



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

아스피린 과민성 두드러기 환자에서
프로스타글란딘 E2 수용체 아형 EP4
유전자의 다형성에 관한 연구

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

신혜정

아스피린 과민성 두드러기 환자에서
프로스타글란딘 E2 수용체 아형 EP4
유전자의 다형성에 관한 연구

지도교수 박 해 심

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2010년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의생명과학과/분자의학전공

신 혜 정

신혜정의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 박 해 심 인

심사위원 김 승 현 인

심사위원 정 선 용 인

아주대학교 대학원

2009년 12월 21일

아스피린 과민성 두드러기 환자에서 프로스타글란딘 E2 수용체

아형 EP4 유전자의 다형성에 관한 연구

연구배경 및 목적 : 아스피린 과민증 만성 두드러기 (aspirin - intolerant chronic urticaria, AICU)는 만성 두드러기 환자들 중 30~40% 에서 관찰된다. 아스피린 과민증 만성 두드러기의 병인기전은 명확하게 알려져 있지 않지만, 비만 세포의 활성화와 염증 매개체인 히스타민의 배출 조절이 주요 병인기전으로 보고되고 있다. 프로스타글란딘 E2는 그 수용체인 프로스타글란딘 E2 수용체 아형 EP4 (prostaglandin E2 receptor subtype EP4 gene, *PTGER4*) 를 매개로 하여, 세포 안의 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준을 증가시키고 비만 세포의 매개체인 히스타민 유리능을 억제 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 아스피린 과민성 두드러기와 *PTGER4* 유전자 다형성 (polymorphism) 과의 연관성 연구로 아스피린 과민성 두드러기의 병인기전을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법 : 아스피린 과민증을 동반한 만성 두드러기 (aspirin - intolerant chronic urticaria, AICU) 환자 141명, 아스피린 과민증을 동반하지 않은 만성두드러기 (aspirin - tolerant chronic urticaria, ATCU) 환자 153명, 그리고 정상 대조군 (normal healthy control, NC) 174명의 한국인을 대상으로

PTGER4 유전자 다형성 중, 특히 단일 염기 다형성 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)의 case - control 연관성 연구를 수행하였다. *PTGER4* 유전자 다형성에 따른 기능 차이를 규명하기 위해 luciferase reporter assay 와 전기 이동성 교대 분석 실험(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)를 수행하였고, 아스피린 과민성 두드러기 환자의 말초혈액 호염기구로부터 유전자다형성에 따른 히스타민 유리능을 비교하였다.

결과 : *PTGER4* 유전자의 -1254A>G 다형성의 변이 대립형질의 빈도가 정상 대조군에 비해 아스피린 과민성을 동반한 만성두드러기 환자군에서 유의하게 높았다 ($p=0.032$, for AICU vs. NC). 인간 비만 세포주인 HMC - 1 을 이용한 luciferase reporter assay 결과, -1254 GG 대립형질을 가진 promoter reporter construct에서 프로모터 활성도가 유의하게 낮았다 ($p=0.003$). *PTGER4*와 그 전사인자인 SP1을 공동세포이입 (cotransfection) 결과, 우성 대립인자인 AA 유전자형을 가진 promoter reporter construct는 약 2.8배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되었고 ($p=0.003$), 열성 대립인자인 GG 유전자형을 가진 promoter reporter construct는 약 2.5배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되었다. 또한 전사인자인 MAZ를 공동세포이입 한 결과 유전자형에 따른 차이 없이 약 1.7배정도 전사조절 부위의 활성이 증가되었다 ($p=0.005$). 또한 아스피린 과민증 두드러기(aspirin - intolerant urticaria, AIU)환자들의 말초혈액 호염기구(basophil)에서 항 인간 goat IgE 항체 ($10\mu\text{g/mL}$)로 자극 후 히스타민 유리능과 *PTGER4* 유전자의 -1254A>G 다형성 사이의 관련성을 비교한 결과, -1254 AG 대립 유전자와 -1254 GG 대립 유전자를 가진

환자들이 -1254 AA 대립 유전자를 가진 환자들보다 히스타민 유리능이 유의하게 높았다 ($p=0.048$). 한편 *PTGER4* 1927G>A 다형성의 경우, 1927G>A 대립 유전자형 빈도는 아스피린 과민성 만성 두드러기 환자에서 정상대조군에 비해 유의하게 낮았다 ($p=0.031$).

결론 : 본 연구결과는 *PTGER4* -1254 GG 대립 유전자는 SP1이나 MAZ와 같은 전사인자들의 결합능이 변화되어 *PTGER4* 유전자의 프로모터 활성화에 영향을 주고, 궁극적으로는 히스타민 유리능을 증가시켜 아스피린 과민성 두드러기의 발생에 관여할 가능성을 시사한다.

핵심어: 아스피린 과민성, 두드러기, 프로스타글란딘 E2, *PTGER4* (프로스타글란딘 E2 수용체 아형 EP4), 단일염기다형성

차 례

국문요약.....	i
차 례	iv
그림 차례.....	vi
표 차례.....	vii
약 어.....	viii
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법	4
A. 프로스타글란딘 E2 수용체(<i>PTGER4</i>)의 단일염기다형성 연관성 연구....	4
1. 직접염기서열 분석을 이용한 프로스타글란딘 E2 수용체의 단일염기 다형성의 조사.....	4
2. 연구 대상 및 표현형.....	5
3. 유전자형 분석.....	5
B. 프로스타글란딘 E2 수용체의 단일염기다형성의 기능적 연구.....	11
1. 세포배양.....	11
2. 역전사 중합효소연쇄반응(RT - PCR)을 이용한 다양한 세포주에서의 <i>PTGER4</i> 유전자의 발현	11
3. Promoter construct 제작과 luciferase repoter assay	14
4. 전기 이동성 교대 분석 실험 (Electrophortic mobility shift assays, EMSA)	15

5. 공동세포이입 (cotransfection)을 이용한 <i>PTGER4</i> promoter활성에서 의 전사 인자의 영향.....	17
6. 호염기구의 히스타민 유리능	17
7. 통계처리.....	19
III. 결과	20
A. 프로스타글란딘 E2 수용체유전자의 유전자 다형성 조사.....	20
B. 프로스타글란딘 E2 수용체유전자의 단일염기다형성의 기능적 연관성 연 구	22
1. 연구대상의 임상적 특성	22
2. <i>PTGER4</i> 유전자의 유전자형 빈도.....	23
C. 프로스타글란딘 E2 수용체유전자의 단일염기다형성의 기능학적 연구..	25
1. <i>PTGER4</i> promoter 부위 - 1254 A>G의 전사활성 조절의 효과	25
2. <i>PTGER4</i> - 1254 A>G 다형성 부위와 전사 인자 결합의 확인	28
3. 공동세포이입(cotransfection)을 통한 <i>PTGER4</i> promoter 부위의 전 사인자(MAZ, SP1)의 영향.....	31
4. <i>PTGER4</i> - 1254 A>G 다형성>G 다형성에 따른 호염기구 히스타민 유리능	34
IV. 고찰	36
V. 결론	42
참 고 문 헌	43
ABSTRACT.....	51

그림 차례

Fig. 1. Schematic representation of <i>PTGER4</i> gene.....	7
Fig. 2. Primer pairs used for <i>PTGER4</i> expression and expression of <i>PTGER4</i> mRNA in various cell lines.....	13
Fig. 3. Effect of -1254A>G polymorphism on the transcription activity of <i>PTGER4</i> promoter.....	26
Fig. 4. Functional effect of the -1254A>G polymorphism on transcriptional activity.....	29
Fig. 5. Effect of SP1 on the transcription activity of <i>PTGER4</i> promoter....	32
Fig. 6. Effect of MAZ on the transcription activity of <i>PTGER4</i> promoter...	33
Fig. 7. <i>Ex vivo</i> functional study of <i>PTGER4</i> -1254 A>G polymorphism.	35

표 차례

Table 1. Clinical characteristics of the study subjects.....9

Table 2. Amplifying and extension primers of the candidate genes for SNP genotyping..... 10

Table 3. The SNPs within *PTGER4* gene identified in 24 normal healthy volunteers..... 21

Table 4. The genotype and allele frequencies of *PTGER4*..... 24

약어

AIA : Aspirin - intolerant asthma

AICU : Aspirin - intolerant chronic urticaria

ATCU : Aspirin - tolerant chronic urticaria

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

COX : Cyclooxygenase

EMSA : Electrophoretic mobility shift assay

MAF : Minor allele frequency

MAZ : MYC - associated zinc finger protein

PTGER1 : Prostaglandin E2 receptor subtype EP1 gene

PTGER2 : Prostaglandin E2 receptor subtype EP2 gene

PTGER3 : Prostaglandin E2 receptor subtype EP3 gene

PTGER4 : Prostaglandin E2 receptor subtype EP4 gene

SNP : Single nucleotide polymorphism

SP1 : Specificity protein 1

3' - UTR : 3' - untranslated region

5' - UTR : 5' - untranslated region

I. 서 론

아스피린(acetylsalicylic acid, ASA)은 살리실산염(salicylate)으로부터 유도된 약으로 오늘날 진통, 해열, 항염증제 등 광범위하게 쓰이고 있다(Szczeklik 등, 2003). 그러나 아스피린이나 다른 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 과민반응에 의해 천식, 두드러기 및 혈관부종을 악화시킨다(Stevenson, 2004; de Weck, 2006).

아스피린 과민증(aspirin-intolerance)은 천식 환자 중 10~20%에서, 만성 두드러기 환자 중 30~40%에서 관찰된다(Grattan, 2003; Mastalerz 등, 2004; Jenneck 등, 2007). 아스피린 과민성 천식(aspirin-intolerant asthma, AIA)의 병인기전은 아스피린에 의한 cyclooxygenase(COX)효소의 억제로 인한 아라키돈산에서 프로스타글란딘의 생성 억제와 류코트리엔의 과생성 등이 관여하는 것으로 보고되었다(Szczeklik, 1990; Szczeklik 등, 2003). 반면, 아스피린 과민성 두드러기의 병인기전은 아직 확실히 밝혀지지 않는 않지만, 아스피린 과민성 두드러기 환자에서 아스피린에 대한 특이 IgE 항체가 있다는 증거가 보고되었고, 혈청 내 자가항체와의 관련성도 보고되었다(Ye 등, 2005). 또한 한국인 만성 두드러기 환자를 대상으로 한 연구에서 아토피는 아스피린 과민성 만성 두드러기의 위험 요소이고, 만성두드러기의 30~50%의 환자를 자가 혈청 피부반응 검사를 통해 자가 혈청을 진피 내에 주사하였을 때 팽진과 발적 반응 일어나는 자가 면역성 두드러기임이 보고되었다(Han 등, 2003; Jang, 2005; Choi 등, 2009).

아스피린 과민성 만성 두드러기는 아스피린 내성 만성 두드러기와 비교하였을 때 아토피 경향이 높고, 젊은 연령군이며, 전신 스테로이드 투여량이 높다고 알려져 있다(Ye 등, 2005).

아스피린 과민성 두드러기의 병인기전은 COX 억제 기전으로 설명되기도 한다. 아스피린이 아라키돈산 대사에서 COX경로를 차단함으로써 5-리폭시게나아제(5-lipoxygenase : 5-LO) 경로로 전환되거나 류코트리엔 생성을 억제하는 프로스타글란딘 E₂의 감소가 류코트리엔 과잉 생산과 관련있는 것으로 생각된다. 즉 프로스타글란딘 E₂가 5-LO 경로의 대사산물인 류코트리엔생산을 조절하여 아스피린 과민성 발생에 중요한 역할을 할 것으로 시사되었다(Stevenson, 2004). 연구 결과에 따르면 아스피린 과민성 두드러기는 비만 세포의 탈 과립으로 화학매개물질인 히스타민과 함께 분비된 시스테인 류코트리엔이 유리되어 호산구의 활성화에 영향을 초래하는 것으로 보고 되었다(Tilley 등, 2001). 또한 아스피린 과민성 급성 두드러기 환자에서 중성구 활성화의 마커인 혈청내 myeloperoxidase(MPO)가 증가되어 있고, 혈청 내 MPO 와 인터루킨 - 8 (IL - 8)과 인터루킨 - 18 (IL - 18)이 유의한 관계가 있다는 것이 보고되어, 호중구의 활성화가 아스피린 과민성 두드러기의 병인 기전에 영향을 끼칠 것이라는 것을 시사하고 있다(Choi 등, 2007).

프로스타글란딘은 면역 반응 동안에 면역세포를 활성화 시키는 중요한 지질매개인자로서, 프로스타글란딘 E₂는 사람 비만 세포에서 면역글로블린 E(IgE)에 의한 히스타민과 류코트리엔 C₄의 유리를 저해시킨다(Peachell 등, 1988). 프로스타글란딘 E₂에 대한 수용체는 *PTGER1* (EP1), *PTGER2* (EP2), *PTGER3* (EP3), *PTGER4* (EP4)로 4종류가 있는데, 이 중 프로스타글란딘 E₂

수용체 아형 EP4 (prostaglandin E2 receptor subtype EP4 gene, *PTGER4*)는 세포 안의 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준을 증가 시켜 세포 신호전달을 조절하여 비만 세포의 매개체인 히스타민 유리능을 억제한다(Shuh 등, 1999). 또한 *PTGER4*는 COX - 2 mRNA의 안정성과 양을 조절한다(Regan, 2003).

PTGER4 유전자의 단일 염기다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)이 비만 세포의 기능과 신호전달을 조절하는 *PTGER4*와 COX를 저해시키는 아스피린과 관련이 있고, 저해된 프로스타글란딘 E2가 비만 세포의 매체 분비를 촉진시켜, 아스피린 과민성 두드러기의 병인기전과의 관련성이 있다는 가정하에 본 연구를 하게 되었다.

본 연구는 *PTGER4* 유전자의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)과 아스피린 과민성 만성 두드러기 (AICU)와의 연관성 연구로 *PTGER4* 유전자 다형성에 따른 아스피린 과민성 만성 두드러기의 병인기전을 이해하고자 하였다. *PTGER4* 유전자의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)에 따른 세포 내 전사 활성 조절을 규명하고 아스피린 과민증의 병인기전과 아스피린 과민증 두드러기 환자의 유전적 기작을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 프로스타글란딘 E2 수용체(*PTGER4*)의 단일염기다형성 연관성 연구

1. 직접염기서열 분석을 이용한 프로스타글란딘 E2 수용체의 단일염기다형성의 조사

연구 대상의 genomic DNA의 추출은 Puregene DNA Purification Kit(Gentra systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 말초 혈액으로부터 분리하였다. *PTGER4* 유전자 염기서열분석은 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 보고 되어있는 *PTGER4* 유전자 염기서열 (NM_00958)을 기초로 확인하였다. *PTGER4* 유전자 전사조절 부위(Promter)를 포함한 엑손1과 5' - 비 번역부위(Exon 1, 5' - Untanslated region: 5' - UTR) 2Kb와 3' - 비 번역부위를 포함 하는 모든 엑손부위(3' - Untanslated region: 3'-UTR, Exon 2, Exon 3)를 정상대조군 24명의 genomic DNA 시료를 대상으로 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)를 이용하여 분석하였다. 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위한 primer와 반응 조건은 김상헌 등(2007)이 제시했던 것을 사용하였다. 분석 결과는 Choromas (Technelysium, Tewantin, Australia) 프로그램으로 확인하였고, 정상대조군의 염기서열 비교를 위해 Multalin Interface Page (INRA, Toulouse, France) 프로그램을 사용하였다. 염기서열 비교분석 결과 소수 대립유전자의 빈도가 (Minor allele frequency : MAF)

최소 5% 이상인 유전자 변이를 단일 염기 다형성 (single nucleotide polymorphism: SNP)으로 정하였다 (Fig. 1). 소수대립유전자의 빈도가 5% 이상인 단일염기다형성은 - 1598T/C, - 1529T/C, - 1307C/T, - 1254A/G, 1927G/A이었다 (Table 1).

2. 연구 대상 및 표현형

대상 환자는 아주대학교병원 알레르기 클리닉을 내원하여 만성두드러기로 진단받은 환자 중 천식을 동반된 경우를 제외하였고, 아스피린 500mg (Rhonal®; KunWha Pharmaceutical Co., Seoul, Korea) 1정을 이용한 경구 유발시험에 양성 반응을 나타낸 아스피린 과민증을 동반한 만성 두드러기 (aspirin-intolerant chronic urticaria, AICU) 환자 141명과, 대조군으로 아스피린 과민증을 동반하지 않은 만성 두드러기 (aspirin-tolerant chronic urticaria, ATCU) 환자 153명으로 분류하였다. 정상 대조군 (normal healthy control, NC)은 알레르기 질환이 없으면서 알레르기 피부단자시험 결과가 음성이고, 두드러기 질환의 병력이 없는 174명을 등록하였다. 연구에 참여한 모든 환자는 아주대병원의 임상시험심의위원회 (IRB)에서 승인한 바에 따라 고지 후 동의서를 작성하였다. 본 연구에 참여한 정상 대조군과 환자군에 대한 특성은 Table 1에 제시하였다.

3. 유전자형 분석

5개 단일염기다형성 (- 1598T/C, - 1529T/C, - 1307C/T, - 1254A/G, 1927G/A)에 대한 LD 패턴 조사한 결과, - 1254A/G과 1927G/A가 tagging

SNP으로 선정되어 유전자형 분석을 진행하였다. *PTGER4* 유전자의 각 SNP 유전자형 분석은 primer extension 반응으로 SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 유전자형 분석에 사용한 primer는 Table 2 에 제시하였다.



Location : 5p13.1

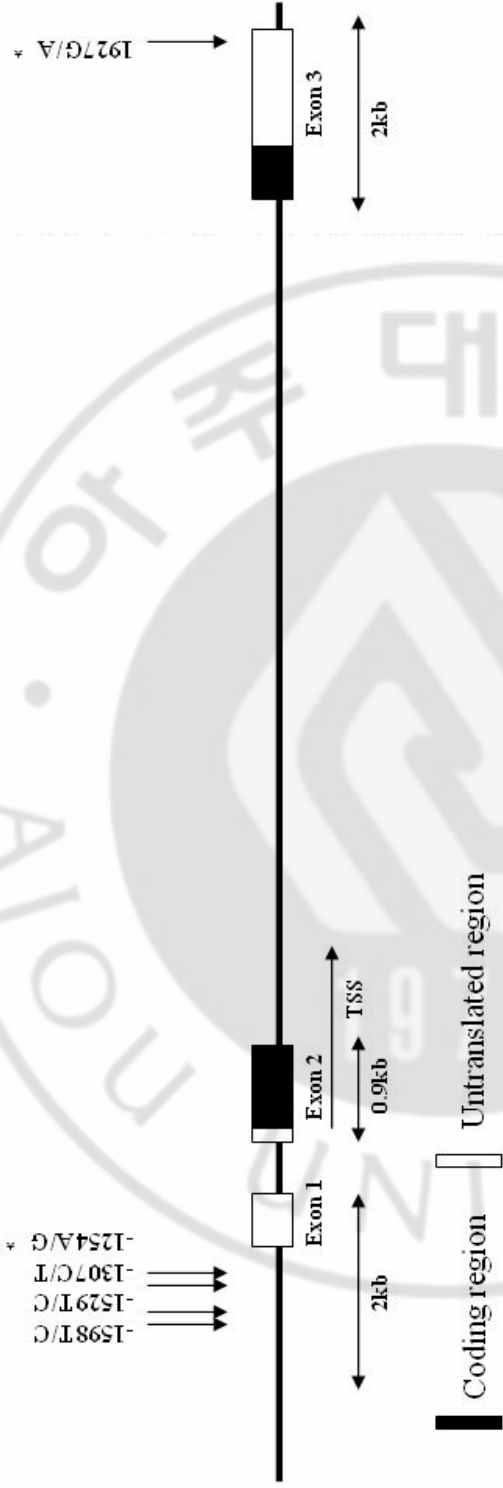


Fig. 1. Schematic representation of *PTGER4* gene. Gene Map of *PTGER4* gene on chromosome 5p 13.1 and location of single - nucleotide polymorphisms (SNPs). The first base of the translation site is denoted as nucleotide 1 (Translation start site, TSS). Coding exons are marked by blocks and 5' and 3' untranslated regions by white blocks. Target SNPs is marked by black stars.



Table 1. Clinical characteristics of the study subjects

	AICU		ATCU		NC		P value	
	AICU	ATCU	AICU vs ATCU	AICU vs NC	ATCU vs NC	AICU vs NC	ATCU vs NC	AICU vs NC
Sex(male/total)	69/141(48.9%)	73/153(47.7%)	0.907	0.428	0.579			
Age(years)*	35.44±11.54/141	39.39±11.71/153	0.004	< 0.001	< 0.001			
Atopy(presence/total)	101/140(72.1%)	75/152(49.3%)	< 0.001	< 0.001	< 0.001			
Log[serum total IgE (IU/ml)]*	5.20±1.05/121	4.69±1.11/144	< 0.001	< 0.001	< 0.001			
Anti-thyroglobulin antibody (positive/total)	12/99(12.1%)	23/136(16.9%)	0.357	NA	NA			
Anti-microsomal antibody (positive/total)	7/99(7.1%)	20/136(14.7%)	0.096	NA	NA			
Anti-nuclear antibody (positive/total)	17/107(15.9%)	22/139(15.8%)	1.000	NA	NA			

AICU, aspirin-intolerant chronic urticaria; ATCU, aspirin-tolerant chronic urticaria; NC, normal healthy controls. * This value was presented as means ± SD. NA, not applicable. Bold character indicate significant *p* value.

Table 2. Amplifying and extension primers of the candidate genes for SNP genotyping

Gene	Locus(SNP ID)	Position	Primers	Tm
<i>PTGER4</i>	-1254A>G (rs45613037)	Promter	Forward 5'-CTCCA-ACTCCTTTTATGGTG-3'	60
			Reverse 5'-GGCTGTTTCATCTTCCTCTC-3'	
			Extension 5'-GCGTGAAAACCACGGGAGCCGCCCC-3'	
	1927G>A (rs16870224)	3'-UTR	Forward 5'-TATGAGGACTGCCTTATGG-3'	60
			Reverse 5'-ACACACACTTTCAGAGAAA-3'	

B. 프로스타글란딘 E2 수용체의 단일염기다형성의 기능적 연구

1. 세포배양

인간 비만 세포주인 HMC - 1 세포주는 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지에 10% FBS (invitrogen), 100U/ml 의 penicillin, 25mM HEPES, 그리고 100mg/ml streptomycin을 첨가하여 배양하였고, 인간 단핵구 세포주인 U937 세포주와 인간 T 림프구 세포주인 Jurkat 세포주는 RPMI 1640 (invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지에 10% FBS (invitrogen), 100U/ml 의 penicillin, 25mM HEPES, 그리고 100mg/ml streptomycin을 첨가하여 배양하였다. 모든 세포주는 Water jacketed CO₂ incubator (Thermo Electron, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

2. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용한 다양한 세포주에서의 *PTGER4* 유전자의 발현

PTGER4 유전자의 발현은 총 9가지 세포주 (HMC - 1, 인간 비만 세포주; Hep3B, 인간 간세포암 세포주; A549, 인간 폐 상피 세포주; Jurkat, 인간 T 림프구; U937, 인간 단핵구 세포주; Beas2B, 인간 기관지 상피 세포주; Hela, 인간 선암종 세포주; HL60, 인간 전 골수구성 백혈병 세포주; THP - 1, 인간 단핵구 세포주)에서 RT - PCR로 확인하였다. 각 세포로부터 총 RNA를 TRI-reagent (Sigma, Aidrich, USA)을 이용하여 추출하였고, 2 μ g의 총 RNA를 가지고 42°C에서 1시간 동안 역전사반응을 수행하였다. 인간 β - *actin*

유전자의 증폭은 전향 시발체 (Forward primer) 5' - TCCTTCTGCAT CCTGTCGGC - 3' 와 후향 시발체 (Revers primer) 5' - CAAGAGATGG CCACGGCTGC - 3'를 이용하여 수행하였다. 95℃ 5분 동안 열처리한 후에 95℃에서 30초, 58℃에서 30초 그리고 72℃에서 30초 를 1주기 (cycle)로 하는 총 22주기 동안 역전사 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행한 후에, 최종적으로 72℃에서 5분을 동안 연장반응을 수행한 뒤, 모든 반응을 종료하였다. 인간 *PTGER4* 유전자의 증폭을 위해 전향 시발체 (Forward primer) 5' - AAGACAGTGCTCAGTAAAGCAA - 3' 와 후향 시발체 (Revers primer) 5' - TCCACCAGTAAGACACTCTCTG - 3'을 이용하여 수행하였다. 95℃ 5분 동안 열처리한 후에 95℃에서 40초, 58℃에서 30초 그리고 72℃에서 1분을 1주기 (cycle)로 하는 총 40주기 동안 역전사 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행한 후에, 최종적으로 72℃에서 5분을 동안 연장반응을 수행한 뒤, 모든 반응을 종료하였다. 발현의 비교는 중합 효소 연쇄반응 후 전기영동을 실시하여 인간 *PTGER4* 유전자의 발현양을 인간 β -*actin* 유전자 발현양으로 보정하였다. 그 결과 *PTGER4* 유전자의 발현이 확인된 비만 세포주, Jurkat 세포주와 *PTGER4* 유전자와 관련이 있어 보이는 U937 세포주가 세포 내 기능 연구용 세포주로 선정하였다(Fig. 2).

A

Gene	Primer	Primers	Accession Number	Size(bp)
<i>PTGER4</i>	Forward	5'-AAGACAGTGCTCAGTAAAGCAA-3'	NM_00958	365
	Reverse	5'-TCCACCAGTAAGACACTCTCTG-3'		
<i>β-actin</i>	Forward	5'-TCCTTCTGCATCCTGTCCGGC-3'	NM_001101.3	275
	Reverse	5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGC-3'		

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>PTGER4</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>β-actin</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 2. Primer pairs used for *PTGER4* expression and expression of *PTGER4* mRNA in various cell lines. A. Primer pairs used for *PTGER4* expression. B. Expression of *PTGER4* mRNA in various cell lines. 1: HMC - 1 (human mast cell); 2: Hep3B (human hepatocellular carcinoma cell); 3: A549 (human lung epithelial cell); 4: Jurkat (human T lymphocytes); 5: U937 (human monocytes); 6: Beas2B (human bronchus epithelial cell); 7: Hela (human adenocarcinoma cell); 8: HL60 (human promyelocytic leukemia cells); 9: THP - 1 (human monocyte)

3. Promoter construct 제작과 luciferase reporter assay

1. Promoter construct 제작

유전자 재조합에 사용할 *PTGER4* 유전자의 전사조절 부위 -1254 A>G 의 증폭을 위해 -1254 AA 또는 -1254 GG 유전자형을 가진 사람의 genomic DNA를 대상으로 *PTGER4* 유전자의 전사 조절부위의 241bp를 전향 시발체 (Forward primer) 5' - GAGTTCCCCTCCGCACCTC - 3'와 후향 시발체 (Reverse primer) 5' - TCGCCTTTCCACCCTCTGTAC - 3'를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물을 TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)의 pCR®2.1 - TOPO® vector에 TA 클로닝하였다. Plasmid DNA의 유전자형은 직접 염기서열분석으로 확인하였다. -1254 AA 또는 -1254 GG 유전자형을 포함하는 *PTGER4* promoter plasmid DNA는 다시 pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI, USA)에 효소 Xho I 과 Hind III(Takara, Shuzo, Japan)를 이용하여 재 클로닝 하였다. 이중 효소처리를 통해 생성물을 agarose 전기영동을 통해 UV로 확인하였다. *PTGER4* luciferase reporter construct는 대장균 배양액으로부터 Endo Free Plasmid Midi kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 순수한 plasmid DNA를 추출 하였다.

2. 세포이입(transfection)과 luciferase reporter assay

인간 비만 세포에 *PTGER4* luciferase reporter construct를 전기천공기 MP - 100(Digital bio tech. Seoul, Korea)와 PMK - 1096(Digital bio tech)을 이용하여 세포이입을 수행하였다. 각 well 당 2×10^5 개의 세포에 *PTGER4*

plasmid DNA 1 μ g과 Renilla plasmid DNA 5ng 과 부유완충액 10 μ L(Digital bio tech. Seoul, Korea)를 섞어 부유시킨 후, 제품설명서에 제시한 방법에 따라 전기충격을 가하였다. 24 well plate에 다시 부유시킨 다음 Water jacketed CO₂ incubator(Thermo Electron, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건으로 24시간 배양하였다. Promoter reporter assay는 Dual - Luciferase reporter Assay kit(Promega)를 사용하였고 pGL3 - control vector 와 pGL3 - Basic vector는 양성 대조군과 음성 대조군으로 사용되었다. Luciferase activity 측정은 Clarity(Bio - TEK, Winooski, VT, USA)를 사용하였고, 세포이입 효율 차이는 Renilla activity 값으로 보정하였다

4. 전기 이동성 교대 분석 실험 (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA)

1. 핵 추출물(Nuclear extracts)의 추출

인간 비만 세포를 차가운 PBS로 세척하고 차가운 완충용액 A[10mM HEPES(pH 7.9), 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1mM NaVO₃ 그리고 complete protease inhibitor Cocktail(Roche, basel, Switzerland)]로 재 부유시킨다. 차가운 완충용액을 넣어서 재 부유시킨 세포를 얼음에서 10분 동안 배양시킨 후 0.5% Nonidet P - 40를 넣고 얼음에서 15분 더 배양시킨다. 그 후 6,000g에서 1분 동안 원심분리 시킨 후 침전물(pellet)에 추출 완충용액 [20mM HEPES(pH 7.9), 400mM KCl, 4.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1mM NaVO₃, 1mM NaF 그리고 complete protease inhibitor Cocktail(Roche)]를 넣고 재 부유시킨 후 얼음에서 1시간 동안 배양시킨다. 그 뒤 10,000g에서 10분 동안 원심 분리시킨

후 상층액만 새로운 튜브에 옮긴 뒤 15% glycerol을 첨가하고 -80°C에서 보관하였다.

2. 전기 이동성 교대 분석 실험 (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA)

이중가닥 -1254 A>G DNA 탐침(probe)은 두 개의 단일 가닥 DNA로 95°C에서 5분 동안 열 변성 후 37°C에서 식혀서 상보적 이중 가닥 DNA 서열을 제조하였다. 실험에 사용한 oligonucleotide의 염기서열 정보는 Fig.4에 제시 되어있다. 이중 가닥 DNA probes는 DNA 중합효소 I Large (Klenow) fragment (promega) 와 [α - 32 P] dCTP를 이용하여 5' -end에 동위원소로 표지하였다. 5 μ g의 핵 추출물(nuclear extract)과 반응액 [10mM HEPES(pH 7.9), 400ng의 poly(dI - dC), 1mM MgCl₂, 30mM KCl, 1mM DTT, 1mM NaVO₃, 1mM NaF]에 5%의 glycerol를 섞은 후 얼음에서 20분 동안 방치시킨 후에 0.2pmol의 방사선으로 표지 된 이중가닥 DNA probe를 얼음에서 20분간 반응시켰다. 만들어진 반응액은 native 6% polyacrylamide 겔에 로딩하고 0.5X TBE buffer(45mM Tris - borate, pH8.0, 45mM boric acid, 1mM EDTA)에서 120V에서 3시간 동안 전기영동 시킨다. 저해 실험은 방사선 표지가 안 된 DNA 탐침(probe)을 사용하여 선 반응하여 수행하였다. Supershift 실험은 각각의 항체 2 μ g을 반응 mixture에 얼음에서 20분간 선 반응시키고 방사선으로 표지된 probe로 얼음에서 20분간 반응시킨다. Anti - SP1 (07 - 645)는 Millipore(Millipore, CA, USA) 에서 구입하였고, Anti - MAZ (A - 17, sc - 13485)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다. 방사선 반응 검출은 FLA7000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)을

이용하였다.

5. 공동세포이입(cotransfection)을 이용한 *PTGER4* promoter활성에서의 전사인자의 영향

인간 비만 세포에 luciferase reporter vector의 한시적 이입을 전기천공기 MP - 100(Digital bio tech. Seoul, Korea)와 PMK - 1096(Digital bio tech)을 이용한 electroporation으로 수행하였다. 2×10^5 개의 세포에 *PTGER4* plasmid DNA $0.95 \mu\text{g}$ 과 Renilla plasmid DNA 5ng과 각각 MAZ plasmid DNA와 SP1 plasmid DNA를 50ng과 부유완충액 $10 \mu\text{L}$ (Digital bio tech. Seoul, Korea)를 섞어 부유시킨 후, 제품설명서에 제시한 방법에 따라 전기충격을 가하였다. 24 well plate에 다시 부유시킨 다음 Water jacketed CO_2 incubator(Thermo Electron, USA)를 이용하여 37°C , 5% CO_2 의 조건으로 24시간 배양하였다. Promoter reporter assay는 이전과 동일하게 수행하였다.

6. 호염기구의 히스타민 유리능

인간 호염기구에서 히스타민 유리능을 알아보기 위해 말초 혈액에서 백혈구를 분리하였다(Bae 등, 2007). 먼저, 20mL의 blood를 6%의 dextran - 3%의 dextrose - physiologicsaline이 들어있는 2.5mL의 용액과 1mL의 ethylenediamine tetraacetic acid와 섞는다. 섞은 후 상온에서 2시간 동안 반응시키고 1500rpm 4°C 10분간 원심분리 하여 혈장에 포함된 백혈구를 얻는다. 백혈구 침전물은 PIPES - A [25mM piperazine - N - N'bis - 2 ethane sulphonic acid, 110 mM NaCl, 5mM KCl, 40mM NaOH, 0.03% bovine serum

albumin ,pH 7.4]로 두 번 씻어 주고, 자연 발생적인 히스타민 유리능을 측정한다. PIPES - ACMD (PIPES 에 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 그리고 0.1% dextrose를 넣고 섞는다)를 최종 cell 농도가 5 X 10⁶ cells/mL 이 되게 재부유시킨다. 항 인간 goat IgE 항체(1:10, 1:100, 1:1000 vol/vol으로 희석, KLP, USA)를 백혈구를 100 μL에 부유하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 유사한 방법으로 백혈구 부유시켜 자연발생적 히스타민 유리능 측정을 위해 PIPES-ACMD만 넣고 배양하였다. 최종 세포 내 히스타민 농도는 백혈구 현탁액에 0.1%의 NP - 40를 첨가하여 측정하였다. 배양시킨 호염기구는 3000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하고 상층액을 선별하여 히스타민치를 측정하기 위해 -80°C에서 보관하였다. 히스타민 EIA Kit(Immunotech, Marseille, France)를 이용하여 히스타민 유리능 차이 비교 실험을 수행하였으며, Synergic™ HT (BIO - TEK, Vermont, USA)를 이용하여 히스타민 유리량을 측정하였다. 히스타민 유리능은 최종 세포 내 히스타민 퍼센트를 표현한다.

히스타민 유리능 (%) = 100 X ((자극된 히스타민 유리능 - 자연발생적 히스타민 유리능)/(최종 세포내 히스타민 유리능 - 자연발생적 히스타민 유리능))

7. 통계처리

연구대상자의 임상적 특성을 비교하기 위하여, 연속 변수는 T - test, 비연속 변수는 Chi - square test를 이용하여 분석하였다. 유전자형 분석 후 Hardy Weinberg 평형을 조사하였다(Haploview ver. 4.1). 또한 최종 선정된 단일 염기다형성의 질환군 별 유전자형의 분포 차이를 확인하기 위하여, Chi - square test를 이용하였고, logistic regression을 통하여 나이와 성별을 보정하였다. 유전자형 결과를 토대로, 연속 변수는 T - test, 비연속 변수는 Chi - square test를 이용하여 질환군 별 임상지표 차이를 분석하였다. 각 유전자 형에 따른 promoter activity와 luciferase assay, histamine 유리능 차이는 T - test와 Mann - Whitney test를 이용하였다. 통계적 유의성은 p value가 0.05이하인 경우로 한정하였고, 모든 통계 분석은 SPSS version 12.0.1 (SPSS Inc., Chicag1, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 결과

A. 프로스타글란딘 E2 수용체유전자의 유전자 다형성 조사

정상대조군 24명의 genomic DNA 시료를 대상으로 *PTGER4* 유전자의 직접염기서열분석을 시행하여 NCBI에 보고되어 있는 염기서열(NM_00958) 정보와 다형성을 비교해보았다. 그 결과 promoter 부위의 4개의 다형성을 확인하였고 (-1598 T>C, -1529 T>C, -1307 C>T, -1254 A>G), 3' -UTR 부위의 1개 다형성을 확인하였다 (1927 A>G, Table 3).

Table 3. The SNPs within *PTGER4* gene identified in 24 normal healthy volunteers

Gene	location	SNP ID	Heterozygosity		HWE		MAF
			Observed	Expected	P value		
<i>PTGER4</i>	-1598T/C	rs45437592	25.0%	28.9%	0.936		17.5%
	-1529T/C	rs4133101	71.4%	49.5%	0.134		45.2%
	-1307C/T	rs10039983	27.3%	29.8%	1		18.2%
	-1254A/G	rs45613037	27.3%	29.8%	1		18.2%
	1927G/A	rs16870224	52.2%	38.6%	0.285		26.1%

MAF, minor allele frequency. NA, not available. HWE, hardy weinberg equilibrium.

B. 프로스타글란딘 E2 수용체유전자의 단일염기다형성의 기능적 연관성 연구

1. 연구대상의 임상적 특성

연구대상의 임상적 특성은 Table 1에 요약되어 있다. 총 294명의 만성두드러기 환자 중 AICU군은 141명, ATCU군은 153명 이었으며, 비아토피성 정상대조군은 174명 이었다. ATCU군의 평균연령 (39.39 ± 11.71 세)은 AICU군의 평균연령 (35.44 ± 11.54 세)보다 높았고 ($p < 0.004$), 정상 대조군의 평균연령 (30.97 ± 10.68 세) 보다 높았다 ($p < 0.001$). 성비는 세 군간의 유의한 차이는 없었다. 아토피의 비율은 AICU군이 161명(72.1%) 으로 ATCU군 (75명, 9.3%) 보다 높았다 ($p < 0.001$). 혈청 총 IgE치는 AICU 군 ($5.20 \pm 1.05 \log(\text{IU/L})$) 과 ATCU군 ($4.69 \pm 1.11 \log(\text{IU/L})$) 모두 정상 대조군 ($3.57 \pm 1.30 \log(\text{IU/L})$) 보다 유의하게 높았고 ($p < 0.001$), AICU 군과 ATCU군 간에도 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.001$). 항 핵항체 및 항 갑상선 항체 (anti - thyroglobulin anibody, ATA; anti - microsomal anibody, anti - nuclear anibody, ANA)는 AICU 군과 ATCU군 간의 유의한 차이는 없었다.

2. *PTGER4* 유전자의 유전자형 빈도

PTGER4 유전자의 유전자형 빈도는 Table 4에 요약하였다. *PTGER4* 유전자의 -1254A>G 다형성의 변이 대립형질의 빈도가 정상 대조군에 비해 AICU 환자군에서 유의하게 높았다 ($p=0.031$, for AICU vs. NC). *PTGER4* 유전자의 -1254A>G 다형성의 AA 유전자형 빈도는 co-dominant 모델에서 AICU 환자군에 비해 정상 대조군에서 유의하게 높았다 ($p=0.032$, for AICU vs. NC). *PTGER4* 유전자의 1927G>A 다형성의 경우, 변이 대립형질의 빈도 및 유전자형 빈도 모두 AICU 환자에서 정상 대조군에 비해 유의하게 낮았다 ($p=0.040$). 또한 *PTGER4* 유전자의 1927G>A 다형성의 GG 유전자형 빈도는 co-dominant 모델에서 정상 대조군에 비해 AICU 환자군에서 유의하게 높았다 ($p=0.031$, for AICU vs. NC).

Table 4. The genotype and allele frequencies of *PTGER4*

Loci	Genotype	AICU	ATCU	NC	p value		
					AICU vs ATCU	AICU vs NC	ATCU vs NC
<i>PTGER4</i> -1254 A>G*	AA	76(53.9%)	85(55.6%)	107(61.5%)	0.860	0.032	0.108
	AG	54(38.3)	59(38.6%)	59(33.9%)	0.697	0.075	0.239
	GG	11(7.8%)	9(5.9%)	8(4.6%)	0.982	0.075	0.160
	q	0.270	0.252	0.216	0.861	0.031	0.112
	total	141	153	174			
<i>PTGER4</i> 1927 G>A	GG	82(63.1%)	46(47.4%)	57(48.3%)	0.028	0.031	0.659
	AG	42(32.3%)	45(46.4%)	58(49.2%)	0.580	0.691	0.349
	AA	6(4.6%)	6(6.2%)	3(2.5%)	0.017	0.009	0.902
	q	0.208	0.294	0.271	0.031	0.040	0.689
	total	130	97	118			

Each p value was calculated with co-dominant, dominant, recessive model respectively. Logistic regression analysis was applied to control for age and sex as covariates. AICU, aspirin-intolerant chronic urticaria; ATCU, aspirin-tolerant chronic urticaria; NC, normal controls. q, minor allele frequency. *This allele is considered as a risk factor. Bold character indicate significant p value 0.05 or less was considered to be significant.

C. 프로스타글란딘 E2 수용체유전자의 단일염기다형성의 기능학적 연구

1. *PTGER4* promoter 부위 -1254 A>G의 전사활성 조절의 효과

PTGER4 -1254 A>G 다형성에 따른 promoter 부위의 활성을 조사하기 위해 인간 비만 세포주인 HMC-1, U937 인간 단핵구세포주, Jurkat 인간 T 림프구 세포주를 이용하였고, 인간 비만 세포에 *PTGER4* -1254 AA 유전자형과 -1254 GG 유전자형을 가진 두 개의 luciferase reporter plasmid DNA를 세포이입(transfection) 시킨 후 promoter reporter assay를 시행하였다(Fig. 3). -1254 GG 유전자형을 가진 construct에서 -1254 AA 유전자형을 가진 construct보다 약 1.5배 정도 낮은 promoter activity가 관찰되었다($p=0.003$). U937세포와 Jurkat 세포에 세포이입 시켰을 때 동일한 결과를 관찰 하였다 ($p<0.001$, $p=0.003$).

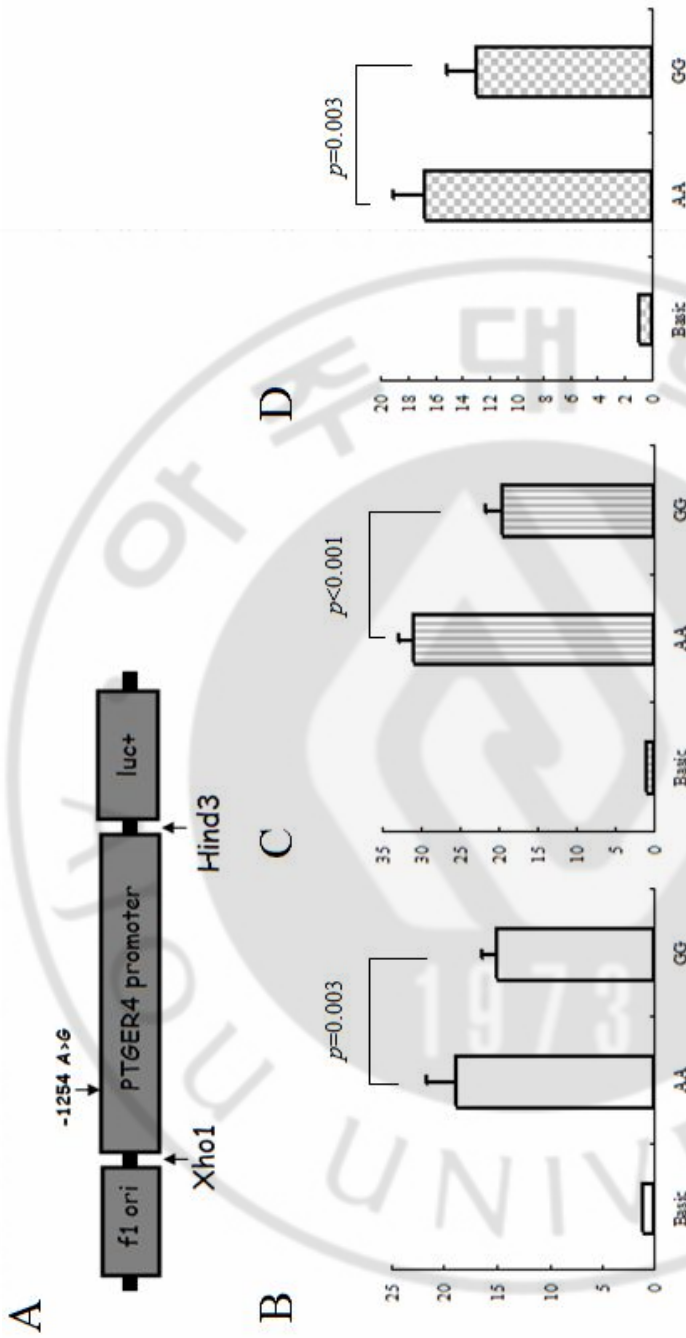


Fig. 3. Effect of -1254A>G polymorphism on the transcription activity of *PTGER4* promoter. (A) Schematic representation of reporter gene construct that contained the *PTGER4* promoter region at -1254A>G polymorphisms. Luciferase reporter constructs using transfected with HMC-1 cell(B), U937 cell(C) and Jurkat cell(D). Relative luciferase activity was represented as the ratio of the activity to the luciferase activity in the cells transfected with the empty control vector pGL3-Basic. Luciferase activity assay was performed in three independent experiments. Values represent mean \pm SD of for three independent experiments(n=9). Statistical differences were evaluated with independent - *t* - test.

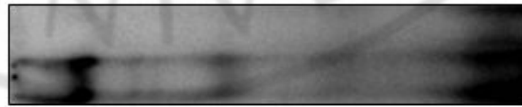
2. *PTGER4* -1254 A>G 다형성 부위와 전사 인자 결합의 확인

PTGER4 -1254 A>G 다형성에 따른 전사인자의 결합여부를 알아보기 위해 인간 비만 세포주의 핵 추출물을 제조하여 -1254 A>G 의 이중 가닥 oligonucleotide probe를 이용하여 결합 차이를 확인한 결과(Fig. 4.), -1254 A probe에 더 높은 결합능을 보이는 단백질의 출현을 확인하였다(Fig. 4. B). 특정 전사 인자의 결합 여부를 확인하기 위해 동위원소가 표지되지 않은 probe (NF - kB 와 OCT - 1 과 MAZ 그리고 SP1)를 이용하여 경쟁적 반응 차이를 확인하였을 때, SP1 특이 DNA probe 에 의해서 -1254 A probe의 단백질 결합이 -1254 G probe 보다 선택적으로 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 4. C). 다음에는 항 SP1 항체와 항 MAZ 항체를 이용하여 supershift assay를 수행하였다. 결과 -1254 GG 대립형질에 비해 -1254 AA 대립형질에 전사인자인 SP1과 MAZ가 선택적으로 결합능 감소를 확인하였다(Fig. 4. D).

A PTGER4 -1254 A : GGAGCCGCCCCACCCCGCGGCC
 PTGER4 -1254 G : GGAGCCGCCCGCCCGCGGCC
 OCT-1 : TGTCGAATGCAAAATCACTAGA
 NF-kB : AGTTGAGGGGACTTCCCCAGG
 MAZ : CTCGGCCCTCCCCCGC
 SPI1 : ATTTCGATCGGGCGGGCGGA

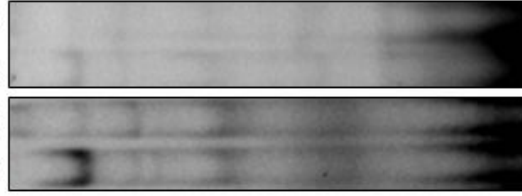
B

Nuclear extract + +
 Probe : -1254A/G A G



D

Nuclear extract + + + +
 Probe : -1254A/G A A G G
 Competitor MAZ SP-1
 Ab Ab Ab Ab



C

Nuclear extract + + + + + + + + + +
 Probe : -1254A/G A A A A A A G G G G G G
 Competitor X100 X100 X100 X100 X100 X100 X100 X100
 A G OCT-1 NFKB MAZ SP-1 G A OCT-1 NFKB MAZ SP-1

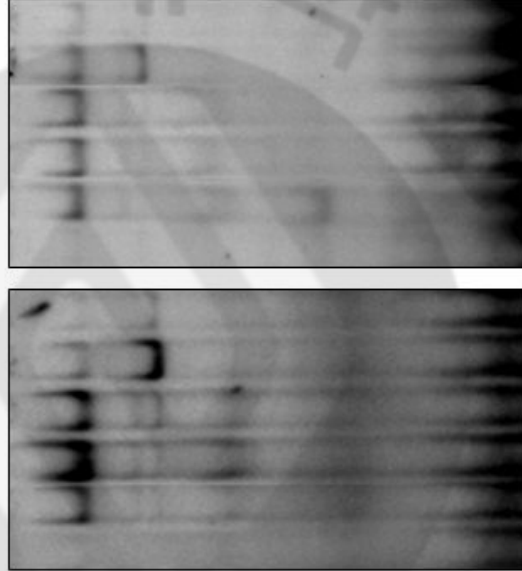


Fig. 4. Functional effect of the -1254A>G polymorphism on transcriptional activity.

(A) Nucleotide sequences of oligonucleotides used as probes and competitors (-1254A, -1254G, OCT-1, NF- κ B, MAZ, SP1). (B, C, D) EMSAs for the -1254 A>G polymorphism using HMC-1 cell nuclear extracts. Differential of a nuclear protein to -1254A/G alleles, binding affinity of specificity protein 1 (SP1) protein and MYC-associated zinc finger protein for *PTGER4* promoters with either a A or a G at position -1254. Identification of the transcription factor binding to -1254 probes using competitive binding assay. Competitive binding assay was performed with unlabeled OCT-1, NF- κ B, MAZ, SP1 probe. The amount of competitor was 10-fold molar excess than probe. Identification of the transcription factor binding to -1254 probes using competitive binding assay. Supershift assay was performed with SP1 and MAZ antibody. The antibody used 2 μ g/well. The unbound probes and specific band are indicated by arrows.

3. 공동세포이입(cotransfection)을 통한 *PTGER4* promoter 부위의 전사인자(MAZ, SP1)의 영향

MAZ와 SP1의 전사인자가 세포 내에서 어떤 기능을 하는지 알아보기 위해 공동세포이입을 수행하였다. *PTGER4* plasmid DNA 0.95 μ g과 Renilla plasmid DNA 5ng 과 각 각 MAZ plasmid DNA와 SP1 plasmid DNA를 50ng로 세포이입 시킨 후 promoter reporter assay를 시행한 결과 SP1을 공동세포이입을 시켰을 때 우성 대립인자인 AA 유전자형을 가진 promoter reporter construct는 약 2.8배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되었고, 열성 대립인자인 GG 유전자형을 가진 promoter reporter construct는 약 2.5배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되어 나타난 것을 확인할 수 있었고(Fig. 5), MAZ를 공동세포이입 시켰을 때 AA 유전자형과 GG 유전자형을 가진 promoter reporter construct 모두 약 1.7배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

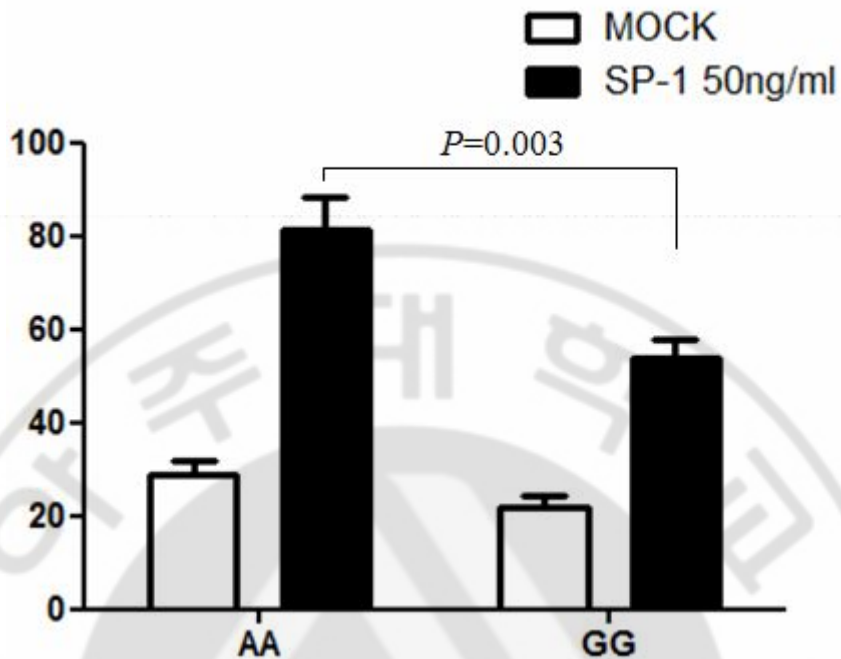


Fig. 5. Effect of SP1 on the transcription activity of *PTGER4* promoter. The HMC - 1 cells were co - transfected with *PTGER4* luciferase reporter and SP1 constructs. Relative luciferase activity was represented as the ratio of the activity to the luciferase activity in the cells transfected with the empty control vector pGL3 - Basic. Luciferase activity assay was performed three independent experiments. Values represent mean \pm SEM of for three independent experiments (n=9). Statistical differences were evaluated with independent - *t* - test.

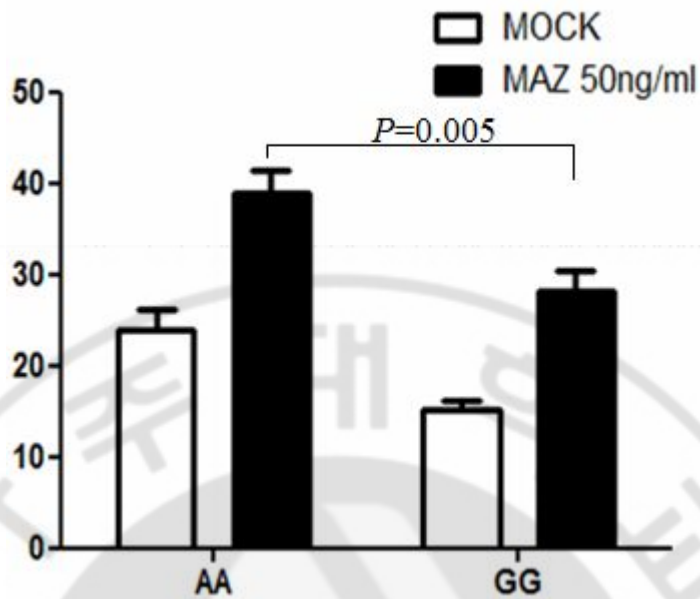


Fig. 6. Effect of MAZ on the transcription activity of *PTGER4* promoter. The HMC - 1 cells were co - transfected with *PTGER4* luciferase reporter and MAZ constructs. Relative luciferase activity was represented as the ratio of the activity to the luciferase activity in the cells transfected with the empty control vector pGL3 - Basic. Luciferase activity assay was performed three independent experiments. Values represent mean \pm SEM of for three independent experiments (n=9). Statistical differences were evaluated with independent - *t* - test.

4. *PTGER4* -1254 A>G 다형성>G 다형성에 따른 호염기구 히스타민 유리능

아스피린 과민성 두드러기(AIU) 환자군에서의 *PTGER4* -1254 A>G 다형성에 따른 히스타민 유리능을 알아보기 위해 아스피린 과민성 두드러기(AIU) 환자에서 호염기구를 분리한 후 항 인간 goat IgE ($10 \mu\text{g/mL}$) 항체로 자극시켜 히스타민 유리능을 측정하였다. 그 결과 아스피린 과민성 두드러기(AIU) 환자 중 *PTGER4* -1254 GG 유전자형 또는 AG 유전자형을 가진 환자 일수록 -1254 AA 가진 환자 보다 히스타민 유리능이 증가하였다($p < 0.048$, Fig. 7).

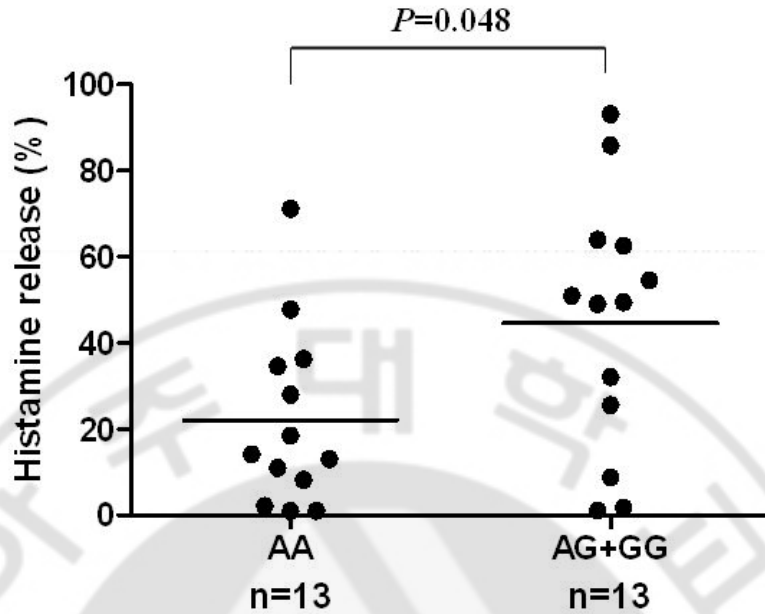


Fig. 7. *Ex vivo* functional study of *PTGER4* - 1254 A>G polymorphism. Histamine release from the peripheral basophils after stimulation with anti - IgE antibody (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 26 AIU patients. The p value was determined by a Mann - Whitney test. Percent histamine release = $100 \times ((\text{stimulated histamine release} - \text{spontaneous histamine}) / (\text{total cellular histamine release} - \text{spontaneous histamine release}))$

IV. 고찰

알레르기 질환은 환경인자와 유전인자의 상호작용에 의해 발생하는 대표적인 복합 질환으로, 특히 아스피린 과민성 만성 두드러기 질환의 발생에 가장 중요한 선행인자인 아토피를 비롯한 주요 표현형의 발생은 유전적 요인과 관련성을 보인다(Kim 등, 2009). 본 연구에서는 아스피린 과민성 두드러기의 병인기전에 관여 할 것으로 추측되는 *PTGER4* 유전자 2개의 단일 염기다형성을 분석하였으며, 아스피린 과민성 두드러기와 각 단일 염기다형성의 대립유전자 빈도 및 유전자형의 빈도는 유의한 연관성을 확인하였다. *PTGER4* 유전자의 -1254A>G 다형성의 변이 대립형질의 빈도가 정상대조군에 비해 아스피린 과민성을 동반한 만성두드러기 환자군에서 유의하게 높게 관찰되어 *PTGER4* 유전자의 -1254A>G의 다형성이 아스피린 과민성 두드러기 병인기전에 중요한 유전적 소인으로 관여할 가능성을 제시하였다.

이에 본 연구자는 한국인 아스피린 과민성 두드러기 환자에서 *PTGER4* promoter 부위와 엑손 1부위 및 엑손 2부위 그리고 엑손 3부위 및 3' - UTR 부위의 유전자 다형성 연구를 직접염기서열분석을 통해 분석 한 결과 promoter 부위의 6개의 다형성을 확인하였고 (-1598 T>C, -1529 T>C, -1307 C>T, -1254 A>G), 3' - UTR 부위의 1개의 다형성을 확인하였다(1927 A>G).

연구 대상의 표현형을 두드러기 환자와 정상대조군 간에 임상적 특징과의 관계를 살펴본 결과 AICU 환자군의 아토피와 혈청 내 IgE 양이 ATCU 환자군과 정상대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 관찰되었다. 이는 AICU

환자의 아토피 경향이 ATCU 환자보다 높다는 이전 연구(Ye 등, 2005)와 같은 결과로써 결론적으로 아토피가 AICU의 위험인자임을 시사한다.

PTGER4 유전자의 유전자형 빈도를 두드러기 환자군과 정상대조군 간에 비교한 결과 -1254A>G 다형성의 변이 대립형질의 빈도가 정상대조군에 비해 환자군에서 유의하게 높았으며, 1927G>A 다형성의 경우 변이 대립형질의 빈도 및 유전자형 빈도 모두 아스피린 과민성 두드러기 환자에서 정상 대조군에 비해 유의하게 낮았다. 각 유전자의 대립형질을 연구 대상 군끼리 표현형을 비교해 보았지만 유의한 차이는 없었다. 이는 -1254A>G 다형성의 변이 대립형질과 1927G>A 다형성의 GG 유전자형은 AICU로 진행 할 가능성이 높다는 것을 보여준다.

또한 아스피린 과민성 두드러기 환자와 대조군간의 빈도와 임상적 특징에서도 유의한 결과를 보였던 *PTGER4* gene의 promoter 부위에 존재하는 -1254 A>G의 다형성에서 각각의 유전자형에 따라 전사 조절의 차이가 있는지 확인하기 위해 promoter reporter assay를 실시하였고, 히스타민이 주로 비만세포에서 분비되는 점을 감안하여 인간 비만 세포주, U937 세포주, Jurkat 세포주에 세포이입을 실시한 결과, 우성 대립형질인 AA 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 열성 대립형질인 GG 유전자형 가진 promoter reporter construct보다 약 1.5배 정도 promoter 부위의 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 GG 유전자형을 가질 경우 *PTGER4* 유전자의 전사활성이 저해되어 비만세포의 히스타민 유리능을 증가시켜 아스피린 과민성 두드러기 발생에 관여할 가능성을 시사한다. 역전사 증합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용한 다양한 세포주에서의 *PTGER4*

유전자의 발현을 통해 *PTGER4* 유전자의 발현이 확인된 비만 세포주, Jurkat 세포주와 단핵구 세포에서 PGE_2 가 면역조절자의 역할을 한다 (Demeure CE, 등 1997)는 점에 착안하여 U937 세포주를 세포 내 기능 연구용 세포주로 선정하였다

전사인자는 다른 전사인자와 상호작용을 하여 유전자 발현 시 다른 신호 전달 경로 사이에 cross-talk 가 가능하게 하는데, 전사인자가 유전자의 promoter 부위의 특정 DNA 배열에 결합하거나 이미 DNA 에 결합되어 있는 전사인자의 활성화가 일어나면 전사시작 부위에 인접한 TATA Box에 결합되어 기전전사기구 (basal transcription machinery)와 통하게 되고, 이것이 일련의 기전인자 (basal factor)를 통해 RNA polymerase II의 활성화를 일으키고 유전자 전사와 messenger RNA (mRNA)의 생성을 증가시켜 단백질의 해독이 일어나게 한다. 전사인자가 유전자의 promoter 부위의 DNA와 결합하면 기전전사기구와 직접적으로 작용하거나 전사인자를 기전전사기구에서 활성화시켜 결과적으로 유전자 발현을 증가시킨다.

*PTGER4*와 전사인자인 SP1을 공동세포이입 (cotransfection) 한 결과, 우성 대립인자인 AA 유전자형을 가진 promoter reporter construct는 약 2.8배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되었고, 열성 대립인자인 GG 유전자형을 가진 promoter reporter construct는 약 2.5배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되어 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이는 AA 유전자형을 가질수록 SP1의 전사 활성도가 더 증가 되어 promoter 부위의 활성이 증가되는 것을 의미한다. 또한 MAZ를 공동세포이입 한 결과 각 유전자형에 따른 차이 없이 약 1.7배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되었다. 이는 전사인자인 SP1과 MAZ가

PTGER4 전사조절 부위의 활성을 조절할 것이라는 것을 간접적으로 시사하는 결과이다.

전기 이동성 교대 분석 실험 결과 -1254 GG 대립형질에 비해 -1254 AA 대립형질에 전사인자인 SP1이 결합하여 촉진자의 역할을 하고 전사인자인 MAZ가 결합하는 것을 확인하였다. Zinc finger 단백질인 SP1 과 MYC 관련 zinc finger 단백질인 MAZ는 전사인자로서 GC-rich 부위에 결합하여 다양한 유전자의 발현을 활성화시킨다고 알려져 있다 (Bossone SA 등, 1992; Narayan VA 등, 1996; Her S 등, 1999; Song J 등, 2001; Her S 등, 2003). Serotonin 1a receptor(5-*HT1a*) 유전자에 관한 연구에서 전사조절에 중요한 부위인 TATA Box가 없고 SP1과 MAZ를 공동세포이입 (cotransfection)을 수행하였을 때 promoter 부위에 의해 유전자 발현 활성이 증가되는 것이 보고되었다 (Parks CL 등, 1996). 또한 promoter의 GC-rich 부위에서 TATA Box가 없었을 때 GC-rich 부위의 전사인자 SP1의 인식부위는 유전자의 기본적인 전사에 중요하다고 보고되었다 (Hapgood 등, 2000). 본 연구자는 *PTGER4* promoter 부위의 TATA Box를 찾아본 결과 인간 *PTGER4* 유전자에서 없는 것을 발견하였다.

PTGER4 -1254A>G의 다형성은 TATA Box가 결여된 promoter 부위의 GC-rich 부위로써 유전자의 기본적인 전사에 중요한 부분일 것이라고 시사된다. PGE₂는 비반세포로부터 히스타민 발생을 방지하고, 그 프로스타노이드가 비반세포의 활성을 조절하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데(Coleman 등, 1994; Breyer 등, 2001), 본 연구 결과 -1254 G 대립인자를 가질수록 AICU 환자의 비율이 높았다. 그리고 아스피린 과민성

두드러기 환자의 말초혈액 호염기구에서 히스타민 유리능과 *PTGER4*의 단일 염기 다형성들 사이의 관련성을 비교한 결과, -1254 AG/GG 대립 유전자를 가진 환자들에서 -1254 AA 대립 유전자를 가진 환자들보다 히스타민 유리능이 유의하게 높았다. 이는 -1254 G 대립 형질을 가질수록 히스타민 유리능이 증가되어 아스피린 과민성 두드러기 발생에 관여함을 시사하고 있다. 또한, Rat의 medial preoptic area(MPO)와 frontal cortex(FrCx)에 EP4 수용체 촉진제(agonist, ONO - AE1 - 329)로 자극시켰을 때 히스타민 유리능이 증가되었다는 보고도 있다(Huang ZL 등, 2003). 이는 EP4 수용체의 신호전달 기전이 히스타민 유리능에 관여한다는 것을 의미한다.

PTGER4 1927G>A 다형성의 경우, 변이 대립형질의 빈도 및 유전자형 빈도 모두 아스피린 과민성 만성 두드러기 환자에서 정상대조군에 비해 유의하게 낮았다. *PTGER4* 1927G>A 다형성은 3' - UTR 부위로서 3' - UTR 부위는 유전자 전사에 중요한 기능을 하는 부위로서 mRNA의 수송과 mRNA의 안정성에 관여한다고 알려져있다(Goldberg IH 등, 1962; Mazumder B 등, 2003; Puga I 등, 2005; Wang D 등, 2005; Kim 등, 2009). 따라서 *PTGER4* 1927G>A 다형성의 3' - UTR mRNA 안정성 연구를 시행하였지만, 각 대립형질에 따른 유의한 차이를 얻지 못하였다. 이는 *PTGER4* 1927G>A 다형성 부위는 mRNA의 안정성에 관여하지 않을 가능성을 시사한다.

지금까지의 연구 결과를 바탕으로 아스피린 과민성 두드러기 환자의 표현형에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있었으며, 본 연구는 아스피린 과민성 두드러기로 발병할 가능성이 있는 환자의 조기 검사 방법 및 아스피린 과민성 두드러기의 치료제 개발 등에 중요한 기초자료가 될 것이라고 생각된다. 향후

아스피린 과민성 두드러기의 영향을 나타내는 보다 더 정확한 병인기전을 규명하기 위해서는 이 보다 더 많은 아스피린 과민성 두드러기 환자를 대상으로 하여 만성 염증반응에 관여한다고 알려진 면역학적, 임상적 특성을 고려한 연구가 진행되어야 한다고 생각한다. 또한 환자 혈청에서의 비만세포를 억제한다고 알려진 사이토카인이나 프로스타노이드가 히스타민 분비능에 미치는 영향에 대한 생체 기능 추가 연구가 필요 할 것으로 생각한다.



V. 결론

본 연구에서는 아스피린 과민증을 동반한 두드러기 환자와 대조군을 피험자로 선정한 후, 이들에 대한 *PTGER4* 유전자의 단일 염기다형성의 분포를 조사하였고, 또한 이 유전자 다형성이 아스피린 과민성 두드러기에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

상기 결과들은 *PTGER4* -1254 GG 대립 유전자에 SP1이나 MAZ같은 전사인자들의 결합능이 변화되어 프로모터 활성화에 영향을 주고 궁극적으로는 히스타민 유리능을 증가시킴으로써 아스피린 과민성 두드러기의 발생에 기여할 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. 김승현, 박해심 : 알레르기 질환에서 유전체 연구 현황과 임상적 유용성.
내과학회 76 : 416 - 424, 2009
2. 장안수 : 만성 두드러기와 아스피린 과민증. *천식 및 알레르기* 25 :
173 - 174, 2005
3. Augustin LB, Felsheim RF, Min BH, Fuchs SM, Fuchs JA, Loh HH.
Genomic structure of the mouse delta opioid receptor gene. *Biochem
Biophys Res Commun* 207 : 111 - 119, 1995
4. Bae JS, Kim SH, Ye YM, Yoon HJ, Suh CH, Nahm DH, Park HS.
Significant association of Fc ϵ RI α promoter polymorphisms with
aspirin-intolerant chronic urticaria. *J Allergy Clin immunol* 119 :
449 - 456, 2007
5. Bossone S A, Asselin C, Patel A, Marcu KB. MAZ, a zinc finger protein,
binds to c - MYC and C2 gene sequences regulating transcriptional
initiation and termination. *Proc Natl Acad Sci* 89 : 7452 - 7456, 1992

6. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA. Prostanoid receptors: subtype and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41 : 661 - 690, 2001
7. Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, MacChia D, et al. Chronic idiopathic urticaria: Infiltrating cells and related cytokines in autologous serum - induced wheals. *J Allergy Clin immunol* 114 : 284 - 292, 2005
8. Choi JH, Ahn IS, Lee HB, Kim HO, Park CW, Lee CH. A study of an autologous serum skin test and *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic idiopathic urticaria. *J Korean Dermatol* 47 : 798 - 802, 2009
9. Choi JH, Kim SH, Suh CH, Hahm DH, Park HS. Polymorphisms of high - affinity IgE receptor and histamine - related genes in patients with ASA - induced urticaria/ angioedema. *J Korean Med Sci* 20 : 367 - 372, 2005
10. Choi SJ, Ye YM, Hur GY, Shin SY, Han JH, Park HS. Neutrophil activation in patients with ASA - induced urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 28 : 244 - 249, 2007

11. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46 : 205 - 229, 1994
12. de Weck AL, Gamboa PM, Esparze and Sanz ML. Hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti - inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr Pharm Des* 12 : 3347 - 3358, 2006
13. Goldberg IH, Rabinowitz M, Reich E. Basis of actinomycin action, I. DNA binding and inhibition of RNA - polymerase synthetic reactions by actinomycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 48 : 2094 - 2101, 1962
14. Grattan CE. Aspirin sensitivity and urticaria. *J Clin Exp Dermatol* 28 : 123 - 127, 2003
15. Han HJ, Jeon JG, Park CW, Lee CH, Ahn HK. A case of aspirin intolerance in chronic urticaria. *J Korean Dermatol* 41 : 1099 - 1101, 2003
16. Hapgood JP, Riedemann J, Scherer SD. Regulation of gene expression by GC - rich DNA cis - elements. *Cell Biol Int* 25 : 17 - 31, 2001

17. Her S, Bell RA, Bloom AK, Siddall BJ, Wong DL. Phenylethanolamine N - methyltransferase gene expression. Sp1 and MAZ potential for tissue - specific expression. *J Biol Chem* 274 : 8698 - 8707, 1999
18. Her S, Claycomb R, Tai TC, Wong DL. Regulation of the rat phenylethanolamine N - methyltransferase gene by transcription factors Sp1 and MAZ. *Mol Pharmacol* 64 : 1180 - 1188, 2003
19. Hofer MF, Harbeck RJ, Schlievert PM, Leung DYM. Staphylococcal toxins augment specific IgE responses by atopic patients exposed to allergen. *J Invest Dermatol* 112 : 171 - 176, 1999
20. Huang ZL, Sato Y, Mochizuki T, Okada T, Qu WM, Yamatodani, Urade Y and Hayaishi O. *J Neuroscience* 23 : 5975 - 5983, 2003
21. Jabara HH, Geha RS. The superantigen toxic shock syndrome toxin - 1 induces CD40 ligand expression and modulates IgE isotype switching. *Int Immunol* 8 : 1503 - 1510, 1996
22. Jenneck C, Juergens U, Buecheler M, Novak N. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of aspirin intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 99 : 13 - 21, 2007

23. Kim SH, Kim YK, Park HW, Jee YK, Kim SH, Bahn JW, Chang YS, Kim SH, Ye YM, Shin ES, Lee JE, Park HS and Min KU. Association between polymorphisms in prostanoid receptor genes and aspirin - intolerant asthma. *J Pharmacogenetics and Genomics* 17 : 295 - 304, 2007
24. Kim SH, Kang YM, Kim SH, Cho BY, Ye YM, Hur GY, Park HS. Histamine *N*-methyltransferase 937 A>G polymorphism affects mRNA stability in patients with acetylsalicylic acid - intolerant chronic urticaria. *Allergy* 64 : 213 - 221, 2009
25. Mastalerz L, Setkowicz M, Sanak M, Szczeklike. Hypersensitivity to aspirin: common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 113 : 771 - 775, 2004
26. Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3' - UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28 : 91 - 98, 2003
27. Mourad W, Scholl P, Diaz A, Geha R, Chatila T. The staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 triggers B cell proliferation and differentiation via major histocompatibility complex - unrestricted cognate T/B cell interaction. *J Exp Med* 170 : 2011 - 2022, 1989

28. Narumiya SY, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews* 79 : 1193 - 1226, 1999
29. Narayan VA, Kriwacki RW, Caradonna JP. Structures of zinc finger domains from transcription factor Sp1. Insights into sequence - specific protein - DNA recognition. *J Biol Chem* 272 : 7801 - 7809, 1997
30. Parks CL, Shenk T. The serotonin 1a receptor gene contains a TATA -less promoter that responds to MAZ and Sp1. *J Biol Chem* 271 : 4417 - 4430, 1996
31. Puga I, Lainez B, Fernandez - Real JM, Buxade M, Broch M, Vendrell J, Espel E. A polymorphism in the 3'untranslated region of the gene for tumor necrosis factor receptor 2 modulates reporter gene expression. *J Endocrinology* 146 : 2210 - 2220, 2005
32. Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* 74 : 143 - 153, 2003
33. Stevenson DD : Aspirin and NSAID sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 24 : 491 - 505, 2004

34. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostanoid receptors. *J Biological chemistry* 282 : 11613 - 11617, 2007.
35. Song J, Ugai H, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK. Independent repression of a GC - rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis - elements. *J Biol Chem* 276 : 19897 - 19904, 2001
36. Suh YJ, Yoon SH, Sampson AP, Kim HJ, Kim SH, Nahm DH, Suh CH, Park HS. Specific immunoglobulin E for staphylococcal enterotoxins in nasal polyps from patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 34 : 1270 - 1275, 2004
37. Szczeklik A, and Stevenson DD : Aspirin - induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 111 : 913 - 921, 2003
38. Tilley SL ,Coffman TM. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 108 : 15 - 23, 2001
39. Toppe E, Haas N, Henz BM. Neutrophilic urticaria: Clinical features, histological changes and possible mechanisms. *Br J Dermatol* 138 :

248 - 253 , 1998

40. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL and Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435 C>T affects mRNA stability. *J Pharmacogenetics and Genomics* 15 : 693 - 704, 2005
41. Ye YM, Hur GY, Park HJ, Kim SH, Kim HM, Park HS. Association of specific IgE to staphylococcal superantigens with the phenotype of chronic urticaria. *J Korean Med Sci* 23 : 845 - 851, 2008
42. Ye YM, Kim JE, Nahm DI, Kim SH, Suh CH, Nahm DH, Park HS. Comparison of clinical characteristics and prognosis of chronic urticaria according to the aspirin sensitivity. *J Korean Med Sci* 25 : 194 - 199, 2005

- ABSTRACT -

Genetic Polymorphism Study of Prostaglandin E2 Receptor Subtype

EP4 gene (*PTGER4*) in Aspirin - Intolerant Urticaria

Hye Jung Sin

Department of Biomedical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Processor Hae Sim Park)

Introduction: The pathogenic mechanism of ASA (acetylsalicylic acid) - induced chronic urticaria (AICU) is still unknown, but it has been known that released histamine by cutaneous mast cell activation is considered to be an important role. Prostaglandin E2 has been identified for inhibition of neutrophil activation, superoxide release and leukotriene production. Prostaglandin E2 is also an important modulator of mast cell function and signaling. Prostaglandin E2 receptor subtype EP4, a G protein - coupled receptor, mediates suppression of mediator release from mast cell. The aim of this study is to investigate the association of *PTGER4* gene polymorphisms with the pathogenesis of AICU. This study also investigated

the functional variability of the *PTGER4* gene according to the polymorphisms.

Materials and Methods: The 141 patients with AICU, 153 patients with ATCU, and 174 normal healthy controls (NC) were recruited from Ajou University Hospital, for a case-control association study. Two polymorphisms of *PTGER4* (-1254A>G and 1927G>A) were genotyped using a primer extension method. The functional effects of genetic polymorphisms in *PTGER4* gene were analyzed by luciferase reporter assay, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and histamine releasing test from basophils.

Results: The minor allele frequency of *PTGER4* -1254A>G gene polymorphisms showed significantly higher in the AICU group than in NC group ($p=0.031$, for AICU vs. NC). Promoter-reporter construct carrying the -1254 GG genotype displayed significantly lower promoter activity than that with -1254 AA construct in three different cell lines including HMC-1 cell line ($p < 0.001$, respectively). EMSA finding showed that two transcription factors, SP1 and MAZ bound with lower affinity to the -1254 G than that to the -1254 A allele. Moreover, the AIU patients with -1254 G allele showed significantly higher histamine releasing capacity from peripheral basophils after the stimulation with anti-IgE antibody.

Conclusion: There results suggest that the *PTGER4* promoter polymorphisms may contribute to the development of the AICU phenotype by increasing histamine releasibility from peripheral basophils. The promoter polymorphism may modulate *PTGER4* expression by altering the binding affinities of transcription factors, SP1 and MAZ.

Key words Aspirin hypersensitivity, Urticaria, Prostaglandin E2, *PTGER4*(prostaglandin E2 receptor subtype EP4 gene), Genetic polymorphism.