

증례를 중심으로 한 유전성 신경근육질환의 유전자 검사와 질 관리

울산의대 서울아산병원 의학유전학클리닉

유 한 옥

DNA testing in inherited neuromuscular disorders: a case-based approach and quality assurance

Han-Wook Yoo

Department of Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

단일 유전자 이상에 의한 유전병들의 유전자 진단은 유전자의 구조와 기능의 이해, 질병과의 연관성만 확인되면 즉시 유전자 진단을 할 수 있는 상황이 되었고 실제 이러한 희귀한 단일 유전자 이상에 의한 유전병의 진단은 임상에 응용되고 있다. 그러나 개개의 질환이 희귀함으로 모든 유전병을 high through-put으로 하기에는 어려움이 있다. 각 민족에 유병율이 높은 유전병을 중심으로 진단에 이용하게 되는데 population based 진단이 시도되거나 고려되는 질환들의 간단한 예를 들면 Ashkenazi Jewish 경우 Tay-Sachs disease, Gaucher disease, familial dysautonomia, familial breast, ovarian cancer 등이고 백인의 경우 cystic fibrosis, hemochromatosis 등이다. 희귀한 유전병들은 individual family based로 하게 되는데 실제 임상적 유전자 진단이 행해지는 희귀 유전병들을 유전자이름의 알파벳순으로 나열하면 거의 1,500여종에 이른다. 진단에 이용되는 방법들은 직접적 염기서열 결정(direct DNA sequencing)에서부터 microarray, oligonucleotide ligation assay, MLPA, PCR-Southern, genomic Southern, realtime-PCR, triplet expansion assay 등등

헤아릴 수 없이 많다. 이들 희귀 유전질환의 유전자 진단은 loci heterogeneity가 없을수록, 즉 특정 유전질환이 특정 유전자의 이상으로만 발생할 때, genetic heterogeneity가 없을 때, 즉 소수의 유전자형이 대부분의 발병 원인을 차지 할 때 임상적으로 진단적 가치가 있다. 희귀한 유전자형의 경우 반드시 기능에 대한 연구가 수반되어 morbid mutation 임이 확증될 때 진단에 이용될 수 있다. 이와 같이 단일 유전자 이상에 의한 유전자 진단의 경우는 그 임상적 해석이 명료하게 된다. 그러나 성인이 되어서야 증상이 나타나는 유전병의 경우(adult onset disease)에 예방적 또는 치료적인 방법이 없는 상황에서는 소아의 유전자 진단은 원칙적으로 시행해서는 안 된다.

여러 가지 환경적 요인과 다양한 유전자들의 여러 염기서열의 변화(SNP, 반복 염기서열의 copy수 등)에 의해 발생하는 다인자성 질환들은 유병율은 높아서 의료, 사회 경제적으로 큰 영향을 끼치게 된다. 그러나 SNP에 근거한 유전자 진단은 각 민족에서 대단위 유전적 연구(case-control association, family based association 연구 등)가 선행된 다음에야 임상적 의의를 알 수 있게 된다. 즉 research test와 clinical test를 혼동해서는 안 된다. 질병 감수성을 예측하기 위해 시행하고자 하는 유전자 검사의 경우 엄격한 정도 관리 및 효용성과 과학적 타당성에 관한 심의를 요한다. 즉 건강한 사람에게서 미래의 질병을 예측할 목적으로 이용되는 검사, 유

전자 검사만으로 독립적으로 질병 이환 여부를 확정될 수 없는 검사, 민감도가 낮고 양성 예측도가 낮은 검사, 치료수단이나 예방수단이 이용 가능하지 않거나 효과적이지 않은 경우, 한국인의 유전학적 역학 데이터가 충분하지 않은 경우, 임상적 효용성, 적절성, 과학적 타당성이 확립되지 않은 유전자 검사는 연구 목적의 유전자 검사(research test)로 간주하고 이는 피검사자의 동의 하에 검사자의 재정적 지원으로만 할 수 있게 해야 한다. 현재 일반적으로 인정되는 검사들은 thrombophilia panel(백인의 경우), 관상동맥 심장질환 panel 신경관 개존 등의 질환들이다.

기타의 유전자 검사로는 가족성 종양에 관한 유전자 검사와 약물반응에 대한 유전자 검사를 예로 들 수 있는데 가족성 종양에 대한 유전자 검사는 가족 중에 특정 수 이상의 환자가 있는 경우에만 시행한다. 가족성 종양에 대한 유전자 검사를 위해 양성 또는 음성 예측치, 민감도와 특이도가 허용수준 이상임을 확인해야 한다. 약물 반응에 대한 유전자 검사는 약물의 신진대사성 효소 유전자의 다형성을 이용한 약물에 대한 민감도 진단으로 치료를 위한 유용한 정보를 줄 수는 있다. 그러나 결과로 인해 검사 대상자에게 차별 등으로 오용되지 않도록 해야 한다.

본 연수 강좌에서는 단일유전자 이상에 의한 다양한 유전성 신경질환 및 근육질환의 유전자검사의 실제, 즉 검사 전 상담 및 검사 후 상담 등을 문답식으로 증례 위주로 강의하고자 한다.

본 론

1. 유전성 신경 근육질환의 검사 전, 검사 후 유전상담의 원칙

유전상담의 기본적인 개념 및 구성, 내용들을 간단히 기술하고 일반적인 유전성질환 진료에서 흔히 접하게 되는 문제들을 중심으로 실제적인 유전상담의 내용을 설명하고자 한다.

① Clinical genetic service 구성요소로서의 유전상담

(1) 평가: 내원이유, 가족력, 환자 및 관계된 가족의 진료(진찰, 검사)

(2) 임상진단 및 치료관리: 피상담자 및 가족을 모두 포함한다.

(3) 재발율의 평가: 진단, 가계도분석, 검사결과에 의존하게 된다.

(4) 유전상담: 질환의 자연경과 및 결과, 재발위험도 평가, 자연경과 및 결과를 수정시킬 방법과, 재발방지 방법을 모색한다(예: 산전진단).

(5) Follow-up care: 적절한 전문의에 의뢰하며, advocacy group(환자자조모임, 비영리 단체, networking)을 활용한다.

② 유전상담의 정의

피상담자가 이해할 수 있는 용어로 충분히 설명되어야 하는 "communication process (by trained person)" 이며 반드시 문서화 되어져야 한다.

"By American Society of Human Genetics"

(1) 피상담자에게 의학적 진실(진단, 병의 자연경과, 가능한 치료)을 이해시킨다.

(2) 질환의 유전방식과 가족의 재발 위험도를 평가하고 이해시킨다.

(3) 재발 위험도를 줄일 여러 option들을 이해시킨다.

(4) 재발위험도, 가족들의 의도(목표, 가치관, 종교등)에 따라 여러 option들 중 하나를 적절히 선택하는 결정을 하게 한다.

(5) 피상담자 또는 환자와 그 가족이 질환에 대해 최선의 적응을 하게 도와준다(최신 치료법의 소개, 발전하는 연구, 검사법의 소개).

③ 유전상담의 요건

(1) 진단과 위험도의 평가

1) 정확한 진단이 중요한데 풍부한 임상경험과 문헌, 데이터베이스(예: LDDB, POSSUM 등)을 이용한다.

2) 가계도의 구축: 표준화된 심볼 및 software(Progeny, Cyrillic, Pedigree. Draw, Kindred 등)을 사용한다.

3) 위험도 평가

i) Mendelian risk: 가계도상의 위치, 유전방식에 의해 결정되며 DNA 분석 등으로 완벽히 평가할 수 있는 경우가 증가하고 있다. 주의할 점은 phenocopy, locus heterogeneity 등이 있지 않은지 고려해야 한다.

ii) Modified risk: Mendelian risk에 여러 다른 인자(conditional information)를 고려한다(예: Huntington 무도병의 발병나이에 따라 위험도가 달라진다).

iii) Empiric risk: 대부분의 다인자성 유전질환들과 기형증후군들에서 경험적인 위험도가 사용된다.

(2) 유전자검사(염색체, 생화학적, DNA 검사) 전후의 유전상담: 피상담자의 이해를 도울 수 있는 도구(소책자, 그림, 컴퓨터그래픽)가 필요하다.

1) 검사 전 유전 상담(pretest genetic counseling)의 요건
 검사목적, 검사과정, 검사 소요시간, 검사의 의의, 검사의 비용 및 부담자, 동의서작성

2) 검사 후 유전상담(postgenetic counseling)의 요건
 검사결과의 의미해석(양성, 음성의 의미), 가족구성원 위험도평가, 질병의 자연경과 설명, 질병의 관리 및 치료, 예방 option 설명

(3) Communication
 privacy와 confidentiality가 중요하다. 유전자 검사결과에 대한 피상담자 및 가족 구성원의 알 권리와 알지 않을 권리의 conflict를 숙지하여야 한다. 비지시적 상담(non-directive counselling)으로 환자의 자율성(autonomy)가 확립될 수 있도록 한다. 유전상담의 내용을 요약, 피상담자가 이해할 수 있는 언어로 문서화(documentation) 하여 전달한다.

(4) Support
 유전질환 등록 system, 환자의 자조모임, 비영리 지지단체의 활용과 가족구성원은 잠재적인 환자일 수 있지만 환자에 대한 support와 advocate를 하면서 caregiver의 역할을 할 수 있다.

④ 재발위험도의 평가(risk estimation):
Quantitative Genetics

(1) Probability theory: Law of addition & Law of multiplication

(2) The Hardy-Weinberg model

(3) Bayes' Theorem

- 1) prior probability
- 2) joint probability
- 3) posterior or relative probability

2. 증례 연구

본 연수 강좌 중 다음에 열거한 여러 종류의 질환군중에서 대표적인 질환의 환자병력, 가계도 유전자 분석결과와 기술한 중요한 issue들과 연관된 질문이 주어질 것이며 이에 대한 토론이 진행될 예정이다.

① 삼핵산 반복 서열 증폭에 의한 유전성 신경질환

(1) Coding region의 small scale expansion of CAG repeat (polyglutamine tract):

1) 질환들: Huntington disease, Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), spinocerebellar ataxia, Spinobulbar muscular atrophy (Kennedy's disease)

2) 유전자검시기법: PCR-PAGE, PCR-direct sequencing, PCR-fragment 분석 (capillary electrophoresis)

3) 결과해석에 범하기 쉬운 오류 들

i) primer위치와 정확한 copy수

4) 유전상담의 issue들

i) 18세미만의 무증상 자녀를 검사할 것인가?

ii) 정상범위와 겹치는 gray zone을 어떻게 해석할 것인가?

iii) 부계를 통한 유전과 모계를 통한 유전 시 유전자형과 표현형의 차이는?

iv) 유전자형과 표현형의 연관성

v) 산전진단의 문제들

(2) Non-coding region의 large scale expansion

1) 질환들: Fragile X증후군(5'-upstream region CGG expansion of FMR1 gene), myotonic dystrophy (3'-untranslated region of DMPK gene, CTG expansion)

2) 유전자 검시기법: genomic southern with or without methylation specific RFLP, PCR-Southern, long PCR-PAGE, PCR-fragment 분석(capillary electrophoresis)

3) 결과해석에 범하기 쉬운 오류들

i) Southern시에 somatic mosaicism 때문에 정확한 copy 수를 알기 어렵다.

ii) Fragile-X 증후군 유전자 검사에서의 methylation 여부의 확인과 해석

4) 유전상담의 issue들

i) Fragile-X증후군 유전자검사에서 premutation결과의 해석: 남자와 여자의 경우 어떻게 다른가?

ii) Myotonic dystrophy의 locus heterogeneity: DM2

iii) 신생아형 myotonic dystrophy와 모계유전, 산전진단의 문제들

iv) 유전자형과 표현형연관성

(3) Intron region의 medium size의 (GAA)n expansion in 1st intron of X25 gene

- 1) 질환: Friedreich's ataxia
- 2) 유전자검사 기법: long PCR, PCR-Southern, genomic Southern
- 3) 결과해석에 범하기 쉬운 오류 들
 - i) 상염색체 열성유전질환임으로 두 대립유전자의 copy 수를 결정해야하는데 불완전한 PCR로 보인자와 환자를 구별하지 못하는 오류를 범 할 수 있다.
 - ii) 마찬가지로 정상인과 보인자를 구별하지 못하는 오류를 범할 수 있다.
 - iii) 4%에서는 점돌연변이 동형접합체 또는 삼핵산중폭 돌연변이와 점돌연변이의 복합이형접합체 양상을 보인다.
- 4) 유전상담의 issue들
 - i) 다른 triplet expansion과는 달리 유전자 기능의 loss of function에 기인한다.
 - ii) 유전자형과 표현형연관성
 - iii) 산전진단의 문제들

② 사립체성 신경근육질환

- 1) 질환
 - i) 점돌연변이에 의한 질환들
 - MEERF (myoclonic epilepsy and ragged red fibers) : 8344 A→G, mtRNA^{lys}, 8356 T→C, mtRNA^{lys}
 - MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episode) : 3243, 3271, 3252
 - Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) : 3394, 3460, 4216, 4917, 5244, 7444, 11778, 13708, 14484, 15257, 15812
 - Pigmentary retinal degeneration : 8993, 3243
 - ATP synthase 결핍
 - Leigh disease
 - ii) 결실 또는 중복변이에 의한 질환들
 - Kearns-Sayre syndrome(KSS)
 - Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO) syndrome
 - Pearson syndrome
- 2) 유전자 검사기법: mitochondrial whole gene sequencing, Southern analysis
- 3) 결과해석에 범하기 쉬운 오류들
 - i) sequence variation의 해석
 - ii) heteroplasmy ratio에 초래된 underrepresentation에

의한 염기서열 분석의 오류

③ Dystrophinopathies

- 1) 질환들
 - Duchenne type vs Becker type 진행성 근이영양증
 - i) Dystrophin유전자: positional cloning으로 처음 발견된 매우 큰 유전자로서, 2.5 Mb, 전사하는데 16 시간 걸리며 약 80개의 exons & introns으로 구성됨.
 - ii) 2개의 결실변이 hot spot: exons 44-50 & 2-13
 - iii) in-frame vs out of frame; Becker vs Duchenne
 - iv) amino terminus of dystrophin vs carboxy terminus of dystrophin;
 - Becker vs Duchenne
 - v) Central domain deletion; 대부분 경한 Becker type
 - vi) 약 45%의 DMD와 30%의 BMD 환자는 결실변이가 아님.
 - 2) 유전자 검사기법; multiplex PCR, MLPA, linkage analysis, FISH, Southern analysis
 - 3) 결과해석에 범하기 쉬운 오류들
 - i) multiplex PCR의 위양성과 위음성
 - ii) 연관분석시의 유전자조합에 의한 오류-표지자선택에 주의
 - 4) 유전상담의 issue들
 - i) 유전자분석결과로 Becker형과 Duchenne형을 구별할 수 있는가?
 - ii) 보인자의 분석 및 유전상담
 - iii) 산전진단의 문제들
- ④ 척수성 근위축증
 - 1) Survival motor neuron (SMN)
 - i) 1.7 kb transcripts, 8 exons, 20 kb of genomic DNA
 - ii) 최소한 2 copy인 SMN-C과 SMN-T로 coding region에 2 bp의 차이가 있다.
 - iii) SMN-T 결실이 90-95%의 SMA 환자에서 관찰된다.
 - iv) 약 1%의 환자부모가 SMN-T 동형접합체 형태로 결실
 - v) splice site mutation, 기타 점돌연변이, 4-bp frame shift deletion 등이 보고되어 있다.
 - 2) Neuronal apoptosis inhibitor protein(NAIP)

i) 6.0 & 7.0 kb transcripts, 16 exons, 70 kb of genomic DNA, apoptosis 억제 기능

ii) 45-55% of type I과 <18% of type II & III SMA 환자들은 NAIP가 결실

3) 유전자 검사기법: PCR-RFLP, DNA sequencing, real time PCR

4) 결과해석에 범하기 쉬운 오류들

i) 점돌연변이와 결실변이의 복합이형접합체의 가능성

ii) 점돌연변이와 미세결실변이등의 가능성

iii) SMN-C 단독결실의 해석

iv) NAIP결실의 의미

5) 유전상담의 issue들

i) genotype-phenotype연관성(SMN-C copy수 및 NAIP 결실유무)

ii) 산전진단의 issue들

iii) 무증상 보인자의 SMN-T 동형접합결실문제

⑤ Prader-Willi 증후군(PWS)과 Angelmann 증후군(AS)

1) 유전자검사기법: PCR bisulfite with methylation-specific primers, FISH, 염기서열분석

2) 결과해석에 범하기 쉬운 오류들

i) FISH상 정상소견의 해석

ii) UPD와 미세결실

3) 유전상담의 issue들

i) Imprinting gene 돌연변이 가능성

ii) 산모의 연령과 PWS 분자유전학적 발병기전

iii) PWS에서 UPD와 미세결실의 임상양상 차이

iv) 산전진단의 issue들

⑥ Torsion dystonia

1) 유전자 검사기법: PCR-heteroduplex assay, PCR-PAGE, 염기서열 분석

2) 결과해석에 범하기 쉬운 오류

i) 98%환자가 exon1의 3 bp 결실

3) 유전상담의 issue들

i) de novo mutation

ii) penetrance

iii) variable expressivity

⑦ Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)

1) 유전자검사 기법: 염기서열분석

2) 결과해석에 범하기 쉬운 오류

i) SNP와 mutation의 구별: 모든 돌연변이는 cystine, arginine residue의 변화를 초래

ii) target exons (exon3,4,11,18) 의 돌연변이가 전체 돌연변이의 몇 %를 cover (? 85%)

3) 유전상담의 issue들

Table. 유전성 발초 신경질환들

	Locus	Gene	Mechanism
Charcot-Marie-Tooth type 1 (HMSN I)			
CMT1A	17p11.2-12	PMP22	Duplication/point mutation
CMT1B	1q22-23	MPZ	Point mutation
CMT1C	Unknown	Unknown	Unknown
CMTX	Xq13.1	Cx32	Point mutation
CMT4	8q	Unknown	Unknown
Charcot-Marie-Tooth type 2 (HMSN II)			
CMT2A	1p36	Unknown	Unknown
CMT2B	3q	Unknown	Unknown
CMT2C	Unknown	Unknown	Unknown
Dejerine-Sottas disease (DSD) (HMSN III)			
DSDA	17p11.2-12	PMP22	Point mutation
DSDB	1q22-23	MPZ	Point mutation
Hereditary neuropathy with pressure palsies (HNPP)			
HNPPA	17p11.2-12	PMP22	Deletion/point mutation
HNPPB	Unknown	Unknown	Unknown

- i) de novo mutation
- ii) penetrance
- iii) variable expressivity

⑧ 유전성 발초 신경질환

- 1) 질환들(Table)
- 2) 유전자 검사기법: FISH, PCR-RFLP, 염기서열분석, realtime PCR
- 3) 결과해석 및 유전상담의 문제들
 - i) locus heterogeneity
 - ii) SNP vs mutation

참고문헌

- 1) Conner KE, Rosenberg RN: Genetic basis of ataxia; In Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL(es): The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. 2nd ed, Boston, Butterworth-Heinemann 1997;503-44.
- 2) Wang CH, Carter TA, Gilliam TC: Neuropathies and Neuronopathies. In Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL(es): The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. 2nd ed, Boston, Butterworth-Heinemann 1997;785-816.

부록 1. Technique/Method Master List

1. Allele-specific PCR/ARMS (amplification refractory mutation system)
2. Bead array
3. Invader chemistry
4. Mass spectrometry
5. Microarray technology
6. MLPA (multiplex ligation probe amplification)
7. Mutation scanning using dHPLC, SSCP, DGGE, TGGE, heteroduplex analysis, melting curve analysis
8. Oligonucleotide ligation assay (OLA)
9. PCR, bisulfite with methylation-specific primers
10. PCR, followed by capillary electrophoresis
11. PCR, followed by gel electrophoresis (agarose, polyacrylamide, etc.)
12. PCR, GeneScan fragment size analysis
13. PCR, followed by heteroduplex analysis
14. PCR, real-time with intercalating dye (e.g. SYBR Green)
15. PCR, real-time with allele-specific probe
16. PCR, melting curve analysis with intercalating dye (e.g. SYBR Green)
17. PCR, melting curve analysis with allele-specific probe
18. PCR, followed by RFLP assessment (restriction enzyme digestion)
19. PCR, followed by membrane transfer and probe hybridization
20. PCR, long distance or long
21. PCR, multiplex
22. PCR-based assay capable of differentiating methylated sites
23. PCR-based assay targeted at SNRPN gene expression
24. Pyrosequencing
25. Sequencing
26. Southern blot (without prior PCR amplification)
27. Southern blot using methylation sensitive restriction enzymes

부록 2. Reagent and Manufacturer Master List

1. In-house ("home-brew")
2. Abbott Molecular
3. AppliedBiosystems (ABI)
4. Bayer
5. Bio-Rad
6. Chemicon
7. eSensor
8. Innogenetics
9. Ipsogen
10. Luminex
11. MRC Holland
12. Nanogen
13. Promega
14. Qiagen
15. Roche
16. Tepnel
17. Third Wave InPlex
18. Third Wave Invader
19. Tm Bioscience
20. Rotorgene
21. Zymo Research