

단순 두개골조기유합 환아에서 섬유아세포 성장인자 수용체 3 유전자의 돌연변이 유무

박병주 · 손대구 · 김대광* · 한기환

계명대학교 의과대학 성형외과학교실, 해부학교실*

Mutation Analysis in Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Gene in Korean Children with Simple Craniosynostosis

Byungju Park, M.D., Daegu Son, M.D., Daekwang Kim M.D.* Kihwan Han, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Anatomy,* Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

The C749G(Pro250Arg) mutation in the gene for fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) has been found in patients with various types of craniosynostosis. In this study, the blood of 9 Korean children with non-syndromic craniosynostosis were collected and mutation analyses were performed to screen whether this Pro250Arg mutation is also prevalent in Korean population. The genomic DNA samples were analysed by PCR amplification to amplify exon 7 and flanking intron sequence of FGFR3 (341 bp). Restriction digests were analysed by gel electrophoresis. There were no heterozygous for Pro250Arg mutation. No mutations in restriction enzyme digestion were confirmed by direct DNA sequencing. In this study, only 9 patients with simple craniosynostosis were subjected to mutation detection. Therefore, it is necessary to study a large number of patients in order to understand the proportion of non-syndromic craniosynostosis attributable to FGFR3 mutation. The epidemiologic study of this disease should be also combined in addition.

Key Words: Cranoisynostosis, FGFR3

I. 서 론

두개골조기유합(craniosynostosis)은 한 개 이상 두개골

Received June 20, 2001

Revised September 3, 2001

Address Correspondence : Kihwan Han, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University School of Medicine, 194 Dongsan-Dong, Choong-Gu, Taegu 700-712, Korea. Tel: 053) 250-7633 / Fax: 053) 255-0632 / E-mail: khh@dsmc.or.kr

* 이 연구는 1999년도 동산의료원 특수과제 연구비로 이루어졌음.

봉합이 조기에 유합하는 것으로 신생아 2100명당 1명꼴로 나타난다.¹ 두개골조기유합은 크게 두개골조기유합만 있는 단순형(simple or non-syndromic type)과 두개골조기유합외에 두개안면과 신체 여러 부위에 기형이 동반되는 복잡형(complex or syndromic type)으로 나눌 수 있다. 두개골조기유합은 100여 개의 증후군에서 나타나는데 대부분의 경우에는 단순히 두개골조기유합만 있거나 손과 발에 작은 기형이 동반해서 나타난다.² 두개골조기유합의 유전적 원인은 크게 단일유전자 이상(monogenic disorder)과 염색체 이상(chromosomal aberrations)으로 구분된다. 단순형과 복잡형 두개골조기유합은 단일유전자 이상에 의해 나타나지만, 염색체 이상으로 발생하는 두개골조기유합의 경우에는 항상 다른 신체적 이상이 같이 나타나는 증후군으로 나타난다. 국내에서 임상적으로는 흔히 접하는 두개골조기유합은 성형외과 수술로 성공적으로 교정되고 있지만 이에 대한 역학조사는 아직 보고되지 않은 상태이며 발병 원인에 대한 분자유전학적인 연구도 국내에서는 전무한 상태이다.

최근에 섬유아세포 성장인자 수용체(fibroblast growth factor receptor, FGFR)의 돌연변이와 두개골조기유합의 연관성에 관한 연구가 많이 보고되어 이 질환의 유전자적 진단의 가능성을 보여주고 있다. 복잡 두개골조기유합이 나타나는 Crouzon병, Apert증후군, 그리고 Jackson-Weiss 증후군에서는 FGFR2 유전자에서 돌연변이가 나타나며,^{3,4} Pfeiffer증후군에서는 FGFR1과 FGFR2의 돌연변이가 보고되었다.⁵ Bellus 등⁶은 단순 두개골조기유합 환자의 DNA에서 FGFR3의 exon 7과 이웃한 intron 부위를 PCR (polymerase chain reaction) 증폭하여 DNA 분석을 실시해본 결과, 일부 환자에서 FGFR3 유전자의 749번째 염기인 cytosine(C)의 guanine(G)으로의 전위(transversion) (C749G) 즉, 아미노산 서열의 250번에서 proline(Pro)이 arginine(Arg)으로 치환(substitution)(Pro250Arg)됨을 밝혔다. 이러한 사실에 근거하여 본 연구에서는 한국인 단순 두개골조기유합 환자에서 본 돌연변이 유무를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험재료

단순 두개골조기유합을 가진 9명의 소아에서 채취한 말초혈액 5 ml를 실험재료로 사용하였다. 단두증(brachycephaly)이 5명이였고, 사두증(plagiocephaly)과 삼각두증(trigonocephaly)이 각각 3명과 1명이였다. 9명의 환아에서 가족력은 없었다.

나. 말초혈액에서의 DNA 추출⁶

말초혈액 5 ml를 채취하여 혈액 용해 완충용액(blood lysis buffer)(155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA pH 7.0)으로 적혈구를 완전히 용혈시킨 다음 원심 분리하여 상층액을 버리고 적혈구를 제거하였다. 혁 용해 완충용액(nuclei lysis buffer)(10 mM Tris-HCl pH 8.2, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA)으로 남아 있는 말초혈액 세포덩어리를 분산시키고 proteinase K(100 µg/ml, Gibco, USA)와 1% sodium dodecyl sulfate를 추가하여 37°C에서 16 시간 방치한 다음 modified salting-out 방법으로 DNA 을 추출하였다.

다. 제한효소 절단에 의한 돌연변이 검색⁶

1) Polymerase chain reaction(PCR) 증폭

FGFR3 유전자의 exon 7 및 이웃한 intron 부위를 증폭하기 위하여 sense 시발체 5'-CGGCAGTGACGGTGG TGGTGA-3'(Bioneer, Korea)와 antisense 시발체 5'-CCA AATCCTCACGCAACCC-3'(Bioneer, Korea)를 사용하였다. PCR 혼합물의 구성은 증류수 24.75 µl, dimethyl sulfoxide 5 µl, 25 mM MgCl₂ 3 µl, 5 mM dNTP 2 µl, 각각의 시발체 1 µl(50 pmole), AmpliTaq Gold™ DNA polymerase(1.25 units, Perkin Elmer, USA) 0.25 µl, 10x enzyme buffer(Perkin Elmer, USA) 5 µl, DNA 2 µl(200 ng)을 혼합하여 전체 용량이 50 µl가 되도록 하였다. PCR 반응주기는 먼저 95°C에서 10분간 1주기를 시행하고 그 다음에 94°C, 30 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 45 sec 주기를 35 회 시행한 후 72°C에서 10분간 유지하였다. 증폭산물을 2% agarose gel(Promega, USA)에 전기영동하여 확인하였다.

2) 제한효소처리에 의한 돌연변이 검출

변화된 염기서열이 있는지를 간접적으로 확인하기 위하여 PCR 증폭으로 얻어진 DNA산물을 Nci 1 제한효소(Promega, USA)로 37°C에서 16시간 방치한 다음 3% Nu-sieve agarose gel(FMC, USA)에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 사진 촬영하였다.

라. DNA 서열 검색⁶

DNA 염기서열을 직접 읽어내어 변화된 염기서열이 있는지 알아내기 위해 PCR 증폭으로 얻어진 DNA산물을 순수 정제한 다음 fluorescent dideoxy terminator 방법으로 돌연변이의 유무를 재확인하였다.

III. 결 과

가. 제한효소에 의한 Pro250Arg 돌연변이의 검출

FGFR3 유전자의 exon 7과 이웃한 flanking intron 서열 부분을 PCR 증폭한 산물의 크기는 341 bp였다(Fig. 1). 이 PCR 산물을 Nci 1 제한효소로 처리하였을 때, C749G의 돌연변이가 있는 경우에는 DNA가 세 개의 밴드로 잘려지게 되지만 9명의 소아에서는 모두 두 개(218 bp, 123 bp)의 밴드로 잘려져서 정상 대립형질만 나타났다(Fig. 2).

나. DNA 염기 서열 분석에 의한 돌연변이의 검출

제한효소를 이용한 돌연변이의 검출 결과를 확인하기 위하여 직접 DNA의 염기서열을 분석한 결과에서도 FGFR3 유전자의 749번째 염기에서 cytosine이 guanine으로 염기전위된 돌연변이를 검출할 수 없었다(Fig. 3).

IV. 고 찰

두개골조기유합증후군들은 임상적 소견에 의해 Pfeiffer, Crouzon, Jackson-Weiss, Apert 증후군 등으로 구분해 왔지만 이들 증후군들은 문자유전학적 수준에서도 진단 구별이 가능하다.⁷ 예를 들면 첨두(acrocephaly), 넓고

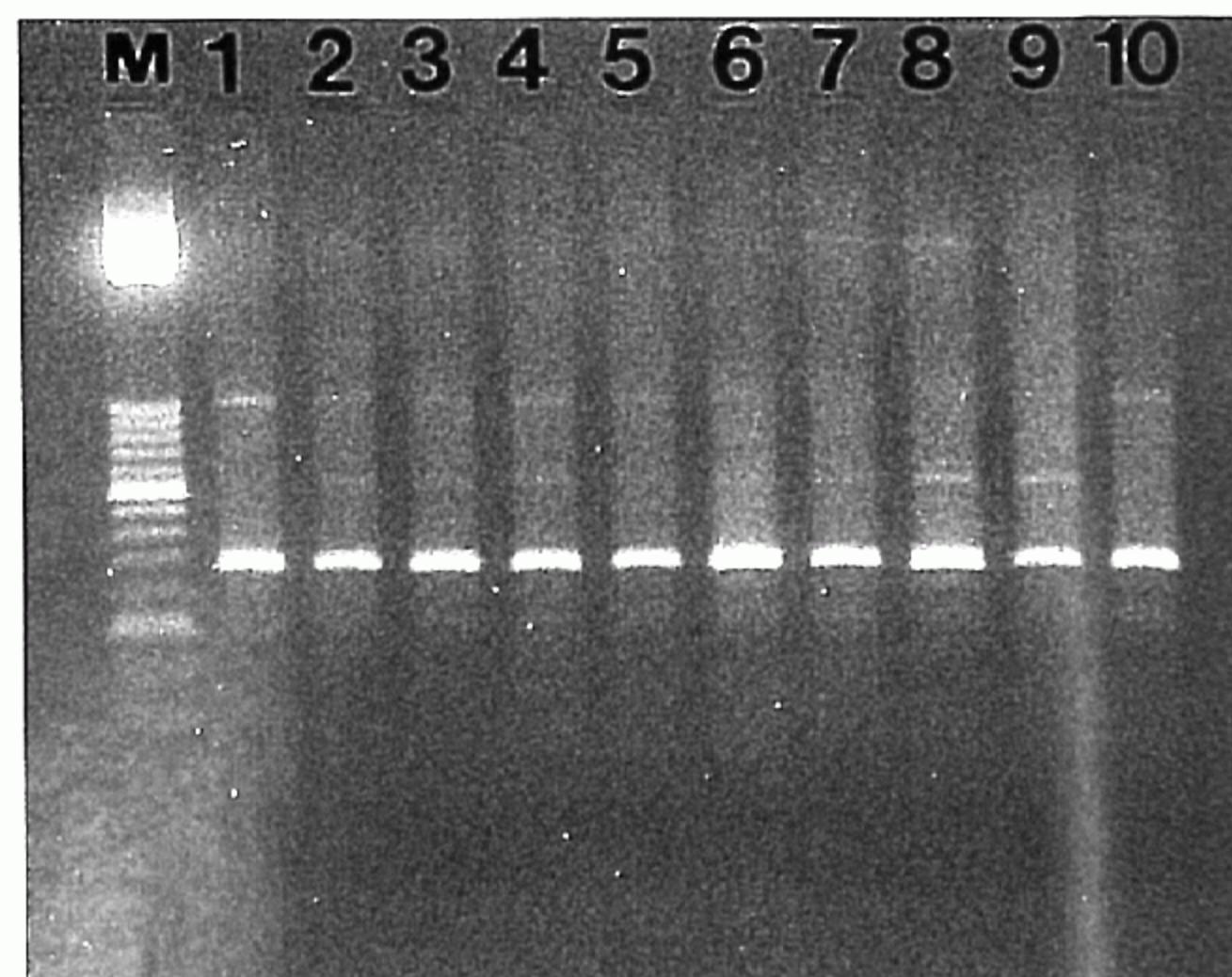


Fig. 1. The 341 bp FGFR3 amplification product from exon 7 and flanking intron sequence. Lane M: 50 bp DNA size marker; lane 1: normal control; lane 2-10: affected individuals with simple craniosynostosis.

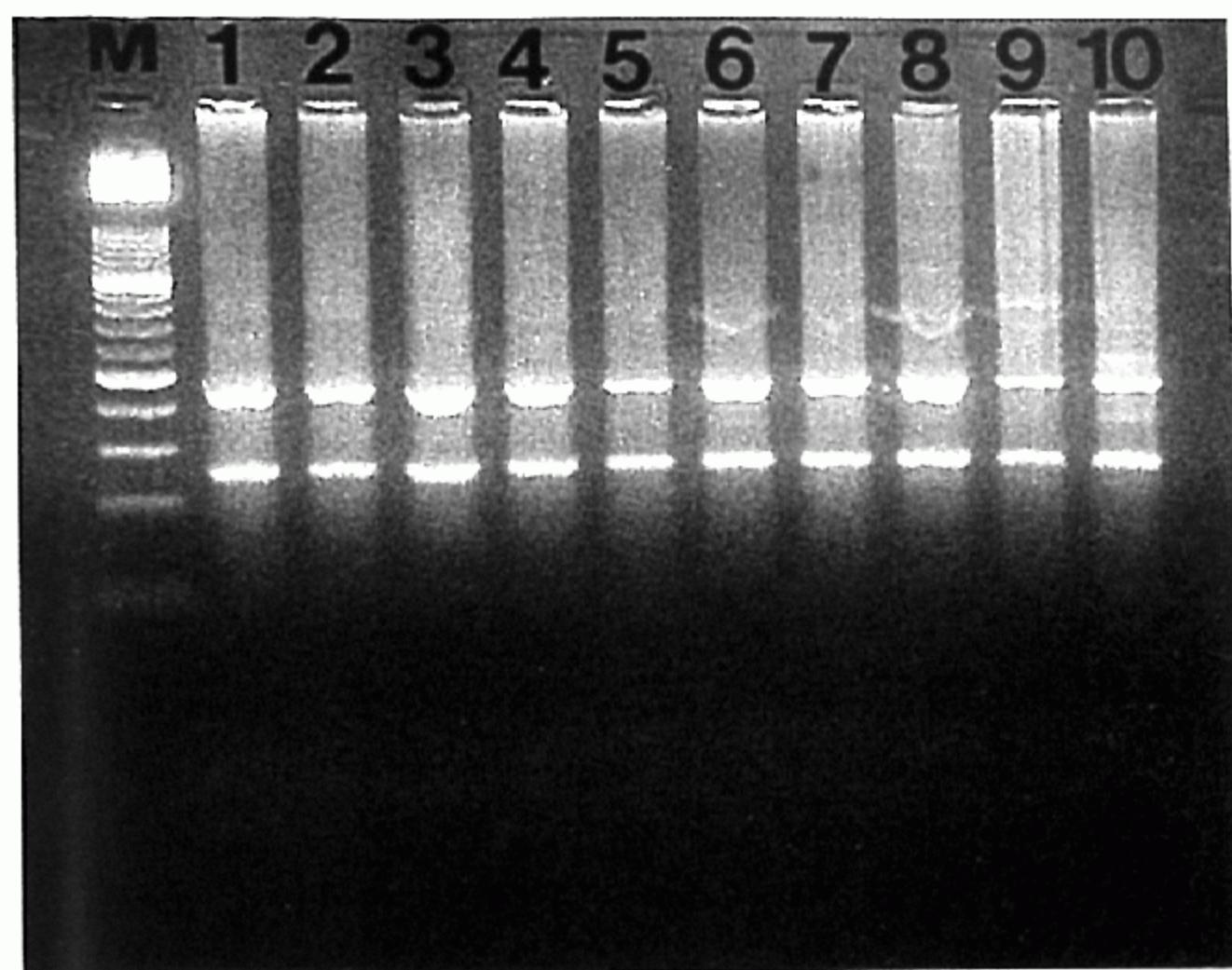


Fig. 2. Detection of Pro250Arg Mutation by Nci I restriction enzyme digestion. The 341 bp FGFR3 amplification product from exon 7 was cleaved by Nci I into 218 bp and 123 bp fragments in all individuals. Lane M: 50 bp DNA size marker; lane 1: normal control; lane 2-10: affected individuals with simple craniosynostosis.

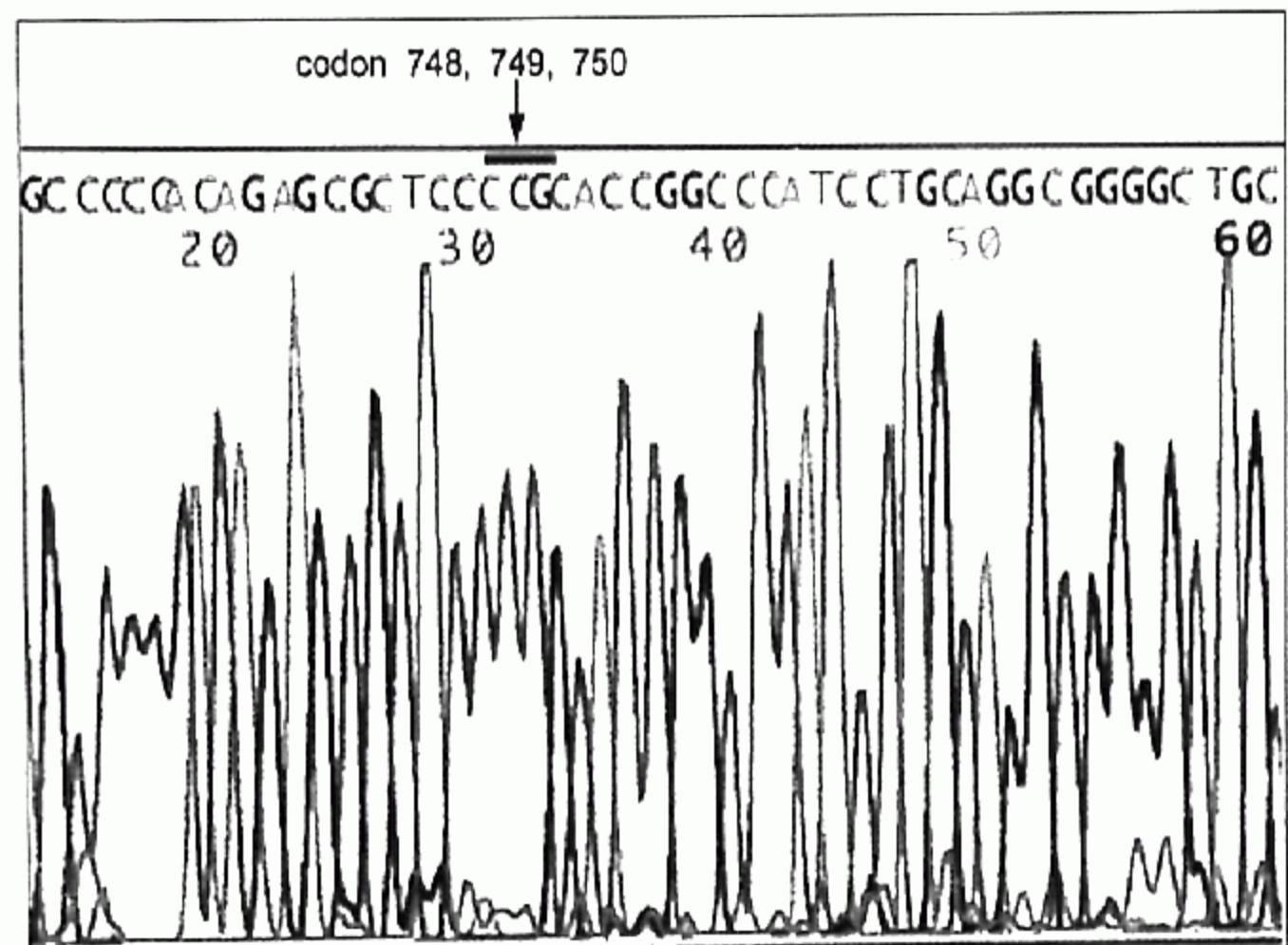


Fig. 3. Detection of the Pro250Arg mutation by direct DNA sequencing. The electropherograms demonstrated the no-presence of C and G indicating the C749G mutation.

내측으로 굽곡된 엄지발가락과 엄지손가락 그리고 두개골 조기유합이 특징적으로 나타나는 Pfeiffer증후군 경우에는 FGFR1 유전자에 특이적으로 돌연변이(Pro252Arg)가 나타나며,⁵ 두개골조기유합과 손과 발의 대칭적 합지(symmetrical syndactyly)가 특징적으로 나타나는 Apert증후군의 원인으로는 FGFR2 유전자의 Ser252Trp와 Pro253Arg의 돌연변이가 보고되었다.^{2,4} 무연골형성(achondroplasia), 연골저형성(hypochondroplasia), thanatophoric dysplasia와 같은 골격이형증(skeletal dysplasia)에서는 FGFR3의 돌연변이가 보고되었다.^{8,9} 이러한 FGFR 유전자들은 공통적으로 세 개의 extracellular immunoglobulin-like domain(I-

III), transmembrane domain 그리고 두 개의 intracellular tyrosin kinase domain으로 구성되어 있다.¹⁰ 모든 포유류의 FGFR에서 2번째와 3번째 Ig-like domain 사이에는 16개의 아미노산 서열이 같은 부위가 존재하는데, 이 부위 안에서 돌연변이가 나타나는 것이다. 그러므로 모든 포유류의 FGFR에서 공동서열을 갖는 2번째와 3번째 Ig-like domain부분이 두개골조기유합을 지니는 질환과 연관이 있을 것으로 추정되며 이러한 돌연변이는 섬유아세포 성장인자(FGF) ligand의 결합을 바꿀 것으로 추정되지만 이러한 돌연변이에 대한 병리 유전적인 기전은 밝혀진 것이 없다.¹¹

단순 두개골조기유합의 분자생물학적 원인을 밝히기 위한 연구는 최근에 들어서 활성화되고 있는데, Bellus 등⁶은 단순 두개골조기유합의 한 원인으로서 FGFR3의 C749G 염기서열 돌연변이(Pro250Arg)를 처음 밝혔다. 이후 Moloney 등²은 단순 관상봉합 두개골조기유합(simple coronal craniosynostosis)을 가진 환자 26명 중 8명(31%)에서 동일한 돌연변이를 검출했고, Reardon 등¹²은 사지에 다른 이상이 없는 단일봉합 두개골조기유합(unisutural craniosynostosis)환자 47명 중 3명(6.4%)에서 그리고 Gripp 등¹³은 편측성 관상봉합 두개골조기유합(unilateral coronal synostosis)만 가진 환자 37명 중 4명(10.8%)에서 FGFR3 유전자의 동일한 돌연변이를 검출하였다. 또한 중국인의 경우 단순 두개골조기유합을 가진 환자 18명 중 5명(28%)에서 FGFR3 유전자의 Pro250Arg 돌연변이가 나타났다고 보고하였다.¹⁴ 본 연구에서는 9명의 단순 두개골조기유합 환아에서 FGFR3 유전자의 C749G 돌연변이를 발견할 수 없었다. 이것은 현재까지 보고된 결과와 다른 결과로 표본의 수도 고려해야 하겠지만, 한국인에서 단순 두개골조기유합과 FGFR3 유전자가 관련이 적거나, 본 연구에서 행해지지 않은 FGFR3 유전자 다른 부위의 돌연변이와 관련이 있을 가능성도 배제할 수 없다. 앞으로 한국인에서 단순 두개골조기유합과 FGFR3 유전자의 돌연변이와의 관계를 이해하기 위해서는 더 많은 표본에서 조사가 이루어져야 하겠으며, 또한 이 질환의 역학적 조사도 이루어져야 이러한 유전자의 돌연변이가 선별검사로서 좀 더 유용한 의미를 가질 수 있을 것이다.

V. 요 약

단순 두개골조기유합을 가진 9명의 한국인 소아에서 섬유아세포 성장인자 수용체 3 유전자의 749번째 염기서열에서 나타나는 cytosine의 guanine으로 돌연변이(C749G, Pro250Arg)를 제한효소 처리법과 DNA 염기서열 분석법으로 연구하였다. 9명 모두 정상적인 대립형질을 나타내

어 돌연변이를 검출할 수 없었다. 이는 현재까지 보고된 다른 인종의 결과와 다른 소견으로 적은 대상군으로 인한 비틀림일 수도 있으나 한국인에서의 특이 소견일 가능성도 배제할 수 없다. 앞으로 좀 더 많은 환자에서 두개골조기유합과 FGFR3 유전자와 연관성을 조사할 필요성이 있을 것으로 생각되며 아울러 역학적인 조사도 같이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaiti-Pellie C, Marchac D, Renier D: Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet* 55: 500, 1995
2. Moloney DM, Wall SA, Ashworth GJ, Oldridge M, Glass IA, Francomano CA, Muenke M, Wilkie AO: Prevalence of Pro250Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis. *Lancet* 349: 1059, 1997
3. Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao JI, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M: Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet* 8: 275, 1994
4. Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyne LJ, Rutland P, Malcolm S, Winter RM, Reardon W: Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet* 9: 165, 1995
5. Schell U, Hehr A, Feldman GJ, Robin NH, Zackai EH, de Die-Smulders S, Viskochil DH, Stewart JM, Wolff G, Ohiashi H, Price A, Cohen MM Jr, Muenke M: Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet* 4: 323, 1995
6. Bellus GA, Gaudenz K, Zackai EH, Clarke LA, Szabo J, Francomano CA, Muenke M: Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet* 14: 174, 1996
7. Muenke M, Schell U: Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet* 11: 308, 1995
8. Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick MW, Tsipouras P: A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum Mol Genet* 4: 2097, 1995
9. Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM: Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 13: 233, 1996
10. Zhang Y, Gorry MC, Post JC, Ehrlich GD: Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family. *Gene* 230: 69, 1999
11. Cohen MM Jr: Transforming growth factor beta s and fibroblast growth factors and their receptors: Role in sutural biology and craniosynostosis. *J Bone Miner Res* 12: 322, 1997
12. Reardon W, Wilkes D, Rutland P, Pulleyne LJ, Malcolm S, Dean JC, Evans RD, Jones BM, Hayward R, Hall CM, Nevin NC, Baraister M, Winter RM: Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unisutural sporadic craniosynostosis. *J Med Genet* 34: 632, 1997
13. Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Gaudenz K, Whittaker LA, Bartlett SP, Glat PM, Cassileth LB, Mayro R, Zackai EH, Muenke M: Identification of a genetic cause for isolated unilateral coronal synostosis: A unique mutation in the fibroblast growth factor receptor 3. *J Pediatr* 132: 714, 1998
14. Tsai FJ, Wu JY, Lee CC, Tsa CH: A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR 3) causes non-syndromic craniosynostosis. *Acta Paediatr* 89: 672, 2000