

ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีเมอร์พื้ในใยของมารดาในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิก  
กับกลุ่มอาการดาวน์

นางสาวทิวารัตน์ สีนฤวิวัฒน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6001-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN MATERNAL GENES OF FOLATE METABOLISM  
AND DOWN SYNDROME

Miss Thivaratana Sinthuwiwat



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2004

ISBN 974-17-6001-9


Thesis Title                                   ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN MATERNAL  
GENES OF FOLATE METABOLISM AND DOWN SYNDROME  
By   Miss Thivaratana Sinthuwiwat  
Field of Study                                 Medical Science  
Thesis advisor                               Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.


---


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

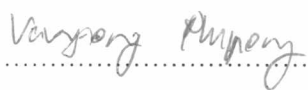
  
.....Dean of the Faculty of Medicine  
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

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

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

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

  
.....Member  
(Assistant Professor Vorapong Phupong M.D.)

ทิววาร์ตน์ สิ้นธุวิวัฒน์ : ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมในยีนของมารดาในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกกับกลุ่มอาการดาวน์ (ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN MATERNAL GENES OF FOLATE METABOLISM AND DOWN SYNDROME) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 101 หน้า. ISBN 974-17-6001-9

กลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบบ่อย ผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ส่วนใหญ่เกิดจากการที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 โครโมโซม ทำให้มีโครโมโซมคู่ที่ 21 สามโครโมโซมในแต่ละเซลล์ สาเหตุเกิดจากการไม่แยกตัวของโครโมโซมในระยะไมโอซิส และมีอุบัติการณ์ในประชากรทั่วไปประมาณ 1/600-1/1000 ของการคลอดที่มีชีวิต และพบเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะปัญญาอ่อน โอกาสเกิดกลุ่มอาการนี้ในบุตรจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของสตรีที่ตั้งครรภ์ นอกจากอายุของมารดาที่มากขึ้นที่เป็นปัจจัยหลักในการมีบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ ปัจจัยเสี่ยงของมารดาที่เป็นสาเหตุของการไม่แยกตัวของโครโมโซมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาที่มีมาก่อนเสนอว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมในยีนของมารดาในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกกับกลุ่มอาการดาวน์ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมในยีนที่ตำแหน่ง *MTHFR* 677C->T, *MTHFR* 1298A->C, *MTRR* 66A->G และ *MTR* 2756A->G กับโอกาสเสี่ยงของสตรีไทยในการมีบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์จากการศึกษาในมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์จำนวน 109 คนและกลุ่มควบคุม 186 คน โดยอายุเฉลี่ยของมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ =  $33.9 \pm 5.81$  และ กลุ่มควบคุม =  $32.4 \pm 5.12$  ( $\chi^2=0.034$ ,  $P=0.85$ ) โดยวิธี PCR และตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าความถี่อัลลีล *MTHFR* 677T เป็น 0.15 ส่วนความถี่ของอัลลีล *MTRR* 66G เท่ากับ 0.28 ซึ่งเป็นความถี่ที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับประชากรอื่นๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วนความถี่ของอัลลีล *MTHFR* 1298C และ *MTR* 2756G เท่ากับ 0.28 และ 0.15 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับประชากรอื่น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างในความถี่ของอัลลีลและความถี่ของจีโนไทป์ระหว่างมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างความถี่ของแฮพลอไทป์ของ *MTHFR* 677/*MTHFR* 1298 ระหว่างมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มควบคุม โดยสรุปการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่าสตรีไทยที่มีโพลีมอร์ฟิซึมในยีน *MTHFR*, *MTRR* และ *MTR* ไม่มีความสัมพันธ์กับการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต ทิววาร์ตน์ สิ้นธุวิวัฒน์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์*  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

# # 457 52213 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: DOWN SYNDROME / MTHFR / MTRR / MTR

THIVARATANA SINTHUWIWAT : ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN  
MATERNAL GENES OF FOLATE METABOLISM AND DOWN SYNDROME.

THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR VORASUK SHOTELERSUK, M.D.,  
101 pp. ISBN 974-17-6001-9

Down syndrome is a complex genetic and metabolic disorder attribute to the presence of three copies of chromosome 21. It is the leading genetic cause of mental retardation and is estimated to occur 1/600 – 1,000 live births. The origin of extra chromosome is due to abnormal chromosomal segregation during meiosis (non disjunction). Except for advanced maternal age at conception, maternal risk factors for meiotic non disjunction are unknown. Previous studies found an association between polymorphisms in maternal genes of folate metabolism and Down syndrome. However, it is still controversial. Some recent studies showed contradictory findings. We performed an association study between *MTHFR* 677C->T, *MTHFR* 1298A->C, *MTRR* 66A->G and *MTR* 2756A->G polymorphisms and the risks of Thai women having children with Down syndrome. We analyzed 109 case mothers and 186 control mothers for the polymorphisms by PCR amplification followed by restriction enzyme digestion analysis. There were no significant difference between groups in term of mean age at conception (case = 33.9±5.81, control = 32.4± 5.12;  $\chi^2=0.034$ ,  $P=0.85$ ). Our data show that *MTHFR* 677T and *MTRR* 66G allele frequencies in Thai are 0.15 and 0.28, respectively. These are relatively low compared with those in other population. The *MTHFR*1298C and *MTR*2756G allele frequencies are 0.28 and 0.15, respectively. These frequencies are comparable to those in other populations. The results found no difference in the allele and genotype frequencies of *MTHFR* 677C->T, *MTHFR* 1298A->C, *MTRR* 66A->G and *MTR* 2756A->G between Thai mothers of Down syndrome and controls. Moreover, we found no difference in the haplotype frequencies of *MTHFR* in case compared with control group. In conclusion, our results do not support the presence of an increased risk of Down syndrome in mothers carrying of the *MTHFR*, *MTRR* and *MTR* polymorphisms in Thai population.

Field of study Medical Science

Academic year 2004

Student's signature Thivaratana Sinthuwirat.

Advisor's signature Vorasuk Shotelersuk

## ACKNOWLEDGEMENTS

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, Assoc. Prof. Dr. Vorasuk Shotelersuk for his help, interest, suggest and encouragements help me all the time I have worked on this thesis. I also greatly express my heartfelt thanks to other committee members, Assoc. Prof. Dr. Apiwat Mutirangura, Dr. Verayuth Praphanpoj and Assist. Prof. Dr. Vorapong Phupong for their helpful suggestion and corrections during my study.

I am so grateful to my colleagues, Mr. Wichai Pornthanakasem for his helps, supports since the first time I started my laboratory practice and inspired me. Furthermore, I would like to thank Miss Nida Pornprasertsud and Mr. Chupong Ittiwut for encouragement help me all the time I have worked on this thesis. Especially, I would like to give my special thanks to Miss Siraprapa Thongkorbetch, Mr. Chalurmporn Srichomgthong for their helps, suggestion and encouragements, this thesis would have been impossible to accomplish without their helps.

Finally, I would like to express my deepest gratitude my dear parents for their loves and understandings to have brought me today's success.

This work was supported by Chulalongkorn University

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## TABLE OF CONTENTS

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgments.....	vi
Table of contents.....	vii
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	xi
List of Abbreviation.....	xii
Chapter	
I. Introduction.....	1
II. Review of Related Literatures.....	8
III. Materials and Methods.....	20
IV. Results.....	31
V. Discussion and Conclusion.....	57
References.....	61
Appendices.....	74
Biography.....	89

## LIST OF TABLE

Table	Page
1 Results of previous studies that found the association between SNPs of <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> and <i>MTR</i> was risk for having children with Down syndrome.....	11
2 Results of previous studies that failed to find the association between SNPs of <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> and <i>MTR</i> was risk for having children with Down syndrome.....	12
3 Primer and PCR products.....	26
4 Mixture of PCR reaction for detection.....	27
5 PCR cycle.....	27
6 Contingency table showing combination of Groups and Conditions for chi square ( $\chi^2$ ) test.....	29
7 Characteristic of responding age-matched control mothers and mothers of children with Down syndrome.....	31
8 Allele frequency of polymorphisms from <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> and <i>MTR</i> in mothers having children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	36
9 Frequency of <i>MTHFR</i> 677C->T polymorphism in mothers having children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	37
10 Frequency of <i>MTHFR</i> 1298A->C polymorphism in mothers having children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	38
11 Frequency of <i>MTHFR</i> polymorphisms in mothers having children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	39
12 Distribution of the haplotype over the groups of case mothers and control.....	40
13 The distribution of <i>MTHFR</i> haplotype combination in DS mother and control.....	40
14 Frequency of <i>MTRR</i> polymorphisms in mothers having children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	41
15 Interaction between <i>MTHFR</i> and <i>MTRR</i> in mothers having children with Down syndrome and age-matched control mothers.....	42



## LIST OF TABLE

Table	Page
16	Frequency of <i>MTR</i> polymorphisms in mothers having children with Down syndrome and Age-match control mothers.....42
17	Interaction between <i>MTHFR</i> and <i>MTR</i> in mothers having children with Down syndrome and age-matched control mothers.....43
18	Interaction between <i>MTRR</i> and <i>MTRR</i> in mothers having children with Down syndrome and age-matched control mothers.....44
19	Interaction between <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> and <i>MTR</i> in mothers having children with Down syndrome and age-matched control mothers.....45
20	Characteristic of responding age-matched control mothers and mothers of children with Down syndrome( $\leq$ 30 years old) .....48
21	Allele frequency of polymorphisms from <i>MTHFR</i> , <i>MTR</i> and <i>MTRR</i> in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome compared to Age-matched control mothers.....49
22	Frequency of <i>MTHFR</i> 677C->T polymorphism in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-match control mothers.....50
23	Frequency of <i>MTHFR</i> 1298A->C polymorphism in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-match control mothers.....50
24	Frequency of <i>MTHFR</i> polymorphisms in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-match control mothers.....52
25	Distribution of the haplotype over the groups of case mothers and control.....52
26	The distribution of <i>MTHFR</i> haplotype combination mothers aged 30 years old or less to have and control.....53

## LIST OF TABLE

Table	Page
27 Frequency of <i>MTRR</i> polymorphisms in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	54
28 Interaction between <i>MTHFR</i> and <i>MTRR</i> in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-matched control mothers.....	54
29 Frequency of <i>MTRR</i> polymorphisms in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-match control mothers.....	55
30 Interaction between <i>MTHFR</i> and <i>MTR</i> in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-matched control mothers.....	55
31 Interaction between <i>MTRR</i> and <i>MTRR</i> in mothers aged 30 years old or less to have children with Down syndrome and Age-matched control mothers.....	56

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	metabolic pathway of <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> and <i>MTR</i>	13
2.	RFLP patterns of <i>MTHFR</i> 677C->T	32
3.	RFLP patterns of <i>MTHFR</i> 1298A->C	33
4.	RFLP patterns of <i>MTRR</i> 66A->G	34
5.	RFLP patterns of <i>MTR</i> 2756A->G	35



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF ABBREVIATIONS

DS	=	Down syndrome
<i>MTHFR</i>	=	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
<i>MTRR</i>	=	Methionine syntase reductase
<i>MTR</i>	=	Methionine syntase
OR	=	Odd ratio
95%CI	=	95% Confidence Interval
HWE	=	Hardy-Weinberg equilibrium
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย