

Analysis of Single Nucleotide Polymorphism of MMP3 Gene in Korean Genome

Su-Mi Kim, Su-Won Kim and Min Yoo[†]

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

MMP3 (Matrix metalloproteinase-3) is an important gene in the development of cardiovascular and metabolic diseases. It is also reported that the genotype of MMP3 could be a factor for disease conditions. So, SNP analysis is a prerequisite to study MMP3 related diseases. However, statistical data or analytical reports of this gene in the Korean population is not available. We have employed PCR and ARMS technique to amplify the position of Lys45Glu which is located within chromosome 11q22.3 and exon 2. Genomic DNA were extracted from 201 people. We found that, 17 individuals had the wild homozygote type (W/W, 8%), 98 individuals had the SNP homozygote type (S/S, 49%), 86 had the heterozygote type (W/S, 43%). This study should facilitate research on the cause of cardiovascular diseases due to polymorphisms in the MMP3 gene and to develop further therapy at the genetic level.

Key Words: MMP3, Cardiovascular disease, SNP, ARMS, Korean genome

Matrix metalloproteinase (MMP)는 기질 금속단백효소로 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)을 선택적으로 분해하는 효소이다. MMP는 세포간 해리, 세포사멸사 (apoptosis)의 회피, 세포분열, 혈관형성 및 수많은 성장 인자와 cytokine의 생체이용률에 영향을 주어 배 발생 (embryonic development), 조직형성, 염증반응, 상처치유 등을 조절하며, 특히 종양 발생과 성장에 관련되어 있다고 알려져 있다 (Egeblad and Werb, 2002; Hojilla et al., 2003; Nam et al., 2004). MMP 효소군은 현재 약 19종 이상이 보고되어 있으며, 그 중 기질특이성에 따라 분류된 stromelysin-1 계열의 MMP3은 치주질환 뿐만 아니라 류마티스 관절염, 골 관절염을 포함한 다양한 염증성 질환과 관련된 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Reynolds and Meikle, 1997; Lim et al., 2000; Kim et al., 2005). 또한 MMP3의 promoter 부위의 polymorphism이 심혈관질환과 연관되어 있다고 보고되어 지는 등 질환과 관련한 MMP3의 연구는 점점 확대되어

가고 있다 (Tervonen T and Karjalainen K, 1997; Poöllänen et al., 2002; Ye, 2005).

질환연구방법 중 단일 염기 다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)을 이용한 연구가 활발해지고 있는 추세이다 (Lee, 1998; Kim and Yoo, 2008; Baek and Yoo, 2009). SNP는 인간 유전체에 가장 흔한 다형성으로 단 하나의 염기쌍이 0.1% 확률로 개인에 따라 서로 다르게 나타나며 개인의 유전적 차이를 나타내는 일반적인 형태로 염색체 상에 골고루 분포되어 있다. 외국의 경우 SNP에 대한 연구가 활발하게 이뤄지고 있고 특히 연구가 활발한 미국 등 선진국의 염기서열이 대체로 보고되어지고 있는 실정이다. 미국 국립보건원 (National Institutes of Health, NIH) 산하의 국립생물공학정보센터 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)가 관리하는 GenBank에 등록된 염기서열은 세계 각지에서 등록되고 있다. SNP로 인한 질병보고가 되어 있음에도 불구하고 한국인에게 적용하여 질병을 진단하고 치료하기 위해서는 한국인 특유의 염기서열 데이터가 필요하다. 이는 SNP에 대한 연구가 많이 이뤄지고 있지만 현재까지 대부분의 연구가 선진국을 중심으로 이뤄지고 있기 때문에 한국인 고유의 염기서열을 조사해 볼 필요를 느꼈기 때문이다.

이에 본 연구에서는 exon 11에 위치하는 MMP3 유전자의 SNP 중에서 아연이 결합하는 활성 부위인 catalytic

*Received: 1 March, 2012 / Revised: 30 March, 2012

Accepted: 31 March, 2012

[†]Corresponding author: Min Yoo. Department of Biology, College of Natural Sciences, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea.

Tel: 82-53-580-5537, Fax: 82-53-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

Table 1. Sequences of MMP3 gene primer for the Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Name	Orientation	Sequence	Size (bp)
MMP 1F1	Sense	cta gaa aac tac tac gac ctg a	22
MMP 1F2	Sense	cta gaa aac tac tac gac ctg g	22
MMP R1	Antisense	atg tga gtg gag tca cct ctt	21

Table 2. Sequences of MMP3 gene primer for the amplification of wild type sequence

Name	Orientation	Sequence	Size (bp)
MMP F	Sense	cta gaa aac tac tac gac ctc	21
MMP R1	Antisense	atg tga gtg gag tca cct ctt	21

domain을 단백질로 만드는 유전자에 해당하고 단일 염기 변이에 의해 단백질이 달라지는 A723T인 Lys45Glu 변이에 대해 한국인에서의 SNP를 알아보려고 하였다. SNP를 알아보기 위해 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용하여 DNA를 증폭하며, PCR에 필요한 primer는 amplification refractory mutation system (ARMS 법)을 이용하여 primer의 3' 말단에 변이 부위가 오도록 설정하고, allele 특이성을 높이기 위해 변이 부위보다 1염기 5' 측에 mismatch를 하나 더 만들었다. SNP가 발견되는 부위에서 정상서열 primer와 변이서열 primer를 2 set 제작하여 유전자의 변이여부를 쉽게 판별할 수 있는 PCR 조건을 확립하고 MMP3의 SNP를 봄으로써 한국인에게 나타나는 유전자 type과 염기서열을 분석하고자 하였다.

먼저 Genomic DNA는 임상적으로 정상이라 판명된 한국인 성인 남, 녀 135명으로부터 혈액 채취 동의서를 구한 후 채취하였다. DNA blood mini kit을 사용하여 채취한 혈액으로부터 DNA를 추출하고, 이를 -20℃에 보관한 후 꺼내어 사용하였다. MMP3의 SNP를 찾기 위하여 Genbank에 등록된 human MMP3의 SNP와 genomic DNA 염기서열을 바탕으로 primer를 제작하였다 (Table 1). PCR 반응 프로그램은 denaturation을 94℃에서 30초, annealing을 53℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초로 하여 전체 35 cycle로 반응하였고 pre-denaturation을 94℃에서 5분, post-extension을 72℃에서 7분으로 반응하였다.

혈액에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하고 MMP3의 SNP 부위를 포함하지 않는 1 base pair 짧은 primer를 사용하였다 (Table 2). 반응 프로그램은 denaturation을 94℃에서 30초, annealing을 55.2℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초로 하여 전체 35 cycle로 반응하였고 pre-denaturation을 94℃에서 5분, post-extension을 72℃에서 7분으로 반응하였다.

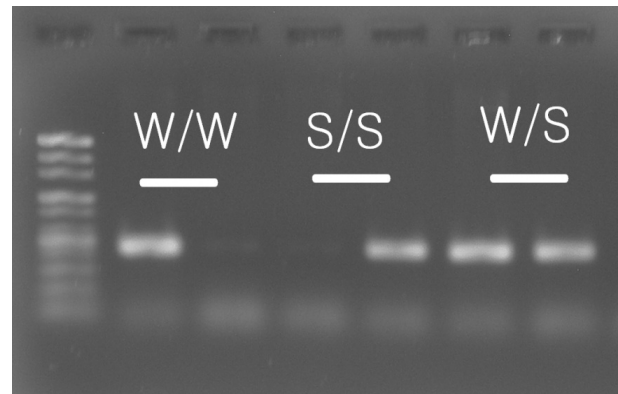


Fig. 1. Electrophoresis of PCR products in Lys45Glu polymorphism analysis of MMP3 gene by ARMS. Wild homozygote type (W/W), SNP homozygote type (S/S), heterozygote type (W/S). Size marker: 100 bp ladder.

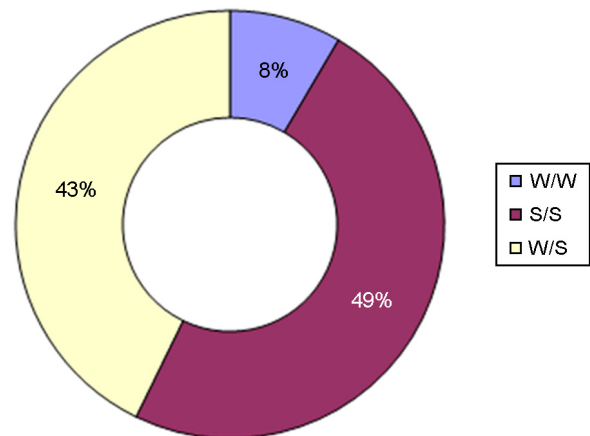


Fig. 2. Ratio of Lys45Glu polymorphism of MMP3 gene by ARMS. Among 201 samples, 17 were turned out to be wild homozygote type (W/W, 8%), 98 were SNP homozygote type (S/S, 49%), 86 were heterozygote type (W/S, 43%).

그 결과 정상서열 primer에 PCR 산물이 없고, 변이서열 primer에 PCR 산물이 있으면 그 DNA에 MMP3 변이가 있는 것을 찾을 수 있었다 (Fig. 1). 총 201명 중에서 wild homozygote type (W/W) 17명, SNP homozygote type (S/S) 98명, heterozygote type (W/S) 86명으로 나타났다 (Fig. 2). 전체 백분율을 비교해 보면 W/W 8%, S/S 49%, W/S 43%로 나타나 한국인에서는 Wild homozygote type, SNP homozygote type, heterozygote type이 모두 나타나는

것을 알 수 있었고, SNP homozygote type, heterozygote type 은 49%, 43%로 비슷한 비율로 나타나고 wild homozygote type은 8%로 나타나 상대적으로 적은 비율을 보였다.

또한 MMP3의 SNP 부위를 포함하지 않는 1 base pair 짧은 primer로 증폭한 PCR 산물과 pGEMT-easy vector를 사용하여 클로닝한 후 color selection으로 선별한 cloning 된 MMP3 유전자를 획득하기 위해 miniprep을 실시하였으며, 이렇게 분리한 plasmid DNA를 MMP3의 SNP 부위를 포함하지 않는 1 base pair 짧은 primer로 PCR함으로써 vector 속에 insert가 삽입되었는지 확인하였다. 반응 프로그램은 pre-denaturation을 94℃에서 5분으로 1 cycle 반응시킨 후, denaturation을 94℃에서 30초, annealing을 55.2℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초로 하여 전체 35 cycle로 반응하였고, 마지막으로 post-extension을 72℃에서 7분으로 반응하였다. 이후 (주)마크로젠에 의뢰하여 자동염기서열반응으로 염기서열을 결정된 결과, 정상염기서열과 SNP 염기서열이 모두 발견되었다. 이는 ARMS 기법으로 PCR 한 결과 wild heterozygote type으로 나온 것과 동일한 결과였다.

종합하면, 한국인에서는 wild homozygote type, SNP homozygote type, wild heterozygote type이 모두 나타나는데, 이 중에서도 SNP homozygote type 49%, wild heterozygote type 43%로 비슷한 비율로 나타났으며, wild heterozygote 은 8%로 상대적으로 적은 비율로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 한국인의 MMP3 유전자에 대한 유전자적 차원에서 기초를 마련하였고 이를 바탕으로 질병에 대한 한국인 특이적인 진단법을 개발하는데 기초 자료가 될 수 있을 것이라고 기대한다. 앞으로 정상인에 대한 자료를 더욱 확대하고 환자들에 대한 염기서열도 함께 비교 분석하여 진단과 치료에 기초 자료를 마련하고자 한다.

REFERENCES

- Baek SA, Yoo M. Tandem Repeats (CCTTT)_n in the Promoter of iNOS Gene in Korean Genome. *J Exp Biomed Sci.* 2009. 15: 167-170.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002. 2: 161-174.
- Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer.* 2003. 89: 1817-1821.
- Kim SW, Yoo M. Association of UCP2 Polymorphisms with Type 2 Diabetes in Korean Subjects. *J Exp Biomed Sci.* 2008. 14: 239-242.
- Kim YH, Ha KY, Kil GMI, Choi KY. The differences in expression of matrix metalloproteinase-3 in Degenerative lumbar scoliosis and spinal stenosis. *J Kor Orthop Assoc.* 2005. 40: 209-215.
- Lee KO. A Study of Genetic Polymorphisms of HLA-class I and II Genes Using Polymerase Chain Reaction. *J Exp Biomed Sci.* 1998. 4: 11-25.
- Lim SJ, Shin KY, Jeon CK, Han KY, Kim BO. A study on matrix metalloproteinase-3 activity in blood serum of the diabetic patients. *Oral Biol Res.* 2000. 24: 79-90.
- Nam JH, Park KS. Single nucleotide polymorphisms of matrix metalloproteinase in Koreans. *Kor J Genet.* 2004. 26: 289-296.
- Poöllänen PJ, Lehtimäki T, Ilveskoski E, Mikkelsen J, Kajander OA, Laippala P, Perola M, Goebeler S, Penttilä A, Mattila KM, Syrjäkoski K, Koivula T, Nikkari ST, Karhunen PJ. Coronary artery calcification is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 3: the Helsinki Sudden Death Study. *Atherosclerosis* 2002. 164: 329-335.
- Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol.* 1997. 14: 144-157.
- Tervonen T, Karjalainen K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol.* 1997. 24: 505-510.
- Ye S. Influence of Matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovas Res.* 2006. 69: 636-645.