

3565009
9

PPPUKM

HADIAH

PENENTUAN METILASI DNA PADA PROMOTER *MATRIX*
METALLOPROTEINASE 1 (MMP1) DAN *MMP 9*
DALAM KELAHIRAN BAYI PRAMATANG

NURUL HAYATI BINTI MOHAMAD ZAINAL



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEH IJAZAH
SARJANA SAINS PERUBATAN

FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2013



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

27 Mei 2013

NURUL HAYATI BINTI MOHAMAD ZAINAL
P50275

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang Maha Pemurah dan Maha Mengasihani. Beryukur saya ke hadrat Ilahi kerana memberikan saya berkat, inayah, kesabaran dan kekuatan dalam menyiapkan dan menyempurnakan kajian ini. Sekalung penghargaan dan jutaan terima kasih yang tak terhingga kepada penyelia utama Profesor Madya Dr. Norfilza Mohd Mokhtar atas bimbingan, teguran dan nasihat yang begitu berguna kepada saya sepanjang kajian ini. Ucapan terima kasih ditujukan kepada penyelia bersama saya iaitu Dr. Norhazlina Abd Wahab yang sudi memberikan tunjuk ajar dalam menyiapkan kajian ini. Jutaan penghargaan juga ditujukan kepada penyelidik bersama, Profesor Dr. Nor Azlin Mohamed Ismail yang banyak membantu dalam pengumpulan sampel kajian di Jabatan Obstetrik dan Ginekologi PPUKM. Penghargaan yang tak terhingga saya ingin luahkan kepada Profesor Madya Dr. Azmi Tamil dari Jabatan Kesihatan Komuniti PPUKM yang tidak jemu memberikan bimbingan dan tunjuk ajar kepada saya dalam analisis dan pengolahan data statistik kajian ini.

Kajian ini tidak akan dapat disiapkan tanpa bantuan dan bimbingan dari Profesor Madya Dr. Nor Anita Megat Mohd Nordin yang merupakan ketua Jabatan Fisiologi UKM, Profesor Madya Dr. Zaiton Zakaria, Profesor Madya Dr. Siti Fatimah Ibrahim, para pensyarah Jabatan Fisiologi UKM dan Profesor Dr. Fauziah Othman iaitu ketua Jabatan Anatomi Manusia UPM. Jutaan terima kasih juga diucapkan kepada Profesor Datuk Dr. A Rahman A Jamal, pengarah Institut Perubatan Molekul UKM (UMBI) kerana membenarkan penggunaan makmal UMBI bagi menjalankan metodologi kajian ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada pihak Lembaga Etika & Penyelidikan PPUKM kerana memberikan kelulusan dan bantuan geran juga kepada pihak UPM yang meluluskan cuti belajar dengan bergaji penuh.

Kerja makmal saya di UMBI tidak akan dapat dijayakan tanpa bantuan dan tunjuk ajar daripada kakitangan UMBI terutamanya kepada Cik Zamzureena Mohd Rani dan Puan Raihana Mat Isa. Ucapan terima kasih juga saya hulurkan kepada rakan pelajar dan pembantu penyelidik di UMBI yang banyak membantu saya di dalam makmal terutamanya kepada Puan Rosfayati Othman, Cik Rabiah Abdul Wahab, Cik Nurul Ainin Abdul Aziz dan Dr. Hermawan Istiadi. Sekalung penghargaan juga ingin saya zahirkan kepada semua kakitangan wad dan bilik bersalin PPUKM, Jabatan Fisiologi UKM dan juga Jabatan Anatomi Manusia UPM.

Akhir sekali tetapi yang memainkan peranan utama dalam hidup saya, ucapan penghargaan yang tak berbelah bahagi atas pemahaman dan pengorbanan yang diberikan oleh seluruh keluarga saya. Ingatan abadi penuh kasih sayang terhadap Allahyarham ayahanda, Mohamad Zainal Abidin dan Allahyarhamah bonda, Umi Kalsum Pohan Hj Zainuddin. Ucapan ini ditujukan khas kepada suami Khairul Akmal Idris, anakanda kesayangan Harith Ziqri dan Adam Wafiy yang memahami pengorbanan yang perlu bonda lakukan bagi menyiapkan kajian ini. Ucapan ini juga kepada kekanda Dr. Ir. Hannerita Mohamad Zainal serta anakandanya Noor Syahirah Badrol Alam. Terima kasih juga ditujukan kepada sahabat sejati saya Siti Sabariah Yaakob. Terima kasih sekalung budi atas nasihat, pengertian dan sokongan padu yang diberikan terutamanya dalam menempuh masa-masa sukar dalam menyiapkan kajian ini. Sekian.

ABSTRAK

Kelahiran bayi pramatang mencatat 6 ke 10 peratus daripada jumlah keseluruhan kelahiran bayi di negara Barat dan menyumbang lebih dua pertiga kematian perinatal. Pemahaman mengenai metilasi DNA boleh menyumbang kepada asas pengetahuan dalam memahami patogenesis kelahiran bayi pramatang. Objektif kajian ini adalah untuk menentukan kehadiran metilasi DNA pada promoter *matrix metalloproteinase 1* (*MMP1*) dan *matrix metalloproteinase 9* (*MMP9*) dalam kelahiran bayi matang dan bayi pramatang menggunakan analisis bisulfit, metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase (MSP). Sampel darah vena ibu yang diperolehi daripada kelahiran bayi matang ($n = 15$) dan bayi pramatang ($n = 15$) melalui rawatan bisulfit dan menjalani proses MSP. Kaedah MSP dijalankan menggunakan kitaran parameter yang merangkumi langkah pengaktifan awal pada suhu 95°C , penyahsialian pada suhu 94°C diikuti oleh langkah penyepuhan. Terdapat 4 suhu penyepuhan; 56.1°C untuk *methyalted MMP1*, 53.7°C untuk *unmethyalted MMP1*, 51.9°C untuk *methyalted MMP9* dan 52.3°C untuk *unmethyalted MMP9*. Langkah terakhir ialah langkah pemanjangan pada suhu 72°C . Keputusan MSP disahkan menggunakan kaedah penjujukan DNA. Penilaian keputusan penjujukan DNA bagi analisis gugusan CpG dibuat menggunakan perisian ClustalW dan SPSS. Primer bagi *MMP1* terletak di antara -1226 ke -1378 daripada lokasi permulaan transkripsi (*transcription start site*) (TSS) gen *MMP1* yang mengandungi lima gugusan CpG. Sementara itu, primer *MMP9* pula terletak di antara -337 ke -447 daripada lokasi TSS gen *MMP9* dan mengandungi enam gugusan CpG. Metilasi *MMP1* dikesan pada 30 sampel kelahiran matang dan pramatang menggunakan MSP. Bagi promoter *MMP9* pula, kesemua sampel mempunyai turutan DNA metilasi dan tidak metilasi. Keputusan gen *MMP1* disahkan dengan kaedah penjujukan DNA. Tetapi keputusan validasi untuk gen *MMP9* adalah gagal. Analisis gugusan CpG bagi *MMP1* menunjukkan kumpulan kelahiran bayi matang mempunyai gugusan CpG metilasi yang lebih tinggi iaitu 49 (65.33%) berbanding kumpulan kelahiran bayi pramatang yang hanya mempunyai 39 (52%) daripada jumlah keseluruhan 75 CpG ($t=0.694$, $p<0.05$). Metilasi dikesan pada 4 daripada 5 gugusan CpG dalam promoter *MMP1* di mana ia melibatkan 7 sampel kelahiran matang (46.47%) dan hanya 2 sampel pramatang (13.33%). Peratusan *methyalted MMP1* yang lebih tinggi berpotensi menyebabkan ekspresi *MMP1* berkurangan dan dengan itu mengekalkan kekuatan kolagen fibrilar pada membran amnion. Ini dapat mengekalkan kehamilan sehingga matang. Kesimpulannya, kelahiran bayi pramatang mempunyai peratusan gugusan CpG metilasi yang lebih rendah berbanding kelahiran bayi matang bagi gen *MMP1* yang menggunakan primer antara -1226 ke -1378 daripada TSS gen *MMP1*.

DETERMINATION OF DNA METHYLATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE 1 (*MMP1*) AND *MMP 9* PROMOTERS IN PRETERM LABOUR

ABSTRACT

Preterm birth accounts for 6 to 10 percent of all births in Western countries and contributes more than two thirds of all perinatal deaths. Understanding DNA methylation may offer basic knowledge in the understanding of pathogenesis of preterm labour. The objective of this study was to determine presence of DNA methylation of matrix metalloproteinase 1 (*MMP1*) and matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) promoters in term and preterm labour using bisulfite analysis, methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). Maternal venous blood samples of term labour ($n = 15$) and preterm labour ($n = 15$) underwent bisulfite treatment and was subjected to MSP. The MSP was carried out using cycle parameters of initial activation step at 95°C, denaturing at 94°C, followed by annealing step. There were 4 annealing temperatures used; 56.1°C for *MMP1* methylated, 53.7°C for *MMP1* unmethylated, 51.9°C for *MMP9* methylated and 52.3°C for *MMP9* unmethylated. Final step is an extension at 72°C. MSP results were validated using DNA sequencing method. Evaluation of the sequencing results by CpG islands analysis was done using ClustalW and SPSS softwares. Primers for *MMP1* were located between -1226 to -1378 upstream from the transcription start site (TSS) of *MMP1* gene that consists of five CpG islands. While *MMP9* primers were located at -337 to -447 upstream of TSS of *MMP9* gene, consisting of six CpG islands. *MMP1* methylation was detected in 30 samples of term and preterm using MSP. While for *MMP9* promoter, all samples have both methylated and unmethylated DNA sequence. Findings of *MMP1* gene was confirmed by DNA sequencing. However, validation of *MMP9* gene failed. The CpG islands analysis for *MMP1* revealed that term labour samples have higher methylated CpG, which was 49 (65.33%) as compared to preterm labour samples that have only 39 (52%) out of total 75 CpG ($t=0.694$, $p<0.05$). Methylation occurred in 4 out of 5 methylated CpG islands in the *MMP1* promoter where it involved 7 term samples (46.47%) and only 2 preterm samples (13.33%). Higher percentage of methylated *MMP1* will most likely cause *MMP1* expression to decrease, thus maintaining fibrillar collagen strength at the amniotic membrane. This will subsequently maintain pregnancy till term. In conclusion, preterm labour has higher percentage of methylated CpG compared with term labour in *MMP1* gene using primer located between -1226 to -1378 upstream from the transcription start site (TSS) of *MMP1* gene.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI ILUSTRASI	x
SENARAI SIMBOL	xi
SENARAI TATANAMA	xiv

BAB I	PENDAHULUAN	
1.1	Pengenalan	1
1.2	Objektif	5
1.2.1	Objektif am	5
1.2.2	Objektif khusus	5
1.3	Hipotesis Kajian	5
BAB II	KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1	Pengenalan Kelahiran Bayi Prematang	6
2.2	Epidemiologi Kelahiran Bayi Prematang	7
2.3	Etiologi Kelahiran Bayi Prematang	8
2.4	Faktor Genetik dan Kelahiran Bayi Prematang	9
2.4.1	Polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs) dan kelahiran bayi pramatang	10
2.4.2	Interaksi persekitaran, gen dan kelahiran bayi pramatang	10
2.4.3	Faktor gen dan kelahiran bayi pramatang	11
2.5	Faktor Epigenetik dan Kelahiran Bayi Prematang	17
2.5.1	Metilasi DNA	17
2.6	Metilasi DNA Gen <i>MMP1</i> dan <i>MMP9</i> Dalam Kelahiran Bayi Prematang	19
BAB III	METODOLOGI KAJIAN	
3.1	Pengenalan	211
3.2	Subjek Kajian	211

3.3	Sampel Kajian	22
3.4	Pengiraan Saiz Sampel	222
3.5	Radas dan Bahan	24
3.6	Penyediaan Sampel	25
3.6.1	Rawatan bisulfit	25
3.6.2	Penentuan kualiti dan kuantiti DNA ekstrak	26
3.6.3	Metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase (MSP)	26
3.6.4	Elektroforesis gel agaros	30
3.6.5	Penjujukan DNA	32
3.7	Carta Alir Sampel	36
BAB IV	HASIL KAJIAN	
4.1	Pengenalan	37
4.2	Analisis Data Demografi Sampel	37
4.3	Analisis Kualiti dan Kuantiti DNA Ekstrak	40
4.4	Analisis MSP Menggunakan Elektroforesis Gel Agaros	40
4.4.1	Analisis MSP gen <i>MMP1</i>	40
4.4.2	Analisis MSP gen <i>MMP9</i>	46
4.5	Analisis MSP Gen <i>MMP1</i> Menggunakan Kaedah Penjujukan DNA	50
4.6	Analisis Data MSP Gen <i>MMP1</i> Menggunakan Perisian ClustalW dan SPSS	53
4.7	Analisis Data Penjujukan DNA Gen <i>MMP1</i> Menggunakan Perisian ClustalW dan SPSS	60
BAB V	PERBINCANGAN	
5.1	Data Demografi	64
5.1.1	Tempoh gestasi dan kelahiran bayi pramatang	64
5.1.2	Berat kelahiran bayi dan kelahiran bayi pramatang	65
5.1.3	Tempoh gestasi, berat kelahiran bayi dan kelahiran bayi pramatang	65
5.2	Kaedah Makmal	66
5.2.1	Rawatan bisulfit	66
5.2.2	Metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase (MSP))	68
5.3	Metilasi DNA Pada Promoter Gen <i>MMP1</i> dan Gen <i>MMP9</i>	68
5.3.1	Data hasil kajian gen <i>MMP1</i>	71
5.3.2	Data hasil kajian gen <i>MMP9</i>	73
5.4	Sumbangan Kajian Terhadap Masyarakat	76

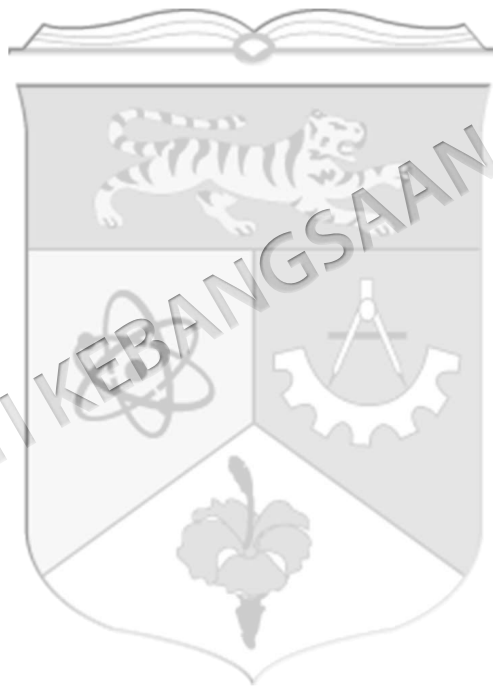
BAB VI KESIMPULAN

6.1	Rumusan dan Penemuan Kajian	77
6.2	Cadangan Kajian Lanjutan	78

RUJUKAN	81
----------------	----

LAMPIRAN	87
-----------------	----

A	Borang Persetujuan Pesakit	87
B	Borang Kelulusan Lembaga Etika & Penyelidikan PPUKM	93
C	Manuskrip Yang Dihantar	95



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
3.1	Senarai jujukan primer oligonukleotida ke hadapan dan ke belakang dalam MSP	29
3.2	Tindak balas dan suhu bagi kitar gen <i>MMP</i>	30
3.3	Suhu penyepuhan bagi gen <i>MMP1</i> dan <i>MMP9</i>	30
3.4	Reagen kitaran jujukan DNA	33
3.5	Tindak balas dan suhu bagi kitaran penjujukan DNA	33
4.1	Ringkasan maklumat demografi bagi data pesakit	39
4.2	Min tempoh gestasi (hari) dan berat bayi (kg) mengikut kumpulan kes	40
4.3	Hasil analisis nanodrop ND-1000 spektrofotometer (TB01-TB12, TB13-TB17, PB01-PB06 dan PB07-PB16) (PB = sampel bayi pramatang, TB = sampel bayi matang)	42
4.4	Ringkasan maklumat bagi sampel data kelompok gugusan CpG	62
4.5	Hasil ujian t bagi bilangan CpG metilasi berdasarkan kes	62
4.6	Korelasi di antara variabel kelahiran bayi pramatang dengan jumlah CpG metilasi	63

SENARAI ILUSTRASI

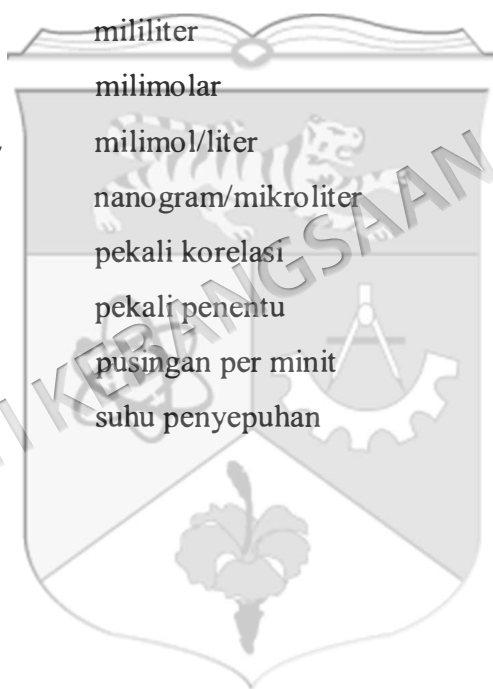
No. Rajah	Halaman
3.1	23
Rajah yang menunjukkan pengiraan saiz sampel menggunakan 15 kes pesakit dan 15 kes kawalan menggunakan perisian PS2	
3.2	28
Rajah menunjukkan jujukan, lokasi dan kedudukan primer <i>MMP1</i> beserta gugusan CpG (M – primer metilasi, U – primer bukan metilasi)	
3.3	28
Rajah menunjukkan jujukan, lokasi dan kedudukan primer <i>MMP9</i> beserta gugusan CpG (M – primer metilasi, U – primer bukan metilasi)	
4.1	41
Hasil analisis sampel dalam perisian menggunakan Nanodrop Nd-1000 spektrofotometer	
4.2	43
MSP menggunakan primer gen <i>MMP1</i> bagi sampel darah TB01, TB14, TB15, PB02, PB13 dan PB14 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP1</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP1</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP1</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP1</i> bukan metilasi)	
4.3	43
MSP menggunakan primer gen <i>MMP1</i> bagi sampel darah TB02, TB04, PB15 dan PB16 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP1</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP1</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP1</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP1</i> bukan metilasi)	
4.4	44
MSP menggunakan primer gen <i>MMP1</i> bagi sampel darah TB03, TB16, TB17, PB01, PB02 dan PB03 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP1</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP1</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP1</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP1</i> bukan metilasi)	
4.5	44
MSP menggunakan primer gen <i>MMP1</i> bagi sampel darah TB05, TB06, TB07, PB04, PB05 dan PB06 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP1</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP1</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP1</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP1</i> bukan metilasi)	
4.6	45
MSP menggunakan primer gen <i>MMP1</i> bagi sampel darah TB08, TB09, TB10, PB07, PB08 dan PB09 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP1</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP1</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP1</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP1</i> bukan metilasi)	

4.7	MSP menggunakan primer gen <i>MMP1</i> bagi sampel darah TB11, TB12, TB13, PB10, PB11 dan PB12 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP1</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP1</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP1</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP1</i> bukan metilasi)	45
4.8	MSP menggunakan primer gen <i>MMP9</i> bagi sampel darah TB01, TB02, TB05, PB03, PB06 dan PB04 (9M+ve = kawalan positif <i>MMP9</i> metilasi, 9M-ve = kawalan negatif <i>MMP9</i> metilasi, 9U+ve = kawalan positif <i>MMP9</i> bukan metilasi dan 9U-ve = kawalan negatif <i>MMP9</i> bukan metilasi)	47
4.9	MSP menggunakan primer gen <i>MMP9</i> bagi sampel darah TB04, TB06, TB07, PB01, PB02 dan PB05 (<i>MMP9</i> M+ve ctrl = kawalan positif <i>MMP9</i> metilasi, <i>MMP9</i> M-ve ctrl = kawalan negatif <i>MMP9</i> metilasi, <i>MMP9</i> M+ve = kawalan positif <i>MMP9</i> bukan metilasi dan <i>MMP9</i> M-ve = kawalan negatif <i>MMP9</i> bukan metilasi)	47
4.10	MSP menggunakan primer gen <i>MMP9</i> bagi sampel darah TB03, TB07, PB15 dan PB16 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP9</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP9</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP9</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP9</i> bukan metilasi)	48
4.11	MSP menggunakan primer gen <i>MMP9</i> bagi sampel darah TB08, TB09, TB10, PB07, PB08 dan PB09 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP9</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP9</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP9</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP9</i> bukan metilasi)	48
4.12	MSP menggunakan primer gen <i>MMP9</i> bagi sampel darah TB11, TB12, TB13, PB10, PB11 dan PB12 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP9</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP9</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP9</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP9</i> bukan metilasi)	49
4.13	MSP menggunakan primer gen <i>MMP9</i> bagi sampel darah TB14, TB15, TB16, TB17, PB13 dan PB14 (+ve ctrl M = kawalan positif <i>MMP9</i> metilasi, -ve ctrl M = kawalan negatif <i>MMP9</i> metilasi, +ve ctrl unM = kawalan positif <i>MMP9</i> bukan metilasi dan -ve ctrl unM = kawalan negatif <i>MMP9</i> bukan metilasi)	49
4.14	Jujukan DNA bentuk kromatografi bagi TB05	50
4.15	Jujukan DNA bentuk kromatografi bagi TB11	51
4.16	Jujukan DNA bentuk kromatografi bagi PB02	51

4.17	Jujukan DNA bentuk kromatografi bagi PB08	52
4.18	Jujukan DNA bentuk kromatografi bagi PB13	52
4.19	Jujukan DNA bentuk kromatografi bagi PB14	53
4.20	Jujukan <i>MMP1</i> dalam TB05 yang disahkan dengan perisian susunan ClustalW	54
4.21	Jujukan <i>MMP1</i> dalam TB05 yang disahkan dengan jadual skor perisian ClustalW	54
4.22	Jujukan <i>MMP1</i> dalam TB11 yang disahkan dengan perisian susunan ClustalW	55
4.23	Jujukan <i>MMP1</i> dalam TB11 yang disahkan dengan jadual skor perisian ClustalW	55
4.24	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB02 yang disahkan dengan perisian susunan ClustalW	56
4.25	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB02 yang disahkan dengan jadual skor perisian ClustalW	56
4.26	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB08 yang disahkan dengan perisian susunan ClustalW	57
4.27	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB08 yang disahkan dengan jadual skor perisian ClustalW	57
4.28	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB13 yang disahkan dengan perisian susunan ClustalW	58
4.29	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB13 yang disahkan dengan jadual skor perisian ClustalW	58
4.30	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB14 yang disahkan dengan perisian susunan ClustalW	59
4.31	Jujukan <i>MMP1</i> dalam PB14 yang disahkan dengan jadual skor perisian ClustalW	59
4.32	Jumlah kuantiti CpG metilasi dalam kumpulan bayi matang dan pramatang	61
4.33	Jumlah bilangan taburan lokasi CpG metilasi mengikut Jujukan bagi kumpulan bayi matang dan pramatang	61

SENARAI SIMBOL

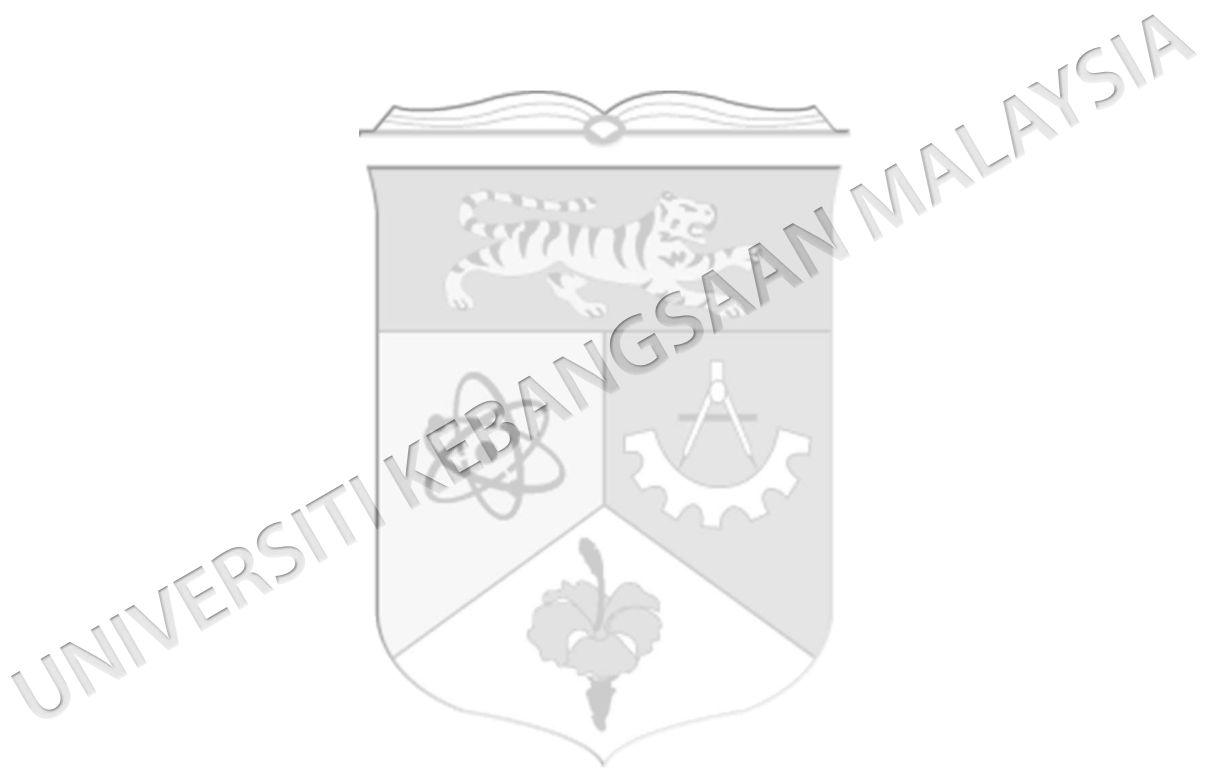
$^{\circ}\text{C}$	darjah Celcius
%	peratus
μl	mikroliter
bp	pasangan bes
cm	sentimeter
kb	kilobes
kg	kilogram
M	molar
min	minit
ml	mililiter
mM	milimolar
mmol/L	milimol/liter
ng/ μl	nanogram/mikroliter
r	pekali korelasi
r^2	pekali penentu
rpm	pusingan per minit
T_m	suhu penyepuhan



SENARAI TATANAMA

BV	vaginosis bakteria
cDNA	DNA komplementari
ddNTPs	<i>Dideoxynucleotide triphosphates</i>
DNA	<i>deoxynucleic acid</i>
DNMTs	<i>DNA methyltransferases</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
gugusan CpG	Kawasan genomik yang mempunyai bilangan frekuensi CpG yang tinggi
IL-1 β	interleukin-1 β
IUGR	rencanan tumbesaran dalam kandungan
LBW	kelahiran bayi kurang berat
MBDs	<i>methyl-CpG-binding domain proteins</i>
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
MMP1	<i>matrix metalloproteinase 1</i>
MMP9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
MSP	metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	kadar kematian neonatal
PB	sampel darah bayi pramatang
PPROM	pemecahan membran pramatang
PPUKM	Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
PS2	<i>Power and Sample Size Calculation</i>
qPCR	<i>quantitative polimerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SNP	polimorfisme nukleotida tunggal
SROM	pemecahan membran secara spontan
sT F-R	tumor nekrosis larut faktor reseptor
TB	sampel darah bayi matang
TGFBI	<i>gen transforming growth factor-β 1</i>
TIMP	tisu perencat metaloproteinases
TNF- α	tumor nekrosis factor- α

TSS	tapak permulaan transkripsi gen
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
UMBI	Institut Perubatan Molekul UKM



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Kelahiran bayi pramatang adalah antara masalah utama yang menyumbang kepada pelbagai komplikasi serius terutamanya dalam bidang obstetrik dan pediatrik. Bayi yang dilahirkan pramatang ini menghadapi risiko komplikasi untuk jangka masa pendek dan panjang. Bayi pramatang berpotensi menjadi kanak-kanak kurang upaya yang mengalami masalah gangguan tumbesaran dan perkembangan mental pramatang (Ancel et al. 1999). Selain daripada itu, keluarga bayi terbabit juga perlu bersedia daripada pelbagai segi termasuk pengetahuan mengenai masalah kesihatan bayi pramatang, kewangan yang cukup untuk membiayai kos perubatan serta kekuatan fizikal dan mental dalam proses membesarkan bayi istimewa itu (Ancel et al. 1999).

Terdapat pelbagai faktor yang boleh mempengaruhi peningkatan kelahiran bayi pramatang termasuklah taraf hidup yang rendah, usia ibu yang terlalu muda atau terlalu tua, ibu tunggal sama ada bercerai atau mengandung tanpa taraf sah perkahwinan yang kurang mendapat sokongan moral daripada pasangan, pendatang tanpa izin yang tidak mendapat kemudahan perubatan, saiz pelvis kecil yang tidak dapat menampung kehamilan yang membesar dan pendedahan ibu kepada rokok, dadah dan alkohol (Lumley 2003). Banyak kajian telah dilakukan bagi meneliti kepentingan cara pencegahan faktor penyebab terbabit dan rawatan terbaik bagi menangani kelahiran bayi pramatang ini (Lumley 2003; Hsieh et al. 2005; Murphy 2007). Meskipun begitu, masih kurang bilangan kajian yang menyelidik tentang kepentingan faktor genetik (Crider et al. 2005).

Pemecahan membran pramatang (*preterm premature rupture of membrane*) (PPROM) berlaku apabila kekuatan membran bayi terjejas kerana kelemahan kolagen fibrilar. Walaupun mekanisme sebenar PPRM masih belum jelas, tetapi pengurangan sintesis membran kolagen atau peningkatan degradasi kolagen dipercayai menyumbang terhadap pemecahan membran (Maymon et al. 2000a). *Matrix metalloproteinase 1 (MMP1)* adalah kolagenase utama yang dipercayai terlibat di dalam PPRM. Aktiviti *MMP* dipengaruhi oleh ekspresi gen, aktiviti proenzim dan perencat dalam metaloproteinases (Garland et al. 2002). Beberapa gen telah dikenal pasti memainkan peranan dalam kelahiran bayi pramatang ini termasuklah *CYP11A1*, *MspI* dan *GSTT1* (Vogler & Kozlowski 2002), polimorfisme $\text{TNF-}\alpha\text{-308}$ (Macones et al. 2004) dan *MMPs* seperti *MMP1* (Maymon et al. 2000a) dan *MMP9* (Athayde et al. 1998).

Selain daripada variasi genetik dalam ekspresi gen, faktor epigenetik juga boleh mempengaruhi aras ekspresi *MMP*. Epigenetik didefinisikan sebagai perubahan ekspresi *deoxynucleic acid* (DNA) yang diwarisi tanpa perlu mengubah jujukan DNA. Contoh komponen epigenetik termasuklah modifikasi histon, reposisi nukleosom, regulasi posttranskripsi gen oleh mikro-RNA dan metilasi DNA (Clark 2007). Metilasi DNA ialah salah satu jenis modifikasi kimia DNA oleh enzim yang dinamakan *DNA methyltransferases* (DNMTs). Proses metilasi secara ringkasnya melibatkan penambahan kumpulan metil kepada posisi 5-karbon pada sitosin (C) dalam cincin pirimidin.

Kajian ini bertujuan untuk mengkaji peranan gen *matrix metalloproteinase 1 (MMP1)* dan *MMP9* di dalam masalah kelahiran bayi pramatang ini. Terdapat kajian yang mengkaji kesan variasi genetik pada promoter *MMP9* dengan PPRM (Maymon et al. 2000b). Seramai 291 orang wanita telah terlibat sebagai subjek untuk menentukan aras *MMP2* dan *MMP9* yang aktif di dalam cecair amnion dalam kelahiran bayi matang dan pramatang (Maymon et al. 2000b). Keputusan kajian ini menunjukkan pemecahan membran bayi secara spontan (matang atau pramatang), proses kelahiran (matang atau pramatang), dan invasi kaviti amnion oleh mikrob adalah berkait rapat dengan peningkatan aras *MMP9* yang aktif secara signifikan dalam cecair amnion (Maymon et al. 2000b).

Satu kajian lain yang dijalankan pada tahun 2008 bertujuan untuk menentukan sama ada faktor epigenetik turut mempengaruhi kawalan ekspresi *MMP1* dalam amnion manusia (Wang et al. 2008). Metilasi DNA berjaya direncatkan dalam fibroblas amnion dengan menggunakan 5-aza-2'-deoxycytidine dan seterusnya menghasilkan peningkatan transkripsi gen *MMP1*. Penemuan ini dibuktikan lagi berdasarkan pengurangan metilasi DNA pada tempat spesifik (-1538) pada promoter *MMP1*. Selain daripada itu, terdapat juga polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) [AF007878.1 (*MMP1*):g.3447T>C] yang ditemui dalam promoter *MMP1* (Wang et al. 2008). Kajian ini merumuskan bahawa selain daripada mutasi genetik, metilasi DNA juga memainkan peranan penting dalam mengawal ekspresi *MMP1* dan seterusnya mempengaruhi risiko kelahiran bayi pramatang dan mengurangkan komplikasi dari segi obstetrik (Wang et al. 2008).

MMP9 terlibat di dalam proses degradasi membran dasar dan komponen matriks ekstraselular yang lain dalam membran bayi ketika pemecahan membran bayi berlaku. Kandungan aras *MMP9* meningkat dalam plasma dan cecair amnion ibu ketika bermulanya proses kelahiran secara spontan dalam kelahiran bayi matang dan pramatang sama ada dengan atau tanpa pemecahan membran pramatang (Tu et al. 1998; Maymon et al. 2000b). Peningkatan aras *MMP9* dalam plasma ibu ini boleh mencecah sebanyak tiga kali ganda daripada nilai asal dan berlaku secara semulajadi. Peningkatan ini tetap berlaku tidak mengira usia gestasi sesuatu kandungan (Tu et al. 1998). Peningkatan aras *MMP9* dan pengurangan aras tisu perencat metaloproteinases (TIMP) yang disebabkan oleh pengeluaran sitokin proinflamasi menyumbang kepada proses kemusnahan dan seterusnya pemecahan membran bayi (Challis et al. 2009). Oleh itu, terdapat kemungkinan bahawa aras kandungan *MMP9* boleh mempengaruhi faktor risiko kelahiran pramatang dalam ibu yang mengandung. Terdapat pelbagai mekanisme yang boleh mempengaruhi aras *MMP9* dalam plasma dan cecair amnion ibu seperti perubahan epigenetik termasuklah metilasi DNA.

Terdapat pelbagai kaedah untuk menyiasat status metilasi DNA iaitu kaedah metilasi tidak spesifik tindak balas polimerase rantaian, kaedah metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase (MSP) dan kaedah mikroatur (Liu & Maekawa 2003). Kaedah MSP dipilih untuk kajian ini berdasarkan kaedahnya yang lebih

ringkas dan kos efektif (Herman et al. 1996).

Kajian ini bertujuan untuk menentukan kehadiran metilasi DNA bagi gen *MMP1* dan *MMP9* dalam kelahiran bayi matang dan pramatang. Kaedah yang akan digunakan bagi menentukan status metilasi DNA bagi *MMP1* dan *MMP9* dalam kelahiran bayi matang dan pramatang ini adalah dengan menggunakan analisis bisulfit iaitu kaedah metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase (MSP). Selain daripada itu, kajian ini juga bertujuan untuk menentukan keberkesanan penggunaan kaedah MSP sebagai penanda pengenalpastian metilasi.

Kajian yang terhad dilakukan untuk melihat faktor metilasi DNA yang boleh dikaitkan dengan kelahiran bayi pramatang terutamanya di Malaysia. Hasil penyelidikan ini diharapkan dapat membantu memahami perubahan epigenetik pada dua gen spesifik iaitu *MMP1* dan *MMP9* di dalam kes kelahiran bayi pramatang. Ia juga dapat meningkatkan pengetahuan terhadap kelahiran bayi pramatang serta memperbaiki pencegahan kelahiran bayi pramatang pada masa hadapan. Sekiranya objektif kajian ini tercapai, ia akan memberi impak dalam menangani kelahiran bayi pramatang pada masa kini. Satu kaedah ringkas penyaringan menggunakan darah ibu bagi mengenal pasti wujudnya metilasi gen-gen yang tertentu boleh dihasilkan. Melalui kaedah ini, pastinya ibu yang mempunyai risiko tinggi mengalami kelahiran bayi pramatang akan dipantau dengan lebih teliti dan langkah-langkah pencegahan dapat diambil.

1.2 OBJEKTIF

1.2.1 Objektif Am

Untuk menentukan kehadiran metilasi DNA bagi gen *MMP1* dan *MMP9* dalam kelahiran bayi matang dan pramatang.

1.2.2 Objektif Khusus

- a) Untuk membandingkan frekuensi metilasi DNA bagi gen *MMP1* dan *MMP9* antara kelahiran bayi matang dan pramatang dengan menggunakan rawatan bisulfit.
- b) Untuk menentusahkan penanda pengenalpastian metilasi dengan menggunakan kaedah metilasi spesifik tindak balas berantai polimerase (MSP).

1.3 HIPOTESIS KAJIAN

- a) Frekuensi metilasi DNA dalam bahagian promoter *MMP1* dan *MMP9* dalam kelahiran bayi matang adalah lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelahiran bayi yang pramatang.
- b) MSP boleh mengesan metilasi DNA gen *MMP1* dan *MMP9* secara spesifik dalam kelahiran bayi matang jika dibandingkan dengan kelahiran bayi yang pramatang.

RUJUKAN

- Ancel, P. Y., M. J. Saurel-Cubizolles, G. C. Di Renzo, E. Papiernik & G. Breart 1999. Very and moderate preterm births: Are the risk factors different? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 106(11): 1162-1170.
- Athayde, N., S. S. Edwin, R. Romero, R. Gomez, E. Maymon, P. Pacora & R. Menon 1998. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *American journal of obstetrics and gynecology* 179(5): 1248-1253.
- Auger, N., T. U. N. Le, A. L. Park & Z.-C. Luo 2011. Association between maternal comorbidity and preterm birth by severity and clinical subtype: retrospective cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 11: 67-67.
- Basso, O., J. Olsen & K. Christensen 1999. Study of environmental, social, and paternal factors in preterm delivery using sibs and half sibs. A population-based study in Denmark. *Journal of Epidemiology and Community Health* 53(1): 20-23.
- Challis, J. R., C. J. Lockwood, L. Myatt, J. E. Norman, J. F. Strauss & F. Petraglia 2009. Inflammation and pregnancy. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 16(2): 206-215.
- Chandiramani, M., R. Tribe & A. Shennan 2007. Preterm labour and prematurity. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 17(8): 232-237.
- Clark, S. J. 2007. Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum. Mol. Genet.*
- Crider, K. S., N. Whitehead & R. M. Buus 2005. Genetic variation associated with preterm birth: A HuGE review. *Genetics in Medicine* 7(9): 593-604.
- Dizon-Townson, D. S. 2001. Preterm labour and delivery: a genetic predisposition. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 15: 57-62.
- Eads, C. A., K. D. Danenberg, K. Kawakami, L. B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P. V. Danenberg & P. W. Laird 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 28(8): e32 (i-viii)
- Esteller, M., M. Sanchez-Cespedes, R. Resell, D. Sidransky, S. B. Baylin & J. G. Herman 1999. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Research* 59(1): 67-70.
- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy & C. L. Paul 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(5): 1827-1831.

- Fujimoto, T., S. Parry, M. Urbanek, M. Sammel, G. Macones, H. Kuivaniemi, R. Romero & J. F. Strauss 2002. A Single Nucleotide Polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-1 (*MMP-1*) Promoter Influences Amnion Cell *MMP-1* Expression and Risk for Preterm Premature Rupture of the Fetal Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 277(8): 6296-6302.
- Fuks, F., W. A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies & T. Kouzarides 2000. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* 24(1): 88-91.
- Galm, O. & J. G. Herman. 2005. Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction. Dlm. (pnyt.). Ed. *Multiple Myeloma* hlm. 279-291.
- Garland, S. M., F. Ní Chuileannáin, C. Satzke & R. Robins-Browne 2002. Mechanisms, organisms and markers of infection in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* 57(1-2): 169-183.
- Grunau, C., S. J. Clark & A. Rosenthal 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research* 29(13): e65-e65-e65-e65.
- Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myöhänen, B. D. Nelkin & S. B. Baylin 1996. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(18): 9821-9826.
- Hoffman, H. J. M. A. & L. S. M. D. Bakketeig 1984. Risk Factors Associated With the Occurrence of Preterm Birth. *Clinical Obstetrics & Gynecology* 27(3): 539-552.
- Hsieh, T. T., S. F. Chen, W. Y. Shau, C. C. Hsieh, J. J. Hsu & T. H. Hung 2005. The impact of interpregnancy interval and previous preterm birth on the subsequent risk of preterm birth. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 12(3): 202-207.
- Kato, K., N. K. Long, H. Makita, M. Toida, T. Yamashita, D. Hatakeyama, A. Hara, H. Mori & T. Shibata 2008. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *British Journal of Cancer* 99(4): 647-654.
- Kim, J., M. M. Pitlick, P. J. Christine, A. R. Schaefer, C. Saleme, B. Comas, V. Cosentino, E. Gadow & J. C. Murray 2013. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in Human Amnion. *The Scientific World Journal* 2013: 1-11.
- Kramer, M. S., K. Demissie, H. Yang, R. W. Platt, R. Sauv  , R. Liston, F. for the & S. Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance 2000. The

- Contribution of Mild and Moderate Preterm Birth to Infant Mortality. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 284(7): 843-849.
- Kristensen, L. S. & L. L. Hansen 2009. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry* 55(8): 1471-1483.
- Ku, J.-L., Y.-K. Jeon & J.-G. Park 2011. Methylation-specific PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 791: 23-32.
- Lao, T. t. & L. f. Ho 2000. Relationship between preterm delivery and maternal height in teenage pregnancies. *Human Reproduction* 15(2): 463-468.
- Li, L.-C. & R. Dahiya 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18(11): 1427-1431.
- Liu, Z.-J. & M. Maekawa 2003. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. *Analytical biochemistry* 317(2): 259-265.
- Lumley, J. 2003. Defining the problem: the epidemiology of preterm birth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 110(Supplement 20): 3-7.
- Lynn M, M. 2000. Matrix metalloproteinases. *Current Biology* 10(19): R692-R692.
- Macones, G. A., S. Parry, M. Elkousy, B. Clothier, S. H. Ural & J. F. Strauss 2004. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190(6): 1504-1508; discussion 3A-1504-1508; discussion 3A.
- Maymon, E., R. Romero, P. Pacora, M.-T. Gervasi, K. Bianco, F. Ghezzi & B. H. Yoon 2000a. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology* 183(4): 914-920.
- Maymon, E., R. Romero, P. Pacora, M. T. Gervasi, R. Gomez, S. S. Edwin & B. H. Yoon 2000b. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *American journal of obstetrics and gynecology* 183(4): 887-894.
- McIntire, D. D., S. L. Bloom, B. M. Casey & K. J. Leveno 1999. Birth Weight in Relation to Morbidity and Mortality among Newborn Infants. *N Engl J Med* 340(16): 1234-1238.
- Mercer, B. M., R. L. Goldenberg, A. H. Moawad, P. J. Meis, J. D. Iams, A. F. Das, S. N. Caritis, M. Miodovnik, M. K. Menard, G. R. Thurnau, M. P. Dombrowski, J. M. Roberts & D. McNellis 1999. The preterm prediction study: effect of

- gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *American journal of obstetrics and gynecology* 181(5 Pt 1): 1216-1221.
- Miller, C. A. & J. D. Sweatt 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53(6): 857-869.
- Muhammad, K., R. Maruf, J. Farzana, R. Shantanu, P. B. Rachelle, R. Z. Muhammad, K. Mohammed & A. Habibul 2011. A genome-wide DNA methylation study in colorectal carcinoma. *BMC Medical Genomics* 4.
- Murphy, D. J. 2007. Epidemiology and environmental factors in preterm labour. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 21(5): 773-789.
- Myohanen, S., J. Wahlfors & J. Janne 1994. Automated fluorescent genomic sequencing as applied to the methylation analysis of the human ornithine decarboxylase gene. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping* 5(1): 1-8.
- Nafee, T. M., W. E. Farrell, W. D. Carroll, A. A. Fryer & K. M. K. Ismail 2008. Review article: Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 115(2): 158-168.
- Nagase, H. & J. F. Woessner 1999. Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274(31): 21491-21494.
- National Center for Biotechnology Information 2012a. *MMP1* matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) [Homo sapiens] - Gene - NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=default&list_uids=4312 [26 June 2012].
- National Center for Biotechnology Information 2012b. *MMP9* matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) [Homo sapiens] Gene NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4318> [26 June 2012].
- Ohashi, H. 2002. Methylation-Specific PCR. Dlm. (pnyt.). Ed. *PCR Cloning Protocols* hlm. 91-97.
- Porter, T. F., A. M. Fraser, C. Y. Hunter, R. H. Ward & M. W. Varner 1997. The risk of preterm birth across generations. *Obstetrics & Gynecology* 90(1): 63-67.
- Raja, R. L. T., A. B. M. Anderson & A. C. Turnbull 1974. Endocrine Changes in Premature Labour. *British Medical Journal* 4(5936): 67-71.
- Relton, C. L., A. Groom, B. St. Pourcain, A. E. Sayers, D. C. Swan, N. D. Embleton, M. S. Pearce, S. M. Ring, K. Northstone, J. H. Tobias, J. Trakalo, A. R. Ness,

- S. O. Shaheen & G. Davey Smith 2012. DNA Methylation Patterns in Cord Blood DNA and Body Size in Childhood. *PLoS ONE* 7(3).
- Romero, R., T. Chaiworapongsa, J. Espinoza, R. Gomez, B. H. Yoon, S. Edwin, M. Mazon, E. Maymon & S. Berry 2002. Fetal plasma *MMP-9* concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *American journal of obstetrics and gynecology* 187(5): 1125-1130.
- Sato, N., N. Fukushima, R. H. Hruban & M. Goggins 2008. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology* 21(3): 238-44.
- Sepulveda, A. R., D. Jones, S. Ogino, W. Samowitz, M. L. Gulley, R. Edwards, V. Levenson, V. M. Pratt, B. Yang, K. Nafa, L. Yan & P. Vitazka 2009. CpG Methylation Analysis—Current Status of Clinical Assays and Potential Applications in Molecular Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics* : JMD 11(4): 266-278.
- Shah, J. N., G. Shao, T. K. Hei & Y. Zhao 2008. Methylation screening of the TGFBI promoter in human lung and prostate cancer by methylation-specific PCR. *BMC Cancer* 8: 284-284.
- Thomassin, H., C. Kress & T. Grange 2004. MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. *Nucleic Acids Research* 32(21): e168-e168.
- Thompson, R. F., M. Suzuki, K. W. Lau & J. M. Greally 2009. A pipeline for the quantitative analysis of CG dinucleotide methylation using mass spectrometry. *Bioinformatics* 25(17): 2164-2170.
- Tost, J., J. Dunker & L. G. Gut 2003. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing™. *Biotechniques* 35(1): 152-157.
- Tu, F. F., R. L. Goldenberg, T. Tamura, M. Drews, S. J. Zucker & H. F. Voss 1998. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth. *Obstetrics and Gynecology* 92(3): 446-449.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts & J. A. M. Leunissen 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35: W71-W74-W71-W74.
- Vadillo-Ortega, F., A. Hernandez, G. Gonzalez-Avila, L. Bermejo, K. Iwata & J. F. Strauss Iii 1996. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology* 174(4): 1371-1376.

- Vadillo-Ortega, F. & G. Estrada-Gutiérrez 2005. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 112: 19-22.
- Vogler, G. P. & L. T. Kozlowski 2002. Differential influence of maternal smoking on infant birth weight: gene-environment interaction and targeted intervention. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 287(2): 241-242.
- Vu, T.-D., F. Yun, J. Placido & S. E. Reznik 2008. Placental matrix metalloproteinase--1 expression is increased in labor. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 15(4): 420-424.
- Wang, H., M. Ogawa, J. R. Wood, M. S. Bartolomei, M. D. Sammel, J. P. Kusanovic, S. W. Walsh, R. Romero & J. F. Strauss 2008. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control *MMPI* expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Human Molecular Genetics* 17(8): 1087-1096.
- Wang, X., B. Zuckerman, C. Pearson, G. Kaufman, C. Chen, G. Wang, T. Niu, P. H. Wise, H. Bauchner & X. Xu 2002. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 287(2): 195-202.
- WHO 1961. Aspects of low birth weight. Report of the expert committee of maternal child health. WHO Technical Report (217:3-16.).
- Woodfine, K., J. E. Huddleston & A. Murrell 2011. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue. *Epigenetics & Chromatin* 4(1).
- World Health Organization Geneva, S. 1970. The Prevention of Perinatal Mortality and Morbidity. *WHO Technical Report Series; 1970 Report 457*.
- World Health Organization Geneva, S. 1996 Perinatal mortality: a listing of available information (unpublished document WHO/FRH/MSM/96.7).
- Winkvist, A., I. Mogren & U. Högberg 1998. Familial patterns in birth characteristics: impact on individual and population risks. *International Journal of Epidemiology* 27(2): 248-254.
- Yasmin, S., D. Osrin, E. Paul & A. Costello 2001. Neonatal mortality of low-birth-weight infants in Bangladesh. *Bulletin of the World Health Organization* 79(7): 608-614.