

Association between *MIR149* SNPs and Intrafamilial Phenotypic Variations of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A

Yu Jin Choi¹, Ah Jin Lee¹, Soo Hyun Nam², Byung-Ok Choi² and Ki Wha Chung^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Kongju National University, 56 Gongjudaehak-ro, Gongju 32588, Korea

²Department of Neurology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Received May 15, 2019 / Revised June 10, 2019 / Accepted June 11, 2019

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is a group of rare peripheral neuropathies characterized by progressive muscle weakness and atrophy and areflexia in the upper and lower extremities. The most common subtype of CMT is CMT1A, which is caused by a tandem duplication of the *PMP22* gene in the 17p12 region. Patients with CMT1A show a loose genotype - phenotype correlation, which suggests the existence of secondary genetic or association factors. Recently, polymorphisms of rs71428439 (n.83A>G) and rs2292832 (n.86T>C) in the *MIR149* have been reported to be associated with late onset and mild phenotypic CMT1A severity. The aim of this study was to examine the intrafamilial heterogeneities of clinical phenotypes according to the genotypes of these two SNPs in *MIR149*. For this study, we selected 6 large CMT1A families who showed a wide range of phenotypic variation. This study suggested that both SNPs were related to the onset age and severity in the dominant model. In particular, the AG+GG (n.83A>G) and TC+CC genotypes (n.86T>C) were associated to late onset and mild symptoms. Motor nerve conduction velocity (MNCV) was not related to the *MIR149* genotypes. These results were consistent with the previous studies. Therefore, we suggest that the rs71428439 and rs2292832 variants in *MIR149* may serve as genetic modifiers of CMT1A intrafamilial phenotypic heterogeneity, as they have a role in the unrelated patients. This is the first study to show an association using large families with variable clinical CMT1A phenotypes. The results will be helpful in the molecular diagnosis and treatment of patients with CMT1A.

Key words : Charcot-Marie-Tooth disease Type 1A (CMT1A), genetic modifier, intrafamilial phenotypic heterogeneity, Korea, *MIR149*

서 론

샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease: CMT)은 유전운동감각신경병증(hereditary motor and sensory neuropathy: HMSN)으로도 불리는 희귀 말초신경병의 그룹으로, 진행성 근육 약화 및 위축, 감각 소실, 상지 및 하지의 무반사 증상을 나타낸다. CMT는 유전적 및 임상적으로 상당히 이질적인 특성을 보이며, 유병율은 약 2,500명당 1명 정도이다[18]. CMT는 단일 유전적 원인에 의해 발병하지만, 지금까지 130여 유전자의 돌연변이가 CMT 및 이와 연관된 말초신경병의 발병과 관련된 것으로 알려졌다[17]. CMT는 일반적으로 정중운동신경의 전기전도도(motor nerve conduction velocity: MNCV)가 38 m/s 미만으로 떨어진 수초결손형(demyelinat-

ing type)의 CMT1과 38 m/s 이상인 축삭형(axonal type)의 CMT2로 구분된다[7, 8]. CMT는 유전자형과 표현형 간의 상관관계는 느슨한 것으로 알려져 있으며[2, 14, 22], 표현형적 이질성은 가족 내에서 관찰되는 경우도 있다[1, 13].

CMT type 1A (CMT1A, MIM #118220)는 가장 빈번하게 관찰되는 CMT 유형으로, 전체 CMT 환자의 30% 이상, CMT1 유형의 50% 이상을 차지한다. CMT1A는 peripheral myelin protein 22 (*PMP22*) 유전자가 포함되어 있는 염색체 17p12 지역에서 비균등 교차(unequal crossover)에 의한 1.4 Mb 길이의 직렬 중복(tandem duplication)으로 발병한다[11]. 반면, 동일 지역의 결손은 유전성 압박마비 신경병(hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP, MIM #162500)을 유발한다(Fig. 1A) [4]. 수초 형성에 필수적인 *PMP22* 유전자가 과발현되면, 구조적, 기능적으로 불안정한 수초를 만들 수 있다. 정상인의 유전체에는 *PMP22* 유전자가 2개이지만, CMT1A는 3개를 가지므로, 모든 CMT1A 환자에서는 *PMP22* 유전자의 발현이 정상인에 비해 1.5 배로 동일하게 증가될 것으로 예상된다. 그러나 상당히 넓은 범위의 다양한 표현형이 관찰되는데, 환자 개개인간 질병의 중증도는 휠체어를 사용해야 하는 매우 심한 증상부터 간단한 손저림만 보이거나 거의 무증상까지 있으며, 발병 연령은 유아기부터 60세까지

*Corresponding author

Tel : +82-41-850-8506, Fax : +82-41-850-0957

E-mail : kwchung@kongju.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

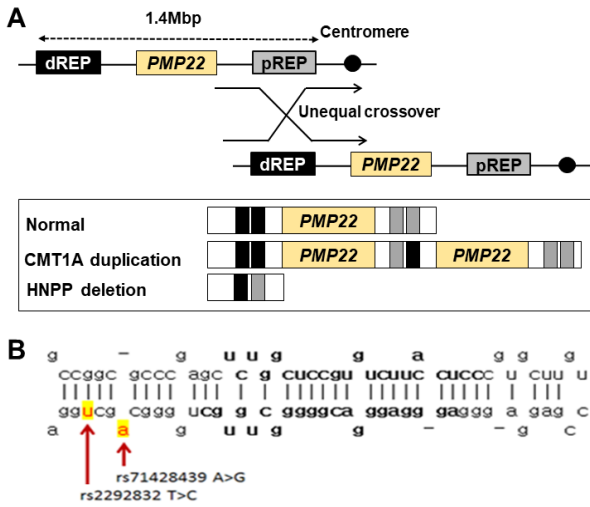


Fig. 1. Unequal crossover in 17p12 region containing *PMP22* gene and location of 2 SNPs in premature miRNA149. (A) Occurrence of CMT1A duplication and HNPP deletion by recurrent unequal crossover in 17.12 region of 1.4 Mbp length (CMT1A: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A; HNPP: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies; SNP: single nucleotide polymorphism). (B) Schematic secondary structure of premature miRNA 149. Two SNPs of rs71428439 (n.83A>G) and rs2292832 (n.86T>C) were indicated by red arrows.

매우 다양하다[9]. 표현형적 이질성의 정확한 원인은 아직 밝혀지지 못했지만 이러한 표현형의 이질성은 *PMP22* 발현과 연관이 있을 것으로 예상 가능하며, 여러 2차적 유전적 요인이 존재할 것으로 제시되고 있다. *PMP22*의 발현을 조절하는 유전자로서 *LITAF* 및 *SH3TC2*가 보고되었다[3, 20].

MIR149 유전자에 대해 5 개의 예측 프로그램(TargetScan Human 6.2, DIANA-microT, RNA22, MirTarget2, miRanda)을 사용하여 CMT 유발 유전자의 표적 여부를 예측하였는데, 3 가지 이상의 표적 예측 프로그램으로부터 *PMP22*, *MPZ*, *SPTLC2*, *SH3TC2*, *LITAF*, *ARHGEF10*, *DHTKD1*, *DNAJB2*,

KIF1B, *LRSAM1*, *NDRG1* 및 *SEPT9*를 포함한 CMT 관련 유전자 mRNA의 3'-UTR과 결합할 것으로 예측되었다[15]. 최근에 *MIR149*의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이 CMT1A의 중증도를 조절한다는 연구결과가 보고되었다[6, 15]. *MIR149*의 miRNA 전구체의 3' 말단 근처에는 n.83A>G (rs71428439)와 n.86T>C (rs2292832)의 두 개의 SNP이 위치하고 있는데(Fig. 1B), 혈연 관계가 없는 한국인의 CMT1A 환자를 대상으로 하는 선형 연구에서 두 SNP의 유전자형이 CMT1A의 표현형적 이질성과 연관이 있다고 보고되었다[6, 15]. 즉, n.86T>C의 TC와 CC 유전자형과 n.83A>G의 AG와 GG 유전자형은 모두 후기 발병 및 가벼운 증상과 상관성이 있음을 보였다.

본 연구팀은 한 가족 내에서도 환자 간에 발병 연령이나 증상의 심한 정도에서 큰 차이를 보이는 한국인 CMT1A 대가계들을 다수 확보하여, *MIR149*의 rs71428439 및 rs2292832의 유전자형이 가족내 표현형적 이질성(intrafamilial phenotypic heterogeneity)과도 관련되는지를 밝히고자 하였다. 이에 본 연구에서는 6 CMT1A 가계의 38명의 환자를 대상으로 *MIR149*의 두 SNP에 대한 유전자형을 조사하여, 유전자형과 발병 연령, 중증도 및 신경전기전도도와와의 상관성을 규명하였다.

재료 및 방법

연구대상

본 연구는 삼성서울병원에 내원한 *PMP22* 중복을 가진 환자 가계 중 환자 수가 5명 이상이며, 중증도(severity) 및 발병 연령이 다양한 6가계를 대상(환자수: 38명)으로 수행하였다(Fig. 2, Table 1). 대조군으로는 CMT 환자가 아니면서 환자와 평균 연령 및 성별의 비율이 일치하는 한국인 38명을 조사하였다. 본 연구는 삼성서울병원과 공주대학교 생명윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다(SMC-2018-05-102-002, 2018-27).

임상적 표현형 분석

발병 연령은 증상이 처음 나타나는 환자의 연령을 묻는 방

Table 1. Base-line characteristics of the CMT1A families and control subjects

Family ID	Control	Cases						
		FC45	FC152	FC270	FC272	FC296	FC521	Total/mean
No. of patients	-	6	6	7	6	5	8	38
No. of non-patients	38	12	8	8	10	7	9	54
Patient sex (male/female)	16 / 22	2 / 4	3 / 3	4 / 3	3 / 3	3 / 2	1 / 7	16 / 22
Examined age (yrs, mean±SD)	31±16.5	43.8±16.1	40.2±20.0	24.3±16.6	33.0±13.5	35.6±14.6	26.1±14.1	33.1±16.5
Onset age (yrs, mean±SD)	-	25.7±23.3	34.5±22.6	15.0±15.6	27.0±17.0	13.0±6.9	11.4±13.2	20.6±18.3
CMTNS	-	14.2±5.4	8.3±6.4	8.1±5.4	11.7±7.0	13.2±2.9	9.1±5.7	10.6±5.8
Median MNCV (m/s)	-	20.9±0.9	25.5±5.0	22.5±3.0	18.7±2.5	15.1±2.8	27.4±6.9	22.1±5.7

CMT1A: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMTNS: CMT neuropathy score, MNCV: median motor nerve conduction velocity, SD: standard deviation

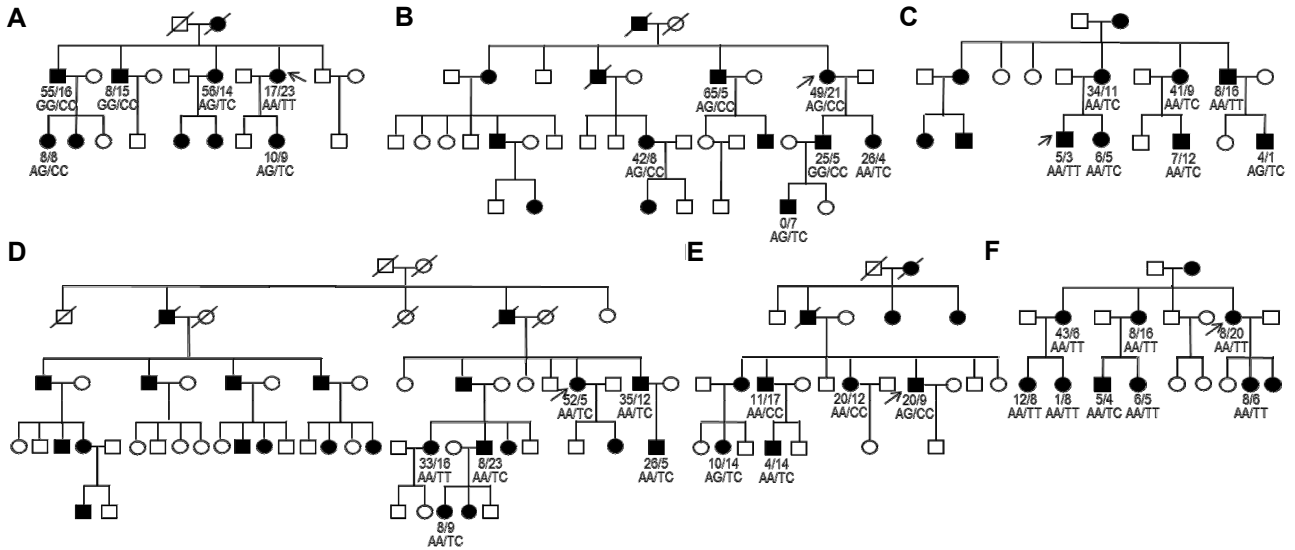


Fig. 2. Pedigrees of six Korean CMT1A families with variable phenotypic variations. The filled squares and circles are affected individuals and unfilled squares or circles denoted unaffected individuals. Probands are indicated by arrows. At the bottom of each examined patient, onset age (years) and CMT neuropathy score (CMTNS) were provided at the upper line and genotypes of rs71428439 (n.83A>G) and rs2292832 (n.86T>C) are provided at the bottom line. (A) FC45, (B) FC152, (C) FC270, (D) FC272, (E) FC296, and (F) FC521.

식으로 결정하였으며, 환자의 중증도의 척도로는 CMT 신경 병증 점수(CMT neuropathy score, CMTNS)를 사용하여 결정하였다[12]. 정중운동신경 전도도(median motor nerve conduction velocity: MNCV)는 팔꿈치와 손목에 자극을 주어 결정하였다.

DNA 추출 및 PMP22 증복과 MIR149 SNP의 유전자형 결정

전체 genomic DNA는 혈액으로부터 QIAamp DNA blood kits (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. PMP22의 증복은 염색체 17p12 (1.4 Mb 길이) 지역에 위치하는 6 microsatellite 좌위(D17S921, D17S9B, D17S9A, D17S918,

D17S4A, D17S2230)의 multiplex PCR과 PMP22의 유전체 양 (genomic dosage)에 대한 real-time PCR을 수행하여 결정하였다. Multiplex PCR은 Choi 등(2007)의 방법을 약간 변형하여 수행하였으며[5], 각 microsatellite의 primer 서열, 농도 및 형광 표지에 대한 내용은 Table 2에 나타내었다. Multiplex PCR의 증폭 산물은 ABI 3130xl 유전자 분석기(Applied Biosystems, Foster City, USA)로 분석하였고, 유전자형 결정은 GeneMapper ID version 4.1 (Applied Biosystems) 프로그램을 이용하였다. PMP22의 real-time PCR은 CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, USA)과 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan)을 사용하여 수행하였다. PMP22의 증폭은 5'-GTGGCATCTCAACTCGGATT-3'과 5'-

Table 2. Primer sequences, concentration and labeling for multiplex PCR of 6 microsatellites

Locus	Primer sequence (5'→3')	Primer concentration (μM)	Labeling dye
D17S921	F: GTGTTGTATTAGGCAGAGTTCTCC R: GGCAGTAGATGGTGACTTTATGGC	0.3	FAM
D17S9B	F: TCTCAGTCCTGATTTCTTGATTTTG R: CCAGAGCTAACACCACATTC	0.72	HEX
D17S9A	F: CAACCATCAGTGATTTGATGGTTTAC R: GAGTTGTCAGTACAACCTGTTC	0.52	HEX
D17S918	F: TCCTGTAATCTGTCCCCAAACGTC R: TTCCTCACACAACCTATTGATAGTC	0.2	HEX
D17S4A	F: CTGTGGAGGAAAGAAAACACTGCC R: GCACTAAAGTAGCTTGTAACCTCG	0.35	FAM
D17S2230	F: AGGAACTGATGTCTAAAACTATCC R: GTGAATCCAGGAGGCAGAGCTTGC	0.4	FAM

TACGCTCAGAGCCTCAGACA-3'을 사용하였고, 대조 유전자로서 ACTB의 증폭은 5'-AAGATGACCCAGGTGAGTGG-3'과 5'-CCTGCAGAGTTCCAAAGGAG-3'의 primer를 사용하였으며, 증폭 결과는 2^{-ΔΔC_T} 방법으로 분석하였다[10]. 2개의 SNP이 위치한 MIR149 서열은 5'-CTCTGGCTCCGTGTCTTCA-3'과 5'-GTCAGCCACCTCTCACACC-3'의 primer를 사용하여 SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA)에서 PCR 수행으로 증폭하였으며, 증폭 산물은 Sanger 방법으로 염기서열을 조사하여 각 SNP의 유전자형을 결정하였다.

통계분석

발병 연령, 피검사 연령(examined age), CMTNS와 MNCV는 평균±표준 편차(SD)로 표시하였고, 유전자형은 빈도로 표시했다. Hardy-Weinberg 평형 (HWE)은 chi-square test로 검사하였다. Web-기반 SNP 분석은 SNPStats web tool을 사용하였고[http://bioinfo.iconcolgia.net/SNPstats/] [21], 기타 통계 분석은 SPSS version 20 (SPSS, Chicago, USA)을 사용하여 수행하였다.

결 과

CMT1A 가계 선발 및 임상적 특성

본 연구에서 환자가 5명 이상으로 가족내 환자 간에 임상적 특징이 차이가 많이 나는 6 CMT1A 가계의 환자 38명(남 16명, 여 22명)과 동일한 숫자의 정상 대조군(남 16명, 여 22명)을 선발하였는데, 환자군과 대조군의 평균 연령은 33.1±16.5세와 31.2±16.5세로 유의적 차이는 없었다($P = 0.973$). 환자군에서 발병 연령, CMTNS, MNCV의 임상적 표현형은 개인간에 큰 차이를 보였다(Table 1). 평균 발병 연령은 20.6±18.3세로, 가계별로는 FC521 가계의 11.4±13.2세부터 FC152 가계의 34.5±22.6세까지 매우 다양하였으며, 특히 환자 개인별로는 영아(0세)부터 65세까지 큰 차이를 보였다. 증상의 중증도를 나타내는 CMTNS의 평균값은 10.6±5.8로, FC270 가계의 8.1±5.4에서 FC45 가계의 14.2±5.4의 범위를 보였으며, 환자별로는 최소 1에서 최대 23까지 다양한 중증도의 차이를 보였다. 환자의 정중운동신경 전도도(MNCV)의 평균값은 22.1±5.7 m/s였으며(정상 속도 ≥ 50.5 m/s), 가계별로는 FC296 가계의 15.1±2.8 m/s에서 FC521 가계의 27.4±6.9 m/s의 범위를 보였지만, 발병 연령이나 CMTNS에 비해서는 차이가 크지 않았다. 발병 연령과 중증도(CMTNS) 간에는 유의적인 연관성이 관찰되지 않았다($R^2 = 0.001$, $P = 0.850$, Fig. 3).

CMT1A 환자의 두 MIR149 SNP의 대립유전자 빈도 및 유전자형 분포

표현형적 이질성을 보여주는 6가계, 38명의 CMT1A 환자군

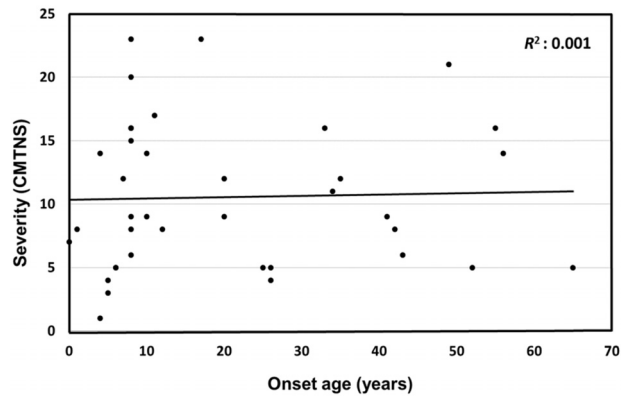


Fig. 3. Scatter plot of the onset age and clinical severities of the 38 CMT1A patients. The severity was measured by CMT neuropathy score (CMTNS).

과 38명의 비환자 대조군의 MIR149의 두 SNP인 rs71428439 (n.83A>G)와 rs2292832 (n.86T>C)의 유전자형을 조사하였다 (Table 3). rs71428439의 A 대립유전자 빈도는 대조군과 환자군에서 각각 0.842와 0.789였으며, rs2292832의 T 대립유전자 빈도는 대조군과 환자군에서 각각 0.684와 0.513이었다. 유전자형 분포는 rs71428439와 rs2292832에서 환자군과 대조군 모두에서 HW 평형 상태를 유의적으로 벗어나지 않았다 (rs71428439: $P = 0.949$, $P = 0.199$; rs2292832: $P = 0.553$, $P = 0.519$).

SNP rs71428439에서 AA, AG, GG 3가지 유전자형을 환자군에서 모두 보인 가계는 FC45와 FC152이었으며, AA와 AG 유전자형이 관찰된 가계는 FC270와 FC296이었다. AA 유전자형만 관찰되어 다형성을 보이지 않은 FC272와 FC521은 rs71428439의 유전자형과 표현형의 상관성 분석에서 제외하였다. rs2292832의 경우 TT, TC, CC의 3가지 유전자형이 모두 관찰된 가계는 FC45이었으며, TT와 TC 유전자형이 관찰된 가계는 FC270, FC272, FC521이었다. TT 유전자형만 관찰되어 다형성을 보이지 않은 FC152와 FC296은 역시 rs2292832의 유전자형과 표현형의 연관성 분석에서 제외하였다.

rs71428439 SNP의 유전자형과 가계 내 표현형의 상관성

rs71428439 (n.83A>G)에 대해 AA, AG, GG 유전자형 중에서 2가지 이상이 관찰된 FC45, FC152, FC270, FC296 가계를 대상으로 유전자형과 표현형간의 연관성 분석을 수행하였다. 본 연구에서는 Nam 등(2018)과 Choi 등(2019)의 선행 연구를 따라 우성 모델을 적용하여, 환자 그룹을 AA 유전자형과 AG나 GG (AG+GG) 유전자형의 소그룹으로 나누고 두 그룹에 대한 발병 연령, CMTNS 및 MNCV의 값을 계산하여 유전자형과의 상관성을 분석하였다[6, 15].

발병 연령에서 FC45, FC152, FC296의 3가계에서 AG+GG 유전자형을 가진 환자들이 AA 유전자형을 가진 환자들보다 상대적으로 더 늦은 발병을 보였으며, FC270 가계에서만 AA 유전자형을 가지는 환자가 더 늦은 발병을 보여주었다(Fig. 4A).

Table 3. Genotype and allele frequencies of two *MIR149* SNPs in CMT1A patients and controls

SNP	Genotype	Control (%) n=38	Patient families						
			Total (%) n=38	FC45 (%) n=6	FC152 (%) n=6	FC270 (%) n=7	FC272 (%) n=6	FC296 (%) n=5	FC521 (%) n=8
rs71428439 (n.83A>G)	AA	27 (71.1)	25 (65.8)	1 (16.7)	1 (16.7)	6 (85.7)	6 (100)	3 (60.0)	8 (100)
	AG	10 (26.3)	10 (26.3)	3 (50.0)	4 (66.7)	1 (14.3)	0 (0.0)	2 (40.0)	0 (0.0)
	GG	1 (2.6)	3 (7.9)	2 (33.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	A allele	64 (84.2)	60 (78.9)	5 (41.7)	6 (50.0)	13 (92.9)	12 (100)	8 (80.0)	16 (100)
	G allele	12 (15.8)	16 (21.1)	7 (58.3)	6 (50.0)	1 (7.1)	0 (0.0)	2 (20.0)	0 (0.0)
	HWE-P	0.949	0.199						
rs2292832 (n.86T>C)	TT	17 (44.7)	11 (28.9)	1 (16.7)	0 (0.0)	2 (28.6)	1 (16.7)	0 (0.0)	7 (87.5)
	TC	18 (47.4)	17 (44.7)	2 (33.3)	2 (33.3)	5 (71.4)	5 (83.3)	2 (40.0)	1 (12.5)
	CC	3 (7.9)	10 (26.3)	3 (50.0)	4 (66.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)
	T allele	52 (68.4)	39 (51.3)	4 (33.3)	2 (16.7)	9 (64.3)	7 (58.3)	2 (20.0)	15 (93.8)
	C allele	24 (31.6)	37 (48.7)	8 (66.7)	10 (83.3)	5 (35.7)	5 (41.7)	8 (80.0)	1 (6.3)
	HWE-P	0.553	0.519						

CMT1A: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, SNP: single nucleotide polymorphism.

FC45에서 AA 유전자형은 17.0±0.0세, AG+GG 유전자형은 27.4±25.7세의 평균 발병 연령을 보였으며, FC152에서는 AA와 AG+GG 유전자형 환자들은 각각 26.0±0.0세와 36.2±24.8세, FC296에서는 AA와 AG+GG 유전자형 환자들은 각각 11.7±8.0세와 15.0±7.1세로 조사되었다. 그러나 FC270 가계는 AA와 AG+GG 유전자형 환자들은 각각 16.8±16.2세와 4.0±0.0세를 보여, AA 유전자형을 가질 때 더 늦은 발병을 보였다. 4가계 전체 환자의 평균 발병 연령은 AA 그룹은 16.3±12.6세, AG+GG 그룹은 27.1±23.1세로, AG+GG 그룹이 10세 이상의 늦은 발병 연령을 보이는 것으로 조사되었다.

중증도를 나타내는 CMTNS의 값을 AA와 AG+GG 그룹간에 비교하였을 때, AG+GG 유전자형을 가진 환자들이 AA 유전자형을 가진 환자들보다 3가계에서 더 낮은 값을 보여 상대적으로 증상이 가벼운 것으로 조사되었으며, 한 가계에서만 AA 유전자형을 가진 환자들의 증상이 더 가벼운 것으로 조사되었다(Fig. 4B). FC45는 AA와 AG+GG 유전자형 환자들은 각각 CMTNS 값을 23.0±0.0와 12.4±3.6, FC270은 AA와 AG+GG

유전자형 환자들은 각각 9.3±4.8과 1.0±0.0, FC296은 AA와 AG+GG 유전자형 환자들은 각각 14.3±2.5과 11.5±3.5을 보여 AG+GG 유전자형 환자들이 더 가벼운 증상을 보였다. 그러나 FC152는 AA와 AG+GG 환자들이 각각 4.0±0.0과 9.2±6.7의 값을 보여, AA 유전자형 그룹에서 가벼운 증상을 나타내었다. 4가계 평균 CMTNS는 AA 그룹은 11.5±6.1, AG+GG 그룹은 10.2±5.5로, AG+GG 그룹이 약간 낮은 값을 보였지만, 큰 차이는 없었다.

정중운동신경 전도도(MNCV)의 값을 AA와 AG+GG 그룹간에 비교하였을 때, 4가계 모두에서 AG+GG 그룹 환자들이 AA 그룹 환자들보다 더 빠른 MNCV 값을 보였다(Fig. 4C). FC45, FC152, FC270 및 FC296 가계에서 AA와 AG+GG 그룹 환자들은 각각 20.5±0.0 m/s와 21.0±0.9 m/s, 21.2±0.0 m/s와 26.6±5.0 m/s, 21.9±2.8 m/s과 26.0±0.0 m/s, 14.8±3.7 m/s과 15.5±1.8 m/s의 MNCV 값을 보였다. 4가계를 통합하여 계산하면, AA 그룹은 19.8±4.1 m/s, AG+GG 그룹은 22.3±5.0 m/s로 AG+GG 그룹에서 약간 더 빠른 전기전도도를 보였다.

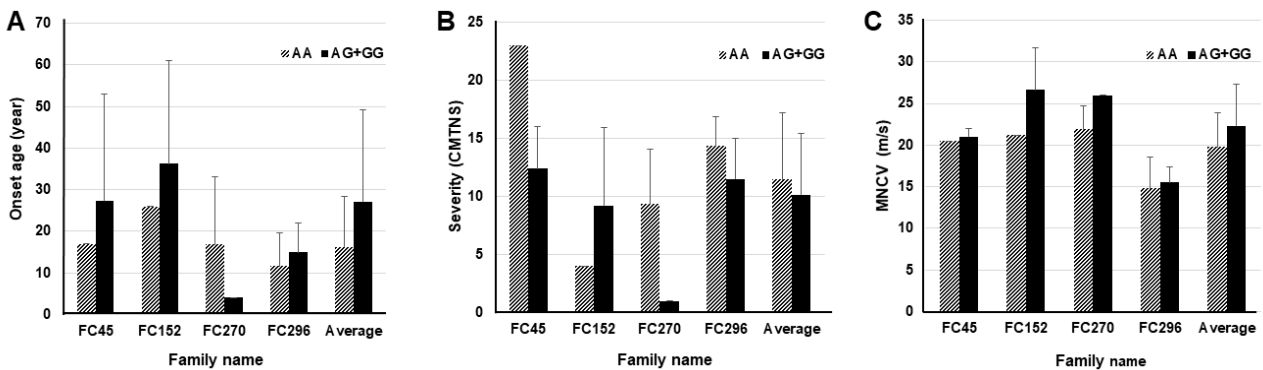


Fig. 4. Clinical phenotypes according to genotypes of *MIR149* rs71428439 (n.83A>G). (A) Onset ages vs. genotypes. (B) CMTNS vs. genotypes. (C) MNCV vs. genotypes.

rs2292832 SNP의 유전자형과 가계 내 표현형의 상관성

rs2292832 (n.86T>C)의 유전자형 조사에서 TT, TC, CC 중 2종류 이상의 유전자형이 관찰된 FC45, FC270, FC272, FC521의 4가계를 대상으로 유전자형과 표현형의 상관성을 조사하였다. rs2292832의 분석도 rs71428439의 경우와 마찬가지로 우성 모델을 적용하여, 환자 그룹을 TT 유전자형과 TC 및 CC (TC+CC) 유전자형의 소그룹으로 나누고, 두 그룹에 대한 표현형과 유전자형간의 상관성을 분석하였다[6, 15].

발병 연령에서 FC45, FC270의 2가계에서 TT 유전자형의 환자들보다 TC+CC 유전자형의 환자들 상대적으로 더 늦은 발병을 보였으며, FC272와 FC521의 2가계는 TT 유전자형 그룹이 TC+CC 그룹보다 더 늦은 발병을 보여주었다(Fig. 5A). FC45에서 TT와 TC+CC 유전자형의 그룹은 각각 발병 연령이 17.0±0.0세와 27.4±25.7세였으며, FC270은 TT와 TC+CC 환자들에서 각각 6.5±2.1세와 18.4±17.6세의 평균 연령이 조사되어, TC+CC 환자들 상대적으로 더 늦은 발병 연령을 보였다. 그렇지만, FC272와 FC521 가계는 TT와 TC+CC 유전자형의 환자는 각각 33.0±0.0세와 25.8±18.7세, 12.3±13.9세와 5.0±0.0세의 발병 연령을 보여, TT 유전자형의 환자들 상대적으로 더 늦게 발병하였다. 조사된 4가계의 평균 발병 연령은 TT 그룹은 13.5±12.9세, TC+CC 그룹은 22.7±19.7세로, TC+CC 유전자형의 그룹이 상당히 늦게 발병하였다.

CMTNS의 값을 TT와 TC+CC 그룹간에 비교하였을 때, 4가계 모두에서 AG+GG 유전자형을 가진 환자들 상대적으로 AA 유전자형을 가진 환자들보다 더 낮은 값을 보여 상대적으로 증상이 가벼운 것으로 조사되었다(Fig. 5B). 가계 별로 살펴보면, FC45, FC270, FC272 및 FC521 가계에서 TT와 TC+CC 유전자형을 가진 환자들은 각각 23.0±0.0과 12.4±3.6, 9.5±9.2와 7.6±4.6, 16.0±0.0과 10.8±7.4, 9.9±5.8과 4.0±0.0의 평균 CMTNS 값이 관찰되었으며, 4가계의 평균을 계산하면, TT 그룹은 11.5±6.8, TC+CC 그룹은 9.9±5.5로 큰 차이는 없었지만 TC+CC 유전자형에서 약간 가벼운 증상을 나타내었다.

MNCV의 분석에서 FC45와 FC521의 2가계 TC+CC 그룹의

환자들이 TT 유전자형 그룹보다 상대적으로 빠른 MNCV를 보였으며, FC270과 FC272의 2가계는 TT 유전자형 그룹이 TC+CC 그룹보다 약간 더 빠른 MNCV를 보여주었다(Fig. 5C). 즉, FC45와 FC521의 TT와 TC+CC 유전자형의 환자는 각각 20.5±0.0 m/s와 21.0±0.9 m/s, 25.6±5.1 m/s와 40.0±0.0 m/s의 평균 MNCV가 조사되었으며, FC270과 FC272의 TT와 TC+CC 유전자형의 환자는 각각 23.0±4.2 m/s와 22.3±2.9 m/s, 19.4±0.0 m/s와 18.6±2.7 m/s의 MNCV를 보였다. 조사된 4가계의 평균 MNCV에서 TT 그룹은 24.1±4.8 m/s, TC+CC 그룹은 21.8±5.5 m/s로, TT 그룹이 약간 더 빠른 전기전도도를 보였다.

고 찰

PMP22 유전자의 중복으로 발병하는 상염색체 우성 유전병인 CMT1A의 환자 사이에 나타나는 임상적 표현형의 차이는 2차적 유전적 요인의 존재를 예상하게 하였으며, 최근에는 비친척 관계의 CMT1A 환자를 대상으로 한 몇몇 연구에서 이런 유전적 요인이 제시된 바 있다[6, 15, 20]. 본 연구에서는 6개의 CMT1A 대 가계를 대상으로 MIR149의 rs2292832와 rs2292832의 유전자형과 표현형이 우성 모델의 적용에서 상관성을 조사하였는데, CMT1A 가계를 대상으로 표현형의 가족내 다양성에 유전자형-표현형의 비교 분석 연구는 처음이다.

Nam 등(2018)의 선행 연구처럼 우성 모델을 적용하여 환자들을 MIR149의 rs71428439 (n.83A>G)와 rs2292832 (n.86T>C)의 유전자형에 따른 임상적 표현형을 비교하였을 때, 비친척 관계의 환자를 대상으로 수행한 선행 연구와 상당히 비슷한 결과를 보였다[15, 16]. rs71428439에서 변이 대립유전자 가진 AG+GG 그룹은 AA 그룹에 비해 늦은 발병을 보인 가계가 3가계인데 비해, 조기 발병을 보인 가계는 1가계뿐이었으며, 4가계 평균은 AA 그룹은 16.3±12.6세, AG+GG 그룹은 27.1±23.1세로, 변이를 가진 그룹이 10세 이상의 늦은 발병을 보였다. rs2292832에서는 TC+CC 그룹은 TT 그룹과 비교했을 때

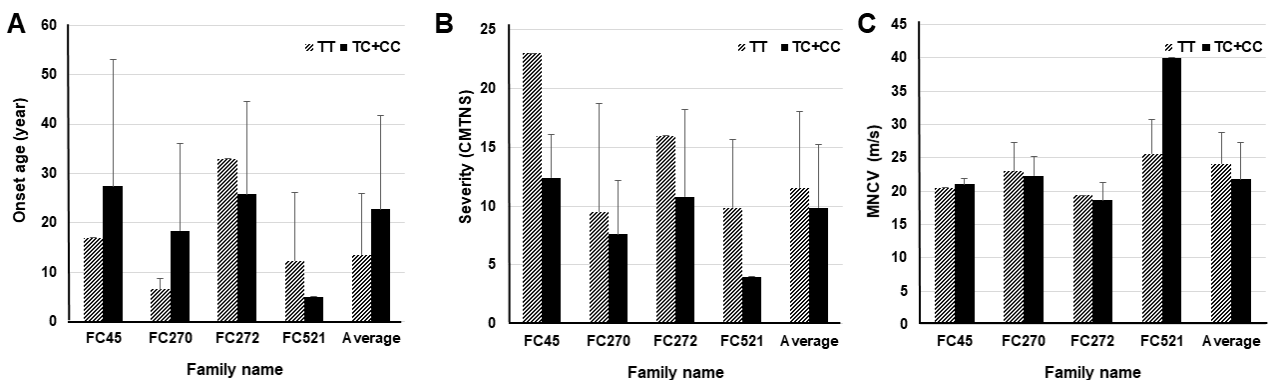


Fig. 5. Clinical phenotypes according to genotypes of MIR149 rs2292832 (n.86T>C). (A) Onset ages vs. genotypes. (B) CMTNS vs. genotypes. (C) MNCV vs. genotypes.

각각 2가계에서 더 빠르거나 느린 발병을 보였지만, 4가계 평균은 TC+CC 그룹은 22.7 ± 19.7 세로 TT 그룹의 13.5 ± 12.9 세에 비해 상당히 늦은 발병을 보였다. 증상의 중증도 지표로서 CMTNS에 대해, rs71428439의 AG+GG 그룹은 3가계에서 AA 그룹보다 더 낮은 값을 보였으며, 4가계 평균 CMTNS는 AA 그룹의 11.5 ± 6.1 에 비해 AG+GG 그룹이 10.2 ± 5.5 를 나타내어 근소하지만 더 가벼운 증상을 보였다. s2292832에서는 4가계 모두 TC+CC 그룹이 TT 그룹보다 더 낮은 값을 보였으며, 4가계 평균은 TT 그룹의 11.5 ± 6.8 에 비해 TC+CC 그룹이 9.9 ± 5.5 를 나타내어 역시 약간 더 가벼운 증상을 보였다. 즉, MIR149의 rs71428439 AG+GG와 s2292832 TC+CC 유전자형은 가족내의 늦은 발병과 가벼운 중증도의 유전적 요인으로 작용할 수 있음을 제시하였다.

전기전도도에 대해 rs71428439의 AG+GG 그룹은 4가계 모두에서 더 빠른 MNCV를 보였으며, 4가계 평균은 AA 그룹의 19.8 ± 4.1 m/s에 비해 AG+GG 그룹이 22.3 ± 5.0 m/s를 보여 약간 더 빠른 전기전도도를 보였다. s2292832에서는 TC+CC 그룹은 각각 2가계에서 더 빠르거나 느린 MNCV를 보였으며, 4가계 평균은 TT 그룹의 24.1 ± 4.8 m/s에 비해 TC+CC 그룹은 21.8 ± 5.5 m/s로 TT 유전자형 그룹이 오히려 약간 더 빠른 MNCV를 보였다. 이런 결과는 전기전도도는 MIR149의 SNP 유전자형과 유의적인 차이를 보이지 않았다는 선행 연구와 일치한다[15, 16].

MIR149의 특정 SNP 유전자형이 직접적으로 PMP22의 발현을 억제함으로써 CMT1A 환자들의 가벼운 증상을 유도하는지는 알 수 없다. CMT 관련 유전자들에 대한 miR149 RNA의 표적 여부를 여러가지 예측 프로그램들을 사용하여 조사하였을 때, miR149의 표적으로 PMP22 mRNA의 3'-UTR 뿐만 아니라 MPZ, SPTLC2, SH3TC2, LITAF, ARHGEF10 등 많은 CMT 유전자들의 mRNA가 표적인 것으로 예측되었다. 이런 예측(*in silico* prediction)은 MIR149의 변이형이 PMP22의 mRNA에 직접 작용하여 발현을 조절할 수도 있지만, 다른 CMT 유전자들의 발현을 조절함으로써 증상에 영향을 미칠 수도 있음을 시사하는 것이다. CMT1A의 표현형적 다양성은 MIR149나 LITAF와 같은 유전자들의 SNP와 같은 유전적 요인도 작용할 수 있지만[6, 15, 20], 환경적 요인이나 후성유전학적 요인이 복합적으로 작용할 수도 있다. 따라서 본 연구에서 일부 가계는 유전자형에 따른 발병 연령이나 중증도에 영향을 미치지 못한 것은 이런 복잡한 요인들의 상호 작용으로 여겨진다.

MIR149의 두 SNP에 대한 대립유전자 빈도는 1,000 Genomes Project database (<http://www.1000genomes.org/>)의 데이터에서 인종에 따라 상당한 차이를 보이므로, 두 SNP의 유전자형과 표현형 간의 상관성이 인종-특이적일 가능성이 제기된 바 있다[15]. 따라서 본 연구에서 제시된 가족 내 유전자형과 임상적 표현형의 상관성도 인종-특이적일 가능성을 배제할 수

는 없다.

CMT1의 동물 모델을 대상으로 한 연구에서는 ascorbic acid 나 onapristone (progesterone receptor inhibitor)의 처리가 PMP22 발현을 저해함으로써 치료 효능을 보였으므로, CMT1A의 유전적 원인의 규명은 유전체 맞춤형 치료법 개발에도 매우 중요하다. 본 연구는 처음으로 MIR149의 변이형이 가계 내 표현형적 이질성의 원인 중 하나로 작용할 가능성을 제시하였다[16, 19]. 본 연구의 결과는 CMT1A 환자 가계를 대상으로 얻었기 때문에 통계적인 유의성은 다소 떨어지지만, 가계 내 증상의 차이가 심한 희귀한 6 대가족을 사용하여 연구를 수행한 것은 의미가 크다고 여겨지며, 이런 결과는 CMT1A의 분자 진단 및 치료법 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단의 지원사업으로 수행되었음(2017R1A2A2A05001356, 2017R1A2B2004699 및 NRF-2018R1A4A1024506).

References

- Amornvit, J., Yalvac, M. E., Chen, L. and Sahenk, Z. 2017. A novel p.T139M mutation in HSPB1 highlighting the phenotypic spectrum in a family. *Brain Behav.* **8**, e00774.
- Auer-Grumbach, M., Schlotter-Weigel, B., Lochmuller, H., Strobl-Wildemann, G., Auer-Grumbach, P., Fischer, R., Offenbacher, H., Zwick, E. B., Robl, T., Hartl, G., Hartung, H. P., Wagner, K., Windpassinger, C. and Austrian Peripheral Neuropathy Study Group. 2005. Phenotypes of the N88S Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 mutation. *Ann. Neurol.* **57**, 415-424.
- Brewer, M. H., Ma, K. H., Beecham, G. W., Gopinath, C., Baas, F., Choi, B. O., Reilly, M. M., Shy, M. E., Züchner, S., Svaren, J. and Antonellis, A. 2014. Haplotype-specific modulation of a SOX10/CREB response element at the Charcot-Marie-Tooth disease type 4C locus SH3TC2. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5171-5187.
- Chance, P. F., Alderson, M. K., Leppig, K. A., Lensch, M. W., Matsunami, N., Smith, B., Swanson, P. D., Odelberg, S. J., Distèche, C. M. and Bird, T. D. 1993. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* **72**, 143-151.
- Choi, B. O., Kim, J., Lee, K. L., Yu, J. S., Hwang, J. H. and Chung, K. W. 2007. Rapid diagnosis of CMT1A duplications and HNPP deletions by multiplex microsatellite PCR. *Mol. Cells* **23**, 39-48.
- Choi, B. O., Nam, S. H. and Chung, K. W. 2019. Replication studies of MIR149 association in Charcot - Marie - Tooth disease type 1A in a European population. *Neuromuscul. Disord.* **29**, 160-162.
- Fridman, V., Bundy, B., Reilly, M. M., Pareyson, D., Bacon, C., Burns, J., Day, J., Feely, S., Finkel, R. S., Grider, T., Kirk,

- C. A., Herrmann, D. N., Laurá, M., Li, J., Lloyd, T., Sumner, C. J., Muntoni, F., Piscoquito, G., Ramchandren, S., Shy, R., Siskind, C. E., Yum, S. W., Moroni, I., Pagliano, E., Zuchner, S., Scherer, S. S., Shy, M. E. and Inherited Neuropathies Consortium. 2015. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **86**, 873-878.
8. Harding, A. E. and Thomas, P. K. 1980. Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *J. Med. Genet.* **17**, 329-336.
 9. Kim, Y. H., Chung, H. K., Park, K. D., Choi, K. G., Kim, S. M., Sunwoo, I. N., Choi, Y. C., Lim, J. G., Lee, K. W., Kim, K. K., Lee, D. K., Joo, I. S., Kwon, K. H., Gwon, S. B., Park, J. H., Kim, D. S., Kim, S. H., Kim, W. K., Suh, B. C., Kim, S. B., Kim, N. H., Sohn, E. H., Kim, O. J., Kim, H. S., Cho, J. H., Kang, S. Y., Park, C. I., Oh, J., Shin, J. H., Chung, K. W. and Choi, B. O. 2012. Comparison between clinical disabilities and electrophysiological values in Charcot-Marie-Tooth 1A patients with PMP22 duplication. *J. Clin. Neurol.* **8**, 139-145.
 10. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* **4**, 402-408.
 11. Lupski, J. R., de Oca-Luna, R. M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B. J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D. F., Killian, J. M., Garcia, C. A., Chakravarti, A. and Patel, P. I. 1991. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* **2**, 219-232.
 12. Murphy, S. M., Herrmann, D. N., McDermott, M. P., Scherer, S. S., Shy, M. E., Reilly, M. M. and Pareyson, D. 2011. Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **16**, 191-198.
 13. Nakhro, K., Park, J. M., Choi, B. O. and Chung, K. W. 2013. Missense mutations of mitofusin 2 in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy: polymorphic or incomplete penetration? *Anim. Cells Syst.* **17**, 228-236.
 14. Nam, D. E., Yoo, D. H., Choi, S. S., Choi, B. O. and Chung, K. W. 2018. Wide phenotypic spectrum in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2 patients with KIF5A mutations. *Genes Genomics* **40**, 77-84.
 15. Nam, S. H., Kanwal, S., Nam, D. E., Lee, M. H., Kang, T. H., Jung, S. C., Choi, B. O. and Chung, K. W. 2018. Association of miR-149 polymorphism with onset age and severity in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neuromuscul. Disord.* **28**, 502-507.
 16. Passage, E., Norreel, J. C., Noack-Fraissignes, P., Sanguedolce, V., Pizant, J., Thirion, X., Robaglia-Schlupp, A., Pellissier, J. F. and Fontés, M. 2004. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* **10**, 396-401.
 17. Rossor, A. M., Carr, A. S., Devine, H., Chandrashekar, H., Pelayo-Negro, A. L., Pareyson, D., Shy, M. E., Scherer, S. S. and Reilly, M. M. 2017. Peripheral neuropathy in complex inherited diseases: an approach to diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, 846-863.
 18. Saporta, M. A. and Shy, M. E. 2013. Inherited peripheral neuropathies. *Neurol. Clin.* **31**, 597-619.
 19. Sereida, M. W., Meyer zu Hörste, G., Suter, U., Uzma, N. and Nave, K. A. 2003. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat. Med.* **9**, 1533-1537.
 20. Sinkiewicz-Darol, E., Lacerda, A. F., Kostera-Pruszczyk, A., Potulska-Chromik, A., Sokołowska, B., Kabzińska, D., Brunetti, C. R., Hausmanowa-Petrusewicz, I. and Kochoński, A. 2015. The LITAF/SIMPLE I92V sequence variant results in an earlier age of onset of CMT1A/HNPP diseases. *Neurogenetics* **16**, 27-32.
 21. Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R. and Moreno, V. 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**, 1928-1929.
 22. van Paassen, B. W., van der Kooi, A. J., van Spaendonck-Zwarts, K. Y., Verhamme, C., Baas, F. and de Visser, M. 2014. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Orphanet J. Rare Dis.* **19**, 38.

초록 : 샤르코-마리-투스병 1A형(CMT1A)의 가족내 표현형적 이질성과 MIR149 SNP에 대한 연관성 연구

최유진¹ · 이아진¹ · 남수현² · 최병옥² · 정기화^{1*}

(¹공주대학교 자연과학대학 생명과학과, ²성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 신경과)

샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease: CMT)은 희귀 말초신경병의 그룹으로, 진행성 근육 약화 및 위축, 감각 소실, 상지 및 하지의 무반사 증상을 나타낸다. CMT1A는 PMP22 유전자가 존재하는 17p12 지역의 직렬 중복으로 발병하는데, 유전자형-표현형의 상관성이 느슨하여 2차 유전적 요인의 존재를 암시한다. 최근 MIR149의 rs71428439 (n.83A>G)와 rs2292832 (n.86T>C) 변이가 후기 발병 및 가벼운 증상의 표현형과 연관성이 있는 것으로 보고되었다. 본 연구는 CMT1A 기계내 임상적 표현형의 이질성이 MIR149의 SNP과 연관성이 있는지를 규명하기 위해 수행하였으며, 조사 대상으로는 기계내 표현형의 차이가 심한 6 CMT1A 대 가계를 대상으로 하였다. 그 결과, MIR149의 rs71428439와 rs2292832 유전자형은 가족내의 늦은 발병과 약한 증증도의 유전적 요인으로 작용할 수 있음을 제시하였다. 특히, AG+GG (n.83A>G)와 TC+CC 유전자형(n.86T>C)은 발병 시기가 늦고 경미한 증상을 보였다. 운동신경 전기전도도(MNCV)는 MIR149 유전형과 연관이 없는 것으로 보였는데, 이러한 결과는 이전 연구와 일치한다. 따라서 본 연구는 MIR149의 rs71428439와 rs2292832 변이는 CMT1A 기계내 표현형적 이질성의 원인 중 하나로 작용할 가능성을 제시한다. 본 연구는 기계 내 증상의 차이가 심한 6 대가족을 사용하여 연구를 수행한 것은 의미가 크다고 여겨지며, 이런 결과는 CMT1A 환자의 분자 진단과 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.