

한국인에서 HLA 유전자 부위 내 Microsatellite 표지자의 분포와 HLA 대립유전자의 유전적 연관성

가톨릭대학교 의과대학 ¹미생물학교실, ²가톨릭조혈모세포은행, ³가톨릭조혈모세포이식센터

장정필¹ · 최은정² · 윤호열² · 최희백² · 김희제³ · 조병식³ · 민우성³ · 이종욱³
김춘추³ · 김태규^{1,2}

Distributions of HLA Microsatellite Markers and the Linkage Disequilibria between HLA and Microsatellites in Koreans

Jung-Pil Jang¹, Eun-Jeong Choi², Ho-Yeul Yoon², Hee-Baeg Choi², Hee-Je Kim³,
Byung-Sik Cho³, Woo-Sung Min³, Jong-Wook Lee³, Chun-Choo Kim³ and Tai-Gyu Kim^{1,2}

¹Department of Microbiology, ²Catholic Hematopoietic Stem Cell Bank, ³Catholic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: The microsatellites within human leukocyte antigen (HLA) region show considerable polymorphism and strong linkage disequilibrium (LD) with HLA alleles. These microsatellites have been used for genetic analysis including disease mapping to understand susceptibility to autoimmune and infectious diseases. Also, use of microsatellites has recently been proposed as an approach for identifying non-HLA markers within the HLA region that could function as transplantation determinants and for the selection of potential donors for transplantation. **Methods:** To analyse the frequency of five microsatellites in the Korean population, genotyping for polymorphisms at five microsatellites markers (BAT2, MIB, DQCAR, D6S105 and TNFD) within HLA region was performed on 143 healthy Korean controls. **Results:** The most frequent genotype shown in healthy Korean controls were BAT2 8 (153 bp, 42.7%), MIB 1 (326 bp, 40.6%), DQCAR 3 (188 bp, 38.5%), D6S105 7 (126 bp, 58.0%) and TNFD 3 (128 bp, 58.0%). And common two-loci haplotypes were found as MIB 1-HLA-B*62 (HF: 10.6%), MIB 6-HLA-B*44 (HF: 7.8%), DQCAR 3-HLA-DRB1*13 (HF: 8.5%), TNFD 5-HLA-B*62 (HF: 7.8%) and D6S105 7-HLA-A*02 (HF: 16.2%). **Conclusion:** These data might provide useful information on the microsatellites markers with HLA region in Korean population and be helpful in further defining the clinical impact of these microsatellites. (*Immune Network* 2007;7(3):149-157)

Key Words: Linkage disequilibria, Microsatellite, Human leukocyte antigen (HLA), Graft-versus-host- disease (GVHD)

서 론

지난 20년 동안 많은 연구가 이루어지고 있는 짧은 계승DNA 염기의 직렬 반복 또는 짧은 연쇄반복 염기 서열(short tandem repeats, STR)은 미소위성체(microsatellite) 또는 가변반복서열(variable number of tandem re-

peats, VNTR)로도 알려져 있다(1-10). Microsatellite는 2~6개의 염기가 반복된 것으로 반복 횟수에 의해 유전적 다형성이 특징지어지고 이러한 microsatellite들은 HLA유전자 부위에 250개 이상이 존재하고 있으며 유전자지도(gene mapping)와 일배체형(haplotype)의 유전적 분석에 있어서 표지자(marker)로 사용되고 있다(11). 또한 Foissac는 주 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)내 microsatellite가 사람의 조직적합성항원(human leukocyte antigen, HLA)의 다형성(polymorphism)과 강한 연쇄불평형(linkage disequilib-

책임저자 : 김태규, 가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 137-701, 서울특별시 서초구 반포동 505번지
Tel: 02-5900-1216, Fax: 02-3476-7355
E-mail: kimtg@catholic.ac.kr

rium, LD)을 나타낸다고 보고하였고(5,7), Malkki등은 HLA와 microsatellite의 연쇄불평형에서 HLA-A와D6S 265, HLA-A와 D6S510, HLA-B와 D6S2810, HLA-B와 D6S2811, HLA-DRB1과 D6S2883, HLA-DRB1과 D6S 2876, HLA-DQB1과 D6S2876등이 가장 강한 연쇄불평형을 나타내고 microsatellite가 HLA 좌위와 가까울수록 연쇄불평형이 더 높아진다고 보고하였다(6). 또한 최근에는 microsatellite를 HLA를 대신하여 이식이 가능한 공여자를 선택하기 위한 이식결정 인자로써 사용될 수 있는 방안을 연구하고 있다(1).

이러한 MHC 부위의 microsatellite는 자가면역과 감염성 질병의 민감성 그리고 MHC내 재조합 부위를 확인할 수 있는 유전적 표지자로 오랫동안 사용되었다(6). Inoko등은 HLA유전자의 microsatellite가 건선(psoriasis vulgaris), 베체트 증후군(Behcet's syndrome), 류마티스관절염(rheumatoid arthritis), 미만성세기관지염(diffuse panbronchiolitis), 무정자증(azoospermia), 흑색종이 아닌 피부암(non-melanoma skin cancer)등과 같은 HLA와 연관된 여러 가지 질병의 표지자로서 적용된다고 보고하고 있다(11). 또한 국내에서도 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus)등이 HLA유전자내 microsatellite와 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다(12). 또한 최근 HLA 유전자 부위의 몇몇 microsatellite는 비혈연간 조혈모세포이식 시 백혈병의 재발과 생존률, 이식편대 숙주반응(graft-versus-host disease, GVHD)과 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다. 미국의 Malkki등은 MHC class III 표지자인 BAT2 (CA)와 MIB, class I 표지자인 D6S105가 공여자-환자 사이에서 불일치하면 사망률이 증가한다고 보고하면서 비혈연간 조혈모세포이식 시 MHC 내 microsatellite 일치 여부의 중요성도 강조하였으며(1), 우리나라와 HLA 가 유사한 일본에서는 DQCAR II, MIB, MICA, C1-3-1, D6S 510, TNFa, TNFd, D6S273, C3-2-11, C5-3-1, C5-4-5, C5-2-7 그리고 D6S265에 관한 연구가 이루어졌고 이중 TNF α 가 조혈모세포 이식 후 생존률과 연관성이 있다고 보고되고 있다(11). 그리고 Kikuchi등은 선천성 유전질환과 많은 연관성이 있는 것으로 보고된 22번째 염색체 내에 존재하는 155종류의 microsatellite를 분석하여 D22S0141i, D22S0021i, D22S0199i, D22S0222i microsatellite의 불일치가 급성 이식편대숙주반응과 연관성이 있음을 보고 하였다(13).

따라서 본 연구에서는 HLA 유전자부위 내에서 조혈모세포 이식 후 질병과 연관성이 있는 HLA 내 microsatellite 5종류 (DQCAR, D6S105, BAT2, MIB, TNFd)에 대하여 한국인에서의 분포와 HLA 대립유전자와의 유전적 연관성을 규명하였다.

재료 및 방법

실험대상. 본 연구의 대상은 가톨릭대학교 의과대학에 재학 중인 학생과 교직원 중 정상 한국인 143명을 대상으로 하였다. 본 연구는 모든 연구 대상으로부터 유전체 연구를 위한 동의서와 가톨릭대학교 윤리위원회로부터 심의를 받았다.

DNA추출. DNA의 추출은 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer coporation, Daejeon, Korea)를 이용하여 이루어졌으며 이를 요약하면 다음과 같다. 혈액 1 ml에서 적혈구용해용액(RBC lysis buffer)을 이용하여 림프구를 분리한 후 이를 인산완충용액(PBS) 200 μ l에 현탁 시켰고 proteinase K (20 μ g/ml) 20 μ l와 binding buffer (GC) 200 μ l를 첨가하여 60°C에서 10분 동안 반응 시켰다. 반응이 끝나면 isopropanol을 100 μ l 첨가해 주고 이 반응액을 binding column으로 옮겨준 후 washing buffer (W1, W2)를 이용하여 세척하였다. 세척된 column에 증류수를 200 μ l 넣어준 후 원심분리 시켜 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정 한 후 100 ng/ μ l의 농도로 하여 microsatellite 유전자형을 분석하기 위한 PCR의 주형으로 사용하였다.

Microsatellite 대립유전자에 대한 클로닝 및 염기서열 분석. 각 microsatellite에 대한 primer (Table I)의 최종 농도가 1 μ M이 되도록 사용하였으며, 이들 primer와 100 ng/ μ l DNA, 0.25 U/ μ l Taq polymerase (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea), 10X PCR buffer (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea), 2.5 mM dNTP, 증류수를 혼합하여 총 volume이 50 μ l가 되도록 하였다. 유전자 증폭은 유전자증폭기기(PCR machine: my cyclor; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 D6S105: 94°C

Table I. The sequence of primers for genotyping of D6S105, DQCAR, BAT2, MIB and TNFd microsatellite

| Microsatellite | Dye | Primer sequences (5' → 3') |
|----------------|-----|---|
| D6S105 | TET | F: GCCCTATAAAAATCCTAATTAAC R: GAAGGAGAATTGTAATCCG |
| DQCAR | FAM | F: GCATTTCTCTTCCTTATCACTTC R: GTGTTTGAGAGGTGTGCATG |
| BAT2 | FAM | F: CTCCAGCCTGGATAACAG R: ACAAGGGCTTTAGGAGGTCT |
| MIB | HEX | F: CTACCATGACCCCTTCCCC R: CCACAGTCTCTATCAGTCCA |
| TNFd | FAM | F: AGATCCTTCCCTGTGAGTTCTGCT R: CATAGTGGACTCTGTCTCCAAAG |

8분/ 94°C 15초, 56°C 15초, 72°C 30초를 35회 반복/72°C 10분; DQCAR, TNFd: 95°C 5분/95°C 30초, 59°C(DQCAR), 63°C(TNFd) 30초, 72°C 1분을 35회 반복/72°C 10분; BAT2: 94°C 5분/94°C 30초, 65°C 30초, 72°C 40초를 35회 반복/72°C 10분 ; MIB: 95°C 40초/95°C 20초, 67°C 1분을 30회 반복/72°C 10분의 조건으로 시행하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동하여, geneclean Turbo kit (Qbiogene, Inc, Carlsbad, California)으로 gel extraction 하였다. 그 후 T&A Cloning Vector Kit (RBC, Taipei, Taiwan)를 이용하여 cloning한 후 5개 이상의 colony를 선택하여 DNA를 분리하고 분리된 DNA를 주형으로 하여 95°C 5분/95°C 30초, 65°C 1분, 72°C 2분을 25회 반복/72°C 10분에서 증폭시켰다. 증폭시킨 PCR 증폭산물을 Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 염기분석하고, 각각에 대한 대립유전자형을 확인하였다.

Microsatellite 유전자형별. 다형성이 있는 microsatellite 좌위의 반복 수를 결정하기 위해 forward primer의 5'끝에 형광물질 6-FAM, HEX 또는 TET (Applied Biosystems, FosterCity, CA)를 표지하여 PCR primer로 사용하였다. Microsatellite 각각의 primer (forward, reverse)를 최종 농도가 0.5 pmol/μl이 되도록 사용하였으며, 이들 primer와 100 ng/μl DNA, 0.25 U/μl Taq polymerase (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea), 10X PCR buffer(Intron Biotechnology, Seongnam, Korea), 2.5 mM dNTP, 증류수를 혼합하여 총10 μl가 되도록 하였다. 유전자증폭기기(my cycler; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 D6S105: 94°C 8분/ 94°C 15초, 56°C 15초,

72°C 30초를 35회 반복/72°C 30분; DQCAR: 95°C 5분/95°C 30초, 59°C 30초, 72°C 1분을 35회 반복/72°C 30분; BAT2: 94°C 5분/94°C 30초, 65°C 30초, 72°C 40초를 35회 반복/72°C 30분; MIB: 95°C 40초/95°C 20초, 67°C 1분을 30회 반복/ 72°C 30분; TNFd: 95°C 5분/95°C 30초, 63°C 30초, 72°C 1분을 35회 반복/72°C 30분의 조건으로 PCR을 시행 하였다. 증폭된 DNA를 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 증폭산물을 확인하고, PCR 증폭산물에 formamide와 size standard marker인 GS500 Tamra (Applied Biosystems) 그리고 loading dye를 혼합한 뒤 95°C에서 5분 동안 변성 시켰다. 이렇게 변성된 증폭산물을 8M urea가 포함된 6% polyacrylamide denaturing sequencing gel을 이용하여 ABI 377 DNA sequencer(Applied Biosystems)에서 900V, 3시간 동안 전기영동 하였다. DNA 분절의 길이를 분석 하기 위해 GENESCAN 672(ver. 2.1) software를 사용하였고 GENOTYPER (ver.2.0) software를 사용하여 유전자형별을 하였다 (Fig. 1).

자료 분석. 검사 결과의 통계적 유의성은 대상이 5예 이상인 경우는 chi-square 검정으로 시행하였고, 5예 미만인 경우는 2-tailed Fisher's exact test를 이용하였다. 또한 p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다. 5종류 microsatellite의 연쇄불평형(linkage disequilibrium, LD)값을 구하기 위한 공식은 $LD = a - (b \times c \times d \times e \times f)$ 으로 a값은 haplotype frequency이고 b, c, d, e, f값은 각각의 microsatellite 대립유전자 빈도이다. 연쇄불평형값은 0에서 1까지의 범위로 1에 가까울수록 연쇄불평형을, 0에 가까울수록 연쇄균형을 나타낸다.

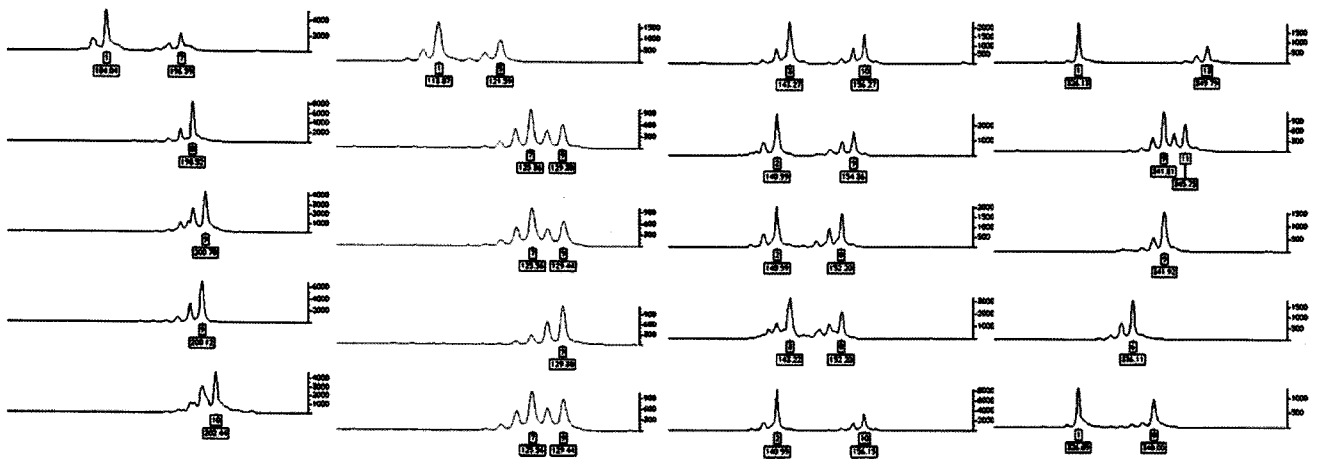


Figure 1. The GeneScan electropherogram of five microsatellites (DQCAR, D6S105, BAT2, MIB, TNFd).

Table II. The genotype frequencies of five microsatellites alleles in Korean population (n=143)

| Allele | BAT2 | | MIB | | DQCAR | | D6S105 | | TNFd | |
|--------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
| | Size bp | GF n (%) | Size bp | GF n (%) | Size bp | GF n (%) | Size bp | GF n (%) | Size bp | GF n (%) |
| 0 | 137 | 0 (0) | 324 | 0 (0) | 182 | 4 (2.8) | 112 | 0 (0) | 122 | 2 (1.4) |
| 1 | 139 | 2 (1.4) | 326 | 58 (40.6) | 184 | 3 (2.1) | 114 | 23 (16.1) | 124 | 18 (12.6) |
| 2 | 141 | 58 (40.6) | 328 | 0 (0) | 186 | 0 (0) | 116 | 0 (0) | 126 | 4 (2.8) |
| 3 | 143 | 44 (30.8) | 330 | 0 (0) | 188 | 55 (38.5) | 118 | 3 (2.1) | 128 | 83 (58.0) |
| 4 | 145 | 1 (0.7) | 332 | 17 (11.9) | 190 | 0 (0) | 120 | 36 (25.2) | 130 | 29 (20.3) |
| 5 | 147 | 13 (9.1) | 334 | 1 (0.7) | 192 | 20 (14.0) | 122 | 4 (2.8) | 132 | 57 (39.9) |
| 6 | 149 | 1 (0.7) | 336 | 51 (35.7) | 194 | 1 (0.7) | 124 | 11 (7.7) | 134 | 1 (0.7) |
| 7 | 151 | 2 (1.4) | 338 | 0 (0) | 196 | 24 (16.8) | 126 | 83 (58.0) | 136 | 18 (12.6) |
| 8 | 153 | 61 (42.7) | 340 | 9 (6.3) | 198 | 45 (31.5) | 128 | 13 (9.1) | 138 | 2 (1.4) |
| 9 | 155 | 16 (11.2) | 342 | 16 (11.2) | 200 | 24 (16.8) | 130 | 30 (21.0) | 140 | 1 (0.7) |
| 10 | 157 | 28 (19.6) | 344 | 15 (10.5) | 202 | 21 (14.7) | 132 | 23 (16.1) | 142 | 2 (1.4) |
| 11 | 159 | 2 (1.4) | 346 | 51 (35.7) | 204 | 3 (2.1) | 134 | 3 (2.1) | 144 | 1 (0.7) |
| 12 | 161 | 7 (4.9) | 348 | 18 (12.6) | 206 | 5 (3.5) | 136 | 2 (1.4) | 146 | 0 (0) |
| 13 | 163 | 1 (0.7) | 350 | 5 (3.5) | 208 | 3 (2.1) | 138 | 0 (0) | 148 | 0 (0) |
| 14 | 165 | 0 (0) | 352 | 4 (2.8) | 210 | 1 (0.7) | 140 | 0 (0) | 150 | 0 (0) |
| 15 | 167 | 0 (0) | 354 | 0 (0) | 212 | 0 (0) | 142 | 0 (0) | 152 | 0 (0) |
| 16 | 169 | 0 (0) | 356 | 3 (2.1) | 214 | 0 (0) | 144 | 0 (0) | 154 | 0 (0) |
| 17 | 171 | 0 (0) | 358 | 2 (1.4) | 216 | 0 (0) | 146 | 0 (0) | 156 | 0 (0) |

GF: genotype frequency

결 과

정상 한국인에서 BAT2, MIB, DQCAR, D6S105, TNFd microsatellite의 빈도. 정상 한국인 143명에 대한 BAT2, MIB, DQCAR, D6S105, TNFd 대립유전자 형별검사 결과 BAT2에서 13종류, MIB에서 13종류, DQCAR에서 13종류, D6S105에서 11종류, TNFd에서 12종류의 대립유전자가 확인되었다. 각각의 대립유전자 유전자형 빈도는 BAT2에서 BAT2 8 (42.7%), BAT2 2 (40.6%), BAT2 3 (30.8%), BAT2 10 (19.6%), MIB에서 MIB 1 (40.6%), MIB 6 (35.7%), MIB 11 (35.7%), MIB 12 (12.6%), DQCAR에서 DQCAR 3 (38.5%), DQCAR 8 (31.5%), DQCAR 7 (16.8%), DQCAR 9 (16.8%), D6S105에서 D6S105 7 (58.0%), D6S105 4 (25.2%), D6S105 9 (21.0%), D6S105 1 (16.1%), TNFd에서 TNFd 3 (58.0%), TNFd 5 (39.9%), TNFd 4 (20.3%), TNFd 1 (12.6%) 순이었다 (Table II).

또한 한국인과 다른 인종간의 microsatellite 빈도를 비교하면, BAT2는 일본인과 비교 결과 한국인과 유사한 빈도를 나타내었다. 즉, microsatellite BAT2는 BAT2 8 (153 bp)과 BAT2 2 (141 bp)에서 가장 높은 빈도를 나타내었다. 그리고 DQCAR은 코카시안종과 아프리카계 미국흑인과의 비교 결과 한국인에서는 빈도가 나타나지 않았던 DQCAR 4 (190 bp, 0%)에서 가장 높은 빈도(38.8%, 47.1%)로 유의하게 증가하였고(p

$< 1.0 \times 10^{-10}$), 크로아티아인에서는 DQCAR 2 (186 bp, 41.5%)에서 가장 높은 빈도로 한국인에 비해 유의하게 증가(p $< 3.3 \times 10^{-9}$)하는 동시에 한국인에서 가장 높은 빈도를 나타낸 DQCAR 3 (188 bp, 23.4%)에서 가장 낮은 빈도(0.4%)로 유의하게 감소하는 차이를 보였다(p $< 1.0 \times 10^{-10}$). 또한 D6S105는 칠레인과 오스트레일리아인과의 비교 결과 한국인에서 D6S105 7 (126 bp, 41.3%)이 높은 빈도로 칠레인과 오스트레일리아인에 비해 유의하게 증가하였고(p $< 1.0 \times 10^{-4}$), 칠레인과 오스트레일리아인에서는 고른 분포를 보였지만 D6S105 8 (128 bp)에서 각각 가장 높은 32.2%와 37.0%의 빈도로 한국인에 비해 유의하게 증가하였다(p $< 1.0 \times 10^{-4}$). TNFd는 한국인에서 높은 빈도를 나타낸 TNFd 3 (128bp, 42.3%)에서 가장 높은 빈도로 크로아티아인과 코카시안에 비해 유의하게 증가한 (p $< 1.0 \times 10^{-4}$) 반면 크로아티아인(56.6%)과 코카시안(51.4%)에서는 TNFd 4 (130 bp)에서 가장 높은 빈도로 한국인에 비해 유의하게 증가하였고(p $< 1.0 \times 10^{-4}$), TNFd 5 (132 bp)에서는 세 인종 모두 두 번째로 높은 빈도를 나타내었다 (Table III).

Microsatellite 간의 일배체형과 연쇄불평형. BAT2-MIB-TNFd-D6S105-DQCAR 대립유전자 사이의 통계적으로 유의한 일배체형은 Table IV와 같다. 즉 BAT2-MIB-TNFd-D6S105-DQCAR 사이에는 221 종류의 일배

Table III. Comparison of allele frequencies at four microsatellites among Korean population and other populations

| Allele | BAT2 alleles | | | DQCAR alleles | | | D6S105 alleles | | | TNFD alleles | | | | |
|-------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--|-----------------------------------|----------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | Korean (%) (n=143) | Japanese ^a (%) (n=85) | Korean (%) (n=143) | Korean (%) (n=143) | African ^c American (%) (n=35) | croatian ^d (%) (n=135) | Allele | Korean (%) (n=143) | Chilean ^e (%) (n=59) | Australian ^f (%) (n=82) | Allele | Korean (%) (n=143) | croatia ^g (%) (n=152) | Caucasian ^h (%) (n=109) |
| 1 (139 bp) | 1.0 | 0.0 | 2.1 | - | - | 10.7 | 1 | 8.4 | 0.0 | 0.6 | 0 | 0.7 | - | - |
| 2 (141 bp) | 26.6 | 28.8 | 1.4 | - | 0 | 0 | 2 (114 bp) | 0 | 3.4 | 0.6 | 1 (122 bp) | 6.3 | 3.0 | 0.5 |
| 3 (143 bp) | 17.1 | 15.3 | 0.0 | 12.9 | 41.5 [†] | 41.5 [†] | 3 (116 bp) | 1 | 0.6 | 1.2 | 2 (124 bp) | 2.1 | 5.3 | 16.2 |
| 4 (145 bp) | 0.3 | 0.6 | 23.4 | - | 0.4 [†] | 0.4 [†] | 4 (118 bp) | 12.9 | 3.4 | 1.2 | 3 (126 bp) | 42.3* | 2.6 | 5.1 |
| 5 (147 bp) | 5.2 | 1.2 | 0.0 | 47.1 [†] | 11.9 | 11.9 | 5 (120 bp) | 1.7 | 5.1 | 1.2 | 4 (128 bp) | 15.4 | 56.6* | 51.4* |
| 6 (149 bp) | 0.3 | 0.0 | 8.7 | 1.4 | 0.4 | 0.4 | 6 (124 bp) | 5.6 | 11.0 | 12.0 | 5 (130 bp) | 23.4 | 21.7 | 22.7 |
| 7 (151 bp) | 1.4 | 1.2 | 0.3 | 1.4 | 11.9 | 11.9 | 7 (126 bp) | 41.3* | 19.5 | 7.0 | 6 (132 bp) | 0.3 | 10.0 | 2.3 |
| 8 (153 bp) | 27.3 | 28.8 | 14.0 | - | 3.3 | 3.3 | 8 (128 bp) | 5.9 | 32.2* | 37.0* | 7 (134 bp) | 6.3 | 0.9 | 1.9 |
| 9 (155 bp) | 6.3 | 4.1 | 23.4 | 5.7 | 0 | 0 | 9 (130 bp) | 12.6 | 9.3 | 18.0 | 8 (136 bp) | 1.0 | - | 0.0 |
| 10 (157 bp) | 10.8 | 6.5 | 11.9 | 8.6 | 5.9 | 5.9 | 10 (132 bp) | 8.7 | 6.8 | 11.0 | 10 (138 bp) | - | - | - |
| 11 (159 bp) | 0.7 | 1.8 | 10.1 | 1.4 | 5.6 | 5.6 | 11 (134 bp) | 1 | 2.5 | 7.0 | 11 (138 bp) | - | - | - |
| 12 (161 bp) | 2.4 | 11.8 | 1.0 | 17.2 | 13.7 | 13.7 | 12 (136 bp) | 0.7 | 4.2 | 4.0 | 12 (136 bp) | - | - | - |

a: Hashimoto et al. (1999), b, c: Macaubas et al. (1995), d: Grubic et al. (2000), e: Blanco et al. (2003), f: Jazwinska et al. (1993), g: Grubic et al. (2006), h: Kim et al. (2000), * $p < 1.0 \times 10^{-4}$; [†] $p < 3.3 \times 10^{-9}$; [‡] $p < 1.0 \times 10^{-10}$.

Table IV. Analysis of five-locus haplotypes among five microsatellites within the HLA region in Korean population (n=143, HF>1.0, p<0.01)

| Microsatellite markers | | | | | HF (%) | LD |
|------------------------|-----|------|--------|-------|--------|-----|
| BAT2 | MIB | TNFd | D6S105 | DQCAR | | |
| 8 | 6 | 3 | 7 | 3 | 3.0 | 2.8 |
| 3 | 6 | 4 | 4 | 3 | 2.1 | 2.1 |
| 2 | 1 | 5 | 7 | 10 | 2.1 | 2.0 |
| 8 | 11 | 3 | 7 | 8 | 1.7 | 1.5 |
| 3 | 6 | 3 | 7 | 8 | 1.4 | 1.3 |
| 5 | 8 | 3 | 7 | 3 | 1.4 | 1.4 |
| 2 | 9 | 3 | 7 | 9 | 1.4 | 1.4 |
| 3 | 6 | 3 | 4 | 3 | 1.0 | 1.0 |
| 10 | 1 | 5 | 7 | 7 | 1.0 | 1.0 |
| 8 | 11 | 3 | 9 | 9 | 1.0 | 1.0 |
| 2 | 6 | 4 | 9 | 8 | 1.0 | 1.0 |
| 8 | 6 | 3 | 8 | 3 | 1.0 | 1.0 |
| 9 | 1 | 5 | 9 | 7 | 1.0 | 1.0 |

HF: haplotype frequency, LD: linkage disequilibria

체형이 존재하고 이중 13종류가 1%이상의 빈도를 나타내었다. 특히 BAT2 8-MIB 6-TNFd 3-D6S105 7-DQCAR 3 (HF: 3.0%, LD: 2.8)과 BAT2 4-MIB 6-TNFd 4-D6S105 4-DQCAR 3 (HF: 2.1%, LD: 2.1)이 가장 높은 빈도를 나타내었다.

HLA 유전자와 Microsatellite 간의 일배체형과 연쇄불평형. 각각의 HLA 유전자(HLA-A, B, DR)에 근접해 있는 microsatellite(D6S105, MIB, BAT2, TNFd, DQCAR)간 일배체형과 연쇄불평형을 확인하였다(Table V). 그 결과 D6S105 와 HLA-A에서 52종류의 일배체형이 존재하고 14종류가 1% 이상의 빈도를 나타내면서 유의한 값(p<0.05)으로 가장 빈도가 높은 것은 D6S105 7-HLA-A*02 이었다(HF:16.2%, LD:2.7, p<0.003). 그리고 MIB 와 HLA-B에서는 48종류의 일배체형이 존재하고 24종류가 1% 이상의 빈도로 유의한 값을 나타내었으며, BAT2와 HLA-B, TNFd와 HLA-B에서는 각각 83종류 중 19종류, 65종류 중 19종류가 1% 이상의 빈도로 유의한 값을 나타내었다. 이들 중 높은 빈도를 갖는 일배체형은 각각 MIB 1-HLA-B*62 (HF:10.6%, LD: 8.1, p<7.5×10⁻⁵⁷), BAT2 2-HLA-B*61 (HF: 5.9%, LD: 3.6, p<4.8×10⁻¹⁴), TNFd 5-HLA-B*62 (HF: 7.8%, LD: 5.2, p<3.3×10⁻²⁴)등 이었다. 또한 HLA 유전자와 microsatellite가 가장 인접한 DQCAR과 HLA-DRB1의 경우는 60종류의 일배체형이 존재하고 그 중 22종류가 1%이상의 빈도로 유의한 값을 나타내었는데 가장 빈도가 높은 것은 DQCAR 3-HLA-DRB1*13 (HF:8.5%, LD: 5.8, p<5.6×10⁻²⁸)이었다.

고 찰

사람의 게놈 내의 인트론 부분에 널리 분포하고 있는 것으로 알려진 반복 염기 서열들은 유전자 감식의 표지자로서 유용하며, 지금까지 많은 연구자들에 의해 다양한 가변반복서열(VNTR)과 짧은 연쇄반복 염기서열(STR)이 발견되고 이러한 것들의 유용성 검토 연구가 지속적으로 진행되어 왔다(1-11).

본 연구에서는 한국인에서 HLA 유전자부위 내 microsatellite의 분포와 microsatellite와 HLA유전자와의 유전적 연관성을 규명하고자 5종류의 HLA 내 microsatellite 표지자(DQCAR, D6S105, BAT2, MIB, TNFd)들을 분석하였다. 우리는 MIB를 제외한 4종류의 microsatellite들을 다른 인종과 비교 분석 하였고, 그 결과 코카시안, 아프리카계 미국인, 오스트레일리아인, 칠레인, 크로아티아인에서 한국인과 다른 빈도의 결과를 확인 할 수 있었다(14-22). 이는 HLA유전자가 인종마다 다른 빈도를 나타내는 것과 같이 HLA유전자 부위 내 microsatellite도 HLA유전자와 같이 인종마다 다른 빈도를 나타내는 것으로 사료된다. 반면, 일본인과는 유사한 빈도를 나타내 우리나라와 일본은 HLA 유전적 배경이 비슷함을 다시 한 번 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 한국과 일본, 더 나아가 아시아계 나라들과의 인류학적 연구를 하는데 기초가 될 것이다. 그리고, DQCAR에서는 한국인과 다른 인종간의 차이뿐만 아니라, 유사한 빈도를 나타낸 코카시안과 아프리카계 미국인종이 유럽의 크로아티아인종과 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있었으며, D6S105는 한국인에서 빈도가 D6S105 7 (126 bp) 대립유전자 (41.3%)에 극히 편중되어 있는 반면, 북아메리카의 칠레와 오스트레일리아는 D6S105 6-10 (124-132 bp) 대립유전자까지 골고루 분포되어 있었다. 이러한 결과는 인종마다 특징적인 것으로서 칠레와 오스트레일리아는 백인들이 이주한 나라들로 여러 인종이 섞여 있어 비슷한 빈도를 나타내는 것이라 사료된다.

Microsatellite 대립유전자를 일배체형으로 분류한 후 조합을 만들어 분석한 결과 BAT2 8 (153 bp)-MIB 6 (336 bp)-TNFd 3 (128 bp)-D6S105 7 (126 bp)-DQCAR 3 (188 bp)에서 가장 높은 빈도를 나타내었다(HF: 3.0%, LD: 2.8). 또한, HLA-A, B, DR 유전자와 microsatellite 대립유전자를 일배체형으로 분류한 후 조합하여 분석한 결과 Table V에서 확인할 수 있었다. 그리고 어떤 질병에 관련된 유전자의 위치를 분석하는데 있어서 예전에는 가계의 연관분석을 통해 재조합 수치를 가지고 위치를 파악하는 방법이 주로 사용되었다면 최근에는 연쇄불평형(linkage disequilibrium)에 입각한 방법으로 환자군과 대조군의 유전자분석을

Table V. Analysis of two-locus haplotypes among HLA and five microsatellites within HLA region in Korean population (n=143, HF>1.0, p<0.05)

| MIB | HLA-B | | HF (%) | LD | DQCAR / HLA-DRB1 | | HF (%) | LD | BAT2 / HLA-B | | HF (%) | LD | TNFd / HLA-B | | HF (%) | LD | D6S105 / HLA-A | | HF (%) | LD | |
|-----|-------|-------|--------|-----|------------------|----------|--------|-----|--------------|-------|--------|-----|--------------|-------|--------|-----|----------------|-------|--------|-----|--|
| | MIB | HLA-B | | | DQCAR | HLA-DRB1 | | | BAT2 | HLA-B | | | TNFd | HLA-B | | | D6S105 | HLA-A | | | |
| 1 | 62 | 10.6 | 8.1 | 8.1 | 3 | 13 | 8.5 | 5.8 | 2 | 61 | 5.9 | 3.6 | 5 | 62 | 7.8 | 5.2 | 7 | 02 | 16.2 | 2.7 | |
| 6 | 44 | 7.8 | 5.9 | 5.1 | 3 | 01 | 7.1 | 5.1 | 3 | 13 | 5.0 | 3.9 | 4 | 44 | 5.7 | 4.2 | 4 | 33 | 7.2 | 5.5 | |
| 1 | 46 | 6.4 | 4.9 | 6.7 | 8 | 07 | 6.7 | 4.8 | 3 | 44 | 5.0 | 3.3 | 7 | 46 | 5.6 | 5.2 | 7 | 26 | 5.3 | 1.9 | |
| 9 | 61 | 6.4 | 5.7 | 6.7 | 9 | 09 | 6.7 | 5.6 | 8 | 54 | 5.0 | 3.2 | 3 | 07 | 5.3 | 2.8 | 1 | 02 | 4.8 | 2.0 | |
| 11 | 54 | 6.0 | 4.7 | 6.4 | 7 | 04 | 6.4 | 4.1 | 10 | 46 | 4.6 | 3.9 | 3 | 13 | 5.3 | 2.8 | 7 | 30 | 4.3 | 1.2 | |
| 12 | 51 | 6.0 | 5.2 | 5.9 | 3 | 15 | 5.9 | 3.4 | 8 | 07 | 4.6 | 2.9 | 3 | 54 | 5.2 | 2.5 | 9 | 24 | 3.5 | 1.1 | |
| 6 | 07 | 5.7 | 4.5 | 5.3 | 8 | 04 | 5.3 | 1.4 | 2 | 44 | 4.3 | 1.7 | 1 | 58 | 5.0 | 4.6 | 4 | 11 | 3.0 | 1.5 | |
| 6 | 13 | 5.0 | 3.8 | 4.3 | 5 | 08 | 4.3 | 3.1 | 9 | 62 | 3.5 | 2.9 | 5 | 51 | 3.9 | 1.4 | 10 | 11 | 2.8 | 1.8 | |
| 11 | 58 | 4.6 | 3.6 | 3.2 | 9 | 04 | 3.2 | 1.3 | 2 | 58 | 2.8 | 1.5 | 3 | 35 | 3.1 | 1.5 | 7 | 31 | 2.6 | 1.0 | |
| 11 | 35 | 3.5 | 2.8 | 3.2 | 8 | 12 | 3.2 | 1.6 | 10 | 51 | 2.8 | 1.6 | 3 | 27 | 2.5 | 1.1 | 8 | 30 | 1.8 | 1.3 | |
| 10 | 51 | 3.2 | 2.5 | 2.9 | 5 | 15 | 2.9 | 2.0 | 5 | 27 | 2.5 | 2.3 | 4 | 51 | 2.5 | 0.9 | 6 | 24 | 1.7 | 0.7 | |
| 8 | 27 | 3.2 | 3.1 | 2.5 | 10 | 08 | 2.5 | 1.2 | 3 | 58 | 2.1 | 1.3 | 4 | 14 | 2.1 | 1.8 | 1 | 26 | 1.6 | 0.9 | |
| 4 | 14 | 2.5 | 2.3 | 1.8 | 7 | 12 | 1.8 | 0.8 | 8 | 48 | 2.1 | 1.1 | 5 | 52 | 1.8 | 1.3 | 5 | 24 | 1.3 | 1.0 | |
| 1 | 52 | 2.1 | 1.6 | 1.8 | 10 | 12 | 1.8 | 1.1 | 8 | 38 | 1.4 | 0.9 | 3 | 38 | 1.8 | 1.0 | 3 | 30 | 1.3 | 1.0 | |
| 1 | 71 | 2.1 | 1.6 | 1.8 | 10 | 09 | 1.8 | 0.8 | 2 | 67 | 1.4 | 1.0 | 5 | 48 | 1.7 | 0.8 | 1 | 26 | 1.6 | 0.9 | |
| 4 | 38 | 1.8 | 1.7 | 1.8 | 12 | 11 | 1.8 | 1.7 | 12 | 52 | 1.4 | 1.4 | 3 | 59 | 1.4 | 0.8 | 5 | 24 | 1.3 | 1.0 | |
| 13 | 60 | 1.8 | 1.7 | 1.7 | 10 | 14 | 1.7 | 1.0 | 8 | 59 | 1.1 | 0.7 | 2 | 37 | 1.1 | 1.0 | 3 | 30 | 1.1 | 1.0 | |
| 11 | 59 | 1.4 | 1.1 | 1.7 | 5 | 14 | 1.7 | 1.1 | 3 | 37 | 1.1 | 0.8 | 5 | 67 | 1.1 | 0.7 | 1 | 26 | 1.6 | 0.9 | |
| 11 | 37 | 1.4 | 1.1 | 1.1 | 1 | 03 | 1.1 | 1.0 | 5 | 14 | 1.1 | 0.9 | 1 | 60 | 1.0 | 0.9 | 3 | 30 | 1.1 | 1.0 | |
| 4 | 67 | 1.4 | 1.3 | 1.1 | 0 | 03 | 1.1 | 1.0 | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 61 | 1.4 | 0.9 | 1.1 | 13 | 11 | 1.1 | 1.0 | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 13 | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 11 | 07 | 1.1 | 1.0 | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 44 | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 11 | | 1.1 | 1.0 | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 48 | 1.1 | 0.8 | 1.1 | 11 | | 1.1 | 1.0 | | | | | | | | | | | | | |

HF: haplotype frequency, LD: linkage disequilibria

통해 불균형하게 즉, 어느 한쪽에만 나타나는 유전적 표지를 찾음으로 질병관련 유전자의 위치를 찾아가는 방식이 새로운 흐름으로 자리잡고 있다. 또한 이러한 연구는 HLA질병 관련 연구에 도움을 줄 뿐만 아니라, microsatellite 대립유전자 일배체형 형별을 통해 조혈모세포이식에서 환자-공여자쌍의 선택에 도움을 줄 것이다(1,6,23-28). 이러한 내용은 HLA 내 microsatellite 표지자와 급성 이식편대숙주반응의 연관성을 조사한 Li들(2003)의 연구에서도 확인할 수 있었는데, 이들은 D6S265 ($p=0.053$)가 통계적으로 유의성은 없었으나, 연관성이 있을 것이라고 시사하였다. 또한 급성 이식편대숙주반응과 생존과의 관계 분석에서 TNFd가 높은 등급(III-IV)의 이식편대숙주반응에서 사망의 빈도($p<0.040$, RR=12.00)가 증가함을 보고 하였다(11).

본 연구에서는 한국인에서 HLA내 microsatellite와 HLA 대립유전자 사이에서 유전적 연관성을 확인 하였지만, 앞으로 여러 유전병과의 관계도 규명해야 할 것으로 사료된다. 또한 HLA 내 microsatellite 뿐만 아니라 22번 염색체의 몇몇 microsatellite 표지자들이 급성 이식편대숙주반응과 연관성이 있는 것으로 보고되므로 앞으로의 연구에서는 22번 염색체의 microsatellite 표지자들이 한국인에서는 어떻게 영향을 미치는지 확인해야 할 것이고, HLA 내 microsatellite와 질병의 통계적인 연관성 연구의 여러 가지 의미를 규명하기 위해 발병 기전이나 HLA 내 microsatellite의 기능에 대한 연구가 더 많은 환자-공여자쌍에서 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구에 도움을 주신 이헌준 학생에게 감사의 마음을 전합니다.

참 고 문 헌

- Malkki M, Gooley T, Horowitz M, Petersdorf EW: MHC class I, II, and III microsatellite marker matching and survival in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens* 69;46-49, 2007
- Tamiya G, SOhkiaina TA, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Yoshitome M, Makino S, Kimura M, Inoko H: New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 54;221-228, 1999
- Matsuzaka Y, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Kimura M, Bahram S, Tamiya G, Inoko H: New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region. *Tissue Antigens* 56;492-500, 2000
- Matsuzaka Y, NMaakkainjoma KS, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski J.K, Tamiya G, Inoko H: New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* 57;397-404, 2001
- Foissac A, Fort M, Clayton J, Abbal M, Raffoux C, Moine A, Bensa JC, Bignon JD, Mercier P, Cambon-Thomsen A: Microsatellites in the HLA Region: HLA Prediction and Strategies for Bone Marrow Donor Registries. *Transplantation Proceedings* 33;491-492, 2001
- Malkki M, Single R, Carrington M, Thomson G, Petersdorf E: MHC microsatellite diversity and linkage disequilibrium among common HLA-A, HLA-B, DRB1 haplotypes: implications for unrelated donor hematopoietic transplantation and disease association studies. *Tissue Antigens* 66;114-124, 2005
- Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A: Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens* 55;477-509, 2000
- Cullen M, Malasky M, Harding A, Carrington M: High-density map of short tandem repeats across the human major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 54;900-910, 2003
- Martin MP, Harding A, Chadwick R, Kronick M, Cullen M, Lin L, Mignot E, Carrington M: Characterization of 12 microsatellite loci of the human MHC in a panel of reference cell lines. *Immunogenetics* 47;131-138, 1998
- Gourraud PA, Mano S, Barnette T, Carrington M, Inoko H, Cambon-Thomsen A: Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequencebased analysis. *Tissue Antigens* 64;543-555, 2004
- Li S, Kawata H, Katsuyama Y, Ota M, Morishima Y, Mano S, Kulski JK, Naruse KT, Inoko H: Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens* 63;362-368, 2004
- Kim TG, Kim HY, Lee SH, Cho CS, Park SH, Choi HB, Han H, Kim DJ: Systemic lupus erythematosus with nephritis is strongly associated with the TNFB*2 homozygote in the Korean population. *Hum Immunol* 46;10-17, 1996
- Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y, Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H: Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics*. 59;99-108, 2007
- Weber JL, Kwitek AE, May PE, Zoghbi HY: Dinucleotide repeat polymorphism at the D6S105 locus. *Nucleic Acids Res* 25;968, 1991
- Jazwinska EC, Lee SC, Webb SI, Halliday JW, Powell LW: Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Am J Hum Genet* 53;347-352, 1993
- Blanco R, Suazo J, Santos JL, Paredes M, Sung H, Carreno H, Jara L: Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population. *Cleft Palate Craniofac J* 41;163-167, 2004
- Grubić Z, Stingl K, Zunec R, Car H, Cecuk-Jelčić E, Brkljacić-Kerhin V: Linkage disequilibria between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population. *Tissue Antigens* 69;86-94, 2007
- Hashimoto M, Nakamura N, Obayashi H, Kimura F, Moriwaki A, Hasegawa G, Shigeta H, Kitagawa Y, Nakano K, Kondo M, Ohta M, Nishimura M: Genetic contribution of the BAT2 gene microsatellite polymorphism to the age-at-onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Genet* 105;197-199, 1999
- Kimura A, Ota M, Katsuyama Y, Ohbuchi N, Takahashi M, Kobayashi Y, Inoko H, Numano F: Mapping of the HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis. *International Journal of Cardiology* 75;S105-S110,

- 2000
20. Kim HK, Han H, Choi HB, Pyo CW, Kim CC, Kim TG: Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans. *Hum Immunol* 61;1274-1280, 2000
 21. Macaubas C, Hallmayer J, Kalil J, Kimura A, Yasunaga S, Grumet FC, Mignot E: Extensive polymorphism of a (CA)_n microsatellite located in the HLA-DQA1/DQB1 class II region. *Hum Immunol* 42;209-220, 1995
 22. Grubić Z, Zunec R, Crkvenac K, Cecuk-Jelčić E, Kastelan A: Distribution of alleles at DQCAR microsatellite locus in the Croatian population. *Croat Med J* 41;298-302, 2000
 23. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y: The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 99;4200-4206, 2002
 24. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F: Effect of matching of class I HLA alleles on Clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *N Engl J Med* 339;1177-1185, 1998
 25. Oka A, Tamiya G, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Makino S, Shiina T, Yoshitome M, Iizuka M, Sasao Y, Iwashita K, Kawakubo Y, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S, Inoko H: Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Immunogenetics Hum Mol Genet* 8;2165-2170, 1999
 26. Carrington M, Wade J: Selection of transplant donors based on MHC microsatellite data. *Hum Immunol* 50;151-154, 1996
 27. Foissac A, Fort ML, Giraldo P, Abbal M, Raffoux C, Cambon-Thomsen A: Microsatellites in the HLA region potential applications in bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 29;2374-2375, 1997
 28. Hanifi Moghaddam P, Zwinderman A, Kazemi M, van der Voort Maarschalk M, Ruigrok M, Naipal A, van der Slik A, Oudshoorn M, Giphart MJ: D6STNFa microsatellite locus correlates with CTLp frequency in unrelated bone marrow donor-recipient pairs. *Hum Immunol* 59;295-301, 1998