



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2010년 2월  
박사학위 논문

한국인의 *AGGF1* E133K  
유전 변이 연구

조선대학교 대학원

의 학 과

이 성 현

한국인의 *AGGF1* E133K  
유전 변이 연구

Study of *AGGF1* E133K Genetic Variation in the  
Korean Population

2010년 2월 25일

조선대학교대학원

의 학 과

이 성 현

한국인의 *AGGF1* E133K  
유전 변이 연구

지도교수 문 대 수

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2009년 10월

조선대학교대학원

의 학 과

이 성 현

## 이성현의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	<u>박영진</u> (인)
위원	조선대학교 교수	<u>문대수</u> (인)
위원	전남대학교 교수	<u>신명근</u> (인)
위원	조선대학교 교수	<u>장숙진</u> (인)
위원	조선대학교 교수	<u>박 건</u> (인)

2009년 12월

조선대학교대학원

# 목 차

<b>LIST OF TABLES</b>	-----	<b>III</b>
<b>LIST OF FIGURES</b>	-----	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT(영문)</b>	-----	<b>V</b>
<b>ABSTRACT(한글)</b>	-----	<b>28</b>
<b>1. 서론</b>	-----	<b>1</b>
<b>2. 재료와 방법</b>	-----	<b>2</b>
<b>I. 대상균</b>	-----	<b>2</b>
<b>II. 인간 유전체 DNA 추출</b>	-----	<b>2</b>
<b>III. AGGF1 K133 제작을 위한 site-directed         mutagenesis</b>	-----	<b>3</b>
<b>IV. AGGF1 E133K 다형성 검출을 위한         직접염기서열분석법</b>	-----	<b>6</b>
<b>V. AGGF1 E133K 다형성 검출을 위한 제한효소         절편길이다형성법</b>	-----	<b>6</b>
<b>VI. AGGF1 E133K 다형성 검출을 위한 대립유전자         특이증합효소연쇄반응법</b>	-----	<b>7</b>

3. 결과	9
I. 대상군의 인구학적 특성	9
II. AGGF1 E133K 유전자 다형성 빈도	9
III. AGGF1 E133K 다형성을 가진 대상인의 임상적 특성	9
IV. AGGF1 E133K 검출을 위한 대립유전자특이중합 효소연쇄반응법과 제한효소절편길이다형성법 비교	9
4. 총괄 및 고안	10
5. 참고문헌	23
6. 감사의 글	30

## **LIST OF TABLES**

Table 1. The primer sequences for PCR, sequencing and mutagenesis ----- **16**

Table 2. Frequency of AGGF1 E133K genetic variation in previously reported studies and in this study ----- **17**



## LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Sequencing results of *AGGF1* c.397 nucleotide from (A) homozygotic *AGGF1* K133 DNA by site-directed mutagenesis, (B) homozygotic *AGGF1* E133 wild DNA and (C) heterozygotic *AGGF1* E133K DNA. ----- **18**
- Fig. 2. Analysis of a single nucleotide variation at c.397 in the *AGGF1* gene. ----- **19**
- Fig. 3. Design of primers for detection of *AGGF1* E133K variation by allele-specific PCR (AS-PCR) assay. ----- **20**
- Fig. 4. Electrophoresis of the allele-specific PCR assay (ASP). ----- **21**
- Fig. 5. 3D protein modeling of *AGGF1* E133 illustrated by SWISS-MODEL Repository. ----- **22**

# ABSTRACT

## Study of *AGGF1* E133K Genetic Variation in the Korean population

Sung Hyun Lee

Advisor: Prof. Dae Soo Moon MD, Ph.D

Department of Laboratory Medicine

Graduate School of Chosun University

Background : The E133K genetic variation of *AGGF1* gene that is a potent angiogenetic factor have been assumed genetic susceptible factor for Klippel-Trenaunay syndrome. However, frequency and clinical significances of *AGGF1* E133K genetic variation have not been known in the Korean population. The aim of the study was to investigate frequency and clinical significances of *AGGF1* E133K variation in Korean.

Material and Method : The 958 subjects, including 950 healthy controls, 3 Klippel-Trenaunay syndrome patients and 5 relatives were enrolled in the study. Genotyping of *AGGF1* E133K was carried out by allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) in all samples and reconfirmed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 201 samples.

Results : In 950 healthy controls, frequency of *AGGF1* E133K genetic variation was 0.11% (1/950). One healthy control with heterozygotic *AGGF1* E133K genetic variation was not shown features of Klippel-Trenaunay

syndrome. All three patient with Klippel-Trenaunay syndrome and their relatives have wild genotype of *AGGF1* E133. Results with AS-PCR and PCR-RFLP was identical in randomly selected 201 samples.

Conclusion: *AGGF1* E133K is very rare genetic variation in the Korean population. However, this result bring into questionable state whether *AGGF1* E133K is a mutation and a susceptible factor of Klippel-Trenaunay syndrome in the Korean population. This study is the first report of *AGGF1* E133K genetic variation in Korean population.

Key Word: *AGGF1*, E133K, Klippel-Trenaunay Syndrome, Allele-specific PCR

## 1. 서론

Klippel-Trenaunay 증후군은 1900년 Klippel과 Trenaunay에 의해 첫 보고된 드문 선천적 혈관이상 질환으로 피부의 혈관종, 다수의 심부 및 표재정맥류, 이환된 사지의 비대가 특징적으로 나타난다 (Klippel M et al. 1900; Berry SA et al. 1988). 또한 Klippel-Trenaunay 증후군 환자에서 동정맥 기형으로 인한 피부에 자주빛의 커다란 모반이 함께 나타나는 경우 Klippel-Trenaunay-Weber 증후군으로 분류한다(Meine JG et al. 1997).

Klippel-Trenaunay 증후군의 원인은 아직 알려져 있지 않으나 상염색체 우성의 유전성 경향이 보고되었다(Ceballos-Quintal JM et al. 1996). 또한 최근 Klippel-Trenaunay 증후군에 대한 취약 유전자(susceptible gene)로 *AGGF1* 유전자가 보고되기도 하였다(Tian XL et al. 2004; Timur AA et al. 2005). 또한 Tian XL 등은 *AGGF1* 유전자에 E133K 돌연변이가 발생하는 경우 혈관생성능력이 증가하여 Klippel-Trenaunay 증후군이 발생할 것이라고 하였다(Tian et al. 2004).

한국에서는 Klippel-Trenaunay 증후군에 대한 체계적인 조사가 이뤄지지 않고 있는 실정이다. 한국의학논문데이터베이스 (<http://kmbase.medric.or.kr/>)에 의하면 Klippel-Trenaunay 증후군과 관련된 논문은 1971년 전 등 (Jeun KH et al. 1971)의 첫 증례보고 이후 총 45건이 보고되고 있으나 이들 논문을 살펴보면 산발적인 증례보고가 전부이다 (Kim JY et al. 2000; Kim MY et al. 2003; Lee YK et al. 2003; Kim JH et al. 2004; Jang HS et al. 2006; Cheon SH et al. 2009). 또한 Klippel-Trenaunay 증후군에 대한 분자유전학적 접근도 전무한 상태이다.

이에 저자는 한국인을 대상으로 Klippel-Trenaunay 증후군의 취약 유전변이로 보고되어진 *AGGF1* E133K 염기다형성의 빈도와 임상적 의의에 대해 연구 하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### I. 대상군

2008년 1월부터 10월까지 순천중앙병원에 건강검진을 목적으로 내원한 정상인 950명과 Klippel-Trenaunay 증후군으로 진단된 3명 및 각 가족구성원 5명을 대상으로 하였으며 각 대상자 모두에게서 유전자검사동의서를 받았다. 유전자검사에 대해 동의하지 않은 경우 채혈을 비롯한 모든 연구 행위에 참여되지 않도록 하였다.

### II. 인간유전체DNA추출

인간 유전체 DNA는 QIAamp blood mini kit (Qiagen, CA, USA)를 이용하여 정맥혈을 대상으로 제조회사의 지침에 따라 추출하였다. 추출과정을 간략히 적으면 다음과 같다. 정맥혈 180  $\mu$ L에 Proteinase K 20  $\mu$ L와 AL buffer 200  $\mu$ L를 넣어준 다음 잘 혼합한 후 56°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 100% 실험용 에탄올 200  $\mu$ L를 넣고 잘 혼합하였다. 혼합액을 QIAamp Spin Column에 넣은 후 8,000 rpm (6,000 g)에서 1분간 원심분리 하였다. Spin column에 500  $\mu$ L의 완충액 AW1을 넣고 8,000 rpm (6,000 g)에서 1분간 원심분리 하였다. 500  $\mu$ L의 완충액 AW2를 넣고 14,000 rpm (20,000 g)에서 3분간 원심분리 하였다. QIAamp Spin Column을 고압멸균이 된 새 microcentrifuge tube에 넣고 100  $\mu$ L의 AE 완충액을 넣고 실온(15~20°C)에 1분간 방치한 다음 13,000 rpm (20,000 g)에서 1분간 원심분리 하여 인간 유전체 DNA를 추출하였다.

### III. *AGGF1*K133 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 제한효소길이절편 다형성 실험의 양성 대조를 위해 site-directed mutagenesis를 실시하였다.

*AGGF1* E133K 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 제한효소길이절편 다형성 실험의 양성 대조를 위해 site-directed mutagenesis를 실시하였다. 직접염기서열분석을 통해 *AGGF1* E133 동형접합자로 확인된 유전체 DNA를 주형으로 mutagenesis를 위한 주형을 증폭하였다. PCR 반응물 조제는 2X Anydirect Max Red premix (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM dNTPs) (BioQuest, Seoul, Korea)와 2 µL 시발체 혼합물(Table 1)을 넣고 DNA 농도는 10 ng을 사용하여 최종 반응량이 20 µL가 되도록 하였다. 시발체 혼합물은 5 µM의 전시발체(*AGGF1*IntF forward primer)와 5 µM의 후시발체(*AGGF1*ComR reverse primer)로 구성되었다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94°C에서 5분 반응시키고 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초를 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 연장반응을 시켰다. 1.0% 아가로오스겔(iNtRon, Sungnam, Korea)에 전기영동을 하여 447 bp의 밴드를 잘라 Gel purification kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제하였다. Gel purification 과정은 잘라낸 아가로오스겔 100 mg에 300 µL Buffer GEB를 넣고 60°C에 10분간 방치하였다. 아가로오스겔이 완전히 녹으면 100 µL isopropanol을 첨가하여 잘 섞어 주었다. 용해물(lysate)를 spin column에 분주하고 10,000 rpm에서 30초간 원심분리한 후 여과액은 버리고 collection tube는 재사용하였다. 500 µL Buffer GEB를 넣고 12,000 rpm에서 30초간 원심분리하고 여과액은 버리고 collection tube는 재사용하였다. 다시 750 µL의 80% 에탄올을 분주하고 12,000 rpm에서 30초간 원심분리하였다. 여과액은 버린 후 collection tube를 재장착하고 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 잔존한 80% 에탄올을 제거하였다. Binding column을 새로운 고압멸균된 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 30 µL의 elution buffer를 binding column에 넣어주고 5분 실온 방치한 후 12,000 rpm의 속도로 30초간 원심분리하여 정제된 PCR 산물을 얻었다.

정제된 PCR 산물을 T-blunt PCR cloning kit (Solgent, Daejeon, Korea)

를 이용하여 클로닝하였다. 정제된 PCR 산물 3.0  $\mu\text{L}$ 에 T-vector 0.7  $\mu\text{L}$ 와 6X T-blunt buffer 1.0  $\mu\text{L}$ 와 D/W를 넣어 총량을 6.0  $\mu\text{L}$ 로 한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 다시 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 방치하여 ligation 과정을 진행하였다. 70  $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하여 불활성화를 시킨 후 ligation 산물 3  $\mu\text{L}$ 를 *E. coli* BL21 (Novagen, Madison, WI, USA)와 혼합한 후 전기천공법(electroporation)을 실시하여 전이(transformation)를 시켰다. 전기천공법은 전기천공기(electroporator)인 ECM 630 (BTX, San Diego, CA, USA)을 이용하여 실시하였다. 이 전체 혼합액을 1 mL Luria-Bertani (LB) 액체배지에 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 배양한 후 IPTG와 X-gal 그리고 ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과 kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이 함유된 LB 배지에 도포한 후 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 배양하였다. 배지에서 성장한 콜로니 20개를 채취하여 각각을 콜로니(colony) PCR를 실시하였다. 콜로니 PCR 반응물 조제는 10x EF-Taq buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 10mM dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ , EF-Taq 0.25  $\mu\text{L}$ , D/W 부유된 콜로니 15.0  $\mu\text{L}$ 와 2  $\mu\text{L}$  시발체 혼합물(Table 1)을 넣고 최종 반응량이 25  $\mu\text{L}$ 가 되도록 하였다. 시발체 혼합물은 T-vector에 대한 universal primer인 5  $\mu\text{M}$ 의 전시발체(M13F forward primer)와 5  $\mu\text{M}$ 의 후시발체(M13R reverse primer)로 구성되었다. GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 반응시키고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초, 56 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분을 30회 반복한 후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 연장반응을 시켰다. 이 중 3개의 콜로니 PCR 산물에 대해 상기 T-vector에 대한 universal primer (Table 1)을 이용하여 염기서열분석을 실시하여 mutagenesis primer가 결합하는 부위에 염기변이가 없는 것을 확인하였다.

Mutagenesis primer (Table 1) 각각을 kination을 실시하여 5' 말단에 hydroxy(-OH)기를 부착시켰다. kination을 시키는 목적은 mutagenesis 이후 self-ligation을 유도하기 위해서이다. kination 과정을 간단히 기술하면 kination buffer (pnk-A) 1.5  $\mu\text{L}$ , kinase (pnk) 1.0  $\mu\text{L}$ , 10 mM ATP 1.0  $\mu\text{L}$  그리고 20 pg으로 희석된 primer를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 방치하였다. 이렇게 kination된 primer 쌍을 이용하여 inverse PCR를 실시하였다.

Inverse PCR 반응물 조제는 10X pfu-X buffer (Solgent) 5.0  $\mu\text{L}$ , 10mM

dNTP (Solgent) 1.0  $\mu$ L, pfu-X DNA polymerase (Solgent) 0.5  $\mu$ L, 플라스미드 주형 (100 pg/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L와 2  $\mu$ L 시발체 혼합물(Table 1)을 넣고 최종 반응량이 50  $\mu$ L가 되도록 D/W를 첨가하였다. 시발체 혼합물은 kination된 mutagenesis primer인 10  $\mu$ M의 전시발체(AGGF1muF forward primer)와 10  $\mu$ M의 후시발체(AGGF1muR reverse primer)로 구성되었다. GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer)을 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95 $^{\circ}$ C에서 5분 반응시키고 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 54 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 30회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 클로닝을 시행하기 전에 PCR을 위한 주형으로 넣어주었던 DNA를 제거하기 위해 *DpnI* (NEB, Boston, MA, USA) 제한효소로 처리하였다. *DpnI*은 CpG 부위가 메틸화된 DNA만을 선택적으로 분해하므로 inverse PCR 과정에서 생성된 DNA 절편은 분해되지 않으면서 메틸화된 플라스미드 주형은 제거할 수 있다. *DpnI* 제한효소 처리과정은 *DpnI* 1.5  $\mu$ L와 NEB buffer 4 3.0  $\mu$ L를 넣은 후 37  $^{\circ}$ C에서 2시간 방치하였다. *DpnI* 제한효소로 처리한 PCR 산물을 0.8% 아가로오즈겔(iNtRon)에 전기영동을 하여 4570 bp의 밴드를 잘라 Gel purification kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제하였다. Gel purification 과정은 상기한 방법을 이용하였다. 정제된 *DpnI* 제한효소 처리된 PCR 산물을 정제된 PCR 산물을 T-blunt PCR cloning kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 클로닝하였다. 클로닝은 상기한 T-vector cloning 방법을 이용하였다.

Mutagenesis 성공 여부를 확인하기 위해 배지에서 성장한 콜로니 10개를 채취하여 각각을 콜로니(colony) PCR를 실시하였다. 콜로니 PCR 반응물 조제는 10x EF-Taq buffer 2.5  $\mu$ L, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ L, EF-Taq 0.25  $\mu$ L, D/W 부유된 콜로니 15.0  $\mu$ L와 2  $\mu$ L 시발체 혼합물(Table 1)을 넣고 최종 반응량이 25  $\mu$ L가 되도록 하였다. 시발체 혼합물은 T-vector에 대한 universal primer인 5  $\mu$ M의 전시발체(M13F forward primer)와 5  $\mu$ M의 후시발체(M13R reverse primer)로 구성되었다. GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95 $^{\circ}$ C에서 2분 반응시키고 95 $^{\circ}$ C에서 20초, 56 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 연장반응을 시켰다. 이 중 4개의 콜로니 PCR 산물에 대해 상기



T-vector에 대한 universal primer (Table 1)을 이용하여 염기서열분석을 실시하여 mutagenesis가 성공적으로 일어났음을 확인하였다(Fig. 1A).

#### IV. 중합효소연쇄반응법-직접염기서열분석

*AGGF1* E133K 유전 변이를 관찰하기 위해 중합효소연쇄반응법-직접염기서열분석을 실시하였다. PCR 반응물 조제는 2x Anydirect Max Red premix (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM dNTPs) (BioQuest, Seoul, Korea)와 2 uL 시발체 혼합물(Table 1)을 넣고 DNA 농도는 10 ng을 사용하여 최종 반응량이 20 uL가 되도록 하였다. 시발체 혼합물은 5 uM의 전시발체(*AGGF1*IntF forward primer)와 5 uM의 후시발체(*AGGF1*CommR reverse primer)로 구성되었다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94°C에서 5분 반응시키고 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초를 40회 반복한 후 72°C에서 10분간 연장반응을 시켰다. PCR purification kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR 산물을 정제하였으며 sequencing 반응은 ABI prism<sup>TM</sup> Big dye<sup>TM</sup> terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (ABI, CA, USA)와 중합효소연쇄반응에 이용한 *AGGF1*IntF와 *AGGF1*CommR primer를 이용하였으며 sequencing 산물 정제는 Montage dye removal kit (Milipore, NY, USA)를 이용하였다. 최종 염기서열분석은 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer (ABI) 장비를 이용하였다 (Fig. 1).

#### V. 중합효소연쇄반응법-제한효소절편길이다형성

*AGGF1* E133K 유전 변이를 관찰하기 위해 중합효소연쇄반응법-제한효소절편길이다형성을 실시하였다. PCR 반응은 상기 염기서열분석을 위한 PCR 과정과 동일하다. 제한효소절편길이다형성을 실험하기 위해 정제과정을 거치지 않은 PCR 산물 10 uL을 새로운 0.2 mL PCR tube로 옮긴 후 당 tube에 *TaqI* (NEB, Boston, MA, USA) 1 uL, 10X NEB buffer 4 (NBE) 2

$\mu\text{L}$ , 100X BSA (NEB) 0.2  $\mu\text{L}$  그리고 D/W를 첨가하여 총량을 20  $\mu\text{L}$ 로 맞추었다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf)를 이용하여 65도에서 6시간 방치한 후 80도에서 20분 방치하여 *TaqI* 효소의 기능을 소실시켰다. 절편길이다형성을 확인하기 위해 2% 아가로오즈겔(iNtRon)을 사용하여 산물을 전기영동하여 분석하였다(Fig. 2). 절단되지 않은 PCR 산물은 447 bp이며 야생형인 *AGGF1* E133의 경우 절단이 되어 285 bp와 162 bp로 나누어지게 된다. 하지만 *AGGF1* K133 염기 변이가 있는 경우에는 절단이 되지 않고 447 bp만 관찰되게 된다. 모든 중합효소연쇄반응법-제한효소절편길이다형성 실험에 *AGGF1* E133 동형접합자검체와 *AGGF1* K133 동형접합자검체를 함께 실험하여 검사의 적절성을 평가하였다.

## VI. 대립유전자특이중합효소연쇄반응법

*AGGF1* E133K 유전 변이 유무는 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 (allele-specific polymerase chain reaction, AS-PCR)을 이용하여 판정하였다. 이 AS-PCR법은 정성적이며 *AGGF1* E133K에 대한 동형과 이형접합변이 여부를 판정할 수 없다. PCR 반응물 조제는 2X Anydirect Max Red premix (1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  dNTPs) (BioQuest, Seoul, Korea)와 2  $\mu\text{L}$  시발체 혼합물(Table 1)을 넣고 DNA는 2  $\mu\text{L}$ 를 사용하고 D/W를 넣어 최종 반응량이 20  $\mu\text{L}$ 가 되도록 하였다. 시발체 혼합물은 10  $\mu\text{M}$ 의 공통 역시발체 (*AGGF1*ComR common reverse primer)와 5  $\mu\text{M}$ 의 돌연변이 특이적 전시발체 (*AGGF1*MutF mutant specific forward primer) 그리고 2.5  $\mu\text{M}$ 의 내부 대조 전시발체 (*AGGF1*IntF internal control forward primer)로 구성되었다(Fig. 3). 돌연변이 특이적 전시발체의 경우 돌연변이 대립유전자(mutant allele)에 특이적이고 고의적 불일치를 포함하며 181 bp의 산물로 나타난다. 내부 대조 전시발체의 경우 변이형과 야생형 대립유전자 모두에서 관찰되어 PCR의 성공 여부를 판정하게 되며 447 bp의 반응산물이 관찰된다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94°C에서 5분 반응시키고 94°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서

30초를 40회 반복한 후 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 2% 아가로오즈겔 (iNtRon)을 사용하여 PCR 산물을 전기영동하여 분석하였다(Fig. 4).

본 연구에 이용된 AS-PCR 조건의 적절성은 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 제조된 동형접합성 *AGGF1* K133 플라스미드와 중합효소연쇄 반응법-직접염기서열분석법으로 확인된 *AGGF1* E133 동형접합성 인간 유전체 DNA를 양성 및 음성대조로 각각 이용하여 평가하였다.

### 3. 결 과

#### I. 대상군의 인구학적 특성

정상 대상군은 총 950명이었으며 남자 474명과 여자 476명으로 구성되었다. 평균 나이는 46세였으며 최소 연령은 10세였고 최고 연령은 87세였다.

#### II. *AGGF1* E133K 유전자 다형성 빈도

950명의 정상 대조군에서 *AGGF1* E133K 염기다형성은 1명 (0.01%) 발견되었으며 3명의 Klippel-Trenaunay 증후군 환자와 그들의 가족 구성원 모두 *AGGF1* E133 동형접합자로서 야생형이었다.

#### III. *AGGF1* E133K 다형성을 가진 대상인의 임상적 특성

*AGGF1* E133K 이형접합자를 가진 정상 대조자는 55세 여자로서 대상인을 비롯한 가족구성원 모두에서 Klippel-Trenaunay 증후군을 의심할 소견은 관찰되지 않았다.

#### IV. *AGGF1* E133K 검출을 위한 대립유전자 특이 증합효소연쇄반응법과 제한효소절편길이 다형성법 비교

950명 중 AS-PCR 결과가 음성이 나온 200명과 양성인 1명에 대해 실시한 PCR-RFLP는 AS-PCR 결과와 동일하였다.

#### 4. 총괄 및 고안

*AGGF1* 유전자는 angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 의 약어로서 *VG5Q* 유전자로도 불리고 있다. *VG5Q*는 vasculogenesis gene on 5q의 약어이다(Akkawi M et al. 2006). 이 약어에 통해 알 수 있듯이 *AGGF1* 유전자는 5q13.3에 위치하고 있으며 forkhead-associated domain과 G-patch domain를 함유한 강력한 혈관생성인자에 대한 유전 정보를 담고 있다(Tian XL et al. 2004). *AGGF1* genomic DNA는 총길이 34,807 bp (GI No. 224589817)이며 14개의 엑손으로 구성되어 있다. *AGGF1* mRNA는 총 4466 bp (accession No. NM\_018046.3) 구성되어 있으며 *AGGF1*의 cDNA는 2145 bp이며 총 14개의 엑손으로 구성되어 있고 엑손 1번의 일부는 5' untranslated region (UTR) 그리고 엑손 14번의 일부는 3'-UTR로 구성되어 있다. *AGGF1* 단백질(accession No. NP\_060516.2)은 714개의 아미노산으로 구성되어 있으며 forkhead-associated domain (아미노산 435-508)과 G-patch domain (아미노산 619-663)를 포함하고 있다 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55109?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55109?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum)). *AGGF1* 단백질(Fig. 5)은 혈관내피세포, 혈관 평활근세포 그리고 조골세포 등에서 발현되며 거의 모든 조직(심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 횡문근, 신장, 췌장)에서 관찰된다. *AGGF1* 단백질은 혈관내피세포를 이용한 시험관내 혈관생성실험을 통해 강력한 혈관생성인자로 확인되었으며 혈관내피세포 표면에 결합하여 혈관내피세포의 증식을 촉발한다(Tian et al. 2004). 이러한 *AGGF1* 단백질의 혈관생성은 *GATA1* 단백질에 영향을 받는다고 한다. Fan 등(Fan C. et al. 2009)은 siRNA를 이용하여 *GATA1*의 표현을 knockdown한 결과 *AGGF1* 표현도 감소하였고 혈관내피세포의 apoptosis와 내피세포의 모세혈관 생성 및 내피세포의 이동을 억제하였으며 인간 *AGGF1* 단백질을 투여하여 회복시켰다고 한다.

혈관 장애의 병인과 관련된 여러 유전 인자가 보고되고 있다. 이러한 유전 인자로는 Klippel-Trenaunay 증후군의 *AGGF1* 유전자 변이, 모세혈관 기형에서 관찰되는 *RASA1* 유전자 변이, 뇌해면정맥 기형에서 관찰되는

*KRIT1*, *MGC4607*, *PDCD10* 유전자 변이, 사구정맥기형에서 관찰되는 *GLMN* 유전자 변이, 다발성 피부 및 점막 정맥 기형에서 관찰되는 *TIE2* 유전자 변이, 림프부종에서 관찰되는 *VEGFR3*, *FOXC2*, *NEMO*, *SOX18* 유전자 변이, 유전출혈모세혈관확장증에서 관찰되는 *ENG*, *ACVRLK1*, *MADH4* 유전자 변이, Coats 질환에서 관찰되는 *NDP* 유전자 변이, 대뇌 상염색체 우성 동맥병증에서 관찰되는 *NOTCH3* 그리고 Proteus 증후군에서 관찰되는 *PTEN* 유전 변이 등이 알려져 있다 (Wang QK. 2005).

Klippel-Trenaunay 증후군(MIM #149000;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=149000>)은 피부 혈관종, 정맥류, 그리고 사지의 골과 연부조직의 편측비대와 같은 세가지 특징적인 소견을 보이는 질환으로, 1900년에 Klippel과 Trenaunay가 24세 남자 환자에서 Naevus Variqueux Osteohypertrophique란 이름으로 처음 기술하였다(Klippel M et al. 1900; Jang HS et al. 2006). Klippel-Trenaunay 증후군 환자중 동정맥기형으로 인한 피부에 자주빛의 커다란 모반을 동반하는 경우 Klippel-Trenaunay-Weber 증후군으로 분류되며(Meine JG et al. 1997) 혈관종은 Klippel-Trenaunay 증후군에서 가장 흔하게 관찰되는 질환으로 하지 피부에서부터 근육과 뼈까지 다양한 깊이를 가진 병변이 발생하지만 흉막, 비장, 간, 방광, 직장에도 생길 수 있다(Lee YK et al. 2003).

Klippel-Trenaunay 증후군의 진단 기준은 아직 명확하지 않으나 역사적으로 임상 양상이나 혈류역학적 특성, 생물학적 특성을 기준으로 분류하고 진단내리고자 하였다(Oduber CE et al. 2008). Klippel-Trenaunay 증후군 환자에서 사지의 비후는 1939년 Freund (Freund E, 1939)에 의해 첫 보고된 이후 1964년 Malan과 Puglionisi (Malan A et al, 1964)는 이환된 정맥의 양상에 따라 선천성 혈관형성이상(congenital angiodyplasia)를 4가지 범주로 분류하였다. 이 범주는 Klippel-Trenaunay 증후군의 치료 방향과 예후를 결정하는데 도움을 주었으나 모든 정맥 변형을 4가지로 분류하는 데는 어려움이 있었다(Lindenauer SM. 1965; Oduber CE et al. 2008). Jacob AG 등 (Jacob AG et al. 1998)은 252명의 Klippel-Trenaunay 증후군 환자의 기술표를 바탕으로 다음 세 가지 특성 중 2개만 있으면 Klippel-Trenaunay 증후군

으로 진단내릴 수 있다고 하였다. 첫째, 모세혈관기형은 자주 바깥쪽으로 국한되며 이환된 사지의 전체로 퍼지는 것이 반드시 필요하지 않으며 비후된 사지외의 다른 부위에서도 병변이 발견될 수 있다. 둘째, 연조직 또는 골조직의 비후가 관찰된다. 셋째, 정맥류 또는 정맥 기형은 종종 지속적으로 외측 태생기 정맥을 가진다. Oduber (Oduber CE et al. 2008)등은 Mulliken (Boyd JB et al. 1984), Jacob (Jacob AG et al. 1998), Cohen (Cohen MM Jr. Klippel-Trenaunay syndrome. Am J Med Genet. 2000;93:171-5) 등의 보고를 바탕으로 Klippel-Trenaunay 증후군의 진단 기준을 제시하였다. 이 진단 기준에 의하면 Klippel-Trenaunay 증후군은 두 가지 주된 특성에 의해 특징지어진다. 첫째, 선천성 혈관 기형으로 자칫빛 모반을 포함하는 모세혈관 기형과 다양한 기형을 보이는 정맥 기형(정맥의 발달 부전 또는 무형성, 태생기 정맥의 존재, 정맥류, 정맥 비후, 정맥 비틀림), 동정맥기형으로 매우 작은 크기의 동정맥기형도 포함하며 어떠한 림프관 기형도 진단 기준에 들어간다. 둘째, 성장 장애로 골성장 장애와 연조직 성장 장애로 구성된다. 본 연구에 참여한 Klippel-Trenaunay 증후군 환자 3명은 특징적인 Klippel-Trenaunay 증후군의 특성을 보였으며 진단검사의학적으로 특별한 이상소견은 관찰되지 않았다.

Klippel-Trenaunay 증후군의 발생빈도에 대한 국내 연구는 없으나 외국 논문에 따르면 문헌에 따라 차이가 있으나, 남녀간의 차이는 거의 없으며 약 100,000 출생아당 1명의 빈도로 발생하는 것으로 알려져 있다 (Lorda-Sanchez I et al. 1998; Jang HS et al. 2006). Klippel-Trenaunay 증후군 환자의 부모의 유산이 증가하지는 않는다고 하며 대부분의 Klippel-Trenaunay 증후군 환자에게서 염색체 이상은 발견되지 않는다고 한다(Oduber CE et al. 2008). 그러나, 염색체 5번과 11번의 상호전좌(Whelan AJ et al. 1995)와 염색체 8번과 14번을 포함한 균형전좌(Wang Q et al. 2001) 그리고 환염색체 18번 (Timur AA et al. 2004) 등이 보고되었다 (Oduber CE et al. 2008). 질환의 발생과 관련하여 드물게 가족력이 보고되기도 하지만 대부분이 가족력이 없다(Oduber CE et al. 2008). Berry 등 (Berry SA et al. 1998)은 태생기의 혈관 형성 과정에서 주로 내막세포의 이

상과 관련이 있는 것으로 추정하고 있으나 현재까지 알려진 정확한 병인은 없다(Oduber CE et al. 2008).

Tian 등 (Tian XL et al. 2004)은 t(5;11)(q13.3;q15.1) 전이를 가진 Klippel-Trenaunay 증후군 환자에게서 절단부위(breakpoint region)를 분석하여 5q13.3 절단점(break point)에 *AGGF1* 유전자의 존재를 확인하였으며 절단점은 *AGGF1* 유전자의 프로모터(promoter)에 위치하였다. 이 전이로 인해 야생형의 프로모터를 가진 *AGGF1* 유전자에 의해 표현되는 단백질 보다 3배 더 *AGGF1* 단백질 표현이 많은 것을 확인하였다. 특히, 130명의 Klippel-Trenaunay 증후군 환자 중 5명이 *AGGF1* E133K 이형접합자였으며 200명의 대조군에서는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 추가 실험을 통하여 *AGGF1* E133K 변이가 야생형에 비해 더욱 강력한 혈관생성인자로 작용한다는 것을 확인하였으며 Klippel-Trenaunay 증후군의 취약 유전자(susceptibility gene)으로 *AGGF1*을 제안하였다. 그러나 Klippel-Trenaunay 증후군은 뚜렷한 유전 양식을 보이지 않고 대부분 산발적 발생을 보이므로 *AGGF1* 유전 변이가 단독으로 Klippel-Trenaunay 증후군을 유발한다고 보기는 힘들다. 이에 Happle는 일련의 연구 보고(Happle R. 1986; Happle R. 1987; Happle R. 1993)를 통해 "second hit (이차 충격)"가설을 제안하였다. 이는 *AGGF1* 유전자의 배선 돌연변이(germline mutation)이 Klippel-Trenaunay 증후군의 발생에 중요하지만 충분하지 않고 *AGGF1* 유전자의 추가적인 유전 변이 또는 다른 유전자의 체세포 돌연변이가 추가적으로 발생하는 경우에 Klippel-Trenaunay 증후군이 발생한다는 가설이다(Wang QK. 2005).

*AGGF1* E133K를 다양한 수준에서 HUGO 돌연변이 명명법 (<http://www.hgvs.org/mutnomen>)에 따라 기술하면 유전체 DNA 수준에서 g.5218G>A (GI No. 224589817), mRNA 수준에서 r.757G>A (accession No. NM\_018046.3) 그리고 cDNA 수준에서 c.397G>A (accession No. NM\_018046.3)로 기술된다. *AGGF1* E133K 유전 변이로 인한 *AGGF1* protein 상 변화는 133번째 아미노산이 glutamic acid (E)에서 lysine (K)로 치환된다. Glutamic acid는 음전하를 띤 아미노산이고 lysine은 양전하를 띤 아미노산이므로 *AGGF1* 단백질의 구조 및 기능변화를 유발할 것이라고 예



측가능하다.

Tian 등(Tian XL et al. 2004)의 *AGGF1* 유전 변이 연구에서 200명의 정상대조군에서는 *AGGF1* E133K 유전 변이가 단 한명도 발생하지 않은 반면 Klippel-Trenaunay 증후군 환자 130명 중 5명(3.8%)에서 *AGGF1* E133K 유전 변이가 관찰되어 *AGGF1* E133K 유전 변이가 Klippel-Trenaunay 증후군을 일으키는 취약 유전 인자(susceptible genetic factor)로 보고하였다. 또한 이는 정상대조군에서 1% 이하로 변이가 관찰되어 돌연변이로 규정 지워졌으며 일련의 *in vitro* 및 *ex vivo* 연구를 통하여 *AGGF1* E133K 유전변이가 *AGGF1* 단백질의 기능변화를 초래한다는 사실을 확인하였다. 하지만 이후 시행된 다른 연구 그룹의 결과는 Tian 등의 연구결과와 다른 보고가 나오고 있다(Barker KT et al. 2006; Gutierrez S et al. 2006). Barker 등(Barker KT et al. 2006)은 *AGGF1* E133K에 대한 연구를 진행하여 이 이형접합이 275명의 건강한 대조군에서 9명(3.3%)가 발견되었다고 하였으며 비대칭성 과증식 증후군(asymmetric overgrowth syndrome) 환자 24명 중 1명이 *AGGF1* E133K 변이를 보였지만 Klippel-Trenaunay 증후군 환자에게는 발견되지 않았다고 한다. 따라서, Barker 등은 *AGGF1* E133K는 돌연변이가 아닌 단염기다형성(single nucleotide polymorphism)이며 Klippel-Trenaunay 증후군을 유발하지 않을 것이라고 결론지었다. Gutierrez 등(Gutierrez S et al. 2006)의 연구에 따르면 *AGGF1* E133K는 768명의 스페인 대조군에서 17명(2.2%), 비대칭성 과증식 증후군 환자 또는 환자의 부모 223명 중에서 3명(1.3%)이 발견되었으나 Klippel-Trenaunay 증후군 환자에서는 발견되지 않았다고 하여 Barker 등(Barker KT et al. 2006)의 결론과 동일하게 *AGGF1* E133K는 단염기다형성이라고 결론내렸다 (Table 2). 한국인에서 *AGGF1* E133K는 기존 서양인을 대상으로 한 연구와는 다르게 발생 빈도(0.11%)가 매우 낮았다. 이는 민족 간의 차이를 시사하는 소견으로 사료되었다. 발생 빈도만 보면 한국인에서 *AGGF1* E133K 유전 변이는 돌연변이로 생각되지만 *AGGF1* E133K 유전 변이를 소유한 대조자에서 혈관 기형을 확인하지 못하여 한국인에서 *AGGF1* E133K가 기능적으로도 돌연변이이며 Klippel-Trenaunay 증후군과 관련있는지는 추가 후속연구를 통해 밝혀져야

될 것으로 사료된다.

결론으로 한국인에서 *AGGF1* E133K는 매우 드문 유전 변이이다. 그러나 본 연구로는 *AGGF1* E133K 유전 변이가 돌연변이인지 그리고 Klippel-Trenaunay 증후군에 대한 취약 유전 변이인지는 알 수 없다. 이 연구는 한국인을 대상으로 한 *AGGF1* E133K에 대한 첫 보고이다.

**Table 1. The primer sequences for PCR, sequencing and mutagenesis**

Name	Sequence (5'-3')
AGGF1IntF	GAGACATTAGAATCAAAGATACAC
AGGF1ComR	GTTCTTGGGCATCAACAG
AGGF1MutF	ATCAACAAGATCAAGCTAACA
AGGF1muF	AAAACCTTCTATTTTGAATTCTAAA
AGGF1muR	GATAGCTTGATCTTGTTGATCC
M13F	CAGGAAACAGCTATGAC
M13R	GTAAAACGACGGCCAG

**Table 2. Frequency of *AGGF1* E133K genetic variation in previously reported studies and in this study**

References	Nation	Frequency of <i>AGGF1</i> E133K	
		Control group	Patient group*
Tian XL et al. 2004	not mentioned	0/200 (0.0%)	5/130 (3.8%)
Barker KT et al. 2006	England, USA, Canada	9/275 (3.3%)	1 <sup>†</sup> /24 (4.2%)
Gutierrez S et al. 2006	Spain	17/768 (2.2%)	3/223 (1.3%)
In this study	Korea	1/950 (0.1%)	0/8 (0.0%)

\*Patient group include patients and their relatives with Klippel-Trenaunay syndrome and other asymmetric overgrowth syndrome in some articles

<sup>†</sup>One patient is not a Klippel-Trenaunay syndrome but overgrowth syndrome patients

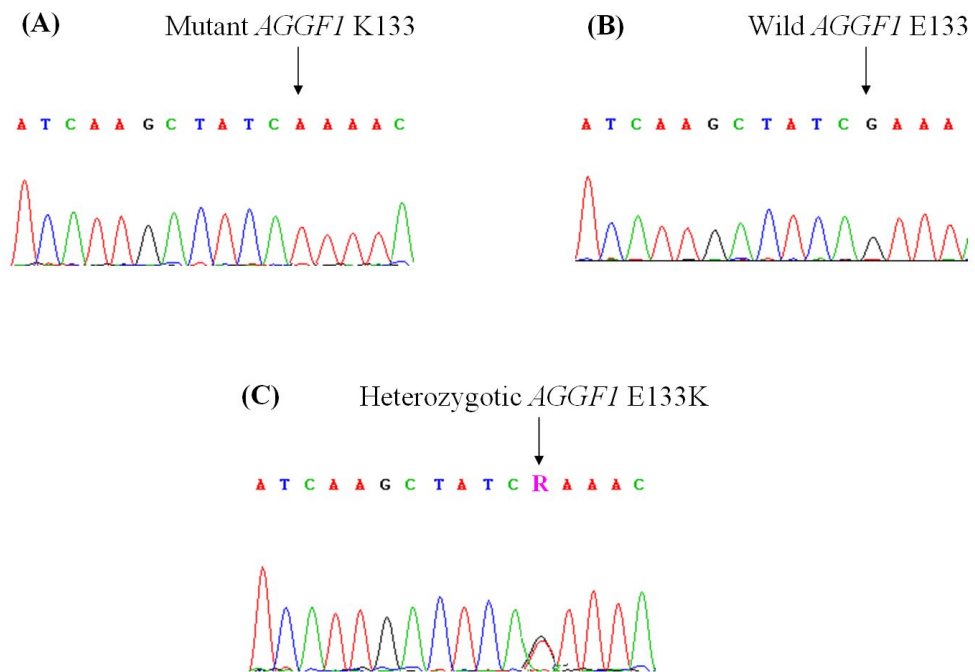


Fig. 1. Sequencing results of *AGGF1* c.397 nucleotide from (A) homozygotic *AGGF1* K133 DNA by site-directed mutagenesis, (B) homozygotic *AGGF1* E133 wild DNA and (C) heterozygotic *AGGF1* E133K DNA from healthy control.

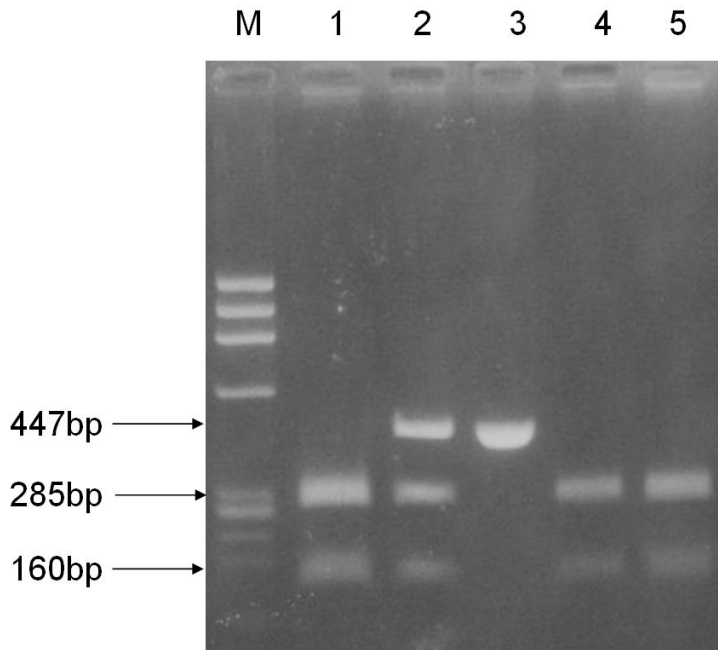


Fig. 2. Analysis of a single nucleotide variation at c.397 in the *AGGF1* gene. Three DNA fragments are shown after digestion with *TaqI*: lane M,  $\phi$ X174/*HindIII* DNA size marker (TaKaRa, Siga, Japan); lane 1, wild homozygotic *AGGF1* E133 confirmed by direct sequencing; lane 2, heterozygotic *AGGF1* E133K confirmed by direct sequencing; lane 3, variant homozygotic *AGGF1* K133 by site-directed mutagenesis; lane 4, wild homozygotic *AGGF1* E133; lane 5, wild homozygotic *AGGF1* E133.



Fig. 3. Design of primers for detection of *AGGF1* E133K variation by allele-specific PCR (AS-PCR) assay.

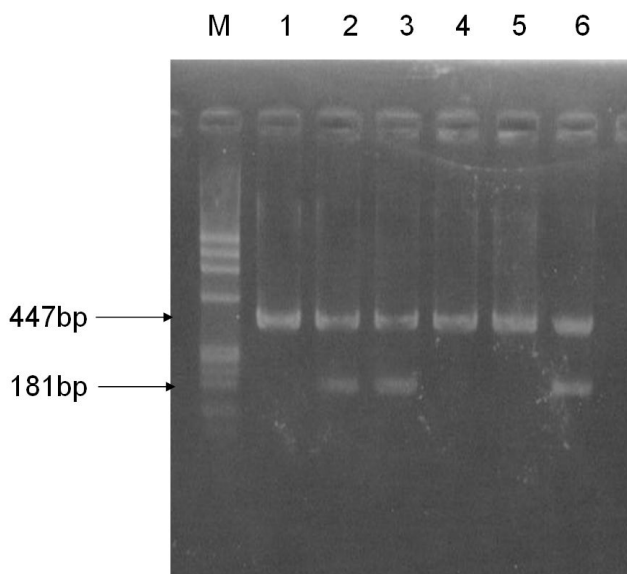


Fig. 4. Electrophoresis of the allele-specific PCR assay (ASP). Three PCR product are shown: lane M,  $\phi$ X174/HindIII DNA size marker (TaKaRa, Siga, Japan); lane 1, wild homozygotic *AGGF1* E133 confirmed by direct sequencing; lane 2, heterozygotic *AGGF1* E133K confirmed by direct sequencing; lane 3, variant homozygotic *AGGF1* K133 by site-directed mutagenesis; lane 4, wild homozygotic *AGGF1* E133; lane 5, wild homozygotic *AGGF1* E133l; lane 6, variant *AGGF1* E133K from healthy control.



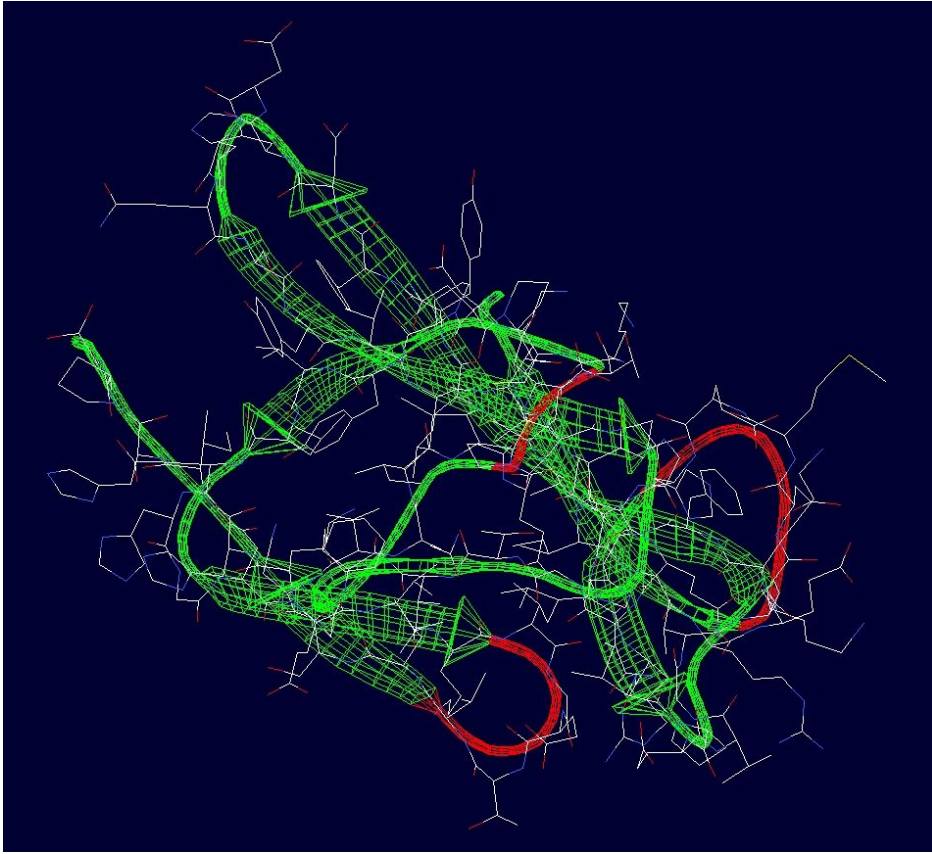


Fig. 5. 3D protein modeling of AGGF1 E133 illustrated by SWISS-MODEL Repository.

## References

Akkawi M, Abbasi I, Hochberg A, Gofrit ON, Dweik H, Matouk IJ. The human VG5Q gene transcript is over expressed in colorectal and bladder carcinomas. *Gene Ther Mol Bol.* 2006;10:173-8.

Barker KT, Foulkes WD, Schwartz CE, Labadie C, Monsell F, Houlston RS, Harper J. Is the E133K allele of VG5Q associated with Klippel-Trenaunay and other overgrowth syndromes? *J Med Genet* 2006;43:613-4.

Berry SA, Peterson C, Mize W, Bloom K, Zachary C, Blasco P, Hunter D. Klippel-Trenaunay Syndrome. *Am J Med Genet* 1998;79(4):319-26.

Boyd JB, Mulliken JB, Kaban LB, et al. Skeletal changes associated with vascular malformations. *Plast Reconstr Surg.* 1984;74:789-97.

Ceballos-Quintal JM, Pinto-Escalante D, Castillo-Zapata I. A New Case of Klippel-Trenaunay-Weber Syndrome: Evidence of Autosomal Dominant Inheritance. *Am J Med Genet.* 1996;63:426-7.

Cheon SH, Lee SH, Park EB. Rectal involvement of Klippel-Trenaunay syndrome. *J Korean Soc Coloproctol.* 2009;25:52-5.

Cohen MM Jr. Klippel-Trenaunay syndrome. *Am J Med Genet.*

2000;93:171-5.

Freund E. Diffuse genuine phlebectasia. Arch Surg. 1939;60:113-21

Gutierrez S, Magano L, Delicado A, Mori MA, de Torres ML, Fernández L et al. The G397A (E133K) change in the *AGGF1* (*VG5Q*) gene is a single nucleotide polymorphism in the Spanish population. Am J Med Genet A. 2006;140(24):2832-3.

Happle R. Cutaneous manifestation of lethal genes. Hum Genet. 1986;72:280.

Happle R. Lethal genes surviving by mosaicism: a possible explanation for sporadic birth defects involving the skin. J Am Acad Dermatol. 1987;16:899 - 906.

Happle R. Klippel-Trenaunay syndrome: is it a paradominant trait? Br J Dermatol. 1993;128:465 - 466.

Jang HS, Lee SY, Lee YJ. A case of Klippel-Trenaunay-Weber syndrome with facial hemihypertrophy and hemimegalencephaly J Korean Child Neurol Soc 2006;14(1)169-74.

Jeun KH, Kim YP. A case report of Klippel-Trenaunay-Parkes Weber syndrom. Ann Dermatol. 1971;9:15-22.

Kim JH, Kim CW, Son DK, Chung BW, Yang SE, Kim JL, Kim JK, Chung IS. A case of Klippel-Trenaunay-Weber syndrome presenting with esophageal and gastric varices bleeding. Korean J Gastroenterol. 2004;43:137-41.

Kim JY, Lee JB, Lee SC, Won YH. A case of Klippel-Trenaunay syndrome with lymphangioma circumscriptum. Korean J Dermatol. 2000;38(11):1522-6

Kim MY, Lee SY, Kim NY, Lee SJ, Kim WD, Cho SM, Lee DS, Kim DK, Choi SM. A case of Klippel-Trenaunay syndrome combined with Sturge-Weber syndrome. J Korean Pediatr Soc. 2003;46:909-12

Klippel M, Trenaunay P. Du Naevus Variqueux Osteohypertrophique. Arch Gen Med 1900;77:641-72.

Lee YK, Kim JK, Cho KS. Bladder Hemangioma Associated with Klippel-Trenaunay Syndrome: Case Report. J Korean Radiol Soc. 2003;48:271-4.

Lindenauer SM. Congenital arteriovenous fistula and the Klippel-Trenaunay syndrome. *Ann Surg.* 1971;174:248-63.

Lorda-Sanchez I, Prieto L, Rodriguez-Pinilla E, Martinez-Frias ML. Increased parental age and number of pregnancies in Klippel-Trenaunay-Weber syndrome. *Ann Hum Genet* 1998;62:235-9.

Malan A, Puglionisi A. Congenital angiodyplasias of the extremities: generalities and classification, venous dysplasias. *J Cardiovasc Surg.* 1964;5:87-130.

Meine JG, Schwartz RA, Janniger CK. Klippel-Trenaunay-Weber Syndrome. *Cutis* 1997;60:127-32.

Oduber CE, van der Horst CM, Hennekam RC. Klippel-Trenaunay Syndrome Diagnostic Criteria and Hypothesis on Etiology. *Ann Plast Surg* 2008;60:217-23.

Wang QK. Update on the molecular genetics of vascular anomalies. *Lymphat Res Biol.* 2005;3:226-33.

Tian XL, Kadaba R, You SA, Liu M, Timur AA, Yang L, et al. Identification of an angiogenic factor that when mutated causes susceptibility to Klippel-Trenaunay syndrome. *Nature* 2004;427:640-5.

Timur AA, Driscoll DJ, Wang Q. Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:1434-7

Timur AA, Sadgephour A, Graf M, et al. Identification and molecular characterization of a de novo supernumerary ring chromosome 18 in a patient with Klippel-Trenaunay syndrome. *Ann Hum Genet.* 2004;68:353-61.

Wang Q, Timur AA, Szafranski P, et al. Identification and molecular characterization of de novo translocation t(8;14)(q22.3;q13) associated with a vascular and tissue overgrowth syndrome. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;95:183-8.

Whelan AJ, Watson MS, Porter FD, Steiner RD. Klippel-Trenaunay-Weber syndrome associated with a 5:11 balanced translocation. *Am J Med Genet.* 1995;59:492-4.

국문 초록  
한국인의 *AGGF1*E133K 유전변이 연구

Sung Hyun Lee

Advisor: Prof. Dae Soo Moon MD, Ph.D

Department of medicine

Graduate school of chosun University

배경: *AGGF1* 유전자는 강력한 혈관생성인자에 대한 정보를 담고 있는데 *AGGF1* E133K 염기 변이가 Klippel-Trenaunay 증후군 의 유전적 취약 인자로 대두되고 있다. 그러나, 한국인을 대상으로 *AGGF1* E133K 염기다형성의 빈도와 임상적 의의에 대해서 알려지지 않았다. 이에 저자는 한국인을 대상으로 *AGGF1* E133K 염기다형서의 빈도와 임상적 의의를 연구하고자 하였다.

대상 및 방법: 건강검진을 목적으로 내원한 정상인 950명과 Klippel-Trenaunay 증후군으로 진단된 3명과 각 가족구성원 5명을 대상으로 하였으며 *AGGF1* E133K 다형성 검출하기 위해 대립유전자특이중합효소연쇄반응법(AS-PCR)을 이용하였으며 검사의 적절성을 확인하기 위해 950명 중 200명에 대해 제한효소절편길이다형성(RFLP) 기법 그리고 추가로 직접염기서열분석법(direct sequencing)을 이용하였다.

결과: 950명의 정상 대조군에서 *AGGF1* E133K 유전 변이는 1명 (0.01%) 발견되었으며 *AGGF1* E133K 이형접합자를 가진 정상 대조자에서 Klippel-Trenaunay 증후군을 의심할 소견은 관찰되지 않았다. 또한 3명의 Klippel-Trenaunay 증후군 환자와 그들의 가족 구성원 모두 *AGGF1* E133 동형접합자로서 야생형이었다. 201개의 검체에 대해 실시한 AS-PCR 검사결과와 RFLP 검사결과는 일치하였다.

결론: 한국인에서 *AGGF1* E133K는 매우 드문 유전 변이이다. 그러나 본 연구로는 *AGGF1* E133K 유전 변이가 돌연변이인지 그리고 Klippel-Trenaunay 증후군을 유발하는지는 알 수 없다. 이 연구는 한국인을 대상으로 한 *AGGF1* E133K에 대한 첫 보고이다.



## 감 사 의 글

논문이 나오도록 이끌어주신 지도교수님 문대수교수님께 감사드립니다. 또한, 이 논문에서 실시한 실험에 대해 많은 조언을 해 주신 박건 교수님께 또한 감사드립니다. 본 논문 심사를 해주신 박영진 교수님, 장숙진 교수님, 신명근 교수님께도 감사드립니다. 오늘의 저 자신이 있기까지는 키워주시고 지켜주신 부모님과 항상 옆에서 지지와 격려를 잊지 않던 아내에게 이 논문의 영광을 돌립니다. 이 논문이 나오도록 도와주신 모든 분들께 감사드립니다.

학위논문을 마무리 지으면서

2009. 12. 24

## 저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20057455	과 정	박사
성 명	한글: 이성현      한문 : 李 成 賢      영문 : Lee, Sung Hyun				
주 소	광주 북구 임동 한국아텔리움 205동 806호				
연락처	E-MAIL : <a href="mailto:cup0024@hanmail.net">cup0024@hanmail.net</a>				
논문제목	한글: 한국인의 <i>AGGF1</i> E133K 유전 변이 연구 영어: Study of <i>AGGF1</i> E133K Genetic Variation in the Korean Population				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의( ○ )    반대(    )

2010년            2 월

저작자:            이 성 현            (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**