

류마티스 관절염의 DNA repair gene (hMLH1 및 hMSH2)의 Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) 및 흡연간의 연관성 연구

조 운 희², 김 수 영¹, 정 해 원², 홍 성 철¹

¹제주대학교 의학전문대학원 예방의학교실, ²서울대학교 보건대학원

Abstract

Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) of DNA repair genes (hMLH1 and hMSH2) in Rheumatoid arthritis Patients and its association with rheumatoid arthritis by Smoking status

Yoon-Hee Cho², Su-Young Kim¹, Hae-won Chung², Seong-Chul Hang¹

¹Department of preventive of Medicine, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea,

²School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Korea

The purpose of this study is to examine the risk factors and the single nucleotide polymorphisms(SNPs) of DNA repair gene (hMLH1 and hMSH2) associated with rheumatoid arthritis by smoking status and environmental tobacco smoke(ETS). This study was planned to detect the susceptibility of the patients diagnosed by rheumatoid arthritis to the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of DNA repair gene(hMLH1 and hMSH2) by smoking status and environmental tobacco smoke(ETS). The single nucleotide polymorphisms(SNPs) of DNA repair gene(hMLH1 and hMSH2) were analyzed by Dynamic allele specific hybridization(DASH) technique in rheumatoid arthritis patients and controls. The single nucleotide polymorphisms(SNPs) of DNA repair gene(hMLH1 and hMSH2) of patients were compared to those of age and sex matched controls, which are statistically analyzed and adjusted by age, sex, smoking status, and ETS. This study showed that The SNP of DNA repair gene hMLH1 was significantly associated with the susceptibility of rheumatoid arthritis, but that of hMSH2 was not. Differential effect of passive smoking on the association between the SNP of DNA repair gene hMSH2(CC type or CT type) and rheumatoid arthritis risk was found. It is suggested that the SNPs of DNA repair gene correlated with susceptibility to rheumatoid arthritis by smoking status was able to be used as its susceptibility marker and further as basic data to prevent the risk factors for rheumatoid arthritis. But the larger sample studies, including a variety of SNPs of DNA repair gene will be needed.(J Med Life Sci 2011;8:25-34)

Key Words : Rheumatoid arthritis, Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), DNA repair gene (hMLH1 and hMSH2)

1. 서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis; RA)은 양의학적으로 원인이 확실하게 알려진 것은 없으나 면역기능과 관계된다는 것이 유력하며, 유전적 요인과 함께 세균이나 바이러스에 의한 감염, 인스턴트 식품의 과다복용, 환경 오염, 운동부족, 및 과도한 스트레스 등이 위험요인으로 추정되고 있는 만성질환이다¹⁾.

한의학적 시각으로는 과로, 정신적 손상, 습기가 많은데서 생활을 하거나, 음식을 잘못 먹는 등의 상황에서 풍, 한, 습이 피부를 침입하고 경락을 통하여 관절과 근육에 침입하여 발병하는 것으로 이리저리 옮겨 다니는 행비, 통증이 심한 통비, 거동

이 힘들고 감각이 둔한 착비 그리고 역절공 등으로 표현을 하고 있다. 즉 통증부위가 발생한 곳만의 이상이 아니고 전신적인 증세이며 혈액을 타고 전신적으로 나타나는 것으로 판단하고 있다.

최근 많은 연구자들에 의해 흡연이 류마티스 질환의 감수성 요인으로 작용한다는 사실이 속속 알려지고 있는데, 그 중 흡연이 T-세포의 변형 및 APC 수의 감소 등을 유발함에 따라 궁극적으로 자가면역기능에 작용하여 질환의 중증도에 영향을 미친다고 보고되고 있다. 또한 Matthey 등 (2002)²⁾의 선행연구에서는 장기간 흡연자가 그렇지 않은 사람 보다 RF(rheumatoid factor) 농도가 높다고 보고한 바 있다. 뿐만 아니라 가족 중에 류마티스 질환에 이환된 경험이 없으면서 흡연량이 많은 사람이 류마티스 질환에 이환되었다는 보고가 있었음에도 불구하고 류마티스 질환과 흡연간의 연관성에 영향을 미치는 유전적 요인에 대한 연구도 부족한 실정이다.

한편 인간 유전체 정보가 속속히 밝혀지면서 각 개인마다 유전적 다형성이 보고되고 있으며 이러한 유전적 다형성은 각 질환에

Address for correspondence : Su-Young Kim
Department of Internal Medicine, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : suy0202@jejunu.ac.kr

이환되는 각 개인마다의 민감도와 관련이 있다는 연구가 보고되고 있다. 또한 DNA의 이상구조는 DNA 염기서열상의 변이를 나타내는데 인간에 있어서 이중 약 90% 정도는 DNA의 단일 염기의 차이에서 온다고 알려져 있으며, 이러한 다형성을 Single Nucleotide polymorphism(SNP)이라고 한다²⁾. 특히 단일염기다형성(SNP)의 변이는 단백질을 형성하는 3차원 구조에 이상을 초래하여 단백질의 기능의 변화를 초래할 수 있기 때문에 치명적인 질병을 일으킬 수도 있다³⁾. 이러한 SNP는 질병의 감수성 인자로 널리 사용되어질 것으로 기대되고 있다.

인간에 있어서 DNA 손상 회복 기전에 참여하는 유전자는 70 개 정도가 있다고 알려져 있는데, 만약 DNA 회복에 관여하는 유전자의 단일염기에서 돌연변이가 발생하면 유전자의 본래 기능이 저하되어 DNA 회복기전에 결함을 가져오게 되고 과도한 DNA 상해를 축적하게 된다⁴⁾. 개체 내에 DNA 상해나 구조적 변이가 남아 있게 되면 DNA 복제 시 잘못된 염기쌍이 생길 확률이 커지고, 돌연변이, 암, 노화의 가속화 현상 등 비정상적인 분화를 초래하게 된다⁵⁾. DNA 회복 기전에는 base excision repair(BER), nucleotide excision repair(NER), recombination repair, mismatch repair(MMR)가 복제시 생길 수 있는 오류를 최소화하여 유전자 항상성을 유지시키는데 주요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이러한 DNA 손상 회복 관련 유전자가 변형을 이루게 되면 암과 같은 질병에 주요 역할을 할 것으로 알려져 있다⁶⁾. 특히 MMR(mismatch repair) 회복 기전은 DNA 복제 과정 중의 오류로 생긴 잘못된 염기쌍을 교정하는 복제 후 회복 기능을 수행하게 되는데⁵⁾, MMR에 관계하는 유전자는 hMSH2, hMSH3, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6 등 6종로 hMSH2와 hMLH1 유전자 변이는 유전성 비용종증 대장암(hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)의 발병 및 흡연에 의한 DNA 회복기전에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다⁷⁾.

한편 미세위성 DNA(Microsatellite)는 DNA상의 1-6bp의 반복 서열로서 개개인마다 매우 다양하며, 불안정한 상태를 보이는 유전자로서 DNA 손상 회복 유전자의 돌연변이에 의해 보다 짧은 서열 혹은 긴 서열의 비정상 구조를 보이게 되는데, 이는 DNA 손상 회복기전의 결함으로 인한 DNA 손상으로 표현되기도 한다(microsatellite instability; MSI). 많은 연구에서 MSI가 암 환자 및 류마티스 관절염 환자의 활막세포에서 많이 발견된다고 보고하고 있다⁸⁻¹²⁾. 이러한 MSI는 MMR 기전의 손상으로 인해 생긴다고도 알려져 있다.

류마티스 질환의 경우 역시 원인 유전자라고 추정되는 HLA 등의 다형성에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다. 그러나 앞서 언급한 흡연 등의 생활습관과 관련이 있는 유전적 다형성에 대한 연구는 국내·외를 막론하고 미흡한 상태이다.

질병에 대한 개개인의 감수성은 여러 가지 물리적, 환경적, 유전적 인자의 노출 정도에 따라 달라진다고 알려져 있으며, 특히 개인의 유전자에 대한 관심이 매우 높아지고 있다. 특히 자연발생적 복제 과정이나 환경오염물질에 의한 인체의 손상에 대한 방어 기저에 관여하는 DNA 회복 유전자의 변이는 질병발생 위험에 대한 개인간의 차이를 나타낼 수 있어 매우 중요하다¹³⁾. 단일염기다형성(SNP) 연구는 인간 집단 수준에서 뿐 만 아니라 개인수준에서 질병의 초기 원인을 구명할 수 있어 특정 질병발생에 민감한 집단을 선별하고 이러한 집단 구성원들의 질병 예방 효과도 기대할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 류마티스 관절염과 DNA repair gene (hMLH1 및 hMSH2)의 Single Nucleotide Polymorphism(SNPs) 간의 원인적 연관성 및 흡연과 이들 유전자간의 상호작용이 류마티스 관절염 발병의 민감도에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

2. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 류마티스 관절염의 관련 유전자의 다형성을 조사하기 위한 DNA 확보를 위하여 혈액채취에 동의한 대상자 중 최종 1987년 미국류마티스학회에서 정한 진단기준에 부합하는 류마티스 관절염 환자 79명과 성별·연령별 짝짓기 된 건강한 일반인 72명을 대상으로 성, 연령, 흡연, 음주 등에 대한 기본 설문을 실시하였다. 이들의 정맥혈을 채취하여 genomic DNA를 분리하여 hMLH1 와 hMSH2 각각의 단일염기다형성(SNP)을 분석하였다.

2. 연구 방법

2.1. 각 유전자의 SNP 선정

HGVbase (<http://www.hgvbase.g2p.org/>)에 등록된 SNP를 포함하는 염기서열을 NCBI의 dbSNP에 입력후 BLAST search를 통해 각

Table 1. Primers and probes for amplification of Single Nucleotide polymorphisms(SNPs) region of each genes.

Gene	SNP region	Primer	Probe
hMLH1	미등록 exon 15 (G→A)	Biotin-5'-GCTGGATGGAATAAGCTACAG 5'-AGTGCCTTGTGTTCACGTTCT	① a: 5'-TCTTCCTTCAGCTGTAG ② b: 5'-TCTTCCTTTAGCTGTAG
hMSH2	미등록 promoter region (C→T)	Biotin-5'-ACCGAAACGAAGCCCTGGAAG 5'-GCTTTCGCCACGGCGACCAC	① : 5'-CACACCCAGTCAGCTTC ② : 5'-CACACCCAATCAGCTTC

a: match probe.
b: mismatch probe.

유전자의 intron 부위를 배제하고 게놈상의 DNA 변이의 근원적인 것을 반영할 것으로 기대되어지는 genomic DNA 염기서열을 선택하였다¹⁴⁾. 중합효소반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 위하여 설계한 각 유전자의 primer 및 probe를 Table 1에 제시하였다.

2.2. DASH(dynamic allele-specific hybridization)기법을 이용한 SNP분석

2.2.1 DNA 분리

Sodium heparine이 첨가된 전혈 1.5 ml에 cell lysis 용액을 넣은 후 실온에서 10분이상 방치하고, 2000 g로 10분간 원심분리한다. 다시 cell lysis 용액을 넣어 위의 과정을 반복한 후 상등액을 버리고 백혈구 pellet을 풀어준 후 nuclei lysis 용액을 첨가하여 잘 흔들여 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 보관한다(DNA Purification Kit, Promega).

2.2.2 PCR 증폭

추출된 DNA 10 ng을 중합효소반응에 사용하였다. DNA 증폭에 사용된 반응물은 deoxynucleotide triphosphate(dNTP), KCl, Taq DNA polymerase, Tris-HCl(pH 9.0), MgCl₂ 등이 적절하게 배합되어 있는 premixture에 각각의 DNA template과 biotin이 부착되어 있는 4 pmol의 상위 primer와 biotin이 부착되어 있지 않은 20 pmol의 하위 primer를 첨가한 후 eppendorf PCR machine을 이용하여 반응을 수행하였다. 증폭조건은 94 °C에서 30초, 각각의 유전자에 따라 50-55 °C 의 annealing 온도에서 10초 과정을 35회 반복하였다.

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

2.2.3 The DASH(dynamic allele-specific hybridization) assay

DASH 방법은 SNP이 없는 정상 염기서열과 변이가 있는 염기서열에 대한 두 가지 소식자(probe)를 이용하여 각각의 단일가닥 분리 온도(melting temperature: Tm)의 차이를 검색함으로써 변이의 유무, 즉 유전자형을 알아내는 방법이다. 우선 streptavidin이 부착되어있는 96 well에 biotin이 부착된 primer로 증폭한 PCR 산물과 DASH buffer(Hybaidd, 영국)을 각각 10 ul, 40 ul씩 넣고 실온에서 최소 1시간 이상 방치한 후, buffer를 제거한다. 그 다음으로 0.1 M NaOH 50 ul를 넣고 실온에 5분 방치하고 상등액을 제거한 후 다시 한번 0.1 M NaOH 50 ul를 넣고 세척한다.

이렇게 해서 well 내에는 biotin-streptavidin이 결합된 PCR 생성물만 남아있게 된다. 여기에 상보적인 probe와 DASH buffer로 1:10000으로 희석한 DNA 형광염색액(SYBR Green)을 함께 넣고 혼성결합(hybridisation)시킨다. 이때 microtiter plate의 뚜껑을 덮은 채로 PCR 기기(eppendorf, 미국)의 온도장하 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(Hybaidd, 영국)에 microtiter plate를 넣는다. DASH 기기 내에서 온도를 서서히 상승시켜 Tm을 모니터링하는데 단일가닥 분리시 혼성결합체에 결합되어 있던 SYBR Green이 분리되면서 나타나는 형광신호는 probe와 template DNA 간의 Tm을 나타낸다¹⁵⁾.

2.3. 통계 분석

유전자형의 빈도를 분석하기 위하여 SPSS10.0 통계 패키지용 소프트웨어를 사용한다. SNP의 빈도차이는 X²-test, multiple regression 등의 분석을 통하여 검정한다.

3. 결 과

1. 조사대상자의 일반적 특성(Table 2)

본 연구에서는 1987년 미국 류마티스학회에서 정한 진단기준에 부합하는 류마티스 관절염 환자를 모집하여 이들 모두 류마티스 관절염의 임상적 증후 및 혈액검사를 실시하여 류마티스 관절염 환자로 최종 진단하여 최종 총 73명을 분석하였다. 대조군은 문진 및 건강검진을 통해 류마티스 관절염 및 특정질환에 이환되지 않은 건강한 사람을 대상으로 선정된 류마티스 관절염 환자외 성별·연령별 짝짓기하여 최종 79명을 분석하였다. 이들 모두 류마티스 관절염의 관련유전자의 다형성을 조사하기 위한 DNA 분석에 동의하였다.

본 연구 대상자의 일반적 특성은 Table 1과 같았다. 연령의 경우 류마티스 관절염 환자 및 대조군의 경우 각각 평균 48.81±8.61 세, 및 45.98 ± 9.23 세로 두 집단간 차이가 없었다(t-test, p=0.053). 성별은 류마티스 관절염 환자 및 대조군 각각 여성의 경우 86.3% 및 89.9%로 여성이 남성보다 더 많았으며 성별차이는 관찰되지 않았다 (x²-test, p=0.617). 류마티스 관절염 환자 중 12.9%가 현재 흡연하고 있었으며, 27.5%가 평소 음주하고 있었고, 대조군 중 7.7%가 현재 흡연하고 있었으며, 45.6%가 평소 음주하고 있었다. 흡연태도 및 음주태도의 경우 류마티스 관절염환자군과 대조군에서 차이를 보였었다(x²-test, p > 0.05). 간접흡연(Environmental tobacco smoke; ETS)의 경우 주변(집, 직장, 및 기타)에 흡연하고 있는 사람이 있다고 응답한 경우 류마티스 관절염 환자 및 대조군간 차이는 관찰되지 않았다(x²-test, p=0.031). 몸무게 및 키의 경우 류마티스 관절염환자 및 대조군간 차이는 관찰되지 않았다(t-test, p > 0.05). BMI(몸무게(kg)/키(m)²)의 경우 류마티스 관절염 환자는 22.11±2.77, 대조군은 23.33± 2.74로 두 집단간 차이가 관찰되었다.

Table 2. General characteristics of study population at baseline

	No. of subj		
	Rheumatoid Arthritis Patients	Controls	
Age(mean ± S.D, years)	48.81 ± 8.61	45.98 ± 9.23	0.053**
>40	9(12.3)	16(20.3)	
40(= - <50	29(39.7)	39(49.4)	
>50	35(47.9)	24(30.4)	0.072***
Sex			
male	10(13.7)	8(10.1)	
female	63(86.3)	71(89.9)	0.617***
Smoking status			
Never	56(80.0)	60(92.3)	
Current smoking	9(12.9)	5(7.7)	
Ex-smoking	5(7.1)	0(0.0)	0.047***
ETS*			
No	26(40.6)	16(25.8)	
Yes	38(59.4)	46(74.2)	0.091***
Alcohol intake			
No	50(72.5)	31(54.4)	
Yes	19(27.5)	26(45.6)	0.041***
Duration of disease(year)	8.99 ± 6.24	-	
Weight (kg)	56.77 ± 9.14	57.86 ± 8.33	0.469**
Height (cm)	159.83 ± 7.39	157.49 ± 6.68	0.056**
BMI(Height/Weight ²)	22.11 ± 2.77	23.33 ± 2.74	0.011**
Total	73(100.0)	79(100.0)	

*: Environmental tobacco smoke.; **:using t-test; ***:using X² test

Table 3. Distribution of the Single Nucleotide polymorphisms of hMLH1 and hMSH2 gene and Estimated Risks among Rheumatoid Arthritis Patients (RA) and Controls

Genotype	Rheumatoid Arthritis Patients(n=73)	Controls (n=79)	Crude OR (95% CI)	Adjusted ORd (95% CI)
hMLH1				
GGa	13(17.8)	9(11.4)	1(reference)	1(reference)
GA	53(72.6)	49(62.0)	0.749 (0.294-1.906)	0.663 (0.221-1.991)
AA	7(9.6)	21(26.6)	0.231 (0.069-0.771)	0.183 (0.042-0.798)
GG or GA	66(90.4)	58(73.4)	1(reference)	1(reference)
AAc	7(9.6)	21(26.6)	0.298 (0.116-0.739)	0.256 (0.080-0.814)
hMSH2				
CCa	3(4.1)	0(0.0)	1(reference)	1(reference)
CT	29(39.7)	26(32.9)	0.000 (0.000-.)	0.000 (0.000-.)
TT	41(56.2)	53(67.1)	0.000 (0.000-.)	0.000 (0.000-.)
CC or CT	32(43.8)	26(32.9)	1(reference)	1(reference)
TT	41(56.2)	53(67.1)	0.629 (0.325-1.215)	0.776 (0.355-1.695)

a, Adjusted for age, sex, and smoking status.

2. 조사대상자의 hMLH1 및 hMSH2 유전자의 단일염기다형성과 류마티스 관절염간의 연관성

류마티스 관절염 환자와 성별·연령별 짝짓기 된 건강한 대조군의 DNA를 확보하여 류마티스 관절염과 hMLH1 및 hMSH2 유전자의 단일염기다형성간의 관련성을 조사하였다.

류마티스 관절염 환자 및 대조군의 hMLH1 유전자의 exon 15(G→A)번 내에 위치한 단일염기다형성의 유전자형의 빈도를 분석한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Wild type인 GG형, Heterozygous type인 GA형 및 Homozygous type인 AA형은 류마티스 관절염 환자의 경우 각각 17.8%, 72.6% 및 9.6%였으며, 대조군의 경우 11.4%, 62.0% 및 26.6%로 두 군간 hMLH1 유전자형 차이를 관찰할 수 있었다(p=0.022). 이를 성, 연령, 및 흡연력으로 보정한 후에도 hMLH1 GG형 혹은 GA형 군이 AA형에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험이 높게 관찰되었다(p < 0.05).

hMSH2 유전자의 promoter 부위 (C→T)에 위치한 단일염기다형성의 유전자형의 빈도를 분석한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Wild type인 CC형, Heterozygous type인 CT형 및 Homozygous type인 TT형은 류마티스 관절염 환자의 경우 각각 4.1%, 39.7%, 및 56.2%였으며, 대조군의 경우 0%, 32.9% 및 67.1%로 두 군간 hMSH2 유전자형 차이를 관찰할 수 없었다. 이를 성, 연령, 및 흡연력으로 보정한 후에도 hMSH2 CT형 혹은 TT형이 CC형에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험이 관찰되지 않았다(p > 0.05).

hMLH1 GG형 및 GA형을 가진 경우 전혀 주변(집, 직장, 레저를 할 경우에) 흡연하는 사람이 없는 경우가 그렇지 않은 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험은 관찰되지 않았으며, 연령, 성 및 흡연력으로 보정한 후에도 통계적으로 유의하지 않았다. 또한 hMLH1 AA형을 가진 경우 전혀 주변(집, 직장,

레저를 할 경우에 흡연하는 사람이 없는 경우가 그렇지 않은 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험은 관찰되지 않았으며, 연령, 성 및 흡연력으로 보정한 후에도 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 4).

Table 4. Distribution of the Single Nucleotide polymorphisms of hMLH1 gene and Estimated Risks among Rheumatoid Arthritis Patients (RA) and Controls according to smoking status and environmental smoking status(ETS)

	RA (n, %)	Controls (n, %)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	RA (n, %)	Controls (n, %)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)
Smokinga								
Never smoke	54(84.4)	43(89.6)	1	1	2(33.3)	17(100.0)	1	1
Current smoking	6(9.4)	5(10.4)	0.956 (0.273-3.344)	4.738 (0.492-45.606)	3(50.0)	0(0.0)	13.72 (0.000-)	21.75 (0.000-)
Ex-smoking	4(6.3)	0(26.6)	12.51 (0.000-)	27.40 (0.000-)	1(16.7)	0(0.0)	13.72 (0.000-)	13.87 (0.000-)
ETSb								
No	35(60.3)	32(74.4)	1	1	3(50.0)	14(73.7)	1	1
Yes	23(39.7)	11(25.6)	0.523 (0.221-1.241)	0.472 (0.178-1.253)	3(50.0)	5(26.3)	0.357 (0.054-2.384)	0.000 (0.000-)

a, Adjusted for age, sex and ETS, b, Adjusted for age, sex and smoking.

hMSH2 CC형 및 CT형을 가진 경우 전혀 주변(집, 직장, 레저를 할 경우에 흡연하는 사람이 없는 경우가 그렇지 않은 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험은 0.171(p < 0.05)로 연령, 성 및 흡연력으로 보정한 후에도 통계적으로 유의하였다. 그러나 hMSH2 TT형을 가진 경우 전혀 주변(집, 직장, 레저를 할 경우

에 흡연하는 사람이 없는 경우가 그렇지 않은 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험은 0.708(p > 0.05)이었으며, 연령, 성 및 흡연력으로 보정한 후에도 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 5).

Table 5. Distribution of the Single Nucleotide polymorphisms of hMSH2 gene and Estimated Risks among Rheumatoid Arthritis Patients (RA) and Controls according to smoking status and environmental smoking status(ETS)

	RA (n, %)	Controls (n, %)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	RA (n, %)	Controls (n, %)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)
Smokinga								
Never smoke	25(83.3)	19(90.5)	1	1	31(77.5)	41(93.2)	1	1
Current smoking	2(6.7)	2(9.5)	0.760 (0.098-5.896)	31.92 (0.000-)	7(17.5)	3(6.8)	3.086 (0.738-12.904)	4.520 (0.682-29.977)
Ex-smoking	3(10.0)	0(0.0)	12.34 (0.000-)	33.18 (0.000-)	2(5.0)	0(0.0)	14.82 (0.000-)	18.76 (0.000-)
ETSb								
No	16(59.3)	17(89.5)	1	1	22(59.5)	29(67.4)	1	1
Yes	11(40.7)	2(10.5)	0.171 (0.033-0.895)	0.091 (0.010-0.857)	15(40.5)	14(32.6)	0.708 (0.284-1.768)	0.520 (0.183-1.479)

a, Adjusted for age, sex and ETS, b, Adjusted for age, sex and smoking.

4. 고 찰

현재까지 류마티스 관절염과 연관이 있는 유전자다형성에 대한 연구는 사람의 조직 적합성 항원(human leukocyte antigen; HLA) 유전자에 집중되어 있으며, GST계열, 및 TNF- α 와 같은 비 HLA 유전자 다형성에 대한 연구도 시도되고 있다. 그러나 DNA 유전 손상 회복기전 관련 유전자의 다형성 특히 SNP에 대한 연구는 거의 초기상태라 할 수 있다. hMLH1 및 hMSH2 DNA MMR 단백질이 인간이 발암, 특히 HNPCC에 관련이 있다는 것은 잘 알려져 있지만 다른 암이나, 류마티스 관절염 발생에 어떠한 역할을 하는지는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 DNA 유전 손상 기전 중 복제 후 회복을 담당하는 MMR 기전의 주요 유전자인 hMLH1 및 hMSH2를 선정하여 이들의 genomic DNA 상에 존재하는 SNP와 류마티스 관절염간의 연관성을 조사하였다.

Kullmann 등(2000)¹⁶⁾은 류마티스 관절염환자, 퇴행성 관절염 환자, 건강한 사람, 및 대장암환자를 대상으로 hMLH1 및 hMSH2 단백질 발현정도를 조사한 결과 류마티스 관절염 환자의 활막 세포 내막에서 50% 이상, 퇴행성관절염 환자 활막 세포 내막에서 30% 미만, 건강한 사람의 대장에서 30-50%, 결장(colon carcinoma) 환자에서 10% 미만으로 류마티스 관절염 환자의 활막세포 내막에서 hMLH1과 hMSH2 단백질이 가장 많이 발현되었다고 보고하였고, 이는 활막 세포내에서 지속적인 염증반응에 의해 유전자 불안정이 유도될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 또한 Simelyte 등(2004)¹⁷⁾ 역시 류마티스 관절염 환자, 퇴행성 관절염 환자, 건강한 사람을 대상으로 hMSH2, hMSH3 및 hMSH6 단백질 발현을 조사한 결과 류마티스 관절염 환자의 활막세포에서 이들 DNA 손상 회복 단백질 발현이 높게 관찰되었으며, 지속적인 염증반응에서 생기는 산화적 손상에 의해 MMR 단백질 발현이 증가할 가능성을 보고하였다. 비록 류마티스 관절염 활막세포에서의 유전자 돌연변이에 의한 기능 장애로 인한 결과는 아직까지 잘 알려져 있지 않지만 유전자 손상이 DNA 손상회복 기전이 감당하기에는 너무 과도해 지는 상황에서 누적되어 생길 것으로 판단된다. 이때 hMLH1 유전자 이상은 hMLH1 단백질 발현이 적게 되어지고 MSI가 누적되어질 것으로 판단된다.

DNA 손상회복 기전 중 이형접합 복합체인 MutS α (hMSH2와 hMSH6)와 MutS β (hMSH2와 hMSH3)는 MMR 기전의 주요 역할을 담당하고 있는데, 이때 MutS α 는 단일염기 MMR 기전에, MutS β 는 삽입 혹은 결실 부위의 MMR 기전에 주요 작용을 하고 있는 것으로 알려져 있다^{18, 19)}. hMSH2 유전자는 두 이형접합 복합체각각의 주요 인자로 구성되어 있다^{10, 18-19)}. 이러한 DNA 손상회복 관련 유전자에 이상이 생길 경우 회복되지 않은 유전자 오류들이 누적이 되고, 궁극적으로 몇몇 암에서 발견되어지는 유전자 돌연변이가 누적되어진다^{10,18-19)}. 미세위성 DNA 돌연변이(microsatellite instability; MSI)는 대장암에서도 발견되어지며 돌연변이생성의 주요 증거로 사용되어지고 있다. MSI는 삽입 혹은 결실 등의 돌연변이를 초래하고, 이는 종종 유전자 손상회

복기전의 MMR 기전의 손상으로 인해 생긴다고 알려져 있다^{8, 20-24)}. 암에서 발생하는 DNA 손상과 손상회복기전은 류마티스 관절염에서의 DNA 손상과 손상회복기전을 이해하는데 도움을 줄 수 있다. 예를 들면 결장암의 경우 MSI는 삽입 혹은 결실 돌연변이를 일으키게 되는 돌연변이화 과정의 증거로 알려져 있으며, 이 MSI는 종종 DNA MMR 기능 장애로 인해 생긴다고 보고되고 있다. 이러한 MSI는 류마티스 관절염 활막세포에 많이 관찰되어 지고 있다. 본 연구에서는 hMSH2 유전자 SNP는 류마티스 관절염에 연관이 없는 것으로 나타났다. 그러나 hMLH1 유전자 SNP는 류마티스 관절염에 연관이 있는 것으로 나타났다.

앞에서 언급한 바와 같이 hMLH1 및 hMSH2는 DNA MMR 기전의 주요 유전자로 알려져 있으며, 특히 유전성 비용종증 대장암(hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)의 발병에 이들 유전자 변이가 주요한 역할을 한다고 알려져 있다⁷⁾. 그러나 이들 단백질 중 MSI 발생에 더욱 필수적인 단백질이 무엇인지는 명확하지 않으나, Chang 등 (2000)²⁵⁾은 MSI와 감소된 hMLH1 단백질 발현과 관련이 있다고 보고하였다. hMLH1 단백질과 hMSH2 단백질은 MMR 발생과정에서 각각 순차적으로 다른 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾. hMSH2 단백질은 손상된 DNA를 인지하는 역할을 담당하는 반면, hMLH1 단백질은 손상된 DNA 인지 복합체와 관련된 다른 단백질사이에서 상호 작용을 조정하는 기능을 담당한다²⁶⁾. 그러나 Xinarianos 등 (2000)²⁷⁾은 비소세포폐암(Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC) 조직에서 hMLH1과 hMSH2 단백질 발현을 비교 연구한 연구에서 두 단백질은 독립적으로 발현되며, 서로 관련이 없다고 보고하고 있다. 또한 이들은 암조직에서 hMLH1과 hMSH2 단백질의 감소가 발암과정에 나타나는 어떠한 임상병리학적 지표와도 관련이 없다고 보고하였다²⁷⁾.

프로모터(promoter) 부위는 비록 protein-coding 부위는 아니지만 유전자의 전사조절이 이루어지는 부위이기 때문에 이 부위 SNP의 특성을 파악하는 것도 중요하다. protein-coding 부위의 돌연변이가 HNPCC의 발병 원인의 상당부분을 차지하는데 반해 이부위에 아무런 변이가 나타나지 않는 환자도 발견되고 있다는 점에 주목하여 이러한 환자들의 경우는 이 유전자의 전사의 결손이 그 원인이 될 수 있다고 알려져 있다²⁸⁾. 뿐만 아니라 프로모터 부위의 점돌연변이는 유전적인 망막아(세포)종(retinoblastoma)를 유발한다는 연구도 제시되고 있어 전사 조절 부위의 구조를 명확히 파악할 필요성이 제시되고 있다.

본 연구에서 hMSH2 유전자의 promoter 부위에 존재하는 SNP(C>T)는 류마티스 관절염환자와 대조군간 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구 결과 조사된 hMSH2 유전자형 자체만으로는 류마티스 관절염 발생과는 관련이 없는 것으로 판단된다. 그러나 HNPCC 환자군을 조사한 타 연구에서는 CC 유전자형이 4.0%, CT 유전자형이 8.0%, TT 유전자형이 88.0%로 나타나 본 연구결과에서의 일반 대조군 및 류마티스 관절염 환자의 CT 유전자형에 비해 현저하게 낮았고 TT 유전자형은 높게 분석되었다. HNPCC 환자의 경우는 일반대조군 및 류마티스 관절염 환자와 달리 C 대립유전자(allele) 결실이 많기 때문에 HNPCC 환자

군의 위험인자 분석 연구시에 생물학적 표지자로서의 가능성을 보여주고 있다²⁹⁾.

Lee 등(2003)¹⁰⁾은 류마티스 관절염환자의 활막세포 및 말초혈액과 골관절염 환자 활막세포 조직을 비교한 연구에서 류마티스 관절염 환자의 활막세포에서 다수의 MSI가 존재한다고 보고하고 있다. 한편 산화적 손상(oxidative stress)은 DNA 손상회복 기전을 억제할 수 있다고 알려져 있다³⁰⁾. 또한 Lee 등 (2003)¹⁰⁾은 건강한 사람, 골관절염 환자, 및 류마티스 관절염 환자의 결합조직세포 유사 활막세포(fibroblast-like synoviocyte; FLS)에서 hMSH6, hMSH3, SSMH2, hMLH1, 및 hPMS2 단백질 발현을 관찰한 결과 류마티스 관절염 환자의 FLS에서 hMSH6, hMLH1의 발현은 낮고, hMSH3 및 hMSH2의 발현은 높았으나 각 군당 차이가 없는 것으로 보고하여 MMR 유전자 자체의 효과보다는 MMR 유전자와 환경간의 상호작용에 의한 손상에 주목하였다. 이들의 연구에 따르면¹⁰⁾ NO 및 H₂O₂ 노출에 의한 산화손상(oxidative stress)에 의해 류마티스 관절염 환자의 FLS가 다른 대조군에 비해 hMSH2 및 hMSH3의 높은 발현과 hMSH6의 낮은 발현을 보고하였으며 hMSH2를 제외한 다른 단백질 발현은 용량-반응 관계를 보인 것으로 보고하고 있다.

담배는 40여종의 발암물질을 포함한 4,000여 종의 화학물질로 이루어져있으며, 몇몇 물질의 경우는 DNA adduct를 발생시켜 DNA 복제시 DNA 손상을 유발하게 되고, 이러한 손상이 복구되지 않으면 궁극적으로 유전자 돌연변이를 초래하게 된다³¹⁻³⁴⁾. 또한 산화적 손상 대표물질인 NO는 류마티스 관절염과 궤양성 대장염과 같은 만성 염증성 질환에 많이 존재하게 되는 데 국부적으로 발생하는 NO가 돌연변이를 유발시키고, 이렇게 발생된 유전자 손상 및 돌연변이는 암발생은 되지 않을지라도 류마티스 관절염 활막세포 내막에 많이 존재하게 된다³⁵⁻³⁷⁾. 이때 MMR 기전은 이러한 손상을 복구하는 대표적인 DNA 손상복구 기전이다. MMR 기전이 잘못될 경우 미소부소체(microsatellite) 서열 내에 짧은 반복 서열이 더 많아지거나 없어지는 현상인 MSI(microsatellite instability)가 발견되는데 이 MSI는 대장암, 위암, 폐암 등으로 진단된 암환자 및 류마티스 관절염 활막 세포에서 발견되어 지고 있다^{38, 39)}. 따라서 MSI는 MMR 기전의 손상 정도를 판단하는 지표로 활용되어지기도 한다⁸⁾.

Kouso 등 (2008)⁴⁰⁾과 Chang 등 (2000)²⁵⁾은 MSI가 많은 환자에서 hMLH1 발현이 낮았고, hMLH1 결손이 MSI와 유의한 연관성을 나타냈다고 보고하였지만, hMSH2와는 관련이 없는 것으로 보고하였다. 그에 반해 흡연에 의한 손상 복구는 hMSH2와 관련이 있는 것으로 보고하고 있다. hMLH1 단백질이 낮게 발현되는 이유로서는 hMLH1 promoter 부위의 과메틸화에 의해 hMLH1 단백질 발현이 비활성화되는 것이고 이 때문에 궁극적으로 MSI가 생긴다는 것이다^{40, 41)}. 그러나 Yu 등 (2006)⁷⁾은 대장용종 환자를 대상으로 hMLH1 -93G>A, hMLH1I219V 및 hMSH6 G39E 유전자 다형성을 조사한 환자대조군 연구에서 흡연이 MMR 기전의 손상과 관련이 있으며, 특히 hMLH1 -93G>A 유전자 다형성에 따라 흡연이 대장용종 발생에 미치는 위험이 증가하는 것으로 보고하였다.

본 연구결과 hMSH2 유전자와 흡연 상태 및 간접흡연과 연관이 있는 것으로 나타났으나, hMLH1 유전자는 흡연상태 및 간접흡연과 연관이 없는 것으로 나타났다.

많은 연구에서 흡연의 건강상의 위해를 경고하고 있으며, 발암성, 면역계 이상 및 다른 감염질환에 영향을 미친다고 보고되고 있다. 특히 류마티스 관절염의 발병 및 중증도의 위험요인으로 보고되고 있다¹⁾. Criswell 등 (2006)⁴²⁾은 흡연은 질환 진행 과정에서 지속적으로 역할을 하기보다는 침묵적 질환의 초기 단계에 더욱 중요한 영향을 미친다고 보고하고 있어, hMSH1 SNP TT형 유전자를 가진 비흡연자에 비해 현재 흡연자가, 현재 흡연자보다 과거 흡연자에게서 류마티스 관절염 발병 위험이 더 큰 본 연구 결과를 뒷받침하고 있다. 즉 류마티스 관절염 발병 초기에 흡연으로 인해 발생한 DNA상의 산화적 손상이 hMSH2 유전자의 homozygous variant형을 가진 사람들에게서 DNA MMR 기전에 궁극적으로 효율을 낮추며 DNA 손상회복기전에 과부하를 초래하며 궁극적으로 MSI를 누적시키면서 류마티스 관절염 발병 위험을 높이게 될 수 있다.

본 연구결과 hMSH2 유전자의 wild type CC형 및 heterozygous variant CT형을 가지고 있으면서 현재 흡연을 하고 있거나 과거에 흡연경험이 있는 사람이 흡연을 했던 경험이 없는 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험이 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다. hMSH2 유전자의 homozygous variant TT형을 가지고 있으면서 현재 흡연을 하고 있거나 과거에 흡연경험이 있는 사람이 흡연을 했던 경험이 없는 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험이 높게 나타났으며, 연령, 성, 및 간접흡연을 보정한 후에도 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다. 이는 본 연구대상자들의 대부분이 여성들로서(류마티스 관절염 환자: 86.3%, 대조군: 89.9%) 우리나라 흡연자의 대부분이 남성임을 고려해 볼 때 본 연구에서 흡연에 따른 류마티스 관절염과 hMSH2 유전자간의 연관성을 밝히기에는 한계가 있었다. 이를 보완하기 위해 주변(집, 직장, 및 기타)에서 흡연하는 사람이 있는지 여부에 따라 류마티스 관절염과 hMSH2 유전자간의 연관성을 조사해 보았다. hMSH2 유전자의 wild type CC형 및 heterozygous variant CT형을 가지고 있으면서 주변(집, 직장, 및 기타)에서 흡연하는 사람이 있는 사람이 그렇지 않은 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험이 성, 연령, 및 흡연력을 보정한 후에 0.091배로 나타났으며, 이는 통계적으로 유의하였다. 그러나 hMSH2 유전자 homozygous variant TT형을 가지고 있으면서 주변(집, 직장, 및 기타)에서 흡연하는 사람이 있는 사람이 그렇지 않은 사람에 비해 류마티스 관절염에 이환될 위험이 성, 연령, 및 흡연력을 보정한 후에 0.520배로 나타났으며 이는 hMSH2 유전자의 wild type CC형 및 heterozygous variant CT형을 가지고 있는 사람에 비해 간접흡연에 따른 류마티스 관절염 이환에 더 위험할 것으로 보이나, 이는 통계적으로 유의하지 않았다.

본 연구에서는 hMSH2 유전자는 자체로는 류마티스 관절염 발병에 연관이 없었으나 흡연 혹은 간접흡연과 상호작용을 통해 류마티스 관절염 이환에 민감하게 작용할 것으로 판단되어진다.

Yu 등 (2006)⁷⁾은 hMLH1 -93G>A, hMLH1 I219V 및 hMSH6 G39E 유전자 다형성과 대장 용종(colorectal polyps)간의 연관성을 조사한 결과 이들 유전자들은 직접적인 관련은 없는 것으로 보고하였으나, 흡연에 의한 유전자 손상과 특정 유전자 다형성 hMLH1 -93G>A이 대장 용종과 연관이 있을 수 있다는 사실을 보고하였다. 그러나 Lipkin 등(2004)⁴³⁾은 산발성 대장암과 hMLH1 I219V 및 D132H 유전자 다형성간의 연관성을 연구한 환자 대조군 연구에서 hMLH1 I219V은 직접적인 연관이 없으나 hMLH1 D132H variant와는 직접적인 연관이 있다고 보고하였으며, 특히 hMLH1 D132H variant는 높은 MSI 발생과는 연관이 없는 것으로 보고하였다. 따라서 앞선 연구결과들은 하나하나의 hMLH1 유전자 다형성이 전체 MMR 기전의 결핍에 원인으로 작용하는 것이 아니고, 몇몇 hMLH1 유전자 다형성이 DNA 손상 회복기전의 역량을 감소시키고, 흡연 노출에 의해 발생하는 DNA 손상을 복구하려는 DNA MMR 효율을 감소시키는 것으로 보고하여, hMLH1 SNP가 류마티스 관절염과 연관이 있으며 흡연이 hMLH1 SNP 유형에 따라 류마티스 관절염의 민감도에 영향을 미칠 수 있는 가능성을 보여준 본 연구결과를 뒷받침하고 있다.

본 연구는 앞서 언급한 바와 같이 연구대상자의 대부분이 여성으로서 우리나라 통계상 흡연자의 대부분이 남성이라는 점을 감안할 때 흡연에 따른 류마티스 관절염과 hMLH1 및 hMSH2간의 연관성을 파악하기에는 제한이 있었다. 또한 다양한 hMLH1 및 hMSH2 유전자 다형성을 조사하지 못한 한계점이 있다. 그러나 본 연구결과는 류마티스 질환의 예방 및 치료효과의 효율성을 높일 수 있는 예비자료 및 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료되며 이후 류마티스 관절염과 DNA 손상회복 유전자의 SNP를 조사하기 위하여 대규모 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

“이 연구는 2004년도 제주대학교발전기금 효천학술연구기금의 지원에 의해서 이루어 졌음”

참 고 문 헌

- 1) Matthey DL, Dawes PT, Fisher J, Brownfield A, Thomson W, Hajeer AH, Ollier WE. Nodular disease in rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1/TNF gene interaction. *J Rheumatol*. 2002 Nov;29(11):2313-8.
- 2) Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul 20; Boland CR, Sato J, Saito K, Carethers JM, Marra G, Laghi L, Chauhan DP. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev*. 1998; 22(5): 377-382.
- 3) Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today*. 1999 Dec;5(12):538-43.
- 4) Gupta S, Gellert M, Yang W. Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutS β bound to unpaired DNA loops. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Dec 18. doi: 10.1038/nsmb.2175.
- 5) Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*. 2001;37(3):241-83.
- 6) Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedayati M, Grossman L, Mohrenweiser H, Wei Q. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis*. 2002 Feb;23(2):295-9.
- 7) Yu JH, Bigler J, Whitton J, Potter JD, Ulrich CM. Mismatch repair polymorphisms and colorectal polyps: hMLH1-93G>A variant modifies risk associated with smoking. *Am J Gastroenterol*. 2006 Jun;101(6):1313-9.
- 8) Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998; 58(22): 5248-5257.
- 9) Wong NA, Harrison DJ. Colorectal neoplasia in ulcerative colitis—recent advances. *Histopathology*. 2001; 39(3): 221-234. Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 283(1): C148-154.
- 10) Lee SH, Chang DK, Goel A, Boland CR, Bugbee W, Boyle DL, Firestein GS. Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis. *Immunol*. 2003; 170(4): 2214-2220.
- 11) Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(20): 10895-10900.
- 12) Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest*. 1995; 96(3): 1631-1638.
- 13) Lo SF, Wan L, Huang CM, Lin HC, Chen SY, Liu SC, Tsai FJ. Genetic polymorphisms of the DNA repair gene UNG are associated with the susceptibility of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2011 Dec 3.
- 14) Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST. dbSNP: a

- database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):352-5.
- 15) Prince JA, Feuk L, Howell WM, Jobs M, Emahazion T, Blennow K, Brookes AJ. Robust and accurate single nucleotide polymorphism genotyping by dynamic allele-specific hybridization (DASH): design criteria and assay validation. *Genome Res.* 2001 Jan;11(1):152-62.
 - 16) Kullmann F, Widmann T, Kirner A, Jüsten HP, Wessinghage D, Dietmaier W, Rüschoff J, Gay S, Schö lmerich J, Müller-Ladner U. Microsatellite analysis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59(5): 386-389.
 - 17) Simelyte E, Boyle DL, Firestein GS. DNA mismatch repair enzyme expression in synovial tissue. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63(12): 1695-1699.
 - 18) Loeb LA, Springgate CF, Battula N. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res.* 1974; 34(9): 2311-2321.
 - 19) Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991; 51(12): 3075-3079. 8:234(2):177-86.
 - 20) Boland CR, Sato J, Saito K, Carethers JM, Marra G, Laghi L, Chauhan DP. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev.* 1998; 22(5): 377-382.
 - 21) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993; 260(5109): 816-819.
 - 22) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993; 363(6429): 558-561.
 - 23) Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993; 75(5): 1027-1038.
 - 24) Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystr-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993; 75(6): 1215-25.
 - 25) Chang JW, Chen YC, Chen CY, Chen JT, Chen SK, Wang YC. Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(5): 1639-1646.
 - 26) Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21(6): 1174-1179.
 - 27) Xinarianos G, Liloglou T, Prime W, Maloney P, Callaghan J, Fielding P, Gosney JR, Field JK. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 2000; 60(15): 4216-4221.
 - 28) Iwahashi Y, Ito E, Yanagisawa Y, Akiyama Y, Yuasa Y, Onodera T, Maruyama K. Promoter analysis of the human mismatch repair gene hMSH2. *Gene.* 1998 Jun 15;213(1-2):141-7.
 - 29) Shin KH, Shin JH, Kim JH, Park JG. 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.* 2002 Jan 1;62(1):38-42. Erratum in: *Cancer Res* 2002 Apr 15;62(8):2445.
 - 30) Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature.* 1994; 371(6492): 75-80.
 - 31) Hoffmann D, Hecht SS. Advances in tobacco carcinogenesis. In: Cooper CS, Grover PL, editors, *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I*, Springer-Verlag Berlin, 1990; 63-102.
 - 32) Doherty KM, Sharma S, Uzdilla LA, Wilson TM, Cui S, Vindigni A, Brosh RM Jr. RECQ1 helicase interacts with human mismatch repair factors that regulate genetic recombination. *J Biol Chem.* 2005; 280(30): 28085-28094.
 - 33) Elliott B, Jasin M. Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(8): 2671-2682.
 - 34) Mu D, Tursun M, Duckett DR, Drummond JT, Modrich P, Sancar A. Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(2): 760-769.
 - 35) Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1996; 111(4): 871-885.
 - 36) Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest.* 1995; 96(5): 2357-2363.
 - 37) Grabowski PS, Wright PK, Van 't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. Immunolocalization of inducible

- nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol*. 1997; 36(6): 651-655.
- 38) Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83(14): 1024-1027.
- 39) Lawes DA, SenGupta S, Boulous PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2003; 29(3): 201-212.
- 40) Kouso H, Yoshino I, Miura N, Takenaka T, Ohba T, Yohena T, Osoegawa A, Shoji F, Maehara Y. Expression of mismatch repair proteins, hMLH1/hMSH2, in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *J Surg Oncol*. 2008; 98(5): 377-383.
- 41) Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW, Chen JT, Shih CM, Chen CY. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest*. 2003; 111(6): 887-895.
- 42) Criswell LA, Saag KG, Mikuls TR, Cerhan JR, Merlino LA, Lum RF, Pfeiffer KA, Woehl B, Seldin MF. Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older Caucasian women. *Ann Rheum Dis*. 2006 Sep;65(9):1163-7. Epub 2006 Aug 3.
- 43) Lipkin SM, Rozek LS, Rennert G, Yang W, Chen PC, Hacia J, Hunt N, Shin B, Fodor S, Kokoris M, Greenson JK, Fearon E, Lynch H, Collins F, Gruber SB. The MLH1 D132H variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004; 36(7): 694-699.