

KLK1 基因啟動子-130G_N多型性與帕金森氏症感受性的分析

黃淑宜¹ 莊蕙瑄¹ 陳瓊美² 吳逸如^{2*} 李桂楨^{1*}

¹國立臺灣師範大學生命科學系

²長庚紀念醫院神經內科

(收稿日期：2005.4.19，接受日期：2005.5.6)

摘 要

帕金森氏症為一常見的神經退化性疾病，和遺傳及環境因素相關。KLK1 為一 serine protease，在人體包括大腦皮質、海馬迴等多處部位皆有表現。本研究的目的是在探討 KLK1 基因啟動子-130G_N多型性與國人帕金森氏症感受性的相關性。-130G_N多型性基因型的分析方法包括螢光PCR產物的長度分析、單股核酸構形多型性/異雙股分析及DNA定序等。所研究樣品群包括208位帕金森氏症患者及95位正常人。結果共觀察到五種對偶基因：I (G₉)、A (G₁₀)、B (G₂CG₇)、H (G₁₁)、K (G₁₂)。多型性對偶基因的啟動子轉錄活性分析顯示，在人類胚胎腎細胞HEK-293及人類腦癌細胞IMR-32中，A、B、H對偶基因的轉錄活性並無顯著差異，但三者的轉錄活性均較K對偶基因顯著的好。進一步的依據含或不含K對偶基因的基因型，或K對偶基因頻率，進行X²統計分析，結果顯示在正常人族群與帕金森氏症患者群間，並未呈現顯著差異。故推論KLK1基因啟動子多型性，雖然會影響其在人類胚胎腎細胞及腦癌細胞中的表現量，但其變異和國人帕金森氏症的感受性並沒有太大關連性。

關鍵詞：KLK1，-130G_N多型性，帕金森氏症，疾病感受性

緒 言

帕金森氏症 (Parkinson's disease) 為一常見的神經退化性疾病，患者在臨床上會出現運動遲緩、靜止性顫抖、僵硬等症狀，病理特徵包含中腦黑質區緻密部 (pars compacta of the substantia nigra) 的多巴胺神經細胞數目大量減少，及在神經元細胞質中出現Lewy bodies的包涵體 (Lang and Lozano, 1998)。帕金森氏症的病因至今未明，目前最被廣為接受的為基因與環境交互作用的多因子理論。目前已知的遺傳基因缺陷，包括α-SYN (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kruger *et al.*, 1998)、parkin (Kitada *et al.*, 1998)、UCHL1 (Leroy *et al.*, 1998)、DJ-1 (Bonifati *et al.*, 2003)、PINK1 (Valente *et al.*, 2004)、dardarin (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004)等。然

而大多數的帕金森氏症患者，並不具上述這些基因的變異。故應進一步利用候選基因策略，來探討可能參與的其他遺傳因子。

Kallikrein 為 serine proteases 的一個亞群，和一些蛋白質的轉譯後修飾作用有關，藉此將前驅蛋白轉變為有生物活性的分子，如轉變kininogen成血管擴張素kinin (Carbarni *et al.*, 1993; Clements, 1994)。人體內的kallikrein可以分為兩群：plasma kallikrein和tissue kallikrein，前者為單一基因的產物，在肝臟中以prekallikrein的方式合成，分泌至血液中，再轉變為plasma kallikrein (Chung *et al.*, 1986; Beaubien *et al.*, 1991)，後者則包含多個成員，如KLK1 (pancreatic/renal kallikrein)、KLK2 (glandular kallikrein)、KLK3 (prostate-specific kallikrein)等，表現於人體多處器官及腺體

*通信作者：李桂楨 (Guey-Jen Lee-Chen); FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43019@cc.ntnu.edu.tw
吳逸如 (Yih-Ru Wu); FAX: 886-3-3288849; E-mail: yihruwu@adm.cgmh.org.tw
黃淑宜和莊蕙瑄對此文獻的貢獻相同。

(Clements, 1994)。目前已知的 *KLK1* ~ *KLK15* 等 15 個相關基因，皆位於染色體 19q13.3-q13.4 上 (Evans *et al.*, 1988; Riegman *et al.*, 1992)。

和本研究相關的 *KLK1* 基因，約長 4.5 kb，有 5 個 exon，其 5' 端上游區 -202 bp 長的啟動子片段已具組織專一性表現 (Xiong *et al.*, 1997; Yousef *et al.*, 2000)。在 *KLK1* 啟動子的 -130 ~ -121 間有多型性區域 (-130G_N)，在白種人、非裔美國人、亞洲人的族群分析中共發現了 10~15 種對偶基因 (allele) (Song *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2002)。在非裔美國人的族群分析中，此啟動子多型性和高血壓及末期腎病相關 (Yu *et al.*, 2002)。此啟動子多型性亦和國人的腎病進程相關 (Lee-Chen *et al.*, 2004)。由於 serine proteases 參與生理活性大分子的後修飾作用、細胞外基質蛋白的分解、synapse 相關蛋白的切割等 (Shiosaka and Yoshida, 2000)，且利用 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 的方法，在大腦皮質及海馬迴部位亦可檢測到 *KLK1* 的表現 (Shimizu-Okabe *et al.*, 2001)，因此本實驗分析了正常人及帕金森氏症患者之 *KLK1* 基因 5' 端上游區的 -130G_N 啟動子多型性，並檢測各多型性啟動子的轉錄活性，以了解此多型性是否和國人帕金森氏症的發生相關。

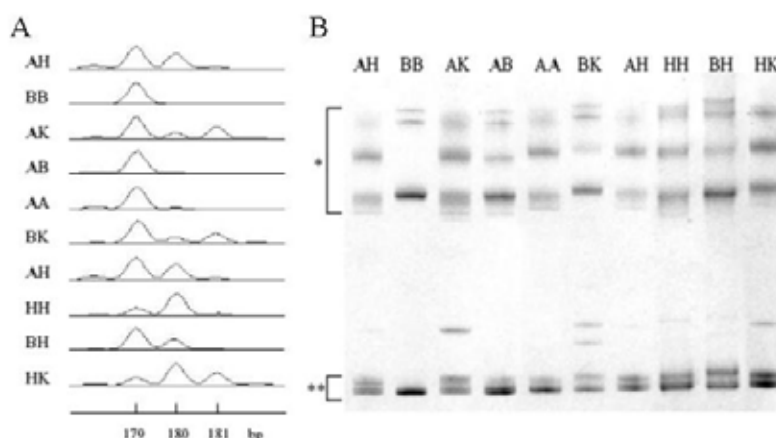
材料與方法

研究樣品

正常人 (95 位) 及帕金森氏症 (208 位) 患者的血液樣品，由林口長庚紀念醫院吳逸如醫師及陳瓊美醫師提供。由各血液樣品的白血球中分離出 DNA。

KLK1 基因啟動子-130G_N 多型性的檢視

以 PCR 放大正常人及帕金森氏症患者之 *KLK1* 基因 5' 端上游區啟動子序列，反應所使用之引子對為 hKPM6: GAATGCGTCCAGCGTGATCC、hKPM7: fam-AGCCCTTATCCCCTCAGAGC。在一 25 μ l 的反應中，反應溶液包含 100 ng 的 DNA、50 ng 的引子對、1.0 mM MgCl₂、200 μ M dNTP 及 0.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酵素 (Promega)。PCR 反應的煉合溫度為 60°C，所放大的 178 ~ 181 bp 片段包含啟動子上 -210 ~ -32 區域 (核苷酸序列 +1 表示 mRNA 轉錄的起始點)。反應完畢後的產物，經稀釋 8 倍後，以聚丙烯酰胺膠體進行長度分析 (MegaBACE Analyzer 定序儀及分析軟體，Molecular Dynamics)，由不同長度推算出各樣品的基因型，如對偶基因 I (178 bp)、A 或 B (179 bp)、H (180 bp)、K (181 bp) 等。對偶基因 A 或 B 可進一步藉單股核酸構形多型性 (SSCP) 及異雙股 (heteroduplex) 分析區分。上述五種多型性對偶基因，亦經選殖、定序，來確認各對偶基因的序列。



圖一、*KLK1* 基因啟動子多型性的檢視。(A) 螢光 PCR 產物之聚丙烯酰胺膠體長度分析結果。(B) 上述 PCR 產物變性後之 SSCP/heteroduplex 分析結果，*及**分別表示變異的單股構形及異雙股構造。各樣品的基因型標示於左方(A)或上方(B)。

Figure 1. Genotype analysis of *KLK1* promoter polymorphism. (A) Electrophoresis of fluoresced PCR products in linear polyacrylamide gels on an automated sequencer. (B) Electrophoresis of danatured PCR products for SSCP and heteroduplex analyses. The template genotypes in (A) and (B) are indicated on the left (A) and top (B).

表一、KLK1 多型性基因型分佈及對偶基因頻率

Table 1. KLK1 genotype distribution and allele frequency

Genotype*	Control		PD	
	No.	(%)	No.	(%)
AA	43	(45.3)	83	(40.0)
AB	14	(14.7)	26	(12.5)
AH	18	(19.0)	47	(22.6)
AI	0	(0.0)	2	(1.0)
AK	7	(7.4)	26	(12.5)
BB	0	(0.0)	2	(1.0)
BH	5	(5.3)	9	(4.3)
BK	1	(1.1)	3	(1.4)
HH	3	(3.2)	4	(1.9)
HK	4	(4.2)	4	(1.9)
KK	0	(0.0)	2	(1.0)
Total	95		208	
Allele*				
A	125	(65.8)	267	(64.2)
B	20	(10.5)	42	(10.1)
H	33	(17.4)	68	(16.4)
I	0	(0.0)	2	(0.5)
K	12	(6.3)	37	(8.9)
Total	190		416	

*A: G₁₀, B: G₂CG₇, H: G₁₁, I: G₉, K: G₁₂.

多型性啟動子片段的轉錄活性分析

取含頻率較高的對偶基因A、B、H、K的DNA樣品，以引子對 hKPM1: CTGCAGGAATCTAGTTC、huKATG: CAGAACCAGGAACCACAT 放大 999 bp 長 (-945 ~ +54) 的多型性啟動子片段，經選殖、定序後，以 *Eco*RI 切出，置入已引入限制酶 *Eco*RI 切位的 pGL3-Basic 載體 (Promega) (Wu *et al.*, 2004) 的螢火蟲 luciferase 報導基因前。培養人類胚胎腎細胞 HEK-293 及人類腦癌細胞 IMR-32 於 37°C 含 5% CO₂ 且溼度良好的培養箱中。培養液為含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青黴素與 100 U/ml 鏈黴素之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)。接種 4×10⁵ 個細胞在 12-well 培養盤上，隔天取 1.5 μg 啟動子重組質體 DNA 及 0.05 μg 含有水母 (*Renilla*) luciferase 之質體 DNA (phRL-TK, 作為 internal control)，以 liposome 轉移入細胞中。兩天後收取細胞，製備細胞液，以冷光測定儀 (Luminometer) 測定螢火蟲及水母 luciferase 的相對活性比值。

統計分析

以基因計算方法分析正常人族群及帕金森

氏症樣品群的多型性對偶基因頻率及異型合子率，並以 χ^2 檢測是否具有顯著差異。上述各對偶基因轉錄活性的差異以雙尾 Student's *t*-test 檢測之。

結果

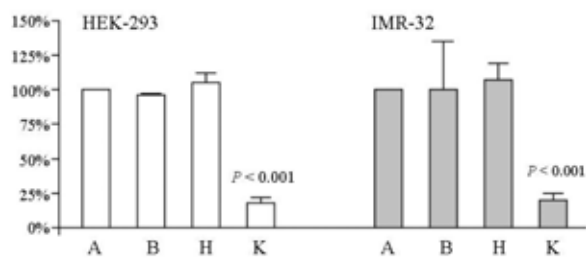
KLK1 基因啟動子多型性分析

KLK1 基因上游區 -130G_N 多型性，以引子對 hKMP6、hKMP7 放大的片段，經螢光定序儀分析後，長度範圍為 178~181 bp，即對偶基因 I 的長度為 178 bp，對偶基因 A、B 的長度為 179 bp，對偶基因 H 的長度為 180 bp，對偶基因 K 的長度為 181 bp 等 (圖一A)。進一步的 SSCP/heteroduplex 分析，可分辨出含對偶基因 A、B 的基因型 (圖一B)。各對偶基因亦經選殖、定序確認其序列變異：I (G₉)、A (G₁₀)、B (G₂CG₇)、H (G₁₁)、K (G₁₂) 等 (data not shown)。

正常人 (95 位) 及帕金森氏症 (208 位) 患者的多型性基因型分析結果列於表一。在正常人及帕金森氏症病患族群中，共觀察到的十一種基因型，其中以 AA 為最常見 (45.3%、40.0%)，其次為 AH (19.0%、22.6%)、AB (14.7%、12.5%)、AK (7.4%、12.5%)、HK (4.2%、1.9%)、BH (5.3%、4.3%)、HH (3.2%、1.9%)、BK (1.1%、1.4%)、AI、BB、KK (皆為 0.0%、1.0%) 等。這十一種基因型由五種對偶基因組成，其中對偶基因 A 最為常見，在兩族群中分別佔 65.8%、64.2%，其次為 H (17.4%、16.4%)、B (10.5%、10.1%)、K (6.3%、8.9%)、I (0.0%、0.5%) 等。

多型性啟動子的轉錄活性分析

將包含上述頻率較高的 A、B、H、K 對偶基因的啟動子，置於螢火蟲 luciferase 報導基因前，如此構築的重組質體，和由 TK 基因啟動子驅動水母 luciferase 之內在控制組質體，共同轉入 HEK-293 及 IMR-32 細胞後，經冷光測定儀測定，計算出表現的兩種 luciferase 的活性比值。如圖二所示，在 HEK-293 及 IMR-32 細胞中，若將對偶基因 A 的活性比值定為 100%，B、H 對偶基因的轉錄活性與 A 對偶基因相較，並無顯著差異 (96%~107%，*P* > 0.05)。相反的，K 對偶基因的轉錄活性遠較 A 對偶基因為低 (18%~20%)，且此差異呈顯著性 (*P* < 0.001)。



圖二、 *KLK1* 基因啟動子多型性對偶基因 A (G_{10})、B (G_2CG_7)、H (G_{11})、K (G_{12}) 於 HEK-293 與 IMR-32 細胞的轉錄活性分析。縱座標的相對比值，係以對偶基因 A 之螢火蟲 luciferase 與水母 luciferase 的活性比值作為 100%，比較其他多型性啟動子重組質體的相對活性的結果。各長方形柱子的數值表三次實驗之平均值 ± 標準誤差值。

Figure 2. Transient expression of luciferase enzymatic activity driven by the *KLK1* 5'-flanking 999-bp fragment containing the A (G_{10}), B (G_2CG_7), H (G_{11}), and K (G_{12}) alleles in HEK-293 and IMR-32 cells. The levels of luciferase activities are expressed as percentages of the activity of the A allele. Each value is the mean ± SD of three independent experiments, each performed in duplicate.

K 對偶基因和帕金森氏症感受性的相關性

上述啟動子的轉錄活性分析結果顯示，*KLK1* 基因的啟動子多型性可能影響其在細胞中的表現量。故進一步分析正常人族群及帕金森氏症患者群，含或不含 K 對偶基因的基因型或 K 對偶基因頻率。結果顯示在此兩樣品群間，並未呈現顯著差異 ($P > 0.05$ ，表二)。

討 論

本研究以台灣地區的帕金森氏症患者與正常人為對象，探討 *KLK1* 基因 -130 G_N 多型性與國人帕金森氏症發生的相關性，並利用報導基因系統進行人類胚胎腎細胞 HEK-293 及腦癌細胞

IMR-32 體外實驗，檢測 *KLK1* 基因啟動子 -130 G_N 多型性對轉錄活性的影響。

在基因型的分析方面，先前 Song 等人於 1997 年的報導中，分析了 18 位亞裔樣品，其所觀察到的四種對偶基因 A (61.1%)、H (25.0%)、B (11.1%)、K (2.8%) 的結果，與我們的結果相似 (表一)。由於我們的樣品群較大 (95 位正常人及 208 位帕金森氏症患者)，故有機會觀察到 I 這個罕見的 (< 0.1%) 對偶基因。此對偶基因 I 在美裔黑人中頗常見 (18.2%) (Yu *et al.*, 2002)，可能源自於較高 I 對偶基因頻率的創始族群及族群間 gene flow 很慢。

在 *KLK1* 啟動子活性分析中，A、B、H、K 對偶基因在 HEK-293 及 IMR-32 細胞中表現的啟動子活性相近 (圖二)。與 A 對偶基因相較，B、H 對偶基因啟動子活性約為 96% ~ 107%，而 K 對偶基因的啟動子活性顯著的較 A 對偶基因為低 (18% ~ 20%， $P < 0.001$)。A、B、H、K 對偶基因其多型性變異分別為 G_{10} 、 G_2CG_7 、 G_{11} 、 G_{12} ，其中 B 對偶基因序列中含 GGCGG，類似轉錄因子 SP1 的辨識序列 (Brown *et al.*, 1992)，其他對偶基因則為連續 G 序列的長度變化 (G_{10} ~ G_{12})。-130 G_N 多型性位點鄰近上游區域尚有 CRE (cAMP response element)、GRE (glucocorticoid response element)，下游區域有 CAAT Box 序列。此多型性位點較長的 K 對偶基因，可能因影響鄰近轉錄因子的結合或其交互作用，而導致低轉錄活性。人類的漸進性 myoclonus 癲癇症 (EPM1) (Lalioi *et al.*, 1999) 及第十二型脊髓小腦共濟失調症 (SCA12) (Holmes *et al.*, 2003)，即因啟動子上的長度差異影響啟動子活性所引起。

表二、 包含或不包含 K 對偶基因的基因型及對偶基因頻率

Table 2. Analysis of genotype and allele frequencies with or without K allele

	Control		PD	
	No.	(%)	No.	(%)
Genotype* without K allele (AA, AB, AH, AI, BB, BH, HH)	83	(87.4)	173	(83.2)
Genotype with K allele (AK, BK, HK, KK)	12	(12.6)	35	(16.8)
				0.2744
Allele* A, B, H, I	178	(93.7)	379	(91.1)
Allele K	12	(6.3)	37	(8.9)
				0.2118

*A: G_{10} , B: G_2CG_7 , H: G_{11} , I: G_9 , K: G_{12} .

先前本實驗室及 Yu 等人曾分析正常人族群與腎病患者群此 KLK1 啟動子多型性的分佈，結果發現 K 對偶基因與腎病進程有關 (Yu *et al.*, 2002; Lee-Chen *et al.*, 2004)。KLK1 可活化 kinin、促使血管擴張、降低血壓，來拮抗腎素-血管收縮素系統 (Scicli and Carretero, 1986)。當 KLK1 活性偏低時(如 K 對偶基因攜帶者)，相對的腎素-血管收縮素系統的表現量可能會較高，導致腎病的惡化。本研究中，K 對偶基因活性顯著低於 A、B、H 對偶基因的結果，與上述腎病進程的研究相符。Song 等人於 1997 年報導此 KLK1 啟動子多型性時，也曾於 HEK-293 細胞中分析過啟動子功能，此實驗將啟動子片段-940 ~ +10 的 B 對偶基因的活性設為 100%，A、K、I 對偶基因與 B 相較，無顯著差異，但 H 對偶基因的轉錄活性顯著較低，僅為 B 對偶基因的 15.6%，此結果與本研究的啟動子片段-945 ~ +54 分析結果相異。推測或許 Song 等人和本研究所使用的啟動子片段上，可能有其他未報導過的多型性變異，而導致不同的研究結果。

KLK1 是 serine proteases 的一種，除活化 kinin 來拮抗血管收縮素的功能外，在神經系統多處部位亦表現 (Shimizu-Okabe *et al.*, 2001)，參與大分子的轉譯後修飾作用、細胞外基質蛋白的分解，和 synapse 相關蛋白的切割等 (Shiosaka and Yoshida, 2000)。由於帕金森氏症源自於蛋白質不當的儲積，故推測其表現量變異可能和國人帕金森氏症發生相關。但本研究結果顯示，雖然 K 對偶基因的活性顯著較低，但此 K 對偶基因和國人帕金森氏症的發生並沒有太大關連性。

誌謝

本研究感謝同意參與研究的帕金森氏症病患及正常人。研究經費來源係由國科會計畫 NSC-93-2314-B-182A-175 所補助，於此一併致謝。

參考文獻

Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M and Seidah NG. 1991.

Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* 30:1628-1635.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA and Heutink P. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256-259.

Brown CJ, Baltz KA and Edenberg HJ. 1992. Expression of the human ADH2 gene: an unusual Sp1-binding site in the promoter of a gene expressed at high levels in liver. *Gene* 121:313-320.

Carbarni LA, Scicli AG and Carretero OA. 1993. The molecular biology of the kallikrein-kinin system, III: the human kallikrein gene family and kallikrein substrate. *J. Hypertens.* 11:893-898.

Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA and Davie EW. 1986. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 25:2410-2417.

Clements JA. 1994. The human kallikrein gene family: a diversity of expression and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 99:C1-C6.

Evans BA, Yun ZX, Close JA, Tregear GW, Kitamura N, Nakanishi S, Callen DF, Baker E, Hyland VJ, Sutherland GR, et al. 1988. Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene. *Biochemistry* 27:3124-3129.

Holmes SE, O'Hearn E, Margolis RL. 2003. Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet. Genome Res.* 100:189-197.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y and Shimizu N. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.

Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L and Riess O. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18:106-108.

Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. 1999. Altered spacing of promoter elements due to

- the dodecamer repeat expansion contributes to reduced expression of the cystatin B gene in EPM1. *Hum. Mol. Genet.* 8:1791-1798.
- Lang AE and Lozano AM. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339:1044-1053.
- Lee-Chen GJ, Liu KP, Lai YC, Juang HS, Huang SY and Lin CY. 2004. Significance of the tissue kallikrein promoter and transforming growth factor- β 1 polymorphisms with renal progression in children with vesicoureteral reflux. *Kidney Int.* 65:1467-1472.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD and Polymeropoulos MH. 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451-452.
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, de Munain AL, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW and Singleton AB. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44:595-600.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI and Nussbaum RL. 1997. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CBJM and Trapman J. 1992. Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics* 14:6-11.
- Scicli AG and Carretero OA. 1986. Renal kallikrein-kinin system. *Kidney Int.* 29:120-130.
- Shimizu-Okabe C, Yousef GM, Diamandis EP, Yoshida S, Shiosaka S and Fahnestock M. 2001. Expression of the kallikrein gene family in normal and brain. *Mol. Neurosci.* 12:2747-2751.
- Shiosaka S and Yoshida S. 2000. Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors. *Neurosci. Res.* 37:85-89.
- Song Q, Chao J and Chao L. 1997. DNA polymorphisms in the 5'-flanking region of the human tissue kallikrein gene. *Hum. Genet.* 99:727-734.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G and Wood NW. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160.
- Wu YR, Wang CK, Chen CM, Hsu Y, Lin SJ, Lin YY, Fung HC, Chang KH and Lee-Chen GJ. 2004. Analysis of Heat shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Hum. Genet.* 114:236-241.
- Xiong W, Wang J, Chao L and Chao J. 1997. Tissue-specific expression and promoter analyses of the human tissue kallikrein gene in transgenic mice. *Biochem. J.* 325:111-116.
- Yousef GM, Chang A, Scorilas A and Diamandis EP. 2000. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:125-133.
- Yu H, Song Q, Freedman BI, Chao J, Chao L, Rich SS and Bowden DW. 2002. Association of the tissue kallikrein gene promoter with ESRD and hypertension. *Kidney. Int.* 61:1030-1039.

Analysis of *KLK1* Gene -130G_N Polymorphism with the Risk of Parkinson's Disease

Shu-Yi Huang¹, Huei-Shiuan Juang¹, Chiung-Mei Chen², Yih-Ru Wu^{2*}, Guey-Jen Lee-Chen^{1*}

¹Department of Life Science, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

²Department of Neurology, Chang Gung Memorial Hospital
Taipei, Taiwan

(Received: 19 April 2005, accepted: 6 May 2005)

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder involving several genetic and environmental components. Human tissue kallikrein (*KLK1*) is a serine protease expressed in both the cerebral cortex and hippocampus. In this study we investigated the association of *KLK1* gene -130G_N polymorphism with the risk of Parkinson's disease. The -130 G_N polymorphism was analyzed by electrophoresis of fluoresced PCR products in sequencing gels, single-strand conformation polymorphism (SSCP)/heteroduplex analysis and DNA sequencing. Two hundred and eight patients with PD and 95 normal controls were examined. Five alleles were identified in the *KLK1* promoter: I (G₉), A (G₁₀), B (G₂CG₇), H (G₁₁), and K (G₁₂). A reporter construct containing the K allele cloned into a luciferase reporter plasmid drove significantly lower transcriptional activity of *KLK1* as compared with the A, B, and H alleles in both HEK-293 and IMR-32 cells. However, when the genotype and allele frequencies with or without K allele were analyzed, no statistically significant difference was observed between PD patients and controls. Therefore, the results indicate that although associated with lower transcriptional activity, *KLK1* -130 G_N K allele was not associated with the risk of Taiwanese PD.

Key words: *KLK1*, -130G_N polymorphism, Parkinson's disease, disease susceptibility

*Corresponding author: Guey-Jen Lee-Chen; FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43019@cc.ntnu.edu.tw
Yih-Ru Wu; FAX: 886-3-3288849; E-mail: yihruwu@adm.cgmh.org.tw
Shu-Yi Huang and Huei-Shiuan Juang contributed equally to this work.