



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](#)

석사학위논문

한국 베들링턴 테리어에서
COMMD1 유전자의 exon 2
결손변이 발생빈도 및 임상적 의의

제주대학교 대학원

수의학과

김 윤 기

2013년 7월

한국 베들링턴 테리어에서
COMMD1 유전자의 exon 2
결손변이 발생빈도 및 임상적 의의


지도교수 윤 영 민


김 윤 기


이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 7월

김윤기의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 경갑  (印)

위 원 김 래준  (印)

위 원 윤 영민  (印)

제주대학교 대학원

2013년 7월

초 록

한국 베들링턴 테리어에서 *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이 발생빈도 및 임상적 의의

김 윤 기

(지도교수 : 윤영민)

제주대학교 대학원

수의학과

개의 10번 염색체에 존재하는 *Copper metabolism domain containing 1* (*COMMD1*) 유전자는 체내 구리 대사를 조절하는 COMMD1 단백질을 합성한다. *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이는 단백질의 결핍을 유발하여 베들링턴 테리어 견종에서 구리 중독증을 일으킨다.

본 연구에서는 국내 베들링턴 테리어 105두(수컷 50두, 암컷 55두)의 혈액 시료를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 분자생물학적 진단을 위해 다중 증폭효소 연쇄반응법(multiplex PCR)을 이용하여 *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이의 발생빈도를 조사하였다. 각 유전자형에 따라 혈액 및 혈청화학 검사 결과를 비교분석하고, 검사 개체의 건강상태 등을 지속적으로 모니터링 하면서 변이유전자 동형접합자 군의 생존율을 평가하였다.

베들링턴 테리어 105두에서, 정상유전자 동형접합자가 52두(49.5%), 이형접합자가 47두(44.8%), 변이유전자 동형접합자가 6두(5.7%)로 확인되었다. 혈청검사에서, 2세 이상의 변이유전자 동형접합자 군의 혈중 ALT 활성도가 유의성 있게 증가함을 확인하였다($p < 0.05$). 변이유전자 동형접합자 군의 2.5년 이상, 4년 이상 생존율은 각각 60%, 20%였다.

국내 베들링턴 테리어의 *COMMD1* 유전자 exon 2 결손변이 발생빈도 및 임상

적 의의를 조사한 본 연구는, 변이 유전자의 국내 확산을 줄이고 구리 중독증의 질병 진행에 대한 이해를 넓히기 위한 기초 자료로서 의의가 있다.

주요어: *COMMD1*, 구리 중독증, 다중 중합효소 연쇄반응법 (multiplex PCR), 베들링턴 테리어, 생존율

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	3	
III. 결	과	9
IV. 고	찰	16
V. 결	론	20
VI. 참 고 문 헌	21	
영 문 초 록	26	

I. 서 론

개의 10번 염색체에 존재하는 *Copper metabolism domain containing 1* (COMMD1)은 체내 나트륨 수송 및 구리 대사 조절에 관여하는 COMMD1 단백질을 합성하는 유전자이다(2, 21, 32). COMMD1 유전자의 exon 2 결손변이는 COMMD1 단백질의 완전 결핍을 유발하여 베들링턴 테리어(Bedlington terrier) 견종에서 상염색체 열성 유전질환(autosomal recessive disorder)인 구리 중독증을 유발한다(21, 41). 구리는 생체에 필수적인 미량 원소로서 과산화물제거효소(superoxide dismutase), 시토크롬 C 산화효소(cytochrome C oxidase) 등의 작용에 보조인자로 작용한다(39, 40). 그러나 필요 이상의 구리가 체내에 축적되면 Haber Weiss 반응을 통해 유리기(free radical)를 형성하여 세포독성을 나타낸다(3, 27). 유리기는 핵산의 분열을 유발하고 세포의 지질 및 단백질에 산화적 손상을 입힌다. 척추동물에서 간은 구리의 저장 장소인 동시에 생리적 배설을 조절하는 기관으로, 체내 구리의 항상성 유지에 핵심적인 역할을 한다(23). 소화기관에서 간으로 수송된 구리는 간세포에 저장되며, 필요 이상의 구리는 담즙을 통해서 배설된다.

베들링턴 테리어 견종의 구리 중독증은 1975년 미국에서 Hardy 등에 의해 처음으로 보고되었다(10). 구리 중독증에 이환된 개체는 담즙을 통한 구리 배설이 억제되어 간 내 구리농도가 상승하게 된다(33). 구리는 주로 소엽중심(centrilobular) 및 중간대(midzone)의 간세포 용해소체(lysosome) 내에 축적된다(24, 26). 구리 중독증에 따른 임상 증상의 발현은 대체로 비특이적이며, 그 발현 정도는 간 내 구리 축적 정도에 따라 다르다(34). 임상 증상은 개체의 나이 및 병리학적 변화의 진행 정도에 따라 크게 3군으로 분류할 수 있다(8, 15). 제 1군은 2년령 이하의 어린 개체들로 임상 증상을 나타내지 않으며, 혈청 생화학적 검사 시 정상적인 범위에 속하는 군이다. 제 2군은 2년령에서 중년령 사이의 개체로서, 황달, 간 종대, 용혈성 빈혈 등의 비특이적 증상이 급성적으로 나타나는 군이다. 제 3군은 중년령 이상의 개체로서 만성적이고 점진적인 증상의 악

화를 보이는 군이다.

구리 중독증에 이환된 개체의 일반 혈액검사에서는 특이적인 변화를 나타내지 않으나, 경미한 정도의 빈혈, 용혈, 응고 장애 등이 관찰될 수 있다(10, 14). 혈청 생화학적 검사에서, 간과 관련된 항목들이 비정상적 소견을 나타낼 수 있으나 그 정도는 질병의 진행 상태에 따라 다르다. 선행 연구에 따르면 혈중 alanine transaminase (ALT)의 활성도는 다른 검사 항목들과 비교하였을 때, 구리 중독증의 진단에 도움이 되는 것으로 보고되어 있다(8). 용혈성 빈혈 증상을 나타내는 이환 개체에서는 고빌리루빈혈증 및 빌리루빈뇨증이 나타날 수 있다(43). 구리 중독증에 이환된 개체의 간 내 구리농도는 간 생검을 통해 측정할 수 있으며, 간의 구리농도가 2,000 $\mu\text{g/g}$ 이하인 경우 특별한 임상증상을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다(39). 간의 구리농도 측정법은 구리 중독증의 진단법으로 오랜 기간 임상분야에서 이용되어 왔으나 연령이 어린 개체에서는 정확한 판정을 할 수 없다는 단점이 있다(31). 이에 Forman 등은 2005년 *COMMD1* 유전자의 exon 2를 포함하는 결손 부위의 크기가 39.7 kb임을 밝혀내어, 이를 직접 진단하여 베들링턴 테리어의 유전자형을 정확히 판정할 수 있는 검사법을 제시하였다(6). 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)법을 이용한 유전자 검사는 미국, 호주 및 유럽에서 활발히 이루어지고 있으나(6, 22, 31), 아직까지 한국, 일본을 포함한 아시아 지역에서 베들링턴 테리어를 대상으로 한 유전자 검사 결과에 대한 보고는 없는 실정이다.

본 연구에서는 국내 베들링턴 테리어를 대상으로 *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이의 발생빈도를 조사하였다. 또한 혈액, 혈청화학 검사 및 유전자 검사 결과를 비교분석하고, 변이유전자 동형접합자 개체의 생존율 평가를 통해 구리 중독증에 대한 임상적 의의에 대해 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상동물 및 시료

국내에서 사육되고 있는 베들링턴 테리어 105마리의 혈액 시료(Table 1)를 켄넬 클럽 및 동호회를 통하여 확보하였으며, 보호자로부터 개체의 기본 정보, 가계도 내역, 병력, 임상증상 등의 정보를 수집하였다. 항응고 처리된 전혈 시료 중 0.5 ml을 분주하여 즉시 DNA를 추출하였고, 남은 시료는 향후 추가적 검사를 위해서 -70°C 냉동 보관하였다. 일부 용혈 및 변성되지 않은 혈액에 대해서는 혈청 분리하여 생화학적 검사에 사용하였다.

Table 1. Informations for Bedlington terrier samples used in this study

Total (Heads)	Sex		Age		
	Male	Female	<2years	≥ 2 years, <6years	>6years
105	50	55	74	28	3

2. DNA 추출

Genomic DNA (gDNA)는 EDTA-3K로 항응고 처리한 0.5 ml의 전혈로부터 G-DEX IIb[®] blood DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 추출하였다. 각 DNA 시료는 NanoVue[®] 분광광도계(GE healthcare bioscience, UK)를 이용하여 최종 농도가 100 ng/ μ l 가 되도록 조정하였다.

3. *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이 확인

COMMD1 유전자의 exon 2 결손변이를 확인하기 위해 TP600[®] 유전자 증폭기(Takara Bio Inc., Japan)를 이용하여 다중 중합효소 연쇄반응(multiplex PCR)을 실시하였고, PCR 산물은 1.5% 아가로즈젤에 전기영동하여 확인하였다. PCR에 사용된 primer set (Table 2) 및 반응 조건(Table 3)은 Forman 등 (6)의 방법에 준하여 실험을 실시하였다.

Table 2. Lists of primer pairs for multiplex PCR

Primer	Sequences (5'→3')	Product size (bp)	PCR target
COMMDP3F	GAGCCCCACGAAACAGACTA	500	Normal DNA detection
COMMDP3R	TGGTCCACATCTTCCAATCA		
.....			
COMMDP1F	CCTGCTTATGGTCTTTCCTTTG	250	Affected DNA detection
COMMDP1R	GTACAACAAAGGGATCCCTG		

Table 3. Multiplex PCR conditions for the diagnosis of exon 2 deletion in *COMMD1* gene

Primer pairs		Temp.	Time	Cycles
	Initial denaturation	94°C	5 mins	
COMMDP3F-3R	Denaturation	94°C	45 secs	
	Annealing	56°C	30 secs	35
COMMDP1F-1R	Extension	72°C	30 secs	
	Final extension	72°C	5 mins	

4. 혈액 및 혈청화학 검사

유전자 검사 의뢰된 혈액 시료 중, 응고, 용혈 및 변성이 일어나지 않고 검사 가능한 시료 46개에 대하여 혈액 및 혈청화학 검사를 실시하였다. 일반혈액검사(CBC)는 EDTA-3K로 항응고 처리한 전혈 시료로 Hematology Analyzer[®] (NIHON KODEN corp., Japan)를 이용하였다. 간 기능과 관련된 혈청 생화학 적 검사는 VET SCAN[®] (ABAXIS, USA)을 이용하여 alkaline phosphatase (ALP), ALT, gamma glutamyl transpeptidase (GGT) 활성도, total bilirubin (Tbil)과 total protein (TP) 농도를 측정하였다. 혈액 및 혈청검사 결과는 유전자 검사 결과에 따라 3개의 군으로 나누어 비교분석 하였다. 이형접합 자군과 변이유전자 동형접합자군은 Hardy가 제시한 임상증상의 발현에 따른 분류법(8)에 의거하여 2년령을 기준으로 2개의 군으로 세분하였다.

5. 클로닝(cloning)과 염기서열분석

COMMD1 유전자형의 염기서열 분석을 위하여 PCR 산물을 2% 아가로즈젤에 전기영동 한 후 MEGA-Bead[®] gel extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 gel elution하고 이것을 pCR[®]2.1-TOPO vector (Invitrogen, USA) (Fig 1)에 클로닝 하였다. PCR 산물이 삽입된 vector를 *E. coli* (DH-5 α)에 형질전환(tranformation)하고, 삽입이 확인된 *E. coli*에 대해서는 ampicillin 함유 LB 배지(broth)에 배양(37°C, overnight)하였다. 배양된 *E. coli*를 원심분리하고 pellet을 QIAGEN[®] Plasmid mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 플라스미드를 추출하고 염기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

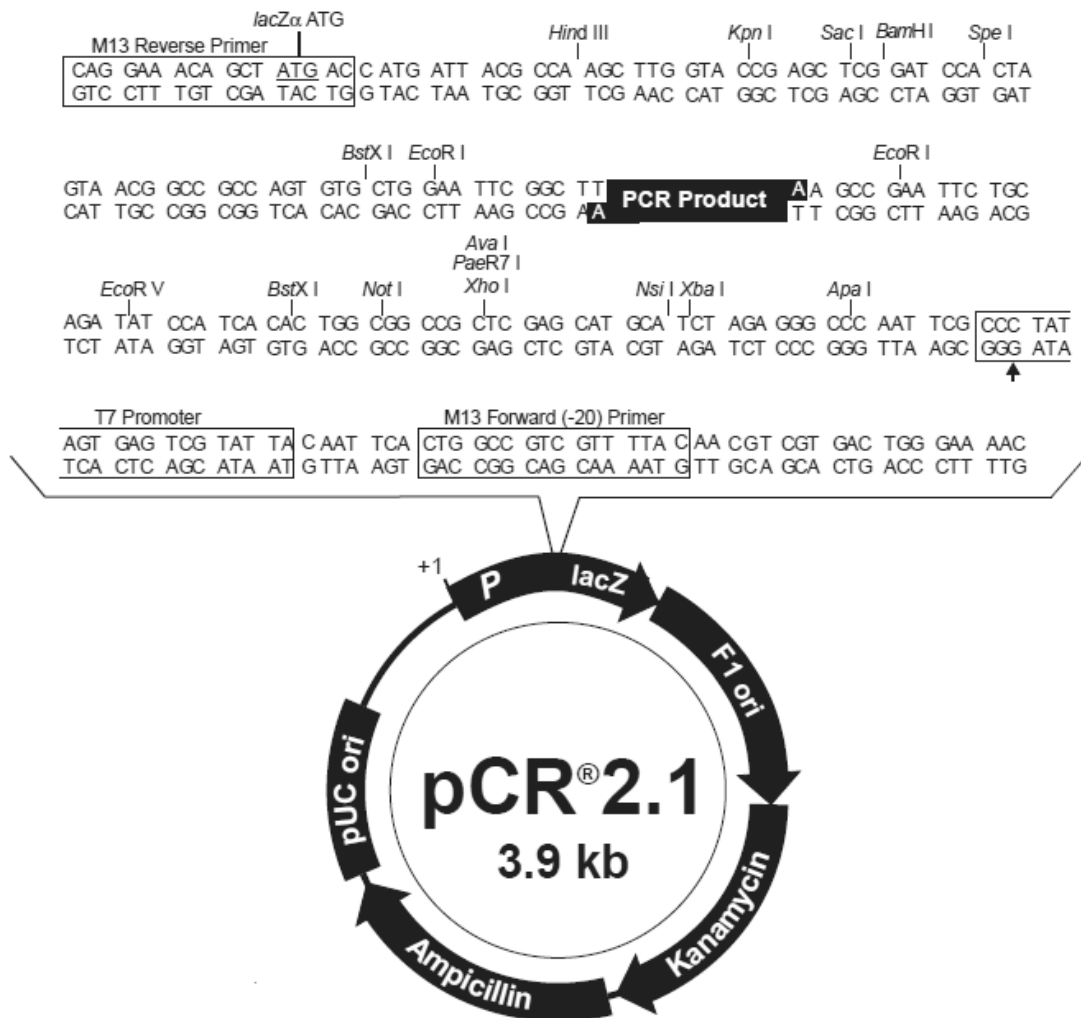


Figure 1. Genetic map of pCR[®]2.1-TOPO vector (Invitrogen, USA) with total vector size of 3.9 kb.

6. 생존율 평가 및 가계도 작성

유전자 검사를 통해 변이유전자 동형접합자로 진단된 개체에 대하여 지속적인 모니터링을 통해 구리 중독증과 관련된 임상증상의 발현 및 건강상태를 등을 확인하였다. 폐사가 확인된 개체에 대하여는, 폐사 직전 동물병원에 내원할 당시 보호자의 주호소 및 1차적 진단에 대한 정보를 수집하고, Kaplan-Meier의 방법(20)을 통하여 생존율을 평가하였다. 또한 수집된 개체 중 부모견 및 자견이 확보된 2개 집단에 대하여 유전자 검사 결과를 토대로 가계도를 작성하였다.

7. 통계처리

각 군의 혈액 및 혈청화학 검사 결과를 비교분석하기 위해 SPSS 통계프로그램 (ver 19.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며, 검사 항목별로 평균과 표준편차를 계산하여 나타내었다. 각 결과는 ANOVA 분석을 통해 통계적 유의성을 검증하였다($p < 0.05$).

Ⅲ. 결 과

1. *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이

COMMD1 유전자의 exon 2 결손변이를 확인하기 위해 PCR을 실시하여, 정상 유전자 동형접합자에서 500 bp 위치에, 이형접합자에서는 500 bp와 250 bp 위치에, 변이유전자 동형접합자에서 250 bp 위치에 특이 밴드를 확인하였다 (Figure 2). 국내 베들링턴 테리어 105마리에서 정상유전자 동형접합자가 52마리(49.5%), 이형접합자가 47마리(44.8%), 변이유전자 동형접합자가 6마리(5.7%)로 확인되었다(Table 4). 각 유전자군의 암수 성비 및 검사의뢰 당시의 평균 나이를 비교한 결과, 정상유전자 동형접합자 군에서는 수컷이, 이형접합자 군에서는 암컷이 더 많았다. 전체 개체군이 검사 의뢰된 시점의 평균 나이는 1.4 년령이었다(Table 5).

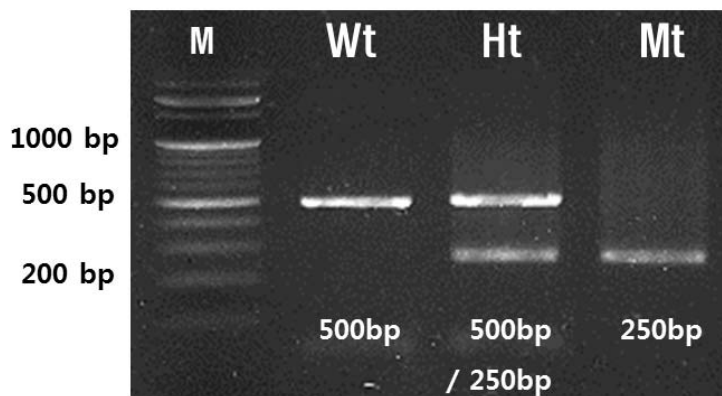


Figure 2. Results of multiplex PCR for wild type homozygote (Wt), heterozygote (Ht), mutant type homozygote (Mt). The normal fragment is 500 bp and affected fragment is 250 bp. Lane M: 100 bp ladder marker

Table 4. Prevalence of the exon 2 deletion of *COMMD1* for Bedlington terriers in Korea

Gene type	Heads (%)
Wild type homozygote (<i>COMMD1</i> +/+)	52 (49.5%)
Heterozygote (<i>COMMD1</i> +/-)	47 (44.8%)
Mutant type homozygote (<i>COMMD1</i> -/-)	6 (5.7%)
Total	105 (100%)

Table 5. Sex and age distribution of examined Bedlington terriers according to the results of genetic analysis

Gene type	Sex (heads)		Age (years, mean ± SD)
	Male	Female	
Wild type homozygote (<i>COMMD1</i> +/+)	32	20	1.5 ± 1.8
Heterozygote (<i>COMMD1</i> +/-)	15	32	1.3 ± 1.4
Mutant type homozygote (<i>COMMD1</i> -/-)	3	3	1.7 ± 1.2
Total	50	55	1.4 ± 1.6

2. 혈액 및 혈청화학 검사

일반혈액검사에서, 백혈구, 적혈구 및 hematocrit 항목의 각 군간 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 6). 간 기능과 관련된 혈청화학 검사 결과, 2년령 이상의 변이유전자 동형접합자군에서 ALT 활성도의 유의적인 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. 또한 2년령 이상의 변이유전자 동형접합자군에서 ALP 활성도의 증가가 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다. 각 군의 GGT 활성도, Tbil과 TP 농도는 차이를 나타내지 않았다(Table 7.).

Table 6. The results of complete blood count for each group

(mean \pm SD)

Group	Classification	Heads (n=46)	WBC ($6-12 \times 10^3/\mu\text{l}$)	RBC ($5.5-8.5 \times 10^6/\mu\text{l}$)	HCT (37-55%)
Wild	NC*	20	7.3 \pm 1.6	7.1 \pm 0.5	49.7 \pm 6.9
Hetero	≤ 2 years	10	7.8 \pm 1.2	6.3 \pm 0.3	42.0 \pm 4.1
	> 2 years	10	6.8 \pm 1.6	7.5 \pm 0.5	53.6 \pm 0.5
Mutant	≤ 2 years	3	10.4 \pm 1.5	6.9 \pm 1.5	47.5 \pm 9.1
	> 2 years	3	10.7 \pm 5.4	7.4 \pm 0.8	48.7 \pm 8.0

Wild; Wild type homozygote, Hetero; Heterozygote, Mutant; Mutant type homozygote, NC*;not classified

Table 7. The results of serum chemistry related liver function in each group

(mean ± SD)

Group	Classification	Heads (n=46)	ALP (23–212 U/L)	ALT (10–100 U/L)	GGT (2–10 U/L)	T.Bil (0.1–0.7 mg/dl)	T.P (5.5–7.8 g/dl)
Wild	NC*	20	106.0 ± 107.8	58.3 ± 30.0	7.1 ± 1.7	0.3 ± 0.2	6.5 ± 1.0
Hetero	≤2 years	10	81.2 ± 72.8	51.6 ± 22.6	7.2 ± 1.9	0.2 ± 0.1	6.1 ± 0.3
	>2 years	10	40.8 ± 12.9	97.0 ± 89.7	7.8 ± 3.3	0.3 ± 0.2	6.7 ± 0.7
Mutant	≤2 years	3	120.0 ± 70.0	96.7 ± 37.7	3.7 ± 2.3	0.2 ± 0.1	6.5 ± 0.6
	>2 years	3	366.3 ± 396.7	376.0** ± 112.6	8.3 ± 8.5	0.5 ± 0.3	6.4 ± 0.6

Wild; Wild type homozygote, Hetero; Heterozygote, Mutant; Mutant type homozygote, NC*;not classified, ** : p<0.05

3. 변이유전자 동형접합자군의 임상증상 및 생존율 평가

변이유전자 동형접합자군에 대한 모니터링을 실시하여 6마리 중 4마리의 폐사를 확인하였다. 폐사한 개체의 유전자 검사 의뢰 나이는 각각 2, 1, 2, 3.7년령 이고, 폐사 나이는 각각 4, 2.3, 2, 3.8년령 이었다(Table 8). 이상의 결과를 통해 변이유전자 동형접합자 군의 2.5년 이상, 4년 이상 생존율을 평가한 결과, 각각 60%, 20%였다(Figure 3).

Table 8. Clinical information of 6 mutant type homozygote Bedlington terriers

Sample No.	Sex	Age(years)		Chief complaints	Primary diagnosis
		Examined	Died		
BT0901	F	2.0	4.0	vomiting	Liver failure
BT0908	F	1.0	2.3	jaundice	Liver failure
BT1108	M	2.0	2.0	vomiting	Liver failure
BT1110	F	3.7	3.8	ascites vomiting	Liver failure Microhepatica
BT0917	M	0.7	Live	—	—
BT1210	M	0.5	Live	—	—

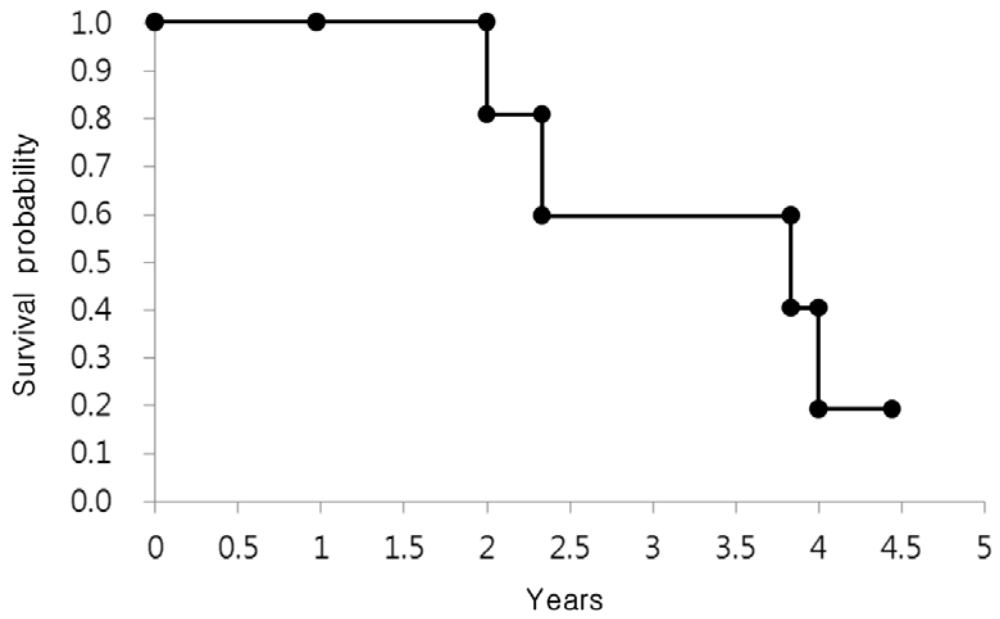


Figure 3. Kaplan–Meier survival curve for 6 mutant type homozygote Bedlington terriers

4. 가계도 작성

수집된 개체 정보와 유전자 검사 결과를 이용하여 부모 자견이 확인된 2개 집단(A, B)의 가계도를 작성하였다. A 가계에서는 이형접합자 수컷과 정상유전자 동형접합자 암컷 사이에서 정상유전자 동형접합자 암수 각 1마리와 이형접합자 암수 각 1마리가 태어났다. B 가계에서는 정상유전자 동형접합자 수컷과 이형접합자 암컷 사이에서 정상유전자 동형접합자 수컷 3마리, 암컷 1마리와 이형접합자 수컷 1마리가 태어났다(Figure 4).

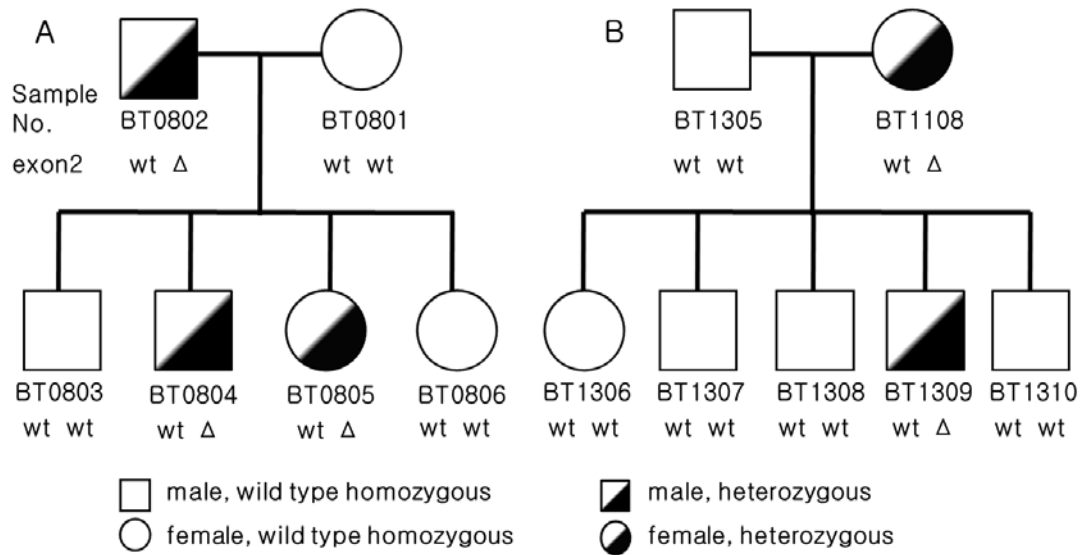


Figure 4. Bedlington terrier pedigrees status of *COMM1* mutation in dogs used for current study. Legend upper left; sample number, exon2 (wild type[wt], deletion[Δ])

IV. 고 찰

베들링턴 데리어에서 구리 중독증을 진단하는 방법으로는 간생검을 통한 구리 농도 측정법과 유전자 검사법이 있다. 간의 구리농도 측정법은 오랜 기간 임상분야에서 이용되어 왔으며, 간 내 구리농도는 원자흡수 분광광도계(atomic absorption spectrophotometer), 중성자 방사화분석(neutron activation analysis) 등을 이용하여 정량적으로 측정하거나, rubeanic acid 또는 rhodanine 염색법 등을 이용하여 반정량적으로 측정할 수도 있다(35, 37, 45). 구리 중독증에 이환된 개체는 간 이외 신장, 뇌, 각막 등의 장기에서도 구리 농도의 상승이 일어나는 것으로 알려져 있으나, 이들 장기와 관련된 임상적 증상 발현은 관찰되지 않는다(14). 간의 구리농도 측정 결과가 $400 \mu\text{g/g}$ 미만이면 정상 개체로 판정할 수 있고, $1,000 \mu\text{g/g}$ 을 초과하면 구리 중독증에 이환된 개체로 판정할 수 있다(45). 그러나 구리농도가 $400 \mu\text{g/g}$ 에서 $1,000 \mu\text{g/g}$ 사이이면 6개월 뒤 재측정하여 판정해야 한다. 특히 정상적인 개체의 간 내 구리농도가 $400 \mu\text{g/g}$ 이상인 사례 및 구리농도가 간의 병리조직학적 변화와 질병의 진행 상태를 정확히 반영하는 지표자(indicator)가 아님을 시사하는 연구 결과가 보고되면서 구리농도 측정법의 진단적 가치에 문제점이 있음이 제기되었다(12, 36). 최근 이에 대한 대안으로서 유전자 검사법이 도입되었다. 1997년 Yuzbasiyan-Gurkan 등은 초위성체 표지자(microsatellite marker) *C04107*과 질병 유전자 사이의 연관 관계를 이용한 유전자 진단법을 제안하였다(44). *C04107*은 베들링턴 데리어 건종에서 두 종류의 대립유전자(allele 1 : 159 bp, allele 2 : 163 bp)로 존재하며, 이 중 allele 2가 질병 유전자와 연관불균형(linkage disequilibrium)을 이루고 있는 사실이 확인되었다. 그러나 후속 연구에 의해 *C04107*과 질병 유전자 사이의 재조합 사례가 보고되면서, *C04107*을 이용한 유전자 진단법은 정상유전자 동형접합자(wild type homozygote), 이형접합자(heterozygote type) 및 변이유전자 동형접합자(mutant type homozygote)를 정확히 감별해 낼 수 없음이 밝혀졌다(5, 11, 16). 이에 본 연구에서는 Forman 등(6)이 제시한 *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이 직접

진단법을 이용하였으며, 국내 베들링턴 테리어 105마리에서 변이유전자 동형접합자의 발생빈도는 5.7%로 확인되었다. 외국의 사례에서는 1999년 벨기에의 베들링턴 테리어 44마리에서 정상유전자 동형접합자가 10마리(20%), 이형접합자가 24마리(47%), 변이유전자 동형접합자가 17마리(33%)로 보고되었다(31). 또한 2007년 호주의 베들링턴 테리어 147마리에서, 정상유전자 동형접합자가 60마리(40%), 이형접합자가 47마리(32%), 변이유전자 동형접합자가 42마리(28%)로 보고된 바 있다(22). 국내 베들링턴 테리어 개체군의 변이유전자 동형접합자 발생빈도는 벨기에, 호주의 보고와 비교하였을 때 매우 낮았다. 이는 현재 베들링턴 테리어의 국내 도입이 초기 단계로 개체수가 많지 않으며, 외국으로부터 국내로 수입이 이루어지는 과정에서 유전자형이 확인된 개체를 선별하여 도입하고 있기 때문으로 사료된다. 그러나 국내 이형접합자의 발생빈도는 44.8%로서, 외국의 사례와 비슷하거나 높은 수준이다. 이는 초기 도입된 일부 개체들이 C04107 초위성체 표지자법을 이용한 부정확한 유전자 검사를 통해 도입되었기 때문으로 판단된다. 이형접합자끼리의 교배를 통해 1/4의 확률로 변이유전자 동형접합자가 태어날 수 있기 때문에, 국내 개체군에 대한 정확한 유전적 진단을 통한 선택적 교배계획의 수립이 필요한 상황이다.

일반혈액검사 결과상에서 각 유전자군 간의 특별한 유의성은 확인할 수 없었으며, 이는 기존 보고와 일치하였다(10, 14). 각 군의 일반혈액검사 결과는 대부분 정상범위 내에 있었으며, 혈관 내 용혈에 의한 빈혈, 혈색소혈증 등은 확인되지 않았다(10, 43). 구리 중독증에 이환된 개체는 혈청 ALT 활성도가 증가하는데, 이는 많은 논란에도 불구하고(17, 28, 39) 현재까지 진단적 가치가 있는 것으로 알려져 있으며 그 민감도는 34-45%로 보고된 바 있다(8, 9). 혈청화학 검사 결과상에서 2년령 이상의 변이유전자 동형접합자군의 ALT 활성도의 유의적인 증가가 관찰되었다. 이는 ALT가 간세포의 세포질에 다량 분포하는 효소로서 구리 축적에 의한 간세포 손상 시 수일 내 순환 혈액 중으로 유출되기 때문이다(42). 동일군의 일부 개체에서 혈중 ALP 활성도의 증가도 관찰되었으나, 개체별 편차가 심하여 유의성을 찾기는 어려운 것으로 확인되었다. 이는 ALP가 간, 골격계 및 신장 등에 분포하는 효소이고 corticosteroid 등의 요인에 의해서도 혈

중 활성도가 상승할 수 있어, ALT에 비하여 간세포 손상에 특이적이지 않기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구에서 변이유전자 동형접합자 개체의 2.5년 이상 생존율은 60%, 4년 이상 생존율은 20%로 확인되었다. 구리 중독증에 이환된 개체의 생존율에 대해서는 지금까지 정확한 조사가 이루어져 있지 않으며, 예후는 질병의 진행도에 따라 상이한 것으로 알려져 있다(8, 30). 구리 중독증에 이환된 개체 중, 경미하거나 중등도(moderate)의 임상 증상이 발현된 개체는 지지요법(supportive care)에 치료 반응을 보이기 때문에 질환의 조기 진단 및 지속적인 건강검진을 통해 예후를 개선시킬 수 있다(30). 본 증의 치료는 과도한 구리의 흡수를 억제하고 간에서의 구리 배설을 촉진하는 것에 초점을 두고 있다(29). 일반적인 사료는 대부분 높은 함량의 구리를 함유하고 있기 때문에 구리 함량이 낮은 처방사료 및 처방식(과일, 야채, 장기를 제외한 육류, 유제품 등)을 급여하는 것이 치료에 도움이 된다(1, 18). 소화기관에서의 구리 흡수를 억제하기 위해 아연 제제를 급여할 수 있으나, 기호성이 떨어지며 용혈성 빈혈, 구토 및 설사 등의 소화기 장애가 부작용으로서 나타날 수 있다(4). D-penicillamine은 구리이온 착화제(chelating agents)로서 구리 중독증의 치료제로 사용할 수 있으며, 콜라겐 합성을 저해하여 간의 섬유화를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(25, 29).

구리 중독증은 상염색체 열성 유전질환으로 변이유전자의 발현 빈도가 높고 이형접합자는 특이적 임상증상을 나타내지 않기 때문에 근절이 매우 어려운 것으로 알려져 있다(7). 그러나 네델란드와 독일 등의 국가에서는 간 생검을 이용한 임상진단을 통해 유전적 문제가 있는 개체를 15~20년간 교배에서 제외함으로써, *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이 발생빈도를 낮은 수준으로 유지하고 있다(31). 본 연구에서는 유전자 검사 결과를 이용한 가계도 작성을 통해 멘델의 유전법칙에 부합되는 유전질환의 형질을 확인하였으며, 국내 베들링턴 테리어 중 유전적 문제가 있는 개체를 교배에서 제외시켜 나간다면 유전변이의 발생 빈도를 낮출 수 있을 것으로 판단된다. 또한 구리 중독증은 베들링턴 테리어 이외에도 도베르만 핀셔(Doberman Pinchers), 웨스트 하이랜드 화이트 테리어(West

Highland White terrier), 스키예 테리어(Skye terrier) 등의 견종에서도 보고되어 있기 때문에(13, 19, 38), 상기 언급된 종에 대한 국내의 유전적 조사도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

국내 베들링턴 테리어에서 *COMMD1* 유전자 exon 2 결손변이의 발생빈도를 분자생물학적 방법으로 진단·조사하고, 혈액, 혈청화학 검사 및 생존율 등을 비교분석한 결과는 아래와 같다.

1. 국내 베들링턴 테리어 105마리의 개체 중, *COMMD1* 유전자 정상유전자 동형접합자가 52마리(49.5%), 이형접합자가 47마리(44.8%), 변이유전자 동형접합자가 6마리(5.7%)로 확인되었다

2. *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이에 따른 유전자형과 연령을 기준으로 분류한 각 군 사이의 일반혈액검사 결과에서 유의적인 차이점은 발견되지 않았다. 간 기능과 관련된 혈청화학 검사 결과에서 2년령 이상의 변이유전자 동형접합자군의 ALT 활성도가 다른 군에 비해 유의적으로 증가하였다.

3. 변이유전자 동형접합자 군의 2.5년 이상, 4년 이상 생존율은 각각 60%, 20%로 확인되었다.

이상의 결과에서 국내 베들링턴 테리어의 *COMMD1* 유전자의 exon 2 결손변이 발생빈도를 확인하였고, 이는 국내 베들링턴 테리어 개체군의 유전자 선택적 교배계획 설립 및 변이유전자 확산의 예방을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Bauer JE. Diet selection and special considerations in the management of hepatic diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 625–629.
2. Biasio W, Chang T, McIntosh CJ, McDonald FJ. Identification of Murr1 as a regulator of the human delta epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 2003; 279: 5429–5434.
3. Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1069S–1073S.
4. Brewer GJ, Dick RD, Schall W, Yuzbasiyan–Gurkan V, Mullaney TP, Pace C, Lindgren J, Thomas M, Padgett G. Use of zinc acetate to treat copper toxicosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201: 564–568.
5. Coronado VA, Damaraju D, Kohijoki R, Cox DW. New haplotypes in the Bedlington terrier indicate complexity in copper toxicosis. *Mamm Genome* 2003; 144: 83–91.
6. Forman OP, Boursnell MEG, Dunmore BJ, Stendall N, van de Sluis B, Fretwell N, Jones C, Wijmenga C, Rothuizen J, van Oost BA, Holmes NG, Binns MM, Jones P. Characterization of the *COMMD1(MURRI)* mutation causing copper toxicosis in Bedlington terriers. *Anim Genet* 2005; 36: 497–501.
7. George JB. Wilson disease and canine copper toxicosis. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1087S–1090S.
8. Hardy RM. Copper–associated hepatitis in Bedlington terriers. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy Small Animal Medicine*, 8th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1983: 834–836.
9. Hardy RM, Stevens JB. Chronic progressive hepatitis in Bedlington

- terriers. In: Proceedings of the 45th Annual Meeting of American Animal Hospital Association 1978.
10. Hardy RM, Stevens JB, Stowe CM. Chronic progressive hepatitis in Bedlington terriers associated with elevated liver copper concentration. *Minn Vet* 1975; 15: 13–24.
 11. Haywood S, Fuentealba IC, Kemp SJ. Copper toxicosis in Bedlington terriers. *Vet Rec* 2000; 146: 383–384.
 12. Haywood S, Fuentealba IC, Kemp SJ, Trafford J. Copper toxicosis in the Bedlington terrier: a diagnostic dilemma. *J Small Anim Pract* 2001; 42: 181–185.
 13. Haywood S, Rutgers HC, Christian MK. Hepatitis and copper accumulation in Skye terriers. *Vet Pathol* 1988; 25: 408–414.
 14. Herrtage ME, Seymour CA, Jefferies AR, Blakemore WF, Palmer AC. Inherited copper toxicosis in the Bedlington terrier: a report of two clinical cases. *J Small Anim Pract* 1987; 28: 1127–1140.
 15. Herrtage ME, Seymour CA, White RA, Small GM, Wight DG. Inherited copper toxicosis in the Bedlington terriers: the prevalence in asymptomatic dogs. *J Small Anim Pract* 1987; 28: 1141–1151.
 16. Holmes NG, Herrtage ME, Ryder EJ, Binns MM. DNA marker *C04107* for copper toxicosis in a population of Bedlington terriers in the United Kingdom. *Vet Rec* 1998; 142: 351–352.
 17. Hultgren BD, Stevens JB, Hardy RM. Inherited, chronic, progressive hepatic degeneration in Bedlington terriers with increased liver copper concentrations: clinical and pathologic observations and comparison with other copper-associated liver diseases. *Am J Vet Res* 1986; 47: 365–377.
 18. Hyun C, Filippich LJ. Inherited copper toxicosis emphasis on Bedlington terrier copper toxicosis. *J Exp Anim Sci* 2004; 43:

- 1-26.
19. Johnson GF, Zawie DA, Gilbertson SR, Sternlieb I. Chronic active hepatitis in Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 1438-1442.
 20. Kaplan, EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assn* 1958; 53: 457-481.
 21. Klomp, AE, van de Sluis B, Klomp LW, Wijmenga C. The ubiquitously expressed *MURR1* protein is absent in canine copper toxicosis. *J Hepatol* 2003; 39: 703-709.
 22. Lee SA, Fillipich LJ, Hyun C. Prevalence of the exon 2 deletion of the *COMMD1* gene in Australian Bedlington terriers. *J Genet* 2007; 86: 289-291.
 23. Loudianos G, Gitlin JD. Wilson's disease. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 353-364.
 24. Ludwig J, Owen CA Jr, Barham SS, McCall JT, Hardy RM. The liver in the inherited copper disease of Bedlington terriers. *Lab Invest* 1980; 43: 82-87.
 25. Magne M, Chiapella AM. Medical management of canine chronic hepatitis. *Comp Cont Edu Vet Pract* 1986; 8: 915.
 26. Owen CA Jr, Ludwig J. Inherited copper toxicosis in Bedlington terriers: Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Am J Pathol* 1982; 106: 432-434.
 27. Pena MM, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 1999; 129: 1251-1260.
 28. Robertson HM, Studdert VP, Reuter RE. Inherited copper toxicosis in Bedlington terriers. *Aust Vet J* 1983; 60: 235-238.
 29. Rolfe DS, Twedt DC. Copper-associated hepatopathies in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25: 399-417.

30. Rothuizen J. Copper storage in the liver, a hereditary problem in Bedlington terriers. In: Proceedings of Voorjaarsdagen 64 Royal Netherlands Veterinary Association, 1983.
31. Rothuizen J, Ubbink GJ, van Zon P, Teske E, van den Ingh TS, Yuzbasiyan-Gurkan V. Diagnostic value of a microsatellite DNA marker for copper toxicosis in West-European Bedlington terriers and incidence of the disease. *Anim Genet* 1999; 30: 190-194.
32. Stuehler B, Reichert J, Stremmel W, Schaefer M. Analysis of the human homologue of the canine copper toxicosis gene *MURRI* in Wilson disease patients. *J Mol Med* 2004; 82: 629-634.
33. Su LC, Owen CA Jr, Zollman PE, Hardy RM. A defect of biliary excretion in copper-laden Bedlington terriers. *Am J Physiol* 1982; 243: 231-236.
34. Su LC, Ravanshad S, Owen CA Jr, McCall JT, Zollman PE, Hardy RM. A comparison of copper-loading disease in Bedlington terriers and Wilson's disease in humans. *Am J Physiol* 1982; 243: G226-G230.
35. Teske E, Brinkhuis BG, Bode P, van den Ingh TS, Rothuizen J. Cytological detection of copper for the diagnosis of inherited copper toxicosis in Bedlington terriers. *Vet Rec* 1992; 131: 30-32.
36. Thornburg LP. A perspective on copper and liver disease in the dog. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 101-110.
37. Thornburg LP, Beissenherz M, Dolan M, Raisbeck MF. Histochemical demonstration of copper and copper-associated protein in the canine liver. *Vet Pathol* 1985; 22: 327-332.
38. Thornburg LP, Shaw D, Dolan M, Raisbeck M, Crawford S, Dennis GL, Olwin DB. Hereditary copper toxicosis in West Highland white terriers. *Vet Pathol* 1986; 23: 148-154.
39. Twedt DC, Sternlieb I, Gilbertson SR. Clinical morphologic and

- chemical studies on copper toxicosis of Bedlington terriers. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175: 269–275.
40. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in Humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 952S–959S.
 41. van de Sluis B, Rothuizen J, Pearson PL, van Oost BA, Wijmenga C. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 165–173.
 42. Villers E, Blackwood L. Laboratory evaluation of hepatic disease. In: *Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*, 2nd ed. UK: BSAVA. 2005: 186–190.
 43. Watson AD, Middleton DJ, Ilkiw JE. Copper storage disease with intravascular haemolysis in a Bedlington terrier. *Aust Vet J* 1983; 60: 305–307.
 44. Yuzbasiyan–Gurkan V, Blanton SH, Cao Y, Ferguson P, Venta PJ, Brewer GJ. Linkage of a microsatellite marker to the canine copper toxicosis locus for Bedlington terriers. *Am J Vet Res* 1997; 58: 23–27.
 45. Yuzbasiyan–Gurkan V, Wagnitz S, Blanton SH, Brewer GJ. Linkage studies of the esterase D and retinoblastoma genes to canine copper toxicosis: a model for Wilson disease. *Genomics* 1993; 15: 86–90.

Abstract

Prevalence and clinical significance of exon 2 deletion of *COMMD1* in a population of Bedlington terriers in Korea

Yungi Kim

(Supervised by Prof. Youngmin Yun)

Department of Veterinary Medicine, Graduate School,
Jeju National University, Jeju, Korea

Copper metabolism domain containing 1 (COMMD1) gene (formerly *MURR1*) encodes COMMD1 protein functioning as a regulator of copper metabolism. Exon 2 deletion of *COMMD1* gene results in complete absence of the protein and causes copper toxicosis in Bedlington terriers.

DNA samples were extracted from whole blood and blood samples were collected from 105 Bedlington terriers (50 males, 55 females) of pet dog clubs in Korea. A multiplex PCR was carried out to detect of exon 2 deletion of *COMMD1* gene. Clinical analysis was performed on each genetic group using the results of complete blood count and serum chemistry. Clinical status of the blood donors have been screened to estimate the survival probability.

Of the 105 samples, 52 (49.5%) were wild type homozygote for the normal *COMMD1* gene, 47 (44.8%) were heterozygote, having both normal and mutated copy of the *COMMD1* gene. And 6 (5.7%) were

mutant type homozygote. Serum ALT activity was elevated in mutant type homozygote group (>2 years). The survival probability of mutant type homozygote surviving past 2.5 years is 60%, and 4 years is 20%.

In this study, it was possible to know the prevalence and clinical significance of exon 2 deletion of *COMMD1* in Bedlington terriers in Korea. The results of genetic analysis using multiplex PCR method could help establish a structured selective breeding program to prevent *COMMD1* mutation in Bedlington terriers in Korea.

Key words : Bedlington terrier, *COMMD1*, copper toxicosis, multiplex PCR, survival probability

감사의 글

석사학위 논문을 준비하고 완성하는 과정은, 고마운 분들의 진실한 도움이 있었기에 더욱 가치있고 의미있는 시간이 되었습니다. 먼저, 학부 때부터 지금에 이르기까지 한결같은 가르침으로 언제나 바른 길로 이끌어주시는 교수님들께 이 자리를 빌려 감사의 말씀을 드립니다. 모자란 글을 한 글자 한 글자 교정봐주시고, 논문의 형태가 갖춰지도록 다듬어주신 심사위원님들께도 깊은 감사를 드립니다. 실험을 계획하고 진행해가는 과정에서 많은 조언과 충고를 아끼지 않은 대학원 선배님들, 항상 힘이 되어 준 든든한 동기들, 그리고 크고 작은 도움을 준 내 과교실 학부 후배님들께 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 또한 대학원 수업을 듣고 논문 발표를 준비하는 과정에서 작은 것부터 큰 것까지 자기일처럼 챙겨주신 학과 조교님과 배려와 이해로 응원해주신 제주시 축산과 직원 여러분들께도 다시 한번 감사드립니다. 마지막으로 부족한 저를 항상 믿어주시고 한결같은 사랑 보내주시는 부모님과 소중한 한 사람에게 사랑한다는 얘기 전하고 싶습니다.