

# 반성 열성 범저감마글로불린혈증 1가계 3환자의 Bruton's Tyrosine Kinase 유전자 변이 및 임상 양상

충남대학교 의과대학 미생물학교실, 소아과학교실\*, 전남대학교 의과대학 소아과학교실†

조은경 · 송창화 · 박정규 · 백영종\* · 유혜영\* · 이재호\* · 황태주† · 국 훈†

## Characterization of Bruton's Tyrosine Kinase Genetic Mutations in One Korean X-linked Agammaglobulinemia Family

Eun-Kyeong Jo, M.D., Chang-Hwa Song, M.S., Jeong-Kyu Park, M.D.  
Young-Jong Baek, M.D.\*, Hye-Young Rhu, M.D.\*, Jae-Ho Lee, M.D.\*  
Tai-Ju Hwang, M.D.† and Hoon Kook, M.D.†

*Department of Microbiology and Pediatrics\*, College of Medicine,  
Chungnam National University, Taejeon, Department of Pediatrics†,  
Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea*

**Purpose:** X-linked agammaglobulinemia(XLA) is an immunodeficiency caused by abnormalities in Bruton's tyrosine kinase(Btk), and is characterized by a deficiency of peripheral blood B cells. We studied the cytoplasmic expression of Btk protein and analyzed the Btk gene in peripheral blood mononuclear cells from two siblings and one cousin with XLA, as well as additional family members.

**Methods:** Btk protein expression was analyzed by flow cytometry. Isolation of the coding sequence of the Btk gene was performed by amplification using the reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) technique. Sequence alterations were screened by the single-stranded conformation polymorphism(SSCP) method and characterized by standard sequencing protocols.

**Results:** Cytoplasmic expression of Btk protein in monocytes was not detected in three patients with XLA. In addition, Btk protein analysis clearly showed cellular mosaicism in monocytes from four obligate carriers, findings further supported by SSCP. A single base pair mutation(T to C) in Btk-exon three, which encodes the PH domain, was identified in four XLA patients. A diagnostic sequencing analysis was established to detect heterozygotic pattern in 4 carrier females. Furthermore, we found significant clinical heterogeneity in individuals with the same gene mutation.

**Conclusion:** The implicating genetic alteration provided valuable clues to the pathogenesis of XLA in Korea and the flow cytometric analysis was suggested as a useful tool for rapid detection of XLA patients and carriers. The present study has identified a genetic mutation in the Btk coding region and demonstrated heterogeneity in clinical manifestations among patients with the same mutation. A flow cytometric analysis was found to be informative in establishing a deficiency of Btk protein in both patients and carriers and is recommended as a frontline procedure in the molecular diagnosis and work-up of XLA. (*J Korean Pediatr Soc* 2002;45:183-191)

**Key Words:** Bruton's tyrosine kinase, X-linked agammaglobulinemia, Direct sequencing, Flow cytometry, Carrier detection

\* 본 연구는 1998년도 한국과학재단 한일공동연구 연구비(986-0700-005-2)에 의하여 연구되었음.

접수: 2001년 7월 27일, 승인: 9월 11일

책임저자: 국 훈, 전남대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 062)222-6645 Fax : 062)222-6103 E-mail : hoonkook@chonnam.ac.kr

## 서 론

반성 열성 범저감마글로불린혈증(X-linked agammaglobulinemia; 이하 XLA)은 선천성 면역결핍질환 중 최초로 보고된 체액성 면역결핍질환으로서<sup>1)</sup> Bruton's tyrosine kinase(Btk) 유전자의 돌연변이에 의해 유발된다<sup>2, 3)</sup>. 환아들은 Btk 단백질이 결핍되어 있거나 기능적으로 불완전하여, 골수에서의 B 세포 분화 과정 중 pre-B cell 단계에서 더 이상의 분화를 수행하지 못하게 된다<sup>4)</sup>. 따라서 환아들은 림프절내의 배중심(germinal center)의 생성이나 혈장세포(plasma cell)가 잘 관찰되지 않으며 특징적인 체액성 면역 결핍 증세를 호소하게 된다. 즉 환아들은 말초혈액 내의 성숙 B 림프구의 수 및 면역글로불린의 생성이 현저히 감소되어 각종 세균성 감염이 빈발하게 된다. 특히 XLA 환아들에게는 만성적으로 반복되는 중이염, 폐렴 및 화농피부증(pyoderma) 등의 발병 빈도가 높으며 주로 *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* 및 *Staphylococcus aureus* 등과 같이 피막(capsule)을 갖는 세균에 의한 감염증이 빈번하게 관찰된다. T 세포 혹은 탐식세포에 관련된 면역결핍 질환과 달리 만성적인 진균감염은 잘 관찰되지 않으며 *Pneumocystis carinii*에 의한 폐렴 역시 흔하지 않다. 치료로는 정주용 면역글로불린을 간헐적으로 투여하는데, 치료에도 불구하고 엔테로바이러스, 아데노바이러스 및 각종 장관계바이러스에 의한 만성 감염증을 겪는다<sup>5-7)</sup>.

세포질 Btk는 Btk/Tec family로 알려진 tyrosine kinase 군에 속하는 단백질로서 pleckstrin homology domain(PH), Tec, Src homology 3(SH3), SH2 및 SH1 등 5개의 도메인 구조로 이루어져 있다<sup>8)</sup>. XLA 환아에서 Btk 유전자의 돌연변이는 이들 5개의 도메인 전역에서 발견되며<sup>9)</sup> 임상양상 또한 매우 다양하나 유전형으로 면역결핍 증상의 정도를 예측할 수 없다<sup>10-13)</sup>. 환아들 대부분은 Btk 단백질 발현이 현저히 저하되어 있으며 이는 대부분 Btk mRNA의 감소 혹은 단백질 자체의 결함에 의한다<sup>2, 11, 14, 15)</sup>. 고전적으로 Btk는 B 세포 수용기(B cell receptor; 이하 BCR)의 신호전달에 중요한 역할을 수행하여 B 세포의 분화에 관여할 것으로 생각되어 왔다. 최근 Btk의 기능에 대한 연구에서 HeLa 세포에 대한 Btk의 과발현은 세포

의 아포토시스를 초래한 반면, B 세포에서는 오히려 Btk에 의해 세포가 아포토시스로부터 보호되었다고 보고되어 Btk는 세포의 생존과 아포토시스에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되었다<sup>16)</sup>.

현재까지 세계적으로 Btk 유전자와 관련된 유전자 변이는 육백여개 이상이 보고되었으며, BTKbase에 정보가 축적되고 있다<sup>17, 18)</sup>. Btk는 B 세포에서만 발현되는 것이 아니라 단핵구에서도 발현되지만<sup>15, 19)</sup> XLA 환아들은 B 세포 외에 단핵구의 분화는 정상적으로 이루어지기 때문에<sup>20, 21)</sup> XLA 환아들의 단핵구 Btk 단백질 발현에 대한 유세포 계측 방법이 최근 XLA 환아들과 보인자를 스크리닝하는 방법으로 제안되었다<sup>15)</sup>. 최근 국내 연구에서 백 등<sup>22)</sup>은 한국인 X-관련성 범저감마글로불린혈증 환자의 새로운 점돌연변이를 보고하였으며 동시에 비교적 간단한 유세포 계측 방법에 의해 단핵구내 Btk 단백질 발현을 측정하여 환아와 보인자를 감별할 수 있었다.

본 연구에서는 임상적으로 XLA 진단하에 현재 치료 중인 환아와 가계를 대상으로 항 Btk 항체를 이용한 유세포 계측을 시행하여 Btk 발현도를 분석하였다. 유세포 계측 및 polymerase chain reaction single-stranded conformation polymorphism(PCR-SSCP) 기법을 이용하여 가계내 환아 3명과 보인자 4명을 검색하고 직접염기서열(direct sequencing) 방법에 의하여 Btk 유전자 변이 분석을 시행하였으며 환아들에 대한 임상 양상을 비교하여 다음과 같은 몇가지 결과를 얻었다.

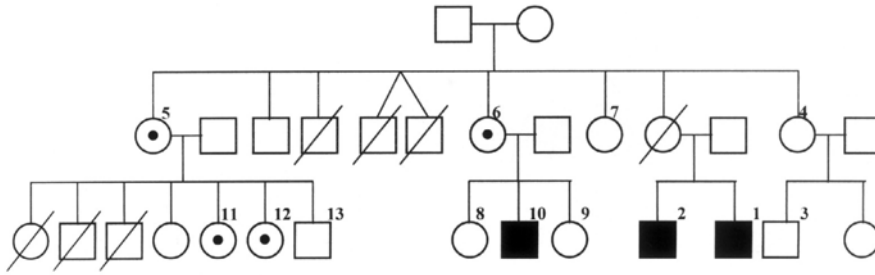
## 대상 및 방법

### 1. 반성 열성 범저감마글로불린혈증 환아

전남대학교병원에 내원하여 치료 중인 사촌간의 XLA 환아 2명과 나중에 진단된 형, 총 3명의 환아와 가계를 대상으로 하였으며 이들 가족 중 13명에서 검체를 채취하여 본 연구를 시행하였다(Fig. 1).

### 2. 말초혈액 단핵구의 분리

환아와 가족 및 건강인 공혈자로부터 heparin(중의 제약, 25,000 IU)을 전처치한 주사기로 25 mL의 정맥혈을 채혈하여 Ficoll-Hypaque 20 mL 위에 조심스럽게 중첩한 후 1,500 rpm에서 30분간 원심 분리하여 중간층의 단핵 세포를 수거하여 RPMI 1640(GIBCO



**Fig. 1.** Pedigree of the XLA family. Dark symbols indicate male patients with XLA. Target represent carrier of X-linked recessive disorder. Superscribed numbers denote those individuals who underwent the study.

430-1800) 기초 배양액으로 1,200 rpm에서 10분간씩 3회 세척하였다. 최종적으로 10% fetal bovine serum(GIBCO), MEM Na pyruvate, MEM non-essential amino acid, penicillin G(100 U/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 RPMI 1640 배지(RPMI 1640 완전 배양액)에 부유하여 trypan blue 염색으로 살아 있는 총 세포수를 산정하였다.

**3. 유세포 계측(flow cytometry)을 이용한 단핵구내 Btk 발현 측정**

유세포 계측에 의한 단핵구내 Btk 염색 및 발현 측정은 Futatani 등<sup>15)</sup>의 방법에 의해 시행하였다. 약 술하면 말초혈액 단핵세포 분리 후 1×10<sup>6</sup> 세포를 phosphate buffered saline(PBS)에 부유하여 polypropylene tube(Falcon No. 2052)에 분주하고 4°C, 1,200 rpm에서 1회 세척한 후 PE-conjugated CD20 (IgG2b) antibody로 4°C에서 20분간 염색하였다. 냉 PBS로 4°C, 1,200 rpm에서 1회 세척한 후 4% paraformaldehyde(in PBS)로 15분간 고정시키고 다시 PBS로 4°C, 1,200 rpm에서 2회 세척한 후 Tris-buffered saline(이하 TBS)내 0.1% Triton X-100과 0.1% bovine serum albumin이 첨가된 permeabilization 용액으로 상온에서 5분간 반응시켜 세포막을 전처리하였다. 이를 1% 우태아혈청(fetal calf serum) 및 0.1% sodium azide가 포함된 세척 완충액(washing buffer)으로 2회 세척한 후 비특이적인 결합을 제거하기 위해 5% 정상 염소 혈청(normal goat serum)을 첨가하여 10분간 반응시켰다. 일차항체반응은 항 BTK 항체(48-2H, IgG1; Tsukada S 제공, Osaka University Medical School, Osaka 565, Japan)를 5.0 µg 가하여 얼음 위에서 20분간 반응하였다. 세척 완충액으로 2회 세척한 후 FACScalibur(Bec-

ton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 Btk의 발현 비율을 조사하였다.

**4. Btk 유전자 변이 분석**

**1) 단핵세포로부터 total RNA 및 genomic DNA의 분리**

단핵세포로부터의 total RNA 분리는 RNeasy kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. 또한 genomic DNA의 분리는 5×10<sup>5</sup>-1×10<sup>6</sup> 세포를 PBS로 두번 세척한 후 이를 lysis buffer(10 mM Tris-Cl pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 20 µg/mL RNase A) 0.4 mL에 부용시킨 후, 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 다시 proteinase K(10 µg/mL) 8 µL를 첨가하여 50°C에서 3시간 반응시킨 후 95% ethanol을 이용하여 DNA를 침전시켜서 0.1 mL 증류수에 녹여 사용하였다.

**2) 중합효소연쇄반응을 위한 primer DNA의 준비**

Btk cDNA의 RT-PCR용 primer의 염기서열은 Hashimoto 등<sup>11)</sup>에 준하여 7쌍을 제조하였으며 모든 primer DNA는 Bioneer사(Bioneer, Korea; PAGE 정제급)에 주문 합성하여 사용하였다.

**3) 중합효소연쇄반응에 의한 유전자 발현 분석**

총 RNA의 RT-PCR은 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들고 이어서 DNA를 증폭하였으며 각각의 조건에서 5 µg의 total RNA를 이용하여 시행하였다. Genomic DNA에 대한 PCR의 경우 준비된 genomic DNA 산물 중 1 µg씩 그리고 cDNA PCR의 경우 생성된 cDNA 산물 중 10 µL씩 취하여 다음과 같은 동일한 조건에서 PCR을 시행하였다. 즉 4 µL의 10×PCR buffer(0.1 Tris-Cl pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl<sub>2</sub>), 1 µL의 5'- 및 3'-primer

(40 pmol), 0.5 U Taq DNA polymerase(Bioneer)를 각 tube에 첨가하여 총반응액이 50  $\mu$ L 되도록 하여 PCR을 시행하였다. PCR은 DNA thermal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 총 33회의 cDNA 증폭반응을 실시하였다. PCR 조건은 변성(denaturation)은 94°C에서 30초, 단련(annealing)은 58°C에서 30초, 신전(extension)은 72°C에서 40초간 반응하고 최종적으로 72°C에서 8분간 반응하였다.

#### 4) PCR-SSCP에 의한 유전자 변이 분석

PCR 산물 중 3  $\mu$ L를 취하여 9  $\mu$ L의 sample loading buffer(95% formamide, 10 mM NaOH, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)에 혼합한 후 100°C에서 5분간 변성한 후 재조합(reannealing)을 방지하기 위해 얼음에 담가 급냉하였다. 각 표본을 1 $\times$ sample buffer(33 mM Tris-sulfate, 7% glycerol, pH 8.3)를 포함하는 12% polyacrylamide gel에 loading하여 250 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후 gel은 Bio-Rad사의 Silver Stain Plus kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 염색하고 건조시켜 보관하였다.

#### 5) DNA direct sequencing에 의한 유전자 변이 분석

한편 PCR 산물은 직접 염기서열 분석을 위해 Promega사의 PCR Preps DNA Purification System을 이용하여 DNA를 먼저 순수 분리하였다. 이를 Sequenase 2.0 kit(USB, Cleveland, OH) 및 BigDye terminator cycle sequencing kit(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 dideoxy nucleotide-chain termination 방법(Sanger F, 1977)으로 반응한 후 자동염기서열분석기(ABI PRISM 310 genetic analyser; PE Applied Biosystems)을 이용하여 각 DNA 표본의 염기서열을 분석하였다. 또한 cDNA PCR 산물에 대한 염기서열 분석 도중 유전자 변이가 발견되면 반대방향의 primer를 이용하여 유전자 변이 여부를 확인하였으며 각 intron 및 exon 경계를 포함하는 genomic DNA에 대한 염기서열 분석을 실시하여 돌연변이를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 환자의 임상증세 및 혈액 검사 소견

환자 P1의 경우 생후 6개월 이후부터 빈번한 감염

증세를 나타내었으며 중이염, 부비동염, 폐렴 등으로 잦은 내원 및 입원의 과거력이 있었다. 그러나 같은 유전자 돌연변이를 갖는 환자의 형제 P2의 경우 환아와 같은 임상증세를 나타내지 않았다. 환아의 사촌인 P3의 경우 P1에 비해 경미한 임상증세를 갖고 있었으나 정상적인 직장 생활을 하고 있었다. 본 연구 대상 중 보인자인 이모 혹은 사촌들은 IgG의 검사결과가 정상 범위였으며 면역결핍을 의심할 만한 임상 소견도 없었다. 환아 P1의 경우 내원시 처음 측정된 IgG가 14.0 mg/dL로 현저한 감소를 보였고 무증상이었던 형 P2는 463.0 mg/dL로 경한 감소를, 그리고 사촌 P3는 281.0 mg/dL로 중등도 감소를 나타내었다. 유세포 계측에 의한 환아들의 CD19 양성 말초혈액 B 세포의 비율은 0.2 내지 0.3%로 정상인에 비해 매우 감소되어 있었으나 T 림프구와 보체계는 정상 범위에 있었다(결과는 표로 제시하지 않음).

환자 P1의 경우 영아기부터 재발되는 만성부비동염 4회 이상, 폐렴은 3회 이상 재발되는 과거력이 있었다. 당시 면역글로불린 검사와 B 세포 측정으로 임상적으로 XLA로 진단되었으며 매 3 내지 4주 간격으로 면역글로불린 정주 후 현재까지 별다른 감염 증세 없이 건강하게 생활하고 있었다. 환자 P2의 경우 유세포 계측 및 유전자 진단 당시까지 별다른 임상증세를 나타내지 않고 면역글로불린 정주 치료를 받지 않으면서도 건강한 생활을 하고 있었다. 또한 사촌인 환자 P3의 경우는 지속적인 중이염과 폐렴 증세를 나타내었으나 규칙적인 면역글로불린 정주 치료를 받은 후 별다른 감염 소견을 보이지 않고 생활하는 상태였다(Table 1).

### 2. 유세포 계측을 이용한 세포내 Btk 발현 측정

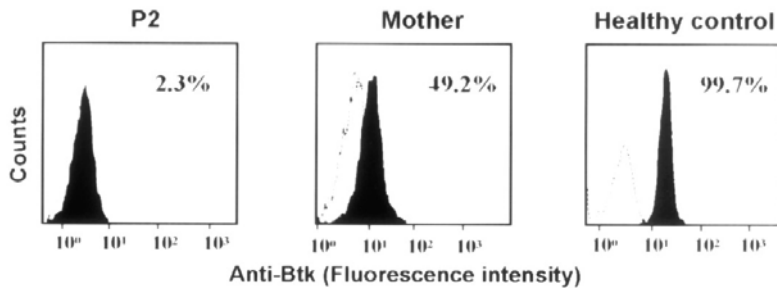
항 Btk 항체를 이용하여 말초혈액 단핵구 세포질 내의 Btk 단백질을 염색하고 유세포 계측에 의해 Btk 단백질 발현도를 검사한 결과 3명의 XLA 환아와 환아 가족내 4명의 보인자를 조기 진단할 수 있었다.

정상인의 단핵구 Btk 발현 비율은 평균 95% 이상이었으나 대상 환아들의 단핵구 중 Btk 발현 비율은 평균 2.0%(range, 0.9-2.7%)로 건강인에 비해 유의하게 감소되어 있었으며 보인자의 경우 평균 40.9%(range, 22.6-52.4%)로 건강인의 약 반 정도의 발현을 나타내었다. 환아의 모친은 교통사고로 이미 사망하여 유세포 계측을 시행할 수 없었으나 환아의 이모

**Table 1.** Laboratory Data and Clinical Characteristics

Patient No.	Age at diagnosis (yr)	Ig level(mg/dL) at onset*			Peripheral B cells (%)†	Family	Clinical presentation
		IgG	IgM	IgA			
P1	9	14.0	0	0	0.2		Chronic sinusitis, pneumonia, skin infection, arthritis
P2	14	463.0	20.1	61.7	0.3	Brother of P1	Well
P3	10	281.0	4.9	20.3	0.2	Cousin of P1	Chronic sinusitis, bacterial pneumonia

\*Reference values for 7-14 yr old children : serum IgG, 570-1,570 mg/dL; serum IgM, 33-135 mg/dL; serum IgA, 86-544 mg/dL, †Peripheral B cells were enumerated by flow cytometric determination of anti-CD19



**Fig. 2.** Flow cytometric analysis of Btk protein expression in monocytes. Peripheral blood mononuclear cells were stained for Btk as described in the text. Monocytes were gated on the basis of CD14 positivity. The dashed line indicates the isotype control antibody. Five thousand cells were evaluated in each gated population.

2명 및 사촌 중 2명의 경우 전형적인 mozaic pattern 이 관찰되어 보인자 임을 진단할 수 있었다. 그러나 가족 중 나머지 대상 6명에서는 단핵구의 Btk 발현이 정상이었다(Fig. 2, Table 2).

**3. Btk 유전자 변이 분석**

**1) PCR-SSCP**

각 대상 환아에서 수집한 말초혈액 단핵세포로부터 유전자를 추출하여 Btk 유전자의 변이를 먼저 PCR-SSCP 방법에 의해 선별검색 하였다. 대상인의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 시행한 후 DNA 밴드를 변성시키고 전기영동하여 비교한 결과 환자와 정상인 및 보인자 간의 exon 3에 대한 PCR 산물에서 이동 변위(mobility shift)의 분명한 차이점이 관찰되었다(Fig. 3). 환아 형제의 4명의 이모들을 대상으로 PCR-SSCP를 시행한 결과 정상인의 밴드와 뚜렷하게 구별되는 이형접합체 양상(heterozygote pattern)을 나타내어 2명의 이모(Fig. 3: 5, 6)가 보인자임을 확인할 수 있었다. 또한 이들 2명의 이모들에 대한 자녀를 대상으로 PCR-SSCP를 시행한 결과 2명의 이종사촌(Fig. 3: 11, 12)이 보인자임을 알 수 있었다.

**Table 2.** Btk Expression Status in XLA Patients and Carriers as Evaluated by a Flow Cytometric Assay

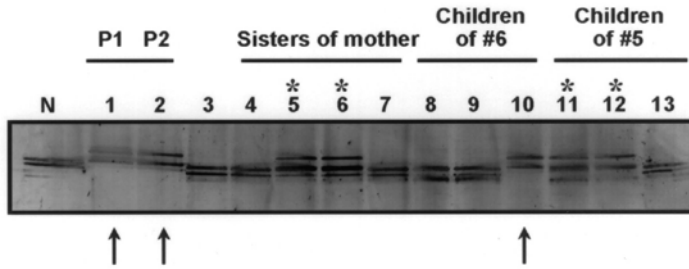
Subject No.	Btk expression in monocytes(%)*	Pattern of Btk expression
P1	2.3	Deficient
P2	2.7	Deficient
Aunt(5)	49.2	Mozaic
Aunt(6)	52.4	Mozaic
P3	0.9	Deficient
Daughter of aunt 5(11)	39.2	Mozaic
Daughter of aunt 6(12)	22.6	Mozaic

\*Data represent the percentages of anti-Btk stainable cells exceeding the upper limit of control staining with an isotype-matched irrelevant MoAb

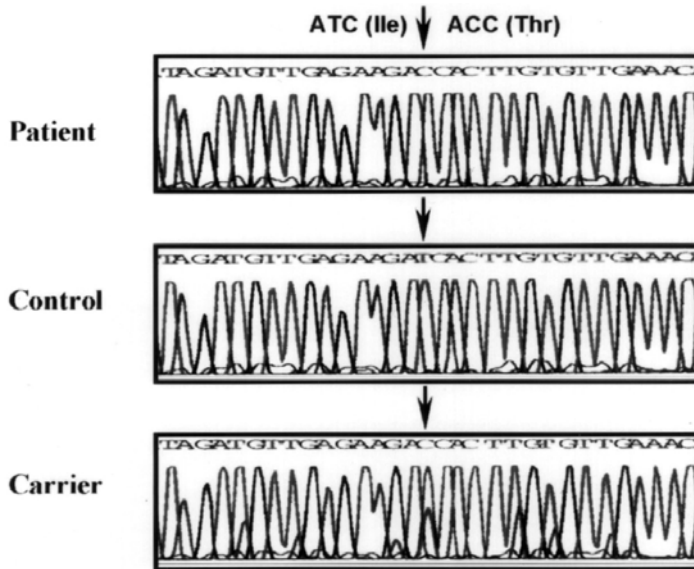
환아들(Fig. 3: 1, 2, 10)은 정상인의 경우와 다른 이동 변위가 관찰되었으며 환아와 보인자에 대한 PCR-SSCP 결과는 유세포 계측 결과와 동일하여 두 방법 모두 환아와 보인자 스크리닝에 매우 유용하고 재현성 있는 기법으로 판단되었다.

**2) 직접 염기서열 분석**

환아 genomic DNA로부터 각 exon 부위를 PCR



**Fig. 3.** Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) analysis of the Btk exon 3. DNA was amplified and analyzed as described in the text. Lane numbers correspond to the superscribed subject numbers in Fig. 1. The homozygote patterns are shown in lanes 1, 2, and 10(↑). Heterozygote patterns denoting carriers are shown in lanes 5, 6, 11 and 12(\*).



**Fig. 4.** Mutation analysis of Btk-exon 3. Direct sequencing of the PCR products of exon 3 for patients P1, P2, and P3 showed a T-to-C mutation at nucleotide position 314 resulting in a ile-61 -> Thr change(↓).

에 의하여 증폭한 후 직접 염기서열 분석을 시행한 결과 Btk 유전자 exon 3에서 한개의 염기의 치환(T→C)에 의해 isoleucine이 threonine으로 전환된 과오돌연변이(missence mutation)가 발견되었다. 환자 3명의 경우 동일한 유전자 변이가 관찰되었고 보인자 4명의 경우 T와 C 염기가 동시에 존재하여 뚜렷한 이형접합체 양상이 관찰되었다(Fig. 4).

### 고 찰

일차면역결핍질환은 면역계에서 필수적인 역할을

담당하는 세포들의 염색체 이상 혹은 각종 유전자 돌연변이에 의해 궁극적으로 면역계의 발달과 기능장애를 초래하게 되는 유전 질환이다<sup>4)</sup>. 특히 XLA는 대표적인 체액성 면역결핍질환으로 주요 면역세포인 B 세포의 형성 혹은 기능장애에 의해 반복적인 세균 감염 및 합병증을 동반하는 중요한 면역질환으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 근접한 일본의 경우는 이미 1980년대 초반부터 국가적인 질환등록체계를 갖추고 70 내지 80 명의 만성 열성 저감마글로불린혈증 환자를 진단 및 보고하고 있으며 최근에는 X-관련성 저감마글로불린혈증 질환 35가계로부터 Bruton's tyrosine kinase(Btk)의

유전자 변이 및 단백질분석을 실시하여 일본 내 반성 열성 저감마글로불린혈증의 유전적 특성을 보고하고 있다<sup>11)</sup>. 우리나라에도 XLA 환아와 가족이 다수 존재할 것으로 생각되며 최근 백 등에 의해 국내 XLA 환아에 대한 분자유전학 진단이 처음으로 시행되어 보고된 바 있다<sup>22)</sup>.

본 연구는 임상적으로 XLA로 진단 받고 현재 치료 중인 한 가족 3명 환아의 가족을 대상으로 Btk 발현도를 항 Btk 항체를 이용한 유세포계측을 통해 분석하고 PCR-SSCP 및 직접염기서열분석에 의해 Btk 유전자 변이를 조사하고자 하였다. 환아들의 B 림프구의 발현은 1 % 미만으로 건강인에 비해 매우 저하되어 있었으며 환아 단핵구 유래 Btk 단백질의 발현도 매우 감소된 양상이었다. 유세포 계측 결과 대상 환아 가족 중 2명의 이모와 2명의 이종사촌에서 단핵구 Btk 발현이 뚜렷한 모자이크 양상(mosaic pattern)을 나타내어 보인자임을 예측할 수 있었다. 최근 Futatani 등<sup>15)</sup>도 XLA 환아에 대하여 시행한 유세포 계측 결과 XLA 환아 41명 중 35명에서 Btk 단백질의 완전한 결핍이 발견되었다고 하며 5명의 경우 부분적 결핍이, 그리고 다른 1명의 경우 정상인과 같은 수준의 Btk 단백질 발현이 관찰되었다고 보고하였다. 국내에서도 최근 백 등<sup>22)</sup>이 XLA 1 가족에서 보고한 바 있어 Btk 유세포 계측 방법이 유전자 염기 서열을 분석하기 전 매우 유용한 보인자 선별 검색 방법으로 사료된다.

본 연구에서 동일한 유전형을 지닌 3명의 환아들은 동일한 XLA 유전형에도 불구하고 임상적으로 매우 다양한 표현형을 나타내었다. 환아 P1의 경우가 가장 빈번한 감염증을 호소하였으나 P2의 경우는 별다른 면역글로불린 치료 없이도 건강한 상태를 유지하고 있었다. 그러나 P3의 경우 환아 P1에 비해 임상적으로는 경미하였으나 계속적인 면역글로불린 정주 치료를 받으며 생활하는 상태였다. 이 가족 내의 임상 양상의 심한 정도는 혈청 IgG 수준과 연관되어, 혈청 IgG 수준이 낮을수록 심한 임상양상을 나타내었다. 하지만 돌연변이의 종류, 즉 유전형과 임상 양상의 경중을 비교한 결과 어떤 유의한 상관관계를 관찰하지 못했다<sup>24)</sup>. 실제로 돌연변이 분석 결과 XLA의 임상 양상은 매우 다양한 차이점을 나타내었는데<sup>9, 24, 25)</sup>, 이는 Btk 돌연변이 외에 다른 주요 인자가 이들의 임상 양상에 큰 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 즉 Btk 유

전자 외에도 T 세포 보조기능의 장애 분석, 림프절 내 혈장세포의 결핍 여부, 특정 MHC allele과의 관련성이나 C4A 유전자 결손 등<sup>26)</sup> 각종 조절인자에 대한 더욱 많은 연구가 이루어져야 하리라고 본다. 본 연구 결과 IgG의 수준이 환아의 임상 양상과 매우 밀접한 연관성을 나타낼 것으로 생각되나 백 등<sup>22)</sup>은 환아 형제간의 IgG의 생산이 비슷한 수준임에도 불구하고 현저한 임상 양상의 차이를 보고하였다.

본 환아들에서는 Btk 유전자 exon 3에서 점돌연변이(T→C)가 발견되어 아미노산의 치환이 일어난 과오 돌연변이를 확인할 수 있었다. Btk 유전자는 X 염색체 상의 Xq21.3-q22 부위에 위치하며<sup>27, 28)</sup> 최근 Btk 유전자의 cDNA 서열이 밝혀지고<sup>2, 3)</sup> 기능적으로는 Src와 유사한 세포질내 tyrosine kinase family에 속한다고 보고되었다<sup>29)</sup>. Btk는 독특한 5개의 도메인으로 구성된 총 659개 아미노산으로 이루어져 있으며<sup>2, 3)</sup> 본 연구의 아미노산 치환이 일어난 부위는 Btk 5개의 도메인 중 PH 도메인 부위이다. 최근 Btk가 PH 도메인을 통하여 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate(PtdIns-3,4,5-P(3))에 결합함으로써 Btk가 세포막으로 전위되는 것을 돕고 B cell 수용기의 신호전달에 필수적인 역할을 한다고 보고되었다<sup>30)</sup>. 따라서 Btk의 PH 도메인은 Btk가 직접적인 신호전달을 조절하는 과정에서 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료되며 이 부위의 돌연변이는 Btk의 기능에 직접적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.

Btk 유전자 돌연변이를 일으키는 위치나 정도는 매우 다양한 것으로 보고되고 있다<sup>17)</sup>. 약 37 kb인 Btk 유전자를 구성하는 19개의 exon을 비롯하여 promoter, polyadenylation 신호 전달 부위 및 intron region에 이르기까지 다양한 지역에서 점돌연변이, 유전자 삽입, 유전자 결손 및 치환에 의한 아미노산 변화 등 다양한 유전자 변이가 보고되었다<sup>9, 18, 20)</sup>. 또한 임상양상도 가족력이 있는 경우(familial), 산발적으로 발생하는 경우(sporadic) 혹은 약간의 임상적인 경향을 나타내는 경우(leaky syndrome)와 같이 매우 다양한 것으로 보고되었다<sup>20)</sup>. 이와 같이 Btk의 유전자 변이는 유전자내 5개 domain 전체에서 고루 보고되고 있으며, 가장 많은 유전자 변이는 과오돌연변이이다<sup>17)</sup>. 본 연구의 대상 가족에서 관찰된 돌연변이는 Holinski-Feder 등<sup>13)</sup>과 다른 연구자들에 의해 이미 보고된 3례와 동일하였다[Btk 데이터베이스에 보고된

바 있다(<http://www.uta.fi/imt/bioinfo/BTKbase/bio-infor.html>).

임상적으로 XLA로 진단된 모든 예에서 Btk의 유전자 변이가 관찰되는 것은 아니며 아직 획기적인 완치 방법이 보고되고 있지는 못하나 세포 혹은 유전자 치료 방법에 대한 연구가 진행되고 있다<sup>31)</sup>. 현재로서는 면역글로불린 투여가 치료의 주안점이 되고 있으며 환자 P1과 P3의 경우 임상적으로 진단받은 이후 계속적으로 면역글로불린을 규칙적으로 투여 받아 생활하고 있다. XLA 환아들은 만일 적절한 면역글로불린 치료가 시행되지 못할 경우 심각한 세균성, 바이러스성 감염을 일으키게 되며 중이염, 부비동염, 피부 감염, 결막염, 비염, 골수염, 뇌수막염, 패혈증, 폐렴 및 위장관염으로 인한 설사 등 각종 감염증이 발생된다고 한다<sup>4, 5)</sup>.

본 연구 결과를 종합해 보면 임상적으로 XLA로 진단된 환아에 대한 유세포 계측 및 유전자 변이 분석을 통해 1가계 내 3명의 환아와 4명의 보인자를 진단할 수 있었으며 대상 환아 3명은 같은 유전형을 가짐에도 불구하고 서로 매우 다른 임상 양상을 나타내었다. 이러한 연구 결과는 XLA 환아와 가족에 대한 유전자 진단 및 상담, 그리고 XLA로 의심되는 환아들에 대한 확진 및 치료 방침 결정에 매우 유용한 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적 :** 본 연구에서는 임상적으로 XLA로 진단받고 현재 치료 중인 한가족 3명 환자의 가계를 대상으로 말초혈액 단핵구의 Btk 단백질 발현과 Btk 유전자 변이를 분석하고자 하였다.

**방법 :** 환아 말초혈액 단핵구의 Btk 발현도를 항 Btk 항체를 이용한 유세포계측을 통해 분석하고 PCR-SSCP 및 직접 염기서열 분석에 의해 Btk 유전자 변이를 분석하였다.

**결과 :** 유세포 계측 및 PCR-SSCP에 의하여 가계 내의 환자 3명 및 보인자 4명을 확인하였으며 환아들의 단핵구의 Btk 발현도를 조사한 결과 2.7% 미만으로 건강인에 비해 매우 유의한 감소를 나타내었다. 유전자 변이 분석 결과 Btk 유전자 exon 3에서 점돌연변이(T→C)가 발견되어 61번째 아미노산의 치환이 일어난 과오돌연변이를 확인할 수 있었다. 동일한 유

전형을 지닌 3명의 환아들은 임상적으로 매우 다양한 표현형을 나타내었다. 특히 환아들의 혈청 IgG level 이 낮을수록 임상 양상은 심한 소견을 보였다.

**결론 :** 본 연구 결과를 종합해 볼 때 임상적으로 XLA로 진단된 환아와 가족에 대한 항 Btk 항체를 이용한 유세포계측 및 PCR-SSCP 방법은 XLA 환아 및 보인자의 진단에 매우 유용하며 신속하게 적용될 수 있는 기법으로 생각된다. 또한 분자유전학 기법을 이용하여 환아의 유전자 변이를 검색한 결과 Btk의 PH 도메인 내 한개의 과오돌연변이를 검색하여 XLA를 최종 확진할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-8.
- 2) Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993;361:226-33.
- 3) Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72:279-90.
- 4) Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995; 333:431-40.
- 5) Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine(baltimore)* 1985;64:145-56.
- 6) Mohiuddin AA, Corren J, Harbeck RJ, Teague JL, Volz M, Gelfand EW. Ureaplasma urealyticum chronic osteomyelitis in a patient with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:104-7.
- 7) Wilfert CM, Buckley RH, Mohanakumar T, Griffith JF, Katz SL, Whisnant JK, et al. Persistent and fatal central-nervous-system ECHO virus infections in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1977;296:1485-9.
- 8) Tsukada S, Rawlings DJ, Witte ON. Role of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency. *Curr Opin Immunol* 1994;6:623-30.
- 9) Vihinen M, Brandau O, Branden LJ, Kwan SP, Lappalainen I, Lester T, et al. BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res* 1998;26:242-7.
- 10) Jin H, Webster AD, Vihinen M, Sideras P, Vore-



- chovsky I, Hammarstrom L, et al. Identification of Btk mutations in 20 unrelated patients with X-linked agammaglobulinaemia(XLA). *Hum Mol Genet* 1995;4:693-700.
- 11) Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, Miyawaki T, Niida Y, Yachie A, et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase(Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: A nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood* 1996;88:561-73.
  - 12) Brooimans RA, van den Berg AJ, Rijkers GT, Sanders LA, van Amstel JK, Tilanus MG, et al. Identification of novel Bruton's tyrosine kinase mutations in 10 unrelated subjects with X linked agammaglobulinaemia. *J Med Genet* 1997;34:484-8.
  - 13) Holinski-Feder E, Weiss M, Brandau O, Jedele KB, Nore B, Beckesj CM, et al. Mutation screening of the Btk gene in 56 families with X-linked agammaglobulinemia(XLA): 47 unique mutations without correlation to clinical course. *Pediatrics* 1998;101:276-84.
  - 14) Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia(XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clin Exp Immunol* 1998;111:334-8.
  - 15) Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998;91:595-602.
  - 16) Islam TC, Smith CI. The cellular phenotype conditions Btk for cell survival or apoptosis signaling. *Immunol Rev* 2000;178:49-63.
  - 17) Vihinen M, Kwan SP, Lester T, Ochs HD, Resnick I, Valiaho J, et al. Mutations of the human BTK gene coding for Bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 1999; 13:280-5.
  - 18) Vihinen M, Arredondo-Vega FX, Casanova JL, Etzioni A, Giliani S, Hammarstrom L, et al. Primary Immunodeficiency Mutation Database. *Adv Genet* 2001;43:103-88.
  - 19) Bykowsky MJ, Haire RN, Ohta Y, Tang H, Sung SS, Veksler ES, et al. Discordant phenotype in siblings with X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1996;58:477-83.
  - 20) Conley ME, Mathias D, Treadaway J, Minegishi Y, Rohrer J. Mutations in btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1998;62:1034-43.
  - 21) Ochs HD, Smith CI. X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine (Baltimore)* 1996;75:287-99.
  - 22) 백영중, 이재호, 김정수, 송창화, 박정규, 김화중 등. X-linked agammaglobulinemia 환자 가족의 Bruton's tyrosine kinase 유전자 변이 분석. *소아과* 2000;43:1599-607.
  - 23) Paller AS. Immunodeficiency syndromes. X-linked agammaglobulinemia, common variable immunodeficiency, Chediak-Higashi syndrome, Wiskott-Aldrich syndrome, and X-linked lymphoproliferative disorder. *Dermatol Clin* 1995;13:65-71.
  - 24) Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, Brigino EN, Tang H, Sung SS, et al. Extreme variation in X-linked agammaglobulinemia phenotype in a three-generation family. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:702-6.
  - 25) Minegishi Y, Rohrer J, Conley ME. Recent progress in the diagnosis and treatment of patients with defects in early B-cell development. *Curr Opin Pediatr* 1999;11:528-32.
  - 26) Roitt I. Essential immunology, 8th ed. Blackwell scientific publications, 1994:295-300.
  - 27) Kwan SP, Kunkel L, Bruns G, Wedgwood RJ, Latt S, Rosen FS. Mapping of the X-linked agammaglobulinemia locus by use of restriction fragment-length polymorphism. *J Clin Invest* 1986;77:649-52.
  - 28) Parolini O, Hejtmancik JF, Allen RC, Belmont JW, Lassiter GL, Henry MJ, et al. Linkage analysis and physical mapping near the gene for X-linked agammaglobulinemia at Xq22. *Genomics* 1993;15:342-9.
  - 29) Bolen JB. Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene* 1993;8:2025-31.
  - 30) Saito K, Scharenberg AM, Kinet JP. Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *J Biol Chem* 2001;276:16201-6.
  - 31) Minegishi Y, Rohrer J, Conley ME. Recent progress in the diagnosis and treatment of patients with defects in early B-cell development. *Curr Opin Pediatr* 1999;11:528-32.