

한국인에서의 DNA repair gene(hMLH1, hMSH2 및 ATM)의 Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs)의 빈도

정현숙 · 김태연 · 조윤희 · 김양지 · 정해원*
서울대학교 보건대학원, 보건환경연구소

Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs) of DNA repair genes; hMLH1, hMSH2 and ATM in Healthy Korean

Hyun Sook Jung, Tae Yon Kim, Yoon Hee Cho, Yang Jee Kim, and Hai Won Chung*
School of Public Health and The Institute of Health and Environmental Science, Seoul National University

(Received March 3, 2003 / Accepted March 18, 2003)

Abstract : Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are alterations in DNA base that occur most frequently throughout the human genome. The SNPs of DNA repair genes, hMLH1, hMSH2 and ATM, among 100 Korean people were analyzed using Dynamic Allele specific Hybridization (DASH) techniques. Mutation at the position of exon 38 (GA) and exon 10 (CG) of ATM gene, mutation at the position of exon 8 (AG), and exon 1 (AG) of hMLH1 gene and exon 14 (AG) of hMSH2 gene were investigated. No mutation at the selected position of ATM gene and hMSH1 gene was found. However, while there was no mutation at the position of exon of hMSH2 gene, mutation was found at the promotion region (CT) with the frequency of 24% CC, 36% CT and 62% TT genotypes. This results might be used as baseline data for research on SNP of Korean population.

Key words : Single Nucleotide Polymorphism (SNP), ATM, hMLH1, hMSH2, Dynamic allele specific hybridization (DASH) technique, Koreans

서 론

현재까지 이루어진 연구에 의하면 사람은 약 2만 5천여 개의 유전자가 있는 것으로 알려졌다. DNA의 이상구조는 DNA 염기서열상의 변이를 나타내는데 인간에 있어서 이중 약 90% 정도는 DNA의 단일 염기의 차이에서 온다(Brookes *et al.*, 1999; Kwok *et al.* 1999). 이러한 다형성을 Single Nucleotide Polymorphism(SNP)이라고 하며 DNA 염기서열 변이 중에서 가장 빈번한 형태이다(Kwok *et al.* 1999).

SNP의 변이는 단백질을 형성하는 3차원 구조에 이상을 초래하여 단백질의 기능의 변화를 초래할 수 있기 때문에 어떤 경우에는 치명적인 질병을 일으킬 수 있게 된다(Kwok *et al.* 1999). 또한 SNP은 인체 지놈 상에서의 발생 빈도가 높아 고효율 유전자형 분석(high-throughput genotyping)에 매우 유용하다(Kwok *et al.* 1999). 따라서 SNP은 표현형을 결정하는 중요 인자로서 뿐만 아니라 유전자 지도 작성을 위한 표지자(marker)로서 사용될 수 있으며 최근에는

복잡한 유전성 질환을 연구하기 위한 생물학적 지표로서로도 활용되고 있다(Kwok *et al.* 1999).

인간에 있어서 DNA 손상 회복 기전에 참여하는 유전자는 70개 정도 되는데 이 유전자 등이 두 개 이상의 기능을 발휘함으로써 정상적인 DNA 회복이 이루어진다(Park *et al.*, 2002). DNA 회복(repair)기전에는 homologous recombinational repair(HRR), non-homologous end joining(NHEJ), nucleotide excision repair(NER), base excision repair(BER), mismatch repair(MMR) 등 주요한 다섯 가지가 있고 이러한 경로를 통하여 개인의 지놈(genome)의 고유성을 유지할 수 있다(Ronen *et al.* 2001; Yu *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002). 유전자 회복 경로에서 중요한 역할을 하는 유전자로는 HRR 과정에 BRCA1, ATM, ATR, WRN, BLM, Tip60, p53 등이 있고, NHEJ 과정에는 DNA-PK 아그룹 등, NER 과정에는 XPB, XPD, p53 등, BER 과정에는 Ref-1/Ape, poly(ADP-ribose) polymerase-1(PARP-1), p53 등이 있으며, 그리고 MMR 과정에는 MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 등이 있다(Ronen *et al.* 2001; Yu *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002).

만약 DNA 회복에 관여하는 유전자의 단일염기에서 돌연

*To whom correspondence should be addressed

변이가 발생하게 되면 유전자의 본래 기능이 저하되어 DNA 회복기전에 결함을 가져오게 되고 과도한 DNA 상해를 축적하게 된다(Ma *et al.*, 2000). 개체 내에 DNA 상해나 구조적 변이가 남아 있게 되면 DNA 복제 시 잘못된 염기쌍이 생길 확률이 커지고, 따라서 돌연변이, 암, 노화의 가속화 현상 그리고 기형유발 등 비정상적인 분화를 초래하게 된다(Ronen *et al.* 2001; Yu *et al.*, 1999). 예를 들면, 소뇌의 퇴화 및 치매증상과 눈이나 피부 등의 모세혈관의 확장현상이 나타나는 상염색체 열성 유전 질환인 모세혈관확장성 운동실조증(Ataxia telangiectasia; AT)이 그러하다(Rotman *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999).

AT질환은 유전적인 변이 때문에 AT유전자의 배열에 변화가 생겨 나타나는데 이렇게 변이된 AT유전자를 ATM(AT Mutated)이라고 한다(Rotman *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999; Shiloh *et al.*, 2001). ATM은 주요한 다섯 가지 DNA repair 기전 중 HRR에 관여하는 대표적인 유전자인데, HRR은 DNA 이중가닥절단에서 DNA 손상으로 잃은 염기 서열 정보를 본래의 상동의 DNA부터 얻어 물리적으로 정확히 재조합하는 회복 기전이므로 ATM 등의 변이로 인한 회복 오류는 지놈의 불안정성을 유도하여 차후의 추가적인 돌연변이를 발생시키게 된다(Rotman *et al.*, 1998; Shiloh *et al.*, 2001). 또한 ATM은 DNA 손상을 감지하는 역할을 하는 것으로 생각되어지고 있는 BASC(BRCA1-associated genome surveillance complex)의 구성성분으로 특히 DNA의 이중가닥절단에서 오는 DNA 상해를 알리는 역할을 하며 DNA 손상에 따른 신호전달체계를 활성화시키는데 주요한 초기 요소이다(Bernstein *et al.*, 2002). ATM 유전자의 결함이 있는 사람으로부터 적출한 세포는 이온화 방사선, bleomycin, 제한효소에 쉽게 손상을 받으며 topoisomerase 억제물질 및 이중가닥절단을 유도하는 모든 물질들에 민감한 것으로 보고 되고 있다(Ronen *et al.* 2001; Bernstein *et al.*, 2002; Shiloh *et al.*, 2001).

유전성 비용종증 대장암(hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)도 DNA 회복 관련 유전자의 이상으로부터 유도되는 유전질환 중의 하나이다(Viel *et al.*, 1997). 이 질환은 새로 합성된 DNA를 정밀하게 탐사함으로써 DNA 복제 과정 중의 오류로 생긴 잘못된 염기쌍을 교정하는 즉, 복제 후 회복의 형태를 띠는 MMR(mismatch repair) 기전의 이상으로 발생하게 된다(Yu *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002; Peltomaki *et al.*, 2001). 사람의 세포에 있어서 MMR에 관계하는 유전자는 hMSH2, hMSH3, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6 등 6종류이다(Yu *et al.*, 1999). Viel(1997), Millar(1999) 등의 연구에 따르면 HNPCC는 MMR 유전자들의 변이에서 온다고 하였는데 이 유전자들 중에서 hMSH2와

hMLH1유전자의 변이가 HNPCC의 발병에 주요한 역할을 하였다고 보고하였다(Viel *et al.*, 1997; Millar *et al.*, 1999). Han(1998) 등의 연구를 보면, 한국의 HNPCC환자에서 hMSH2와 hMLH1 유전자의 변이가 다른 유전자에 비해 압도적으로 많이 나타나 서양인 대상 연구 결과와 일치하였으나 hMSH2와 hMLH1유전자 각각의 변이 빈도 분포는 다른 양상을 나타냈다(박영진 외., 1998; Park *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1998). 이것은 SNP의 변이가 개인별, 민족별로 차이가 날 수 있음을 시사하는 것으로써 유전자의 변이에서 오는 질병, 특히 유전성이 높은 질환일 경우 유전자형에 대한 기초연구가 선행되어야 할 것이다.

질병에 대한 개개인의 감수성은 여러 가지 물리적, 환경적, 유전적 인자의 노출정도에 따라 달라지나 최근에는 개인의 유전자에 대한 관심이 매우 높아지고 있다. 특히 자연발생적 복제과정이나 환경오염물질에 의한 인체의 손상에 대한 방어 기전에 관여하는 DNA 회복 유전자의 변이는 질병발생 위험에 대한 개인간의 차이를 나타낼 수 있어 매우 중요하다고 할 수 있다(Ma *et al.*, 2000). 단일염기다형성(SNP) 연구는 인간 집단 수준에서 뿐만 아니라 개인수준에서 질병의 초기 원인을 구명할 수 있으므로 분자역학분야에서 활발히 다루어야 할 주제이다.

본 연구는 정상 한국인을 대상으로 DNA 회복 기전에 관여하는 유전자들 중 hMLH1, hMSH2 및 ATM를 선택하여 SNP의 분포를 파악하여 향후 진행되어질 SNP 연구 중 정상 한국인에 대한 예비자료 및 기초자료로서 활용될 수 있을 것이며, 특정 질병 발생에 민감한 집단을 선별해내고 이러한 집단 구성원들의 질병 예방 효과도 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

연구 대상 및 방법

연구 대상

건강한 한국인 100명을 분석대상으로 선정하여 성, 연령, 흡연, 음주 등에 대한 기본 설문을 실시하였다. 평균 연령은 36.5세였으며, 이들의 정맥혈을 채취하여 각 유전자의 단일 염기다형성을 분석하였다.

연구 방법

연구대상 유전자의 SNP 선정

HGVbase(<http://hgvsbase.cgb.ki.se/>)에 등록된 SNP를 포함하는 염기서열을 NCBI의 dbSNP에 입력후 BLAST search를 통해 각 유전자의 intron 부위를 배제하고 게놈상의 DNA 변이의 근원적인 것을 반영할 것으로 기대되어지는 genomic DNA 염기서열을 선택하였다(Brookes *et al.*,

Table 1. General characteristics of study population

Variable	No. of subject (n=100)
Sex	
Male	69
Female	31
Average age (Mean±S.E)	36.52±1.45
Age (years)	
≤ 20	26
21-30	15
31-40	21
41-50	22
≤ 51	16
Smoking status	
No	60
Yes	40
Alcohol intake	
No	46
Yes	54

1999, The International SNP Map Working Group, 2001, Smigielski *et al.* 2000). 중합효소연쇄반응(PCR)을 위하여 설계한 각 유전자의 primer 및 probe를 표 2에 제시하였다.

DASH(dynamic allele-specific hybridization)기법을 이용한 SNP분석

DNA 분리

Sodium heparine이 첨가된 전혈 1.5 ml에 cell lysis 용액을 넣은 후 실온에서 10분 이상 방치하고, 2000 g로 10분간 원심 분리한다. 다시 cell lysis 용액을 넣어 위의 과정을 반복한 후 상등액을 버리고 백혈구 pellet을 풀어준 후 nuclei lysis 용액을 첨가하여 잘 흔들어 준다. 이어 protein precipitation 용액을 넣고 충분히 vortex 한 후 2000 g으로 10분간 원심분리하면 단백질을 포함한 모든 불순물이 가라앉는다. 이때 상등액을 조심스럽게 isopropanol 용액에 옮기면

작은 white pellet의 DNA를 얻을 수 있다. 이 pellet을 70% 에탄올로 탈수시키고 rehydration 용액으로 충분히 녹여 -20°C에 보관하였다(Promega).

PCR 증폭

추출된 DNA 10ng을 중합효소반응(Polymerase chain reaction, PCR)에 사용하였다. DNA 증폭에 사용된 반응물은 deoxynucleotide triphosphate(dNTP), KCl, Taq DNA polymerase, Tris-HCl(pH 9.0), MgCl₂ 등이 적절하게 배합되어 있는 premixture(Bioneer)에 각각의 DNA template과 biotin이 부착되어 있는 4 pmol의 상위 primer와 biotin이 부착되어 있지 않은 20 pmol의 하위 primer를 첨가한 후 PCR 기기(Eppendorf)를 이용하여 반응을 수행하였다. 증폭조건은 94°C에서 30초, 각각의 유전자에 따라 50-55°C의 annealing 온도에서 10초 과정을 35회 반복하였다.

각 증폭산물의 5'측에 biotin이 표지되어 있으며 50-70bp의 크기로 증폭되었다. 증폭산물은 5% agarose gel에서 100V의 전압으로 전기영동한 후 Etidium Bromide(EtBr)용액으로 염색하여 UV illuminator를 통해 생성유무를 관찰한 후 SNP분석에 사용하였다.

SNP 분석

본 연구에서는 DASH(dynamic allele-specific hybridization) 분석법을 이용하였다.

DASH 방법은 SNP이 없는 정상 염기서열과 변이가 있는 염기서열에 대한 두 가지 소식자(probe)를 이용하여 각각의 단일가닥 분리 온도(melting temperature: T_m)의 차이를 검색함으로써 변이의 유무, 즉 유전자형을 알아내는 방법이다. 우선 streptavidin이 부착되어있는 96 well에 biotin이 부착된 primer로 증폭한 PCR 산물과 DASH buffer(Hybrid)을 각각 10ul, 40ul씩 넣고 실온에서 최소 1시간 이상 방치한 후, buffer를 제거한다. 이후 0.1M NaOH 50ul를 넣고 실

Table 2. Primers and probes for amplification of Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs) region of each genes

Gene	SNP IDa	SNP region	Primer	Probe
ATM	SNP000007028	exon 38 (G → A)	Biotin-5'-TTAATTCATGATATTTTACTCCA 5'-CATATTTCTCTATGATTCATTTGTA	① ^b : 5'-ATTGTATCTTGGAGTA ② ^c : 5'-ATTGTATTTTGGAGTA
	SNP000007176	exon 10 (C → G)	Biotin-5'-GCAAAAGGAAGAAAATAGAAC 5'-TCTGAATGTGATCTTTTATTACT	①: 5'-ACT TCCCAGCCTAGTTC ②: 5'-ACT TCCCACCCTAGTTC
hMLH1	SNP000002588	exon 8 (A → G)	Biotin-5'-CGACTAACAGCATTTCCAAAG 5'-CTACCCAATGCCTCAACCGTG	①: 5'-TTCGCTCCATCTTTGGGA ②: 5'-TTCGCTCCGCTTTGGGA
	SNP0000064597	exon 1 (A → G)	Biotin-5'-CGGCGGGGGAAGTTAT CCAGC 5'-ACTCCCTCCGTACCAGTTCT	①: 5'-TGCAGGGACTTTAACTG ②: 5'-TGCAGGGAGTTAACTG
hMSH2	SNP000002824	exon 14 (A → G)	Biotin-5'-TAGGTTAACATGGGCTATATC 5'-AATTACCAATCTTTGTTGCAAT	①: 5'-GCAATGTATTCTGATAT ②: 5'-GCAATGTACTCTGATAT
	미등록	promoter region (C → T)	Biotin-5'-ACCGAAACGAAGCCCTGGAAG 5'-GCTTTCGGCCACGGCGACCAC	①: 5'-CACACCCAGTCAGCTTC ②: 5'-CACACCCAATCAGCTTC

a; HGVbase(<http://hgvbase.cgb.ki.se/>) 에 등록된 SNP ID Number.

b; match probe c; mismatch probe.

온에 5분 방치하고 상등액을 제거한 후 다시 한번 0.1M NaOH 50ul를 넣고 세척한다. 이 과정을 통해 well 내에는 biotin-streptavidin 이 결합된 PCR 생성물만 남아있게 된다. 여기에 상보적인 probe와 DASH buffer로 1:10000으로 희석한 DNA 형광염색액(SYBR Green)을 함께 넣고 혼성결합(hybridization)시킨다. 이때 microtiter plate의 뚜껑을 덮은 채로 PCR 기기(Eppendorf)의 온도강하 기능을 이용해 85°C로 급속히 올렸다가 초당 0.07°C씩 떨어뜨려 25°C까지 내린다. 혼성결합이 끝난 microtiter plate의 액을 제거하고 다시 한번 DASH buffer로 1:10000으로 희석한 SYBR Green 염색액을 넣고 DASH기기(Hybaid)에 microtiter plate를 넣는다. DASH 기기 내에서 온도를 서서히 상승시켜 Tm을 모니터링하는데 단일가닥 분리 시 혼성결합체에 결합되어 있던 SYBR Green이 분리되면서 나타나는 형광신호는 probe와 template DNA 간의 Tm을 나타낸다(Prince *et al.*, 2001).

통계 분석

유전자형의 빈도를 분석하기 위하여 SPSS10.0 통계 패키지를 사용하였다. SNP의 빈도차이는 X2-test 분석을 통하여 검증하였다.

연구 결과

정상 한국인 100명을 대상으로부터 얻은 말초혈액으로부터 분리한 DNA를 이용하여 hMLH1, hMSH2 및 ATM 유전자들의 단일염기다형성의 빈도를 분석하였다.

ATM 유전자의 단일염기다형성 분석

ATM 유전자의 exon 38(G→A)번 내에 위치한 단일염기다형성과 exon 10(C→G)번 내에 위치한 단일염기다형성의 유전자형의 빈도를 분석하였다.

exon 38(G→A)번 내에 위치한 단일염기다형성의 경우에서는 GG 유전자형이 100명, GA 유전자형과 AA 유전자형은 나타나지 않아 각각 100%, 0%, 0%의 분포를 나타내었고, exon 10(C→G)번 내에 위치한 단일염기다형성의 경우에는 CC 유전자형이 100명, CG 유전자형과 GG 유전자형은 나타나지 않아 각각 100%, 0%, 0%의 분포를 나타내었다(표 3, 표 4).

Table 3. The Single Nucleotide Polymorphisms of ATM gene in exon 38 (G → A)

Gene	Genotype(%)			Total (n=100)
	GG	GA	AA	
ATM	100(100%)	0(0%)	0(0%)	100(100%)

Table 4. The Single Nucleotide Polymorphisms of ATM gene in exon 10 (C → G)

Gene	Genotype(%)			Total (n=100)
	CC	CG	GG	
ATM	100(100%)	0(0%)	0(0%)	100(100%)

Table 5. The Single Nucleotide Polymorphisms of hMLH1 gene in exon 8 (A → G)

Gene	Genotype(%)			Total (n=100)
	AA	AG	GG	
hMLH1	100(100%)	0(0%)	0(0%)	100(100%)

Table 6. The Single Nucleotide Polymorphisms of hMLH1 gene in exon 1 (A → G)

Gene	Genotype(%)			Total (n=100)
	AA	AG	GG	
hMLH1	100(100%)	0(0%)	0(0%)	100(100%)

hMLH1 유전자의 단일염기다형성 분석

hMLH1 유전자의 exon 8(A→G)번 내에 위치한 단일염기다형성과 exon 1(A→G)번 내에 위치한 단일염기다형성의 유전자형의 빈도를 분석한 결과는 표 5, 표 6과 같다.

exon 8(A→G)번 내에 위치한 단일염기다형성과 exon 1(A→G)번 내에 위치한 단일염기다형성 모두 동형접합체(homozygote) 유전자형 AA가 100명으로 나타났고, AG 유전자형과 GG 유전자형은 모두 발현되지 않아 각각 100%, 0%, 0%의 분포를 나타내었다.

hMSH2 유전자의 단일염기다형성 분석

hMSH2 유전자의 exon 14(A→G)번 내에 위치한 단일염기다형성과 promoter 부위에 위치한 단일염기다형성의 유전자형의 빈도를 분석하였다.

hMSH2 유전자의 exon 14(A→G)번 내에 위치한 단일염기다형성을 분석한 결과, AA 유전자형이 100명, AG 유전자형과 GG 유전자형은 한 명도 표현되지 않아 각각 100%, 0%, 0%의 분포를 나타내었다(표 7). 반면 hMSH2 유전자의 promoter 부위(C→T)에 위치한 단일염기다형성의 유전자형은 CC 유전자형이 2명, CT 유전자형이 36명, TT 유전자형이 62명으로 각각 2%, 36% , 62%로 다양한 분포

Table 7. The Single Nucleotide Polymorphisms of hMSH2 gene in exon 14 (A → G)

Gene	Genotype(%)			Total (n=100)
	AA	AG	GG	
hMSH2	100(100%)	0(0%)	0(0%)	100(100%)

Table 8. Single Nucleotide Polymorphisms of hMSH2 gene in a promoter region (C → T)

Gene	Genotype(%)			Total (n=100)
	CC	CT	TT	
hMSH2	2(2%)	36(36%)	62(62%)	100(100%)

를 보였다(표 8).

고 찰

본 연구에서는 DNA 회복 기전에 관여하는 유전자 중 hMLH1, hMSH2, ATM을 선정하여 이들의 genomic DNA 상에 존재하는 SNP의 빈도를 분석하였다.

ATM 유전자의 exon38(G→A)변과 exon10(C→G)변 내에 위치한 SNP의 빈도를 관찰한 결과 연구대상 100명에서 모두 동형접합체(homozygote) 유전자형인 GG와 CC 유전자형으로 나타났다. 일반인을 대상으로 이루어진 연구가 별로 이루어져 있지 않기 때문에 AT환자를 대상으로 이루어진 연구를 비교하여 보면 다음과 같다. HGVBase에 등록된 자료에 따르면 독일인 모세혈관확장성 운동실조증(Ataxia telangiectasia; AT)환자 66명(HGVBase, Population ID: POP000000297)을 대상으로 한 연구에서는 exon 38(G→A) 변의 동일한 부위의 SNP는 동형접합체(homozygote) 유전자형 GG가 82%를 나타냈고, exon 10(C→G)변의 SNP는 동형접합체(homozygote) 유전자형 CC가 99%로 나타났다. 즉 서로 다른 민족을 비교하는 것이 무리는 있지만 정상인과 AT환자의 SNP빈도는 차이가 남을 알 수 있었다.

ATM 유전자는 모세혈관확장성 운동실조증(Ataxia telangiectasia; AT)환자의 세포에서 클로닝 되었다. 염색체 11q22-23에 위치하는 150 kb의 유전자로 66개의 엑손으로 구성되어 있으며 약 13 kb 정도의 전사영역을 갖고 있다(Rotman *et al.* 1998). ATM은 세포주기 checkpoint 활성화, DNA 회복과 아포토시스의 유발 등과 관련된 심각한 수준의 DNA 절단에서 나타나는 세포반응에 관여한다. 또한 특정 타입의 가닥 절단의 감지자의 역할, 자유 라디칼이나 DNA 재조합, DNA 손상 반응에서 핵심적인 조절자 등을 활성화시키고 다신호 연쇄반응(multiple signaling cascade) 등을 전개시킨다(Rotman *et al.* 1998).

이러한 중요한 기능을 가진 ATM 유전자내 DNA손상으로 인해 돌연변이가 일어나면 여러 가지의 질병 특히, 암과 같은 신생종양에 대한 위험도가 wild type의 집단에 비해 상대적으로 높아진다는 연구가 많이 보고 되고 있다(Oppitz *et al.*, 1999, Vorechovsky *et al.*, 1996, Simmons *et al.*, 1995).

hMLH1과 hMSH2 유전자의 SNP의 빈도를 분석하였는데,

hMSH2 유전자의 promoter 부위의 SNP를 제외하고 모두 동형접합체(homozygote) 유전자형으로 분석되었다. hMLH1 유전자의 exon 8(A→G)변과 exon 1(A→G)변 내에 위치한 SNP는 연구대상 100명에서 모두 동형접합체(homozygote) 유전자형 AA로 나타났다. 정상인을 대상으로 이루어진 연구 결과를 알아 볼 수 없었으나 exon 8(A→G)변의 동일한 부위의 SNP의 빈도는 이탈리아의 유전성 비용종증 대장암(hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC) 환자 가족(HGVBase, Population ID; POP000000326)을 대상으로 한 연구에서 AA 유전자형이 67%로 나타나 정상인을 대상으로 한 본 연구 결과인 100%와는 큰 차이를 보여주었다. 또한 exon1(A→G)변의 동일한 부위의 SNP는 미국립보건원(National Institutes of Health; NIH)의 건강보험의(醫)명부에 올라있는 41명(HGVBase, Population ID; POP000001179)을 대상으로 한 연구에서 AA 유전자형이 97.56%를 보여 본 연구 결과와 차이가 났다.

hMSH2 유전자의 exon 14(A→G)변 내에 위치한 SNP 또한 연구대상 100명에서 모두 동형접합체(homozygote) 유전자형 AA로 나타났다. 동일한 부위의 SNP의 빈도는 스코틀랜드와 미국인 중 정상인(HGVBase, Population ID; POP000000458) 71명을 대상으로 한 연구에서 AA 유전자형이 99%로 나타나 본 연구와 비슷하였다.

이렇게 hMLH1, hMSH2 유전자들의 exon 8(A→G), exon 1(A→G) 및 exon 14(A→G)변에서도 ATM 유전자에서와 같이 모두 동형접합체(homozygote) 유전자형 100%의 단일빈도를 보였다.

반면 hMSH2 유전자의 promoter 부위에 존재하는 SNP(C→T)은 CC 유전자형이 2%, CT 유전자형이 36%, TT 유전자형이 62%로 나타났다. 이러한 빈도의 분포는 1998년 Yuki Iwahashi 등이 보고한 일본인을 대상으로 한 연구에서도 건강한 대조군에서는 CC 유전자형이 2.5%, CT 유전자형이 35.7%, TT 유전자형이 61.8%로 나타나 이 부위의 SNP의 유전자형 빈도 분포가 한국인과 일본인이 거의 동일한 양상을 나타내었다. 그러나, HNPCC 환자군에서는 CC 유전자형이 4.0%, CT 유전자형이 8.0%, TT 유전자형이 88.0%로 나타나 일반 대조군의 CT 유전자형에 비해 현저하게 낮았고 TT 유전자형은 높게 분석되었다. 그 결과 환자군이 C 대립유전자(allele)결실이 많기 때문에 HNPCC 환자군의 위험인자 분석 연구 시에 생물학적 표지자(biomarker)가 될 수 있음을 보고하였다. Shin 등(2002)의 연구에서도 HNPCC 환자군에서 CC 유전자형이 0%, CT 유전자형이 30-40%, TT 유전자형이 60-70%로써 대조군에 비하여 C 대립유전자 결실이 많은 것으로 보고 되었다.

또한 프로모터(promoter) 부위는 비록 protein-coding 부

위는 아니지만 유전자의 전사 조절이 이루어지는 부위이기 때문에 이 부위 SNP의 특성을 파악하는 것도 중요하다고 할 수 있다. Iwahashi(1998) 등은 hMLH1과 hMSH2 유전자의 돌연변이가 HNPCC의 발병의 원인에 상당부분 차지하지만 이 유전자들의 protein-coding 부위에 아무런 변이가 나타나지 않는 환자들도 있는데, 이러한 경우 이러한 유전자의 전사의 결손이 그 원인이 될 수 있다고 하였다. 또한 프로모터 부위의 점돌연변이는 유전적인 망막아(세포)종(retinoblastoma)을 유발한다는 연구를 제시하여 유전자들의 전사 조절 부위의 구조를 명확히 하는 것이 중요하다고 주장하였다.

본 연구는 정상인을 대상으로 수행되었으며 타민족의 정상인을 대상으로 수행된 결과와 대체로 비슷하였으나 약간의 차이를 찾아 볼수 있었는데 이러한 이유로서 분석대상이 된 SNP부위가 각 민족 고유한 형태의 변이가 나타났기 때문이었을 가능성을 배제할 수는 없지만 더 큰 집단을 대상으로 하는 추후의 연구가 필요하다.

일반적으로 게놈 다형성의 주요 관심사는 인구집단의 유전적 특징, 의학의 발달, 법의학, 암 및 유전적 질환의 연구에 있다. SNP는 인간집단 내에서 정상인 개인 내에 존재하는 게놈 DNA의 서로 다른 단일염기를 나타내는 것으로 최소 1%이상의 빈도를 나타내는 것이다. 그러나 보통 단일염기 삽입(insertion)이나 결실(deletion)과 같은 변이(indels)는 SNP에 포함시키지 않는다. 이론적으로 SNP는 bi-, tri-, 또는 tetra-allelic(대립유전자) 다형성을 나타내지만 인간에 있어서 tri-allelic과 tetra-allelic SNPs는 매우 드물고, 보통 bi-allelic(di-allelic) 다형성만을 보이고 있어 흔히 SNP는 bi-allelic 다형성의 하나로 간주되어지고 있다. 또한 게놈상의 DNA 변이의 근원적인 것을 반영할 것이므로 보통 SNP는 cDNAs 상의 단일염기변이(cSNPs)로 분류한다(Brookes *et al.* 1999).

SNP는 돌연변이율이 낮고, 인체 게놈 상에서의 발생 빈도가 높아 고효율 유전자형 분석(high-throughput genotyping)에 매우 유용하다. 따라서 physical mapping 및 genetic mapping을 위한 표지자로서 사용될 수 있으며 최근에는 복잡한 유전적 특질을 연구하기 위한 표지자로서 각광 받고 있다. 이론적인 모델에 따르면, '연관 불균형(Linkage Disequilibrium)' 현상에 기초하여 병에 걸린 집단과 병에 걸리지 않은 대조군 집단 사이에 유전자형을 비교할 경우 특정 유전자형이 병에 걸린 집단의 유전자형과 연관성이 보여지게 되는데, 이러한 현상의 연구를 통하여 특정 질병과 연관된 돌연변이 근처에 표지자를 mapping할 수 있게 됨으로써 질병과 관련된 유전자를 발견하는 연구를 수행할 수 있게 된다(Kwok *et al.* 1999). 또한 복잡한 유전적 특질중의

하나인 특정약물에 대한 반응성도 각개인의 SNP에 따라서 다르게 나타나므로 SNP는 궁극적으로 각 개인의 유전자형에 따른 최적의 약물을 개발하고 투여하는 것을 목표로 하는 'Pharmacogenomics'라는 신생학문의 발생 토대가 되었다(Kwok *et al.* 1999).

이제 SNP는 질병과 궁극적으로 개인에게 맞는 진단과 치료를 하는데 이용되리라는 기대로 많은 관심을 끌게 되었고, 이것을 개발하고 이용하는 데에는 고효율성의 신뢰도와 정확도가 높은 자동화된 스코어링 방법이 필요하게 되었다.

본 연구에서 SNPs를 분석하기 위하여 사용한 방법인 DASH(dynamic allele-specific hybridization) 기법은 W. Mathias Howell 등이 allele-specific oligonucleotide hybridization (ASOH)의 원리를 바탕으로 한 최신의 SNP 스코어링 방법으로서 1999년 소개하였다. 이 방법은 SNP를 포함하는 특정 부위만을 50-70bp 크기로 증폭하여 SNP의 단일염기만을 인지하여 다중의 올리고 뉴클레오티드 소식자(probe)를 반응시킴으로써 ASOH보다 신뢰할 만한 방법이라고 할 수 있다.

DASH의 핵심은 역동적인 가열과 DNA의 변성(denaturation)을 순간적으로 모니터링하는 것이다. 이 방법에는 부가적인 효소나 반응의 단계가 포함되지 않는다. DASH는 ASOH의 간단성을 내포하고 있으면서도 표준화된 반응 조건을 사용함으로써 모든 SNP 변이 여부의 모호한 차이를 구별해 낼 수 있는 특징이 있다(Howell *et al.* 1999).

과거 역학연구를 통한 SNP의 동정에 대한 접근은 대체적으로 역학조사를 통하여 선정된 후보자 유전자의 다형성을 동정하는 방식이었고 생물학적 개념의 가설에 따라 검증되거나 이미 알려진 기능적인 표현형 효과에 영향을 미치는 SNP에 비중을 두었다(Hemminki *et al.* 2002). 그러나 이제는 유전적 위험요소를 반영하는 SNP를 동정하기 위해 다방면의 접근이 시도되어야 할 것이다. 또한 연구대상의 나이, 성별, 인종, 생활방식 및 노출(exposure) 등의 층화된 정보들을 바탕으로 유전자-유전자간, 유전자-환경간의 상호작용을 밝힘으로써 새로운 SNP가 검증되어지고 이들의 연관성이 밝혀짐에 따라 이러한 연구들은 역학연구결과에 대한 해석과 풀이의 단서가 될 수 있을 것이다(Hemminki *et al.* 2002).

참고문헌

- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M. and Garewal, H. (2002): DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **511**(2), 145-178.
- Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. *Gene*, **234**(2), 177-186.
- Han, H.J., Maruyama, M., Baba, S., Park, J.G. and Nakamura, Y.

- (1995): Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum. Mol. Genet.*, **4**(2), 237-242.
- Han, H.Y., Yuan, Y., Ku, J.L. and Park, J.G. (1998): Germline Mutations of hMLH1 and hMSH2 Genes in Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *J. of the Natl. cancer institute*, **88**(18), 1317-1319.
- Hemminki, K. and Shields, P.G. (2002): Skilled use of DNA polymorphisms as a tool for polygenic cancers. *Carcinogenesis*, **23**(3), 379-80.
- Howell, W.M., Jobs, M., Gyllensten, U. and Brookes, A.J. (1999): Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat. Biotechnol.*, Jan; **17**(1), 87-88.
- Iwahashi, Y., Ito, E., Yanagisawa, Y., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Onodera, T. and Maruyama, K. (1998): Promoter analysis of the human mismatch repair gene hMSH2. *Gene*, **213**(1-2), 141-147.
- Kwok, P.Y. and Gu, Z. (1999): Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Molecular Medicine Today*, **5**(12), 538-543.
- Ma, X., Jin, Q., Forsti, A., Hemminki, K. and Kumar, R. (2000): Single nucleotide polymorphism analyses of the human proliferating cell nuclear antigen (pCNA) and flap endonuclease (FEN1) genes. *International Journal of Cancer*, **88**, 938-942.
- Millar, A.L., Pal, T., Madlensky, L., Sherman, C., Temple, L., Mitri, A., Cheng, H., Marcus, V., Gallinger, S., Redston, M., Bapat, B. and Narod, S. (1999): Mismatch repair gene defects contribute to the genetic basis of double primary cancers of the colorectum and endometrium. *Hum. Mol. Genet.*, **8**(5), 823-9.
- Oppitz, U., Bernthaler, U., Schindler, D., Soback, A., Hoehn, H., Platzer, M., Rosenthal, A. and Flentje, M. (1999): Sequence analysis of the ATM gene in 20 patients with RTOG grade 3 or 4 acute and/or late tissue radiation side effects. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **44**(5), 981-8.
- Park, J.G. and Yuan, Y. (1998): Genetic identification and management of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, **12**, 947-955.
- Peltomaki, P. (2001): DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Research*, **488**(1), 77-85.
- Prince, J.A., Feuk, L., Howell, W.M., Jobs, M., Emahazion, T., Blennow, K. and Brookes, A.J. (2001): Robust and accurate single nucleotide polymorphism genotyping by dynamic allele-specific hybridization (DASH): design criteria and assay validation. *Genome Res.*, **11**(1), 152-62.
- Ronen, A. and Glickman, B.W. (2001): Human DNA repair genes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **37**(3), 241-83.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1998): ATM: from gene to function. *Human Molecular Genetics*, **7**(10), 1555-1563.
- Shiloh, Y. (2001): ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development*, **11**, 71-77.
- Shin, K.H., Shin, J.H., Kim, J.H. and Park, J.G. (2002): Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the hMSH2 gene. *Cancer Res*, **62**(1), 38-42.
- Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.J., Taylor, A.R., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S. and Shiloh, Y. (1995): A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science*, **268**(5218), 1749-1753.
- Smigielski, E.M., Sirotkin, K., Ward, M. and Sherry, S.T. (2000): dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids. Res.*, **28**(1), 352-5.
- The International SNP Map Working Group (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**(15), 928-933.
- Viel, A., Genuardi, M., Capozzi, E., Leonardi, F., Bellacosa, A., Paravatou-Petsotas, M., Pomponi, M.G., Fornasari, M., Percecsepe, A., Roncucci, L., Tamassia, M.G., Benatti, P., Ponz de Leon M., Valenti, A., Covino, M., Anti, M., Foletto, M., Boiocchi, M. and Neri, G. (1997): Characterization of MSH2 and MLH1 mutations in Italian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Genes, Chromosomes and Cancer*, **18**(1), 8-18.
- Vorechovsky, I., Rasio, D., Luo, L., Monaco, C., Hammarstrom, L., Webster, A.D., Zaloudik, J., Barbanti-Brodani, G., James, M. and Russo, G. (1996): The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res.*, **56**(12), 2726-32.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E. and Glickman, B.W. (1999): Human DNA repair systems: An overview. *Environ. Mol. Mutagen.*, **33**(1), 3-20.
- 박영진, 박규주, 강구정, 김광연, 김성, 김영진, 김정용, 김진복, 김진천, 오남진, 윤충, 이기형, 최국진, 박재갑 (1998): 한국인의 유전성 비용종증 대장암의 임상적 특징. *대한대장항문학회지*, **14**(1), 1-9.