

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 방법에 의한 디스트로핀 유전자 돌연변이 분자학적 진단의 유용성

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 진단검사의학교실^a

조한나 홍지만 이경아^a 최영철

Clinical Usefulness of Molecular Diagnosis in Dystrophin Gene Mutations Using the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Method

Hanna Cho, MD, Ji-Man Hong, MD, Kyung-A Lee, MD^a, Young-Chul Choi, MD

Departments of Neurology and Department of Laboratory Medicine^a, Brain Korea 21 Project for Medicine Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD), which is the most common X-linked muscular dystrophy, is caused by mutations in the dystrophin gene. These mutations comprise deletions in approximately 55~65% of patients, duplications in 5~10%, and point mutations or small insertion/deletions in the remainder. Unfortunately, current diagnostic assays for dystrophin do not accurately detect duplication mutations or female carriers. In this study we employed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis to detect deletions or duplications of the dystrophin gene in patients with DMD/BMD, and in potential female carriers.

Methods: A total of 41 subjects was recruited for this study, comprising 35 male DMD/BMD patients, 1 female patient with Turner syndrome, and 5 females with a family history of DMD/BMD. The MLPA method was employed to determine the copy number of each of the 79 exons of the dystrophin gene in the 41 subjects.

Results: MLPA analysis for dystrophin was informative in 71.4% (25/35) of patients with DMD/BMD patients, identifying deletions in 60.0% (21/35) and duplications in 11.4% (4/35). MLPA analysis showed the presence of a deletion of the DMD gene in one female patient with Turner syndrome. Of the five female patients with a family history of DMD/BMD, this assay revealed exon deletion in one and duplications in one.

Conclusions: The reported findings reveal that the MLPA method is a powerful tool for detecting duplications and female carriers, as well as DMD gene deletions. MLPA should be considered the method of choice for an initial genetic analysis of DMD/BMD patients.

J Korean Neurol Assoc 28(1):22-26, 2010

Key Words: Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD), Dystrophin gene, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

서 론

Duchenne 및 Becker 근디스트로피(DMD/BMD) 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 돌연변이로 인해 발생하는 가장 흔한 성염색체 열성 유전형질의 근육질환이다. DMD는 전 세계적으로 남아 3,500명 당 1명 정도의 발병률을 가지며, 이환된 환자는 30대 이전에 호흡부전이나 심부전으로 사망하게 된다.¹ BMD는

Received July 21, 2009 Revised October 14, 2009

Accepted October 14, 2009

* Young-Chul Choi, MD

Department of Neurology, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 712 Eonjuro, Gangnam-gu, Seoul, 135-720, Korea

Tel: +82-2-3497-3323 Fax: +82-2-3462-5904

E-mail: ycchoi@yuhs.ac

DMD보다 증상이 경미하고, 상대적으로 늦은 나이에 발현되며, 진행 양상이 완만하다.²

디스트로핀 유전자는 Xp21.2에 위치하며, 2.4 Mb 크기의 79 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있는 매우 큰 유전자이다. 디스트로핀 유전자는 디스트로핀 단백질을 생성하며, 이는 427 kDa 크기의 근육속막 단백질(sarcolemmal protein)로 세포외 바탕질(extracellular matrix)과 세포질 세포골격(cytoplasmic cytoskeleton) 사이의 결합에 관여한다. 디스트로핀 단백질이 소실 혹은 감소되면 근섬유막의 안정성에 장애를 일으키고, 근섬유의 괴사 및 재생이 발생하여 근력저하, 근육위축, 보행장애와 호흡장애 등이 일어난다.^{3,4}

디스트로핀 유전자의 변이는 결손(deletion)이 가장 흔하여 전체 환자의 55~65%에 달한다.^{5,6} 결손 부위가 mRNA의 번역해독틀(translational reading frame)을 이동시킬 경우(out of frame deletion)에는 전사가 초기에 종식하게 되어 디스트로핀 단백질이 형성되지 않게 되고, 증상이 심한 DMD형이 발현하게 된다. 그러나 결손에도 불구하고 해독틀이 보존되는 경우(in frame deletion)에는 분자량이 작거나, 비정상적인 단백질이 생성되어 증상이 경미한 BMD형이 발현한다.⁷ 이 외에도 디스트로핀 변이 중에서 중복(duplication)은 약 5~10%^{8,9}에서 발생하며, 나머지 20~30%는 점돌연변이(point mutation), 미세결손(microdeletion), 미세삽입(microinsertion) 등의 작은 변이로 이루어진다.¹⁰

DMD/BMD의 진단에는 디스트로핀 단백질의 발현 유무와 정도를 western blot이나 면역조직화학염색 등을 이용하여 직접 확인하는 방법과, 유전자검사를 이용하여 디스트로핀 변이를 확인하는 방법이 있으며, 최근에는 후자인 유전자검사법이 보편화되어 비교적 용이하게 진단할 수 있게 되었다. 유전자검사법에는 Multiplex PCR (mPCR), 정량(quantitative) Southern blotting, 정량실시간(quantitative real-time) PCR, 형광제자리교잡법(Fluorescence in situ hybridization, FISH) 및 Multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH) 등의 여러 가지가 있다. 그 중에서도 가장 일반적으로 사용하는 다중 PCR법은 결손 이외의 중복 돌연변이 검출이나 여성 보인자에 대한 검사가 불가능하다는 한계점을 가지고 있다.¹¹⁻¹³ 또한 이 외에도 정량 Southern blotting, MAPH는 검사 과정에 많은 시간과 노력이 필요하여 검사하기가 힘들고,^{8,14} 정량실시간 PCR은 민감점(hot spot) 이외의 엑손에 대해서는 돌연변이의 검출이 어렵다는 점,¹⁵ FISH는 비용이 많이 들고, 중복의 검출이 불가능하다는 단점이 있다.¹⁶ 이러한 검사법들의 단점을 보완한 것으로 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 방법을 새롭게 사용하고 있으며, 검사 방법이 간단하면

서도 결손, 중복 및 여성 보인자 또한 진단이 가능하다.^{17,18}

본 연구는 디스트로핀 유전자검사법 중 MLPA 방법을 이용하여 DMD/BMD 환자의 진단, 그 중에서도 기존 방법으로는 검사가 어려웠던 중복 변이의 검출 및 여성 보인자 진단에 있어서 MLPA의 유용성을 함께 알아보려고 하였다.

대상과 방법

2007년 8월부터 2009년 5월까지 본원에 내원한 35명의 DMD/BMD 남성과 6명의 여성을 대상으로 총 41명에서 디스트로핀 유전자검사인 MLPA를 하였으며, 이들 모두에게 본 연구에 대한 설명을 하였고 유전자 동의서를 받았다.

35명의 남성 환자는 임상 경과, 근전도검사, 근육생검에서 근디스트로피의 소견을 보이고 면역조직화학염색에서 디스트로핀 염색의 이상 소견을 보였던 DMD/BMD 환자를 대상으로 하였으며, 6명의 여성은 한 명의 BMD/DMD증상이 있는 터너중후군(XO) 환자 및 가족력이 있으며 잠재적으로 보인자 가능성이 있는 5명의 여성을 대상으로 하였고, 이들은 환자의 어머니 2명과 환자의 누나 2명, 그리고 환자의 사촌 1명이었다.

MLPA는 MLPA DMD test kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands)를 이용하였다. 프로브 혼합물 034 (DMD 엑손 1-10, 21-30, 41-50, 61-70), 035 (DMD 엑손 11-20, 31-40, 51-60, 71-79)와 교잡하여 결합시킨 후 PCR 증폭을 하였으며, PCR 증폭 산물은 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)로 분석하였다.¹⁹

결 과

MLPA를 이용한 41명 중 변이가 검출된 환자의 유전자 분석 결과는 Table 1과 같다. 남성 환자 중 71.4%(25/35)에서 변이가 검출되었고, 이 중 60.0%(21/35)에서 결손, 11.4%(4/35)에서 중복이 관찰되었다(Table 2). 6명의 여성 대상자 중에서 증상이 있는 터너중후군 환자에서는 결손이 그리고 5명의 잠재적인 보인자 중에서는 환자의 어머니 2명에서 엑손 42번부터 45번까지의 결손 1명과 엑손 52, 53, 56~61번까지의 중복 1명이 발견되었다.

결손 환자 중에서 49, 50번 엑손의 결손이 각각 10명으로 가장 흔했고, 다음으로 흔한 위치는 45, 46, 47, 48번으로 각각 8명에서 발견되었다. 결손이 확인된 21명 중 20명(95.2%)이 다빈도 결손 부위로 알려진 엑손 1~20, 엑손 44~55 사이에서 결손이 확인되었으며, 3명에서 43, 44, 51번의 단일 엑손 결손이었다.

Table 1. Detected mutations by MLPA method

Age	Sex	Clinical phenotype	Mutation
29	M	DMD	Del 45-52
33	M	BMD	Del 3-7
29	M	DMD	Del 45-52
33	M	BMD	Del 3-7
6	M	DMD	Del 46-47
26	M	BMD	Del 3-7
5	M	DMD	Del 45-55
24	M	BMD/DMD	Del 48-50
1	M	DMD	Del 45-52
16	M	DMD	Del 43
5	M	DMD	Del 44-51
19	M	DMD	Del 43-45
20	M	DMD	Del 43-45
22	M	DMD	Del 45-48
18	M	DMD	Del 44
9	M	DMD	Del 46-47
21	M	DMD	Del 51
5	M	DMD	Del 49-50
12	M	DMD	Del 48-52
22	M	BMD/DMD	Del 49-50
20	M	DMD	Del 49-50
16	M	DMD	Dup 19-50
3	M	DMD	Dup 2-9
15	M	DMD	Dup 52-53 and 56-61
8	M	DMD	Dup 8-9
16	F	BMD (XO)	Del 31-42
37	F	asymptomatic	Dup 52-53 and 56-61
21	F	asymptomatic	Del 42-45

Table 2. Results of Dystrophin gene analysis by MLPA method in male patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy

MLPA analysis	Number of patients (%)
No mutation	10 (28.6%)
Mutation	25 (71.4%)
Deletion	21 (60.0%)
Duplication	4 (11.4%)
Total	35(100%)

MLPA; Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Del; deletion, Dup; duplication

고 찰

MLPA는 디스트로핀 유전자의 79개 모든 엑손에 대해 정량적인 검사가 가능하며, 결손 외에도 중복 및 여성 보인자 진단이 가능한 획기적인 방법이다.

본 연구에서 사용된 MLPA는 45개 이상의 대상 염기서열을 동시에 증폭하여 커다란 유전자의 재배열을 빠르게 검출할 수 있는 방법으로, 22~43개의 두 올리고핵산염기로 구성된 탐색자(probe)를 환자의 DNA와 하룻밤 정도 교잡하면 탐색자가 연결 효소에 의해 결합된다. 이 산물이 PCR을 통해 증폭되며, 각

PCR 산물의 상대적인 양은 원하는 염기의 증복된 수에 비례하므로 DMD 유전자의 결손과 중복을 알 수 있게 된다. 각 엑손에 대응하는 그래프의 최고치는 표준물질에 대한 상대적인 이동거리의 차이로 구분하며, 최고치의 차이로 결손과 중복 및 보인자를 감별할 수 있다(Fig.)²⁰

본 연구에서는 BMD/DMD 환자 35명 중 25명(71.4%)에서 유전자 돌연변이 검출률(mutation rate)을 보였으며, 대만의 60.7%²¹, 덴마크에서의 61.4%¹⁷와 비교하여 약간 높았다.

디스트로핀 유전자 변이 중 가장 흔한 결손은 60.0%(21/35)에서 확인되었고, 이는 전체 환자 중 55~65%로 발견되었던 이전의 연구와 비슷하였다.^{6,8} 디스트로핀 유전자 결손은 일정 부위에서 호발하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 지역을 민감점(hot spot)이라고 한다. 디스트로핀의 민감점은 5' 끝부분에서 500 kb 이내에 위치한 최초 20개의 엑손부위와 첫 번째 엑손으로부터 약 1200 kb에 위치한 엑손 44번과 55번 사이이고,^{5,6} 이 두 곳 중에서 1200 kb의 중간 부위에서 결손 빈도가 가장 높다고 보고되고 있다.^{8,12,22} 본 연구에서도 디스트로핀 유전자 결손이 있는 21명 중 다빈도 결손 부위로 알려진 두 곳에서 전체 결손 중 각각 14.3%(3/21)와 81.0%(17/21)가 발견되었다. 이전 연구에 따르면 유럽인에서는 1~20번 엑손 사이에서 21%, 41~60번 엑손 사이에서는 76%의 결손이 확인되었으며, 터키인에서는 전체 결손의 15%와 85%가 이 두 지역에 편중된 양상이었고, 본 연구 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.²³

이처럼 결손이 일정 부위에서 호발하는 것을 이용한 방법이 바로 현재까지 가장 많이 이용되었던 다중 PCR법이다. 다중 PCR법은 가장 흔히 결손되는 민감점에 속한 18개 엑손(3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60)을 동시에 증폭하여 돌연변이를 검출하는 방법으로, 이환된 환자에 있어서 전체 결손의 약 90~98%를 검출할 수 있다.^{11,12} 본 연구에서 MLPA를 사용하여 결손이 검출된 25명의 환자들은 모두 다중 PCR의 18개 엑손에 포함되는 부위에서 결손이 검출되었고, 이에 속하지 않은 결손은 단 한 명도 없었으며, 결손 검출률 자체에는 다중 PCR과 비교하여 볼 때 큰 효율은 없었다.

또한 4명(11.4%)에서 중복(duplication)이 발생하였으며, 이는 이전의 연구 결과인 5~10%^{8,9}와 비슷하였다. 중복의 발생 위치도 이전의 연구 결과와 비슷하게,⁸ 4명 모두 두 곳의 결손 돌연변이의 민감점과 같은 부위에서 중복이 발견되었다. 결손과 중복은 모두 감수분열(meiosis) I 시기에 주로 일어나게 되는데, 두 개의 상동염색체가 짝을 이룬 후 나누어질 때 잘못된 결합이 이루어져, 염색체가 정렬되지 않은 상태로 분열이 일어나게 되면, 한쪽은 결손이 있는 염색체, 반대쪽은 중복이 있는 염색체로 나뉘게 된다.²⁴⁻²⁶ 그러므로 결실과 중복이 비슷한 위치

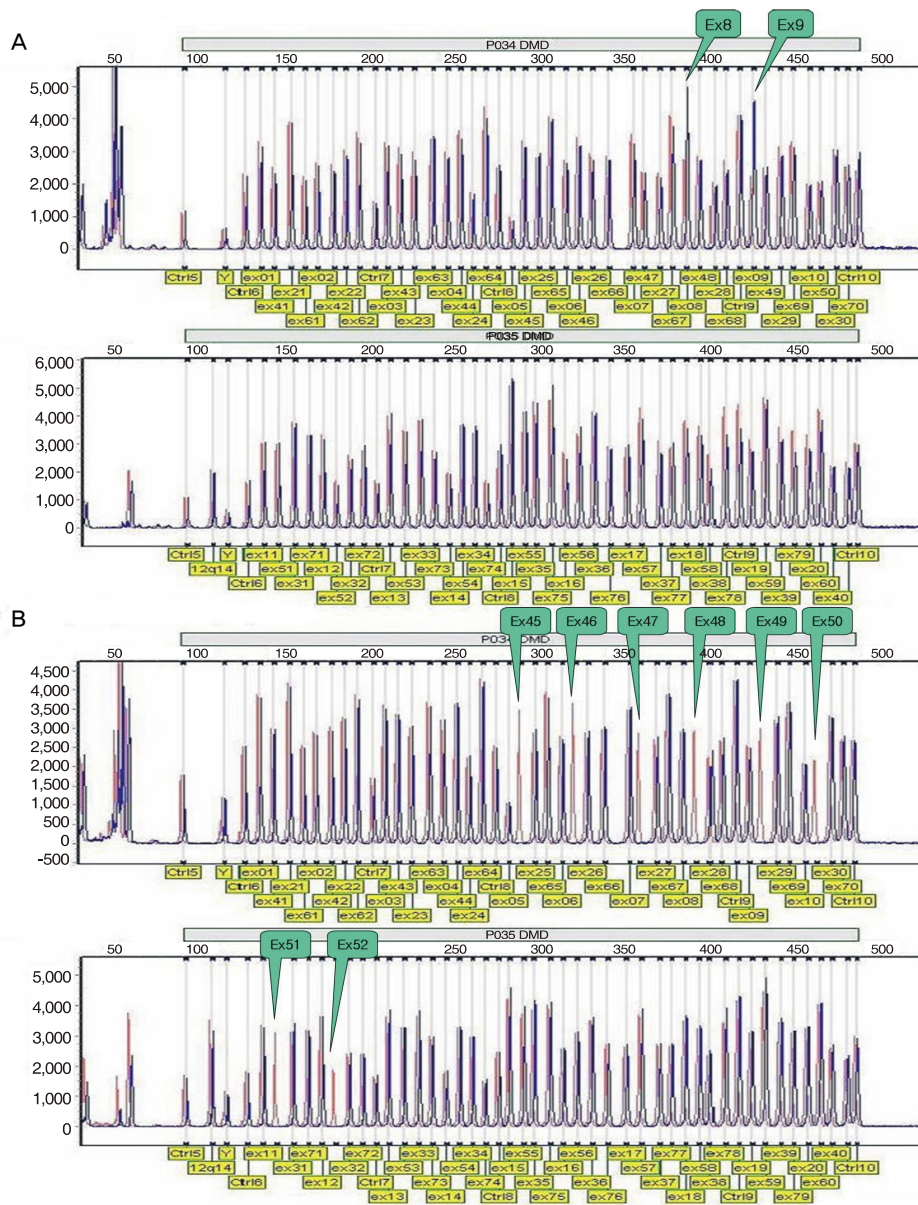


Figure. Examples of MLPA analysis (Red graph-control, Blue graph-patient). (A) Duplication of exons 8 and 9 of the dystrophin gene (arrows). (B) Deletion of exons 45~52 of the dystrophin gene (arrows), MLPA; Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.

에서 발생한 본 연구의 결과는 이론적으로 볼 때 합당하다고 할 수 있겠다.

여성의 경우에는 성염색체가 X염색체 2개로 이루어져 있으며, PCR을 이용한 유전자검사에서는 정상 X염색체로 인해 돌연변이의 검출이 불가능하다. 그러나 MLPA를 사용한 본 연구에는 증상이 있는 터너중후군(XO)²⁷ 환자뿐 아니라, 증상이 없는 보인자인 환자의 어머니 2명에게서 각각 결실 1명, 중복 1명을 검출할 수 있었다.

한 가족 중 한 명의 이환된 남아가 있는 경우 질병의 재발률

은 환자 어머니의 보인자 여부에 따라 결정된다고 할 수 있다. DMD/BMD는 효과적인 치료 방법이 없으므로, 보인자 여부의 확인이 또 다른 환자의 출생을 방지하기 위한 가장 중요한 방법이다. 본 연구 결과, MLPA로 인해 여성 보인자 진단이 가능해짐으로써 앞으로 가족 유전상담에도 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

그러나 MLPA의 경우 탐색자가 부착하는 부위나 연결효소 절단 부위에 존재하는 작은 변이 등으로 해당 엑손 전체가 결손된 것과 같은 위 양성 결과를 보일 수도 있어, 단일 엑손의 결실

이 확인된 경우에는 직접 염기서열 분석과 같은 확인 검사가 필요하며 본 연구에서도 3명의 단일 엑손 결실을 나타낸 환자에 대해서 각 엑손에 대한 단독 PCR 방법으로 이에 대해 확인하였다.¹⁸ 그리고 결손과 중복 이외의 약 20~30% 정도에서 발견되는 점돌연변이, 미세결손, 미세삽입 등의 작은 변이는 확인할 수 없다는 한계를 가지고 있다.

결론적으로, MLPA법은 디스트로핀 유전자의 결실뿐 아니라 중복 돌연변이 및 여성 보인자 검출이 가능한 획기적인 방법이다. 이 방법은 이전까지 널리 사용하던 다중 PCR법 이외 다른 검사법들의 단점을 보완한 것으로, 검사 과정이 비교적 간단하면서도 디스트로핀 유전자를 이루는 79개 모든 엑손에 대한 정량적인 검사가 가능한, 매우 민감하고 유용한 방법이다. 앞으로 DMD/BMD 환자와 가족의 진단과 상담에 큰 도움이 될 것으로 생각하며, 추후 앞에서 언급한 이 검사법의 한계점을 보완할 수 있는 새로운 검사법의 개발 또한 필요하겠다.

REFERENCES

- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.
- Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005;7:317-326.
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66:1121-1131.
- Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993;122:809-823.
- Forrest SM, Cross GS, Flint T, Speer A, Robson KJ, Davies KE. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1988;2:109-114.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988;2:90-95.
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989;45:835-847.
- Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet* 1990;46:682-695.
- Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2331-2335.
- Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 1991;28:304-311.
- Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;86:45-48.
- Na SJ, Kang SW, Kim WJ, Kim TS, Choi YC. Clinical, Immunohistochemical, and Genetic Analysis in Dystrophinopathy. *J Korean Neurol Assoc* 2004; 22:508-515.
- Yamagishi H, Kato S, Hiraishi Y, Ishihara T, Hata J, Matsuo N, et al. Identification of carriers of Duchenne/Becker muscular dystrophy by a novel method based on detection of junction fragments in the dystrophin gene. *J Med Genet* 1996;33:1027-1031.
- Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet* 1996;33:550-558.
- Xiao Y, Jiang X, Wang R. Screening for DMD/BMD deletion carriers by fluorescence in situ hybridization. *Genet Test* 2003;7:195-201.
- Schwartz M, Duno M. Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genet Test* 2004;8:361-367.
- Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat* 2004;23:413-419.
- Park YH, Kim JW, Choi JR, Song JW, Chung JS, Lee KA. Evaluation of Multiplex PCR Assay Using Dual Priming Oligonucleotide System for Detection Mutation in the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Korean J Lab Med* 2008;28:386-391.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
- Hwa HL, Chang YY, Chen CH, Kao YS, Jong YJ, Chao MC, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of deletions and duplications of the Duchenne muscular dystrophy gene in Taiwanese subjects. *J Formos Med Assoc* 2007;106:339-346.
- Imoto N, Arinami T, Hamano K, Matsumura K, Yamada H, Hamaguchi H, et al. Topographic pattern of the rearrangement of the dystrophin gene in Japanese Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1993;92:533-536.
- Onengut S, Kavaslar GN, Battaloglu E, Serdaroglu P, Deymeer F, Ozdemir C, et al. Deletion pattern in the dystrophin gene in Turks and a comparison with Europeans and Indians. *Ann Hum Genet* 2000;64: 33-40.
- Hu XY, Burghes AH, Bulman DE, Ray PN, Worton RG. Evidence for mutation by unequal sister chromatid exchange in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Am J Hum Genet* 1989;44:855-863.
- Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Penaherrera M, Michaelis RC, et al. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *J Med Genet* 1998;35:130-136.
- Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, et al. Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 2000;24:84-87.
- Lee KA, Han SH, Choi JR, Chung JS, Choi YC. Becker muscular dystrophy with r(X) carrying an out-of-frame DMD deletion. *Pediatr Neurol* 2008;39:129-132.