTX konstrasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. RFC ve MTHFR gen polimorfizmleri birliktelikleri açısından değerlendirildiğinde ise kullanılan ANOVA testi ile yapılan analiz sonuçlarında herhangi bir korelasyon belirlenmemiştir.

Literatürde RFC gen değişimlerinin tek başına ya da folat metabolizmasında görev alan diğer enzimleri kodlayan genlerdeki değişimler ile birlikte değerlendirildiği ve sonuçlarının birbirine göre farklılık gösterdiği birçok çalışma mevcuttur. Kanada da, 204 pediyatrik ALL'li bireyde yapılan çalışmada RFC-1 AA genotipi diğer genotiplerin varlığına göre relaps ve ölüm riski açısından yüksek riskli bulunduğu rapor edilmiştir. Rocha ve ark yapmış oldukları çalışmada ise, 246 pediyatrik ALL bireyde hemotolojik relaps ve RFC gen polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Karathanasis ve ark yapmış oldukları çalışmada, RFC G80A gen değişimi ve lösemi gelişimi arasında bir ilişki bulunamazken, MTHFR A1298C ile RFC G80A birlikteliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu rapor edilmiştir. Bir diğer çalışma olan De Jonge ve ark. 'nın sonuçlarına göre, RFC 80 A allelini taşımanın 80G alleline göre 2.1 kat lösemili gelişimi için risk getirdiğini bildirilmiştir. Ge ve ark ise 91 yetişkin ALL bireyde, lösemi relaps riski ile RFC ifadenme seviyesi arasında ilişki istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulduklarını bildirmişlerdir (p=0.0052). İrlanda da yapılan çalışmada RFC G80A polimorfizminin kalp hastalıkları polikliniğinde tedavi gören kadın ve erkek hastaların serum folat seviyesi ve homosistein konsantrasyonu ile ilişkisi bulunamamıştır (11, 13, 14-17).

Bu çalışma çocukluk çağı akut lösemi hastalarında folat metabolizmasında görevli olan MTHFR ve RFC genlerinde bulunan polimorfizmlerinin tek başına ve birlikte olan etkisi hakkında bilgi alınması için gerçekleştirilmiştir. Folat gen polimorfizmleri ve lösemi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacı ile yapılan Akin ve ark yaptıkları çalışmada TYMS gen polimorfizmlerinden olan rs2853542'nin ALL gelişimi için risk faktörlerinden biri olduğu fakat MTHFR, DHFR ve CBS polimorfizmlerinin ALL gelişimi için tek başına risk faktörü olmadığı belirtilmiştir (12).

Bizim çalışmamızın 2 farklı önemi vardır. İlki bu çalışma ile Türk çocukluk çağı ALL'li hastalarda RFC ve MTHFR gen polimorfizmlerinin birlikteliğinin ve hastalığın gelişimi için herhangi bir risk faktörü olup olmadığını belirten ilk çalışmadır. İkinci önemli ilaç metabolizmasında bulunan enzimleri kodlayan genlerde olan polimorfizmler ilacın etkinliğini ve toksitesinin bireyler arasında farklı olmasına neden olabilmekte olduğunun bilinmesine yönelik folat metabolizmasında ve MTX metabolitlerinin oluşturulmasında etkili olan gen polimorfizmlerinin etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada kullanılan metodoloji ile tespit edilen polimorfizmlerin çocukluk çağı ALL gibi lösemilerin sık görülen bir grubunda gerçekleştirmesi sonucunda elde edilen verilerin daha kapsamlı çalışma grubu ile planlanabilecek çalışmalar için yol gösterici olabilecek nitelikte olduğu görülmektedir (18, 19). Bu sonuçlar ALL patogeneğinde etkili olduğu düşünülen folat metabolizmasında görevli olan MTHFR ve RFC genlerinde olan polimorfizmlerin prognostik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Baslund B, Gregers J, Nielsen CH. Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B cells and CD4+ T cells. *Rheumatology* 2008 ;47(4):451-3.
2. Kim YI. Folic acid supplementation and cancer risk: po-int. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(9):2220-5.
3. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010;148(1):3-14.
4. Rabab M Aly, Mona M Taalab, Hayam F Ghazy. MTHFR A1298C and C677T gene polymorphisms and susceptibility to chronic myeloid leukemia in Egypt. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 2571-2578.
5. Aşlar D, Özdiler E, Altuğ AT, Taştan H. Determination of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphism in Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013;77:1143-6.
6. Boccia S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MP, Fang JY, Gao CM, GötzteT, Graziano F, Lacasaña-Navarro M, Lin D, López-Carrillo L, Qiao YL, Shen H, Stolzenberg-Solomon R, Takezaki T, Weng YR, Zhang FF, van Duijn CM, Boffetta P, Taioli E. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: a huge-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2008;167(5):505-16.

7. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP. A polymorphism (80G>A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000;70(4):310-5.
8. Clifford AJ, Rincon G, Owens JE, Medrano JF, Moshfegh AJ, Baer DJ, Novotny JA. Single nucleotide polymorphisms in CETP, SLC46A1, SLC19A1, CD36, BCMO1, APOA5, and ABCA1 are significant predictors of plasma HDL in healthy adults. *Lipids Health Dis* 2013 8;12:66.
9. Rajgopal A, Sierra EE, Zhao R, Goldman ID. Expression of the reduced folate carrier SLC19A1 in IEC-6 cells results in two distinct transport activities. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281(5):C1579-86.
10. Collin SM, Metcalfe C, Zuccolo L, Lewis SJ, Chen L, Cox A, Davis M, Lane JA, Donovan J, Smith GD, Neal DE, Hamdy FC, Gudmundsson J, Sulem P, Rafnar T, Benediktsdottir KR, Eeles RA, Guy M, Kote-Jarai Z; UK Genetic Prostate Cancer Study Group, Morrison J, Al Olama AA, Stefansson K, Easton DF, Martin RM. Association of folate-pathway gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a population-based nested case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(9):2528-39.
11. Karathanasis NV, Stiakaki E, Goulielmos GN, Kalmanti M. The effect of RFC G80A polymorphism in Cretan children with acute lymphoblastic leukemia and its interaction with MTHFR C677T and A1298C polymorphisms. *Int J Lab Hematol* 2014;36(4):425-30.
12. Akin DF, Oner D, Sipahi K, Mumcuoglu M, Kurekci E, Ezer U, Akar N. Screening of polymorphisms in the folate pathway in Turkish pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2017; 18: 349-353.
13. Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, Sandlund JT, Rubnitz J, Ribeiro R, Campana D, Pui CH, Evans WE, Relling MV. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;15;105(12):4752-8.
14. Stanislawski-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, Buckley PT, Kealey C, Young IS, Scott JM, Murray L, Boreham CA, McNulty H, Strain JJ, Whitehead AS. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet* 2009;73;484-91.
15. Coppèdè F, Lorenzoni V, Migliore L. The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with Down syndrome: a meta-analysis. *Nutrients* 2013; 5;5(7):2551-63.
16. Li WJ, Jiang H, Fang XJ, Ye HL, Liu MH, Liu YW, Chen Q, Zhang L, Zhang JY, Yuan CL, Zhang QY. Polymorphisms in thymidylate synthase and reduced folate carrier (SLC19A1) genes predict survival outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with pemetrexed-based chemotherapy. *Oncol Lett* 2013;5(4):1165-1170.
17. Lautner-Csorba O, Gézsi A, Erdélyi DJ, Hullám G, Antal P, Semsei AF, Kutszegi N, Kovács G, Falus A, Szalai C. Roles of genetic polymorphisms in the folate pathway in childhood acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian relevance and effect size analysis. *PLoS One* 2013;5;8(8):e69843.
18. Yates Z, Lucock M. G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. *Life Sci* 2005;14;77(22):2735-42.
19. Levy AS, Sather HN, Steinherz PG, Sowers R, La M, Moscow JA, Gaynon PS, Uckun FM, Bertino JR, Gorlick R; Children's Cancer Group Study. Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25(9):688-95.