임상적 Protein S 결핍증에서 PROS1 유전자 변이 탐색

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 영 아

임상적 Protein S 결핍증에서 PROS1 유전자 변이 탐색

지도교수 송 경 순

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 영 아

김영아의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 관심과 사랑으로 지도해주신 존경하는 송경순 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 가운데도 아낌없는 조언으로 격려해 주신 오상환 교수님, 김현숙 교수님, 안용호 교수님, 이진성 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 연구에 전념할 수 있도록 많은 배려를 해 주신 일산병원 선영규 선생님, 실험에 관해 유용한 조언을 해 주신 최종락 선생님, 그리고 실험을 도와주신 신정식, 김영환 선생에게도 깊이 감사드립니다. 힘든 고비마다 항상 옆에서 격려해주고 도와준 남편을 비롯한 가족 모두와 기쁨을 나누고자 합니다.

저 자 씀

차 례

그 림 차 례

표 차 례

국문요약

임상적 Protein S 결핍증에서 PROS1 유전자 변이 탐색

Protein S의 유전성 결핍증은 혈전증의 위험인자로서 알려져 있으며, 선진 외국의 경우 분자유전학적 연구가 활발하여 해당 유전자(PROS1) 내 약 130여종의 돌연변이(mutation)와 약 20종의 다형성(polymorphism) 양상이 알려져 있다. 그러나 국내에서는 protein S의 유전성 또는 후천성 결핍증에 대한 연구가 미미한 실정이고 임상적으로 혈전증 환자에서 원인적 검사로서 혈중 protein S를 측정하고 있으나 실제로 결핍증을 나타낸 환자에서 유전적 검색 자료는 아직 없다. 이에 임상적으로 protein S 결핍증으로 진단된 환자에서 유전적 결함의 빈도 추정과 함께 한국인에서 처음으로 PROS1 유전자 변이 양상을 관찰하여 이제까지 보고된 외국인의 변이 양상과 비교하고자 하였다.

이를 위해 최근 10년간 임상적으로 protein S 결핍증을 나타낸 60예의 환자에서 PROS1 유전자 내 15개 exon 및 exon/intron junction 부위를 SSCP 스크리닝과 DNA sequencing으로 조사하여 일본에서 보고된 protein S Tokushima를 포함한 유해 돌연변이(detrimental mutation)의 빈도와 임상적 관심이 높은 protein S Heerlen, 외국에서 보고된 다빈도 다형성에 해당되는 intron K 부위의 T/C (PIPS1), exon 15 부위의 3' untranslated trailer의 exonic C/A (PEPS2)와 G/A (Pro626) 양상에 대하여 알아보았다. 또한 정상 대조군 50예를 대상으로 PIPS1, PEPS2, Pro626 (exon15) 유전자의 대립인자 비율을 산출하여 환자군과의 차이 유무를 관찰하였다.

임상적 protein S 결핍증 60예를 대상으로 모든 exon과 exon/intron junction 부위를 SSCP 스크리닝 후 염기서열 분석으로 확인한 결과 유해 돌연변이에 해당되는 예는 없었으며, 대신 3예에서 PROS1 유전자의 exon 14 근처 intron N 부위에서 T 및 G insertion이 관찰되었다. 이는 아직 국제적으로 보고되지 않았으나 coding region이 아니고 정상인에서도 발견되었기 때문에 유전적 protein S 결핍증과는 연관성이 없는 다형성으로 생각되었다. 또한 protein S Tokushima 및 protein S Heerlen도 protein S 결핍증과 정상 대조군 모두에서 관찰되지 않았다. PIPS1의 T/C 대립인자 비율은 protein S 결핍증에서 0.813/0.187, 정상 대조군에서 0.569/0.431로서 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(P=0.002). PEPS2의 C/A 대립인자 비율은 protein S 결핍증에서 0.825/0.175, 정상 대조군에서 0.840/0.160으로서 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.993). Pro626 (exon15) 부위의 G/A 대립인자 비율

은 protein S 결핍증에서 0.702/0.298, 정상 대조군에서 0.656/0.344로서 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(*P*=0.924).

결론적으로 SSCP검사의 예민도에 한계가 있겠으나 임상적으로 관찰되는 protein S 결핍증의 대부분이 유전적 결함보다는 후천적 요인에 의한 것으로 사료되었다. 이는 임상적으로 관찰되는 결핍증을 모두 유전적으로 간주할 수 있는 오류를 배제하는 데 도움이 되는 자료로서 향후 원인 규명에 있어서 고비용의 분자유전학적 유전자 검사보다는 후천적 요인에 대한 고려와 가족검사를 통한 진단적 접근이 바람직할 것으로 생각되었다. 또한 PROS1 유전자 변이 양상(polymorphism)이 외국인과는 차이가 있으며 특히 PIPS1 유전자 다형성에 대하여 보다 많은 한국인을 대상으로 연구가 필요하고 임상적 의의에 대한 연구도 필요하다고 생각한다.

핵심되는 말: 유전성 protein S 결핍증, PROS1 유전자, 돌연변이, 다형성

임상적 Protein S 결핍증에서 PROS1 유전자 변이 탐색

＜지도교수 송 경 순＞

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 영 아

I. 서 론

Protein S는 비타민 K 의존성 당단백으로 protein C의 항응고 작용을 보조하는 역할과 더불어 직접 응고인자 VIIIa와 Xa에 결합하여 항응고 작용을 한다.[1] 혈장 내 protein S는 전체의 60%가 C4b binding protein에 결합한 형태로 존재하며, 나머지 40%가 free form으로 실제 항응고 기능을 담당한다. 이러한 기능은 소위 protein S 활성도(activity)로 나타나며, 각종 혈전성 질환에서 그 원인을 규명하기 위한 진단적 검사로 이용되고 있다.

Protein S 결핍증의 원인은 크게 유전적 및 후천적 요인으로 나눌 수 있다. 후천적 요인은 임신, 경구 피임제 복용, 당뇨, 신부전 등 C4b binding protein이 증가하는 경우와 미숙아, 신생아, 간질환, 비타민 K 결핍증, 경구 항응고제 및 항암적 화학요법 시술 등 protein S의 생성이 감소하는 경우, protein S의 세포 결합이 항진되는 polycythemia vera나 essential thrombocythemia가 있는 경우이다.[2] 유전적 요인은 protein S를 coding하는 PROS1 유전자에 생긴 유해 돌연변이(detrimental mutation)로 인해 양이 부족하거나 기능적으로 이상이 있는 protein S 단백이 생성되는 경우로 이로 인해 유전적 혈전증이 발생할 수 있다.

유전적 혈전증은 주로 항응고 인자 결핍에 의해 생기며, 대표적인 항응고 인자는 anti-thrombin III, protein C 및 protein S이다. 지금까지 보고된 바에 의하면 한국인에서 유전적 혈전증의 원인이 되는 주요 항응고 인자의 임상적 결핍증의 빈도는 protein S, protein C 및 antithrombin III 순으로 알려져 있다.[3,4] 그러나 혈전 질환자에서 유전적 요인을 규명하는 것은 혈장 단백 기능에 기초한 표현형만으로는 곤란하고 이를 입증하기 위해서는 가족 검사 및 PROS1 유전자의 분자생물학적 접근에 의한 진단이 이루어져야 한다. 따라서 지금까지 국내에서 유전적 항응고 인자 결핍증에 대해서는 protein C 및 antithrombin III에 대해서만 소수 보고되어 있으나,[4] protein S의 유전적 결핍증에 대해서는 국내 보고가 전무한 실정이다.

PROS1 유전자는 3번 염색체 3p11.1-3q11.2에 존재하며 주요 mRNA는 약 4 kb 크기로 15개의 exon과 14개의 intron (A-N)으로 구성되어 있다.[5] 같은 염색체에 exon 1은 없고 3% 정도 염기서열의 차이를 보이는 protein S를 coding하지 않는 pseudogene인 PROS2 유전자가 존재한다.

PROS1 유전자 이상으로 양적 감소 혹은 기능 이상의 protein S를 생성하는 경우 50 60대에 혈전증이 발생할 가능성이 80 90%로 혈전증의 위험도가 매우 높으며, 비교적 젊은 연령에서도 혈전증이 발생할 수 있다.[6] 이형접합형(heterozygote)에서도 혈장 protein S가 감소하며 혈전증의 위험도도 증가하는 것으로 보고되고 있는데 평소에는 별 증상이 없으나 수술, 손상, 흡연, 경구 피임약 복용, 부동자세(immobilization), 임신 등의 이차적인 위험인자가 있을 때 혈전증이 유발된다.[7] 동형접합형(homozygote)이거나 다른 유전성 항응고 인자 결핍증과 복합된 경우 조기에 심각한 혈전증이 발생할 수 있다.[8]

외국의 경우 유전적 protein S 결핍증 빈도를 일반 인구의 0.7 2.3%, 혈전증 환자인 경우에는 10%까지 보고하고 있으며, 원인 규명을 위한 PROS1 유전자에 대한 연구가 활발한 상황이다.[9] 최근까지 약 130종의 돌연변이(mutation)가 203명의 protein S 결핍증 환자에서 밝혀져 있으며 약 20종의 다형성(polymorphism) 양상이 알려져 있다.[10,11] 돌연변이 종류로는 missense mutation이 가장 흔하며, nonsense mutation, frameshift deletion, splice site abnormalities 순이며 대부분이 이형접합형이다.[10]

임상적으로 경등도의 이형접합형인 경우 평소에는 증상이 없으나 위험요인이 있을 때 혈전증이 발생할 수 있으므로 유전적 결함이 있는 가계내 무증상 가족에게 예방 조치를 취하여 혈전 발생을 감소시키는 것이 중요하다. 이를 위해 PROS1 유전자 변이에 대한 연구가 필요하나 국내에서는 PROS1 유전자에 대한 분자생물학적 접근이 아직 활발하지 않아 한국인에 대한 기본적인 자료가 전무한 실정이다. 이에 우선 임상적으로 protein S 결핍증으로 진단된 환자에서 유전적 결함의 빈도 추정과 함께 한국인에서 처음으로 PROS1 유전자 변이 양상을 관찰하여 이제까지 보고된 외국인의 변이 양상과 비교하고자 하였다. 즉, 임상적으로 진단된 protein S 결핍증에서 PROS1 유전적 결함을 규명하고자 PROS1 유전자 내 15개 exon 및 exon/intron junction 부위를 중심으로 일본인에서 보고된 protein S Tokushima[12]를 포함한 유해 돌연변이와 임상적으로 관심이 높은 exon 13번의 protein S Heerlen,[13] 3종의 다빈도 다형성인 intron K의 T/C dimorphism (PIPS1),[14] exon 15번의 3' untranslated trailer의 exonic C/A dimorphism (PEPS2)[14] 및 exon 15번의 Pro626 (G/A) dimorphism[15] 양상을 알아보았다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

1991년 1월부터 2000년 12월까지 10년간 연세의료원에 내원하여 protein S 검사가 의뢰된 환자 611명 중 protein S 활성도(activity)나 자유형 항원량(free form antigen)이 70%보다 낮은 환자 322명을 병력 및 검사결과를 토대로 아래와 같은 후천적 요인 유무를 관찰하여 그 중에서 후천적 요인이 관찰되지 않는 경우를 대상군에 포함하였다(Fig. 1).

후천적 요인에는 임신, 경구 피임제 복용, 당뇨, 신부전 등 C4b binding protein의 증가하는 경우, 미숙아, 신생아, 간질환, 비타민 K 결핍증, 경구 항응고제 및 항암적 화학요법 시술 등 proteins S의 생성이 감소하는 경우, protein S의 세포 결합이 항진되는 polycythemia vera나 essential thrombocythemia가 있는 경우를 포함하였다(exclusion criteria).[2]

대상군은 총 60명(남여 각각 30명)이었으며 평균 연령은 50세(범위 14 86, 표준 편차 20)이었다. 대상 환자의 병력 검토 상 혈전증이 있는 경우는 44명으로 혈전증의 종류는 뇌경색, 심부정맥 혈전증/폐전색증, 관상동맥질환이 대부분이었다. 정상 대조군은 건강한 성인 50명(남여 각각 25명)으로 하였다.

2. Genomic DNA 추출

말초혈액 백혈구로부터 Easy DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.

3. DNA 증폭

PROS1 유전자의 15개 exon을 1994년 발표된 Reitsma의 방법에 따라 증폭시켰다.[16] 이 방

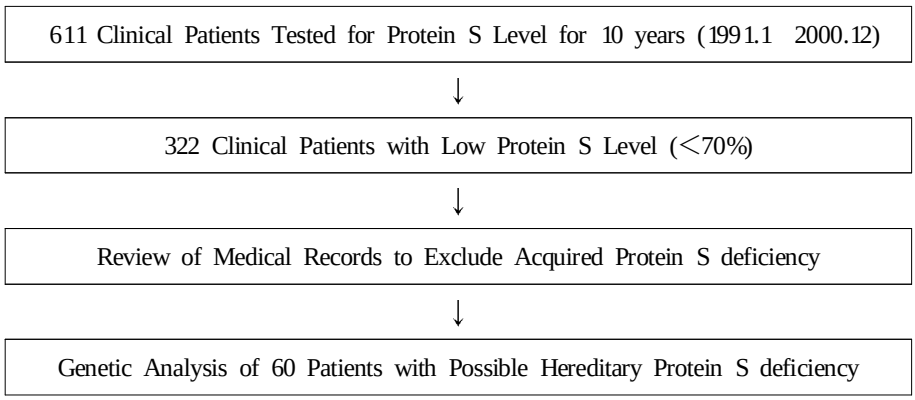

Fig. 1. Case selection strategy in this study.

법으로 PROS1에 특이적인 14쌍의 primer를 사용하여 pseudogene인 PROS2 유전자의 증폭 없이 PROS1 유전자의 exon 및 exon/intron junction 부위를 증폭할 수 있다(Table 1). 150 ng/μL의 genomic DNA 2μL, 10X buffer 2.5μL, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, primer 각각 6 pmol, 4% formamide 1μL, Taq polymerase 1-2 U을 혼합하고 최종 volume을 25μL로 맞추

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for the amplification of the PROS1 gene

Primer	Exon	Sequence*	Position†
PS-1-5	1	ttccgccgaggctcgctggg	−146 to −127
PS-1-3	1	taggagctgcagctctagag	79 to 98
PS-2-5	2	gtcatacaattcataggcag	−108 to −89
PS-2-3	2	cagaaggaagtacaggctgg	64 to 83
PS-3-5	3	gtgaaaatgatggttatatg	−125 to −106
PS-3-3	3	aggtggagagttagacagga	78 to 97
PS-4-5	4	ccatgaattcagatcaagta	−63 to −44
PS-4-3	4	ggtgtactttacctacagag	41 to 60
PS-5/6-5	5 & 6	ggcttcaggatttttattatagta	−87 to −64
PS-5/6-3	5 & 6	ctaactgggattattctcacat	37 to 58
PS-7-5	7	cacaaatcaagggttctttgg	−75 to −55
PS-7-3	7	gatcagtaatgataccacca	9 to 28
PS-8-5	8	ataagattgaaacatttaggg	−59 to −40
PS-8-3	8	caggtgagaattaagcatt	14 to 33
PS-9-5	9	tagtaaccaaacaaaaatgc	−97 to −78
PS-9-3	9	cccttatctgcttaacctct	31 to 50
PS-10-5	10	agctttctgtatttcttactc	−50 to −30
PS-10-3	10	acagactgcatcaaagtggg	29 to 48
PS-11-5	11	gtaatacttggttatttggtaat	−41 to −19
PS-11-3	11	cacacatattcaaatctattac	52 to 71
PS-12-5	12	cctatactcataatcgagcc	−69 to −50
PS-12-3	12	tgggcacacagtagatactc	91 to 110
PS-13-5	13	ctgatgcactttaggagtgc	−54 to −35
PS-13-3	13	gtaaatactgctatgtatac	55 to 74
PS-14-5	14	gcttatattgaatctttgctctg	−31 to −19
PS-14-3	14	atatgccaataaatgtcggt	138 to 157
PS-15-5	15	caagatgctaaaagtcttgg	−49 to −30
PS-15-3	15	gatagcaagagaagtccgaatttc	182 to 205

*Underlining of nucleotides denotes differences between PROS1 and PROS2.
†Numbering of the position is relative to either the 5' or 3' boundary of each exon.

어 반응을 시켰다.

반응 조건은 94°C, 5분간 pre-denaturation 후 94°C, 30초 → 49 62°C, 30 40초 → 72°C, 40 45초로 30 37 cycle 후 72°C에 10분간 반응시켰다. 단, exon 15번은 94°C, 30초 → 52°C, 30초 → 72°C, 45초로 15 cycle 반응 후 94°C, 30초 → 56°C, 30초 → 72°C, 45초로 25 cycle로 반응시켜서 DNA를 증폭시켰다. 반응 산물의 크기는 320 bp (exon 1), 349 bp (exon 2), 228 bp (exon 3), 210 bp (exon 4), 505 bp (exon 5/6), 230 bp (exon 7), 215 bp (exon 8), 262 bp (exon 9), 228 bp (exon 10), 280 bp (exon 11), 348 bp (exon 12), 280 bp (exon 13), 414 bp (exon 14) 및 416 bp (exon 15)이다.

4. Single stranded conformation polymorphism (SSCP)을 이용한 유전자 변이 검색

PCR 산물은 위에서 언급한 방법으로 증폭하였고 이 중 크기가 400 bp 이상의 증폭 산물들은 SSCP 선별검사의 민감도를 높이기 위해 제한 효소로 절단하여 사용하였다.[17] Exon 5/6는 *PstI* (Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan), exon 14는 *XmnI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA), exon 15는 *AluI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA)을 사용하여, exon 5/6은 273 bp와 232 bp, exon 14는 231 bp와 183 bp 그리고 exon 15는 170 bp, 109 bp 및 137 bp로 각각 절단하여 SSCP를 시행하였다.

7μL의 PCR 산물을 0.1% bromophenol blue, 95% formamide, 10 mM NaOH, 0.1% xylene cyanol로 구성된 denaturation 용액 3μL로 희석시켰다. 95°C에서 5분간 열을 가한 후, 즉시 4°C 얼음물에서 최소 5분간 냉각시켰다. 6% acrylamide gel에 실온에서 5μL을 loading 한 후 400 V (0.5 W/cm)로 4 6시간 전기영동 하였고 15번 exon의 경우 2시간 30분 시행하였다. Silver stain 후 결과를 관찰하였다.

5. DNA sequencing을 이용한 유전자 변이 확인

선별 검사에 이상을 보이는 경우 자동화된 DNA 염기서열 분석기를 이용하여 DNA sequencing을 시행하였다.[18] 사용한 기종은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하였다.

6. Protein S Tokushima 검색

Exon 6번의 두번째 epidermal growth factor like domain에 존재하는 Tokushima mutation은 Lys (AAG)가 Glu (GAG)로 치환된 형태로 위에서 언급한 방법으로 5/6 exon을 증폭한 505 bp 산물을 SSCP 선별검사의 민감도를 높이기 위해 제한 효소로 절단하여 사용하였다.[17] *MboI* (Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan)로 처리하여 332 bp 및 173 bp로 절단한 후 SSCP를 시행하여 Tokushima mutation이 존재하는 173 bp 분해 산물의 mobility shift를 관찰하였다.

7. Protein S Heerlen 검색

Protein S Heerlen은 exon 13번의 Ser (TCC)이 Pro (CCC)으로 치환된 형태이다. 상기 방법으로 exon 13번을 280 bp로 증폭하여 *RsaI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA)으로 처리한 후 220 bp와 60 bp로 절단되는지를 관찰하였다.[13]

8. PIPS1 (intron K) 유전자 다형성 검색

Intron K의 T/C dimorphism을 검색하기 위해 한 쌍의 external primer (PSA 및 PSD)와 한 쌍의 internal primer (PSB 및 PSC)를 사용하여 반응조건 94°C, 40초 → 56°C, 30초 → 72°C, 45초로 35 cycle 증폭시켜, T인 경우 402 bp 산물이, C인 경우 100 bp 산물이 증폭되는 것을 확인하였다. 사용한 primer들의 염기서열은 gacattccaaatgagttgtaa (PSA), tgagttccttttgtctgtaac (PSB), agaaacacacatattcaaatcta (PSC), gatcattcaagttgtcactc (PSD)이다.[14]

9. PEPS2 (3'-UTR) 유전자 다형성 검색

3' UTR의 PEPS2 C/A dimorphism을 검색하기 위해 한 쌍의 primer (PSE 및 PSF)를 사용하여 반응조건 94°C, 40초 → 55°C, 30초 → 72°C, 40초로 885 bp 산물을 증폭한 후 *AvaII* (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA)로 처리하여 A인 경우 337, 24, 348, 136 bp 분해 산물을 얻고, C인 경우 136 bp가 36 bp와 100 bp로 더 절단되는 것을 확인하였다. 사용한 primer들의 염기서열은 ggattagaatttggttggaaac (PSE), tgctgctctcaggaaaata (PSF)이다.[14]

10. Pro626 (exon 15) 유전자 다형성 검색

Exon 15번을 위에서 언급한 방법으로 증폭하여 416 bp의 산물을 *BstXI* (Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan)으로 처리하여 A인 경우 186 bp와 230 bp로 잘라지나, G인 경우 절단되지 않는 것을 확인하였다.[14]

11. 통계처리

통계처리는 SPSS 10.0 for Windows를 이용하여 protein S 결핍증과 정상 대조군의 유전적 변이의 빈도 차이를 Chi-square test로 검증하였다.

III. 결 과

1. SSCP 스크리닝 결과

대상군 60명의 각 15개 exon 및 exon/intron junction 부위의 변이를 선별한 결과 대상군의 43.3% (26/60)에서 mobility shift가 관찰되었다. Exon 15번(exon 및 exon/intron junction 포함,

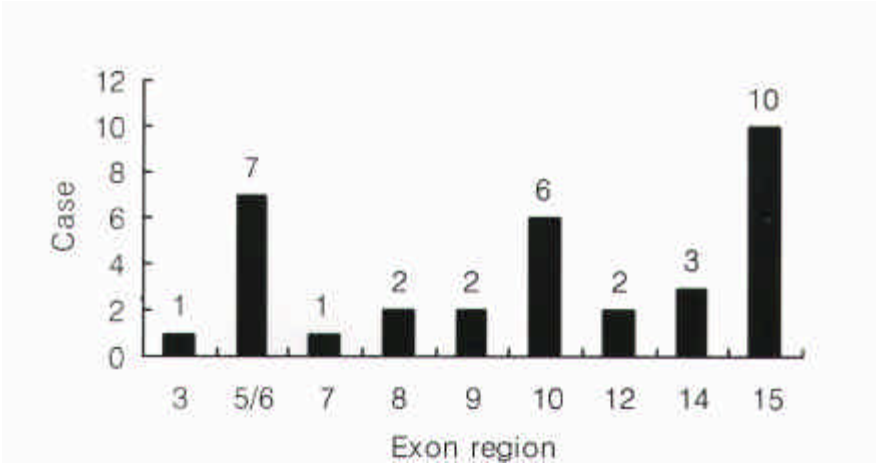

Fig. 2. The distribution of exon regions involved with mobility shifts on SSCP screening method.

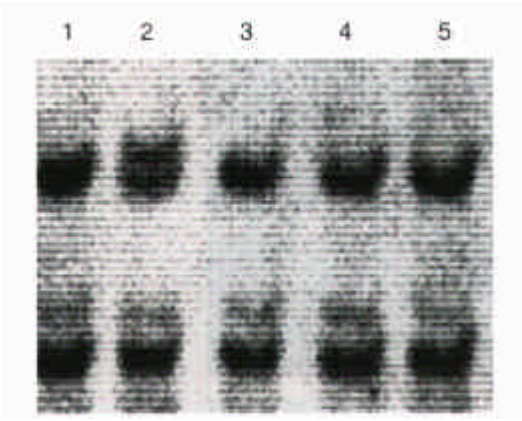

Fig. 3. SSCP screening results for exon 14 region. Abnormal mobility shift in the lane 2.

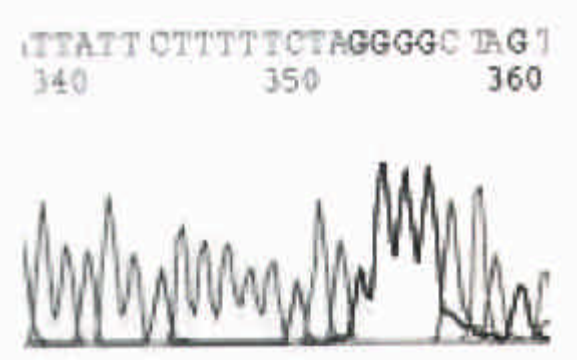

Fig. 4. DNA sequencing result with homozygous T and G insertions in intron N. DNA sequences of intron N in the PROS1 gene were TTTTTCTAGGGGC, compared with wild type TTTTCTAGGGC. Three protein S deficient patients (PSD12, 21, 53) showed the same patterns in homozygote forms.

이하 동일)에서 가장 흔히 관찰되었고, exon 5/6번, exon 10번 순이었다(Fig. 2).

2. DNA sequencing 결과

SSCP에서 mobility shift를 보인 검체를 DNA sequencing한 결과, 유해 돌연변이에 해당되는 변이는 관찰되지 않았으나, 3 case에서 아직 국제적으로 보고되지 않은 새로운 T 및 G insertion이 intron N에서 관찰되었다(Fig. 3, 4).

3. Protein S Tokushima 빈도

Protein S 결핍증 57명에서 검사 결과 protein S Tokushima가 의심되는 173 bp product의 mobility shift는 관찰되지 않았다(Fig. 5).

Fig. 5. SSCP findings for the detection of protein S Tokushima. No mobility shift was observed in SSCP findings from 57 protein S deficient patients.

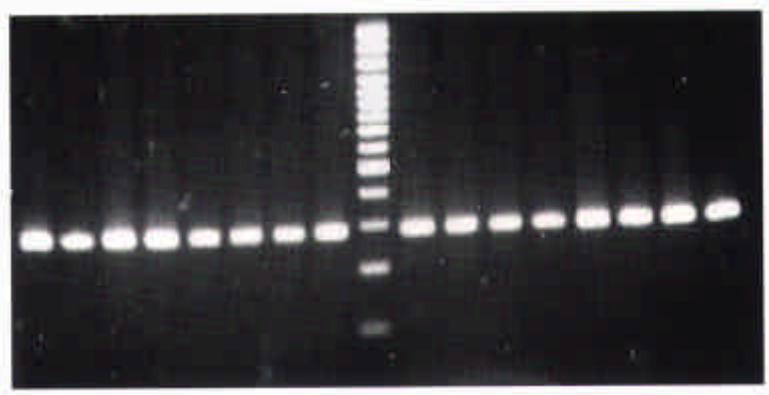

Fig. 6. PCR-RFLP findings for the detection of protein S Heerlen. Neither 57 protein S deficient patients nor 50 normal controls showed protein S Heerlen. PCR products were not digested with *RsaI* restriction enzyme.

4. Protein S Heerlen 빈도

Protein S 결핍증 57명 및 정상 대조군 50명에서 모두 T/T 유전자형을 보여 protein S Heerlen는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

5. PIPS1 (intron K) 유전자 다형성

Protein S 결핍증 56명과 정상 대조군 51명에서 PIPS1 변이를 검색한 결과, protein S 결핍증에서는 T/T 유전자형이, 정상 대조군에서는 T/C 유전자형의 빈도가 더 높았고, 대립인자 비율도 두 군간에 유의한 통계학적 차이가 있었다(P=0.002, Fig. 7, Table 2).

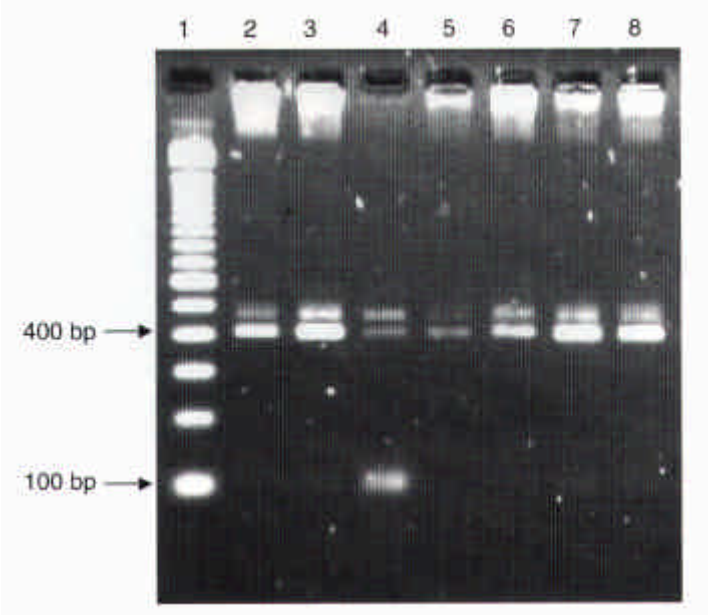

Fig. 7. PCR findings of PIPS1 polymorphism. Lane 1: size marker; lane 2 and 3: T/T (402 bp); lane 4: T/C (402 bp/100 bp).

Table 2. Genotypes and allele frequencies of PIPS1 polymorphism

	Genotype*			Allele frequency†	
	PS deficiency (n=56)	Normal control (n=51)		PS deficiency (n=112)	Normal control (n=102)
T/T	35 (62.5%)	8 (15.7%)	T	91 (0.813)	58 (0.569)
T/C	21 (37.5%)	42 (82.4%)	C	21 (0.187)	44 (0.431)
C/C	0 (0.0%)	1 (1.9%)			

*P=0.0 †P=0.002 by Chi-square test

6. PEPS2 (3' UTR) 유전자 다형성

Protein S 결핍증 60명과 정상 대조군 50명에서 PEPS2 변이를 검색한 결과 두 군 모두 C/C 유전자형의 빈도가 더 높았고, 유전자형이나 대립인자비율도 두 군간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 8, Table 3).

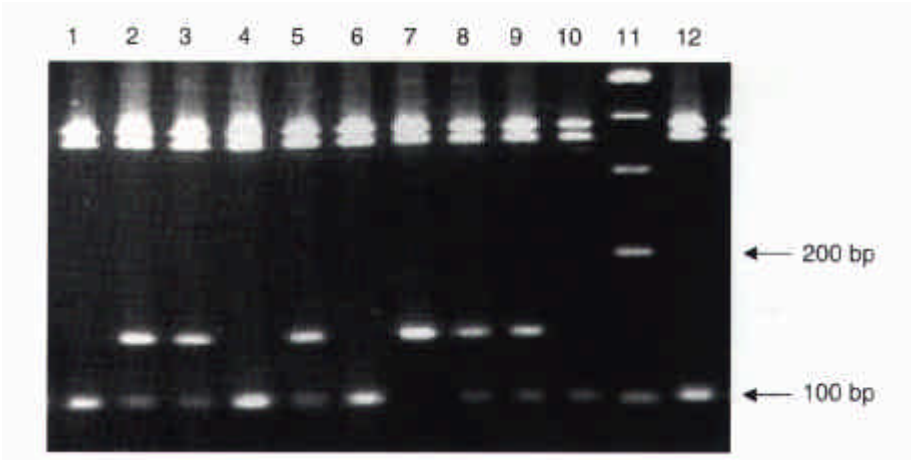

Fig. 8. PCR-RFLP findings of PEPS2 polymorphism. Lane 1: C/C; lane 2: C/A; lane 7: A/A; lane 11: size marker.

Table 3. Genotypes and allele frequencies of PEPS2 polymorphism

	Genotype*			Allele frequency†	
	PS deficiency (n=60)	Normal control (n=50)		PS deficiency (n=120)	Normal control (n=100)
C/C	41 (68.3%)	34 (68.0%)	C	99 (0.825)	84 (0.840)
C/A	17 (28.3%)	16 (32.0%)	A	21 (0.175)	16 (0.160)
A/A	2 (3.4%)	0 (0.0%)			

*P=0.987 †P=0.993 by Chi-square test

7. Pro626 (exon 15) 유전자 다형성

Protein S 결핍증 52명과 정상 대조군 48명에서 exon 15번(Pro 626) dimorphism을 검색한 결과 protein S 결핍증에서는 G/G 유전자형이 정상 대조군에서는 G/A 유전자형이 가장 많았으나, 두 군간에 유전자형이나 대립인자비율에 통계학적인 유의한 차이는 없었다(Fig. 9, Table 4).

8. Novel insertion (T and G in intron N) 발견

위에서 언급한 것처럼 protein S 결핍증 60예 중 3예에서 아직 국제적으로 보고되지 않은 새로운 T 및 G insertion이 intron N에서 관찰되었다. 정상 대조군 30명에서도 SSCP 방법으로 변이를 선별하고 염기 서열로 확인한 결과 1예에서 동일한 유전자 변이가 관찰되어

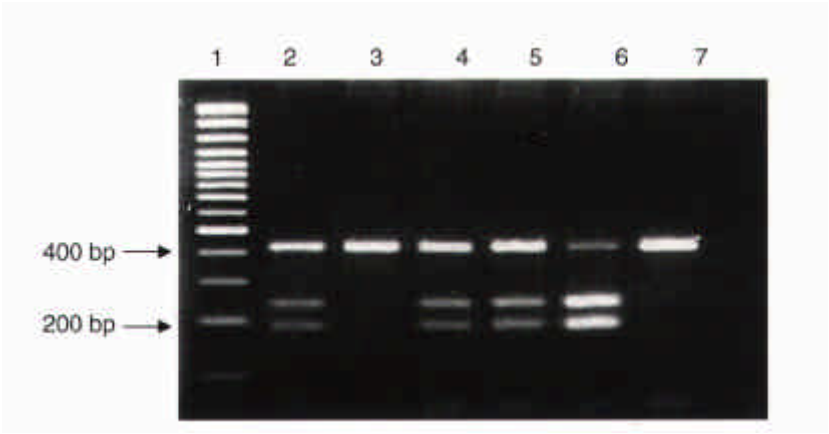

Fig. 9. PCR-RFLP of findings Pro626 polymorphism. Lane 1: size marker; lane 2: G/A; lane 3: G/G.

Table 4. Genotypes and allele frequencies of Pro626 (exon 15) polymorphism

	Genotype*			Allele frequency†	
	PS deficiency (n=52)	Normal control (n=48)		PS deficiency (n=104)	Normal control (n=96)
G/G	27 (51.9%)	18 (37.5%)	G	73 (0.702)	63 (0.656)
G/A	19 (36.5%)	27 (56.3%)	A	31 (0.298)	33 (0.344)
A/A	6 (11.6%)	3 (6.2%)			

*P=0.544 †P=0.924 by Chi-square test

protein S 결핍증에서는 5% (3/60), 정상 대조군에서는 3.3% (1/30)의 빈도를 보였다.

IV. 고 찰

혈전증은 발생 요인에 따라 유전적 및 후천적(획득성) 요인으로 구분되는데, 유전적 혈전증은 주로 항응고 인자의 결핍에 의해 일어나며, 이차적 위험인자가 있을 때 정맥 또는 동맥 혈전성 질환이 쉽게 발생한다. 가족성 protein S 결핍증이 1984년에 처음 보고된 이후 많은 증례들이 보고되고 있다.[1] 유전성 protein S 결핍증에는 3가지 유형이 있는데 제1형(type I)은 면역학적 항원량과 활성도가 모두 낮아 protein S 생성 자체의 저하로 인한 경우이며, 제2형(type II)은 면역학적 항원량은 정상이나 활성도(기능)가 저하된 경우로서 기능 이상 단백 생성이 결핍증의 원인이 되는 경우이다. 제3형(type III)은 free form이 결합 단백과의 친화력이 비정상적으로 항진되어 상대적인 활성도가 저하되는 경우이다.[1] 제1형과 제

3형은 동일한 질환의 표현형이 달리 나타나는 것으로 생각되고 있으며, 동일한 변이를 가지고 있는 가족 내에서도 표현형이 제1형이나 제3형으로 다르게 나타날 수 있다. 제2형은 드문 것으로 되어있다.

유전성 protein S 결핍증의 진단은 쉽지 않은데, 많은 후천적인 인자에 의해 protein S의 활성도나 면역학적 항원량이 영향을 받기 때문이다. Protein S는 혈액 내에서 C4b binding protein과 결합하고 있는데, 이 결합단백은 급성반응물질(acute phase reactant)로 작용하므로 염증 등 결합단백이 증가하는 조건에서는 free protein S가 감소하게 된다. 또한 protein S 생성이 저하되거나 세포 결합이 항진되는 경우에도 protein S의 감소증이 나타난다.[2] 유전성의 입증을 위해서는 가족검사 및 유전자의 분자생물학적인 접근이 필요하나, 한국인의 경우 유전적 가능성만으로 가족검사를 기피하므로 가족검사가 외국처럼 용이하지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 활성도나 항원량 검사를 통하여 protein S가 감소되어 결핍증이 진단된 대상군에서 유전자 이상이 있으면 유전적 결핍증으로 밝히고자 하였으며, 후천적 요인을 배제할 수 없는 경우를 모두 대상군에 포함하여 가능하면 유전적 결핍증을 놓치지 않으려고 하였다.

PROS1 유전자는 signal peptide (exon 1), propeptide와 GLA domain (exon 2), helical stack domain (exon 3), thrombin sensitive loop (exon 4), epidermal growth factor (exon 5 8), sex hormone binding globulin domain (exon 9 14, exon 15 일부)의 구조로 15개의 exon으로 이루어져 있다. 지금까지 약 130예의 변이(mutation) 및 20여종의 다형성(polymorphism)이 알려져 있는데, hot spot이 없이 모든 exon에 고루 분포되어 있다.[10,11] 또 PROS2라는 pseudogene이 같은 염색체에 존재하고 있으며 PROS1 active gene과 상동성이 크므로 유전자 검사에 어려움이 많다.[5] PROS1과 PROS2 유전자간에 recombination의 가능성은 알려져 있지 않다.

RPOS1 증폭이 없이 변이를 탐색하기 위해서 mRNA를 분리하여 RT-PCR 방법을 사용하기도 하나 이 방법은 시간과 노력이 많이 들고, mRNA나 processing 과정에 관여하는 유전적 변이는 검출되지 않는 단점이 있다. 본 실험에서는 1994년 발표된 Reitsma의 방법을 사용하였는데 PROS1과 PROS2 유전자간에 염기서열이 차이가 있는 곳을 선택하여 제작한 primer를 사용하여 PROS1 유전자만을 특이적으로 증폭하는 방법이다.[16] 이 방법으로 변이가 주로 일어나는 coding region과 exon/intron junction을 모두 포함하여 증폭할 수 있다. 단, exon 3번인 경우 PROS2 유전자 염기서열과 동일하고, exon 4와 exon 14인 경우 1 bp 차이인 primer를 사용하였으므로 특이성이 완벽하지는 않지만, SSCP상 mobility shift를 보인 경우 모두 염기서열 분석을 실시하여 변이의 유무와 PROS1 유전자의 특이적인 염기서열 부분을 확인하여 PROS1이 선택적으로 증폭된 것을 확인하였다.

본 연구에서 SSCP로 선별한 총 840개 검사 반응 중 34개 반응에서 mobility shift가 관찰되었으나 유해 돌연변이(detrimental mutation)에 해당되는 것은 없었다. PROS1 유전자의 exon 14번 region에서 abnormal band를 나타낸 3예는 intron N에서의 T 및 G insertion에 의한

mobility shift로 생각되었다. Exon 15에서 mobility shift를 보인 10예는 Pro626 (exon 15) dimorphism에 해당되는 부위에 G/A (7예) 또는 A/A (3예)의 유전자형을 가지고 있었다. 그 외 mobility shift를 보인 예들은 염기서열분석 결과 SSCP 검사의 위양성으로 생각되었다.

SSCP는 유전자의 mutation이나 DNA polymorphism의 변이를 선별하는 검사로 single strand나 mismatched double strand의 구조적인 변화를 검출하는 것으로, 많은 수의 검체의 변이 선별에 유용하게 사용되고 있으나, 많은 보고에서 민감도가 약 70 97%, 특이도가 49%로 알려져 있다.[19,20] Protein S의 변이는 130여종 이상 알려져 있고 hot spot이 없으므로, 특이도는 낮지만 민감도가 높은 SSCP 방법을 선택하였고, 이 방법은 다수의 검체를 선별하는 데 적합하리라 생각되었다. 본 연구에서 일본인에서 발견된 protein S Tokushima[12]는 중점을 두어 선별하였고, 임상적 관심이 높은 protein S Heerlen[13]의 빈도도 조사하였다. SSCP 변이 선별 및 염기 서열 확인 과정에서 유해 돌연변이 대신 유전자 다형성이 관찰되었으므로 빈도가 높은 유전적 다형성인 intron K의 T/C dimorphism (PIPS1)[14], exon 15번의 3' UTR exonic C/A dimorphism (PEPS2)[14] 및 exon 15의 Pro626 (G/A) dimorphism[15]을 연구 대상에 포함시켰다.

Protein S Tokushima는 1993년 Yamazaki 등이 일본인 가족에서 발견하여 보고한 변이로서 exon 6번의 epithelial growth factor like domain에 A가 G로 치환된 missense mutation이다.[21] Lys155가 Glu로 바뀌어서 기능적 이상이 있는 protein S가 생성되므로 제2형의 protein S 결핍증을 보이며 혈전증과 관련이 있다.[12,21] 하지만 182명의 정상 일본인을 대상으로 한 연구에서 1.65%가 이형접합형으로 검색되어 최근에는 다형성일 가능성도 제시되고 있다.[21] 본 연구에서는 SSCP 검사의 민감도를 높이기 위해서 505 bp exon 5/6 증폭산물을 *MboI*으로 절단한 173 bp 산물로 SSCP를 시행하여 protein S Tokushima 유무를 조사하였으나, protein S Tokushima를 검출할 수 없었다. 또한 Exon 5/6의 SSCP상 mobility shift를 보인 7예를 protein S Tokushima mutation 부위를 포함한 염기서열 분석으로 확인하였는데 모두 wild type으로 나와 한국인에서 protein S Tokushima는 드문 것으로 생각되었다.

Protein S Heerlen은 exon 13번의 potential glycosylation site에서 T가 C로 바뀐 missense mutation으로 Ser460이 Pro으로 치환된다.[13] 정상보다 분자량이 약간 작은 protein S가 생성되며 기능적인 이상은 없지만, free protein S가 C4b binding protein와 복합체를 형성하는 경향이 증가되므로 protein S Heerlen은 자유형 protein S 결핍증과 연관되어 있다.[13] Bertina 등은 protein S Heerlen이 혈전증 환자에서 0.67%, 정상인에서 0.52%의 빈도로 보고하고 이를 혈전증의 위험도는 높이지 않는 유전적 다형성으로 생각하였으나,[22] 다른 보고에서는 protein S Heerlen과 같은 제3형의 protein S 결핍증이 혈전증과의 연관되어 있음이 몇몇 연구에서 밝혀져 있으며, 자유형 protein S 결핍증시 응고 경향이 높아진다는 자료들을 들어 protein S Heerlen 자체가 주된 혈전증의 원인은 아니더라도 위험인자는 될 수 있다고 보고하고 있다.[13] 본 연구에서는 protein S 결핍증과 정상 대조군 모두에서 protein S Heerlen은

관찰되지 않아 한국인에서는 드문 것으로 생각되었다. Caucasian을 대상으로 한 외국의 보고에서도 0.52%에 불과하였다.[22]

PIPS1은 1996년에 Mustafa 등이 보고한 것으로 exon 11 근처의 intron K에 위치하는 T/C 다형성이다.[14] Protein S의 염기서열에는 영향을 미치지 않지만 빈도가 높으므로 본 연구에 포함시켰다. PIPS1의 T/C 대립인자 비율은 protein S 결핍증에서 0.813/0.187, 정상 대조군에서 0.569/0.431로서 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(P=0.002). Caucasian을 대상으로 한 외국의 연구와 비교하면 protein S 결핍증에서 T인 경우 외국 0.920/한국 0.813이었고, C가 외국 0.08/한국은 0.187이었고, 정상 대조군은 T인 경우 외국 0.760/한국 0.569이었고, C가 외국 0.240/한국은 0.431로 다소 차이가 있었다.[14]

PEPS2도 protein S의 염기서열에는 영향을 미치지 않지만 빈도가 높은 다형성으로 exon 15번의 3‘ untranslated region에 존재하는 C/A dimorphism이다.[14] 본 연구에서 protein S 결핍증과 정상 대조군 모두 C/C 유전자형의 빈도가 더 높았다. PEPS2의 C/A 대립인자 비율은 protein S 결핍증에서 0.825/0.175, 정상 대조군에서 0.840/0.160으로서 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.993). Caucasian을 대상으로 한 외국의 연구와 비교하면, protein S 결핍증에서 C인 경우 외국 0.850/한국 0.825이었고, A가 외국 0.150/한국 0.175이었고 정상 대조군은 C인 경우 외국 0.830/한국 0.840이었고, A가 외국 0.170/한국은 0.160으로 유사한 빈도를 보였다.[14]

Exon 15번의 Pro626(G/A) 다형성은 1991년에 Diepstranten이 처음 보고한 다형성으로 정상 Caucasian 인을 대상으로 한 외국의 연구의 경우 대립인자 비율에 있어서 G가 0.480, A가 0.520으로 보고되어 있다.[15] Pro626 (exon 15) 부위의 G/A 대립인자 비율은 protein S 결핍증에서 0.702/0.298, 정상 대조군에서 0.656/0.344로서 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.924).

Exon 14번의 intron 부위에서 관찰된 T 및 G insertion은 아직 국제적으로 보고되지는 않은 변이로서 coding region이 아니고 정상인에서도 발견되었기 때문에 유전적 protein S 결핍증에 직접적인 연관이 없는 다형성으로 사료되었다. 빈도는 protein S 결핍증에서 5% (3/60)이었고 정상 대조군은 3.3% (1/30)이었다.

본 연구의 목적은 한국인에서 임상적으로 protein S 결핍증을 나타낸 환자에서 유전적 원인이 차지하는 빈도를 알기 위함이었으나 유해한 돌연변이는 관찰되지 않았으며 한국인에서 임상적으로 관찰되는 protein S 결핍증의 대부분이 유전적 요인보다는 후천적 요인에 의해 발생되는 것으로 생각되었다. 이는 비록 SSCP로 변이를 선별하였으므로 SSCP 민감도의 한계가 있겠으나 임상적으로 관찰되는 결핍증을 모두 유전적으로 간주될 수 있는 오류를 실험적으로 반증한 것으로 생각된다. 따라서 최근의 교과서에서 기술된 바와 같이 protein S 결핍증의 원인이 유전적인 것보다는 후천적이므로 고비용의 분자유전학적 접근보다는 가족검사를 실시하는 것이 좋을 것으로 생각한다. 결론적으로 한국인 protein S 유

전적 결핍증은 SSCP의 민감도를 고려할 때 1% 이하로 매우 드물며 외국에서 보고된 protein S Tokushima 및 protein S Heerlen도 발견되지 않았다. 한편 다형성에 해당되는 유전자 변이는 외국의 양상과 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

V. 결 론

한국인에서 임상적으로 protein S 결핍증을 나타낸 환자에서 유전적 원인이 차지하는 빈도를 알기 위해 protein S 활성도나 자유형 항원량 검사를 통해 임상적으로 진단된 protein S 결핍증 환자를 대상으로 PROS1 유전자내 15 exon 및 exon/intron junction 부위에서 protein S Tokushima를 포함한 돌연변이 유무와 임상적 관심이 높은 protein S Heerlen, 3종의 다빈도 다형성인 intron K의 T/C (PIPS1), exon 15번의 C/A (PEPS2), exon 15번의 Pro626 (G/A) 양상에 대하여 조사하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한국인에서 임상적으로 protein S 결핍증을 나타낸 환자의 경우 유전적 원인보다는 후천적 원인에 의할 가능성이 높은 것으로 생각되었다.
2. 한국인의 유전적 결핍증은 1% 이하로 매우 드문 것으로 추정되며, 외국에서 보고된 protein S Tokushima 및 protein S Heerlen도 발견되지 않았다.
3. PROS1 유전자의 다빈도 다형성(PIPS1, PEPS2, Pro626) 양상은 외국의 양상과 다소 차이가 있었으며, 외국인과는 달리 PIPS1의 경우 T 대립인자 비율이 protein S 결핍증에서 정상 대조군에 비해 유의하게 높았다.

결론적으로, SSCP 민감도의 한계가 있겠으나 임상적으로 관찰되는 protein S 결핍증의 대부분이 유전적 결함보다는 후천적 요인에 의한 것으로 사료되었다. 이는 임상적으로 관찰되는 결핍증을 모두 유전적으로 간주할 수 있는 오류를 배제하는 데 도움이 되는 자료로, 향후 원인 규명에 있어서 고비용의 분자유전학적 유전자 검사보다는 후천적 요인에 대한 고려와 가족검사를 통한 진단적 접근이 바람직할 것으로 생각되었다. 또한 PROS1 유전자 변이 양상(polymorphism)이 외국인과는 차이가 있으며, 특히 PIPS1 유전자 다형성의 임상적 의의에 대하여는 보다 많은 한국인에서의 연구가 필요한 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Goodnight SH, Griffin JH. Hereditary thrombophilia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. Williams Hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill: p.1702-3.
2. Bauer KA. Hypercoagulable states. In: Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. editors. Hematology: basic principles and practice. 3rd ed. Phil-

adelphia: Churchill Livingstone: p.2019-20.
3. **이안나, 송경순. 유전적 혈전증 진단을 위한** ATIII, protein C **및** S, APC resistance **선별검사 결과. 한국지혈혈전학회지** 1995:2:147-54.
4. **김인호, 박선양, 이종태, 방수미, 김효수, 김병국 등. 한국인의 유전성 혈전증. 대한내과학회잡지** 1996;51:732-42.
5. Schmidel DK, Tatro AV, Phelps LG, Tomczak JA, Long GL. Organization of the human protein S genes. Biochemistry 1990;29:7845-52.
6. Ingrid P, Barbara S. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency: a cooperative, retrospective study. Arterioscl Throm Biol 1996;16:742-8.
7. Bertina RM. Hereditary protein S deficiency. Haemostasis 1985;15:241-6.
8. Formstone CJ, Hallam PJ, Tuddenham EGD, Voke J, Layton M, Nicolaides K, et al. Severe perinatal thrombosis in double and triple heterozygous offspring of a family segregation two independent protein S mutations and a protein C mutation. Blood 1996;87:3731-7.
9. Broekmans AW, Van der Linden IK, Jansen-Koeter Y, Bertina RM. Prevalence of protein C (PC) and protein S (PS) deficiency in patients with thromboembolic disease. Thromb Res 1986;suppl 6:135a.
10. Gandrille S, Borgel D, Ireland H, Lane DA, Simmonds R, Reitma PH, et al. Protein S deficiency: a database of mutations for the plasma coagulation inhibitors subcommittee of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. Thromb Haemost 1997;77:1201-14.
11. Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, et al. Protein S deficiency: a database of mutations-summary of the first update for the plasma coagulation inhibitors subcommittee of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. Thromb Haemost 2000;84:918.
12. Hayashi T, Nishioka J, Shigekiyo T, Saito S, Suzuki K. Protein S Tokushima: abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor like domain of protein S. Blood 1994;83:683-90.
13. Duchemin J, Gandrille S, Borgel D, Feurgard P, Alhenc-Gelas M, Matheron C, et al. The Ser 460 to Pro substitution of the protein Sα (PROS1) gene is a frequent mutation associated with free protein S (type IIa) deficiency. Blood 1995;86:3436-43.
14. Mustafa S, Pabinger I, Mannhalter C. Two new frequent dimorphisms in the protein S (PROS1) gene. Thromb Haemost 1996;76:393-6.
15. Diepstraten CM, Ploos van Amstel HK, Reitsma PH, Bertina RM. A CCA/CCG neutral dimorphism in the codon for Pro 626 of the human protein S gene PS-α (PROS1). Nucleic Acids

Res 1991;19:5091
16. Reitsma PH, Ploos van Amstel HK, Bertina RM. Three novel mutations in five unrelated subjects with hereditary protein S deficiency type I. J Clin Invest 1994;93:486-92.
17. Gomez E, Poort SR, Bertina RM, Reitsma PH. The usefulness of single-strand DNA conformation polymorphism analysis to detect mutations in protein C deficiency. Blood Coagul Fibrin 1997;8:497-502.
18. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Short protocol in molecular biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.;1999.
19. Wikman FP, Katballe N, Christensen M, Laurberg S, Orntoft TF. Efficient mutation detection in mismatch repair genes using a combination of single-strand conformational polymorphism and heteroduplex analysis at a controlled temperature. Genet Test 2000;4:15-21.
20. Buzin CH, Wen CY, Nguyen VQ, Nozari G, Mengos A, Li X, et al. Scanning by DOVAM-S detects all unique sequence changes in blinded analysis: evidence that the scanning conditions are generic. Biotechniques 2000;28:746-53.
21. Yamazaki T, Sugiura I, Matsushita T, Kojima T, Kagami K. Takamatsu J, et al. A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. Thromb Res 1993;70:395-403.
22. Bertina RM, Ploos van Amstel HK, van Wijngaarden A, Coenen J, Leemhuis MP, Deutz-Terlouw PP, et al. Heerlen polymorphism of protein S, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 460. Blood 1990;76:538-48.

Abstract

Genetic analysis of PROS1 gene in clinical patients with protein S deficiency

Young Ah Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
Department of Medicine The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung Soon Song)

Protein S is a vitamin K dependent protein whose inherited deficiency is a well recognized risk factor for thrombosis. Elucidation of the gene defect responsible for protein S deficiency is proceeding rapidly and over 130 mutations in the protein S gene (PROS1) as well as the three frequent polymorphisms and 18 different sequence variations have been identified to date. However, only a few cases with protein S deficiency, which were diagnosed on the basis of phenotypic measurements of plasma levels, have been reported without evidence of genetic mutation in Korea. Therefore, this study performed genetic analysis of PROS1 gene in clinical patients with low plasma protein S level to detect detrimental mutations or sequence variations including the three frequent polymorphisms, thereby, in order to estimate the prevalence of hereditary defects and to establish allelic frequencies in Koreans.

Genomic DNA amplifications from protein S deficient patients (n=60) for each of the 15 individual exons and exon/intron junction regions of the PROS1 gene were screened according to the protocol by Reitsma, et al. (1994) using single stranded conformation polymorphism (SSCP) method, and direct DNA sequencings were performed in the cases with mobility shift on SSCP screening. In addition, PCR-RFLP analysis for protein S Heerlen, which is not clear whether this mutation is a polymorphism or a detrimental mutation, as well as for three frequent polymorphisms including PIPS1 (intron K T/C), PEPS2 (3' UTR of exon 15 C/A) and Pro626 (exon 15), were also carried out in the protein S deficient patients and in normal controls (n=50).

Any detrimental mutation including Protein S Tokushima, which was identified in Japanese families, as well as protein S Heerlen, was not found in all patients with protein S deficiency. A novel polymorphism of T and G insertions in the intron N near exon 14 was found in 3 patients, which also occurred in 1 normal control. The PIPS1 allelic frequencies of T/C were 0.813/0.187 in the patient group and 0.569/0.431 in normal control group, which were significantly different (P=0.002). The allelic frequencies of C/A PEPS2

and G/A Pro626 were 0.825/0.175 and 0.702/0.298 respectively in the patient group, and 0.840/0.160 and 0.656/0.344 in normal control group, which were not statistically different.

In conclusion, the prevalence of hereditary protein S deficiency in Korean population seems to be very rare, suggesting that acquired protein S deficiency takes most part of protein S deficiency rather than hereditary defects in clinically diagnosed cases. The established allelic frequencies of three frequent polymorphisms and a novel polymorphism detected in this Korean study suggest that there is some ethnic difference, compared with other populations including Caucasians.

Key Words: hereditary protein S deficiency, PROS1 gene, mutation, polymorphism