

Rett 증후군 34례의 MECP2 유전자 변이에 관한 연구

인제대학교 의과대학 부산백병원 소아과, 성분도병원 소아과*, 부산대학교 의과대학 생화학교실†

박상조 · 황태규 · 손병희* · 김철민†

Mutational Analysis of MECP2 Gene in 34 Rett Syndrome

Sang Jo Park, M.D., Tae Gyu Hwang, M.D.
Byeong Hee Son, M.D.* and Chul Min Kim, M.D.†

*Department of Pediatrics, College of Medicine, Inje University, Busan Paik Hospital,
St. Benedict Hospital*, Department of Biochemistry†, College of Medicine,
Busan National University, Busan, Korea*

Purpose : Rett syndrome(RTT) is an X-linked dominant neurodevelopmental disorder affecting 1 per 10,000-15,000 female births worldwide. It was initially described by Andreas Rett in 1966. RTT involves developmental regression characterized stereotypic hand movements, tremors, gait apraxia, seizures, deceleration of head growth after the age of 6-18 months. The disease-causing gene was identified as MECP2 on chromosome Xq28. We carried out mutational analysis of MECP2 genes in RTT patients.

Methods : Whole blood(5 cc) of 34 sporadic RTT patients was collected in EDTA-anticoagulated tubes. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the E.Z.N.A. blood DNA kit. Four exons of the MECP2 gene were amplified by PCR in 34 Korean with RTT. We carried out PCR divided the exon three into two parts and the exon four into five parts. Primer sequences designed by Amir et al. in 1999 were almost used(AF030876). Sequencing primers used were the same as PCR. DNA sequencing reactions were performed using an ABI 377 DNA sequencer and ABI PRISM dye terminator cycle sequencing reaction kit(Perkin-elmer). The results were compared with the normal DNA sequence(X99686). To confirm the change of sequence on novel mutations, RFLP analysis was performed.

Results : The MECP2 mutations were detected in 23(67.6%) of the 34 patients. The mutations consisted of 12 different types including nine missense and three nonsense mutations. Of these, three (L100V, G161E and T311M) mutations were newly identified. Most of the mutations discovered are located within MBD(39.1%) and TRD(39.1%). In this study, three(T158M, R270X, R306C) mutations were identified high frequency.

Conclusion : MECP2 gene was also an important cause of Korean RTT patients. MECP2 gene study is an important tool for diagnosis of Korean RTT patients. (*J Korean Pediatr Soc* 2002; 45:1263-1272)

Key Words : Rett syndrome, MECP2

접수 : 2002년 3월 26일, 승인 : 2002년 6월 21일

책임저자 : 손병희, 성분도병원 소아과

Tel : 051)466-7001(380) Fax : 051)466-5073

E-mail : pedson@medigate.net

지체를 보이는 가장 흔한 원인 중의 하나로 진행성의 신경발달장애 질환이다. RTT은 1966년 오스트리아의 의사 Andreas Rett¹⁾에 의해서 처음 보고된 질환으로 1983년 Hagberg 등²⁾이 35례의 RTT 환아들을 보고 함으로서 임상인들의 관심을 끌기 시작한 질환이다. RTT의 진단 기준은 1985년 Hagberg 등³⁾에 의해 처음 만들어졌고 MECP2 유전자가 밝혀지기 전까지는 임상적 기준이 유일한 진단적 근거가 되어왔다. RTT은 여아 10,000-15,000 출생 당 한 명의 발생률을 보이는 것으로 알려져 있다³⁾. RTT은 X염색체 우성유전으로 생각되는 질환이며 여아에게서만 발생하고 이상을 가진 남아의 출생 시 사망하는 질환으로 알려져 있다. RTT은 95% 이상이 산발성으로 발생하며 드물게 가족성으로 발생이 보고되고 있다⁴⁾. 남아에서 발생한 경우는 2000년까지 5례가 보고되어 있다⁵⁻⁹⁾. RTT의 환아들은 6-18개월까지는 비교적 정상적인 발달 상태를 보인 후 급격하게 기술적인 손 운동을 잃어버리고 두위의 발달이 감소하며 특징적으로 반복되는 상동성의 손동작을 보인다. 이와 함께 동반되는 임상상으로는 실조형 뇌성마비, 자폐증 양상, 간질, 이상한 호흡양상(과호흡과/또는 무호흡), 그리고 성장지연(특히 손과 발) 등이 있다¹⁰⁾. 이러한 급격한 임상양상의 출현 후는 거의 성년기까지 특별한 변화 없이 지내게 되는 임상양상을 보인다¹¹⁾.

RTT의 이상 유전자인 MECP2는 methyl-CpG binding protein(MeCP2)을 생산하며 1999년 Amir 등¹²⁾에 의해 처음으로 발견된 이후 MECP2(MIM 300005) 유전자의 이상은 RTT 환아들에서 적게는 25%에서 많게는 90%까지 보고되고 있다^{4, 12-17)}. MECP2 유전자에는 4가지의 중요한 기능 영역(domain)이 있는데 첫 번째는 methyl-CpG-binding domain(MBD)이고¹⁸⁾, 두 번째는 transcriptional repression domain(TRD)이며 이것은 co-repressor인 Sin3 A와 histone deacetylase와 함께 작용하여 DNA의 중심에 있는 histone을 deacetylation시켜 염색체가 비활성화 되게 한다¹⁹⁾. 세 번째는 nuclear localization signal(NLS)로 MeCP2를 핵 속으로 운반하는 역할을 하고 있다²⁰⁾. 마지막으로 최근에 밝혀진 MeCP2의 C-terminal segment이며 이것은 nucleosome core에 결합을 촉진하는 역할을 한다²¹⁾. 본 연구에서는 우리 나라에서는 아직 임상적으로도 생소하다고 할 수 있는 RTT 환아들에서 MECP2 유전자

의 이상이 어느 정도 발현되는지를 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2000년 2월부터 2001년 3월까지 성분도 병원 소아과를 방문하여 RTT으로 진단된 환아와 RTT 부모회 모임에 참석하여 임상적 기준이 RTT으로 확진된 환아 중 유전자 검사에 동의한 환아 34례의 말초 혈액을 EDTA 처리된 튜브에 5 cc 채혈하여 냉동 보관한 후 해빙하여 검체로 사용하였다. 말초혈액의 유전자를 포함한 DNA는 E.Z.N.A. blood DNA kit(Omega Bioteck)를 사용하여 추출하였다. 1% agarose gel electrophoresis를 이용하여 100V에서 40분간 정제된 DNA의 농도와 순도를 분석하였다.

2. PCR 증폭

34례의 RTT 환아에서 MECP2 4가지의 엑손(exon)이 PCR에 의해 증폭되었다. 본 연구에서는 엑손 3은 두 부위로 엑손 4는 다섯 부위로 나누어 분석하였다. Primer sequence는 1999년 Amir 등에 의해 제작된 것을 대부분 사용하였다(AF030876). 그러나 엑손 4의 두번째 PCR primer는 엑손 4의 첫 primer로 바꾸어 사용하였다(Table 1). 증폭을 위한 환경은 최종 용량을 20 μ L로 하였고 그 내용은 다음과 같다. Genomic DNA 100 ng, 각각의 primer 400 μ M, dNTPs 200 μ M, 1X reaction buffer(500 mM KCl, 100 mM Tris HCl; pH 9.0, 1% Triton X-100), 1 U Taq. polymerase(Bionics). PCR 반응의 cycling condition을 위해 95°C에서 첫 4분간의 변성(denaturation) 단계를 거친 후, 94°C에서 1분간 32회를 반복하였고 결합반응(annealing)은 72°C에서 1분간 시행하였다. 마지막 연장반응(extension)은 72°C에서 10분간 시행하였다. 결합반응의 온도는 54°C에서 70°C 사이로 하였다. 증폭된 산물의 분석을 위해 2% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동을 실시하였다.

3. Direct sequencing

증폭된 산물은 QIAquick gel extraction kit(QIAGEN, Hiden, Germany)을 이용하여 순도를 높였다. Sequencing primer는 PCR과 같은 방법을 사

Table 1. Primer Sequences and Positions for PCR and Direct Sequencing

Region	Primer	Position
Pm(Promoter)	5'-ggg TgC AAT gAA ACg CTT A-3'	
	5'-TTT ACC ACA gCC CTC TCT CC-3'	
Exon 2	5'-gTT ATg TCT TTA gTC TTT gg-3'	Intron
	5'-TgT gTT TAT CTT CAA AAT gT-3'	Intron
Exon 3(1)	5'-CCT gCC TCT gCT CAC TTg TT-3'	Intron
	5'-ggg gTC ATC ATA CAT ggg TC-3'	Exon
Exon 3(2)	5'-AgC CCg TgC AgC CAT CAg CC-3'	Exon
	5'-gTT CCC CCC gAC CCC ACC CT-3'	Intron
Exon 4(1)	5'-TTT gTC AgA gCg TTg TCA CC-3'	Intron
	5'-CTT CCC Agg ACT TTT CTC CA-3'	Exon
Exon 4(2)	5'-TTT gTC AgA gCg TTg TCA CC-3'	Exon
	5'-CTg CAC AgA TCg gAT AgA AgA C-3'	Exon
Exon 4(3)	5'-ggC Agg AAg CgA AAA gCT gAg-3'	Exon
	5'-TgA gTg gTg gTg ATg gTg gTg g-3'	Exon
Exon 4(4)	5'-Tgg TgA AgC CCC TgC Tgg T-3'	Exon
	5'-CTC CCT CCC CTC ggT gTT Tg-3'	Exon
Exon 4(5)	5'-ggA gAA gAT gCC CAg Agg Ag-3'	Exon
	5'-Cgg TAA gAA AAA CAT CCC CAA-3'	Intron

용하였다. DNA sequencing은 ABI 377 DNA sequencer(ABI, Foster City, California, USA)와 ABI PRISM dye terminator cycle sequencing reaction kit(Perkin-elmer, Foster City, California, USA)을 이용하여 실시한 후 정상 DNA 순서(X99686)와 결과를 비교하였다.

4. RFLP 분석

우리 나라에서 처음 발견된 유전자 변이의 확인을 위해 RFLP 분석을 시행하였다. 제한효소 위치의 분석을 위해 GeneTyx program을 이용하였다. L100V 유전자 변이는 제한효소 절단 부위에서 분해가 되지 않아 mismatch PCR technique이 이용되었다. 유전자 변이 L100V의 엑손 3의 두 번째 reverse primer는 새로이 제작되었다. 사용된 primer는 5'-GCTT-AAGCTTCCGTGTCCAGCCTTCAGGTA-3'이다. Mismatch PCR에 사용된 PCR은 밑줄이 그어진 부분이다. 실험 환경은 최종 용량을 20 μL로 하였고 그 내용은 다음과 같다. Genomic DNA 100 ng, 각각의 primer 400 μM, dNTPs 200 μM, 1X reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 9.0, 1% Triton X-100), 2% tween 20(Amnesco), 5 M betain(Sigma), and 1 U Taq. polymerase(Bionics). Cycling 환경으로는 첫 변성(denaturation)을 94°C에

서 4분간 동안 실시하였고 94°C에서 1분간 30회, 66°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하였다. 마지막 연장단계를 72°C에서 10분간 시행하였다. 염기 C가 G로의 변이가 있는 MECP2 유전자에서 제한효소 절단 부위가 만들어졌다.

제한효소에 의해서 생산된 산물들은 2% agarose gel 또는 4% NuSieve gel에서 electrophoresis에 의해 분리되었다.

결 과

1. 대상 환아들의 임상특징

환아들을 처음 진찰했을 때의 평균 연령은 6.7세(6.7±3.34세)였고 나이가 제일 적은 환아는 2세였고 제일 많은 환아는 17세였다. 그리고 부모들이 아이들의 이상을 처음으로 인지한 연령은 평균 14개월(14±6.15개월)이었다. RTT의 특징적인 손의 상동행동을 인지한 시기는 평균 21.8개월(21.8±9.71개월)이었다. RTT 환아 34례 중 보행이 가능한 경우는 23명으로 67.6%였고 한 음절이라도 말할 수 있는 환아는 16례(47.1%)였는데 제일 말을 많이 하는 아이의 경우가 넷 또는 다섯 가지 단어 정도를 발음할 수 있었다. CT나 MRI는 34명 모두에서 촬영하였으며 모두 정상 소견이었다. 뇌파는 검사를 시행된 24례 중 21례에서

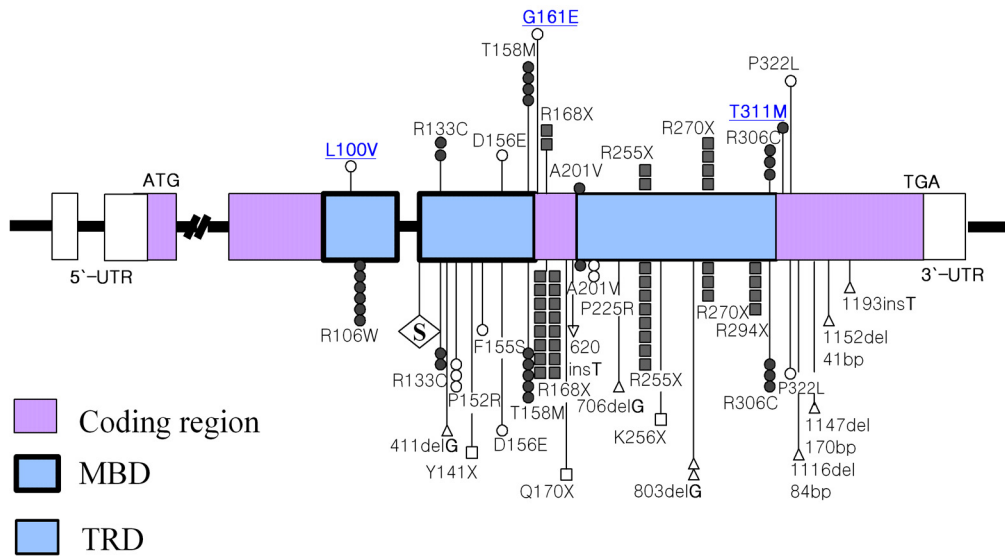


Fig. 1. Distribution of MECP2 mutations in RTT. Top: Mutation identified in this study. Novel mutations are indicated by bold underlined type. Bottom: mutations described previously. Circles represent missense mutation and squares represent nonsense mutations. Mutations at CpG dinucleotides are in filled circles or squares. Frequency of indicated the number of symbol.

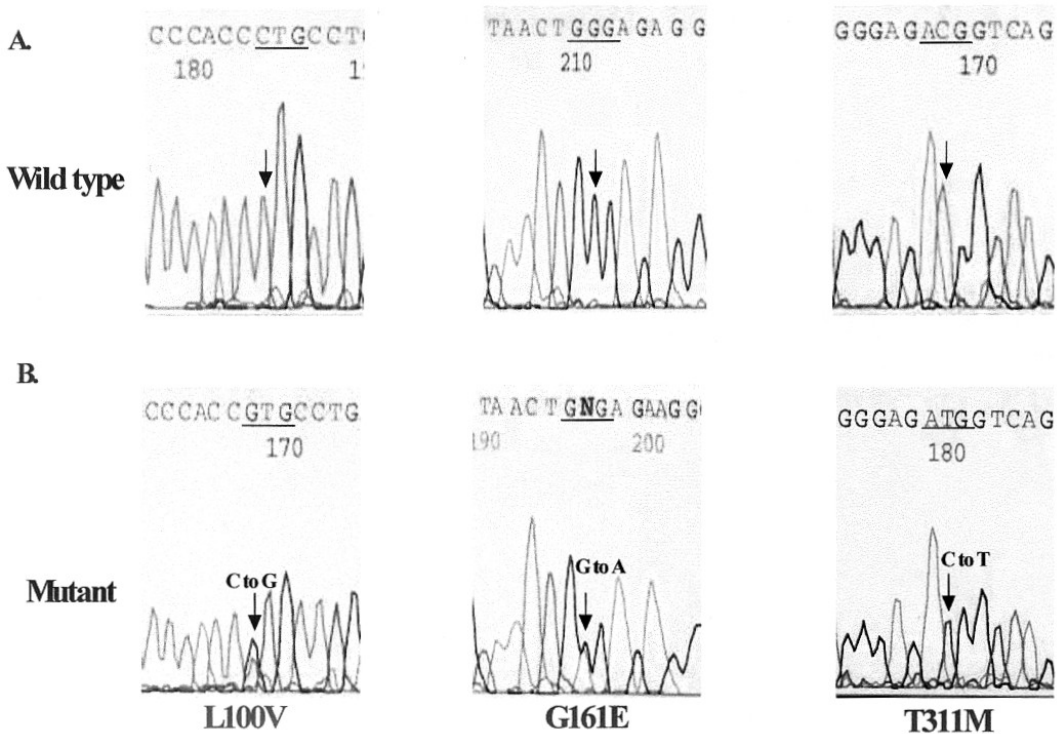


Fig. 2. DNA sequencing electropherograms of wild type (A) and novel mutations (B) of MECP2 identified in RTT patients. Substituted nucleotides are indicated arrow and substituted amino acids are underlined. All sequences are in the sense orientation. L110V and G161E were the heterozygote mutation.

Table 2. Summary of MECP2 Mutations in RTT Patients

Patients	Domain	Exon	Nucleotide change*	Amino acid change	Frequency [†]
R21	MBD	Exon3(2)	298 C→G	L 100 V [‡]	2.9%
R8, 35	MBD	Exon4(1)	397 C→T	R 133 C	5.9%
R24	MBD	Exon4(1)	468 C→G	D 156 E	2.9%
R6, 11, 12, 19	MBD	Exon4(1)	473 C→T	T 158 M	11.8%
R13	MBD	Exon4(1)	482 G→A	G 161 Ec	2.9%
R5, 7		Exon4(1)	502 C→T	R 168 X	5.9%
R20		Exon4(1)	602 C→T	A 201 V	2.9%
R9, 14	TRD	Exon4(2)	763 C→T	R 255 X	5.9%
R15, 23, 25, 31	TRD	Exon4(3)	808 C→T	R 270 X	11.8%
R4, 30, 33	TRD	Exon4(3)	916 C→T	R 306 C	8.8%
R28		Exon4(3)	932 C→T	T 311 M [‡]	2.9%
R16		Exon4(3)	965 C→T	P 322 L	2.9%

*Nucleotide and amino acid numbering according to GenBank
[†]Frequency of substitution among 34 Korean patients with RTT
[‡]Tree mutations were newly identified this study.

이상을 보여 87.5%의 뇌파이상 소견을 보였는데 경련이 없었던 6례의 환자에서도 뇌파의 이상을 보였다.

2. MECP2 유전자의 돌연변이

MECP2 유전자의 돌연변이를 찾아내기 위해 저자들은 34례의 RTT 환자에서 채취한 혈액 샘플에서 direct sequencing을 통하여 MECP2 유전자 네 종류의 엑손을 분석하였다(Fig. 1). 증폭된 PCR 산물들은 인트론과 엑손을 포함하고 있었다(AF030876). MECP2 유전자에 이상이 있는 RTT 환아는 34례 중 23례로 67.6%였다. MECP2 유전자의 돌연변이 종류는 12가지였고 여기에는 9종의 missense 그리고 3종의 non-sense mutation이 있었다. 이 돌연변이 중 L100V, G161E, 그리고 T311M 3종은 우리 나라에서만 처음 발견된 종류이다(Fig. 2). 대부분의 돌연변이는 이상이 밝혀진 RTT 환아들 중에서 MECP2 유전자 중 MBD와 TRD가 높은 빈도(78.2%)로 발견되었으며 T158M, R270X, R306C 세 가지의 유전자 변이도 비교적 자주 발견되었다(Table 2).

3. RFLP 분석에 의한 돌연변이 확인

새로이 발견된 유전자 변이 3종을 확인하기 위해 RFLP 분석을 시행하였다(Table 3). L100V 변이는 mismatch PCR을 이용하였다. 야생형(wild type)의 뉴클레오타이드 296에서 306까지의 sequence는 CCCTGCTGAA(X99686)이었다. Mismatch primer로 증폭을 한 후 자연형의 sequence는 CCCTACCTG

AA였다. 돌연변이가 있는 뉴클레오타이드 sequence는 CCG/TACCTGAA로 나타났다. 염기 C가 G로 변이가 생긴 뉴클레오타이드 298 위치는 제한효소 Afa I를 이용하여 절단하였다. Afa I 제한효소 처리 후 199 bp PCR 산물은 170 bp와 29 bp로 절단된 것을 알 수가 있었다(Fig. 3, lane 2 and 3).

G161E 변이는 Dde I 제한효소로 절단하였으며 자연형이 241 bp와 129 bp를 보이는 반면 돌연변이가 있는 유전자는 241 bp, 202 bp, 129 bp 분절들을 보였다(Fig. 3, lane 5, 6).

T311M 변이는 BsmB I 제한효소를 이용하여 절단하였고 자연형의 366 bp는 198 bp와 168 bp로 분해되는 반면, 환자의 유전자인 T311M는 하나의 밴드만을 보였다(Fig. 3, lane 8, 9).

고 찰

1984년 RTT 심포지움에서 “Vienna criteria”라는 RTT 진단기준이 최초로 만들어졌으며²²⁾, 본 연구에서 진단 기준으로 사용한 RTT 진단기준은 1988년 The Rett Syndrome Dignostic Criteria Work Group²³⁾에서 만든 것을 이용하였고 전형적인 RTT 환아들만을 본 연구에 포함시켰다. RTT 환아들은 6-18개월까지는 비교적 정상적인 발달을 보이는 것으로 되어 있지만 RTT 환아들을 이시기의 발달 단계에서 약간의 저진장이 있는 경우가 많다²³⁾. 본 연구에 포함

Table 3. Design of RFLP Using Restriction Enzyme Sites Created(+) or Destroyed(-) by Mutations of MECP2 Gene in RTT Patients

Patients	Type of mutation	Restriction enzyme	Restriction site	MAP
R21	CTG/GTG L100V	<i>Afa</i> I (+)	↓ GTAC VATG ↑	
R13	GGG/GAG G161E	<i>Dde</i> I (+)	↓ CTNAG GANTC ↑	
R28	ACG/ATG T311M	<i>BsmB</i> I (+)	↓ CGTCTC(N) ₁ GCAGAG(N) ₆ ↑	

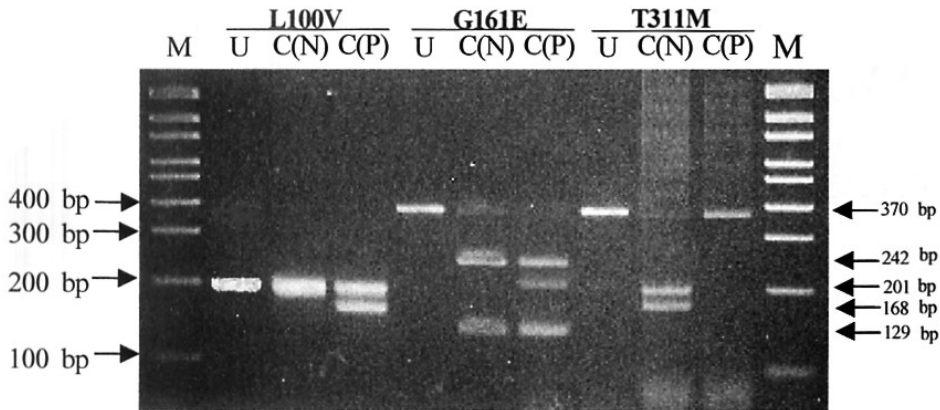


Fig. 3. RFLP for novel mutations(L100V, G161E, and T311M). Gel electrophoresis of PCR products before(U, uncut) and after(C, cut) restriction enzyme site. Cut samples distinguished between normal(N) and patients with mutation(P). PCR product showed the part of exon 3 with mismatch sequence(lane 1) and exon 4(lane 4 and 7). L100V mutation, identified by a mutation-induced cleavage at *Afa* I site(lane 2 and 3). *Dde* I digestion created 202 and 39 bp fragment in G161E mutation(lane 5 and 6). T311M mutation identified by loss of *BsmB* I site(lane 8 and 9). Lane M is λ /Hind III molecular weight marker. The lower 40 bp products were migrated off the gel.

된 환아들에서도 이러한 양상은 흔히 볼 수 있었다.

보통 RTT 환아들이 정확한 진단을 받기 전에 자폐증으로 진단을 받는 경우가 많은데 Olsson 등²⁴⁾은 자폐증과는 쉽게 감별할 수 있는 요소들이 있다고 하였다. 손의 상동행동은 RTT 환아들에서만 특징적으로 볼 수 있으며 자폐증 환아는 주로 사회성과 언어 발달에 주 문제가 있는 반면 RTT 환아들은 주로 운

동과 언어 영역에 있어 퇴행이 심하거나 발달장애를 보인다. 그리고 RTT 환아들에서 언어발달의 수준은 영아기 수준을 벗어나는 경우가 거의 없다고 하였다. 이것은 본 연구에서도 말을 제일 잘 하는 아이의 어휘 수가 4-5단어 정도인 것과는 일치하는 소견이다. 그러나 여기서는 언급을 하지는 않겠지만 RTT variant인 경우는 언어능력이 어느 정도 보존되는 경우도

있다. 또한 자폐증과 감별되는 점들로 RTT 환아는 실조성 뇌성마비 증상을 보이거나 아예 걷지 못하는 경우가 대부분이라는 것이다²⁵⁾. 본 연구에 포함된 환아들 중 걸을 수 있는 경우는 23례로 67.6%였다. 경련의 경우는 자폐증 환아는 25% 정도에서 발생하나 RTT 환아에서는 80%정도까지 경련의 발생률이 높다고 한다²⁶⁾. 본 연구에서는 58.8%에서 경련이 동반되었다.

Goutières 등²⁷⁾은 이러한 임상적 특징과 진단적 근거는 RTT의 진단적 물질(marker)이 발견되고 나면 임상양상은 매우 다양할 수 있을 것이라고 하였다.

뇌자기공명촬영에서는 대뇌의 지역적인 약간의 위축, 그리고 병리학적인 특징으로 분화가 덜 된 작은 신경세포와 수상돌기의 발달이 미숙한 점 등이 발견되었으나 신경세포의 손실은 발견되지 않았다^{28, 29)}. 이러한 영상적 그리고 병리학적인 이상 소견은 RTT의 진단에는 특별한 도움이 되지는 못하였다.

MECP2 유전자는 Xq28의 LICAM과 RCP/GCP loci 사이에서 발견되었고 MeCP2 신체 어디서나 발현되는 단백질로써 486개의 아미노산으로 구성되어있다³⁰⁾. MECP2 mRNA는 1,775 bp의 길이를 가진 네 개의 엑손으로 구성되어져 있다. MeCP2는 MBD 기능영역을 이용하여 메틸기가 붙은 CpG dinucleotide가 있는 부위의 nucleosome에 부착하게 된다³¹⁾. MeCP2가 메틸화 된 CpG island에 부착되면 TRD 기능영역은 co-repressor 복합체인 Sin3A와 histone deacetylase(HDAC)를 이용하여 nucleosome histone의 꼬리인 H3와 H4를 deacetylation시킨다³²⁾. 이 결과로 chromatin의 응집(compaction)을 초래되어 목표 유전자의 발현을 억제하게된다³¹⁾.

MeCP2는 신체의 어느 부위에서나 발현되기 때문에 이 단백질의 변이는 신체 전체에 다양한 영향을 미칠 것으로 기대되나 RTT 환아들의 임상양상의 표출은 거의 대부분이 충추신경계 증상으로 발현하게 된다. MECP2의 조직에 따른 특징적인 발현이 RTT 환아의 특이성을 설명할 수 있을 것 같다. 모든 조직에 널리 발현되는 7.5 kb 전사물과 태아의 간에 높은 양으로 발현되는 1.8 그리고 5 kb 전사물이 있지만 긴 3'-UTR을 포함하고 있는 10.1 kb의 전사물은 발달과정의 태아 뇌에서 높은 발현을 보인다³³⁾. 발달단계의 뇌에서는 MECP2 유전자의 다른 유전자 전사역제가 상당히 중요한 역할을 하는 것으로 생각이 되며

MECP2 유전자의 동종체는 이러한 조절과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 특히 변이가 생긴 MeCP2에 의해 전사에 변화가 생긴 어떤 유전자의 과발현이 생기면 RTT 환아들에서 흔히 발견되는 작은 미성숙 신경세포들, 그리고 수상돌기의 발달이상 등의 변화가 야기될 수 있다.

본 연구자들이 시행한 34례의 RTT 환아의 유전자 분석에서 67.6%의 유전자 변이를 확인했으며 이것은 다른 연구자들^{4, 13-17)}의 보고와도 비슷한 결과를 보인다. 본 연구에서 발견한 대부분(78.2%)의 유전자 변이는 MBD와 TRD 기능영역에서 발견되었다. 그러므로 이 부분에서의 유전자 변이가 RTT 환아들에게 치명적인 문제를 일으킬 것은 자명한 일이다. 또한 본 연구에서는 우리나라에서만 처음으로 발견된 유전자 변이가 3종이 있었다. 이들 중 L100V와 G161E는 MBD 기능영역 내에 위치하고 있었고 T311M은 3'-UTR 영역에서 발견되었다. 유전자 변이를 일으킨 23례의 MECP2 유전자는 20례(87.0%)에서 C가 T로의 변이를 일으킨 경우였고 이것은 Dragich 등³⁴⁾의 70% 정도에서 이러한 변이를 보인다는 보고와도 일치한다. 이러한 원인은 carbon ring의 4 위치에 있는 5m-cytocine은 자연적인 deamination에 의해 thymine으로 잘 변화되기 때문인 것 같다³⁵⁾. L100V를 제외한 나머지의 유전자 변이는 exon 4에서 발견되어 exon 4에서의 유전자 변이 발견율이 95.7%에 이르렀다. 이러한 결과는 exon 4가 우리나라 RTT 환아들에서 유전자 변이가 주로 발생하는 부위일 가능성을 시사하는 것이며, RTT 환아들에서 exon 3와 4의 screening이 RTT 환아들의 유전자 변이를 대부분 발견할 수 있을 것으로 생각이 된다. 그리고 본 연구에서는 R270X, T158M, R306C가 비교적 자주 발견되는 유전자 변이였고 이러한 결과는 Huppke 등¹⁵⁾의 결과와 비슷한 양상을 보여 주었다.

현재까지는 RTT 환아들의 임상양상과 유전자 변이 형태와의 관련은 없는 것으로 보이며 X 염색체 비활성화의 양상에 의해 그 임상양상의 심한 정도가 결정되는 것으로 알려져 있다.

RTT이 X 염색체 우성유전을 하는 것으로 알려져 있는데 최근 Trappe 등³⁶⁾의 연구에 의하면 가족성인 RTT 환아인 경우 문제가 있는 어머니 쪽 염색체를 받아 임상양상의 발현이 생기며 산발성으로 발생하는 대부분의 RTT 환아는 아버지로부터 유래한 X 염색

체에서 유전자 변이가 발생하였다고 보고하였다. 그러므로 산발성으로 발생한 RTT 환아가 있는 가정에서 RTT 환자의 재출현은 거의 없다고 설명하였다. 그리고 산발성인 RTT 환자의 발생이 많은 원인을 Goto 등³⁵⁾은 난자의 X 염색체는 메틸화가 덜 되었고 정자의 X 염색체는 과메틸화가 되어있어 메틸화가 되어있는 cytosine의 자연적 deamination으로 뉴클레오타이드 변화가 정자의 X 염색체에서 잘 일어날 수 있을 것이라고 추측하였다.

본 연구에서는 전형적인 임상양상을 보이는 RTT 환자만 연구대상으로 하였지만 Inui 등³⁷⁾이 연구한 비전형적인 임상양상을 보이는 RTT 환자에서도 비슷한 정도의 유전자 변이가 밝혀지고 있어 RTT 환자들의 확진과 진단에 있어서 MECP2 유전자 변이의 검사는 제일 중요한 진단법으로 자리를 잡고 있다.

본 저자들이 연구한 34례의 RTT 환자에서도 MECP2 유전자의 변이는 비교적 흔히 관찰되어 MECP2 유전자의 변이가 RTT를 유발하는 주 유전자 변임을 확인하였고 RTT이 의심되는 환자에서 확진을 위해 MECP2 유전자 분석이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목적 : 레트증후군이란 1966년 Andreas Rett에 의해 처음 기술되었으며 생후 6개월에서 18개월 정도까지 비교적 정상 발달을 한 후 두위 발달의 감소와 함께 습득했던 인지 및 운동능력의 상실, 언어기능의 상실, 그리고 특징적인 손동작(상동행동)을 보이는 X 염색체 우성유전으로 생각되는 질환이다. 1999년 미국에서 그 결함 유전자인 MECP2 유전자가 Xq28에서 밝혀졌으나 우리 나라에서는 이 질환에 대한 전반적 이해가 부족하며 유전자 연구는 거의 전무한 상태이다. 이에 저자들은 우리 나라의 Rett 증후군 환자에서 MECP2 유전자의 결함이 어느 정도 나타나는지를 알고자 이 연구를 시행하였다.

방법 : 2000년 2월부터 2001년 3월까지 본원을 방문한 Rett 증후군 환자 34례의 말초혈액을 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 처리하여 5 cc 채취하여 냉동 보관한 후 해빙하여 DNA 표본을 추출했다. DNA의 추출은 E.Z.N.A blood DNA kit을 사용하였다. MECP2 유전자 네 종류의 axon은 PCR을

이용해 증폭하였고 primer sequence는 1999년 Amir 등에 의해 디자인 된 것(AF030876)을 사용하였다. ABI 377 DNA sequencer와 ABI PRISM dye cycle sequencing reaction kit을 사용하여 DNA sequencing을 시행하였고 우리 나라에서 최초로 발견된 유전자 변이에 대해서는 RFLP 분석을 통해 확인하였다.

결 과 :

- 1) MECP2 유전자의 변이를 보인 환아는 23례로 67.6%에서 관찰되었다.
- 2) 9종의 missense mutation과 3종의 nonsense mutation을 합해 총 12종의 유전자 변이가 관찰되었다.
- 3) 이들 돌연 변이 중 L100V, G161E, 그리고 T311M은 전세계적으로 우리 나라에서 처음 발견된 변이이다.
- 4) 23례의 유전자 변이는 대부분(78.3%) MBD와 TRD라는 기능영역에서 발견되었다.
- 5) 본 연구에서 T158M, R270X, 그리고 R306C가 자주 나타나는 유전자 변이였다.

결 론 : 우리 나라의 Rett 증후군 환자에서도 MECP2 유전자의 변이는 비교적 흔히 관찰되어 MECP2 유전자의 이상이 Rett 증후군을 유발하는 주 유전자 이상임을 확인하였고 Rett 증후군 환자의 확진을 위해 MECP2 유전자 검사가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Rett A. Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei hyperammoniamie in Kindesalter. Wein Med Wochenschr 1966;116:723-8.
- 2) Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. Ann Neurol 1983; 14:471-9.
- 3) Hagberg B. Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. Acta Paediatr Scand 1985;74:405-8.
- 4) Bienvenu T, Carrie A, de Roux N, Vinet MC, Jonveaux P, Couvert P, Villard L, Arzimanoglou A, Beldjord C, Fontes M, Tardieu M, Chelly J. MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome: Hum Mol Genet 2000 May;22:9:1377-84.
- 5) Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I,

- Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF, Zoghbi HY, Schanen NC, Francke U. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 1999;65:1520-9.
- 6) Clayton-Smith J, Watson P, Ramsden S, Black GC. Somatic mutation in MECP2 as a non-fatal neurodevelopmental disorder in males. *Lancet* 2000;356:830-2.
 - 7) Meloni I, Bruttini M, Longo I, Mari F, Rizzolio F, D'Adamo P, Denvriendt K, Fryns JP, Toniolo D, Renieri A. A mutation in the Rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet* 2000;67:982-5.
 - 8) Orrico A, Lam C, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, Poon PM, Zappella M, Federico A, Sorrentino V. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 2000;481:285-8.
 - 9) Villard L, Kpebe A, Cardoso C, Chelly PJ, Tardieu PM, Fontes M. Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular findings. *Neurology* 2000;55:1188-93.
 - 10) Van den Veyver IB, Zoghbi HY. Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:275-9.
 - 11) Ellaway C, Christdoulou J. Rett syndrome: clinical update and review of recent genetic advances. *J Paediatr Child Health* 1999;35:419-26.
 - 12) Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185-8.
 - 13) Amano K, Nomura Y, Segawa M, Yamakawa K. Mutational analysis of the MECP2 gene in Japanese patients with Rett syndrome. *J Hum Genet* 2000;45:231-6.
 - 14) Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, Krawczak M, Cooper DN, Lynch S, Thomas N, Hughes H, Hulthen M, Ravine D, Sampson JR, Clarke A. Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* 2000;9:1119-29.
 - 15) Huppke P, Laccone F, Kramer N, Engel W, Hanefeld F. Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Hum Mol Genet* 2000;9:1369-75.
 - 16) Obata K, Matsuishi T, Yamashita Y, Fukuda T, Kuwajima K, Horiuchi I, Nagamitsu S, Iwanaga R, Kimura A, Omori I, Endo S, Mori K, Kondo I. Mutation analysis of the methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) in patients with Rett syndrome. *J Med Genet* 2000;37:608-10.
 - 17) Xiang F, Buervenich S, Nicolao P, Bailey ME, Zhang Z, Anvret M. Mutation screening in Rett syndrome patients. *J Med Genet* 2000;37:250-5.
 - 18) Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4886-92.
 - 19) Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 1997;88:471-81.
 - 20) Nan X, Tate P, Li E, Bird A. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 1996;16:414-21.
 - 21) Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe AP. The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry* 1999;38:7008-18.
 - 22) Hagberg B, Goutières F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J. Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 1985;7:372-3.
 - 23) The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group. Diagnostic criteria for Rett syndrome. *Ann Neurol* 1988;23:425-8.
 - 24) Olsson B, Rett A. Autism and Rett syndrome: behavioural investigations and differential diagnosis. *Dev Med Child Neurol* 1987;29:429-41.
 - 25) Naidu S, Murphy M, Moser HW, Rett A. Rett syndrome-natural history in 70 cases. *Am J Med Genet Suppl* 1986;1:61-72.
 - 26) Coleman M, Gillberg C. The biology of autistic syndromes. New York: Praeger Publishers, 1985: 45-50.
 - 27) Goutieres F, Aicardi J. Atypical forms of Rett syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1986;1:183-94.
 - 28) Oldfors A, Sourander P, Armstrong DL, Percy AK, Witt-Engerstrom I, Hagberg BA. Rett syndrome: cerebellar pathology. *Pediatr Neurol* 1990; 6:310-4.
 - 29) Webb T, Clarke A, Hanefeld F, Pereira JL, Rosenbloom L, Woods CG. Linkage analysis in Rett syndrome families suggests that there may be a critical region at Xq28. *J Med Genet* 1998;35: 997-1003.
 - 30) Vilain A, Apiou F, Vogt N, Dutrillaux B, Malfroy B. Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996;74:293-4.
 - 31) Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy

- I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992;69:905-14.
- 32) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-91.
- 33) Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, Poustka A. A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene(MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* 1999;8:1253-62.
- 34) Dragich J, Houwink-Manville I, Schanen C. Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2. *Hum Mol Genet* 2000;9:2365-75.
- 35) Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:362-78.
- 36) Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 2001;68:1093-101.
- 37) Inui K, Akagi M, Ono J, Tsukamoto H, Shimono K, Mano T, Imai K, Yamada M, Muramatsu T, Sakai N, Okada S. Mutational analysis of MECP2 in Japanese patients with atypical Rett syndrome. *Brain Dev* 2001;23:212-5.
-