

Gitelman 증후군의 분자 병태생리 기전

-세포내 단백 Trafficking 장애-

정 해 일교수

서울의대 소아과

66.

1. 서론

신장은 신체 항상성(Homeostasis)을 유지하기 위하여 다양한 기능을 수행하고 있으며, 이를 위하여 사구체 이후 신단위 (Nephron), 즉 신세관 상피세포에 다양한 종류의 막 전달체(Membrane transporter)가 발현한다. 또한 신세관 상피세포는 고도로 분극화(Polarized)되어있어 Apical membrane과 Basolateral membrane이 기능적 측면에서 확실히 구분된다. 여러 종류의 막 전달체들이 신단위 중 적절한 분절(Segment)에서 생성되고 또한 생성된 전달체가 정확한 분극의 세포막으로 이동(trafficking)하기 위하여는 매우 정교한 기전이 작동하여야 한다. 실제로 신세관 질환 중 일부는 이러한 세포내 단백 Trafficking 기전의 장애가 그 병인으로 알려져 있다.

Gitelman 증후군(Gitelman syndrome, GS)은 유전상 신세관 질환 중 하나이며, 임상적으로는 신장에서의 염분 소실, 저칼륨증, 대사성 알칼리증, 고혈압을 동반하지 않는 혈중 Renin와 Aldosterone의 증가 등을 특징으로 한다. 이 질환은 원위곡세관 상피세포의 Thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCCT) 를 encoding 하는 SLC12A3 유전자의 기능 소실 돌연변이가 병인이다. 세포 재에서 생성된 돌연변이 NCCT 단백질 중 일부는 Endolasmic reticulum(ER)에서 적절한 Folding이 이루어지지않아 정상적인 세포막으로의 이동하는 대신 ER 내에 갇혀있게된다. (Class I mutants) 반면에 다른 돌연변이 NCCT 분자는 이러한 세포내 Routing 기전이 부분적인 장애가 있어 Apical membrane으로의 이동이 어느 정도 가능하다. (Class II mutants).

2. 대상 및 방법

이 연구에서는 초기 임상적 진단이 GS 이었던 16명의 환자를 대상으로 임상 및 검사 소견, SLC12A3 유전자 검사, 이노제 투여 후 신 클리어런스 검사, 요 침사의 Immunoblot, 신생검 조직의 면역조직화학 검사 등을 시행하였고, 더불어 이 과정에서 알려진 돌연변이 NCCT 단백을 표유류 세포에서 발현시켜 각 돌연변이 단백질의 세포내 Trafficking 과정

을 확인하였다.

3. 결과

3-1. 임상 및 검사 소견

전체 16명의 환자중 남자는 7명, 여자는 5명이었으며 연령 범위는 5세~31세였다. 이들은 모두 비교적 전형적인 임상 및 검사 소견을 보였다. 여러 검사를 통하여 12명의 환자는 GS 으로 확진되었으며, 나머지 4명은 이노제 오용 (2명), Bartter 증후군(1명), 항암제 치료에 의한 요세관 기능장애(1명)로 최종 진단되었다. GS 환자군 (n=12)과 non-GS 환자군 (n=4) 사이에 임상 및 검사소견 차이는 거의 없었다.

3-2. SLC12A3 유전자 검사

SLC12A3 유전자 검사는 말초혈액 유핵세포의 RNA와 DNA를 같이 이용하여 시행하였으며, GS 환자군 12명에서 13종류의 돌연변이를 확인할 수 있었다. (Table 1) 그러나 그중 5명에서는 단일 돌연변이만이 발견되어 전체적인 돌연변이 진단율은 약 80%이었다. 발견된 13종류의 돌연변이 중 Missense점 돌연변이가 9종류였고, 그중 S967F, R642C,

Table 1. Mutations detected(* novel mutations)

Type of mutation	Amino acid change	Exon	Affected allele No.	Affected Pts No.
	T60M *	1	2	2
	T180K	4	1	1
	D486N	12	2	1
	R642C	15	2	2
	L700P *	17	1	1
	D839N *	21	1	1
	R955Q	25	1	1
	S967F *	25	5	3
	1979T *	26	1	1
Insertion/Deletion *			2	2
Abnormal splicing *			2	2

T60M은 서로 혈연관계가 아닌 2명 이상의 환자에서 공통적으로 발견되었다.

3-3. 이뇨제 투여 후 신 클리어런스 검사

수분 및 Half saline 부하 후 충분한 소변량이 유지될 때 Furosemide (FRS, 20mg 정도) 혹은 Hydrochlorothiazide (THZ, 100mg 경구)를 투여하고 chloride 클리어런스와 원위 Chloride 재흡수 분획(Distal fractional chloride reabsorption = $\text{CH}_2\text{O}/(\text{CH}_2\text{O} + \text{CCl})$)을 측정하였다. GS 환자군에서는 정상 대조군에서 관찰되는 THZ 투여 후 chloride 클리어런스의 증가가 소실되어 있었으며, non-GS 군 중 2명은 정상 대조군과 유사한 반응이 관찰되었고 1명은 GS 군과 유사한 반응이 관찰되었다. FRS에 대한 반응은 3군 모두 차이가 없었다. 원위 chloride 재흡수 분획도 GS 군에서는 정상 대조군에서 관찰되는 THZ 투여 후 감소 현상이 소실되었으며, non-GS 군 중 2명은 정상 대조군과 유사한 반응이 관찰되었고 1명은 GS 군과 유사한 반응이 관찰되었다. 따라서 이뇨제 투여 후 신 클리어런스 검사를 이용하여 GS에 대한 비교적 정확한 감별 진단이 가능하였다.

3-4. 요침사의 Immunoblot

요 침사를 SDS-PAGE한 후 NCCT, Na-K-2Cl 전달체 (NKCC2) 및 aquaporin 2에 대한 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였다. 2명의 non-GS 군에서는 정상 대조군과 비교하여 요 침사 중 NCCT의 현저한 증가가 관찰되었으며, GS 군중 3명 (D839/N979T compound heterozygote, del195Q heterozygote, T180K heterozygote)에서는 정상 대조군과 비슷하거나 혹은 감소된 NCCT가 관찰되었고, 2명(S967F homozygote, abnormal splicing heterozygote)에서는 NCCT가 전혀 관찰되지 않았다. 따라서 요 침사의 immunoblot 검사로 GS의 감별 진단 뿐 아니라 돌연변이의 class에 대한 구별도 가능하였다.

3-5. 신생검 조직의 면역조직화학 검사

GS 환자 2명과 non-GS 환자 1명의 신생검 조직에서 NCCT, NKCC2 및 Na-K-ATPase에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학 검사를 시행하였다. GS 환자 중 1명(S967F homozygote)에서는 원위 곡세관에서의 정상적인 NCCT의 발현이 완전히 소실되었으며, 다른 1명(del195Q heterozygote)에서는 NCCT의 발현이 감소되어 관찰되었다. 한명의 non-GS 환자에서의 NCCT 발현은 정상이었다. NKCC2 및 Na-K-ATPase 발현은 모든 군에서 정상이었다. 따라서 요 침사의 immunoblot 검사와 마찬가지로 신생검 조직의 면역조직화학 검사를 이용하여 GS의 감별 진단 뿐 아니라 돌연변이의 class에 대한 구별이 가능하였다.

3-6. 돌연변이 NCCT 단백질의 포유류 세포 내 발현

Wild-type NCCT cDNA의 5' 끝쪽에 N-myc sequence를 tagging 시킨 후 pcDNA3.1D

vector에 cloning하고, 여러 종류의 돌연변이 (T60M, D486N, R642C, L700P, D839N, S967, I979T, del195Q)에 대하여 site-directed mutagenesis를 시행한 후, MDCK 배양세포에 lipofectamine 2000을 이용하여 transfection 시켰다. Wild-type 및 돌연변이 NCCT의 세포 내 발현위치를 myc 항체를 이용하여 확인하고, 또한 이들 단백질의 glycosylation 상태를 확인하기 위하여 전체 세포 lysate를 N-glycosidase F와 endoglycosidase H로 처리한 후 Western blot을 시행하였다. D486N, R642C, del195Q등의 돌연변이 단백질은 세포질 내와 세포막에 일부 발현하였으며 (class II 돌연변이), T60M, L700P, S967 등의 돌연변이 단백질은 세포 내에서 전혀 발현하지 않았다. (class I 돌연변이), 세포 lysate의 Western blot 검사에서 R642C 돌연변이 단백질은 high-mannose partially glycosylated 형태(110-kD)보다는 주로 complex-glycosylated 형태 (130~140-kD)로 존재하였으며 (class II 돌연변이), L700P와 S967F 돌연변이 단백질은 주로 partially glycosylated 형태로 존재하였다(class I 돌연변이).

4. 결론

GS은 임상 증상의 정도가 환자마다 다양할 뿐 아니라 다른 질환(Bartter 증후군, 이노제 남용 등)과 임상적 증상의 중복이 있어 감별진단이 어려울 수 있다. 또한 현재의 치료는 신장에서 소실되는 전해질 등의 보충으로 병인 기전에 대한 근본적 치료가 아니다. 최근 이 질환의 유전적 결함이 확인되었고 분자 수준에서 병인기전이 알려짐에 따라 이 연구에서는 분자 유전학적 혹은 약리학적 기반을 둔 새로운 진단법들이 시도하였고, 또한 각 돌연변이 단백질의 병인기전을 확인함으로써 앞으로 새로운 치료법의 개발을 시도할 수 있게 되었다.

5. Acknowledgement

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2003-042-E00069)에 의하여 연구되었음.

6. 참고문헌

1. Cullen BR: Use of eucaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol* 152:684-704, 1987.
2. De Jong JC, Van Der Vliet WA, Van Den Heuvel LP, Willems PH, Knoers NV, Bindels RJ: Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome, *J Am Soc Nephrol* 13:1442-1448, 2002

3. De Jong JC, Willems PH, Goossens M, Vandewalle A, van den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ: Effects of chemical chaperones on partially retarded NaCl cotransporter mutants associated with Gitelman's syndrome in a mouse cortical collecting duct cell line. *Nephrol Dial Transplant* 19:1069–1076, 2004.
4. Gitelman, HJ, Graham JB, Welt LG: A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Phys* 79:221–235, 1966.
5. Gladziwa U, Schwarz R, Gitter AH, Bijman J, Seyberth H, Beck F, Ritz E, Gross P: Chronic hypokalaemia of adults: Gitelman's syndrome is frequent but classical Bartter's syndrome is rare. *Nephrol Dial Transplant* 10:1607–1613, 1995.
6. Gross P: Gitelman syndrome: when will it turn into Gitelman disease? *Pediatr Nephrol* 18:613–616, 2003.
7. Hebert SC, Mount DB, Gamba G: Molecular physiology of cation-coupled Cl-cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch* 447:580–593, 2004.
8. Kamel KS, Oh MS, Halperin ML: Bartter's, Gitelman's, and Gordon's syndromes. From physiology to molecular biology and back, yet still some unanswered questions. *Nephron* 92 Suppl 1:18–27, 2002.
9. Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, Velazquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF, Ellison DH: Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol* 277(4 Pt 2):F643–649, 1999.
10. Kuznetsov G, Nigam SK: Folding of secretory and membrane proteins. *New Engl J Med* 339:1688–1695, 1998.
11. Lang F, Capasso G, Schwab M, Waldeggger S: Renal tubular transport and the genetic basis of hypertensive disease. *Clin Exp Nephrol* 9:91–99, 2005.
12. Lin SH, Cheng NL, Hsu YJ, Halperin ML: Intrafamilial phenotype

- variability in patients with Gitelman syndrome having the same mutations in their thiazide-sensitive sodium/chloride cotransporter. *Am J Kidney Dis* 43:304–312, 2004.
13. Lin SH, Shiang JC, Huang CC, Yang SS, Hsu YJ, Cheng CJ: Phenotype and genotype analysis in Chinese patients with Gitelman's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2500–2507, 2005.
 14. Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, Colussi G, De Fusco M, Sereni F, Ballabio A, Casari G: Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* 59:1019–1026, 1996.
 15. Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A, Casari G: Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 35:486–493, 1996.
 16. McKee JA, Kumar S, Ecelbarger CA, Fernandez-Llama P, Terris J, Knepper MA: Detection of Na⁺ transporter proteins in urine. *J Am Soc Nephrol* 11:2128–2132, 2000.
 17. Olkkonen VM, Ikonen E: Genetic defects of intracellular-membrane transport. *New Engl J Med* 343:1095–1104, 2000
 18. Perlmutter DH: Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr Res* 52:832–836, 2002.
 19. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA: Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13368–13373, 2004.
 20. Reinalter SC, Jeck N, Peters M, Seyberth HW: Pharmacotyping of hypokalaemic salt-losing tubular disorders. *Acta Physiol Scand* 181:513–521, 2004.
 21. Ring T, Knoers N, Oh MS, Halperin ML: Reevaluation of the criteria for the clinical diagnosis of Gitelman syndrome. *Pediatr Nephrol*

- 17:612–616, 2002.
22. Sabath E, Meade P, Berkman J, de los Heros P, Moreno E, Bobadilla NA, Bazquez N, Ellison DH, Gamba G: Pathophysiology of functional mutations of the thiazide-sensitive Na–Cl cotransporter in Gitelman disease. *Am J physiol Renal Physiol* 287:F195–203, 2004.
 23. Simon DB, Nelson–Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Moina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP: Gitelman’s variant of Bartter’s syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na–Cl cotransporter. *Nature Genet* 12:24–30, 1996.
 24. Syren ML, Tedeschi S, Cesareo L, Bellantuono R, Colussi G, Procaccio M, Ali A, Domenici R, Malberti F, Sprocati M, Sacco M, Miglietti N, Edefonti A, Sereni F, Casari G, Coviello DA, Bettinelli A: Identification of fifteen novel mutations in the SLC12A3 gene encoding the Na–Cl Co–transporter in Italian patients with Gitelman syndrome. *Hum Mutat* 20:78, 2002.
 25. Tago N, Kokubo Y, Inomoto N, Naraba H, Tomoike H, Iwai N: A high prevalence fo Gitelman’s syndrome mutations in Japanese. *Hypertens Res* 27:327–331, 2004.
 26. Takeuchi K, Kure S, Kato T, Taniyama Y, Takahashi N, Ikeda Y, Abe T, Narisawa K, Muramatsu Y, Abe K: Association of a mutation in thiazide-sensitive Na–Cl cotransporter with familial Gitelman’s syndrome. *J Clin Endocr Metab* 81:4496–4499, 1996.
 27. Tsukamoto T, Kobayashi T, Kawamoto K, Fukase M, Chihara K: Possible discrimination of Gitelman’s syndrome from Bartter’s syndrome by renal clearance study: report of two cases. *Am J Kidney Dis* 25:637–641, 1995.
 28. Welch WJ, Brown CR: Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* 1:109–115, 1996.