

한국인에서 *hMLH1* 유전자의 다형성과 급성골수성백혈병 발병위험의 상관성

전남대학교 의과대학 ¹병리학교실, ²내과학교실, ³조혈계질환유전체센터, 화순전남대학교병원

박성철^{1,3} · 김설매^{1,3} · 김형준^{2,3} · 정상우¹ · 최 찬^{1,3*}

Association Study of *hMLH1* Polymorphisms with Risk of Acute Myeloid Leukemia in Korean

Cheng Zhe Piao^{1,3}, Jin Xue Mei^{1,3}, Hyeoung-Joon Kim^{2,3}, Sang Woo Juhng¹ and Chan Choi^{1,3*}

Departments of ¹Pathology, ²Internal Medicine, Chonnam National University Medical School,

³Genome Research Center for Hematopoietic Diseases, Chonnam National University Hwasun Hospital, Hwasun, Korea

Acute myelogenous leukemia (AML) is caused by dysregulation of oncogenes, tumor suppressor genes, and DNA mismatch repair genes. Accumulating evidence has shown that genetic differences in mismatch repair capacity resulting from genetic polymorphism influence the risk of environmental carcinogenesis. In AML and lymphoma, the promoter of *hMLH1* is frequently hypermethylated. The purpose of this study is to investigate the association of *hMLH1* gene polymorphisms with the susceptibility to AML in Korean people. Allelic frequency of rs9311149, rs1800734, rs3774343, rs4647215, rs3774341, rs3774335, rs748766, D376D, V384D SNPs of *hMLH1* was determined in 32 normal subjects by sequencing analysis. Haplotype frequency and linkage disequilibrium coefficient of nine SNPs were estimated. The author selected and genotyped six SNPs for full-scale association study, they include one tagging SNP from neighboring six SNPs and five SNPs including two novel SNPs. One hundred and sixty eight AML cases and 255 unrelated healthy controls were used for the study. V384D was associated with increased risk of AML both in genotypes (OR=2.335; 95% CI: 1.056~5.165, p=0.032) and in allele frequency (OR=2.417; 95% CI: 1.118~5.228, p=0.021). Other SNPs except V384D were not associated with AML. The allele frequency of the SNPs between Asians, European descendants, and Africans was very significantly different (p<0.01), respectively. Among Asians, that of Koreans and Japanese was similar (p>0.05), while that between Korean and Chinese, and that between Japanese and Chinese were significantly different (p<0.05). The data suggests that V384D polymorphism of *hMLH1* might be associated with AML.

Keywords: Polymorphisms Genetic; SNP protein; Leukemias

서 론

2001년에 인간 유전체 전체 염기서열이 밝혀졌고 그중에 99% 이상이 동일하다는 것이 확인되었다.¹ 인간 유전체 염기서열에서 관찰되는 1% 미만의 유전자의 변이를 단일염기 다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)이라고 부른다.² 2005년 10 월 4일 까지 사람에서 발견되어 보고된 SNP의 수는 10,430,753개 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi)이며, 이 수는 시간이 지남에 따라 기하 급수적으로 늘어날 것이다. 이와 같이 인류 집단에서 1% 미만의 차이에 의해 개인간에 모습이나, 행동, 그리고 질환감수성에 차이가 생긴다.³⁻⁵ 급성골수성백혈병(Acute Myelogenous Leukemia, AML)은 염색체 전좌가 빈번하게 나타나는 악성 혈액종양이다.⁶ 급성골수성백혈병의 발병원인은 아직 확실하게 알려지지는 않았으나 여러 종류의 암 유전자, 종양억제 유전자, 그리고 과오수정(DNA mismatch repair) 유전자 등 다양한 유전자와 관련되어 있다.

생명체의 유전체는 외부환경에의 노출을 통하여 끊임없이 DNA손상을 받게 되며 생체내 DNA 복제 과정 중에서도 오류가 발생할 수 있다.^{7,8} 이러한 상해나 오류로 유도된 DNA상의 이상구조는 DNA 회복기전에 의해 정상적인 DNA 구조로 되돌려질 수 있다.^{7,9} DNA 회복은 다양한 요인의 노출, 특히 발암원과 같은 물질의 노출에서 오는 손상으로부터 세포의 유전적 고유성을 유지하는 중요한 역할을 한다.¹⁰ 정상적으로 DNA polymerase가 새로 합성되는 DNA에 잘못된 염기를 삽입할 때 일어나는 nucleotide의 mismatch는 과오수정 유전자 효소에 의해 수정된다.¹¹ 과오수정은 세포증식시 세포가 유전체를 정확하게 복제하기 위해 필요한데 이러한 체계에 결함이 있으면 정상세포보다 돌연변이 확률이 100배 정도 높다.¹² 따라서 DNA 과오수정 유전자의 소실은 유전자의 불안정성을 초래하며 특히 microsatellite sequence에서 돌연변이가 쉽게 일어나게 되고 암 발생을 유발하게 된다.¹³ 사람에게서 현재까지 알려진 과오수정 유전자는 *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*와 *hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1*, *hPMS2*이다. 이중 *hMLH1* 유전자는 3p21에 위치하고 21개의 exon을 가지고 있다. 또한 *hMLH1* 유전자는 비용종증대장암(Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer).¹⁴ 크론병과 궤양성대장염,^{15,16} 림프종, 급성골수성백혈병^{17,18} 등 다양한 질환과 관련이 있다. 그리고 *hMLH1*의 V384D SNP과 대장암의 발생에 관하여는 관련

이 있다¹⁹⁻²¹와 없다^{22,23}는 상반된 주장이 있다.

급성골수성백혈병의 일부는 *hMLH1* 유전자 프로모터의 메틸화(methylation)에 관련되어 있으나,^{17,18} 급성골수성백혈병과 *hMLH1* 유전자의 SNP의 연관성 연구는 보고된 바 없다. 본 연구의 목적은 과오수정 유전자인 *hMLH1* 유전자의 SNP과 급성골수성백혈병간의 상관관계를 구명하는데 있다.

재료 및 방법

1. DNA를 얻기 위한 혈액 채취 및 genomic DNA 추출

17세에서 82세 사이의 병리학적인 증상이 없는 건강한 한국인 321명과 화순전남대학교병원에 내원하여 급성 골수성 백혈병(AML)으로 진단받은 14세부터 84세 사이의 환자 291명을 대상으로 매개인의 서면 동의를 거친 후 말초혈액을 채취하였다. 건강한 한국인의 평균연령은 50.6세였고 급성골수성백혈병 환자의 평균 연령은 50.0세였다(Table 1). 전혈 10 ml에서 genomic DNA를 추출하는데 QIAampTM DNA blood Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하였다. 50 ml centrifuge tube에 500 μ l Qiagen protease를

Table 1. Characteristics of the study population

Variables		AML	Normal controls	p-value
Number		291	321	
Sex	Male	153 (52.6%)	159 (49.5%)	0.45
	Female	138 (47.4%)	162 (50.5%)	
Age Range		50.0 \pm 17.6	50.6 \pm 17.4	0.93
	14~30	14.0 \pm 84.0	17.0 \pm 82.4	
	31~45	58 (19.9%)	59 (18.4%)	
	46~60	66 (22.7%)	70 (21.8%)	
	>60	80 (27.5%)	91 (28.0%)	
Type (FAB)		87 (29.9%)	102 (31.8%)	
	0		7	
	1		20	
	2		119	
	3		46	
	4		43	
	5		25	
	6		17	
	7		2	
	Others		12	

FAB classification: M0 (undifferentiated AML), M1 (myeloblastic, without maturation), M2 (myeloblastic, with maturation), M3 (promyelocytic), M4 (myelomonocytic), M5 (monoblastic leukemia or monocytic leukemia), M6 (erythrocytic), M7 (megakaryoblastic), Others: 2nd leukemia (10), biphenotype etc (2).

넣고 10 ml 전혈을 넣어서 섞는다. AL buffer를 12 ml 넣어 섞고, 70°C에서 10분간 incubation시킨 후, 100% ethanol을 10 ml 넣고 10분 동안 섞는다. 이 혼합물의 절반을 새로운 50 ml centrifuge tube에 끼워 넣은 QIAamp Maxi column에 넣고 뚜껑을 덮은 뒤 3,000 rpm에서 3분간 원심분리시킨다. 침전된 것을 버린 뒤 남은 혼합물질을 다시 QIAamp Maxi column에 넣고 3,000 rpm에서 3분간 다시 원심분리시키고 침전액을 버린다. QIAamp Maxi column에 AW1 buffer를 5 ml 넣고 5,000 rpm에서 1분간 원심분리시킨다. AW2 buffer 5 ml을 QIAamp Maxi column에 넣고 5,000 rpm에서 15분간 원심분리시킨다. QIAamp Maxi column을 새로운 50 ml centrifuge tube로 옮겨서 AE buffer 1 ml을 떨어뜨리고 실온에서 5분간 두었다가 5,000 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 분광광도계를 이용하여 정량하였다.

2. PCR을 위한 primer 제작

dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)의 database에 기초하여 Pyrosequencing Primer는 Pyrosequencing Assay Design Software (ADSW; Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 reverse 쪽에 biotin을 부착시켜 Primer를 design하였고 ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (PE Biosystems, Foster City, CA)에 사용하는 Primer는 SNPs site가 PCR 산물의 중심 부분에 위치하도록 Primer 3 program (<http://www.justbio.com/primer/index.php>)을 이용하여 primer를 설계하였다(Table 2).

3. hMLH1 유전자의 PCR 증폭 및 유전형 분석

1) PCR 증폭

PCR은 PTC-0100™ programmable thermal controller-pelter effect cycling (MJ Research, Waltham, MA)을 사용하였다. Genomic DNA 1 µl (20 ng/µl), sense primer와 antisense primer 각각 0.5 µM, 2× PCR buffer [150 mM Tris-HCl (pH 9.0), 30 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 2 µg BSA], 2 mM dNTP 1 µl, F-Taq DNA polymerase (SolGent, Deajeon, Korea) 0.5 unit을 더하고 최종 반응 액은 20 µl으로 하였다. PCR 증폭조건은 95°C에서 2분간 변성을 한 뒤, 95°C에서 20초, 54~62°C에서 40초, 72°C에서 2분을 1주기로 45주기로 실행하였다. 증폭된 PCR 생성물 3 µl를 1% agarose gel에서 150 V

로 30분간 전기영동한 후 전개된 산물은 UV transilluminator로 확인하였다.

2) Pyrosequencing

SNP rs1800734는 Pyrosequencing으로 genotyping 분석을 진행하였다. Pyrosequencing 기술은 Klenow DNA polymerase, ATP sulfurylase, Luciferase, Apyrase 등 4가지 효소의 촉매작용을 이용하여 template에 따라 DNA 중합반응이 일어나는 과정에서 각 유전형에 따라 새로이 어떤 염기가 이용되는가 하는 것을 검출해 내는 방법이다. Biotin이 부착된 PCR산물 25 µl에 3차 멸균중류수 15 µl 넣은 다음 beads (Amersham Biosciences AB, Uppsala City, Sweden) 3 µl와 1× binding buffer 37 µl 넣어 준 다음 5분동안 shaking 시킨다. probe를 위의 혼합물과 70% ethyl alcohol, 0.2N NaOH, PSQ washing buffer에 차례로 5초씩 담궜다가 5초씩 들어서 잘 건조시킨다. 마지막으로 10 pmole/µl sequencing primer 1.6 µl와 annealing buffer 38.4 µl이 들어있는 Pyrosequencing reaction plates에 넣고 잘 흔들어 주면서 beads를 released 시킨 다음 95°C에서 1분 동안 primer를 annealing 시키고 실온에서 식힌 다음 PSQ 96MA system (Biotage AB, Uppsala City, Sweden)을 이용하여 SNP genotyping을 진행하였다.

Table 2. Primers of hMLH1 and PCR conditions used in this study

SNP ID	Primer sequences (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Cycle number	Product size (bp)
rs1800734	F, ggctggatggcgtaagctac R, ctatgctcaacggaagtgc S, gatggcgtaagctaca	59	45	89
rs3774341	F, ctctgacctcaggtgatcc R, catgaccattttcccttt	54	45	353
rs4986984	F, gggatttttaatagtttgctggtg R, ttgattacgtgaaataagaactcca	62	45	365
D376D/ V384D/ CNUH- GRCHD03- 209	F, tcgggcagaattgcttctat R, tctgtcttatcctctgtgacaatg S, gactttgctaccaggacttgc	54	45	381

F indicates the forward primer and R indicates the reverse primer, S indicates the sequencing primer, rs1800734 was genotyped by pyrosequencing, and other SNPs were genotyped by ABI 3100 genetic analyzer.

3) DNA 염기서열 분석

PCR 산물은 DNA purification Kit (SolGent, Daejun, Korea)를 이용해서 정제하였다. PCR 산물 20 μ l에 100 μ l의 PB buffer를 잘 섞은 뒤 filter column에 넣고, 1분간 원심분리시킨다. Column에 80% ethyl alcohol을 750 μ l을 넣고 다시 1분간 원심분리시키고, 침전액을 버린 뒤 다시 2분간 원심분리시킨다. Filter column을 새로운 1.5 ml tube로 옮긴 뒤, 30 μ l의 EP buffer를 filter 중앙에 떨어뜨리고 3분간 실온에 방치해 두었다가 2분간 원심분리한다. Filter는 버리고 1.5 ml tube에 정제된 PCR 산물을 1% agarose gel에서 TAE buffer 상태에서 150 V로 30분간 전기영동한 후 UV transilluminator로 관찰하였다. 전기영동으로 확인한 정제한 PCR 산물 1 μ l, sequence primer 1 μ l (1.6 pmol/ μ l), BigDyeTM v3.1 ready mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) 1 μ l, BigDyeTM Terminator v1.1, v3.1 5 \times sequencing buffer (Applied Biosystem, Foster City, CA) 3.5 μ l, 3차 멸균증류수 3.5 μ l을 더해서 최종 반응액을 10 μ l로 하였다. PCR은 96°C에서 1분 변성시킨 뒤, 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 6분을 1주기로 25주기를 실행하고, 4°C에서 끝냈다.

BigDye PCR 생성물을 정제하기 위해 BigDye PCR 생성물 10 μ l, 3 M sodium acetate (pH 4.6) 2 μ l, 95% ethyl alcohol 50 μ l을 잘 섞은 뒤 실온에서 30분간 방치하고 나서, 13,000 rpm, 22°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버린다. 70% ethyl alcohol 350 μ l을 넣은 뒤 두세 번 가볍게 섞은 다음 13,000 rpm, 22°C에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 버렸다. 50°C에서 15분간 건조시킨 후 Hi-Di formamide (Applied Biosystem, Foster City, CA) 20 μ l을 넣고 잘 섞고 실온에서 20분 동안 방치하였다. 95°C에서 5분간 변성시키고 4°C에 10분 동안 둔 후 ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

4. hMLH1 유전자의 후보 SNP 선정

International hapmap projects database (<http://hapmap.org/index.html.en>)와 JSNP (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>) database 및 SNPbrowserTM software version 3.0 (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 동경거주 일본인과 북경거주 중국인에서 minor allele frequency가 0.1 이상이고 SNPs 사이의 거리가 일정한 hMLH1 gene의

rs1800734, rs3774341, rs4986984와 V384D SNP을 선택하였다.

5. 통계 분석

환자군과 대조군은 로지스틱 회귀분석(<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>)을 통해 비차비와 95% 신뢰 구간을 추정하였다. Hardy-Weinberg 평형을 검사하는데는 χ^2 검사를 이용하였다. 두 군의 평균을 비교하는데는 t-test를 하였다. 분석하는데 이용한 프로그램은 SPSS Ver12.0이다.

결 과

1. 정상 한국인과 급성골수성백혈병 환자에서의 6개 SNPs의 유전형 분포 및 대립 형질 빈도의 차이

321명의 정상 한국인과 291명의 급성골수성백혈병 환자에서 rs1800734, rs3774341, rs4986984, D376D, V384D, CNUH-GRCHD03-209 등 6개의 SNPs의 유전형 분포와 대립 형질의 빈도를 관찰하였으며 모든 loci에 대한 유전자형의 분포는 Hardy-Weinberg 평형이었다($p > 0.05$). rs1800734는 정상 한국인에서 G/G 유전형이 50명, G/A 유전형이 131명, A/A 유전형이 74명으로 각각 19.6%, 51.4%, 29.0%로 다양한 분포를 나타내었고 대립 형질의 빈도는 G는 0.453, A는 0.547이었다. 급성골수성백혈병 환자에서도 G/G 유전형이 38명, G/A 유전형이 85명, A/A 유전형이 45명으로 각각 22.6%, 50.6%, 26.8%로 분포되었고 대립 형질의 빈도는 각각 G는 0.479, A는 0.521이었다.

rs3774341은 정상 한국인에서 A/A 유전형이 205명, A/C 유전형이 47명, C/C 유전형이 3명으로 각각 80.4%, 18.4%, 1.2%의 분포를 나타내었고 대립 형질의 빈도는 A는 0.896, C는 0.104였다. 급성골수성백혈병 환자에서는 A/A 유전형이 139명, A/C 유전형이 26명, C/C 유전형이 3명으로 각각 82.7%, 15.5%, 1.8%의 분포를 나타내었고 대립 형질의 빈도는 각각 A는 0.905, C는 0.095였다.

rs4986984는 정상 한국인에서 C/C 유전형이 252명, C/T 유전형이 3명, T/T 유전형은 나타나지 않아 각각 98.8%, 1.2%, 0%의 분포를 나타내었고 대립 형질의 빈도는 각각 C는 0.994, T는 0.006였다. 급성골수성백혈병 환자에서는 C/C 유전형이 165명, C/T 유전형이 3명, T/T 유전형은 나타나지 않아 각각 98.2%, 1.8%, 0%의 분포를 나타내었고 대립 형질의 빈도는 각각 C는 0.991, T는 0.009였다.

D376D는 정상 한국인에서 T/T 유전형이 254명, T/C 유전형이 1명, C/C 유전형은 나타나지 않아 각각 99.6%, 0.4%, 0%의 분포를 나타내었고 대립형질의 빈도는 T는 0.998, C는 0.002였다. 급성골수성백혈병 환자에서는 T/T 유전형이 168명, T/C 유전형과 C/C 유전형은 모두 나타나지 않아 각각 100%, 0%, 0%의 분포를 나타내었고 대립형질의 빈도는 각각 T는 1.0, C는 0이었다.

V384D는 정상 한국인에서 T/T 유전형이 307명, T/A 유전형이 14명, A/A 유전형은 나타나지 않아 각각 95.7%, 4.3%, 0%의 분포를 나타내었고 대립형질의 빈도는 T는 0.978, A는 0.022였다. 급성골수성백혈병 환자에서는 T/T 유전형이 272명, T/A 유전형이 18명, A/A 유전형이 1명으로 각각 93.5%, 6.2%, 0.3%의 분포를 나타내었고 대립형질의 빈도는 각각 T는 0.966, A는 0.034였다.

CNUH-GRCHD03-209는 정상 한국인에서 A/A 유전형이 253명, A/G 유전형이 2명, G/G 유전형은 나타나지 않아 각각 99.2%, 0.8%, 0%의 분포를 나타내었고 대립형질의 빈도는 A는 0.996, G는 0.004였으며 급성골수성백혈병 환자에서는 A/A 유전형이 168명, A/G 유전형과 G/G 유전형은 모두 나타나지 않아 각각 100%, 0%, 0%의 분포를 나

타내었고 대립형질의 빈도는 각각 A는 1.0, G는 0이었다 (Table 3). 6개의 SNP 모두에서 정상 한국인과 급성골수성백혈병 환자에서 대립형질 빈도의 차이가 없었다.

2. 한국인에서 발견한 *hMLH1* 유전자의 새로운 단일염기다형성

Coding region에서 2개의 새로운 단일염기다형성을 발견하였는데 이들은 각각(+18524C→T, +32178A→G)였다 (Fig. 1). 이 2개의 새로운 단일염기다형성은 아미노산이 바뀌는 돌연변이(coding non-synonymous SNP)로서 rs4986984 (+18524C→T)는 exon 10번에서 arginine[R]이 cysteine[C]으로 바뀌었고 정상 한국인에서 작은 대립유전자의 빈도(minor allele frequency)는 0.006였고 NCBI's SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)에 rs4986984로 등록되었다. CNUH-GRCHD03-209 (+32178A→G) SNP는 exon 14번에서 aspartic acid[D]가 glycine[G]로 바뀌었고 정상 한국인에서 작은 대립유전자의 빈도가 0.004였다. 그러나 이 2개의 새로운 SNPs는 정상 한국인과 급성골수성백혈병환자에서 유전형 분포 및 대립형질의 빈도가 유의있는 차이를 보이지 않았다(Table 3).

Table 3. SNPs of *hMLH1* genotype distributions of controls and AML cases, with ORs and 95% CIs

SNP ^a	Region	Amino acid ^b	Genotype	Number		OR (95%CI)
				AML	Normal	
-93 A>G (rs1800734)	5' UTR	NA ^c	G/G	38 (22.6%)	50 (19.6%)	1
			G/A	85 (50.6%)	131 (51.4%)	0.85 (0.52~1.41)
			A/A	45 (26.8%)	74 (29.0%)	0.80 (0.46~1.40)
+10195 A>C (rs3774341)	Intron5	NA	A/A	139 (82.7%)	205 (80.4%)	1
			A/C	26 (15.5%)	47 (18.4%)	0.82 (0.48~1.38)
			C/C	3 (1.8%)	3 (1.2%)	1.48 (0.29~7.41)
+18524 C>T (rs4986984)	Exon 10	[R]/[C]	C/C	165 (98.2%)	252 (98.8%)	1
			C/T	3 (1.8%)	3 (1.2%)	1.53 (0.31~7.66)
			T/T	0 (0%)	0 (0%)	1.53 (0.03~77.27)
+32179 T>C (D376D)	Exon 14	[D]/[D]	T/T	168 (100%)	254 (99.6%)	1
			T/C	0 (0%)	1 (0.4%)	0.50 (0.02~12.43)
			C/C	0 (0%)	0 (0%)	1.51 (0.03~76.49)
+32202 T>A (V384D)	Exon 14	[V]/[D]	T/T	275 (92.9%)	307 (95.6%)	1
			T/A	20 (6.8%)	14 (4.4%)	1.60 (0.80~3.22)
			A/A	1 (0.3%)	0 (0%)	3.35 (0.14~82.54)
+32178 A>G (CNUH-GRCHD03-209)	Exon 14	[D]/[G]	A/A	168 (100%)	253 (99.2%)	1
			A/G	0 (0%)	2 (0.8%)	0.30 (0.01~6.31)
			G/G	0 (0%)	0 (0%)	1.50 (0.03~76.19)

Numbers in the n column indicate the number of individuals. In the genotypes frequency column, number of individuals with a given genotype and parentheses show percentages. p-value was calculated by Hardy-Weinberg equilibrium. Odds ratios are given with 95% confidence intervals (95% CI). Normal, healthy Korean normal population; AML, Acute myelogenous leukemia patients. ^aCalculated from the translation start site. ^bAmino acid: Amino acids change; ^cNA: not applicable.

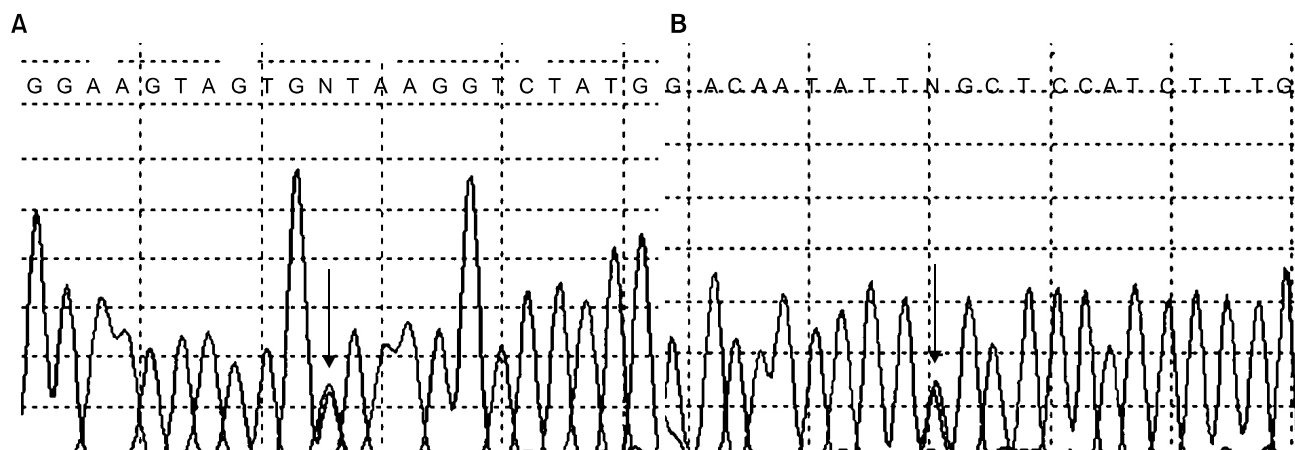


Fig. 1. (A) Partial sequence of the hMLH1 exon10 around rs4986984. Genomic DNA from normal individual was sequenced. The arrow indicates the C/T heterozygosity of rs4986984 at position +18524 from the start of the translation site. (B) Partial sequence of the hMLH1 exon14 around CNUH-GRCHD03-209. Genomic DNA from normal individual was sequenced. The arrow indicates the A/G heterozygosity of CNUH-GRCHD03-209 at position +32178 from the start of the translation site.

Table 4. Comparison allele frequency of the SNPs in the hMLH1 gene in different population

SNP ID	Allele	KOR (n)	JPT (n)	CHB (n)	CEU (n)	YRI (n)	ED*
rs1800734	G:A	0.45:0.55 (510)	0.48:0.52 (86)	0.49:0.51 (88)	0.81:0.19 (114)	—	0.35 ($p < 0.01$)
rs3774341	A:C	0.90:0.10 (510)	0.82:0.18 (74)	0.94:0.06 (88)	0.51:0.49 (98)	0.53:0.47 (120)	0.39 ($p < 0.01$)
V384D	T:A	0.98:0.02 (510)	0.98:0.03 [†] (160)	—	—	—	0.03 ($p > 0.05$)

Parentheses show the number of chromosomes. Different population data were obtained from the International Hapmap projects (<http://hapmap.org/index.html.en>). Population descriptors: KOR: Korean normal population; JPT: Japanese in Tokyo, Japan; CHB: Han Chinese in Beijing, China; CEU: CEPH (Utah residents with ancestry from northern and western Europe); YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria. *ED (Ethnic difference) in allele frequency was calculated by subtracting the Korean allele frequency from the highest allele frequency of minor allele among ethnic groups at each SNP site. [†]Frequency data from Wang Y et al.²³

3. SNP 대립형질 빈도의 인종간 차이

International hapmap projects (<http://hapmap.org/index.html.en>)의 database를 참고하여 인종간 SNP 변이빈도를 알 수 있는 rs1800734, rs3774341, 그리고 V384D에서 동경거주 일본인, 북경거주 중국인, 북유럽과 서유럽혈통의 유타거주인, 아프리카계 혈통(나이지리아의 요루바인) 등 인종과 한국인을 비교하였는데 rs1800734에서 동아시아인과 북유럽과 서유럽혈통의 유타거주인 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였고($p < 0.01$), rs3774341에서 동아시아인과 북유럽과 서유럽혈통의 유타거주인 및 아프리카계 혈통간에 통계적으로 유의한 차이($p < 0.01$)를 보였을 뿐만 아니라 동아시아인 중에서도 한국인과 일본인은 차이가 없었으나, 한국인과 중국인($p = 0.03$), 그리고 일본인과 중국인은($p = 0.02$) 통계적으로 유의한 차이를 보였다. V384D는 한국인과 일본

인에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4).

고찰

저자들은 급성골수성백혈병 환자와 정상대조군의 hMLH1 유전자에서 5' flanking region에 위치한 rs1800734, intron에 위치한 rs3774341, 그리고 exon에 위치한 rs4986984, CNUHD-GRCHD03-209, D376D, V384D 등 6개 SNPs의 빈도를 측정하여 분석한 결과 이들 SNP는 백혈병의 발병과 관련이 없음을 발견하였다. V384D SNP는 보고자에 따라 대장암 환자의 발암과 관련이 있다¹⁹⁻²¹와 없다^{22,23}로 알려져 왔다. 과오수정유전자의 이상이 발암의 중요한 원인으로 알려져 있지만 hMLH1 유전자의 SNP는 급성골수성백혈병의 감수성과는 상관이 없는 것으로 생각된다. 현재까

지 hMLH1 유전자는 과오수정 기능에 중요한 영향을 미치는 NH2 말단과 COOH 말단 등 두 곳의 중요 부위를 가지고 있다.²⁴ NH2 말단에는 ATPase 활성을 가지는 HATPase domain이 있고²⁵ COOH 말단에는 DNA 과오수정단백질, C-말단 domain²⁶을 가지고 있다. V384D SNP은 384번째 아미노산을 결정하는데 hMLH1 유전자의 NH2 말단에 위치한 HATPase domain이거나 COOH 말단에 위치한 DNA 과오수정단백질, C-말단 domain에는 포함되지 않았지만 valine이 aspartic acid로 바뀌는(GTT→GAT) non-synonymous SNP이다.

저자들은 한국인에서 2개의 새로운 SNP rs4986984과 CNUH-GRCHD03-209를 발견하였으며 모두 non-synonymous SNP 이었다. 급성골수성백혈병 환자군과 대조군에서 이 2개 SNPs의 유전형과 대립 형질의 빈도는 유의한 통계학적 차이를 보이지 않았다. 그러나 이러한 정보는 앞으로 한국인에서 다양한 질환의 분자역학적 연구에 유용하게 사용 될 것으로 사료된다.

공개된 SNP database는 특정 민족의 SNP 대립 형질의 빈도의 존재를 검사하는 데 매우 유용한 정보이다. 그러나 지금까지의 SNP databas는 대부분 서양인, 아프리카인, 일본인과 중국인 등 특정 인종에만 국한되어 있다. 한국인은 서양인과 많은 SNP의 빈도에서 다르므로 한국인 시료를 사용하여 SNP을 발굴하고 한국인 SNP database를 구축하는 것이 반드시 필요하다. 저자들은 3개의 SNP에서 한국인과 다른 인종간의 대립 형질의 빈도를 비교 하였는데(Table 4) 한국인과 북유럽과 서유럽 혈통의 유타거주인 및 아프리카 계 혈통(나이제리아의 요루바인)간에 통계적으로 유의한 차이를 보였지만 동아시아인 특히 일본인과는 현저한 차이를 보이지 않은 것을 볼 수 있었다. 이것은 한국인과 일본인이 동일한 혈통에서 기원하였을 거라는 Okuda²⁷, Lee 등²⁸의 연구 결과와도 부합된다.

알 림

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(01-PJ10-PG6-01GN16-0005)과 전남대학교 의생명인력사업단(전남 의대 BK사업단)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

References

- Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res* 2005;65:5481-4.
- Kim KH, Yeom KS, Choi C. Search for the cSNP frequencies of N-acetyltransferase 2 and NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 in DNA pool of Korean people. *Chonnam Med J* 2002;38:202-9.
- Gu Z, Hillier L, Kwok PY. Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace. *Hum Mutat* 1998;12:221-5.
- Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002;47:561-6.
- Stephens JC. Single-nucleotide polymorphisms, haplotypes, and their relevance to pharmacogenetics. *Mol Diagn* 1999;4:309-17.
- Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia* 1998; 12(Suppl 1):S7-12.
- Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 2001;37:241-83.
- Rotman G, Shiloh Y. ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 1998;7:1555-63.
- Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagenesis* 1999;33:3-20.
- Ma X, Jin Q, Försti A, Hemminki K, Kumar R. Single nucleotide polymorphism analyses of the human proliferating cell nuclear antigen (pCNA) and flap endonuclease (FEN1) genes. *Int J Cancer* 2000;88: 938-42.
- Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998;4:1-6.
- Thomas DC, Umar A, Kunkel TA. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer. *Mutat Res* 1996;350:201-5.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoc MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
- Annese V, Piepoli A, Andriulli A, Latiano A, Napolitano G, Li HH, et al. Association of Crohn's disease and ulcerative colitis with haplotypes of the MLH1 gene in Italian inflammatory bowel disease patients. *J Med Genet* 2002;39:332-4.
- Pokorny RM, Hofmeister A, Galandiuk S, Dietz AB, Cohen ND, Neibergs HL. Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with the DNA repair gene MLH1. *Ann Surg* 1997;225:718-23; discussion 723-5.
- Lenz G, Hutter G, Hiddemann W, Dreyling M. Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2004;83:628-33.
- Seedhouse CH, Das-Gupta EP, Russell NH. Methylation of the hMLH1 promoter and its association with microsatellite instability in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:83-8.

19. Wang Y, Friedl W, Propping P, Li J, Li Z, Wang J. Val384Asp in hMLH1 gene in Chinese, Japanese and German and its etiological role in colorectal cancer. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi* 1998;15: 263-6.
20. Wang Y, Zhou J, Li Z, Wang J, Li J, Gao C, *et al.* One of the etiological factors of digestive tract cancers in Chinese: the missense mutation Val384Asp in the hMLH1 gene. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi* 2000;17:82-6.
21. Zhang XM, Li JT, Zhu M, Wu XL, Gao P, Zhou P, *et al.* Study on the relationship between genetic polymorphism Val384Asp in hMLH1 gene and the risk of four different carcinomas. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi* 2004;25:978-81.
22. Kim JC, Roh SA, Koo KH, Ka IH, Kim HC, Yu CS, *et al.* Genotyping possible polymorphic variants of human mismatch repair genes in healthy Korean individuals and sporadic colorectal cancer patients. *Fam Cancer* 2004;3:129-37.
23. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Nothen MM, Kruse R, Propping P. A novel missense mutation in the DNA mismatch repair gene hMLH1 present among East Asians but not among Europeans. *Hum Hered* 1998;48:87-91.
24. Kondo E, Suzuki H, Horii A, Fukushige S. A yeast two-hybrid assay provides a simple way to evaluate the vast majority of hMLH1 germ-line mutations. *Cancer Res* 2003;63:3302-8.
25. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, *et al.* Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 2002; 122:211-9.
26. Modrich P. DNA mismatch correction. *Ann Rev Biochem* 1987;56: 435-66.
27. Okuda T, Fujioka Y, Kamide K, Kawano Y, Goto Y, Yoshimasa Y, *et al.* Verification of 525 coding SNPs in 179 hypertension candidate genes in the Japanese population: identification of 159 SNPs in 93 genes. *J Hum Genet* 2002;47:387-94.
28. Lee JK, Kim HT, Cho SM, Kim KH, Jin HJ, Ryu GM, *et al.* Characterization of 458 single nucleotide polymorphisms of disease candidate genes in the Korean population. *J Hum Genet* 2003;48:213-6.