

ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* กับการเกิดโรควงช้างและโรคปาก
แห้งงูเห่านิว

นายชูพงศ์ อธิธิวุฒิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1730-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION BETWEEN *MTHFR* POLYMORPHISMS AND FRONTOETHMOIDAL
ENCEPHALOMENINGOCELE AND CLEFT LIP WITH OR WITHOUT CLEFT PALATE

Mr. Chupong Ittiwut

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science

Program of Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1730-8

ชูพงศ์ อธิวิรุฒิ : ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* กับการเกิดโรควงข้างและโรคปากแหว่งเพดานโหว่ (ASSOCIATION BETWEEN *MTHFR* POLYMORPHISMS AND FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE AND CLEFT LIP WITH OR WITHOUT CLEFT PALATE) อ. ที่ปรึกษา : อาจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 94 หน้า. ISBN 974-03-1730-8

โรคความผิดปกติของหลอดประสาทแต่กำเนิด (neural tube defect-NTD) และโรคปากแหว่งเพดานโหว่เป็นความที่พบบ่อยแต่กำเนิดพบได้บ่อยที่สุดชนิดหนึ่งทั่วโลก สำหรับประเทศไทยพบ NTD ชนิด "โรควงข้าง" ได้บ่อยกว่าบริเวณอื่นของโลก มีการศึกษาพบว่าโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* แบบ 677C→T และ 1298A→C มีความสัมพันธ์กับการเกิด NTD ชนิด occipital และ lumbosacral encephalocele ซึ่งเป็น NTD ที่พบได้บ่อยในชาวคอเคเซียน แต่ยังไม่เคยมีรายงานใดที่ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างยีน *MTHFR* กับการเกิดโรควงข้าง สำหรับโรคปากแหว่งเพดานโหว่แล้วความสัมพันธ์กับยีนดังกล่าวยังไม่เป็นที่แน่ชัด การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม 677C→T และ 1298A→C กับการเกิดโรควงข้างและโรคปากแหว่งเพดานโหว่ โดยศึกษาในครอบครัวที่มีผู้ป่วยโรควงข้างจำนวน 48 ครอบครัว และครอบครัวผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่จำนวน 162 ครอบครัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 202 ราย โดยใช้วิธี PCR และ ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าความถี่ของอัลลีล 677T เป็น 0.12 ซึ่งเป็นความถี่ที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับในประชากรอื่นๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วนความถี่ของอัลลีล 1298C เท่ากับ 0.25 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มประชากรอื่น การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละโพลีมอร์ฟิซึมกับการเกิดโรควงข้างและโรคปากแหว่งเพดานโหว่ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรควงข้าง ผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่รวมถึงในพ่อแม่ของผู้ป่วยเหล่านั้น ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Transmission disequilibrium test (TDT) ไม่พบว่ามี ความเบี่ยงเบนของการถ่ายทอดอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งสูงเกินไปจากสมดุล อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่าแม่ที่มีจีโนไทป์ 677CT/1298AC มีความเสี่ยงที่จะมีลูกเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่สูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 3.67 เท่า (OR=3.67, 95%CI:1.58-8.59) สอดคล้องกับผลของแฮพโลไทป์ C-C/T-A ในแม่ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\chi^2=6.969$, $p=0.008$) การศึกษาในกลุ่มประชากรคนไทยครั้งนี้สรุปได้ว่า แม่ที่โพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* ที่จีโนไทป์เป็น 677CT/1298AC มีความเสี่ยงที่จะมีลูกเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่สูงขึ้น 3.67 เท่า

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต.....ชูพงศ์ อธิวิรุฒิ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... -

427 52153 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE / FEEM / CLEFT LIP
WITH OR WITHOUT CLEFT PALATE / MTHFR

CHUPONG ITTIWUT: ASSOCIATION BETWEEN *MTHFR* POLYMORPHISMS AND
FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE AND CLEFT LIP WITH OR
WITHOUT CLEFT PALATE. THESIS ADVISOR: DR.VORASAK SHOTELERSUK,
M.D., 94 pp. ISBN 974-03-1730-8.

Neural tube defect (NTD) and oral cleft are among the most common birth defects worldwide. In Thailand, Frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM) is a relatively common subtype of NTD. Two polymorphisms, the 677C→T and 1298A→C, in the gene encoding 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) have been found to be associated with occipital and lumbosacral encephaloceles, subtypes of NTD commonly found in Caucasians. No studies have determined the association between these two polymorphisms and FEEM. In addition, associations between *MTHFR* polymorphisms and oral cleft are still controversy. In this study, we aim to determine the associations between the 677C→T and 1298A→C polymorphisms in *MTHFR* and the developments of FEEM and oral cleft. We analyzed 48 families with FEEM and 162 families with oral cleft compared to 202 controls for the polymorphisms by PCR amplification followed by restriction enzyme digestion analysis. Our data show that the 677T allele frequency in Thai is 0.12 which is relatively low compared with those in other populations. The 1298C allele frequency is 0.25 among the Thai population which is comparable to those in other populations. Single locus analysis shows no association between the polymorphisms and patients with FEEM, oral cleft, or their parents. A family-based association studying using biallelic and multiallelic of Transmission disequilibrium (TDT) shows that transmission rates do not deviate significantly from equilibrium supporting results of no associations from the single locus analysis. Interestingly, we detected a statistically significant increased risk (OR = 3.67;95%CI:1.58-8.59) for the heterozygous mothers with the 677CT/1298AC genotype to have a child with oral cleft. This is consistent with the statistical significance ($\chi^2=6.969;p=0.008$) for mother with C-C/T-A haplotype. In conclusion, our data show that in the Thai population, women with the 677CT/1298AC *MTHFR* genotypes have a 3.67 fold of increased risk of having a child with oral cleft.

Field of study Medical Science

Academic year 2001

Student's signature... *Chupong Ittiwut* ...
Advisor's signature... *Vorarak Shotelersuk* ...

ACKNOWLEDGEMENT

I really would like to express my gratitude to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indebted to my advisor, Dr. Vorasuk Shotelersuk, whose help, interest, stimulating suggestions and encouragements help me all the time I have worked on this thesis. I also greatly express my heartfelt thanks to Assoc. Prof. Dr. Apiwat Mutirangura for his helpful suggestions and for giving me permission to use laboratory equipment. Furthermore, I would like to thank Assoc. Prof. Dr. Vilai Chentanez for corrections and suggestions for the thesis.

I am so grateful to my colleagues, Mr. Wichai Pornthanakasem, Miss Narisorn Kongruttanachok and Miss Sairoong Sukdikul for their helps and supports since the first time I started my laboratory practice. Miss Siraprapa Tongkorbpetch is also acknowledged for her helpful assistance. Especially, I would like to give my special thanks to Miss Rungnapa Hirunsatit for her helps and inspired me, this thesis would have been impossible to accomplish without her helps.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my dear parents and my grand parents for their loves and understandings which have driven me to be successful.

This work was supported by the National Science and Technology Development Agency, the Ministry of University Affairs and Chulalongkorn University.

TABLE OF CONTENTES

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgment.....	vi
Table of contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	xi
List of Abbreviation.....	xii
Chapter	
I. Introduction.....	1
II. Review of Related Literatures.....	7
III. Materials and Methods.....	24
IV. Results.....	37
V. Discussion and Conclusion.....	52
References.....	58
Appendices.....	69
Appendix A.....	70
Appendix B.....	74
Appendix C.....	78
Biography.....	83

LIST OF TABLE

Table	Page
1 Mixture of PCR reaction for 677C→T detection	30
2 PCR parameter for 677C→T detection	30
3 Mixture of PCR reaction for 1298A→C detection	31
4 PCR parameter for 1298A→C detection	31
5 Contingency table showing combination of Groups and Conditions for chi square (χ^2) test	32
6 Informative families with scoring of transmission alleles	34
7 Example for scoring number of time allele transmitted and untransmitted	36
8 Allelic distribution of the <i>MTHFR</i> 677C→T in groups of patients with FEEM and their mothers	39
9 Genotype distribution and calculated OR showing association between patients with FEEM their mother and the <i>MTHFR</i> 677C→T polymorphism	40
10 Allelic distribution of the <i>MTHFR</i> 1298A→C in groups of patients with FEEM and their mothers	41
11 Genotype distribution and calculated OR showing association between patients with FEEM, their mothers and the 1298A→C <i>MTHFR</i> polymorphism	41
12 Prevalence and calculated OR with 95% CI of the 677C→T in combination with 1298A→C <i>MTHFR</i> polymorphism among FEEMs, their parents and controls	42
13 Distribution of the haplotypes over the groups of patients with FEEM and their mothers	43
14 The distribution of <i>MTHFR</i> haplotype combination in patients with FEEM and their mothers	44
15 Allelic distribution of the <i>MTHFR</i> 677C→T in groups of patients with CL/P and their parents	45

LIST OF TABLE

Table		Page
16	Genotype distribution and calculated OR showing association between patients with CL/P their parents and the 677C→T <i>MTHFR</i> polymorphism	45
17	Comparison of the <i>MTHFR</i> 1298A→C polymorphism allele frequencies CL/Ps, their parents and controls	46
18	Genotype distribution and calculated OR showing association between Patients with CL/P and the 1298A→C <i>MTHFR</i> polymorphism	46
19	Prevalence and calculated OR with 95% CI of the 677C→T in combination with 1298A→C <i>MTHFR</i> polymorphism among CL/Ps, their parents and controls	48
20	Estimated haplotype frequencies of CL/Ps and their parents compared with controls	49
21	The distribution of <i>MTHFR</i> haplotype combination in patients with CL/P and their parents	50
22	Transmission disequilibrium test (TDT) of <i>MTHFR</i> polymorphisms in CL/P patients	51
23	Transmission disequilibrium test (TDT) of <i>MTHFR</i> haplotype from heterozygous parent to the CL/P offsprings	51
24	Relationship between <i>MTHFR</i> genotype and enzyme activity	56

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Features of Neural-Tube Development and Neural-Tube Defects	8
2	Subdivision of Frontoethmoidal encephalomeningoceles	9
3	metabolic pathways involving <i>MTHFR</i>	15
4	RFLP patterns of <i>MTHFR</i> 677C→T	37
5	RFLP patterns of <i>MTHFR</i> 1298A→C	38

LIST OF ABBREVIATIONS

FEEM	=	Frontoethmoidal encephalomeningocele
CL/P	=	Cleft lip with or without cleft palate
CL	=	Cleft lip
CP	=	Cleft palate
<i>MTHFR</i>	=	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
OR	=	Odd ratio
95%CI	=	95% Confidence Interval
HWE	=	Hardy-Weinberg equilibrium
TDT	=	Transmissio disequilibrium test
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism