

Timidilat Sentaz 2T Gen Polimorfizmi Akut Lösemi İçin Bir Risk Faktörüdür

Thymidylate Synthase 2T Gene Polymorphism is a Risk Factor for Acute Leukemia

Cumhur G. Ekmekçi¹ , Uğur Özbek²

¹Acıbadem Labgen Genetic Diagnosis Center, İstanbul, Turkey

²Department of Medical Genetics, Acıbadem University, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Ekmekçi CG, Özbek U. Timidilat Sentaz (TS) 2T Gen Polimorfizmi Akut Lösemi İçin Bir Risk Faktörüdür. Experimed 2018; 8(3): 79-83.

ÖZ

Amaç: Folat metabolizması içerisinde yer alan timidilat sentaz (TS) enzimi, deoksiüridin monofosfatın (dUMP), deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizlemektedir. Hücre içerisinde DNA sentezi için gerekli olan deoksinükleotidlerin belirli bir denge de bulunmasını sağlamaktadır. Enzimin inhibisyonu sonucu anormal kromozom kırıklarının oluştuğu ve hücre ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir. Çoğalan hücreler için çok gerekli olan enzim aynı zaman da değişik kanser ilaçlarına da hedef olmaktadır. Kromozom 18p11.32 de bulunan TS geni, ATG başlama bölgesinin hemen üzerinde polimorfik tekrar bölgesi içermektedir. 28 bazlık tekrar dizisinin ikili veya üçlü tekrarından oluşan bu polimorfizmin, in vitro ve in vivo olarak gen ekspresyonunda farklılık oluşturduğu gösterilmiştir. Benzeri çalışmalar ile pek çok kanser türü ve kanser ilacı kullanımı ile TS polimorfizmi ilişkisi sorgulanmıştır. Bu çalışmada Türk popülasyonunda akut lösemi etiolojisinde (Akut myeloid lösemi ve Akut lenfoblastik lösemi) TS promoter polimorfizminin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi (ALL) (n=110) ve çocukluk çağı ve erişkin akut myeloid lösemi (AML) (n=126) olgularından elde edilen DNA'larla bölgeye özgü primerler kullanılarak yapılan PZR sonrası agorose jel elektroforezi analizi ile iki veya üç tekrardan oluşan TS polimorfik allelleri belirlendi. Sonuçlar sağlıklı kontrol (n=133) olgularının sonuçları ile karşılaştırarak istatistiksel olarak TS gen polimorfizminin bir risk oluşturup oluşturmadığını sorgulandı. İstatistiksel analizler, SPSS programındaki Fisher's exact test kullanılarak yapıldı.

Bulgular: AML olgularında TS promoter polimorfizmi ile ilişki bulunmadı. Çocukluk çağı ALL olgularında 2T/2T genotipi anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p=0,048).

Sonuç: Çalışmamız ALL gelişiminde, 2T/2T genotipinin bir risk faktörü olduğunu fakat diğer genotiplerin ALL ve AML oluşumunda bir risk oluşturmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut lösemi, polimorfizm, timidilat sentaz

ABSTRACT

Objective: The enzyme thymidylate synthase (TS) in the folate metabolism catalyzes the conversion of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP). It provides a certain balance of deoxynucleotides required for DNA synthesis in the cell. Inhibition of the enzyme showed that abnormal chromosomal breakage and apoptosis occurred. The enzyme, which is necessary for proliferating cells, also targeted different cancer drugs. The TS gene at chromosome 18p11.32 contains the polymorphic repeat region just upstream of the ATG starting site. This polymorphism, consisting of double or triple repeats of the 28-base length sequence, has been shown to differ in gene expression in vitro and in vivo. Similar studies have investigated the relationship between many types of cancer and cancer drug use and TS polymorphism. In this study, the role of TS promoter polymorphism in acute leukemia etiology (acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia) in the Turkish population was investigated.

Material and Method: For this purpose, a pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) case admitted to our unit (n=110) and agorose gel electrophoresis after PCR using region-specific primers with DNA obtained from pediatric and adult acute myeloid leukemia (AML) (n=126) TS polymorphic alleles consisting of two or three repetitions were determined. The results were compared with the results of healthy control (n=133) cases, and we questioned whether TS gene polymorphism is a risk factor.

Results: Statistical analyses were performed using the Fisher exact test in the program SPSS, and the 2T/2T genotype was a risk factor in the formation of ALL (p=0.048).

Conclusion: It was observed that other genotypes did not have a risk for ALL and AML formations.

Keywords: Acute leukemia, polymorphism, thymidylate synthase

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Cumhur G. Ekmekçi **E-mail:** cgekmecki2@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received Date: 24.10.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 30.10.2018

© Copyright 2018 by The İstanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Hematolojik maligniteler, iki ana kan hücresi miyeloid ve lenfoid hücre dizileri soyundan herhangi birinden türemektedir. Lenfomalar ve lenfositik lösemiler lenfoid hücre dizileri, akut ve kronik miyeloid lösemiler, myelodisplastik sendromlar ve miyeloproliferatif hastalıklar, miyeloid dizilerden kaynaklanır. Genel olarak, hasta verileri iyi tutulan batılı ülkelerde hematolojik malignite insidansının yıllar içerisinde artmakta olduğu gözlenmektedir. Buna karşın epidemiyolojik davranışlarını tutarlı ve düzenli bir şekilde tanımlamak zordur (1). ABD’de 2010 yılında yeni hematolojik malignite vakalarının sayısı 137.264, hematolojik maligniteler nedeniyle ölümlerin sayısı ise 54.020 olarak bildirilmiştir (2). Lösemilerin oluşumu ile ilgili elimizde daha çok veri olmakla birlikte, moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Hematolojik malignansi etyolojisinde olgularının sadece küçük bir yüzdesinde, DNA’daki yüksek penetrens gösteren kalıtsal mutasyonlar, iyonize radyasyona, benzen veya kemoterapi gibi kimyasallara maruz kalmayla ilişkili olduğu bilinen durumlardır. Olguların daha büyük bir kısmında ise bilinen etkisi daha az olan ama hastalığa yatkınlığa neden olan polimorfizmlerin varlığıdır. Bir hastalık için yatkınlık oluşturan bu varyasyonların belirlenmesi riskli grupları tanımlamada önem arz etmektedir. Yüksek riskli bir fenotipi tanımlamak için protein-protein, gen-gen etkileşimleri, diyet, diğer çevresel maruziyetler ve bireysel immün fonksiyonu, hematolojik malignite duyarlılığında önemli belirleyiciler olabilir (3, 4).

Folat DNA sentezi ve metilasyonu için gerekli olan önemli bir besin maddesidir ve yetersizliği birçok malignite ile ilişkilendirilmiştir. Folat yolunda en az 30 enzim tanımlanmıştır. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki çeşitli fonksiyonel polimorfizmler, yetişkin ve çocukluk akut lenfositik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML) ve non-Hodgkin lenfoma (NHL) dahil olmak üzere çeşitli maligniteler ile ilişkilendirilmiştir (5, 6).

Timidilat sentaz (TS), deoksüridin monofosfatın (dUMP), deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizlemektedir. Bu enzimin inhibisyonu, deoksitimidin trifosfat tükenmesi ve daha sonra kromozom kırılmaları ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Timidilat sentaz, çoğalan hücrelerde önemli bir enzimdir ve bu nedenle metotreksat ve glutamatlar dahil olmak üzere çeşitli antikanser ilaçları için önemli bir hedeftir. Bu enzimi hedef alan ilaçlara karşı direnç başlıca nedeni, inhibisyonun başarısızlığı olarak bilinmektedir (7).

Timidilat sentaz geninin promotör bölgesinde bir tandem-tekrar dizisi tanımlanmıştır (8) İki ya da üç kez tekrarlayan bu 28-bp lik dizinin polimorfik olduğu gösterilmiştir; üç 28-bp tekrarı olan bireyin, iki 28-bp tekrarı olanlardan daha yüksek timidilate sentaz ekspresyonu gerçekleştirdiği bilinmektedir (8) Timidilat sentaz konsantrasyonu, tedavi etkinliğini, ilaca bağlı toksisiteyi veya her ikisini de etkileyebilir, bu tandem-tekrar polimorfizminin test edilmesi ile terapötik cevap tahmin edebilir (7).

Bu çalışmada AML (erişkin ve çocukluk çağı) ve ALL (çocukluk çağı) olgu gruplarında Timidilat Sentaz geninin promotör böl-

gesine ait 28 bp’lik ikili veya üçlü tekrar bölgesinin bu hematolojik kanserlerle ilişkisi, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırarak belirlendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma üç farklı gruptan oluşmaktadır; çocukluk çağı ALL, erişkin ve çocukluk çağında AML olgularına ait örnekler ve tamamen sağlıklı gruba ait örneklerden oluşmaktadır. Çalışma İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Araştırma Enstitüsü Genetik Bilim Dalına yönlendirilen olgulardan hasta onamı alınarak yapılmıştır. Çalışma, Helsinki Deklarasyonu etik kurallarına uygun olarak etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

ALL hasta örneği sayısı 110 iken, AML hasta grubunda toplam 126 olgu örneği incelemeye alındı. Bu iki hasta grubunun sonuçlarını toplam 133 örnekten oluşan kontrol grubunun sonucu ile karşılaştırıldı.

Örneklerden, otomatik DNA izolasyon cihazı (MagNA Pure, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak DNA ekstrakte edildi. İzole edilen DNA’lar inceleme yapılacak olan güne kadar -20° C de saklandı.

TS polimorfizminin belirleneceği her bir DNA örneği konvansiyonel PZR yöntemiyle amplifiye edildi. PZR amplifikasyonu için F primer: 5'- GCT CCG AGC CGG CCA CAG GCA TG ve R primer: 5'- GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC dizileri kullanıldı. PZR programımız 34 siklustan oluşmakta idi ve her bir reaksiyonda 50 ng genomik DNA örneği kullanıldı. Bu amaç için kullanılan PZR programı ise; Denatürasyon 94°C’de 1 dk, annealing 58°C’de 1 dk, uzama safhası 72°C’ de 1 dk’da ve son uzama safhası ise 72°C’de 7 dk olarak PZR cihazında (Techne, Staffordshire, İngiltere) gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri %4 lük agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak, UV’de bantlar görüntülenerek değerlendirildi. Örneklerin jel görüntüsü Şekil 1’de verilmiştir. İstatistiksel analizler, SPSS (IBM Corp.; Armonk, NY, USA) programındaki Fisher’s exact test kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Toplam 110 ALL, 126 AML ve 133 sağlıklı örnekten elde edilen genotip sonuçları karşılaştırıldı. Genotip sonuçları Tablo 1 de sunulmuştur.

İstatistiksel analizler, SPSS programındaki Fisher’s exact test kullanılarak yapıldı ve ALL oluşumunda, 2T/2T genotipinin bir risk faktörü olduğu (p=0,048) belirlendi.

Tablo 1. ALL, AML ve kontrol grubunun genotip sayı ve yüzdeleri

Genotip	ALL, n=10	AML, n=126	Kontrol, n=133
2T/2T	22 (%20)	17 (%13,5)	22 (%16,5)
2T/3T	47 (%42,7)	72 (%57,1)	67 (%50,4)
3T/3T	41 (%37,3)	37 (%29,4)	44 (%33,1)



Benzer şekilde yapılan diğer karşılaştırmalar için AML 2T/2T ile kontrol grubu 2T/2T karşılaştırılmış; ALL 2T/3T ile kontrol grubu ve AML 2T/3T ile kontrol grubu ve benzer şekilde ALL 3T/3T ile kontrol 3T/3T ve AML 3T/3T ile kontrol 3T/3T sonuçları karşılaştırılmış istatistiksel anlamlılık belirlenememiştir.

İncelediğimiz olgu grupları için elimizde var olan demografik bilgilere istinaden yapılan analizlerde başka herhangi bir istatistiksel anlamlılık belirlenemedi. Bu amaç için genotipteki çeşitlilik ile hastanın klinik ve hematolojik özellikleriyle ilişki bulunamadı. Sadece 2 li tekrardan oluşan heterozigot olanlar veya sadece üçlü tekrarı olan hastalar arasında cinsiyet ve yaş dağılımı açısından fark yoktu. Ayrıca polimorfizmler arasında WBC ve FAB alt tip dağılımında ilişki bulunamadı.

TARTIŞMA

Folat, DNA sentezi ve onarımında önemli bir rol oynar. Folat eksikliğinde, urasilin DNA yapısına katılımında sorun yaşanmakta ve kromozom kırıkları ile karşılaşmaktadır. Bu da kemik iliği hücrelerinin DNA'sında kromozom hasarı, kırılğan alan oluşumu, mikronükleus oluşumu ve yüksek urasil seviyelerini uyarır (9). Bu bilgi dikkate alındığında, folat metabolizmasında rol oynayan genlerdeki polimorfizmlere bağlı fonksiyonel değişikliklerin kanserlerin gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu hipotezle tutarlı olarak folat ilişkili genlerdeki polimorfizmlerin kanser riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10). Folat metabolizmasında ki TS çok önemli bir enzimdir. Reaksiyon için karbon vericisi olarak metilen THF kullanılarak dUMP'nin dTMP'ye dönüşümünü katalize eder ve DNA sentezi ve onarımı için dört öncü nükleotidin dengeli oluşumunu sağlar. TS gen ekspresyonunda ki değişiklik, hematopoietik kök hücreler gibi hızla bölünen hücrelerde bu dengeli beslenmeyi etkileyebilir. TS, 5'-UTR'sinde, iki (2R) veya üç (3R) 28-bp tekrarını içeren polimorfik olduğu bulunan, benzersiz bir 28-bp tekrar dizisi içerir (11). Daha az baskın olan 2R alelinin, in vitro çalışmalarda 3R allelinden 2.6 kat daha düşük gen ekspresyonuna (12) ve TS 2R / 2R bireylerin 3R durumu için homozigot bireylerden tümör dokusunda 3.6 kat daha düşük mRNA ekspresyon seviyelerine neden olduğu gösterilmiştir (13). Bu tandem tekrar dizilerinin, mRNA'nın 5'-UTR'sinde ikincil yapıları oluşturan

gen ekspresyonunu düzenlediği varsayılır (14). Çalışmamızda, TS genindeki bu 5'-UTR tandem tekrar polimorfizminin Türk popülasyonunda ALL ve AML gelişimi ile ilişkisi araştırılmıştır. TS genindeki tekrar polimorfizmi, 110 ALL, 126 AML ve 133 kontrol olgusunun kanından elde edilen DNA'nın PCR ile çoğaltılıp ve ardından Jelde yürütülmesi ile değerlendirildi. TS üçlü tandem tekrarı (3R) alleli frekansının kontrollerde % 33.1, ALL olgularında % 37.3 ve AML olgularında %29.4 olarak gözlemledik. Frekanstaki fark, $p>0.05$ ile istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. TS 2R / 2R genotipi ALL olguların % 20'sinde ve kontrollerin %16.5'inde, bulunarak $p=0.048$ olarak anlamlı fark olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde 2R/3R ler için yapılan karşılaştırmada anlamlı fark gözlenmemiştir.

TS polimorfizmleri üzerine yapılan birçok çalışmaya göre, üçlü tandem tekrarı, gen ekspresyonu ve prognoz ile ilişkilidir, ancak oldukça zıt sonuçlar vermektedir. In vitro bir çalışma, artan sayıda art arda tekrarlanan TS gen ekspresyonunda adım adım bir artış göstermiştir: üçlü tekrarın varlığı, çift tekrardan 2.6 kat daha fazla TS ifadesi ile sonuçlanmaktadır (12). Retrospektif bir çalışmada, üç tekrarlı homozigotun, çift tekrarlı homozigot ile karşılaştırıldığında 3.6 kat daha yüksek TS mRNA seviyeleri sergilediği bildirilmiştir (13).

Nükleotid sentezi ve metilasyon reaksiyonları için kritik bir koenzim olarak, folat tek bir karbon metabolizmasında merkezi bir role sahiptir ve tek başına folat azalması metil havuzunun bozulması için yeterlidir (15). Yakın zamandaki çalışmalar, yüksek düzeydeki diyet folat alımı ile meme kanseri ve kolorektal kanser dahil olmak üzere birçok yaygın kanser için azalan risk arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (16, 17). Bir karbon ve folat metabolizmasında rol oynayan kilit bir enzim olan TS, nükleotid biyosentetik yolunda, dUMP'nin metilasyonunu, de novo hücrel timidilat üretiminin anahtar kaynağı olan dTMP'ye dönüştüren önemli bir rol oynar (18). Önceleri, TS'deki fonksiyonel polimorfizmlerin folat metabolizmasında değişikliklere katkıda bulunduğu ve hematolojik malignite riskleri ile bağımsız olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (19, 20, 21, 22, 23). 3T formundaki TS'nin, 2T ve dört, beş veya dokuz tekrarlar dahil olmak üzere, varyant formda olanlardan daha yüksek TS tran-

skripsiyonu sergilediği bildirilmiştir. Azalmış mRNA stabilitesi, bir mRNA azalması ve daha düşük TS ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (24, 25).

TS geninde var olan 2T/3T polimorfizm beyaz ırkta NHL riskini artırmış, ancak TS, 3'-UTR polimorfizmi (6bp/6bp) ile hematolojik malignite oluşumunda riskin azalmış olduğu gösterilmiştir (26). TS 2T/3T ve TS3'-UTR polimorfizmlerinin fonksiyonel özellikleri kesin olmamasına rağmen, yapılan metaanaliz çalışması ile hematolojik malignitelerin riskleri açısından önemli etkilere işaret etmektedir (26). Bizim verilerimiz sonucuna paralel olarak yapılan bir meta analiz sonucu 2T/3T polimorfizminin ile çocuk hastalarda artmış ALL riski arasında önemli bir ilişki olduğunu doğrulanmış ancak erişkin kişilerde ALL riskinin azaldığı belirlenmiştir. Bu meta-analizde, belirli bir yaş çocuklar veya yetişkinleri sınıflandırmak için kullanılmamışlar her çalışma için aynı yaş grubu referans alınmıştır (26).

ALL, çocukluk çağında en yaygın görülen kanserdir ve gelişmiş ülkelerde tekrarlamadan % 80'lere varan sağkalım oranları bulunmaktadır (27). Çalışmamızda genin göreceli daha az ekspresyonun olduğu 2T/2T taşıyıcılarının çocukluk çağı ALL oluşumunda bir yakınlık oluştururken, bu ve diğer TS genotiplerinin AML'ye bir yakınlık oluşturmadığını belirlemiştir.

Etik Komite Onayı: Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.G.E., U.Ö.; Tasarım - C.G.E., U.Ö.; Denetleme - C.G.E., U.Ö.; Kaynaklar - C.G.E., U.Ö.; Gereçler - C.G.E., U.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.G.E., U.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - C.G.E., U.Ö.; Literatür Taraması - C.G.E.; Yazan - C.G.E.; Eleştirel İnceleme -U.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1572/16012001 ve 1554/16012001).

Ethics Committee Approval: The authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.G.E., U.Ö.; Supervision - C.G.E., U.Ö.; Resource - C.G.E., U.Ö.; Materials - C.G.E., U.Ö.; Data Collection and/or Processing - C.G.E., U.Ö.; Analysis and/or Interpretation - C.G.E., U.Ö.; Literature Search - C.G.E.; Writing - C.G.E.; Critical Reviews - U.Ö.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: 1572/16012001 and 1554/16012001).

KAYNAKLAR

- Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol* 2007;18 (Suppl. 1): i3-i8. [CrossRef]
- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300. [CrossRef]
- Descatha A, Jenabian A, Conso F, et al. Occupational exposures and haematological malignancies: overview on human recent data. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 939-53. [CrossRef]
- Irigaray P, Newby JA, Clapp R, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 640-58. [CrossRef]
- Skibola CF, Curry JD, Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica* 2007; 92: 960-969.
- Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene [6] polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 148: 3-14. [CrossRef]
- Krajinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2002; 359: 1033-34. [CrossRef]
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7. [CrossRef]
- Hori T, Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, et al. Chromosome breakage induced by thymidylate stress in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells. *Cancer Res.* 1984; 44: 703-9.
- Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem* 1999;10: 66-88. [CrossRef]
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003; 88: 159-66.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7. [CrossRef]
- Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1: 65-70. [CrossRef]
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E and Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999; 19: 3249-52.
- Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 101-9. [CrossRef]

16. McCullough ML, Giovannucci EL. Diet and cancer prevention. *Oncogene* 2004; 23: 6349-64. [\[CrossRef\]](#)
17. Sauer J, Mason JB, Choi SW. Too much folate: a risk factor for cancer and cardiovascular disease? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 30-6. [\[CrossRef\]](#)
18. Lehman NL. Future potential of thymidylate synthase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1775-87. [\[CrossRef\]](#)
19. Lightfoot TJ, Skibola CF, Willett EV, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2999-3003. [\[CrossRef\]](#)
20. Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003; 88: 159-66.
21. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 3786-91. [\[CrossRef\]](#)
22. De Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 106: 717-20. [\[CrossRef\]](#)
23. Skibola CF, Forrest MS, Coppede F, et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 104: 2155-62. [\[CrossRef\]](#)
24. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 319-27. [\[CrossRef\]](#)
25. Lincz LF, Scorgie FE, Garg MB, et al. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. *Int J Cancer* 2007; 120: 1930-4. [\[CrossRef\]](#)
26. Yu Weng, Jun Zhang, Xue Tang, Xinyou Xie, Guangdi Chen. Thymidylate synthase polymorphisms and hematological cancer risk: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 1345-51. [\[CrossRef\]](#)
27. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2008; 371: 1030-43. [\[CrossRef\]](#)