

ความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอฟิซึมของ $TGF\beta$ -3 IRF6 SKI และ MTHFD1 กับการเกิดโรค
งวงช้างและโรคปากแห้งเพดานโหว่



นายเฉลิมพล ศรีจอมทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN : 974-17-4096-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN *TGF β -3*, *IRF6*, *SKI* AND *MTHFD1*
AND FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE AND ORAL CLEFT

Mr.Chalurmpon Srichomthong

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN : 974-17-4096-4


Thesis Title ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN *TGFβ-3*, *IRF6*,
SKI AND *MTHFD1* AND FRONTOETHMOIDAL
ENCEPHALOMENINGOCELE AND ORAL CLEFT

By Mr.Chalurmpun Srichomthong

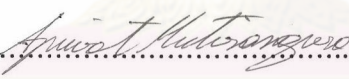
Field of Study Medical Science


Thesis Advisor Associate Professor Vorasuk Shotelersuk


Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master Degree



.....Dean of Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

Thesis Committee


.....Chairman
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Pichit Siriwan, M.D.)


.....Member
(Verayuth Praphanphoj, M.D.)

เฉลิมพล ศรีจอมทอง: ความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมของ *TGFβ-3*, *IRF6*, *SKI*, and *MTHFD1* กับการเกิดโรคคางทูมและโรคปากแหว่งเพดานโหว่ (ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN *TGFβ-3*, *IRF6*, *SKI* AND *MTHFD1* AND FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE AND ORAL CLEFT)

อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 90 หน้า. ISBN 974-17-4096-4

โรคปากแหว่งเพดานโหว่ (Oral Cleft) และโรคคางทูม (Frontoethmoidal Encephalomeningocele, FEEM) เป็นความพิการแต่กำเนิดที่เกิดขึ้นกับกะโหลกศีรษะและใบหน้าที่พบได้บ่อยในประเทศไทย โรคปากแหว่งเพดานโหว่ จำแนกเป็นสองกลุ่มคือ มีปากแหว่งเพียงอย่างเดียว หรือปากแหว่งร่วมกับเพดานโหว่ (cleft lip with or with our cleft palate, CL/P) และมีเพดานโหว่เพียงอย่างเดียว (cleft palate only, CPO) อุบัติการณ์การเกิดโรคแตกต่างกันออกไปในแต่ละกลุ่มประชากร ตั้งแต่ 1/500 – 1/2000 ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์สูงถึง 1/600 ส่วนโรคคางทูมนั้นจัดเป็นโรคในกลุ่มที่มีความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหลอดประสาท (neural tube defect, NTD) พบมากเฉพาะ ในประชากร Southern และ Southeast Asia อุบัติการณ์ในประเทศไทยคือ 1/6,000 ในการศึกษาเน้นหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน ในกลุ่ม transforming growth factor β ได้แก่ transforming growth factor β -3 (*TGFβ-3*), Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*), *SKI*. และยีนที่เกี่ยวข้องกับ folate pathway คือ trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/ methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthase (*MTHFD1*) กับการโรคทั้งสองโดยหลักการ candidate gene ผลการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง *TGFβ-3* 179C→T, *TGFβ-3* 383A→G และ *SKI* 1163C→T ไม่มีความหลากหลายในตัวอย่งที่นำมาทำการศึกษา ในส่วนของ *IRF6* และ *MTHFD1* พบความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่ โดย *IRF6* 820G→A แสดงความสัมพันธ์กับการลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดปากแหว่งและปากแหว่งร่วมกับเพดานโหว่ (OR = 0.57 [0.37 <OR< 0.86]) ส่วน *MTHFD1* 1958G→A ในกลุ่มเด็กที่เป็นเพดานโหว่ที่มีจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรค (OR = 4.42 [1.05 <OR< 16.52]) และยังพบว่าลูกที่แม่มีจีโนไทป์ GA จะเสี่ยงต่อการเกิดโรคเพดานโหว่ด้วย (OR = 2.25 [1.05 <OR< 4.86]) ในส่วนของ *SKI* 185C→G พบผู้ป่วยปากแหว่งร่วมกับเพดานโหว่ 2 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 186 รายเป็น homozygous GG โดยไม่พบในคนปกติ 269 คน สำหรับการศึกษาในโรคคางทูมนั้นไม่พบความสัมพันธ์ของยีนที่ทำการศึกษากับการเกิดโรค

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....*เฉลิมพล ศรีจอมทอง*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*อภิรักษ์*

427 52153 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE / FEEM / ORAL CLEFT / *TGFβ-3* / *IRF6* / *SKI* / *MTHFD1*

CHALURMPON SRICHOMTHONG: ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN *TGFβ-3*, *IRF6*, AND *SKI* AND FRONTOETHMOIDAL ENCEPHALOMENINGOCELE AND ORAL CLEFT. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR VORASUK SHOTELERSUK, 90 pp. ISBN 974-17-4096-4.

Oral cleft and frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM) are among the most severe congenital craniofacial malformations. Oral cleft consists of two major groups, cleft lip with or without cleft palate (CL/P) and cleft palate only (CPO). The variability incidence of cleft lip and/or palate is related to geographic origin, 1/500 or higher. In Thailand, CL/P incidence is 1/600. FEEM is an endemic neural tube defect (NTD), usually situated at the root of the nose, affecting children more commonly in Southern and Southeast Asia including Thailand with an incidence of approximately 1/6,000. We performed an association study between these diseases and genes in transforming growth factor β , *transforming growth factor β -3* (*TGFβ-3*), *Interferon regulatory factor 6* (*IRF6*), and *SKI*, and a gene in folate pathway, *trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthase* (*MTHFD1*). The results showed no *TGFβ-3* 179C→T, *TGFβ-3* 383A→G and *SKI* 1163C→T polymorphisms. Whereas *IRF6* 820G→A polymorphism showed a protective effect for CL/P (OR = 0.57 [0.37 <OR< 0.86]). On the other hand a susceptible risk for CPO was found in individuals with homozygous AA genotype for *MTHFD1* 1958G→A (OR = 4.42 [1.05 <OR< 16.52]), as seen in heterozygous GA mothers (OR = 2.25 [1.05 <OR< 4.86]). Homozygous GG of *SKI* 185C→G was found in 2/186 patient with CL/P but not found in 269 controls. No association between FEEM and our candidate genes was observed. In conclusion, we found an evidence that *IRF6* 820G→A in the patients may be a protective factor for CL/P, while AA at *MTHFD1* 1958G→A in children and heterozygous GA in mother may be a risk factor for CPO.

Field of study Medical Science

Academic year 2003

Student's signature..... Chalurmporn Srichomthong

Advisor's signature..... Vorasuk Shotelersuk

Co-advisor's signature..... Pichit Srim

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to all those who gave me the possibility to complete this thesis. I want to thank the committee of Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis in the first instance, to do the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, for his stimulating guidance and support. His expertise in genetics of the human improved my research skills and prepared me for future challenges. I thank my other committee members, Associate Professor Apiwat Mutirangura, Dr.Pichit Siriwan, and Dr.Verayuth Praphanphoj. for their helpful suggestions and insightful comments during my study.

I am so grateful to my colleagues, Mr. Wichai, Miss Narisorn, Miss Rungnapa Mr.Chupong, Miss Siraprapa, Miss Thivaratana and Miss Nuchsara for their assistance. If I lacked them, this work would not be accomplishment. Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their love and understanding to has brought me today's success.

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgment.....	vi
Table of contents.....	vii
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	x
List of Abbreviation.....	xi
Chapter	
I. Introduction.....	1
II. Review of Related Literatures.....	8
III. Materials and Methods.....	25
IV. Results.....	39
V. Discussion and Conclusion.....	59
References.....	64
Appendices.....	74
Biography.....	79

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Candidate Genes, their structures and SNPs.....	4
2 Priorities for single-nucleotide-polymorphism selection.....	18
3 Number of the study population.....	29
4 Primers and PCR products.....	31
5 PCR components.....	32
6 PCR cycle.....	32
7 Eventuality table showing combination of Groups and Conditions for chi square (X^2) test.....	35
8 Informative trios with scoring of transmission alleles.....	38
9 Genotypic and allelic distribution of the <i>IRF6</i> 820G→A in family with CL/P and controls.....	42
10 Genotypic and allelic distribution of the <i>SKI</i> 185C→G in family with CL/P and controls.....	43
11 Genotypic and allelic distribution of the <i>MTHFD1</i> 1958G→A in family with CL/P and controls.....	43
12 Genotypic and allelic distribution of the <i>IRF6</i> 820G→A in family with CPO and controls.....	44
13 Genotypic and allelic distribution of the <i>SKI</i> 185C→G in family with CPO and controls.....	45
14 Genotypic and allelic distribution of the <i>MTHFD1</i> 1958G→A in family with CPO and controls.....	45
15 Genotypic and allelic distribution of the <i>IRF6</i> 820G→A in family with FEEM and controls.....	46
16 Genotypic and allelic distribution of the <i>SKI</i> 185C→G in family with FEEM and controls.....	47

LIST OF TABLES (CONT.)

Table	Page
17 Genotypic and allelic distribution of the <i>MTHFD1</i> 1958G→A in family with FEEM and controls.....	47
18 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>IRF6</i> 820G→A in family with CL/P.....	49
19 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>SKI</i> 185C→G in family with CL/P.....	50
20 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>MTHFD1</i> 1958G→A in family with CL/P.....	51
21 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>IRF6</i> 820G→A in family with CPO.....	52
22 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>SKI</i> 185C→G in family with CPO.....	53
23 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>MTHFD1</i> 1958G→A in family with CPO.....	54
24 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>IRF6</i> 820G→A in family with FEEM.....	55
25 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>SKI</i> 185C→G in family with FEEM.....	56
26 Genotypic distribution and odds ratio (OR) of <i>MTHFD1</i> 1958G→A in family with FEEM.....	57
27 TDT analysis of <i>IRF6</i> 820G→A in CL/P patients.....	58
28 TDT analysis of <i>MTHFD1</i> 1958G→A in CL/P patients.....	58

LIST OF FIGURES

Table	Page
1 Diagram of various types of orofacial clefting.....	9
2 Features of Neural-Tube Development and Neural-Tube Defects.....	13
3 Characterization of Frontoethmoidal encephalomeningoceles.....	14
4 Signaling by TGF- β through serine/threonine kinase receptors and Smad proteins.....	22
5 Role of MTHFD1 in DNA synthesis.....	24
6 The schematic of RFLP profile for genotyping.....	34
7 RFLP patterns of <i>IRF6</i> 820G \rightarrow A.....	40
8 RFLP patterns of <i>SKI</i> 1163C \rightarrow T.....	40
9 RFLP patterns of <i>MTHFD1</i> 1958G \rightarrow A.....	41
10 Threshold theory.....	59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

FEEM	=	Frontoethmoidal encephalomeningocele
CL/P	=	Cleft lip with or without cleft palate
CPL	=	Cleft palate only
<i>TGFβ-3</i>	=	<i>Transforming growth factor β-3</i>
<i>IRF6</i>	=	<i>Interferon regulatory factor 6</i>
<i>SKI</i>	=	<i>SKI proto-oncogene</i>
<i>MTHFD1</i>	=	<i>Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase</i>
OR	=	Odd ratio
95%CI	=	95% Confidence Interval
HWE	=	Hardy-Weinberg equilibrium
TDT	=	Transmission disequilibrium test
RELP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism