

Toll-like Receptor 2 유전자의 Microsatellite 유전자 다형성과 만성폐쇄성폐질환 발생과의 연관성 결여

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 폐 연구소

이희석, 이혜원, 김덕겸, 고동석, 박근민, 황용일, 이상민, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 임재준

Lack of the Association between Microsatellite Polymorphism in Toll-like Receptor 2 Gene and Development of COPD

Hee Seok Lee, MD., Hye Won Lee, Daeg Kyeom Kim, MD., Dong Seok Ko, MD., Gun Min Park, MD., Yong Il Hwang, MD., Sang-Min Lee, MD., Chul Gyu Yoo, MD., Young Whan Kim, MD., Sung Koo Han, MD., Young-Soo Shim, MD., Jae-Joon Yim MD.*

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine and Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine

Background : The fact that only 10-20% of chronic cigarette smokers develop chronic obstructive pulmonary disease (COPD) reflects the presence of genetic factors associated with the susceptibility to COPD. Recently, it was reported that the surfactant protein A increases the secretion of matrix metalloprotease 9, which degrades extracellular matrices of the lung, through a Toll-like receptor 2 (TLR2). In this context, possible role of TLR2 in the pathogenesis of COPD was postulated, and a functional dinucleotide repeat polymorphism in intron II of TLR2 was evaluated for any association with COPD.

Method : Male patients with COPD and male smokers with a normal pulmonary function were enrolled in this study. The number of Guanine-Thymine repeats in intron II of the TLR2 gene were counted. Because the distributions of the repeats were trimodal, the alleles were classified into three subclasses, 12-16 repeats: short (S) alleles; 17-22 repeats: medium length (M) alleles; and 23-27 repeats: long (L) alleles.

Result : 125 male patients with COPD and 144 age- and gender-matched blood donors with a normal lung function were enrolled. There were no differences in the distribution of each allele subclass (S, M and L) between the COPD and control group ($p=0.75$). The frequencies of the genotypes with and without each allele subclass in the COPD and control group were similar.

Conclusion : A microsatellite polymorphism in intron II of TLR2 gene was not associated with the development of COPD in Koreans. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 58: 367-374)

Key words : Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Toll-like receptor 2 (TLR2), Microsatellite polymorphism, Genetic susceptibility

서 론

만성폐쇄성폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD)은 4번째로 흔한 사망원인이며¹ 2020년까지는 전세계적으로 3번째로 흔한 사망 원인이 되

고 5번째로 흔한 장애 원인이 될 것으로 예상되고 있다^{2,3}. COPD 발생의 위험인자로써 흡연이 가장 잘 알려져 있지만 장기 흡연자의 10-20%에서만 증상이 있는 COPD가 생긴다는 사실은 이 질환의 병인에 유전적인 소인이 관여한다는 사실을 시사한다⁴. 또한 폐기능이 이란성 쌍생아간보다 일란성 쌍생아에서 더 일치한다는 사실과⁵ COPD 환자들의 가까운 친척들에서 기도폐쇄를 더 많이 관찰할 수 있었다는 보고 등은⁶ 유전적 소인이 폐기능의 변화에 영향을 미치며 또한 COPD의 병인에 관여할 수 있음을 제시한다.

COPD의 발생과 연관하여 가장 잘 알려져 있는 유전인자는 α_1 -antitrypsin의 Z 이형(Z-variant)인데, Z 이형의 동종접합체(ZZ)를 가진 환자가 흡연을 할 경우

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF 2003-003-E00083)

Address for correspondence : **Jae-Joon Yim, M.D.**

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-744, South Korea

Phone : 82-2-2072-2059 Fax : 82-2-762-9662

E-mail : yimjj@snu.ac.kr

Received : Jan. 17. 2005

Accepted : Mar. 7. 2005

젊은 나이에 폐기종이 발생할 위험성이 매우 높으며 또한 흡연을 하지 않는 경우조차도 더 빠른 폐기능의 악화를 보인다⁷. 그러나 이런 α_1 -antitrypsin의 Z 이형만으로 모든 COPD의 발생을 다 설명하기에는 Z 이형이 너무 드물다⁸. 이런 맥락에서 여러 유전자들의 다형성(polymorphism)과 COPD의 병인과의 관련성이 연구되고 있는데, 지금까지 보고된 유전자로는 단백분해효소(*PI* 결핍형질과 3' *PI* 유전자에 대한 이형접합체, α_1 -antichymotrypsin), 외인성물질 대사 효소(microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase), 항산화제(heme oxygenase-1), 염증매개체(TNF- α) 등이 있다. 그러나 각각의 결과에 대해서는 아직도 논란이 있는 실정이다^{9,10}.

human Toll-like receptors (TLR)는 초기의 선천성 면역과 획득면역반응에 중요한 역할을 하는 양식인지 수용체(pattern recognition receptor) 중의 하나이다^{11,12}. 한편 matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)은 폐조직의 세포외기질(extracellular matrix)을 분해함으로써 COPD의 병인에 중요한 역할을 하는데¹³⁻¹⁶, Surfactant protein A가 TLR2를 통해 MMP-9의 분비를 증가시킨다는 최근의 보고는¹⁷ COPD의 병인에 TLR2가 관여할 가능성을 시사한다.

이 연구의 목적은 최근에 보고된 TLR2의 intron II에 존재하는 Guanine-Thymine 반복으로 이루어진 유전자 다형성과¹⁸ COPD와의 관련성을 규명하는 것이다.

대상 및 방법

1. 대 상

환자군은 흡연력이 있는 남자 COPD 환자로 하였고 COPD의 진단은 1) 기침, 호흡곤란, 천명 등 만성 호흡기 증상 및 증후가 있으면서 2) 1초간 강제호기량과 강제폐활량의 비(FEV_1/FVC)가 70% 미만이며 3) 200 μ g salbutamol 흡입 후 시행한 기관지확장제반응검사가 음성인 경우(FEV_1 회복률 <12% 또는 FEV_1 증가량 < 200ml)인 경우로 정의하였다. 이들 중 흉부 방사선소견에서 과팽창 외에 다른 이상 소견이 있는

환자와 기관지천식을 시사하는 전형적 병력이 있는 환자도 제외하였다. 대조군은 35세 이상이며, 20갑년 이상의 흡연력이 있으나 폐기능이 정상인 성인 남자로 정하였다. 연구에 참여한 모든 환자들에게 서면동의를 받은 후 말초혈액을 채혈하여 DNA 분리에 사용하였다.

2. TLR2 유전자의 intron II에 존재하는 Guanine-Thymine (GT) 반복횟수의 결정

GT 반복횟수를 결정하기 위해 hex-labeled primers 5'-gcattgctgaatgtatcaggga-3'과 5'-cttgagaaatgt-tttctagc-3'를 이용하여 GT 반복을 포함하는 약 150bp의 영역을 증폭하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)은 *Taq* polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)를 이용하여 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30 주기를 시행하였다. Genescan Analysis 2.1 software가 장착된 ABI 310 sequencer를 사용하여 PCR product의 크기를 측정 후 역산하여 GT 반복횟수를 확인하였다.

3. 통계분석

COPD와 GT 반복횟수에 따른 특정 allele subclass와의 연관성, 또 특정 allele subclass를 가지고 있는 유전형(genotype)과의 연관성을 알기 위해 two-tailed χ^2 test를 통해 분석하였다. *p*-값이 0.05보다 작을 때 유의한 차이를 보이는 것으로 생각하였다. Odds ratio와 95% 신뢰구간은 특정 allele subclass 또는 유전형에 의한 상대적 질환 위험도를 측정하기 위해 계산되었다. 모든 통계적 분석은 SPSS statistical package (version 11.0)을 사용하였다.

결 과

1. COPD군과 대조군의 임상적 특성

연구기간 동안 COPD군에 125명, 정상 대조군에 144명이 참여하였다. 나이의 중앙값은 COPD군에서

64세이고 대조군에서는 64.5세로 두 군간의 유의한 차이는 없었으며($p=0.09$), 흡연력도 COPD군에서의 중앙값이 45갑년이었고 대조군에서는 40.5갑년으로 유의한 차이는 없었다($p=0.06$). COPD군의 평균 FEV₁값은 1.30 ± 0.57 L이었고 대조군의 평균 FEV₁값은 2.80 ± 0.46 L이었다(Table 1).

2. COPD군과 대조군에서의 GT 반복횟수의 분포

가장 흔한 GT 반복횟수는 COPD군의 경우 13 (24.8%), 20 (19.6%), 24 (18.4%) 순이었고 대조군의 경우 13 (26.7%), 20 (26.7%)이 가장 많았고 다음으로는 24 (20.5%) 반복이 흔했다(Figure 1).

3. COPD군과 대조군에서의 GT 반복횟수에 따른 맞섬유전자(allele) 아형의 빈도

COPD군과 대조군의 전체 형질의 빈도에서, 두군 모두 GT repeat이 13, 20, 24회를 중심으로 한 3상성의 분포(trimodal pattern)를 보였다(Figure 1). 이런 분포에 근거하여 microsatellite 유전자다형성에 대한 기존의 다른 분석에서처럼^{19,20} 반복횟수에 따라 맞섬유전자를 세 개의 아형으로 나눴다. 즉 12-16회의 GT 반복을 짧은 아형(S allele), 17-22회의 GT 반복을 중간 아형(M allele), 그리고 23-27회의 GT 반복을 긴 아형(L allele)로 나누었다. COPD군에서 전체 252개 대립유전자의 분포를 보면 짧은 아형은 75 개 (30.0%)

Table 1. Baseline characteristics of the COPD and control groups

	COPD group	control group	<i>p</i> -value
Total number	125	144	
Age, years (median)	42-82 (64)	37-91 (64.5)	0.09
Smoking			
Ex-smoker	69 (55.2%)	113 (78.5%)	
Current smoker	56 (44.8%)	31 (21.5%)	
Pack year (median)*	10-100 (45)	20-210 (40.5)	0.06
Pulmonary function†			
FEV ₁ (liter)	1.30 ± 0.57	2.80 ± 0.46	<0.001
FEV ₁ (% of predicted value)	48.7 ± 19.7	101.8 ± 12.5	<0.001

* pack year of ex- and current smokers

† numbers are mean \pm SD

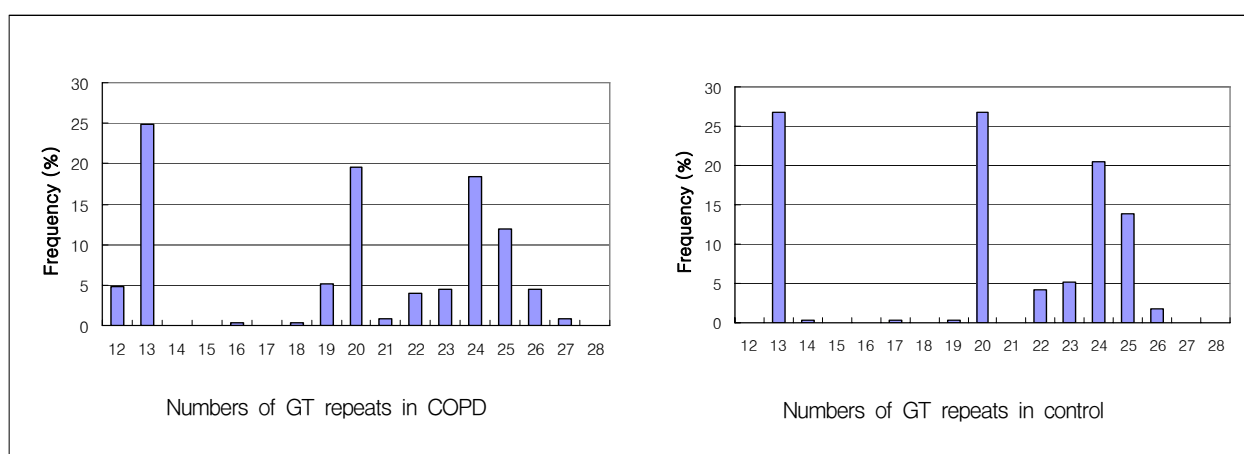


Figure 1. Allele frequencies of the (GT)_n repeats in the COPD patients and controls

Table 2. Allele frequencies of the (GT)_n repeats in the COPD patients and controls

Allele Class	Number of alleles		Odds ratio (95% CI)* vs all other classes
	COPD (n=250)	Control (n=288)	
S	75 (30.0%)	78 (27.1%)	1.15 (0.79-1.68)
M	75 (30.0%)	91 (31.6%)	0.92 (0.64-1.34)
L	100 (40.0%)	119 (41.3%)	0.94 (0.67-1.34)

 $p = 0.75$

* 95% CI; 95% confidence interval

Table 3. Frequencies of the genotypes of the (GT)_n repeats according to the presence/absence of the S alleles in the COPD patients and controls

Genotype subgroup	Number of patients		Odds ratio (95% CI)
	COPD (n=125)	Control (n=144)	
Genotype including S allele	68 (54.4%)	67 (46.5%)	1.37 (0.85-2.22)*
Genotype without S allele	57 (45.6%)	77 (53.5%)	

 $p = 0.22$

*95% CI; 95% confidence interval

였고 중간 아형은 75개 (30.0%), 그리고 긴 아형은 100개 (40.0%)였다(Table 2). 대조군의 경우 288개의 맞섬유전자 형 중 짧은 아형, 중간 아형, 긴 아형의 갯수는 각각 78 (27.1%), 91 (31.6%), 119 (41.3%)이었다. 두 군간에 맞섬유전자의 아형의 분포에 유의한 차이는 없었다($p=0.75$).

4. COPD군과 대조군에서 GT 반복횟수를 유전형의 빈도

각각 대상자들의 유전형은 GT 반복횟수에 따른 맞섬유전자 아형의 조합에 따라 6개의 유전형으로 표시될 수 있다(L/L, L/M, L/S, M/M, M/S, S/S). 이런 6개의 유전형을 짧은 아형을 가지고 있는 유전형과 짧은 아형을 가지고 있지 않은 유전형으로 나누어, COPD군과 대조군 사이에 차이가 있는지 분석하였다. 우선 짧은 아형의 유무에 따른 소그룹 분석에서는 COPD군에서 짧은 아형을 가지고 있는 유전형이 54.4%, 대조군에서는 46.5%로 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.22$, Table 3). 중간 아형이나 긴 아형을 포함하는 지 여부를 기준으로도 분석해보았으나 양군 간에 유의한 차이를 확인할 수 없었다.

고 찰

COPD의 유전적 감수성을 설명하기 위해 여러 유전자의 다형성(polymorphism)이 유전적 위험요인으로 제시되어 왔는데 여기에는 단백분해효소(α_1 -anti-trypsin 유전자의 *PI* 결핍형질의 이형접합체^{21,22}, 3' *PI* 유전자^{23,24}, α_1 -antichymotrypsin²⁵), 외인성 물질 분해효소 (microsomal epoxide hydrolase²⁶, glutathione S-transferase²⁷⁻²⁹), 항산화제 (heme oxygenase-1³⁰), 염증매개체 (TNF- α ³⁰) 등이 있다. 그러나 그 결과는 인종별로 차이를 보이는 등 아직도 논란이 있는데³¹⁻³⁷, 저자들은 microsomal epoxide hydrolase, glutathione transferase S1과 M1의 다형성이 외국인과는 달리 한국인에서는 COPD의 발생과 관련이 없음을 보고한 바 있다^{35,36}.

5' flanking region이나 intron의 microsatellite 유전자 다형성은 몇 개 질환의 임상적 특성이나 발생과 관련되어 있는 것으로 알려져 왔다. 예를 들어 interferon- γ 유전자의 intron I 에 있는 (CA)_n 반복 유전자 다형성은 폐결핵³⁸, 류마치스관절염³⁹, 골수이식 후 이식편대숙주반응(GVHD)⁴⁰, 결정경화증에서의 혈관근육지방증⁴¹, IgA 신병증⁴² 등과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 폐기종⁴³, 관상동맥질환⁴⁴, 결핵⁴⁵ 등도 다른 유전자에 존재하는 microsatellite 유전자

다형성과 연관되어 있다고 보고되기도 하였다. Intron에 존재하는 microsatellite 유전자 다형성이 촉진자(promoter)의 활성도를 조절한다는 것은 이미 보고되었고^{43,46} 저자들이 발표한 이전 연구에서도 GT 반복횟수에 따라 전사활성도(transcriptional activity)가 다름이 증명되었다¹⁸.

MMP-9은 폐조직에서의 type IV collagen과 elastin 같은 여러 세포외기질을 분해하며⁴⁷, 폐기종이 있는 환자의 폐포대식세포와 기관지폐포세척액에서 MMP-9의 발현이 증가되었다는 보고와¹³⁻¹⁶, MMP-9 유전자의 촉진자에 존재하는 유전자 다형성이 폐기종과 관련되었다는 연구는⁴⁸ MMP-9이 폐기종의 병인에 중요한 역할을 가지고 있음을 암시한다. 이에 더하여 surfactant A가 TLR2를 통해 MMP-9를 분비한다는¹⁷ 최근의 보고는, TLR2가 MMP-9을 통해 COPD의 병인에 관여할 가능성을 시사한다.

또한 TLR2가 COPD의 발생에 관여할 것이라고 추론할 수 있는 근거는 COPD의 발생에서의 호흡기감염의 역할과 관련되어있다. 하기도의 세균성 감염은 COPD의 병인과 임상경과에 다양한 영향을 미칠 수 있으며⁴⁹ COPD의 발생과 연관이 있다고 보고된 여러 병원균 중에서⁵⁰⁻⁵³ *Hemophilus influenzae*⁵⁴, *Chlamydia pneumoniae*⁵⁵, *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁶ 등이 TLR2를 통해 인지되고 신호전달을 하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 TLR2가 이런 세균성 병원체에 대한 면역반응을 조절하면서 COPD의 병인에 관여할 가능성이 존재한다.

그러나 저자들은 TLR2 유전자의 intron II에 존재하는 (GT)_n 반복으로 이루어진 유전자 다형성과 COPD의 발생과의 연관성을 확인할 수 없었다. 그러나 이 결과만으로 COPD의 발생과 TLR2와의 관계를 완전히 부정할 수는 없다. 앞으로 TLR2에 존재하는 다른 유전자다형성과 COPD와의 연관성이 규명되어야 하며, 다른 인종에서의 연관성 역시 검토되어야 한다.

요 약

연구배경 :

장기간 흡연을 하는 사람의 10-20%에서만 COPD

가 발생한다는 사실은 COPD의 발생에 유전적 인자가 관여함을 시사한다. 최근 surfactant protein A가, COPD의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MMP-9의 분비를 TLR2를 통해 증가시킨다고. 그러므로 COPD의 병인에 TLR2이 역할을 할 수 있을 것이라는 가정 아래, TLR2 유전자의 intron II에 존재하는 Guanine-Thymine (GT)의 반복으로 이루어진 유전자다형성과 한국인에서의 COPD의 발생과의 연관성을 규명하고자 하였다.

방 법 :

흡연력이 있는 남자 COPD 환자와 정상 폐기능을 보이는 남자 흡연자를 대상으로 하여, TLR2 유전자의 intron II의 GT 반복횟수를 확인하였다. 그 GT 반복이 3상성의 분포를 보여 이들을 다시 세 개의 맞섬 유전자 아형으로 분류하여 분석하였다. (12-16회 GT 반복: 짧은 아형; 17-22회 반복: 중간 아형; 23-27회 반복: 긴 아형)

결 과 :

각각의 맞섬유전자 아형의 분포는 125명의 COPD 군과 144명의 대조군 사이에 유의한 차이는 없었다 ($P=0.75$). 또한 각각의 맞섬유전자 아형의 유무에 따른 유전형의 빈도도 두 군간의 차이는 관찰할 수 없었다.

결 론 :

TLR2 유전자의 intron II에 존재하는 GT 반복으로 이루어진 유전자다형성은 한국인에서 COPD의 발생과 연관되어 있지 않다.

참 고 문 헌

1. Mortality patterns — preliminary data, United States, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997; 46:941-4.
2. Michaud CM, Murray CJ, Bloom BR. Burden of disease-implications for future research. Jama 2001; 285:535-9.
3. Sullivan SD, Ramsey SD, Lee TA. The economic burden of COPD. Chest 2000;117: 5S-9S.
4. Bascom R. Differential susceptibility to tobacco smoke: possible mechanisms. Pharmacogenetics 1991;1: 102-6.
5. Redline S, Tishler PV, Lewitter FI, Tager IB, Munoz A, Speizer FE. Assessment of genetic and nongenetic influences on pulmonary function. A twin study. Am Rev Respir Dis 1987;135:217-22.

6. Givelber RJ, Couropmitree NN, Gottlieb DJ, Evans JC, Levy D, Myers RH, et al. Segregation analysis of pulmonary function among families in the Framingham Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1445-51.
7. Black LF, Kueppers F. alpha1-Antitrypsin deficiency in nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:421-8.
8. O'Brien ML, Buist NR, Murphey WH. Neonatal screening for alpha1-antitrypsin deficiency. *J Pediatr* 1978;92:1006-10.
9. Silverman EK. Genetic Epidemiology of COPD. *Chest* 2002;121:1S-6S.
10. Sandford AJ, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction. *Thorax* 2002; 57:736-41.
11. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-8.
12. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173:89-97.
13. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:240-7.
14. Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'Arcy E M, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997;52: 502-6.
15. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, et al. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with sub-clinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1985-91.
16. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000;117:684-94.
17. Vazquez de Lara LG, Umstead TM, Davis SE, Phelps DS. Surfactant protein A increases matrix metalloproteinase-9 production by THP-1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L899-906.
18. Yim JJ, Ding L, A.A. S, Park GY, Shim YS, Holland SM. A microsatellite polymorphism in intron 2 of human toll-like receptor 2: Functional Implications and Racial Differences. *FEMS Immunol Med Biol* 2004;(In press).
19. McGinnis RE, Spielman RS. Insulin gene 5' flanking polymorphism. Length of class 1 alleles in number of repeat units. *Diabetes* 1995;44:1296-302.
20. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000;66:187-95.
21. Bartmann K, Fooke-Achterrath M, Koch G, Nagy I, Schutz I, Weis E, et al. Heterozygosity in the Pi-system as a pathogenetic cofactor in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur J Respir Dis* 1985; 66:284-96.
22. Seersholm N, Wilcke JT, Kok-Jensen A, Dirksen A. Risk of hospital admission for obstructive pulmonary disease in alpha(1)-antitrypsin heterozygotes of phenotype PiMZ. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:81-4.
23. Kalsheker NA, Watkins GL, Hill S, Morgan K, Stockley RA, Fick RB. Independent mutations in the flanking sequence of the alpha-1-antitrypsin gene are associated with chronic obstructive airways disease. *Dis Markers* 1990;8:151-7.
24. Poller W, Meisen C, Olek K. DNA polymorphisms of the alpha 1-antitrypsin gene region in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Invest* 1990;20:1-7.
25. Poller W, Faber JP, Scholz S, Weidinger S, Bartholome K, Olek K, et al. Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease. *Lancet* 1992;339:1538.
26. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997;350: 630-3.
27. Harrison DJ, Cantlay AM, Rae F, Lamb D, Smith CA. Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol* 1997;16:356-60.
28. Baranova H, Perriot J, Albuissou E, Ivaschenko T, Baranov VS, Hemery B, et al. Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis. *Hum Genet* 1997; 99:822-6.
29. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:693-6.
30. Sakao S, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H,

- Kuriyama T. 2001. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:420-422.
31. Alvarez-Granda L, Cabero-Perez MJ, Bustamante-Ruiz A, Gonzalez-Lamuno D, Delgado-Rodriguez M, Garcia-Fuentes M. PI SZ phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52: 659-61.
 32. Benetazzo MG, Gile LS, Bombieri C, Malerba G, Massobrio M, Pignatti PF, et al. alpha 1-antitrypsin TAQ I polymorphism and alpha 1-antichymotrypsin mutations in patients with obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 1999;93:648-54.
 33. Morgan K, Scobie G, Kalsheker NA. Point mutation in a 3' flanking sequence of the alpha-1-antitrypsin gene associated with chronic respiratory disease occurs in a regulatory sequence. *Hum Mol Genet* 1993;2:253-7.
 34. Sanford AJ, Chagani T, Weir TD, Pare PD. Alpha 1-antichymotrypsin mutations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Dis Markers* 1998; 13:257-60.
 35. Yim JJ, Park GY, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, et al. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax* 2000;55:121-5.
 36. Yim JJ, Yoo CG, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS. Lack of association between glutathione S-transferase P1 polymorphism and COPD in Koreans. *Lung* 2002;180:119-25.
 37. Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW. Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000;15:281-4.
 38. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999;26:1-3.
 39. Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D, Chalmers A, Horsman D, Anderson M, et al. Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000;356:820-5.
 40. Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:1594-600.
 41. Dabora SL, Roberts P, Nieto A, Perez R, Jozwiak S, Franz D, et al. Association between a high-expressing interferon-gamma allele and a lower frequency of kidney angiomyolipomas in TSC2 patients. *Am J Hum Genet* 2002;71:750-8.
 42. Masutani K, Miyake K, Nakashima H, Hirano T, Kubo M, Hirakawa M, et al. Impact of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms on development and progression of IgA nephropathy in Japanese patients. *Am J Kidney Dis* 2003;41:371-9.
 43. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000;66:187-95.
 44. Benjafield AV, Wang XL, Morris BJ. Tumor necrosis factor receptor 2 gene (TNFRSF1B) in genetic basis of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001;79:109-15.
 45. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMPI gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998;338:640-4.
 46. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999;274:13176-80.
 47. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001;2:10-9.
 48. Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:116-9.
 49. Sethi S. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2000;117:286S-91S.
 50. Hass H, Morris JF, Samson S, Kilbourn JP, Kim PJ. Bacterial flora of the respiratory tract in chronic bronchitis: comparison of transtracheal, fiberbronchoscopic, and oropharyngeal sampling methods. *Am Rev Respir Dis* 1977;116:41-7.
 51. Read RC, Wilson R, Rutman A, Lund V, Todd HC, Brain AP, et al. Interaction of nontypable Haemophilus influenzae with human respiratory mucosa in vitro. *J Infect Dis* 1991;163:549-58.
 52. Von Hertzen L, Alakarppa H, Koskinen R, Liippo K, Surcel HM, Leinonen M, et al. Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect* 1997;118:155-64.
 53. Adler KB, Hendley DD, Davis GS. Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion

- by explants of guinea pig airways. *Am J Pathol* 1986;125:501-14.
54. Li JD. Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens. *J Pharmacol Sci* 2003;91:1-7.
55. Netea MG, Kullberg BJ, Galama JM, Stalenhoef AF, Dinarello CA, Van der Meer JW. Non-LPS components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur J Immunol* 2002;32:1188-95.
56. Flo TH, Ryan L, Latz E, Takeuchi O, Monks BG, Lien E, et al. Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J Biol Chem* 2002;277:35489-95.
-