원 저

대한신경과학회지 17(6):848~852, 1999 ISSN 1225-7044

한국인에서 Charcot-Marie-Tooth 1A 질환의 분자유전학적 분석

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 생화학 분자 생물학교실*, 소아과학교실**,
세포유전학 검사실***, 부산대학교 의과대학 신경과학교실****

김승민 최병옥 선우일남 안용호* 이진성** 박보배*** 김대성****

Molecular Genetic Analyses of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A in Korean

Seung-Min Kim, M.D., Byung-Ok Choi, M.D., Il-Nam Sunwoo, M.D., Yong-Ho Ahn, M.D.*, Jin-Sung Lee, M.D., Bo-Bae Park***, Dae-Seung Kim, M.D.******

Department of Neurology, Biochemistry & Molecular biology, Pediatrics**,
Clinical research center***, Yonsei University Medical College
Department of Neurology, Pusan University Medical College*****

Background : Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) is an autosomal dominant inherited demyelinating peripheral neuropathy characterized by progressive distal muscular atrophy and marked slowing of nerve conduction velocities. A 1.5 Mb DNA duplication within chromosome 17p11.2-p12 has been reported. This disease appears to be caused by an altered copy number of the PMP-22 gene within the critical region. **Methods** : DNA analysis was carried out for 158 persons from 40 unrelated families. PCR was done by D17S122 and D17S261. The DNA of the patients was analyzed to detect three alleles for the presence of duplication. **Results** : CMT1A duplication was found in 7 families (64%) of the patients with CMT1 by D17S122, but not by D17S261. **Conclusions** : We have found seven families of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with chromosome 17p11.2-p12 duplication by D17S122. We recommend the screening test by D17S122 for the detection of CMT1A in Korean because genetic analysis done by D17S261 was not informative.
J Korean Neurol Assoc 17(6):848~852, 1999

Key Words : Charcot-Marie-Tooth disease, CMT1A, Duplication, D17S122, D17S261, Ethnic difference

서 론

분자유전학의 발전으로 이제까지 확실하지 않았던 여러 유전성 질환들의 본질이 규명되면서 질병에 대한 진단과 치료의 개념이 변화하고 있으며, 질병의 분류도 많이 달라지고 있는데 그중 대표적인 것이 Charcot-Marie-Tooth (이하 CMT로 약함) 질환이다.[1] CMT 질환은 과거에는 하지 원위부의 근위축으로 인하여 샴페인 병을 거꾸로 세운 듯한 다리모양을 하는 질환으로 비교적 단순하게 인식되어 왔으나, 현재는 하나의 질환군 (syndrome) 으로 인식되고 있다.[2] 분자 생물학적 측면에서 이 질환의 원인이 밝혀지면서, 신경을 둘러싸는 수초단백의 구성요소들이 다양할 것으로 생각되고 있으며 이러한 병인에 의해 CMT 질환의 분류체계가 보다 세분화되고 있다.[3-6]

CMT type 1 (CMT 1형) 은 유전자의 이상에 따라 CMT 1A, CMT 1B, CMT 1C등으로 나누는데 이중 CMT 1A는 CMT 1형중에서 가장 많은 비율을 차지한다.[1-3] CMT 1A는 염색체 17p11.2-p12에서 1.5Mb의 중복을 보이는 것이 주된 원인으로 알려져 있으며 이외에 드물지만 PMP-22유전자의 점상 돌연변이 (point mutation) 도 보고되고 있다.[5,6,9] 유전자의 중복은 중복된 1.5 Mb의 내부에 위치하는 표지자로 흔히 D17S122, D17S125, D17S261등을 이용한 PCR로 검사한다.[3-7,13]

CMT 질환은 서양에서는 2500명중 1명으로 흔하다고[1-3] 하지만 한국인에서는 비교적 드물다고 추측되고 있는데 그 이유는 CMT 질환의 유전성 및 만성적이라는 특성 때문에 숨겨져 있을 가능성도 있지만 종족간 차이 (ethnic difference) 때문일 수도 있다고 생각된다.[16,17]

저자 등은 임상양상, 신경전도 검사 및 신경생검 등으

Manuscript received April 14, 1999.
Accepted in final form July 24, 1999.
* Address for correspondence
Il-Nam Sunwoo, M.D.
Department of Neurology,
Yonsei University Medical College
C.P.O. Box 8044, Seoul, 120-752, Korea
Tel : +82-2-361-6099, Fax : +82-2-393-0705
E-mail : neuro@yumc.yonsei.ac.kr

로 CMT 질환으로 진단된 환자 및 가족들을 대상으로 CMT 1A를 검사하기 위해 D17S122와 D17S261을 사용한 유전자 검사를 시행하여 한국인에서 CMT 1A의 빈도 및 유전적 특성을 알아보고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

연세의료원 신경과 전기 생리학 검사실의 데이터베이스에서 1984년부터 1998년까지 15년간 CMT 질환으로 추정 진단된 환자들을 대상으로 하였다. 각 환자들을 면접 진찰하고 본 질환에 대하여 충분히 설명한 다음 유전자 검사의 동의를 구하였으며 동의한 환자와 그 가족 구성원들을 대상으로 채혈하고 검사하였다.

2. Genomic DNA의 추출

환자의 말초혈액 10 ml를 EDTA 튜브에 채취하고, 10배의 핵 추출 완충액 (0.3 M Sucrose, 10 mM TrisHCl, 5 mM $MgCl_2$, 1% Triton-X100, pH 7.5) 을 첨가하여 실온에서 15분간 놓아둔 후 2500 r.p.m.에서 15분간 원심분리하였다. 원심 분리후 침전물에 융해 완충액 2 ml (0.075 M NaCl, 0.024 M EDTA, pH8.0) 와 10 % SDS 125 μl, Proteinase K (10 mg/ml) 50 μl를 첨가한 다음 55 ℃에서 2시간 동안 놓아 두었다. 위의 샘플에 같은 부피의 페놀 액으로 2회, Chloroform/Isoamylalcohol (24:1) 로 3회 처리하고 0.1 volume의 3 M sodium acetate, 2 volume의 무수 에탄올을 첨가하여 DNA를 추출하였다.

3. D17S122와 D17S261을 이용한 PCR

추출된 환자 및 가족의 genomic DNA에서 염색체 17p11.2-12 부위에 위치하며 short tandem repeats polymorphism을 보이는 D17S122 (Bioneer) 와 D17S261 (Bioneer, Bionics) 를 이용하여 유전자좌의 중복 여부를 검사하였다. D17S122의 sense primer 염기 서열은 5 'CAGAACCACAAAATGTCTTGCATTC3 '을 antisense primer의 염기 서열은 5 'GGCCA-GACAGACCAGGCTCTGC3 '을 사용하였다. D17S261 sense primer의 염기 서열은 5 'CAGGTTCT-GTCATAGGACTA3 '을 antisense primer의 염기 서열은 5 'TTCTGGAAACCTACTCCTGA3 '을 사용하였다. 각 primer set의 sense strand primer는 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 [Y-32P]ATP로 5 '-end labeling을 하였다. 반응 조건은 primer 10 pmole, 10 X kinase buffer 0.5 μl, [Y-32P]ATP 2 μl, H_2O 0.5 μl, T4 kinase 0.5 μl (10 units) 를 첨가하여 최종 반응 부피는 5 μl로 하고 37 ℃에 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Sephadex-50 (Phamacia) column으로 unlabeled isotope을 제거하였다.

PCR은 labelled primer 0.5 μl, antisense primer 20 pmole, 10 x PCR buffer, dNTP 2.5 mM, template 500 ng, Taq polymerase (Takara) 1 unit를 첨가하였으며 최종 부피는 25 μl로 하였다. PCR program은 7분간의 initial denaturation후, 94 ℃에서 1분, 60 ℃에서 1분, 72 ℃에서 30초로 하여 35회 반복하였다. 반응이 끝난 후, PCR 산물의 2 μl를 취해 gel loading buffer 1 μl를 첨가하여 6 % acrylamide/8 M urea denaturing gel에 35 watt로 약 2시간 30분간 전기영동하였다. 전기 영동이 끝난 후 gel을 15 % acetic acid 용액에서 고정한 후 헤어 드라이어로 건조시키고 X-ray 필름을 붙여 -70 ℃에서 약 12~15시간 노출시킨 다음 이를 현상하여 결과를 판독하였다.

4. PMP22 유전자의 sequencing

PMP22 유전자의 중복이 없었지만 CMT 1형으로 생각되는 환자들에서 genomic DNA로 PMP22 유전자의 4개의 exon에 대해 sequencing을 시행하였다. 사용한 primer의 서열은 다음과 같다. 엑손 (exon) 1의 sense primer, CTCCTCGCAGGCAGAAACTC, antisense primer, CTGAACCAGCAGGAGCACGGG, 엑손 2의 sense primer, TCAGGATATCTATCTGATTCTC, antisense primer, AAGCTCATGGAGCACAAAACC, 엑손 3의 sense primer, TGGCCAGCTCTCCTAAC, antisense primer, CACCCCGCTTCCACATG, 엑손 4의 sense primer, GCCATGGACTCTCCGTC, antisense primer, CCTATGTACGCTCAGAG를 사용하였다. PCR은 환자의 genomic DNA의 약 500 ng을 template로 하였고, 각각의 primer 25 pmole, dNTP 1.25 mM, 10 mM TrisHCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01 % gelatin, 1 unit Tag polymerase가 포함된 조건에서 시행하였다. 사용한 PCR program은 Thermal cycler (Perkin-Elmer) 를 이용하여 94 ℃에서 8분간 초기 변성을 시킨 후 94 ℃에서 1분간 denaturation, 60 ℃에서 1분간 annealing, 72 ℃에서 30초간 polymerization시켰으며, 같은 반응을 35회 반복하였다. PCR 샘플의 1/20을 0.8 % agarose gel에 전기영동하여 PCR의 산물을 확인하였다. 선택적으로 증폭된 각 exon의 PCR의 산물은 Sequenase (USB, U.S.A.) 를 이용하여 Direct DNA sequencing을 시행하였는데 상기 반응후 샘플은 6 % polyacrylamide / 8 M urea denaturation gel에 35 watt로 약 2시간 30분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 유리판에 붙인 채로 건조시키고 X-ray 필름을 붙여 상온에서 2~3일간 노출시킨 후 현상하였다.

결 과

임상 양상 및 신경전도 검사 혹은 신경조직 검사상 CMT 질환으로 추정 진단되었고 유전자 검사를 시행한 환자 및 가족은 모두 40가족 158명이었는데 이중 CMT 1형의 임상 진단은 11가족 50명, CMT 2형 12가족 33명, CMT 3형 (Dejerine-Sottas) 4가족 29명, CMT X형 4가족 16명, CMT 5형 (HMSN type 5) 2가족 11명과

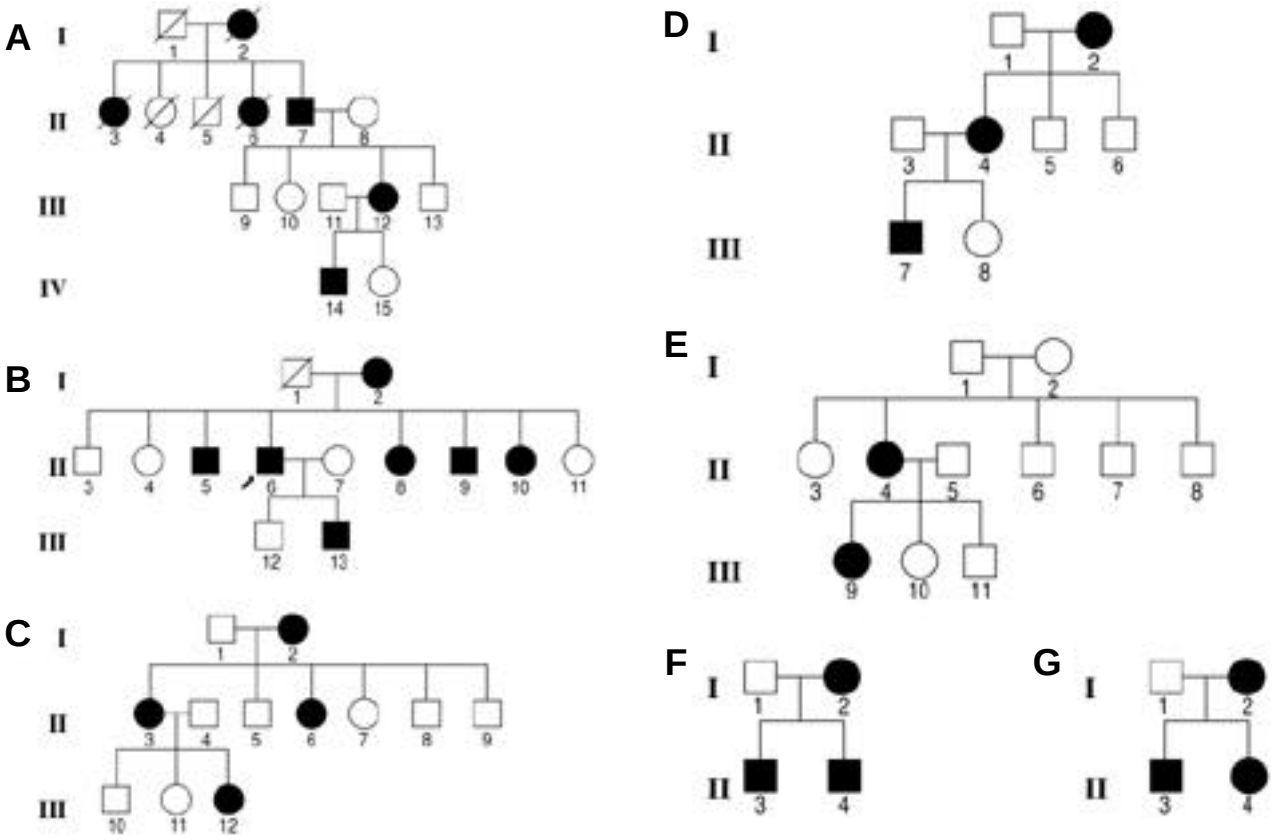

Figure 1. Charcot-Marie-Tooth pedigrees analysed in this study. All families with evidence of duplication at the D17S122 locus (A,B,C,D,E,F,G).

유형을 정확하게 분류할 수 없는 7가족 19명이었다. CMT 1형은 11가족 모두에서 뚜렷한 상염색체 우성 (autosomal dominant) 의 가족력을 보였다.

총 158명을 대상으로 D17S122와 D17S261을 이용하여 염색체 17p11.2-p12의 중복 (duplication) 을 검사하였는데 이중 7가족 16명에서 유전자의 중복을 확인하여 CMT 1A로 진단할 수 있었는데 (Fig. 1), 이것은 CMT 1형으로 임상 진단된 환자의 64 %였다.

D17S122와 D17S261을 사용하여 유전자 검사를 시행한 결과를 비교하면 D17S122를 사용한 검사에서는 7가족 모두에서 유전자의 중복이 확인되었으나 D17S261에서는 이들 모두에서 유전자의 중복이 관찰되지 않았다 (Fig. 2). Fig. 2-A은 D17S122를 이용한 유전자 검사 결과로서 환자 (A14), 외할아버지 (A7) 및 어머니 (A12) 에서 유전자의 중복에 의한 3개의 대립인자를 관찰할 수 있었는데 a3과 a6이 중복에 의한 대립인자로 3대에 걸쳐서 유전되고 있는 것을 보여주고 있다. 그러나 같은 가족인데도 D17S261을 사용한 검사에서는 중복에 의한 3개의 대립인자가 발견되지 않았다 (Fig. 2-B). Fig. 2-C의 E 환자 가족에서도 D17S122를 사용하여 검사한 경우에는 환자 (E9) 와 어머니 (E4) 에서 중복에 의한 a3과 a4의 대립인자가 관찰되었으나 D17S261을 사용한 결과에서는 3개의 명확한 대립인자를 발견할 수 없었다 (Fig. 2-D). 이외에도 D17S122를 사용하여 유전자의 중복이 확인된 나머지 5가족에서도 D17S261을 사용하였을 때에는 비정보적 (non-informative) 이었으며 유전자의 중복을 확인할 수 없었다. 실험오류일 가능성을 배제하기 위하여 기존 보고에서의 sequence를 확인하고[4,13] 다른회사 (처음에는 Bioneer, 후에는 Bionics) 에서 primer제작을 의뢰한 다음 다른 실험실 및 연구원에 의하여 반복 실험을 하였으나 역시 같은 결과를 나타내었다.

CMT 1형인 11가족을 대상으로 PMP22유전자의 점상 돌연변이 (point mutation) 을 알아보기 위하여 4개의 엑손 (exon) 각각에 대해 sequencing을 시행하였지만 PMP22유전자에 점상 돌연변이를 가진 가족은 없었다.

고 찰

CMT 질환은 원인이 되는 유전자의 이상과 그 임상형 (phenotype) 이 매우 다양한 양상을 보이는 질환으로 서서히 진행하는 하지 원위부의 근위축 및 감각저하, 발의 기형, 보행 장애 등을 특징으로 한다.[1-5] CMT 질환은 임상양상, 신경전도 검사 및 신경생검 소견등에 의해 CMT 1형과 CMT 2형으로 나누어 지는데, CMT 1형은 분자 유전학적인 차이에 의해 말초 수초 단백 (peripheral myelin protein) 을 만드는 PMP-22 유전자의 변이에 의한 CMT 1A, 20kDa의 수초 단백인 protein zero (P0) 를 만드는 유전자의 점상 돌연변이에 의한 CMT 1B 그리고 유전자 변이가 알려져 있지 않은 CMT 1C로 나누며, CMT 2

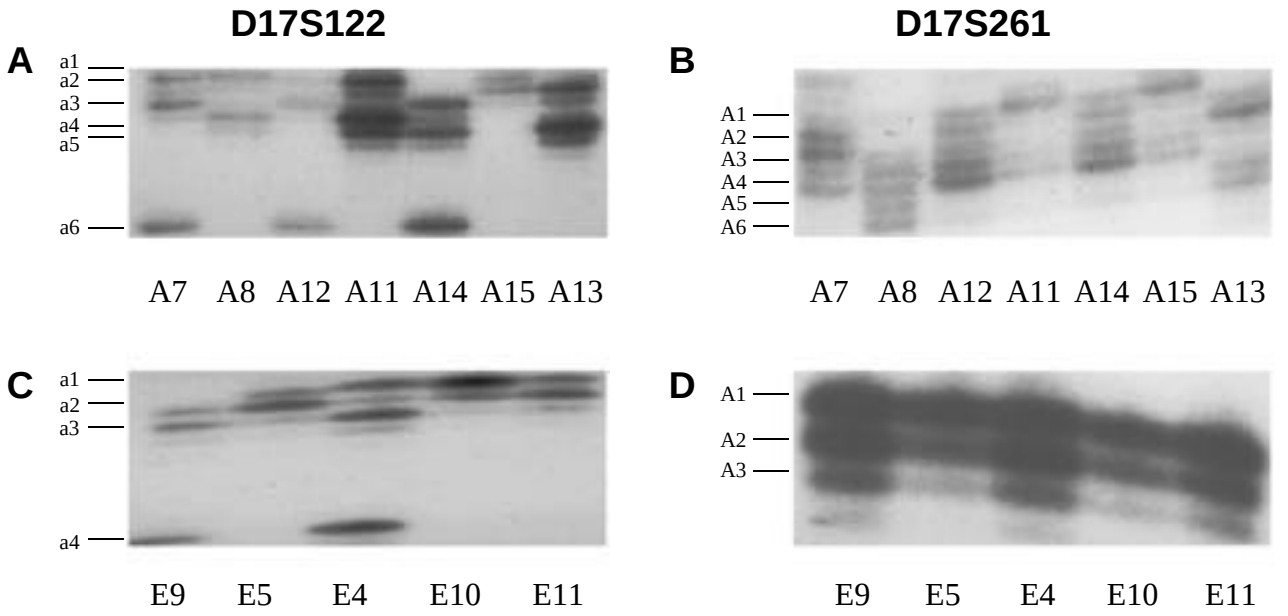

Figure 2. Examples for marker loci D17S122 (family A and E) and D17S261 (family A and E). The genotype of the family members is shown above each lane.

형은 2A, 2B, 2C, 2D등으로 세분화된다.[19-26] CMT 1A는 CMT 1형중 가장 흔하다고 하는데 주로 PMP-22 유전자를 포함하는 염색체 17p11.2-p12의 중복에 의하지만 드물게 PMP-22 유전자의 점상 돌연변이에 의한 것이 알려져 있다.[5,27-29] CMT 1A의 빈도는 본 연구 결과 CMT 1형의 64%로 서구에서의 빈도인 68 %~82.5 %와 비교할 때 약간 낮았다.[1-6,8-11]

유전자의 중복을 확인하기 위해 본 연구에서는 염색체 17p11.2-p12의 1.5Mb내에 위치하는 유전자좌로 D17S122와 D17S261을 사용하였는데, 서양인들을 대상으로 시행한 연구 결과에 의하면 이들 2가지 모두는 CMT 1A뿐만 아니라, 같은 유전자 부위에서 결손을 보이는 HNPP의 진단에도 유용하다고 보고되고 있다.[12-19] 그러나 저자 등의 연구 결과에 의하면 D17S122를 사용한 실험에서는 서구에서와 같은 결과를 보여주었으나 D17S261을 사용한 경우에는 CMT 1A진단에 도움이 되지 않는 것으로 나타났는데 이 결과는 다른 회사의 primer를 이용한 다른 실험실의 다른 연구원에 의해서도 같은 결론이었다. 따라서 한국인에서는 D17S261으로는 염색체 17p11.2-p12의 유전자 중복을 찾을 수 없는 것으로 보이는데 이것이 종족간 차이 때문인지에 대해서는 추가 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

CMT 1A에서 PMP22 유전자의 점상 돌연변이(point mutation)는 이제까지 10가족 정도만 보고되었을 정도로 매우 드문 것으로 알려져 있는데 점상 돌연변이가 있는 CMT 1A질환은 임상 증상이 유전자의 중복이 관찰되는 경우에 비하여 그 정도가 심한 것으로 알려져 있다.[5,27-29] 저자 등도 CMT 1형의 환자들을 대상으로 PMP22 유전자의 4개의 엑손 (exon) 을 모두 검사하였지만 점상 돌연변이를 발견할 수 없었다.

임상양상, 신경전도 검사 및 신경생검 소견상 CMT 질환으로 진단된 40가족 158명을 대상으로 D17S122와 D17S261을 사용하여 염색체 17p11.2-p12의 유전자 중복을 검사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, D17S122를 사용하여 7가족에서 염색체 17p11.2 -p12의 중복을 확인하였는데 이는 CMT 1형 (11가족) 중의 64%에 해당하였으며 서구인을 대상으로한 결과와 비교할 때 약간 낮은 빈도였다. 둘째, D17S261을 사용한 검사에서는 7가족 모두에서 유전자 중복을 관찰할 수 없었다. 셋째, PMP22 유전자의 점상 돌연변이에 대한 검사를 11가족에서 시행하였으나 이상소견은 관찰되지 않았다.

따라서 한국인 환자에서 CMT 1A을 검사하기 위한 선별검사에서는 D17S261보다 D17S122를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Chance PF, Pleasure D. Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Arch Neurol* 1993;50:1180-1184.
2. Harding AE. From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain* 1995;118:809-818.
3. Ionasescu VV. Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 1995;18:267-275.
4. Lupski JR, Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, et al. DNA Duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66:219-232.
5. Roa BB, Garcia CA, Suter U, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A association with a spontaneous point mutation in the PMP-22 gene. *New Engl J Med* 1993;329 (2):96-101.

6. Dyck PJ, Chance PF, Lebo RV et al. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Friffin JW, Low PA, Poduslo JF, editors. Perpheral neuropathy, 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders Co., 1993:1094-1136.
7. Wise CA, Garcia CA, Davis SN, et al. Molecular analysis of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;53:853-863.
8. Ionasescu VV, Ionasescu R, Searby C. Screening of dominantly inherited Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Muscle Nerve* 1993;16:1232-1238.
9. Hayasaka K, Ohnishi A, Takada G, Fukushima Y, Murai Y. Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993;16:1317-1322.
10. NIH/CEPH collaborative mapping group. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* 1992;258:67-86.
11. Young P, Stogbauer F, Wiebusch H et al. PCR-based strategy for the diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology* 1998;50:760-763.
12. Blair I, Kennerson ML, Nicholson GA. Deletion of Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication by polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 1995;41 (8):1105-1108.
13. Weber JL, Kwitek AE, May PE et al. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D17S250 and D17S261 loci. *Nucleic Acids Research* 1990;18(15):4640.
14. Mancardi GL, Uccelli A, Bellone E, et al. 17p11.2 Duplication is a common finding in sporadic cases of Charcot-Marie-Tooth type 1. *Eur Neurol* 1994;34:135-139.
15. Hayashi N, Sugai S, Ito I, Nakamori S, Ogawa M, Nakamura Y. Ethnic difference in the pattern of K-ras oncogene mutations in human colorectal cancers. *Human Mutation* 1996;8(3):258-61.
16. **최문성, 최 겸, 박규헌**. Charcot-Marie-Toothe **병으로 사료되는가족 2례**. ***대한신경과학회지***1989;5 (2);262-271.
17. **최병옥, 선우일남, 이진성 등**. **분자 유전학적 검사로 확진된** Charcot-Marie-Tooth 1A. ***대한신경과학회지*** 1996;14(4);1023-1029.
18. Nagel S, Borisch B, Thein SL et al. Somatic mutations detected by mini- and macrosatellite DNA markers reveal clonal intratumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Cancer research* 1995;55:2866-2870.
19. Nelis E, Timmerman V, Jonghe PD, et al. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations land polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 1994;94:653-657.
20. Murakami T, Sun ZS, Lee CC, Lupski JR. Isolation of novel genes from the CMT1A duplication/HNPP deletion critical region in 17p11.2-p12. *Genomics* 1997;39:99-103.
21. Ben Othmane K, Middleton LT, Loprest LJ, et al. Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1993;17:370-375.
22. Morton NE. Parametoers of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:7474-7476.
23. Suter U, Welcher AA, Spines GJ. Progress in the molecular understanding of hereditary peripheral neuropathies reveals new insights into the biology og the peripheral nervous system. *Trends Neurosci* 1993;16:50-56.
24. Pareek S, Suter U, Spines GJ, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA. Detection and precessing of PMP-22 protein in cultured Schwann cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:10373-10379.
25. Kwon JM, Elliot JL, Yee WC, et al. Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;57:853-858.
26. Ionasescu V, Searby C, Sheffield VC et al. Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy mapped on chromosome 7p (CMT2D). *Hum Mol Genet* 1996;5(9):1373-1375.
27. Navon R, Seifried B, Gal-On NS et al. A new point mutation affecting the fourth transmembrane domain of PMP22 results in severe, de novo Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Genet* 1996;97:685-687.
28. Marrosu MG, Vaccargiu S. A novel point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology* 1997;48:489-493.
29. Roa BB, Garcia CA, Pentao L et al. Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1993;5:19-194.