

가족성 저칼륨성 주기성 마비에서 세포외 칼륨농도가 지연성 정류형 채널을 형성하는 KCNQ3와 KCNQ5 단백질에 미치는 효과

김성조 · 김동현 · 김준범^{1*}

호서대학교 생명공학과, ¹건양대학교 의과대학 소아청소년과학교실

Received September 16, 2009 / Accepted October 20, 2009

Effect of Extracellular Potassium on Delayed Rectifier Potassium Channel Proteins of KCNQ3 and KCNQ5 in Familial Hypokalemic Periodic Paralysis. Sung-Jo Kim, Donghyun Kim and June-Bum Kim^{1*}. Department of biotechnology, Hoseo university, 165, Baebang-Myun, Asan, Chungnam, Republic of Korea, ¹Department of Pediatrics, Konyang University College of Medicine, 685 Gasoowon-Dong, Seo-Goo, Daejeon 302-718, Republic of Korea - Familial hypokalemic periodic paralysis (HOKPP) is an autosomal dominant muscle disorder characterized by episodic attacks of muscle weakness with concomitant hypokalemia. Mutations in either a calcium channel gene (CACNA1S) or a sodium channel gene (SCN4A) have been shown to be responsible for this disease. The combination of sarcolemmal depolarization and hypokalemia has been attributed to abnormalities of the potassium conductance governing the resting membrane potential. To understand the pathophysiology of this disorder, we examined both mRNA and protein levels of delayed rectifier potassium channel genes, KCNQ3 and KCNQ5, in skeletal muscle fibers biopsied from patients with HOKPP. Our results showed an increase in the cytoplasmic level of KCNQ3 protein in patients' cells exposed to 50 mM external concentration of potassium. However, mRNA levels of both channel genes did not show significant change in the same condition. Our results suggest that long term exposure of skeletal muscle cells in HOKPP patients to high extracellular potassium alters the KCNQ3 localization, which could possibly hinder the normal function of this channel protein. These findings may provide an important clue to understanding the molecular mechanism of familial hypokalemic periodic paralysis.

Key words : Hypokalemic periodic paralysis, potassium channel, KCNQ3, KCNQ5, delayed rectifier

서 론

가족성 주기성 마비란 의식의 장애 없이 간헐적으로 가역적 이완성 근육마비가 나타나는 유전질환으로 마비 시 혈중 칼륨 농도에 따라 고칼륨성, 정상 칼륨성, 저칼륨성의 세 가지 형태로 나뉜다. 대부분의 경우 상염색체 우성형태로 유전되나 산발적으로 발생한 예도 보고된 바 있다[1]. 세 가지 유형중 저칼륨성 주기성 마비가 가장 흔한데, 골격근 세포의 L형 칼슘채널 유전자(CACNA1S)와 나트륨채널 유전자(SCN4A)의 돌연변이가 원인으로 알려져 있으나 아직까지 이로 인한 정확한 발병 기전은 밝혀져 있지 않다[2].

가족성 저칼륨성 주기성마비의 증상은 주로 사춘기 전후 시작되며 간헐적인 사지근육의 위약감 또는 전신 골격근육의 이완성 마비로 나타나는데 심한 저칼륨혈증이 동반되는 경우 드물게 호흡근육과 심장근육의 마비를 초래할 수 있어 사망에 이를 수 있다[6,12]. 증상은 주로 새벽에 나타나며 수시간에서 길게는 수일간 지속된 뒤 자연적으로 회복된다. 또한 과식 등 과량의 탄수화물이나 염분 섭취, 심한 운동, 스트레스 및 추위

등에 의해서도 증상이 유발될 수 있다[5].

KCNQ 유전자는 골격근을 포함한 체내 다양한 조직세포에 분포하는 지연성 정류형 칼륨채널(delayed rectifier potassium channel)을 형성한다. 형성된 채널들은 주로 세포 내 유입된 나트륨이온으로 인해 활동전위가 발생할 경우, 막전위를 휴지기 막전위로 되돌리기 위해 세포내 칼륨을 외부로 방출시키는 기능을 수행한다. KCNQ 단백질에는 KCNQ1에서 5가지 총 5종류의 단백질이 알려져 있으며, 각각은 조직 특이적 발현 및 분포를 나타내고 상호작용을 통해 다양한 생리적 기능을 수행한다[10,11]. 이중 KCNQ5는 골격근육을 비롯한 다양한 인체 조직 내에서 발현되어 분포하며 특히, KCNQ3와 상호작용을 통한 기능수행이 가능한 것으로 보고되어 있다[10,13].

가족성 저칼륨성 주기성마비 환자의 경우 마비시 지속적인 세포내 칼륨 저류로 인해 저칼륨혈증이 지속되는 것으로 생각되고 있으나 정확한 병태생리학적 기전은 밝혀져 있지 않다. 이와 관련해 본 연구에서는 가족성 저칼륨성 주기성마비 환자의 골격근 세포를 이용하여 생체내 정상 칼륨 농도(4 mM)와 탈분극 유발을 위한 고칼륨 농도(50 mM)의 조건에서 지연성 정류형 채널 단백질 중 대표적인 KCNQ3 및 KCNQ5 단백질의 발현양상 변화를 확인하고 이를 통해 본 질환의 분자생물학적 발병기전을 알아보고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-42-600-8835, Fax : +82-42-600-8835

E-mail : hoppdoctor@hanmail.net

재료 및 방법

대상

건양대학교병원 소아청소년과에서 치료중인 108명의 가족성 저칼륨성 주기성 마비환자들 중 가장 심한 임상 증상을 나타낸 3명의 환자와 3명의 정상인으로부터 실험에 대한 설명 후 서면 동의를 받아 기관 연구윤리위원회(IRB)의 심의를 거쳐 시행하였다.

근육 표본 채취

피험자를 침상에 누인 상태로 안정을 취하게 하여 비복근(Gastrocnemius)의 생근부위를 Lidocaine으로 국소마취 시킨 후 외과적 절개를 통해 표본을 채취하였다.

골격근 배양 및 칼륨 완충용액 처리

골격근 세포의 증폭과 분화는 기존에 실시된 실험의 방법을 참고로 수행되었다[3]. 이를 간략히 기술하면, 정상인과 가족성 저칼륨성 주기성 마비환자로부터 채취한 골격근 표본을 전처리과정을 거친 후, 20% Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C 95% air 및 5% CO₂ incubator (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)에서 골격근 세포를 배양하였다. 이후 2% horse serum (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Thermo Scientific)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Scientific)을 사용하여 골격근 세포의 분화를 유도하였으며 정상인과 환자의 골격근 세포 모두 12passage 상태의 세포를 이용하였다. 이후 정상적인 생리적 세포의 칼륨농도인 4 mM과 탈분극 유도 위한 고칼륨농도인 50 mM 조건에서 세포의 생리적, 분자생물학적 막단백질 및 세포질 내의 변화를 관찰하기 위하여 완충용액의 농도를 각각 4 mM과 50 mM로 제조한 뒤, 이 완충용액을 각 골격근 세포에 처리한 후 약 1시간 안에 실험에 사용하였다. 환자 세포에 정상 농도와 고농도의 칼륨을 처리한 후 이와 대조하기 위하여 정상세포의 경우도 환자세포와 동일하게 정상농도와 고농도의 칼륨을 처리하여 각각 노출시켰던 완충용액으로 세포를 용해하기 전에 빠르게 세척한 후 실험에 사용하였다. 칼륨 완충용액은 pH 7.2로 적정하고, 조성은 다음과 같다. 4 mM 조성(KCl 0.1491 g, NaCl 4.23 g, MgCl₂ 0.101 g, CaCl₂ 0.036 g glucose 0.450 g MOPS 1.046 g), 50 mM 조성(KCl 1.8637 g, NaCl 4.23 g, MgCl₂ 0.101 g, CaCl₂ 0.036 g glucose 0.450 g MOPS 1.046 g).

RNA isolation 및 quantitative RT-PCR 분석

정상인과 가족성 저칼륨성 주기성 마비환자의 골격근 세포

를 배양한 후 TriZol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 RNA를 분리하였고, 이 중 100 ng의 RNA를 역전사효소로 cDNA 전환하여 quantitative RT-PCR의 주형으로 사용하였다. Quantitative RT-PCR을 위해 accupower PCR PreMix (BIONEER, Daejeon, Korea)와 KCNQ3 primer 또는 KCNQ5 primer를 주형과 함께 혼합하고 PCR을 통해 mRNA의 양적 변화를 확인하였다. 얻어진 결과는 densitometry 분석을 통해 양적차이를 검증 하였다. Primer 염기서열은 다음과 같다. KCNQ3 - Forward : CTC AGC AAC AAC GTA TGT GG. Reverse : GAA TCA GAA ATC CCA TCC CC. KCNQ5 - Forward : GTC AAA TCT CAC CAA GGA CC. Reverse : GGC ATC TGT ACT TTC TCC TG.

Western blot 분석

정상인의 골격근 세포와 가족성 저칼륨성 주기성마비 환자의 골격근 세포에 각 농도별로 칼륨 완충용액을 1시간 동안 처리한 후 세포질과 세포막 단백질을 분획을 실시하였다. 세포질과 세포막 단백질의 분획방법은 세포의 분획방법으로 기존에 시행되었던 방법을 응용하여 사용하였고[8,9], 각 단계별로 protease-inhibitor cocktail (Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 섞어 세포질 분획과 막 분획의 단백질을 분리해 추출하였다. 각 시료별로 20 µg의 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 실시하였고, 전기영동을 통해 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 단백질을 증착시켜 western blot을 실시하였다. 단백질을 보유한 membrane은 5% skim milk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통해 blocking 시킨 후, KCNQ3 및 KCNQ5 1차 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA)를 처리하였고, anti-rabbit 및 anti-mouse 2차 항체를 사용하였으며, supersignal west pico luminal / enhancer solution (Pierce, Rockford, IL, USA)을 통해 단백질 밴드를 확인하였다.

결 과

본 논문에서는 가족성 저칼륨성 주기성마비 환자와 정상인의 세포에서 탈분극시 KCNQ3와 KCNQ5 단백질의 발현양상의 변화를 확인하기 위하여, 생리적으로 정상 세포의 칼륨농도인 4 mM과 탈분극을 유발하는 고칼륨 농도인 50 mM 칼륨 완충용액 처리 전과 한 시간 경과 후의 mRNA 발현수준을 비교하였고, 세포질과 세포막에서 단백질의 발현양상을 알아 보기 위하여 western blot을 시행하였다.

Quantitative RT-PCR을 이용한 KCNQ3와 KCNQ5의 발현 수준 확인

환자와 정상인의 골격근 세포를 생리적 세포의 정상 칼륨농

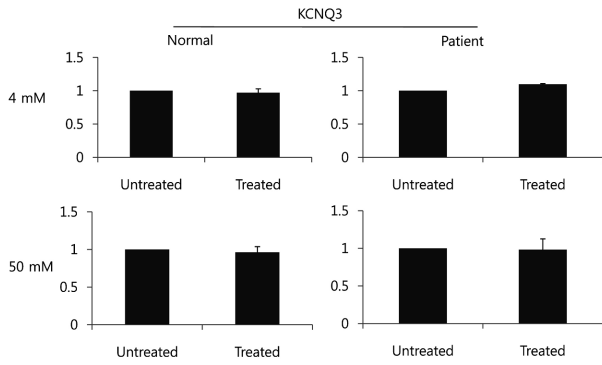


Fig. 1. Quantification of KCNQ3 mRNA expression. The mRNA levels of KCNQ3 did not change after exposure to 4 mM (upper panels) and 50 mM (lower panels) extracellular concentrations of potassium in both normal cells (left) and cells from patients (right). Untreated: prior to exposure to the potassium buffer. Treated: 1 hour after exposure to the potassium buffer. In the fold change, untreated samples are marked as value 1.

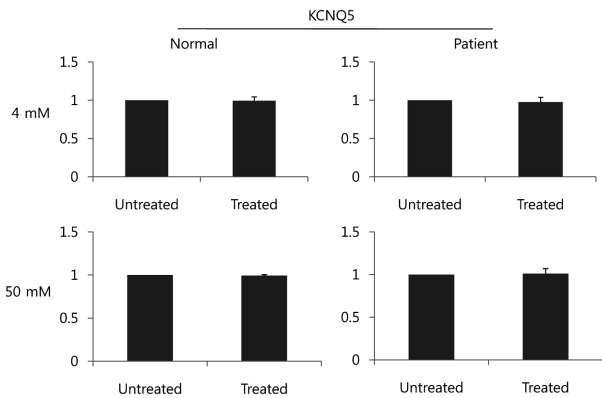


Fig. 2. Quantification of KCNQ5 mRNA expression. The mRNA levels of KCNQ5 did not change after exposure to 4 mM (upper panels) and 50 mM (lower panels) external potassium in both normal cells (left) and cells from patients (right). In the fold change, untreated samples are marked as value 1.

도(4 mM)와 탈분극 유발을 위한 고칼륨농도(50 mM)에 노출시키기 전과 후 각각에서 RNA를 추출하여 KCNQ3와 KCNQ5의 발현수준을 확인하였다. KCNQ3와 KCNQ5의 mRNA 농도는 노출 전과 후 환자와 정상인 모두에서 양적 변화를 나타내지 않았다(Fig. 1, 2).

Western blot을 이용한 KCNQ3와 KCNQ5의 발현 수준 확인

환자와 정상인의 골격근 세포를 4 mM 칼륨농도와 50 mM 칼륨농도에 노출시키기 전과 후 각각에서 막 분획과 세포질 분획의 단백질을 분리하여 KCNQ3와 KCNQ5의 발현수준을 확인하였다. 정상세포의 KCNQ3와 KCNQ5의 경우 4 mM

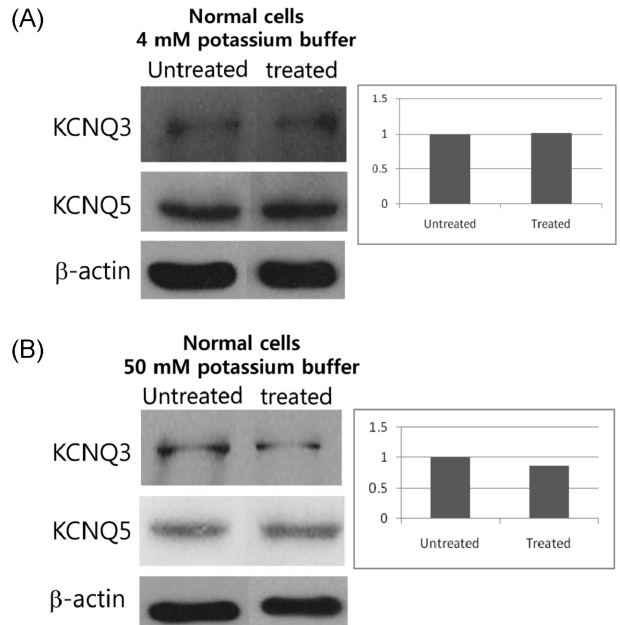


Fig. 3. Western blot analysis of KCNQ3 and KCNQ5 proteins in the cytosolic fraction of normal cells. (A) Concentrations of KCNQ3 (upper panel) and KCNQ5 (middle panel) proteins did not change after exposure to 4 mM external potassium. (B) The concentration of KCNQ3 protein was decreased after exposure to 50 mM external potassium, whereas that of KCNQ5 protein did not change. Densitometric analysis of KCNQ3 protein (right). β -actin was used as a loading control (lower panel).

칼륨 상태에서 변화를 나타내지 않았다(Fig. 3A). 정상세포가 50 mM 칼륨농도에 노출된 경우에도 KCNQ5는 변화를 보이지 않은 반면, KCNQ3의 경우 세포질 내 단백질 양이 감소하는 결과를 나타냈다(Fig. 3B). 환자의 골격근 세포에 대한 실험에서는 KCNQ3와 KCNQ5가 4 mM 칼륨 농도에 노출된 경우 정상세포와 동일하게 단백질의 양적 변화를 보이지 않았고 (Fig. 4A), 50 mM 칼륨농도에 노출된 경우 KCNQ5는 변화를 보이지 않았으나, 세포질 내 KCNQ3의 단백질 양은 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 또한 정상 세포를 50 mM 칼륨농도에 노출시킨 경우 막 분획 내 KCNQ3 단백질 양은 증가한 반면(Fig. 5A), 환자세포의 막 분획 내 KCNQ3 단백질 양은 감소하였다(Fig. 5B).

고 찰

가속성 저칼륨성 주기성 마비는 골격근 세포의 활성화 (activation) 장애에 기인한다[7]. 근세포 수축을 위한 탈분극이 정상적으로 일어나지 못하는 이유에 대해 여러 가지 가설들이 제시되고 있으나, 저자들은 본 연구를 통해 지연성 정류형 채널 단백질의 기능 이상과 질환 발병기전과의 관련성 유무를

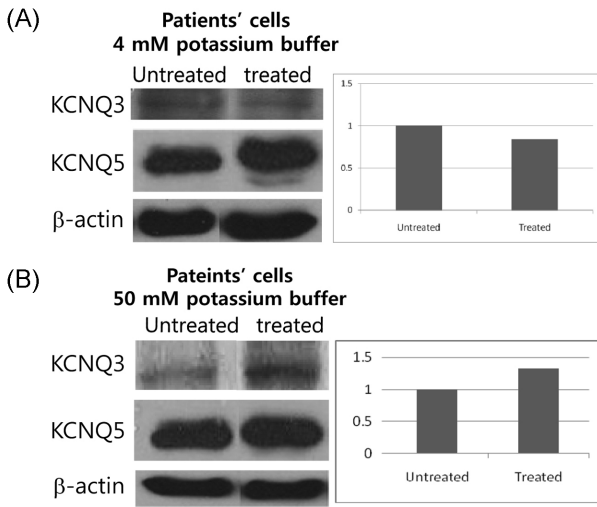


Fig. 4. Western blot analysis of KCNQ3 and KCNQ5 proteins in the cytosolic fraction of patients' cells. (A) Concentrations of KCNQ3 (upper panel) and KCNQ5 (middle panel) proteins did not change after exposure to 4 mM external potassium. (B) The concentration of KCNQ3 protein was increased after exposure to 50 mM external potassium, whereas that of KCNQ5 protein did not change. β-actin was used as a loading control (lower panel).

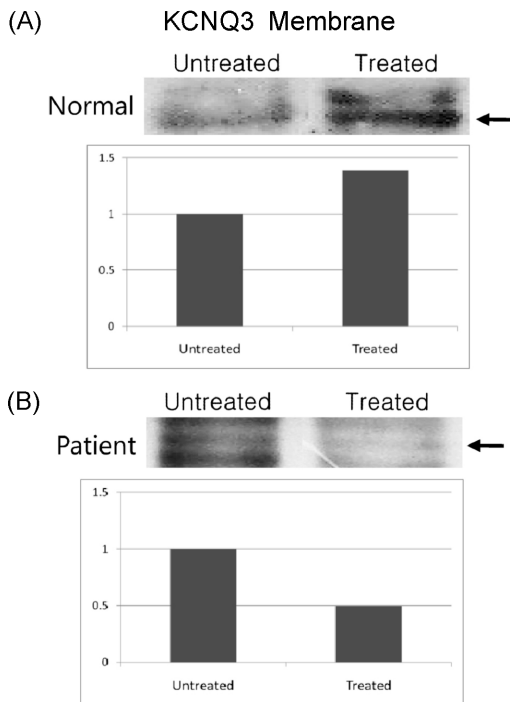


Fig. 5. Western blot analysis of KCNQ3 protein in the membrane fraction after exposure to 50 mM external potassium. The concentration of KCNQ3 protein was increased in normal cells (A) but decreased in patients' cells (B).

확인하고자 하였다. 저자들이 지연성 정류형 채널 단백질을 대상으로 한 이유는 첫째, 이들이 주로 탈분극 시 세포내로

유입된 과량의 나트륨에 대한 보상적 칼륨이온 방출에 관여하므로 기능이상 시 근세포의 활성 장애를 초래할 수 있을 것이며 둘째, 다양한 지연성 정류형 채널들 중 특히 KCNQ군 (family)은 다른 질환들에서도 관련성이 보고된 바 있고[10] 셋째, 선택적으로 작용하는 약제들이 알려져 있어 관련성이 입증될 경우 새로운 치료제 개발이 용이할 수 있기 때문이다. 이를 검증하기 위해 대표적인 KCNQ3와 KCNQ5 단백질의 세포의 칼륨농도 변화에 따른 발현 양상의 변화를 확인하였고 유전자의 일차적 발현증거가 되는 mRNA 상에서는 양적인 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 단백질 양을 관찰한 결과 환자의 세포가 고칼륨 조건인 50 mM에 1시간 동안 노출되는 경우 KCNQ3 단백질의 양은 세포질 내에서 증가하고 막 분획 내에서 감소한 반면, 같은 조건에 노출된 정상 세포에서는 세포질 내에서 감소하고 세포막상에서 증가하였다. 이는 세포막에 존재하며 탈분극 시 세포내 칼륨을 외부로 방출시키는 역할을 담당하는 지연성 정류형 채널을 구성하는 KCNQ3 단백질이 환자의 경우 탈분극 시 세포질 내로 회수되어 정상적인 기능을 수행하지 못하는 것으로 생각할 수 있다. 환자의 골격근 세포질 내에 증가된 KCNQ3 단백질이 유전자로부터 과발현되었다면 mRNA의 증가를 수반해야 하지만, 본 연구를 통해 고칼륨 조건에 장시간 노출된 이후에도 KCNQ3 mRNA는 유의한 농도의 변화를 보이지 않았다. 단백질이 정상적인 기능 수행을 위해 막에 위치하거나, 기능 완료 후 세포질로 회수되는 과정 등의 이상으로 인해 질병이 유발되는 기전에 관한 다수의 연구결과가 보고되어 있다[4]. 따라서 본 연구는 가족성 저칼륨성 주기성 마비에서도 세포막에 존재하며 정상적인 기능을 수행해야 할 지연성 정류형 채널 단백질이 특정 원인에 의해 세포질로 회수되는 현상이 일어나고 있으며 이것이 마비 증상을 발생시키는 한 원인이 될 수 있음을 제시하고 있다. 후후 보다 자세한 분자생물학적 관련기전 및 다양한 막 단백질의 세포의 칼륨농도에 따른 변화에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

가족성 저칼륨성 주기성 마비란 상염색체 우성 유전 질환으로 저칼륨혈증을 동반한 간헐적인 가역적 이완성 근육 마비를 특징으로 한다. 세포내 저류된 칼륨으로 인해 저칼륨혈증이 지속되고 근세포 활성이상으로 인해 마비가 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 증상발현의 분자생물학적 기전을 확인하기 위해 세포 내 칼륨이온을 세포 밖으로 이동시키는 지연성 정류형 채널 단백질의 일종인 KCNQ3와 KCNQ5를 대상으로, 정상인과 환자에서 채취한 골격근 세포를 생리적 세포의 정상 칼륨농도인 4 mM과 탈분극 유도를 위한 고칼륨농도인 50 mM에 노출시켜 단백질의 양적 변화 유무를 확인하였다. 유전자 발현양상을 확인하기 위해 mRNA의 양적 변화를 확인한

결과 모든 조건에서 유의한 변화가 관찰되지 않아 정상 칼륨 조건과 고칼륨조건이 두 유전자발현의 변화를 야기하지 않음을 확인하였다. 그러나 단백질 양을 관찰한 결과 환자의 골격근 세포가 50 mM의 칼륨농도에 노출되는 경우 KCNQ3 단백질은 세포질 내에서 증가하고 세포막 내에서 감소하였다. 이는 환자의 골격근 세포가 고농도의 세포외 칼륨에 의해 탈분극 되는 경우 재분극에 중요한 기능을 담당하는 KCNQ3 채널 단백질이 세포질 내로 이동하여 재분극 형성의 장애를 초래하고 이로 인해 근세포 활성이 일어나지 않게 되어 마비를 유발할 수 있음을 시사하는 결과로 본 질환의 새로운 발병 기전을 설명할 수 있는 근거로 생각된다.

References

- Buruma, O. J., G. T. Bots, and L. N. Went. 1985. Familial hypokalemic periodic paralysis. 50-year follow-up of a large family. *Arch. Neurol.* **42**, 28-31.
- Charness, M. E. 1978. Clinical conferences at The Johns Hopkins Hospital. Hypokalemic periodic paralysis. *Johns Hopkins Med. J.* **143**, 148-153.
- Cottle, D. L., M. J. McGrath, B. S. Cowling, I. D. Coghill, S. Brown, and C. A. Mitchell. 2007. FHL3 binds MyoD and negatively regulates myotube formation. *J. Cell Sci.* **120**, 1423-1435.
- Kim, S. J., Z. Zhang, C. Sarkar, P. C. Tsai, Y. C. Lee, L. Dye, and A. B. Mukherjee. 2008. Palmitoyl protein thioesterase-1 deficiency impairs synaptic vesicle recycling at nerve terminals, contributing to neuropathology in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3075-3086.
- Kim J. B., M. H. Kim, S. J. Lee, D. J. Kim, and B. C. Lee. 2007. The genotype and clinical phenotype of Korean patients with familial hypokalemic periodic paralysis. *J. Korean Med. Sci.* **22**, 946-951.
- Maffe, S., F. Signorotti, A. Perucca, M. Bielli, U. Hladnik, E. Ragazzoni, E. Maduli, P. Paffoni, P. Dellavesa, A. M. Paino, F. Zenone, U. Parravicini, N. F. Pardo, L. Cucchi, and M. Zanetta. 2009. Atypical arrhythmic complications in familial hypokalemic periodic paralysis. *J. Cardiovasc. Med.* **10**, 68-71.
- Morrill, J. A., R. H. Brown Jr, and S. C. Cannon. 1998. Gating of the L-type Ca channel in human skeletal myotubes: an activation defect caused by the hypokalemic periodic paralysis mutation R528H. *J. Neurosci.* **18**, 10320-10334.
- Poole, R. J., D. P. Briskin, Z. Kratky, and R. M. Johnstone. 1984. Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet: Characterization of proton-transport and ATPase in tonoplast vesicles. *Plant Physiol.* **74**, 549-556.
- Prinetti, A., V. Chigorino, G. Tettamanti, and S. Sonnino. 2000. Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J. Biol. Chem.* **275**, 11658-11665.
- Robbins, J. 2001. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **90**, 1-19.
- Wang, H. S., Z. Pan, W. Shi, B. S. Brown, R. S. Wymore, I. S. Cohen, J. E. Dixon, and D. McKinnon. 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* **282**, 1890-1893.
- Yeh, J. H., M. H. Sun, and H. C. Chiu. 1999. Dominant-inherited hypokalemic periodic paralysis in a large Chinese family. *J. Formos. Med. Assoc.* **98**, 277-282.
- Yus-Najera, E., A. Munoz, N. Salvador, B. S. Jensen, H. B. Rasmussen, J. Defelipe, and A. Villarroel. 2003. Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation. *Neuroscience* **120**, 353-364.