

## 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR C677T) Methionine Synthase Reductase (MTRR A66G)

제일병원 유전학연구소<sup>1</sup>, 관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과<sup>2</sup>

1 . 1 . 1 . 1 . 2 . 2 . 2 . 2 . 2 . 2 . 1,2\*

### Polymorphisms of 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR C677T) and Methionine Synthase Reductase (MTRR A66G) as Maternal Risk Factors for Fetal Aneuploidy

Do Jin Kim<sup>1</sup>, Shin Young Kim<sup>1</sup>, So Yeon Park<sup>1</sup>, Jin Woo Kim<sup>1</sup>, Moon Young Kim<sup>2</sup>, Joung Yeol Han<sup>2</sup>  
Jae Hyug Yang<sup>2</sup>, Hyun Kyong Ahn<sup>2</sup>, Jun Seek Choi<sup>2</sup>, Jin Hoon Chung<sup>2</sup>, and Hyun Mee Ryu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Genetics, Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center,

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center,  
Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Aneuploidy is the cause of diseases such as Down syndrome or Edward syndrome and, more generally, is a major cause of mental retardation and fetal loss. The purpose of this study was to evaluate the association between MTHFR (C677T) or MTRR (A66G) polymorphisms and fetal aneuploidy.

**Materials and Methods:** Data was collected from 37 women who had a fetus with aneuploidy (cases) and 78 women who had previously delivered at least two healthy children without aneuploidy and did not have a history of miscarriage or abnormal pregnancy (controls). The MTHFR (C677T) or MTRR (A66G) polymorphisms were analyzed by PCR-restriction fragment length polymorphism assay.

**Results:** The frequencies of the MTHFR 677 CC, CT, and TT genotypes were 30.7%, 48.7%, and 20.6% in the control group and 37.8%, 48.6%, and 13.5% in the case group, respectively. There were no significant differences in genotype frequencies between the two groups. For the MTRR A66G polymorphism, the frequencies of the AA, AG and GG genotypes were 50%, 46.1%, and 3.9% in the control group and 13.5%, 81.1%, and 5.4% in case group, respectively. The frequency of the MTRR AG mutant was significantly increased in the case group, with an odds ratio of 6.5 (95% CI: 2.3-18.6,  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study suggest that mother carriers with the MTRR G allele have an increased risk of fetal aneuploidy, while the MTHFR T allele is not associated with increased risk of fetal aneuploidy. The MTRR A66G polymorphism may be a risk factor for producing a child with chromosomal aneuploidy.

**Key Words:** Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR), Methionine synthase reductase (MTRR), Polymorphism, Aneuploidy

: 2008년 11월 6일

: 2008년 12월 18일

: 2008년 12월 19일

: 2008년 12월 31일

: 류현미

우100-380 서울시 중구 목정동 1-19

관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과

Tel: 02)2000-7683, Fax: 02)2278-4574

E-mail: hmryu@yahoo.com

염색체 수적 이상은 태아의 지능 저하나 유산의 주된 원인이 되고 있다. 가장 잘 알려진 염색체 수적 이상 중 다운증후군이 66%으로서 빈도가 가장 높으며 다음이 에드워드증후군으

로 이 두 질환이 전체 상염색체 이수성 질환의 93%를 차지하는 것으로 보고되고 있다<sup>1)</sup>. 이러한 염색체의 수적 이상은 감수분열 과정 중 염색체가 한쪽으로 치우쳐서 분리되는 염색체의 비분리(meiotic nondisjunction)로 인해 발생한다. 염색체 비분리 현상은 임신 전 모계 쪽의 난포성숙단계 중 감수분열 I에서 95%가 발생한다<sup>1)</sup>. 다운증후군의 경우 신생아의 경우 600명중 1명, 태아의 경우 150명중 1명으로 발생한다<sup>2)</sup>. 그러나 이러한 높은 빈도임에도 불구하고 아직까지 염색체가 왜 분리에 실패하는지에 대한 명확한 기전은 밝혀지지 않았다.

최근 연구발표에 의하면 세포내의 엽산과 methyl-donor의 결핍이 비정상적인 DNA 메틸화나 DNA의 손상 또는 비정상적인 염색체 분리와 연관이 있다고 보고하고 있다<sup>3-5)</sup>. 엽산은 일반적으로 DNA 합성을 위한 염기의 전구물질 생성과 세포내의 메틸화 반응에 꼭 필요한 물질이다<sup>6)</sup>. James 등<sup>6)</sup>은 메틸 대사과정에 관여하고 있는 효소의 돌연변이로 인한 비정상적인 메틸화 결과로 발생하는 비정상적인 DNA 메틸화가 이러한 염색체의 비분리를 증가시킨다고 보고하였다.

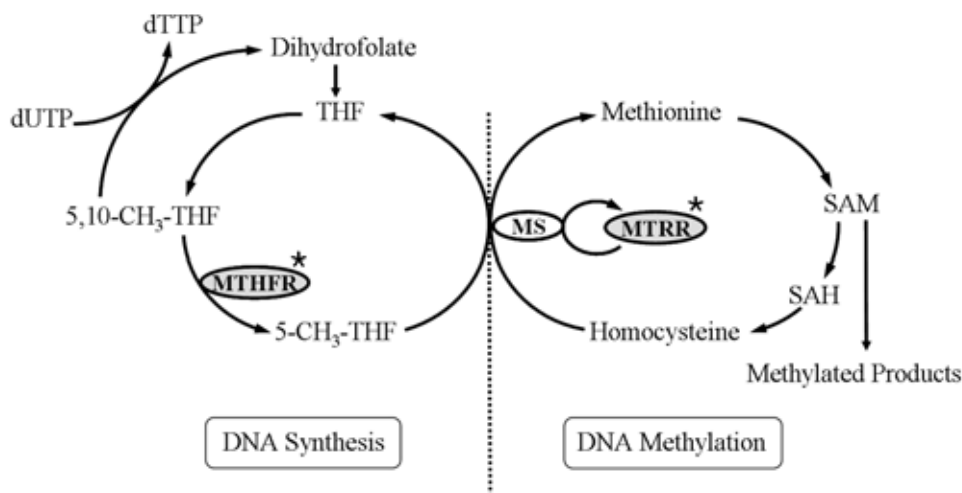
5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)과 Methionine synthase reductase(MTRR)는 이러한 엽산 대사과정에서 관여하는 효소로 알려져 있다. MTHFR는 엽산 대사과정 중에서 5, 10-methylenetetrahydro folate를 5-methyltetrahydrofolate로 전환시키며 5-methyltetrahydrofolate는 호모시스테인을 탈메틸화시켜 메티오닌으로 만드는 methyl-donor로서의 역할을 한다(Fig. 1). MTHFR 유전자 677 부위의

변이(MTHFR C677T polymorphism)는 효소 활성을 최대 30%까지 감소시키며<sup>7)</sup> 이러한 다형성 빈도는 인종에 따라서 서로 다른 분포를 보인다<sup>8)</sup>. MTRR은 methionine synthase 효소의 정상적인 엽산 대사와 DNA 메틸화를 유지 하는데 있어 methionine synthase의 활성 상태를 유지하는데 중요한 역할을 한다<sup>9, 10)</sup>.

본 연구에서는 염색체 수적 이상 유발의 원인인 염색체의 비분리와 관련된 엽산 대사에서 각 대사작용에 관여하는 효소인 MTHFR과 MTRR의 유전자 다형성과 염색체 수적 이상의 태아를 가진 환자의 연관성을 알아보려고 하였다.

## 1.

정상군은 제일병원 산부인과를 방문한 산모 중 유산이나 비정상적인 임신을 한 경험이 없고 2명 이상의 건강한 아이를 출산한 78명의 여성을 선택하였으며(평균연령: 33.0±3.7), 환자군으로는 세포유전학적 검사를 통해 염색체 수적 이상이 확인된 태아를 임신한 37명의 여성을 대상으로 조사를 하였다(평균연령: 32.6±4.4). 환자군은 염색체 21번이 3개인 다운증후군 64.9% (24/37)과 18번이 3개인 에드워드증후군 35.1% (13/37)이었다. 본 연구는 제일병원 임상시험심사위원회(IRB)에서 2005년 5월에 승인을 받아 진행하였다.



**Fig. 1.** Folate metabolism pathway<sup>17)</sup>. Folic acid is fully reduced in the intestinal cell to tetrahydrofolate (THF). 5-MethylTHF is formed from 5, 10-methylTHF by the enzyme methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR), the methyl donor. Methionine synthase(MS) catalyses the remethylation of homocysteine to methionine by using the methyl group from 5-methyl THF and MTRR maintains MS in active state.

## 2.

각 효소의 다형성을 분석하기 위해 사용되는 DNA는 혈액으로부터 DNA extract kit(Puregene, Minneapolis, MN, U.S.A)를 이용하여 추출하였다. 분리된 DNA는 분석하고자 하는 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다.

MTHFR 유전자의 다형성(MTHFR C677T)을 분석하기 위해 준비된 환자군과 정상군의 DNA를 가지고 PCR을 시행하였다. MTHFR 677 부위의 유전자 다형성 검사를 위한 PCR은 60 ng의 DNA, 200mM dNTPs, 각 primer 1 pmol, PCR buffer 및 0.5 unit의 Amp-Taq Gold polymerase로 시행하였으며 총량은 10  $\mu$ l로 하였다. 반응 온도와 시간은 95°C 30초, 61°C 30초, 72°C 60초로 수행하여 35회를 반복한 후 72°C에서 7분간 반응하였다. 이때 사용된 프라이머 서열은 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'과 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'이었다. Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 방법으로 PCR 산물의 유전자 염기 치환을 확인하기 위하여 증폭된 PCR 산물 4  $\mu$ l와 5 unit의 *Hinf*I 제한효소, 10X buffer 1  $\mu$ l로 구성된 총 10  $\mu$ l를 37°C에서 3-4시간 반응을 시킨 후 8% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. MTHFR 677 C>T 치환인 경우 원래의 198 bp의 PCR 생성물이 176 bp와 23 bp로 잘려지는 것을 확인하였다.

MTRR 유전자의 다형성(MTRR A66G) 확인은 위의 실험과 동일한 PCR조성을 사용하였으며 반응 조건으로 온도는 95°C 30초, 55°C 30 초, 72°C 60초로 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 반응하였다. 이때 사용된 프라이머 서열은 5'-GCAAA GGCCATCGCAGAAGACAT-3'와 5'-GTGAAGATCTGCA GAAAATCCATGTA-3'이며 이는 일반적인 염기서열에서 *Nde*I 제한효소가 인식할 수 있도록 인위적으로 C염기를 A로 전환시키도록 제작하여 사용하였다. 증폭된 PCR 산물 8  $\mu$ l와 5 unit의 *Nde*I 제한효소, 10X buffer 1  $\mu$ l로 구성된 총 10  $\mu$ l를 37°C에서 3-4시간 가량 반응을 시킨 후 20% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 이때 생성되는 PCR 생성물은 66 bp이며 RFLP 방법을 통하여 염기가 정상 유전형(A형)인 경우 *Nde*I 의해 44 bp와 22 bp의 2개의 단편을 확인하였으며, 돌연변이인 유전자형(C형)은 제한효소가 반응하지 않아 66 bp크기의 생성물을 확인하였다.

## 3.

환자군과 대조군의 대립 유전자와 유전자형의 빈도분석은 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 사용하였다. 염색체 수적 이상의 비교 위험도를 측정하기 위해 odds ratio (OR)와 95% 신뢰구간(95 percent confidence interval; 95% CI)을 사용하였다. 연구결과의 통계분석은 SPSS 10.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, USA)를 사용하였고, *P*값이 0.05 미만인 경우 통계학적 유의성이 있다고 하였다.

## 1. MTHFR (MTHFR C677T)

MTHFR 677 부위의 유전자형은 대조군에서 정상형인 CC, 이형접합성 변이형인 CT, 동형접합성 변이형인 TT가 각각 30.7%, 48.7%, 20.6%였으며, 환자군에서는 각각 37.8%, 48.6%, 13.5%였다(Table 1). 정상 유전자형인 CC를 이형접합성 변이형인 CT와 동형접합성 변이형인 TT 유전자형과 비교하였을 때 모두 유의한 차이를 보이지 않았으며, 또한 정상 유전자형을 정상이 아닌 모든 유전자형(CT/TT)과 비교하였을 때에도 역시 유의한 차이를 보이지 않았다. MTHFR C677T 다형성에서 T 대립인자 비율은 대조군과 환자군에서 각각 44.9%, 37.8%였으며, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1).

## 2. MTRR (MTRR A66G)

MTRR 66 부위의 유전자형은 대조군에서 정상형인 AA, 이

**Table 1.** Genotype and Allele Frequencies of MTHFR 677C>T in Women Who had a Fetus with Aneuploidy and Control Mothers

MTHFR	Controls n= 78 (%)	Cases n= 37 (%)	OR (95% CI)	<i>P</i>
Genotype				
CC	24 (30.7)	14 (37.8)	1.00	-
CT	38 (48.7)	18 (48.6)	0.81 (0.34-1.93)	0.637
TT	16 (20.6)	5 (13.5)	0.54 (0.16-1.78)	0.305
CT/TT	54 (69.2)	23 (62.2)	0.73 (0.32-1.66)	0.452
Allele				
C	86 (55.1)	46 (62.2)	1.00	-
T	70 (44.9)	28 (37.8)	0.75 (0.4-1.32)	0.314

**Table 2.** Genotype and Allele Frequencies of MTRR 66A>G in Women Who had a Fetus with Aneuploidy and Control Mothers

MTRR	Controls n= 78 (%)	Cases n= 37 (%)	OR (95% CI)	P
Genotype				
AA	39 (50.0)	5 (13.5)	1.00	-
AG	36 (46.1)	30 (81.1)	6.50 (2.28-18.57)	0.000
GG	3 (3.9)	2 ( 5.4)	5.20 (0.69-39.08)	0.143
AG/GG	39 (50.0)	32 (86.5)	6.40 (2.26-18.14)	0.000
Allele				
A	114 (73.1)	40 (54.1)	1.00	-
G	42 (26.9)	34 (45.9)	2.31 (1.29-4.11)	0.004

형접합성 변이형인 AG, 동형접합성 변이형인 GG가 각각 50.0%, 46.1%, 3.9%였으며, 환자군에서는 각각 13.5%, 81.1%, 5.4%였다(Table 2). 정상 유전자형인 AA를 이형접합성 변이형인 AG 유전자형과 비교하였을 때 유의한 차이를 보였으며(OR: 6.5, 95% CI: 2.3-18.6,  $P<0.05$ ), 정상이 아닌 모든 유전자형(AG/GG)과 비교하였을 때에도 역시 유의한 차이를 보였다(OR: 6.4, 95% CI: 2.3-18.1,  $P<0.05$ ). 그러나 동형접합성 변이형인 GG 유전자형과의 비교에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. MTRR A66G 다형성에서 G 대립인자의 빈도는 대조군의 27.1%에 비해 환자군에서 37.8%로 환자군에서 G 대립인자가 의미 있게 증가하였다(OR: 2.3, 95% CI: 1.3-4.1,  $P=0.004$ , Table 2)

다운증후군과 같은 염색체의 수적 이상은 염색체 이상의 15-20%정도 차지할 정도로 많은 부분을 차지하며 태아의 유산과 정신박약의 주된 원인이다<sup>11</sup>). 최근 연구는 hypomethylation에 의해 일어나는 염색체 이상과 관련하여 엽산대사의 역할에 관심을 갖고 있다<sup>6</sup>). 최근 MTHFR 유전자의 돌연변이가 비정상적인 엽산대사를 유발시킴으로써 다운증후군의 발생을 높인다는 보고 후에 MTHFR 유전자의 돌연변이가 감수 분열 중인 염색체의 비정상적인 분리의 원인으로 주목되었다<sup>6, 12</sup>).

MTHFR과 MTRR은 DNA methylation에 필요한 메틸기를 공급하는 대사과정에 관여하는 효소이며 이러한 효소의 이상은 메틸화 반응을 변화시켜 DNA hypomethylation을 유발하게 된다<sup>13, 14</sup>). 많은 연구에서 MTHFR C677T 다형성으로 인한 효소의 활성도와 호모시스테인 농도의 연관성에 대한 영향이 조사되었다<sup>5, 7</sup>). 또한 이러한 MTHFR의 다형성은 나라나 민족

마다 그 빈도가 다르다<sup>8</sup>).

한국인 집단에서 MTHFR의 유전자형과 대립 유전자의 분포는 이전에 발표된 논문들과 비교해 볼 때 동일하였다<sup>15, 16</sup>). 본 연구에서는 결과적으로 MTHFR 677번 째 염기의 다형성이 태아에 있어서 염색 체의 수적 이상을 갖기 위한 위험인자로서 연관이 없는 것으로 조사 되었으나, MTRR 66번 째 염기는 이러한 염색체 수적 이상의 위험인자로서 유의성이 있는 것으로 조사되었다.

많은 연구에서 다운증후군 자녀를 가진 어머니들로부터 MTHFR 유전자의 다형성을 조사한 결과, MTHFR 677T 대립유전자가 다운증후군 환자를 갖는 어머니에게서 높은 것으로 보고되었다<sup>6, 17</sup>). 또한 Grillo 등<sup>18</sup>)은 포르투갈인들을 대상으로 한 연구에서 MTHFR의 C677T와 A1298C 두 지역의 다형성을 조사하였으며 다운증후군을 가진 어머니들에서 MTHFR 677T 및 1298C 변이형의 빈도가 높음을 보고 하였다. 그러나 Boduroglu 등<sup>19</sup>)은 다운증후군 자녀를 가진 152명의 어머니들과 정상 대조군 91명을 대상으로 하여 MTHFR 677과 1298번 째 염기의 유전자 다형성(MTHFR C677T와 A1298C)을 조사한 결과, 이 두 지역의 대립유전자와 다운증후군을 가진 자녀의 출산과의 연관성을 확인할 수 없다는 결과를 보고하였으며 다른 연구보고에 따르면 프랑스<sup>20</sup>)나 이탈리아<sup>21</sup>), 일본<sup>22</sup>)의 여성을 대상으로 시행된 조사에는 다운증후군 자녀를 출산한 여성과 MTHFR 유전자 다형성이 연관이 없는 것으로 보고하고 있다. 이러한 결과에 대해 Stuppia 등<sup>21</sup>)은 이탈리아에서 상대적으로 다른 유럽 국가 사람들에게 비해 높은 비율의 677T 대립유전자를 가지면서도 신경관결손과 같은 질환이 다른 국가보다 낮은 이유를 식습관에 따른 적당량의 엽산 섭취 때문이라고 추론하고 있다. 또한 MTHFR C677T로 인한 저하된 효소 활성은 적당량의 엽산의 섭취로 인해 효소의 저하된 활성을 극복할 수 있다고 보고하고 있다<sup>23, 24</sup>). 또한 신경관 결손의 위험증가 시키는 것으로 보고되고 있으며 일반 엽산대사에 관여하는 필수 효소로서 MTRR에 대한 연구가 이루어지고 있다. Hobbs 등<sup>25</sup>)은 다운증후군을 가진 자녀를 둔 여성을 대상으로 한 MTRR 다형성(MTRR A66G) 조사에서 동형접합형인 GG 유전자형 갖는 비율이 증가하는 것으로 보고하고 있다. 다른 보고에서도 MTHFR C677T 다형성과 MTRR A66G 다형성에서 각각의 경우 다운증후군에 대한 위험도가 증가하며, MTHFR과 MTRR이 조합을 이루는 경우 그 위험도는 더욱 증가하는 것으로 보고 되었다<sup>26</sup>).

본 연구에서 대상이 된 산모들은 단순히 태아의 염색체 이상이 확인된 경우로서 염색체의 이상을 유발하는 여러 유전적 또는 환경적인 요소 중 유전적 요소로서의 MTRR의 가능성을 재확인하였으며, 이러한 결과는 보다 정확한 분석을 위해 염색체 수적 이상의 태아를 가진 많은 환자를 대상으로 MTHFR과 MTRR의 역할에 대해 추가적인 연구가 요구된다.

: 다운증후군을 비롯한 염색체의 수적이상은 태아의 유산이나 정신패약의 가장 큰 요인으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 엽산 대사에 관련된 효소의 다형성(MTHFR C677T, MTRR A66G)을 조사하여 태아의 염색체 수적이상과 유전적인 연관성을 알아보고자 한다.

: 염색체 수적이상이 확인된 태아를 임신한 37명의 산모와 유산이나 비정상적인 임신을 한 경험이 없고 2명 이상의 건강한 아이를 출산한 78명의 여성을 정상군으로 하여 혈액으로부터 DNA를 추출하고 PCR-RFLP를 이용하여 각 지역의 다형성 여부를 확인하였다.

: MTHFR C677T 유전자형은 CC, CT, TT에 대해 각각 30.7%, 48.7%, 20.6%였으며, 환자군에서 각각 37.8%, 48.6%, 13.5%였다. 정상군과 환자군 사이 모든 조합에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 대립유전자의 비율 역시 대조군과 환자군에서 각각 44.9%, 37.8%였으며, 통계적 유의한 차이는 없었다. MTRR A66G 유전자형은 대조군에서 AA, AG, GG에 대해 각각 50.0%, 46.1%, 3.9%였으며, 환자군에서는 각각 13.5%, 81.1%, 5.4%였다. MTRR의 정상 유전자형인 AA와 이형접합성 변이형인 AG 유전자형을 비교하였을 때 유의한 차이를 보였으며(OR: 6.5, 95% CI: 2.3-18.6,  $P < 0.05$ ), 정상이 아닌 모든 다른 유전자형(AG/GG)과 비교하였을 때에도 역시 유의한 차이를 보였다(OR: 6.4, 95% CI: 2.3-18.1,  $P < 0.05$ ).

: 본 연구에서는 MTHFR 677번째 염기의 다형성은 염색체 비분리로 인한 태아 염색체의 수적이상과 연관성이 없는 것으로 확인하였으나, MTRR 66부위의 경우 염기의 다형성이 태아 염색체의 수적이상을 유발하는 유전적 요소로서의 가능성을 제시하고 있다.

- 1) Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, et al. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1992;50:544-50.
- 2) Hernandez D, Fisher EM. Down syndrome genetics: unravelling a multifactorial disorder. *Hum Mol Genet* 1996;5:1411-6.
- 3) Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis* 1993;14:551-7.
- 4) Leyton C, Mergudich D, de la Torre C, Sans J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif* 1995;28:481-96.
- 5) Pogribny IP, Miller BJ, James SJ. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett* 1997;115:31-8.
- 6) James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
- 7) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
- 8) Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
- 9) Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3059-64.
- 10) Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-23.
- 11) Hunt PA. The control of mammalian female meiosis: factors that influence chromosome segregation. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:246-52.
- 12) Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers

- of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res* 1995;55:1894-901.
- 13) Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1184-90.
  - 14) Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52:2071s-7s.
  - 15) Chae KY, Han JH, Seo JY, Cho MJ, Kim S, Kim NK. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Risk of Down Syndrome. *Korean J Pediatr* 2004;47:1053-57.
  - 16) Choi BO, Kim YS, Kim OJ, Seo JH, Kim NK. Hyperhomocysteinemia as an Independent Risk Factor for Silent Brain Infarction: Inverse Correlation with Folate in Patients with MTHFR 677TT Genotype. *J Korean Neurol Assoc* 2003;21:134-40.
  - 17) Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:623-30.
  - 18) Grillo LB, Aciccio GL, Barini R, Pinto W Jr, Bertuzzo CS. Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome. *Cad Saude Publica* 2002;18:1795-7.
  - 19) Boduro lu K, Alanay Y, Koldan B, Tunbılek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet A* 2004;127A:5-10.
  - 20) Gułant JL, Gułant-Rodríguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, et al. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1473-7.
  - 21) Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 2002;10:388-90.
  - 22) Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S, et al. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. *Eur J Nutr* 2004;43:285-7.
  - 23) Bailey LB, Gregory JF. 3rd Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999;129:919-22.
  - 24) Moyers S, Bailey LB. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. *Nutr Rev* 2001;59:215-24.
  - 25) Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:623-30.
  - 26) O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002;107:151-5.