

# 국내 X-관련성 범저감마글로불린혈증 세가족에 대한 Bruton's Tyrosine Kinase 단백질 발현 및 유전자 변이 분석

충남대학교 의과대학 미생물학교실, 소아과학교실<sup>†</sup>, 전북대학교 의과대학 소아과학교실\*,  
울산대학교 의과대학 소아과학교실<sup>†</sup>

송창화 · 조은경 · 박정규 · 김정수\* · 홍수종<sup>†</sup> · 이재호<sup>‡</sup>

## Characterization of Mutations in Bruton's Tyrosine Kinase(Btk) Gene from Unrelated 3 X-linked Agammaglobulinemia(XLA) Families in Korea

Chang-Hwa Song, M.D., Eun-Kyeong Jo, M.D., Jeong-Kyu Park, M.D.  
Jung-Soo Kim, M.D.\*, Soo-Jong Hong, M.D.<sup>†</sup> and Jae-Ho Lee, M.D.<sup>‡</sup>

*Department of Microbiology and Pediatrics<sup>†</sup>, College of Medicine,  
Chungnam National University, Taejon, Department of Pediatrics\*, College of Medicine,  
Chunbuk National University, Chunju, Department of Pediatrics<sup>†</sup>,  
Asan Medical Center, College of Medicine, Ulsan University, Seoul, 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 cytoplasmic expression of Btk protein and analyzed the Btk gene in peripheral blood mononuclear cells(PBMC) from three XLA families in Korea.

**Methods :** Heparinized venous blood samples were collected from four XLA patients and additional family members in three unrelated XLA families. Mononuclear cells were separated from their blood and the intracellular Btk protein was characterized by a flow cytometry. The mutation analysis was performed using direct sequencing.

**Results :** Cytoplasmic expression of Btk protein in monocytes was not detected in the patients with XLA. We observed a novel deletion and two point mutations within introns(intron 1 and intron 18) resulting in alternative splicings. In XLA family 2, a 980 bp deletion(from intron 9+191 T to intron 10-215 C) including exon 10 was found in patient P2. He was the only sporadic case in this study, because his mother and brother showed a normal Btk expression by flow cytometry.

**Conclusion :** These identified genetic alterations support the molecular heterogeneity of Btk gene in XLA disease. Additionally, by means of flow cytometric analysis, we diagnosed three hypogammaglobulinemia patients as XLA. Advancements in diagnostic methods has facilitated a prompt and definite diagnosis of this disease. (*J Korean Pediatr Soc* 2002;45:302-310)

**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 9월 7일, 승인 : 2001년 10월 29일

책임저자 : 이재호, 충남대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 042)220-7247 Fax : 042)585-3686 E-mail : immlee@cnu.ac.kr

**서 론**

X-관련성 범저감마글로불린혈증(X-linked agammaglobulinemia; 이하 XLA)은 B 림프구의 분화단계에서 미성숙 B 림프구로부터 성숙 B 림프구로의 분화가 정지된 일차면역결핍질환으로 약 20만명 중의 1명의 빈도로 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 1952년 Bruton<sup>2)</sup>에 의해 처음 임상적으로 보고된 후 XLA의 직접적인 병인으로 B 림프구 분화에 필수적인 신호전달을 담당하는 세포질내 Bruton's tyrosine kinase (Btk) 유전자 발현 혹은 단백질 기능장애가 보고되었다<sup>3, 4)</sup>. 즉 Btk를 전사하는 유전자의 돌연변이에 의해 Btk 합성 혹은 기능부전이 초래되고 골수의 정상적인 B 림프구 분화 발달이 저해됨으로써 이환된 남아는 심각한 범저감마글로불린혈증 증세와 순환계내 성숙 B 림프구의 결핍 및 반복적인 화농성 감염 등 주 증상들이 나타나게 된다<sup>2-6)</sup>.

Btk 유전자는 X 염색체의 장완 중간 부위인 Xq21.3-q22 부위에 위치한다<sup>7-9)</sup>. 1993년 Btk 유전자의 cDNA 서열이 보고된 후<sup>3, 4)</sup> 현재까지 세계적으로 400여개 이상의 독특한 유전자 변이가 보고되고 있으며 BTKbase(<http://www.uta.fi/laitokset/imt/bioinfo/BTKbase/>)에 그 정보가 축적되고 있다. Btk 유전자 돌연변이를 일으키는 위치나 정도는 매우 다양한 것으로 보고되고 있다. 약 37 kb인 Btk 유전자를 구성하는 19개의 exon 외에도 intron region에 이르기까지 점돌연변이, 유전자 삽입, 결손 및 치환에 의한 아미노산 변화 등 다양한 유전자 변이가 보고되었다. 또한 임상양상도 가족력이 있는 경우(familial), 산발적으로 발생하는 경우(sporadic) 혹은 약간의 임상적인 경향을 나타내는 경우(leaky syndrome)와 같이 매우 다양한 것으로 보고되었다. 따라서 서로 다른 각종 유전자 변이의 위치와 양상에 대한 정보를 축적하고 이를 토대로 임상양상과 질환 경과를 해석하고자 하는 노력이 지속되고 있다<sup>10)</sup>.

임상적으로 XLA로 의심되는 경우 확진과 가계내 유전 상담을 위해서는 환아와 모친 등 가족에 대한 정확한 유전자변이 분석이 선행되어야 한다. 그러나 유전자 분석과정은 경비와 시간을 매우 소모하며 어떤 경우에는 Btk mRNA의 전사량은 감소되어 있으나 전체 유전자내 돌연변이는 발견되지 않는 경우도

있다고 한다<sup>11)</sup>. 최근 Btk에 특이한 단클론항체를 이용하여 단핵구로부터 Btk 단백질 발현량을 유세포 계측(flow cytometry)에 의해 측정하는 방법이 고안되었으며<sup>12)</sup> 본 저자들도 이 방법에 의해 빠르고 정확하게 XLA 환아와 보인자를 진단할 수 있었다<sup>13)</sup>.

본 연구에서는 임상적인 진단하에 현재 치료 중인 국내 XLA 세가족들을 대상으로 항 Btk 항체를 이용한 유세포 계측을 통해 Btk 발현도를 분석하여 환아와 보인자를 검색하고 Btk 유전자 분석을 통하여 분자유전학적 진단을 시도하고자 하였다. 대상 XLA 세가족의 말초혈액 단핵구를 분리한 후 유세포 계측을 이용한 Btk 단백질 발현 측정 및 direct sequencing에 의한 Btk 유전자 돌연변이 분석을 시도하여 다음과 같은 유전자 진단 결과를 얻었다.

**대상 및 방법**

**1. X-관련성 범저감마글로불린혈증 환아**

전북대학교병원 및 서울중앙병원에 내원하여 혈청 감마글로불린 검사 및 임상증상으로 진단된 X-관련성 범저감마글로불린혈증 네명 환아와 그 가족을 대상으로 하였다. 또한 환아 형제 및 부모 등 가족내 자원자를 대상으로 하였다. 이들 환아의 면역학적 소견 및 가족력을 Table 1에 나타내었다.

**2. 말초혈액 단핵구의 분리**

환아와 가족 및 건강인 공혈자로부터 heparin(중의제약, 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 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 측정(flow cytometry)을 이용한 단핵구내 Btk 발현 측정**

유세포 측정에 의한 단핵구내 Btk 염색 및 발현 측정은 Futatani 등<sup>12)</sup>의 방법에 의해 시행하였다. 약

**Table 1.** Patient Laboratory Data and Family History

| Patient No. | Age at diagnosis | Ig Level(mg/dL) at onset* |      |      | Peripheral B cells(%) | Family                     | Clinical presentation            |
|-------------|------------------|---------------------------|------|------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------|
|             |                  | IgG                       | IgM  | IgA  |                       |                            |                                  |
| P1-1        | 3 yr             | 180.8                     | 63.1 | 30.8 | 2.1                   | P1-1 and P1-2 are siblings | bacterial pneumonia              |
| P1-2        | 1 yr             | 9.0                       | 26.0 | 30.8 | 0.8                   |                            | bacterial pneumonia <sup>†</sup> |
| P2          | 6 yr             | 33.0                      | 7.0  | 7.0  | 0.3                   |                            | pneumonia                        |
| P3          | 5 yr             | 34.0                      | 31.0 | 0.0  | 2.0                   |                            | recurrent otitis media pneumonia |

\*Reference values for serum IgG at various ages are as follows : 1-6 mo, 230-940; 7-24 mo, 350-1,200; and 2-5 years, 500-1,300(mg/dL), Reference values for serum IgM at various ages are as follows : 1-6 mo, 15-170; 7-24 mo, 40-200; and 2-5 years, 50-210(mg/dL), <sup>†</sup>expired from bacterial pneumonia

술하면 말초혈액 단핵세포 분리 후  $1 \times 10^6$  세포를 PBS에 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(TBS)내 0.1% Triton X-100과 0.1% bovine serum albumin이 첨가된 permeabilization 용액으로 상온에서 5 분간 반응시켜 세포막을 전처리 하였다. 이를 1% fetal calf serum 및 0.1% sodium azide가 포함된 washing buffer로 2회 세척한 후 비특이적인 결합을 제거하기 위해 5% normal goat serum을 첨가하여 10분간 반응시켰다. 일차 항체 반응은 항 BTK 항체(48-2H, IgG1; Tsukada S 제공, Osaka University Medical School, Osaka 565, Japan)를 5.0 µg 가하여 얼음 위에서 20 분간 반응하였다. Washing buffer로 2회 세척한 후 FACSscalibur(Becton Dickinson, 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  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  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 mL 에 부용시킨 후, 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 다

시 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 genomic DNA 및 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

Total 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 µL 되도록 하여 PCR을 시행하였다. PCR은 DNA thermal cycler(Biometra, Germany)를 사용하여 총 33회의 cDNA 증폭반응을 실시하였다. PCR 조건은 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 58°C에서 30초, extension은 72°C에서 40초간 반응하고 최종적으로 72°C에서 8분간 반응하였다.

##### 4) 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 Big-Dye 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. 환아의 임상증세 및 혈액 검사 소견**

연구대상 환아 네명의 임상 증세 및 혈액검사 소견을 Table 1에 나타내었다. 환아들은 평균 생후 6개월 이후부터 빈번한 감염 증세를 나타내었으며 중이염, 부비동염, 폐렴 및 만성적 설사 등으로 잦은 내원 및 입원의 과거력이 있었다. 그러나 동일한 유전자 돌연변이를 갖는 환아 형제의 경우 서로 다른 임상증세를 나타내는 경우(XLA 가족 1)가 있어서 유전형(genotype)과 표현형(phenotype)간에 차이가 관찰되었다. 보인자인 XLA 모친 혹은 자매들은 IgG의 검사결과가 정상인과 차이를 보이지 않았으며 임상적으로 나타나는 증세도 없었다(결과는 표로 제시하지 않음).

대상 XLA 환아 네명 모두 내원시 처음 측정할 IgG가 200 mg/dL 이하로 현저하게 감소되어 있었고 환아들의 말초혈액 B 림프구의 비율은 0.3 내지 2.1%로 정상인에 비해 매우 감소되어 있었으나(Table 1) T 림프구와 보체계는 정상 범위에 있었다(결과는 Table로 제시하지 않음).

환아 P1-1은 3세 이후로 재발되는 폐렴과 상기도 감염으로 2회 입원 치료하였고 면역글로불린 검사를 시행한 결과 임상적으로 진단되었다. 지금까지 한달 간격으로 IVIG를 투여받고 있으며 아토피 피부염이 있으나 비교적 건강하게 지내고 있다. 그러나 남동생인 P1-2는 뇌성마비가 동반되어 있었으며 폐렴과 화농성 관절염으로 입원 치료하였고 3세에 폐렴과 수두

증(hydrocephalus)으로 입원 치료하였으나 연구 기간 도중 폐렴 악화 및 패혈증으로 사망하였다.

환아 P2의 경우 진단시 연령은 6세였으며 녹농균이 증명된 2회의 폐렴을 통해 면역글로불린 검사를 시행한 결과 IgG 33.0 mg/dL, IgA 7.0 mg/dL, IgM 7.0 mg/dL 및 IgE 31 U/mL로 정상인에 비해 매우 낮은 양상을 나타내었다. 환아 P3의 경우 진단시 연령은 5세이였으며 3세 이후로 반복되는 중이염이 4회 이상, 폐렴이 3회 이상 및 만성부비동염의 과거력이 있었다. 급성 중이염이 동반된 폐렴으로 입원시 면역글로불린 검사를 시행한 결과 IgG 34.0 mg/dL, IgA 0 mg/dL, IgM 31 mg/dL 및 IgE 2.0 IU/mL로 정상인에 비해 매우 낮아 임상적으로 진단되었다. 생존한 환아들은 4주 간격으로 면역글로불린 정주치료를 받으며 재감염 없이 건강하게 지내고 있다.

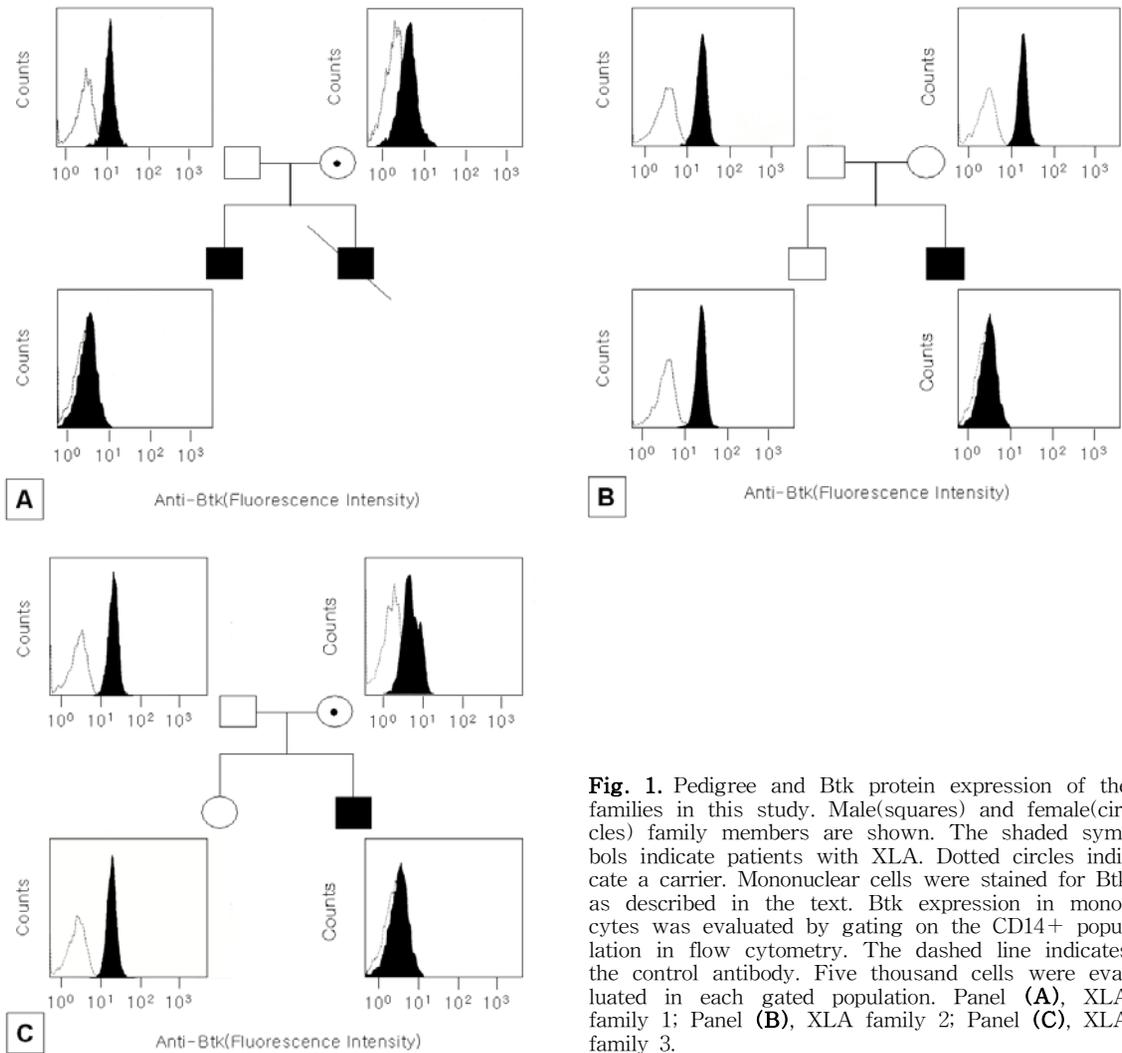
**2. 유세포 계측(flow cytometry)을 이용한 세포내 Btk 발현 측정**

연구 대상 환아와 보인자에 대하여 시행한 유세포 측정 결과를 Table 2에 나타내었다. 항 Btk 항체를 이용하여 말초혈액 단핵구 세포질내의 Btk 단백질을 염색하고 유세포 측정에 의해 Btk 단백질 발현도를 검사한 결과 세명의 XLA 환아와 환아 가족내 2명의 보인자를 조기 진단할 수 있었다(환아 P1-2의 경우 체혈량이 극히 소량으로 유세포 측정을 시행하지 못함).

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

| Subject No. | Pattern of Btk expression | Btk expression in monocytes(%)* |
|-------------|---------------------------|---------------------------------|
| Family 1    |                           |                                 |
| P1-1        | Deficient                 | 0.9                             |
| P1-2        | NA <sup>†</sup>           | NA <sup>†</sup>                 |
| Mother      | Deficient                 | 32.0                            |
| Family 2    |                           |                                 |
| P2          | Deficient                 | 0.9                             |
| Mother      | Normal                    | 98.5                            |
| Family 3    |                           |                                 |
| P3          | Deficient                 | 0.8                             |
| Mother      | Mosaic                    | 55.2                            |

\*Data represent the percentages of anti-Btk stainable cells exceeding the upper limit of control staining with an isotype-matched irrelevant MoAb  
<sup>†</sup>NA, not applicable



**Fig. 1.** Pedigree and Btk protein expression of the families in this study. Male(squares) and female(circles) family members are shown. The shaded symbols indicate patients with XLA. Dotted circles indicate a carrier. Mononuclear cells were stained for Btk as described in the text. Btk expression in monocytes was evaluated by gating on the CD14+ population in flow cytometry. The dashed line indicates the control antibody. Five thousand cells were evaluated in each gated population. Panel (A), XLA family 1; Panel (B), XLA family 2; Panel (C), XLA family 3.

정상인의 단핵구 Btk 발현 비율은 평균 95% 이상이었으나 대상 환자들의 단핵구 중 Btk 발현 비율은 0.8 내지 0.9%로 정상인에 비해 유의하게 감소되어 있었다. Fig. 1A, 1B 및 1C의 경우는 각각 XLA 가족 1, 2 및 3의 유세포 측정 결과를 나타내었다. XLA 가족 2는 국내에서 처음으로 보고되는 XLA의 sporadic case로 환자 외에 다른 가족은 모두 정상적인 Btk 발현 양상을 나타내었다. 그러나 XLA 가족 3의 경우 환자는 Btk 발현이 매우 결핍되어 있었으나 모친의 경우는 전형적인 모자이크 양상(mosaic pattern)임을 확인할 수 있었다. XLA 가족 1의 보인자인 모친의 경우 단핵구의 Btk 발현 비율이 32.0%로 건강인에 비해서는 낮았으나 환자에 비해서는 증

가된 양상이었다. 특히하게도 XLA 가족 1의 모친의 경우 전형적인 모자이크 양상이 관찰되지 않았고 환자와 같이 Btk 발현이 결핍된 양상이었다.

### 3. Btk 유전자 변이 분석

각 대상 환자에서 수집한 말초혈액 단핵구로부터 유전자를 추출하여 Btk 유전자의 변이를 직접 염기서열 분석 방법에 의해 조사하였다. 한개의 유전자 결손(XLA 가족 2)과 2개의 점돌연변이(XLA 가족 1과 3)가 직접 염기서열 분석에 의해 동정되었다. 각 유전자 변이에 대한 분석결과는 Table 3에 종합하였다.

XLA 가족 1과 3에서는 intron 18과 intron 1의 짜집기 공여 위치(splicing donor site)에서 각각 점돌

**Table 3.** Btk Mutations in XLA Patients and Carriers as Evaluated by Direct Sequencing

| Subject No. | Intron/Exon                          | Domain          | Change     | Effect                  |
|-------------|--------------------------------------|-----------------|------------|-------------------------|
| Family 1    |                                      |                 |            |                         |
| 1(P1-1)     | intron 18                            | kinase          | G to T     | Splice-donor defect(+1) |
| 2(P1-2)     | intron 18                            | kinase          | G to T     | Splice-donor defect(+1) |
| 3(Mother)   | Heterozygote                         |                 |            |                         |
| Family 2    |                                      |                 |            |                         |
| 4(P2)       | From intron 9+191T to intron 10-215C | SH3             | 980 bp del | Exon 10 skipping        |
| Family 3    |                                      |                 |            |                         |
| 5(P3)       | intron 1                             | 5' untranslated | G to A     | Splice-donor defect(+1) |
| 6(Mother)   | Heterozygote                         |                 |            |                         |

연변이가 관찰되었다. 이러한 점돌연변이는 cDNA 서열상에서 잘못된 짜집기 현상(aberrant splicing)을 야기할 것으로 생각되어 환자 P1-1의 cDNA를 증폭하고 exon 18에 대한 직접 염기서열 분석을 시행한 결과 환자 P1-1 및 P1-2의 경우 intron 18의 +1에서 발생한 G→T 돌연변이는 cDNA상에서 exon 18 부위의 33 bp 결손이 일어나는 결과를 초래하였다(결과는 그림으로 제시하지 않음). 또한 환자 P3의 경우 intron 1의 +1에서 발생한 G→A 돌연변이는 환자의 전체 genomic DNA 상에서 발견된 유일한 돌연변이였다. 그러나 환자의 cDNA 제조 후 exon 1 부위의 PCR상 매우 많은 band가 얻어졌으며 각 위치의 band에 대한 반복된 염기서열 분석에도 불구하고 결국 cDNA 염기서열에서 어떤 영향을 미치는지 확인할 수 없었다.

환자 P2의 cDNA에 대한 직접염기서열 분석 결과 환자의 cDNA 염기서열 분석 상에서는 exon 10이 결손되는 양상을 보였으나 genomic DNA상에서 intron 9의 +191번째의 T부터 intron 10의 -215 위치의 C까지 980 bp의 광범위한 결손이 발견되었다. 환자는 부모가 모두 정상적인 유전자를 갖는 sporadic case로 가족 중 유일한 Btk 유전자 돌연변이를 나타내었다.

**고 찰**

본 연구는 임상적으로 XLA로 진단 받고 현재 치료 중인 국내 환자 네명 및 가족을 대상으로 Btk 발현도를 항 Btk 항체를 이용한 유세포 측정을 통해 분석하고 Btk 유전자 변이를 분석하였다.

환자들의 B 림프구의 발현은 2.1 % 미만으로 정상인에 비해 매우 저하되어 있었으며 환자 단핵구 유래

Btk 단백질의 발현도 매우 감소된 양상이었다. 유세포 측정 결과 대상환자 가족에 대한 보인자 검사에서 XLA 가족 1의 경우 모친의 Btk 발현은 결핍된 소견을 나타내어 유전자 검사 이전에도 보인자임을 예측할 수 있었다. 또한 XLA 가족 3에 대한 보인자 검사에서 단핵구 Btk 발현은 뚜렷한 모자이크 양상을 나타내었으나 XLA 가족 2의 경우 환자를 제외한 가족 구성원들의 단핵구 Btk 발현은 정상인과 동일하였으며 모친의 경우에도 정상적인 발현을 나타내었다. 또한 P2에 대한 직접 염기서열 분석을 시행한 결과 새로운 유전자 결손을 발견할 수 있었으나 가족 2의 다른 구성원들은 모두 정상적인 염기 서열을 나타내었다.

본 연구결과는 백 등<sup>13)</sup>의 경우와 일치하여 비교적 간단한 유세포 측정 방법에 의하여 XLA 가계내의 보인자를 검사할 수 있었으며 최근 Futatani 등<sup>12)</sup>도 XLA 환자에 대하여 시행한 유세포 측정 결과 XLA 환자 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. 또한 41 case의 대상환자 가족 중 35 가족에서 모자이크 양상의 Btk 단백질 발현이 관찰되었다고 한다<sup>12)</sup>. 본 연구 결과 XLA 가족 2에서 발견된 sporadic case는 국내 최초의 보고로 생각되며 101명의 XLA 환자와 가족을 대상으로 한 다른 보고에 의하면 56가족의 경우 Btk 유전자 변이가 가족내 유전이 아닌 산발적인(sporadic) 발병 양상을 나타내었다고 한다<sup>14)</sup>. 따라서 국내에도 가족력이 없이 산발적인 양상의 XLA 환자들이 더 많이 존재할 것으로 생각되며 이에 대한 광범위한 유전자 변이 조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

환자 P1의 경우 intron 18 +1 부위의 점돌연변이

(G to T)가 발견되었으며 짜집기 공여 위치(splice donor site)에서의 유전자 변이에 의해 exon 18의 3' 말단 부위가 잘못 활성화될 것으로 예측되었으며 실제로 cDNA상에서 exon 18 3' 말단 부위의 33 염기의 결손을 초래하는 유전자 변이를 확인할 수 있었다. Intron 18의 +1 부위의 점돌연변이는 이미 Saha 등<sup>15)</sup>에 의해 보고되었으며 본 연구의 경우와 같이 G가 T로 치환된 경우도 BTKBase(<http://www.uta.fi/imt/bioinfo/BTKbase/>)에서 발견할 수 있었다. 본 연구에서도 동일한 유전형을 갖는 XLA 가족 2 환자 형제간에 매우 뚜렷한 임상 양상의 차이점이 발견되었는데 XLA 환자 가족 내 임상 양상의 다양성은 국내 백 등<sup>13)</sup>의 보고와 일치하였다. 다른 연구자들의 경우에 있어서도 많은 유전자 변이를 검출한 후 유전형과 임상형을 서로 비교한 결과 어떠한 일치도를 규명해 내기가 매우 어려워 상당한 이질성(heterogeneity)을 나타내었다<sup>16-18)</sup>.

환자 P2의 경우 exon 10을 포함하는 980 bp의 유전자 결손(intron 9+191T부터 intron 10-215 C까지)이 genomic DNA 염기서열 분석을 통해 증명되었으며 세계적으로 처음 보고되는 새로운 유전자 변이었다. 다른 연구자들에 의하면 임상적으로 XLA로 예상되는 101명의 XLA 환자 중 7명의 환자에서 광범위한 유전자 변이를 발견할 수 있었다고 보고하고 있다<sup>14)</sup>. 이 보고에서 연구자들은 2.8 부터 38 kb의 크기에 해당하는 4개의 돌연변이를 분석하여 보고하였다. 이들의 연구와 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 XLA의 분자 유전학적 진단을 위하여 광범위한 유전자 염기서열 분석(large-scale sequencing)을 시행하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

환자 P3에서 발견된 Btk의 intron 1 +1 위치의 한개의 점돌연변이는 이미 Conley 등<sup>14)</sup>에 의해 보고된 짜집기 오류(splicing error) 변이었다. Intron 1 부위는 Btk의 유전자의 전사 부위 중 단백질로 해독되지 않는 noncoding region으로서 현재까지 3개의 돌연변이가 보고된 바 있으며 국내에서는 백 등<sup>13)</sup>이 보고한 XLA 가족의 경우가 intron 1의 +5 위치의 유전자 점돌연변이를 나타내었다.

현재까지 XLA의 유전자 치료에 대하여는 보고된 바 없으나 감마글로불린 투여에 의해 항체를 투여하는 방법이 보편적인 치료 방법으로 활용되고 있다. 본 연구의 대상 환자들은 임상 진단 후 규칙적인 면역글

로블린 정주 치료를 받고 있었으며 P1-1, P2와 P3의 경우 면역글로블린 치료 후 별다른 감염 증세 없이 정상적인 생활을 하고 있었으나 P1-2의 경우 심한 폐렴으로 연구 기간 도중 사망하였다. 국외 다른 연구자들의 보고에 의하면 31명의 XLA 환자에 대한 조사<sup>19)</sup>에서 규칙적인 면역글로블린 정주 치료는 진단 후 3개월 이내에 시작되었으며 이 치료에 의해 잔류 혈청 IgG level이 500 mg/dL 이상이 되었을 때 급성 세균 감염을 방어하는데 매우 효과적이었다고 한다. 만일 적절한 치료가 시행되지 못할 경우 심각한 세균성, 바이러스성 감염을 일으키게 되며 중이염, 부비동염, 피부 감염, 결막염, 비염, 골수염, 뇌수막염, 폐혈증, 폐렴 및 위장관염으로 인한 설사 등 각종 감염증이 발생할 수 있다<sup>20, 21)</sup>. XLA 환자의 감염을 유발할 수 있는 흔한 원인균은 폐렴구균, 연쇄구균, 포도구균, 녹농균 및 헤모필루스균 등 대개 화농성 병변과 관련이 깊은 세균들로 알려져 있다. 세포면역능은 정상이므로 대부분의 바이러스에는 저항력이 있으나 간염바이러스, 폴리오바이러스 및 엔테로바이러스 등에 의해 치명적인 감염이 발생할 수 있다<sup>22, 23)</sup>. 반복적인 감염 외에도 성장 부진, 천명음, 편도선과 아데노이드가 없는 소견을 보이며 관절염, 용혈성 빈혈, 사구체 신염, 중성구 감소증, 피부 근염 및 뇌염 등도 병발될 수 있다<sup>2, 24)</sup>. 또한 백혈병과 림프종 등을 비롯한 악성 종양의 발병도 보고된 바 있다<sup>25)</sup>. 본 연구 결과는 때때로 중대한 합병증으로 인해 사망에 이를 수 있는 선천 면역결핍 질환인 XLA의 임상적 치료를 위해 조기 진단과 규칙적인 면역글로블린 정주 치료가 필수적임을 강력하게 시사한다.

본 연구에서 항 Btk 항체를 이용한 말초혈액 단핵구내의 Btk 단백질 발현 측정 결과 네명의 XLA 환자와 환자 가족내 2명의 보인자를 진단할 수 있었다. 또한 새로운 유전자 결손을 포함한 국내 XLA 환자들의 유전자 변이를 확인하여 XLA를 확진할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 XLA의 병인 분석과 유전자 진단 및 조기치료 방침 결정을 위한 매우 유용한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각되며 향후 더 많은 국내 XLA 환자 및 보인자에 대한 분자유전학적 검사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

**요 약**

**목적 :** 본 연구에서는 임상적으로 XLA로 진단받고 현재 치료 중인 국내 환아 세가족의 네명의 환아와 모친 등을 대상으로 말초혈액 단핵구의 Btk 단백질 발현과 Btk 유전자 변이를 분석하고자 하였다.

**방법 :** 말초혈액 단핵구의 Btk 발현도를 항 Btk 항체를 이용한 유세포측정을 통해 분석하고 직접 염기서열 분석에 의해 Btk 유전자 변이를 분석하였다.

**결과 :** 환아들의 B 림프구의 발현은 2.1% 미만으로 정상인에 비해 매우 저하되어 있었으며 유세포 측정기에 의한 환아 단핵구 유래 Btk 단백질 발현도 1.0% 이하로 정상인에 비해 매우 감소되었다. 유전자 변이 분석 결과 XLA 가족 1과 3에서는 각각 intron 18과 intron 1의 짜집기 공여 위치 부위에서 1개의 점돌연변이가 발견되었으며 cDNA상 짜집기 오류 현상을 야기하였다. 그리고 XLA 가족 2의 경우 exon 10을 포함하는 980 bp의 유전자 결손(intron 9+191T부터 intron 10-215C까지)이 발견되었으며 세계적으로 처음 보고되는 새로운 유전자 변이었다. 또한 가족 2의 경우 가족 중 환아에서 만 Btk 단백질 결핍 및 유전자 변이를 진단하여 국내 XLA의 환아 중 최초의 산발적인 발병 양상을 확인하였다.

**결론 :** 본 연구 결과를 종합해 볼 때 임상적으로 XLA로 진단된 환아와 가족에 대한 항 Btk 항체를 이용한 유세포측정 방법은 XLA 환아 및 보인자의 진단에 매우 유용한 방법으로 생각된다. 또한 분자유전학 기법을 이용하여 Btk의 noncoding region을 포함한 광범위한 유전자 영역의 염기서열 분석을 시행한 결과 새로운 1개의 유전자 결손 및 2개의 점돌연변이에 의한 짜집기 오류를 확인하여 XLA를 최종 확진할 수 있었다.

**참 고 문 헌**

- 1) Sideras P, Smith CIE. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995;59:135-223.
- 2) Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-8.
- 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) Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davis 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.
- 5) Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, Largaespada DA, Grimaldi JC, Cohen L, et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 1993;261:358-61.
- 6) Rawlings DJ, Witte ON. Bruton's tyrosine kinase is a key regulator in B-cell development. *Immunol Rev* 1994;138:105-19.
- 7) 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.
- 8) Kwan SP, Terwilliger J, Parmley R, Raghu G, Sandkuyl LA, Ott J, et al. Identification of a closely linked DNA marker, DXS178, to further refine the X-linked agammaglobulinemia locus. *Genomics* 1990;6:238-42.
- 9) 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.
- 10) Ohta Y, Haire RN, Litman RT, Fu SM, Nelson RP, Kratz J, et al. Genomic organization and structure of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase: Localization of mutations associated with varied clinical presentations and course in X chromosome-linked agammaglobulinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9062-6.
- 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) 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.
- 13) 백영중, 이재호, 김정수, 송창화, 박정규, 김화중 등. X-linked agammaglobulinemia 환자 가족의 Bru-

- ton's tyrosine kinase 유전자 변이 분석. 대한소아과학회지 2000;43:1599-607.
- 14) 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.
  - 15) Saha BK, Curtis SK, Vogler LB, Vihinen M. Molecular and structural characterization of five novel mutations in the Bruton's tyrosine kinase gene from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Mol Med* 1997;3:477-85.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) Quartier P, Debre M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, et al. Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr* 1999;134:589-96.
  - 20) Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995;333:431-40.
  - 21) Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine* 1985;64:145-56.
  - 22) Kainulainen L, Nikoskelainen J, Vuorinen T, Tevola K, Liippo K, Ruuskanen O. Viruses and bacteria in bronchial samples from patients with primary hypogammaglobulinemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1199-204.
  - 23) Rudge P, Webster AD, Revesz T, Warner T, Espanol T, Cunningham-Rundles C, et al. Encephalomyelitis in primary hypogammaglobulinaemia. *Brain* 1996;119:1-15.
  - 24) Campana D, Farrant J, Inamdar N, Webster AD, Janossy G. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol* 1990;145:1675-80.
  - 25) Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies(1). *N Engl J Med* 1984;311:235-42.