

MTHFR geninde c677t ve/veya a1298c polimorfizmi tespit edilen bireylerde bu polimorfizm sıklıklarının incelenmesi

Determination of the frequency of MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms in persons with polymorphic MTHFR gene

Nihal Uğuz, Gönül Erden, Oya Güngör, Ceylan Bal, Metin Yıldırımkaaya

ÖZET

Amaç: MTHFR enzimi 5,10 metilentetrahidrofolatı 5 metiltetrahidrofolata katalize ederek, homosisteinden metionin remetilasyonu için gerekli olan aktif folat formunu oluşturur. Bu enzimi kodlayan gendeki mutasyonlar ile birçok hastalık arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Çalışmalar, en iyi bilinen MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışma, MTHFR geninde C677T ve A1298C polimorfizm tespit edilen bireylerde bu polimorfizmlerin sıklığını saptamak amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi III Biyokimya Laboratuvarı'nda C677T ve A1298C yönünden MTHFR polimorfizmi saptanan toplam 164 birey dahil edildi. Hastaların 44'ü erkek, 120'si kadındı. Tüm hastaların yaş ortalaması 48,4±16,8 yıl (yaş aralığı 18-76) idi. MTHFR polimorfizmi, ROCHE Light Cycler 1.5 Real Time PCR ile çalışıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 164 polimorfizimli bireyin 109'unda (% 66,5) MTHFR C677T polimorfizmi saptandı. Bu bireylerin 89'u (% 54,3) heterozigot iken 20'si (%12,2) homozigot mutant tipti. Yine 95 (%57,9) bireyde A1298C polimorfizmi tespit edildi. Bunların 76'sı (%46,3) heterozigot, 19'u (% 11,6) homozigot mutant genotipe sahipti. Her iki polimorfizmin heterozigot birlikte bulunduğu hasta sayısı 40 (% 24,4) idi. Çalışma grubunda, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizm sıklıkları açısından fark tespit edilmedi ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda, polimorfizm tespit edilen bireylerde, MTHFR A1298C polimorfizminin de C677T kadar sık bulunabileceği görüldü.

Anahtar kelimeler: MTHFR, C677T, A1298C, polimorfizm

GİRİŞ

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR), bir flavoprotein olup MTHFR familyasının

ABSTRACT

Objectives: Relationship between several diseases and the mutations on the gene that is encoding MTHFR enzyme has been investigated. Studies are focused on the best known mutations; MTHFR C677T and A1298C. This study is planned for determining the frequency of C677T and A1298C polymorphism of MTHFR gene for individuals who have this kind of polymorphisms.

Materials and methods: 164 individuals who were determined MTHFR polymorphism in Ankara Numune Education and Research Hospital Biochemistry Laboratory were included in the study. 44 of them were men and 120 of them were women. The mean of age of the patients were 48,4±16,8 year (18-76). MTHFR polymorphism was assayed by ROCHE Light Cycler 1.5 Real Time PCR.

Results: In 109 of 164 patients (66.5%) MTHFR C677T polymorphisms were determined. While 89 of these patients (54.3%) were heterozygote, 20 of them were (12.2%) homozygote mutant type. In 95 patients (57.9%) A1298C mutation was determined, 76 (46.3%) were heterozygote and 19 of them (11.6%) had homozygote mutant genotype. Patients number with both mutations together was 40 (24.4%). In the study group, no difference was found in frequency of MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms ($p>0.05$).

Conclusions: In our study, it is seen that in individuals determined polymorphism, even MTHFR A1298C polymorphism can be found as frequent as C677T polymorphism. *J Clin Exp Invest 2012; 3(4): 472-476*

Key words: MTHFR, C677T, A1298C, Polymorphism

(EC 1.5.2.20) bir üyesidir.^{1,2,3} Enzim sitoplazmik bir protein olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır.⁴ İnsanlarda yapılan Western analizler sonucu 2 izoformunun olduğu açıklanmıştır.^{1,5} Bu

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi III. Biyokimya Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Correspondence: Nihal Uğuz,

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi III Biyokimya Laboratuvarı, Ankara, Türkiye Email: nihalsimsek@gmail.com

Received: 04.07.2012, Accepted: 24.11.2012

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2012, All rights reserved

izoformlar dokulara özgü olup, 70 kDa'luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan purifiye edilmiştir.^{1,5}

MTHFR enzimi 656 amino asitten oluşur ve kromozom 1p36.3 üzerinde yerleşik bulunan MTHFR geni tarafından kodlanır.¹ Bu enzim 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür.^{1,6} 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bunun için 5-metil THF, metil grubunu vererek homosisteinin dönüşümünde rol oynar. 5,10- metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10 formil THF'a katkıde olmaktadır.⁶

MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon enzim aktivitesini azaltmaktadır.⁷ C677T polimorfizmi, MTHFR proteinin N terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. Ekzonda meydana gelir.^{8,9} MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in →T (Timin)'e değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır.^{3,10-12} Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Alanin'in yerine Valin'in geçmesine neden olur. Bunun sonucu MTHFR aktivitesi azalır.^{11,12,13} Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur.^{12,13}

MTHFR'nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir.^{14,15}

MTHFR geninde belirlenen başka bir mutasyon da, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan A (Adenin)'in→C (Sitozin)'e değişimi sonucu, MTHFR proteinindeki Glutamin'in→ Alanin'e değişimine neden olan nokta mutasyonudur ve enzimin C-uç regülatör bölgesinde etkilidir.^{4,16,17,18} Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır.^{16,27,48}

A1298C ve C677T polimorfizmlerinin birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır.² Bu aktivite, C677T heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür.² MTHFR 677T/1298C heterozigot durumunun birlikte bulunduğu bireylerde, nöral tüp defektlerinde önemli bir artış olduğu ileri sürülmüştür.^{19,2,7}

C677T homozigotluğunun popülasyon sıklığı, Afrikalı ve ABD'li siyahlarda %1 veya altında, İtalyan, ABD'li hispanikler ve Kolombiyalılarda %25.3 veya üstünde dağılım göstermektedir.²⁰ A1298C polimorfizmi ile her iki polimorfizmin birlikte heterozigot görülme sıklığı ile ilgili literatür bilgileri ise oldukça kısıtlıdır.

Biz retrospektif planladığımız bu çalışmada farklı polikliniklerden laboratuvarımıza başvuran ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmi tespit edilen hastalarda bu polimorfizmlerin sıklığını inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi III Biyokimya Laboratuvarında MTHFR polimorfizmi saptanan toplam 164 birey dahil edildi. Bu bireylerin 80'i hematoloji polikliniğinden, 31'i endokrinoloji ve metabolizma polikliniğinden, 13'ü kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinden ve 40'idi diğer polikliniklerden laboratuvara başvurdu. Hastaların 44'ü erkek, 120'si kadındı. Tüm hastaların yaş ortalaması 48,4 ± 16,8 yıl (yaş aralığı 18-76) idi.

MTHFR Mutasyon Analizi

Roche marka Lightcycler 1.5 adlı cihazla, gerçek zamanlı PCR yöntemiyle çalışıldı. Numuneler tam kandan hazırlandı ve önce DNA ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla Roche-"High Pure PCR Template Preparation Kit" kullanıldı.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) öncesi hazırlık aşaması

Bu amaçla Artus MTHFR LC PCR kiti kullanılmıştır. İçerisinde negatif ve pozitif kontrol bulunmaktadır.

Data analizi

MTHFR'nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir.

MTHFR'nin A1298C polimorfizminde, AA (Glutamin/Glutamin) homozigot normal, AC (Glutamin/Alanin) heterozigot ve TT (Alanin/Alanin) homozigot mutant genotipler görülmektedir.

Nükleotid	Yaban Tip	Varyant
677	62°C	53°C
1298	46°C	57°C

Homozigot yaban tip negatif (normal)

Homozigot varyant homozigot

Heterozigot varyant heterozigot

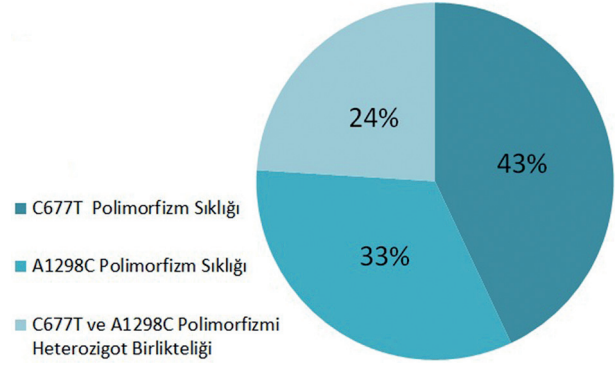
İstatistiksel analiz

Çalışma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde windows ortamında SPSS (Statistical Package for Social Science) 11.5 istatistiksel paket programı kullanıldı. Polimorfizm sıklıklarının karşılaştırılmasında Ki-Kare analizi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

MTHFR polimorfizmi taşıyan 164 bireyin 109'unda (%66,5) C677T polimorfizmi tespit edildi. Bu bireylerin 89'u (%54,3) heterozigot iken 20'si (%12,2) homozigot mutant tipti. Yine çalışmaya dahil edilen bireylerin 95'inde (%57,9) A1298C polimorfizmi tespit edildi. Bunlar arasında 76 birey (%46,3) heterozigot, 19 birey (%11,6) ise homozigot mutant genotip taşımakta idi. Her iki polimorfizmin birlikte heterozigot bulunduğu birey sayısı ise 40 (%24,4) idi. Tablo 1'de çalışmaya dahil edilen bireylerde C677T ve A1298C polimorfizm sıklıkları ile T ve C allel sıklıkları görülmektedir.

Çalışma grubunda, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizm sıklıkları açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). Şekil 1'de mutant bireylerde bahsi geçen polimorfizm sıklıklarının pasta dilimi dağılımı görülmektedir.



Şekil 1. Mutant MTHFR Geni Taşıyan Bireylerde C677T ve A1298C polimorfizm sıklığının dağılımı

Tablo 1. Mutant MTHFR genine sahip bireylerde C677T ve A1298C polimorfizm ve allel sıklığı

Genotip	Toplam Sayı	Görülme Sıklığı (%)	Allel Sıklığı 677'de T (%)	Allel Sıklığı 1298'de C (%)
THFR 677	164	100		39
CC	55	33,5		
CT	89	54,3		
TT	20	12,2		
MTHFR 1298	164	100		34
AA	69	42,1		
AC	76	46,3		
CC	19	11,6		

Tablo 2. Türk popülasyonunda yapılan frekans çalışmaları ile mevcut çalışmanın birlikte değerlendirilmesi

	677CC (%)	677CT (%)	677TT (%)	1298AA (%)	1298AC (%)	1298CC (%)	677T* (%)	1298C* (%)
Sazcı ve Ark (20)	42,9	47,4	9,6	43,7	46,3	10	33,34	33,16
Koçak ve Ark. (27)	42	54	4	46	46	8	31	31
Ozarda ve Ark(28)	49,2	41,1	9,7	45,2	41,9	12,9	30,2	33
Bizim Çalışmamız	33,5	54,3	12,2	42,1	46,3	11,6	39	34

*677'de T, 1298'de C allellerinin görülme sıklığı

TARTIŞMA

Metilentetrahidrofolat enzimi (MTHFR), homosisteinin metionine dönüştüren metiyonin sentaz için gerekli olan 5 metil tetrahidrofolatın oluşmasında görevlidir. 5,10 metilen tetrahidrofolatın 5 metil tetrahidrofolata indirgenmesini katalizler. MTHFR enzim aktivitesinde meydana gelen bir azalma (C677T mutasyonu gibi) plazma homosistein düzeyini artırır. Homozigot C677T polimorfizmi kardiyovasküler hastalık ve nöral tüp defekti riskini artırır.²¹

C677T polimorfizminin sıklığı etnik ve bölgesel farklılıklar gösterir. İtalya ile Kaliforniya ve Kolombiyada yaşayan Hispaniklerde allel sıklığı fazla iken Amerikan zencilerinde ve Afrikanın bazı bölgelerinde daha düşüktür.^{22,23} Almanlarda C677T homozigot sıklığı %7 iken, Hollanda'da %8,9, Fransa'da %9,5 bulunmuştur.^{11,2}

A1298C polimorfizminin popülasyondaki sıklığı C677T polimorfizmi kadar araştırılmamıştır. Kanada ve Hollanda'da homozigot mutant genotip sıklığı yaklaşık %9'dur.^{25,26}

Türk popülasyonunda da bu anlamda yapılmış çalışmalar mevcuttur. Sazcı A ve arkadaşları 1684 bireyin katıldığı geniş çaplı bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada Türk popülasyonda MTHFR C677C, C677T ve T677T genotip sıklıklarını sırası ile % 42.9, 47.4 ve 9.6 bulmuşlardır. MTHFR A1298A, A1298C ve C1298C Genotip sıklıklarını ise sırası ile %43.7, 46.3 ve 10.0 oranında tespit etmişlerdir. Her iki mutasyonun heterozigot birlikteliğini ise %21.6 bulmuşlardır.²⁰

Koçak N ve arkadaşları Sivas bölgesinde ikamet eden bireyler arasından rastgele seçtikleri 222 kişilik bir popülasyonda çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada MTHFR C677C, C677T ve T677T genotip sıklıklarını sırası ile %42, %54 ve %4 bulmuşlardır. MTHFR A1298A, A1298C ve C1298C Genotip sıklıklarını ise sırası ile %46, 46 ve 8 oranında tespit etmişlerdir. 677 T alleli ve 1298 C allel sıklığını her iki grupta da %31 bulmuşlardır.²⁷

Ozarda ve arkadaşları 402 sağlıklı bireyin dahil olduğu çalışmada C ve T allel sıklıkları ile TT ve CC genotip sıklıklarını araştırmışlar, ve bu genotipleri homosistein, folik asit ve vitamin B 12 düzeyi ile ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada genotip sıklıkları cinsiyet bazında analiz edilmiş, erkek hastalarda MTHFR T677T genotip sıklığı %7,7, C677T genotip sıklığı ise %40 bulunmuştur. Kadın hastalarda ise bu oranlar sırası ile %9,1 ve 42,2 tespit edilmiştir. Aynı çalışma içinde 677 T allel sıklığı %30,2, 1298C allel sıklığı %33 oranında tespit edilmiştir.²⁸

Biz çalışmamızda MTHFR C677C, C677T ve T677T genotip sıklıklarını sırası ile % 33.5 , 54.3 ve 12.2 , MTHFR A1298A, A1298C ve C1298C Genotip sıklıklarını ise sırası ile %42.1, 46,3 ve 11,6 oranında tespit ettik. Her iki mutasyonun heterozigot birlikteliği %24 oranında iken, 677 T alleli ve 1298 C allel sıklığını sırası ile %39 ve 34 bulduk. Tablo 2' de bu çalışmaların birlikte değerlendirmesi görülmektedir. Aslında bizim çalışmamız bir popülasyon çalışması değildir. Burada amaç MTHFR açısından mutant gene sahip bireylerde, en sık rastlanan iki polimorfizmin (C677T ve A1298C) sıklıklarını araştırmak idi. Ancak diğer çalışmalarla karşılaştırdığımızda çalışma grubumuzun Türk popülasyonunda yapılan frekans çalışması ile oldukça yakın değerlere sahip olduğunu gördük (Tablo 2). Özellikle Sazcı A ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 1298 C allel değerleri bizim değerlerimize oldukça yakın görünmektedir. A1298C polimorfizm sıklığı ise Koçak N ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile oldukça uyumludur. Ozarda ve arkadaşlarının sağlıklı bireyler üzerinde yaptığı geniş çaplı araştırmada 677T ve 1298C allel sıklıkları bizim çalışma grubunda elde ettiğimiz değerlere oldukça yakındır. Bu uyumun se-

bebini iki şekilde açıklayabiliriz. Birincisi bizim çalışmamızda da çalışma grubunu oluşturan insanların Türk popülasyonundan olması ikincisi ise bu enzimi kodlayan gendeki mutasyonların toplumda çok yaygın görülmesi diye düşünülebilir. Gene Ozarda ve ekibinin çalışması C677T ve A1298C polimorfizminin sağlıklı bireylerde de birbirine oldukça yakın sıklıkta rastlandığını göstermektedir.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda, mutant bireylerde, MTHFR A1298C polimorfizminin de C677T polimorfizmi kadar sık bulunabileceği görülmüştür. Yani mutant genlerin yaklaşık yarısını A1298C polimorfizmi oluşturmaktadır. A1298C ve C677T polimorfizminin birlikte heterozigot olduğu durumlarda, MTHFR enzim aktivitesinin % 40- 50 oranında azaldığı bilinmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda A1298C polimorfizminin klinik yansımalarını net olarak ortaya koyacak geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Homberger G, Linnebank M, Winter C. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 2000;(8): 725-9.
2. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol* 2000;13(1):20-33.
3. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677CT can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat* 2000;16(1):132-8.
4. Sibani S, Christensen B, O'ferrall E, et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000;27(15): 280-7.
5. Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. IV.Reunion, Metiyonin metabolism, molecular mechanisms and clinical implications.1998; Index no 6, March 1-5, University of Navarra and Granada, Spain.
6. Bagley PJ, Jacob S. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Med Sci* 1998;24(95):13217-20.
7. Peng F, Labelle LA, Rainey B, et al. Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med* 2001;8(5): 509-11.
8. Rady PL, Tying SK, Hundnall SD, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): The incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 1999; 86(2):380-8
9. Tonetti C, Burtscher A, Bories D, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: A

- clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am J Med Genet* 2000; 91(3):363-7.
10. Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 1998;9(5):652-6.
 11. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998;(62):1258-1260.
 12. Sell SM, Lugenwa PR. Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet Test* 1999;21(3):287-9.
 13. Demuth K, Moatti N, Hanon O, et al. Opposite effects of plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation on carotid artery geometry in asymptomatic adults. *Thromb Vasc Biol*, 1998;12(18):1838-43.
 14. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2000;130(12): 2238-42.
 15. Molloy AM, Daly S, Mills JL, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;49(11):1591-3.
 16. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: *Am J Epidemiol* 2000;151(7):862-77.
 17. Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr* 2000;130(12):2493-7.
 18. Langman LJ, Wong BYY, Boggis C, et al. The prevalence and linkage disequilibrium of three methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms varies in different ethnic groups presented at INABIS'98-5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, Dec 7-16th.
 19. Kim Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev* 2000;58(2):205-17.
 20. Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kara I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct* 2005;23(1):51-4.
 21. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 2011;10(1):111-3.
 22. Sacchi E, Tagliabue L, Duca F, Mannucci PM. High frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Northern Italy (letter). *Thromb Haemost* 1997;78(9):963-4.
 23. Kluijtmans LA, Van Den Heuvel LP, Boers GH, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58(1):35-41.
 24. Franco RF, Araujo AG, Guerrerrio JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C>T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998; (79):119-21.
 25. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64(2):169-72.
 26. Viel A, Dallagnese L, Simone F, et al. Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 1997;75(10):1105-10.
 27. Koçak N, Özen F, Yıldırım EM, Özdemir Ö. Metilente-tetrahidrofolat Redüktaz (Mthfr) C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2009;16(3):157-61.
 28. Ozarda Y, Sucu DK, Hizli B, Aslan D. Rate of T alleles and TT genotype at MTHFR 677C->T locus or C alleles and CC genotype at MTHFR 1298A->C locus among healthy subjects in Turkey: impact on homocysteine and folic acid status and reference intervals. *Cell Biochem Funct* 2009;27(8):568-77.