

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน transforming growth factor beta2
กับความเสี่ยงในการเกิดโรค เอส แอล อี ในประชากรไทย



นางสาวกรองกมล เหมวิจิตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตรการแพทย์

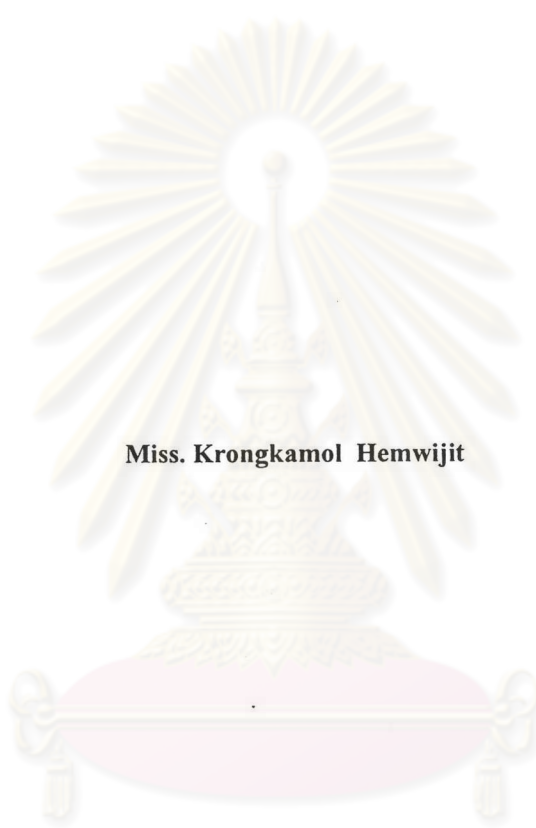
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN : 974-14-1757-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**THE ASSOCIATION BETWEEN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA2 GENE
POLYMORPHISMS AND GENETICS SUSCEPTIBILITY OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS
IN THAI POPULATION**



Miss. Krongkamol Hemwijit

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine**

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN : 974-14-1757-8

Thesis Title THE ASSOCIATION BETWEEN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA2
GENE POLYMORPHISMS AND GENETICS SUSCEPTIBILITY OF SYSTEMIC
LUPUS ERYTHEMATOSUS IN THAI POPULATION.


By Miss. Krongkamol Hemwijit

Field of study Medical Science


Thesis Advisor Assistant Professor Yingyos Avihingsanon, M.D.

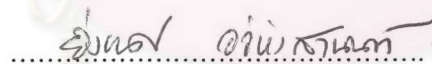
Thesis Co-advisor Associate Professor Nattiya Hirankarn, M.D. Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in partial Fulfillment of the
Requirements for the Master's Degree

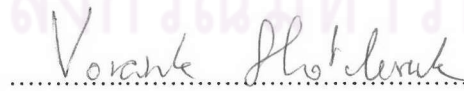

..... Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, MD.Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Yingyos Avihingsanon, M.D.)


..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Nattiya Hirankarn, M.D. Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Vorasuk Shotelersuk)

กรองกมล เหมวิจิตร : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน transforming growth factor beta2 กับความเสี่ยงในการเกิดโรค เอส แอล อี ในประชากรไทย (THE ASSOCIATION BETWEEN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA2 GENE POLYMORPHISMS AND GENETICS SUSCEPTIBILITY OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS IN THAI POPULATION.)
 อ.ที่ปรึกษา : ผศ.นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.พญ.ดร. ณีฎฐิยา หิรัญกาญจน์, 109 หน้า.
 ISBN : 974-14-1757-8

โรคเอสแอลอีเป็นโรครวมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเองเรื้อรังซึ่งเชื่อว่าสาเหตุของโรคเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การศึกษาทางพันธุกรรมจำนวนมากซึ่งส่วนใหญ่ทำในคนผิวขาวโดยวิธี linkage analysis และ association study รายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค SLE มากมาย แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ายีนใดเกี่ยวข้องกับโรคอย่างชัดเจน ยีน TGF β 2 เป็นหนึ่งใน candidate ยีน มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1q41 ของ TGF β family ซึ่ง family นี้มีบทบาทสำคัญในการเป็น multifunctional cytokines ในขบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ การอักเสบ และการควบคุมภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะเป็น immunomodulator และ immuno suppressor การศึกษาจำนวนมากโดยเฉพาะในเรื่องความผิดปกติจาก glomerulonephritis ล้วนแต่บ่งชี้ว่า TGF β มีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินไปสู่ renal fibrosis และ chronic kidney disease ในที่สุด งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความหลากหลายของยีน TGF β 2 ในผู้ป่วยโรค SLE 153 คน เปรียบเทียบกับคนปกติ 133 คน เพื่อหาความสัมพันธ์กับ susceptibility และการดำเนินของโรคโดยเฉพาะใน lupus nephritis งานวิจัยนี้ทำการศึกษา 4 SNP โดยอาศัยข้อมูลจาก THAISNP project ซึ่ง SNP ทั้งหมดมีตำแหน่งอยู่บน 5' UTR intron1 intron5 และ intron6 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SNP สามตำแหน่งสุดท้ายเป็นตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน จากการศึกษาที่พบเราพบว่า common อัลลีล _ ตำแหน่ง +71_72 insACAA, อัลลีล T ตำแหน่ง +720(T/G) และ common อัลลีล _ ตำแหน่ง +94400_94401insA มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค SLE ($p = 0.02$, OR = 1.83, 95%CI = 1.09-3.08, $p = 0.01$, OR = 2.37, 95%CI = 1.19-4.77 และ $p = 0.00008$, OR = 2.91, 95%CI = 1.66-5.15 ตามลำดับ) นอกจากนี้เรายังพบความสัมพันธ์แบบส่งเสริมกันของ haplotype แบบ _T/A/_ ว่ามีความสัมพันธ์อย่างมากกับความเสี่ยงในการเกิดโรค SLE ในประชากรไทย ($p = 0.0001$, OR = 2.64, 95%CI = 1.58-4.42) แม้ว่าเราจะไม่พบความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก นี่เป็นรายงานการศึกษาแรกที่พบ strong association ของยีน TGF β 2 ใน Intron6 กับความเสี่ยงในการเกิดโรคเอสแอลอี เนื่องจาก putative non-functional ของตำแหน่งนี้ ดังนั้นการศึกษาที่พบอาจนำไปสู่การมี Linkage disequilibrium คือ causative polymorphism หรือ mutation ภายใน specific haplotype แบบ _T/A/_

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
 ปีการศึกษา..... 2548.....

ลายมือชื่อนิติ.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ปรึกษาร่วม.....

##4674703430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD : SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS / TGF β 2 / SNP

KRONGKAMOL HEMWIJIT : THE ASSOCIATION BETWEEN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA2 GENE POLYMORPHISMS AND GENETICS SUSCEPTIBILITY OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS IN THAI POPULATION.
 THESIS ADVISOR : ASST.PROF. YINGYOS AVIHINGSANON, MD. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. NATTIYA HIRANKARN, MD, Ph.D., 109 pp. ISBN : 974-14-1757-8

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease, which both genetic and environmental factors are believed to be involved. Many genetic studies, mostly in Caucasian, by linkage analysis and association study implicated that various genes are related to SLE. However, it is still not well understood what genes really important to SLE. TGF β 2 gene, located on chromosome 1q41, is one of the candidate gene. This gene product belongs to TGF β family, which has important role as multifunctional cytokine in tissue repair, inflammation and immunoregulation especially as an immunomodulator and immunosuppressor. Many studies in glomerulonephritis suggest that TGF β has important role in a process of renal fibrosis and chronic kidney disease. The aim of this study was to characterize the polymorphisms of TGF β 2 gene in 153 SLE patients compared with 133 control group in order to determine the association with disease susceptibility and disease progression especially with lupus nephritis. Four SNPs identified by THAISNP project were included in this study located in 5'UTR, intron1, intron5 and intron6. Three of them were new markers which never been studied before. We found that the common allele _ at position +71_72insACAA, allele T at position +720(T/G) and common allele _ at position +94400_94401insA were associated with the increased risk of SLE disease ($p = 0.02$, OR = 1.83, 95%CI = 1.09-3.08, $p = 0.01$, OR = 2.37, 95%CI = 1.19-4.77 and $p = 0.00008$, OR = 2.91, 95%CI = 1.66-5.15, respectively). Furthermore, haplotype analysis at 4 position reveal a strongest association in _T/A/_ haplotype with SLE susceptibility in Thai population ($p = 0.0001$, OR = 2.64, 95%CI = 1.58-4.42). No association with clinical manifestation was observed. This is the first report of a very strong association of TGF β 2 gene polymorphism at intron6 with SLE susceptibility. According to the putative non-functional of this polymorphism. This observation is likely due to linkage disequilibrium to other causative polymorphism or mutation within this specific haplotype: _T/A/_.

Field of Study Medical Science

Academic year2005.....

Student's signature

Advisor's signature

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wished to express her deepest gratitude to her advisor, Assistant Professor Yingyos Avihingsanon, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kind excellent supervision and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism, guidance throughout the period of the study. I also would like to thanks my co-advisor, Associate Professor Nattiya Hirankarn, M.D. Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her stimulating guidance, valuable advice and supporting. Her expertise in immunology improved my research skills and prepared me for future challenges.

I would like 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 would like to thank Mr. Jeerawat Nakkuntod and Mr. Wichai Pornthanakasem for his kindness in guidance throughout the laboratories and providing the beneficial instrument for this study, Miss. Ingorn Kimkong for helping in laboratories. Without them, this work would not be accomplished.

I special thank to Professor Apiwat Mutirangura and his laboratory members for their courtesy for laboratory facilities.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and my friends for their love, support, understanding and encouragement.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II OBJECTIVE.....	5
III LITERATURE REVIEW.....	6
IV MATERIALS AND METHODS.....	17
V RESULTS.....	26
VI DISCUSSION.....	51
REFERENCES.....	53
APPENDIXES.....	60
APPENDIX A.....	61
APPENDIX B.....	63
APPENDIX C.....	65
APPENDIX D.....	68
APPENDIX E.....	83
APPENDIX F.....	87
APPENDIX G.....	91
BIOGRAPHY.....	96

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Revised American Rheumatism Association criteria for classification of systemic lupus erythematosus	8
2. Summary of human linkage studies in SLE.....	10
3. Association of TGF β 1 polymorphism with SLE and other diseases	15
4. Association studies between TGF- β 2 polymorphism and SLE	16
5. Transforming growth factor beta2 (TGF β 2) allele frequencies for ThaiSNP Report	19
6. Summary of SNPs used in this study	20
7. Characteristics of healthy controls and patients with SLE	25
8. Primers used for analysis of the TGF- β 2 gene polymorphism	25
9. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +71_72insACAA in healthy controls and SLE patients	33
10. Risk of SLE associated with TGF- β 2 (insACAA) genotype according to different models of inheritance	33
11. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +720 (T/G) in healthy controls and SLE patients	34
12. Risk of SLE associated with TGF- β 2 (T/G) genotype according to different models of inheritance	34
13. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +89835 (A/G) in healthy controls and SLE patients	35
14. Risk of SLE associated with TGF- β 2 (A/G) genotype according to different models of inheritance	35
15. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in healthy controls and SLE patients	36
16. Risk of SLE associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance	36

17. Haplotype frequencies of the TGF- β 2 polymorphism (+71_72insACAA, +720T/G, +89835 A/G, +94400_94401insA respectively) between normal controls and SLE patients	37
18. Association of the TGF- β 2 polymorphism (+71_72insACAA, +720T/G, +89835 A/G, +94400_94401insA respectively) between normal controls and SLE patients	38
19. Linkage disequilibrium coefficients ($ D'$ and r^2) among TGF β 2 SNP	39
20. Clinical manifestation of patients with SLE in this study	40
21. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in SLE patients with malar rash	41
22. Risk of malar rash associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance	41
23. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in SLE patients with discoid rash	42
24. Risk of malar rash associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance	42
25. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in SLE patients with photosensitivity	43
26. Risk of photosensitivity associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance	43
27. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in healthy controls and SLE patients with oral ulcers	44
28. Risk of oral ulcers associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance	44
29. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in SLE patients with persistent proteinurie	45
30. Risk of persistent proteinurie associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance	45
31. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in SLE patients with cellular cast.....	46
32. Risk of cellular cast associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance.....	46

33. Genotype and allele frequencies for TGF- β 2 polymorphism at position +94400_94401insA in SLE patients with arthritis.....	47
34. Risk of arthritis associated with TGF- β 2 (insA) genotype according to different models of inheritance.....	47
35. Allele and genotype frequencies of the TGF β 2 promoter polymorphisms in healthy Thais individuals compared Caucasian population.....	49
36. Pool phenotype codes are as follows, with X and Y designating two SNP alleles.....	63
37. Linkage disequilibrium coefficients ($ D' $ and r^2) among TGF β 2 SNP.....	81



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The representative of 5' – end labeling primer from samples with homozygous 4-bp insertion (ACAA), heterozygous of 4-bp insertion (ACAA) and homozygous for the commo.....	26
2. The representative of 5' – end labeling primer from samples with homozygous 1-bp insertion(A), heterozygous of 1-bp insertion (A) and homozygous for the common allele.....	27
3. The representative of PCR-RFLP results from samples with homozygous of + 720T and heterozygous + 720T/G	28
4. The representative of PCR-RFLP results from samples with homozygous + 89835A, heterozygous+ 89835 A/G and homozygous + 898.....	29



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

Ag	Antigen
Ab	Antibody
Bp	base pair
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CNS	central nervous system
C	Complement
°C	degree Celsius
dsDNA	double-standed deoxyribonucleic acid
et al	et alii
FcGR	Fc gamma Receptor
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ics	immune complex
IgG	Immunoglobulin G
IFN	interferon
IL	Interleukin
Kda	Kilodalton
λ_s	sibling risk ratio
l	litter
LD	Linkage Disequilibrium
μ l	microlitter
μ g	microgram
MBL	Mannose binding lectin
MBP	mannose-binding protein
ml	milliliter
mM	millimolar
MW	molecular weight
ng	nanogram
NK	Natural Killer

OD	Optimal Density
OR	Odds Ratio
PARP	poly-ADP-ribosyl transferase
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Th	T helper
U	Unit



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย