

Analysis of Tandem Repeats in the Promoter Region of iNOS Gene in Korean Genome

Sun-Ji Kim and Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

To investigate if there are tandem repeats in iNOS gene in Korean genome we applied PCR amplification followed by DNA sequencing. Tandem repeats we were looking at were (AAAT)_n in the promoter region. Totally, 65 people were subjected for this experiment. Twenty of them were patients with metabolic disease. Only (AAAT)₄ was found in all of these Korean samples. This result was somewhat different from the data for Caucasians and other Asian people. So, we assume this is specific VNTR (variable number of tandem repeat) in Korean which can be used for the purpose of diagnosis and for the differentiation of ethnic groups.

Key Words: iNOS, VNTR, Genetic diagnosis

산화질소 (NO)는 arginine을 기질로 하여 NOS (nitric oxide synthase)가 만들어내는 최종산물로서 혈압 조절, 신경 전달, 세균 감염 방어, 그리고 면역 조절 등 다양한 생리적 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Son et al., 2003). NO는 반감기가 아주 짧아서 수 초 정도에 지나지 않지만 free radical 형태로 주변 세포에 확산되면서 cyclic GMP의 생성을 도와 여러 장기에서 그 작용을 나타낸다 (Kim et al., 2001). 포유류의 진핵세포에는 nNOS (neuronal NOS), eNOS (endothelial NOS), iNOS (inducible NOS) 등 세 종류의 NOS가 존재하는 것으로 알려져 있다. 항상 일정한 비율로 발현되는 nNOS와 eNOS가 혈압 및 항상성 (homeostasis) 조절에 작용하는 반면, iNOS는 주로 면역 반응에 관여하는 대식세포에서 활성화된다고 알려져 있다 (Lee, 1996). 특히 iNOS는 다량의 NO를 유리하여 염증 반응, 체내 방어 반응 및 조직 재생 등에 깊숙이 관여하는 것으로 잘 알려져 있다. 그러나 NO가 지나치게 생성되면 오히려 세포독성을 나타내며 신부전과 심장 기능 저하 등 심혈관계 기능에 지장을 초래하기도 한다. 최근에 iNOS가 면역세포 이외에도 폐세포, 신경세포, 관절세포, 간세포 등 다양한 세포에 존재하는 것으로 보고되면서 폐혈성 쇼크 (septic shock), 고혈압, 뇌졸

중 (stroke), 세포자연사 (apoptosis), 염증 반응 등 다양한 임상적 질환에서의 중요성에 대해 연구가 점차 확대되고 있다. 특히 신경계, 면역계 및 심혈관계에서의 기능에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다 (Bae et al., 2003; Son et al., 2003). iNOS는 신경계와 혈관계에 존재하는 nNOS, eNOS와 상당히 다른 특징을 가지고 있다. 주로 전사단계에서 발현이 조절되며 promoter 부위에는 IFN- γ response element (γ -IRE), γ -activated site (GAS), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1) 등의 cis-acting element 들이 존재하는 것으로 보고되어 있다. 이들은 lipopolysaccharide (LPS)와 interleukin- β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 cytokine과 길항적으로 작용하여 promotor를 활성화시켜 iNOS 유전자 전사를 유도하고, 그 결과 다량의 NO를 생성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이외에도 자외선 조사나 산화 스트레스에 의해 iNOS 유전자의 발현이 증가될 수 있다고 보고되어 있다 (Bae et al., 2003; Ko et al., 2006).

최근에 백인계 (Caucasians)와 몇몇 아시아 인종 (Chinese, Malaysian, Indian)에서 당뇨병 환자를 중심으로 iNOS 유전자의 polymorphism이 집중적으로 조사되었다. 당뇨병 환자가 대상이 된 이유는 대사성질환이면서도 심혈관계에 영향을 미치기 때문이었다. 결과에 따르면 백인은 거의 대부분이 (AAAT)₃의 polymorphism을 가지고 있었지만, 아시아인은 258명의 당뇨병 환자 대부분이 (AAAT)₃ polymorphism을 가지고 있지 않았다. 즉 백인에서는 (AAAT)₄가 0.2%만 나타난 반면, 아시아인 환자는

*논문 접수: 2008년 6월 18일

수정재접수: 2008년 7월 28일

[†]교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 생물학과

Tel: 053-580-5537, Fax: 053-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

4081 ggaatgagtg gacaggggga gcaaagtgtt ggcacgggga aatcaggggt gacttttttt
 4141 ccctttgctt ctcaacttct ccctaagtga gttgttattt tacttttatg atggaaaaat
 4201 gcatatgtat gggaatactg tatttcaggc attataagga atgaaattat aggccgggca
 4261 ttgtggctaa cccttgtaat cctagcactt tgagaggctg aagtgggcag atcacttgag
 4321 cttcagagtt cgagaccagc atggacaaca tggtgaaacc cagtctctac caaaaacaca
 4381 aaaatattag ctgggtgtgg tggtgcatgc ctgtagtccc agctactcag gaggctgagg
 4441 tgggaggatc gcttgagcct gggaggcaga agttgcaatg agcagagatc gtgccactcc
 4501 gctccagtct tggtgacaga atgagactcc atctcaaaaa taaataaata aataaataaa
 4561 ataaatgaaa tgaaattata agaaattacc actttttcat gtaagaagtg atcatttcca
 4621 ttataaggga aggaatttaa tctacctgc cattccacca aagcttacct agtgctaaag
 4681 gatgaggtgt tagtaagacc aacatctcag aggcctctct gtgccaatag ccttccttcc
 4741 tttcccttcc aaaaacctca agtgactagt tcagaggcct gtctggaata atggcatcat
 4801 ctaatatcac tggccttctg gaacctgggc attttccagt gtgttccata ctgtcaatat
 4861 tccccagct tcttgactc ctgtcacaag ctggaaaagt gagaggatgg acagggatta
 4921 accagagagc tcctgctga ggaaaaaatc tcccagatgc tgaaagtgag gccatgtggc
 4981 ttggccaaat aaaacctggc tccgtggtgc ctctgtetta gcagccaccc tgctgatgaa

Fig. 1. Promotor sequence of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. In this example from GenBank database, five tandem repeats (AAAT)₅ are shown as boxed area. Relative positions of PCR primers used in the experiment are indicated as underlined. Numbers in the brackets indicate the relative positions when A of ATG is located as 1.

98.4%가 (AAAT)₄의 tandem repeat를 보이고 있었다. 심지어는 (AAAT)₅와 (AAAT)₆의 드문 polymorphism을 가지는 환자도 각각 6명과 1명으로 확인되었는데 이들은 모두 신부전이 심한 환자들이었다 (Liao et al., 2006).

인간게놈프로젝트의 완성 이후 각 국가별로 자국민의 유전자 데이터를 확보하기 위해 노력을 기울이고 있다. Polymorphism이나 SNP 등의 자료들이 21세기 맞춤형 진단과 치료를 위해 중요하다는 인식이 확대되고 있고, 또 인종별로 특이한 유전자 변이가 실제로 보고되고 있기 때문이다 (Hobbs et al., 2002; Tajouri et al., 2004; Nistico et al., 2008). 상기한 것처럼 iNOS 유전자의 promoter에서 발견되는 (AAAT)_n tandem repeat는 분명히 인종간 차이를 보이고 있다 (Bellamy R et al., 1997; Morris et al., 2002; Liao et al., 2005; Ida Manna et al., 2008). 그러나 아쉽게도 한국인을 대상으로 한 polymorphism 연구는 아직 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 임상적으로 정상인 한국인과

대사성질환 환자들을 대상으로 하여 iNOS 유전자 구조 중 promotor 부위의 (AAAT)_n polymorphism을 분석하고자 하였다.

임상적으로 정상 판명된 48명과 심혈관계 질환을 가지고 있는 환자 17명의 혈액으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 환자의 혈액은 경북대학교 의료원에서 제공받았으며, DNA의 추출은 QIAamp DNA Blood Mini kit을 사용해 실시하였다. PCR 반응은 Takara gradient PCR 기기를 이용하여 실시하였고, 반응조건은 94°C/5분 (pre-denaturation), 94°C/30초 (denaturation), 59°C/30초 (annealing), 72°C/30초 (extension), 72°C/7분 (post-extension)으로 전체 35 cycle을 실시하였다. PCR 반응을 위한 sense primer (5'-TGGTGCATGCCTGTAGTCC-3')와 antisense primer (5'-CAGGCCTCTGAGATGTTGGTC-3')의 위치는 Fig. 1에 표시하였다. Tandem repeat 주위의 promotor 염기서열은 GenBank에 등록된 sequence를 기초하였다. PCR 반응 결

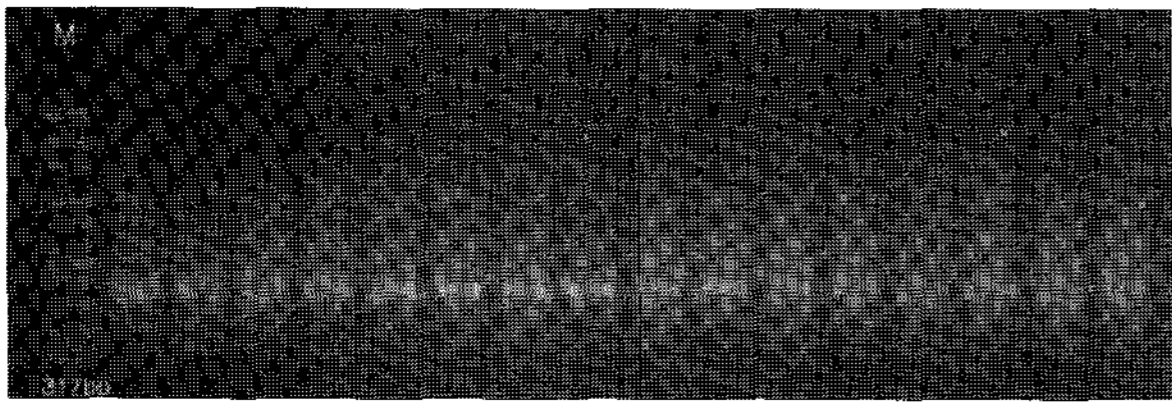
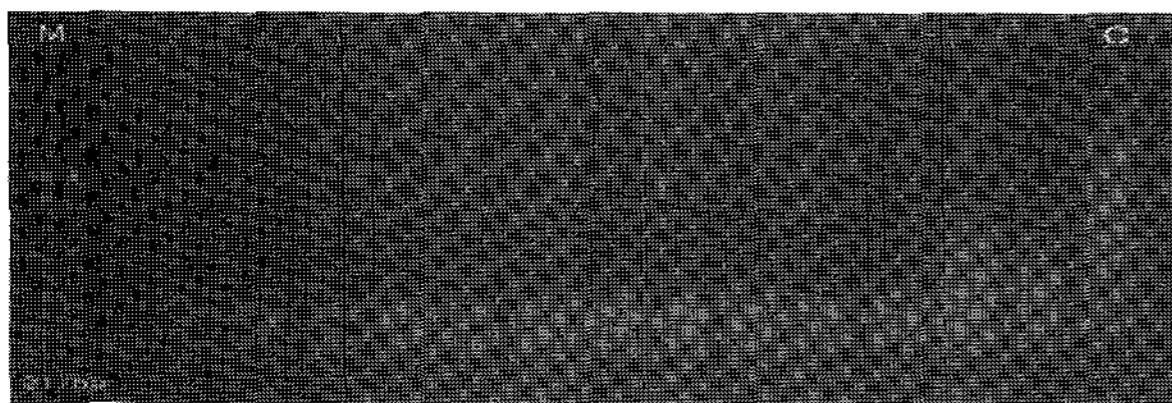
A**B**

Fig. 2. Electrophoretic results of PCR amplification of tandem repeats in the promoter region of iNOS gene. **A** and **B** represent the results from controls (clinically normal group) and patients with coronary diseases. M represents 100 bp ladder.

과는 일차적으로 전기영동하여 DNA band를 확인하였고, DNA sequencing으로 염기서열을 최종 결정하였다 (Yoo, 2001).

PCR 반응 결과 대체적으로 320 bp 부위에서 DNA band가 확인되었다 (Fig. 2). 이는 tandem repeat가 5개일 경우 sense primer와 antisense primer 사이의 염기서열이 총 317 bp라는 GenBank에 등록된 iNOS 염기서열과 정확히 일치하는 결과였다 (Fig. 1). DNA sequencing 결과 정상인 (wild type)과 심혈관계 환자 65명 모두 예외없이 (AAAT)₄의 tandem repeat를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 즉 한국인은 임상적 여부와 상관없이 모두 4개의 tandem repeat를 가지고 있음이 확인되었다. 이것은 백인이 3개의 tandem repeat를 가진다는 보고와 비교할 때 전반적으로 한 개의 (AAAT) repeat가 많은 결과이며, 다른 아시아 국가들과는 대체로 일치하는 결과였다. 다만 다른 아시아 국가들에서는 주로 환자들에서 4개의 tandem repeat가 발견된 반면 본 연구에서는 정상인들에서도 4개의 tandem repeat만 발견된 점이 특이할 만하다. 5개나 6개의 tandem repeat가 다른 국가의 일부 신부전 환자에서 발견되었지만 우리 실험에서는 확인되지 않았다. 이는 앞으로 환자 샘플을 확대하면서 재확인해보아야 할 내용이다. 본 실험의 결과는 Table 1에 정리하여 나타내었다.

VNTR (variable number of tandem repeat)은 범죄현장에서 발견된 샘플로부터 용의자를 추적하거나 친자 확인에 주

Table 1. Relative ratio of tandem repeats in wild types and patients

Allele frequency	Normal/ Total	%	Patient/ Total	%
(AAAT) ₃	0/48	0	0/20	0
(AAAT) ₄	48/48	100	17/20	85
(AAAT) ₅	0/48	0	0/20	0
(AAAT) ₆	0/48	0	0/20	0

로 이용되어져 왔다. 그러나 VNTR이 개인간 차이뿐 아니라 인종간 차이도 보인다는 사실이 알려지면서 임상적 응용 가능성 역시 조심스럽게 제기되어졌다. iNOS의 경우 현재까지의 데이터를 보면 promoter의 AAAT tandem repeat가 분명한 차이를 보이고 있다. 더욱이 심혈관 질환 보유자나 신부전 환자의 경우 그 차이가 확실한 것으로 보고되고 있기에 각 국가별로 이에 대한 데이터베이스를 확보하는 것이 시급해졌다. 본 연구의 결과 한국인은 4개의 tandem repeat만을 유지하는 것으로 확인되었기에 이를 토대로 임상적 질환의 가능성을 예측하는 것이 가능해졌고, 향후 유전자 차원에서 맞춤형 진단 kit를 개발하는데 기여할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

REFERENCES

- Bae JY, Hur GM, Bae SY, Park JS, Lee CJ, Lee JH, Seok JH. Transcriptional Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in C6 Glial Cell. *Chungnam Med J.* 2003. 30: 21-35.
- Bellamy R, Hill AV. Bi-allelic tetranucleotide repeat in the promoter of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Clin Genet.* 1997. 52: 192-193.
- Gomez LM, Anaya JM, Vilchez JR, Cadena J, Hinojosa R, Velez L, Miguel Angel Lopez-Nevot, Martin J. A polymorphism in the inducible nitric oxide synthase gene is associated with tuberculosis. *J Tuberculosis.* 2007. 87: 288-294.
- Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts MJ, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger AL, Anstey NM, Weinberg JB. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan Children. *Mech dis.* 2002. 9: 1468-1475.

- Kim KY, Nam HY, Moon JH, Jeong JS, Lim Y, Chung CK. Autoregulation of Quartz-induced iNOS by iNOS-derived Hydrogen Peroxide in Rat2 Fibroblast. *Kor J Occup Environ Med.* 2001. 13: 159-172.
- Ko SH, Kim SB, Ryu KR, Kim JW, Ahn YB, Moon SD, Kim SR, Lee JM, Kwon KS, Yoon KH, Song KH. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in the Hypoxic Injury to Pancreatic Beta (MIN6) Cells. *Diabetes Res Digest.* 2006. 30: 336-346.
- Kunna TA, Mikkelsson J, Ilveskoski E, Tanner MM, Laippala P, Penttila A, Perola M, Nikkari ST, Karhunen PJ. A Functional variant of the iNOS gene flanking region is associated with LAD coronary artery disease: an autopsy study. *Eur J Clin Invest.* 2003. 33: 1032-1037.
- Lee JE, Kim SY, Seo HA, Jeon JH, Moon SS, Kim HK, Doh YJ, Kim BW, Kim JG, Yoo M, Lee IK. Association of Kir6.2 and Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma (PPAR γ) Polymorphisms with Type 2 Diabetes in Koreans. *Diabetes Res Digest.* 2007. 31: 455-464.
- Lee KY. Nitric Oxide: The Pathophysiological Roles and Clinical Implications in Circulatory System. *The yongnam Univ Med J.* 1996. 13: 159-172.
- Liao L, Lim MC, Chan SW, Zhao SW, Lee KO. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and nephropathy in Asians with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2005. 20: 371-375.
- Manna I, Liguori M, Valentino P, Condino F, Russa AL, Alessandra, Clodomiro, Nistico R, Palma GM, Quattrone A. Preliminary evidences of a NOS2A protective effect from Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J Neur Sci.* 2008. 224: 112-117.
- Morris BJ, Markus MA, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang XL. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complication in type 2 diabetes. *J Mol Med.* 2002. 80: 96-104.
- Nunokawa Y, Ishida Y, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994. 200: 802-807.
- Son YG, Kim GI, Jo HC, Lee JA, Bae BJ, Choi HC, Lee KY, Kim WJ. Interaction of Nitric Oxide and Antioxidants in Hypoxia-Reoxygenation Injury. *J Kor Surg Soci.* 2003. 64: 275-281.
- Tajouri L, Martin V, Ovcaric M, Curtain RP, Lea RA, Csurhes P, Pender MP, Griffiths MR. Investigation of an inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. *Brain Res Bull.* 2004. 64: 9-13.
- Yoo M. Expression of Cytochrome P450 1A1, 1A2, 2C8, 2E1, and 3A4, in Human Brain. *J Biomed Lab Sci.* 2001. 7: 65-70.