

## 사립체 DNA의 거대 결손이 확인된 Kearns-Sayre 증후군

이화여자대학교 의과대학 신경과학교실, 공주대학교 생명과학과<sup>a</sup>, 연세대학교 의과대학 신경과학교실<sup>b</sup>

김숙희 황정희<sup>a</sup> 정기화<sup>a</sup> 김희진 김지영 박기덕 선우일남<sup>b</sup> 최병옥

### Kearns-Sayre Syndrome with a Large Deletion in Mitochondrial DNA

Sook-Hui Kim, M.D., Jung Hee Hwang<sup>a</sup>, Ki Wha Chung, Ph.D.<sup>a</sup>, Hee-Jin Kim, M.D., Jee-Young Kim, M.D., Ki-Duk Park, M.D., Il-Nam Sunwoo, M.D.<sup>b</sup>, Byung-Ok Choi, M.D.

*Department of Neurology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul;*

*Department of Biological Science, Kongju National University<sup>a</sup>, Gongju;*

*Department of Neurology, College of Medicine, Yonsei University<sup>b</sup>, Seoul, Korea*

Mitochondrial DNA (mtDNA) deletions have been found in a majority of patients with Kearns-Sayre syndrome (KSS). The proband, a 14-year-old male, presented with retinitis pigmentosa, bilateral ptosis with an external ophthalmoplegia, and ragged-red fibers in his biceps. The common 5-kb deleted mtDNA was identified in the patient by a long template PCR and DNA sequencing analysis. The deletion was located within the 8469-1344 position and a 13-kb direct repeat sequence was shown in the junction.

J Korean Neurol Assoc 24(3):260-264, 2006

**Key Words:** Mitochondria, Kearns-Sayre syndrome, Deletion

사립체(mitochondria)는 인체 내의 에너지 생산에 중요한 역할을 하는 세포소기관이다. 사립체 DNA 돌연변이에 의해 발생하는 사립체 질환은 다양한 임상 양상을 보이는데 점상 돌연변이에 의한 MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke like episode), MERRF (myoclonic epilepsy with ragged-red fiber) 등과 거대 결손에 의한 KSS (Kearns-Sayre syndrome), CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) 등이 잘 알려져 있다.<sup>1-3</sup> KSS는 20세 이전에 진행성 안검하수와 외안근 마비, 망막색소침착

(retinitis pigmentosa) 등이 주로 발생하는 것을 특징으로 한다.<sup>4</sup> 우리나라에서도 임상적 소견으로 KSS가 의심되는 증례에 대한 보고는 있었으나 사립체 DNA의 분자 유전학적 검사를 통해 거대 결손 돌연변이가 확인된 경우는 없었다.<sup>5</sup> 저자들은 진행성 안검하수 및 외안근 마비와 망막색소침착 등이 발생한 환자에서 6년 후에 사립체 DNA의 거대 결손을 발견하였기에 보고하고자 한다. 이와 함께, KSS의 경우에는 임상적인 면에서 장기간의 세심한 관찰이 필요할 것으로 생각한다.

## 증례

14세 남자 환자가 안검하수를 주소로 내원하였다. 환자의 태생시 체중은 3.4 kg이었고 1세에 보행이 가능하였으며, 발달장애 증상은 보이지 않았다. 환자는 초등학교 3학년인 10세부터 양쪽 눈꺼풀이 처지는 증상이 생기기 시작하였는데, 이러한 증상은 초등학교 5학년이 되어서 뚜렷해졌다고 한다. 초등학교 때에는 주위 친구들에 비해 키가 큰 편에 속했으나 5학년 이후에는 키가 자라지 않아 소아과로 내원하였고, 이때 안검하수 등

Received January 23, 2006 Accepted February 6, 2006

\* Byung-Ok Choi, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Ewha Womans University Dongdaemun Hospital

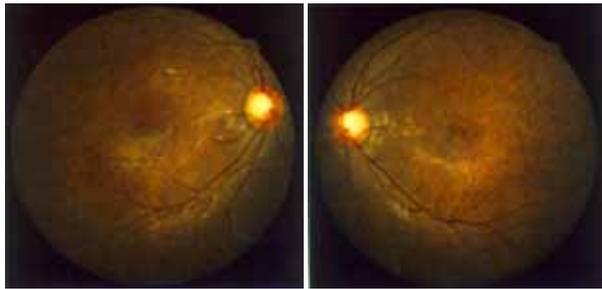
70 Jongno 6-ga, Jongno-gu, Seoul, 110-783, Korea

Tel: +82-2-760-5257 Fax: +82-2-760-5008

E-mail: bochoi@ewha.ac.kr

\* Sook-Hui Kim and Jung Hee Hwang are equally contributed to this work.

\* 본 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-042-E00105).



**Figure 1.** Ophthalmoscopic findings in the proband. At 14 years, he showed a retinitis pigmentosa of bilateral fundus with salt and pepper patterns.

의 증상으로 중증근무력증의 진단하에 아세틸콜린 분해효소 (acetylcholinesterase) 억제제 등의 투약치료를 받았다. 학교 성적은 초등학교 때에는 상위권이었으나 중학교 1학년에서는 하위권으로 내려갔으며, 반에서 키가 제일 작은 편에 속하였다.

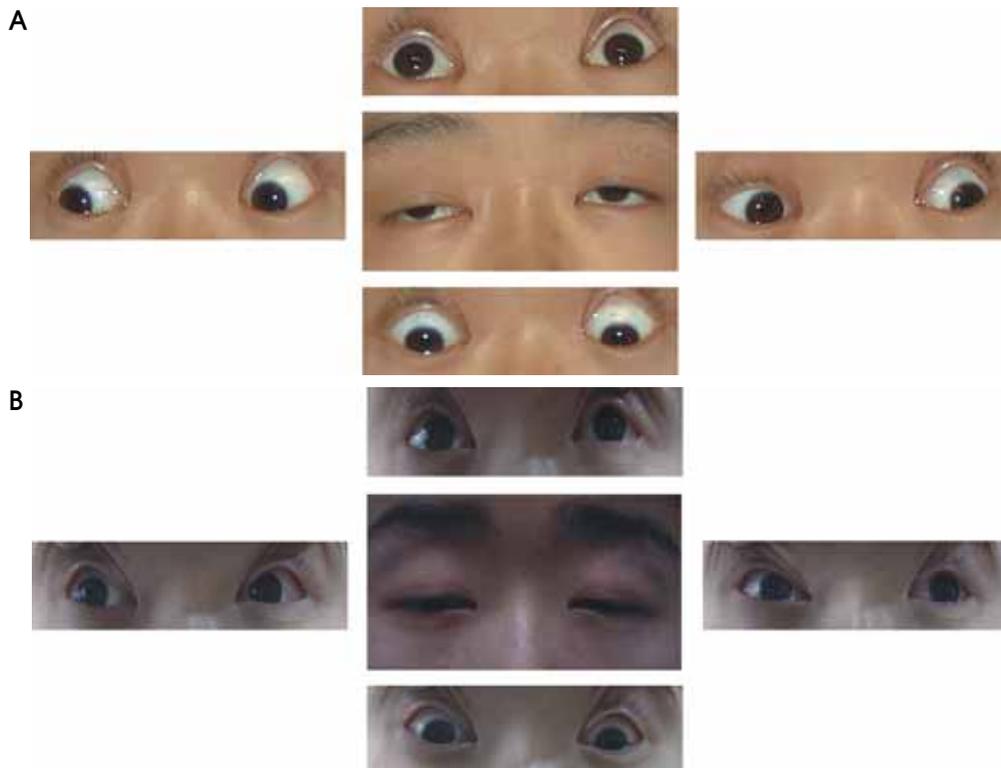
내원 당시 이학적 검사상 신장은 166 cm이었고, 체중은 33 kg이었다. 안저검사상 양안의 망막색소침착을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 신경학적 검사상 의식상태는 정상이었으며, 뇌신경

검사상 양쪽 동공 반사와 대광반사도 정상이었다. 안구운동은 모든 방향에서 제한이 있었지만 완전마비상태는 아니었다. 특히 오른쪽 눈에서 위쪽을 볼 때 심한 안구운동 장애가 관찰되었다(Fig. 2-A).

6년이 지난 후 20세에 환자를 다시 진찰을 하였을 때에는 안검하수가 많이 진행된 소견을 보였고 안구운동은 모든 방향에서 완전 마비상태를 보였다(Fig. 2-B). 소뇌기능 검사와 운동신경 및 감각신경 검사에서 이상 소견은 관찰되지 않았다. 심부건반사는 양측 슬부건반사와 족부건반사가 항진된 소견을 보였으나 병적 반사는 나타나지 않았다.

반복신경자극검사는 정상 소견을 보였으며, 아세틸콜린 수용체 항체(acetylcholine receptor antibody)는 1.0으로 정상 범위에 속하였다. 신경전도 검사는 정상 소견을 보였으나, 근전도 검사에서는 small short polyphasic MUAP를 관찰할 수 있었다.

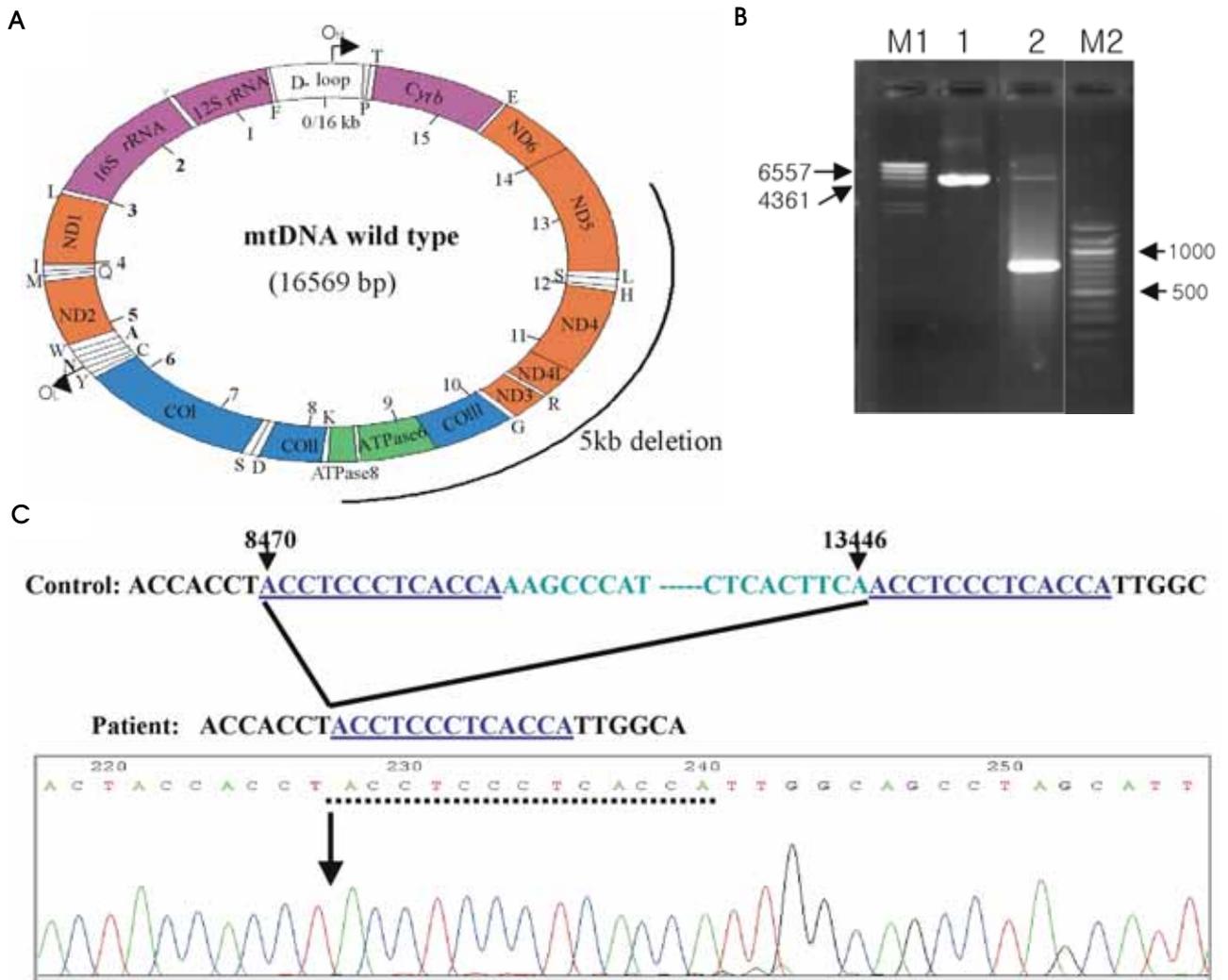
전완허혈운동검사( forearm ischemic exercise test)를 실시하였다. 역량계(dynamometer)를 쥐게 하고 최대 수의적 수축력(maximal voluntary contraction)을 측정 후 MVC의 80%를 계산하였다. 이후 혈압계를 상완에 감고 수축기 혈압 이상으



**Figure 2.** Follow-up study of ophthalmoplegia. (A) At 14 years, the proband showed bilateral ptosis with incomplete ophthalmoplegia. (B) At 20 years, he showed a complete external ophthalmoplegia in all directions.

로 팽창시킨 후 환자에게 역량계를 이용하여 주먹을 쥐었다 폄 다하는 반복운동을 2분 동안 시행하도록 하였으며 이때 MVC의 80%에 해당되는 만큼의 힘을 주도록 하였다. 운동 전과 운동 후 1분, 3분, 5분, 10분에 혈청에서 젖산(lactic acid)과 암모니아의 수치를 측정하였다. 젖산(normal range: 0.7-2.1 mmol/l)은 2.6 mmol/l, 3.9 mmol/l, 3.6 mmol/l, 3.4 mmol/l, 2.7 mmol/l이었으며, 암모니아는 65 mmol/l, 157 mmol/l, 112 mmol/l, 69 mmol/l, 48 mmol/l로 측정되어 운동 후 50% 이상 젖산이 상승되는 소견을 관찰할 수 있었다. 좌완의 이두박근에서 시행한 근육조직검사에서서는 사립체 질환에서 특징적으로

보이는 불균일 적색근섬유(ragged-red fiber)가 관찰되었다. 본 환자의 사립체 DNA의 분자유전학적 검사상 nucleotide position 8469과 13447 사이에 사립체 DNA의 거대 결손(4977 bp)이 관찰되었다(Fig. 3). KSS 환자에서 간혹 발견되는 사립체 DNA의 5-kb 결손을 확인하기 위해서는 환자의 혈액으로부터 총 DNA를 추출한 후, forward primer (mtF8182: 5' -CTG TGGAGCAAACCACAGTTTCATGCC-3')와 reverse primer (mtR13982: 5' -GGCAGGTTTTGGCTCGTAAGAAGGCC-3')를 사용하여 long template PCR을 수행하였다. Long template PCR은 10-20 ng DNA, 각 primer의 300 nM, dNTP



**Figure 3.** Identification of 5 kb detection and determination of exact deletion point. (A) Human mitochondrial genome. Mitochondrial genes are designated with abbreviated letters and 4977 bp common deletion region in KSS patients is shown as a black curved line. (B) PCR products of 5-kb common deletion region. Control (lane 1) shows about 5.8 kb band alone, however the proband (lane 2) shows a strong 0.8 kb band as well as the 5.8 kb band on the agarose gel electrophoresis (M1, XHindIII marker; M2, 100 bp marker). (C) Chromatogram of the DNA sequences at the deletion junction. A 13 bp direct repeat sequence (underlined) was observed at the both break points.

mix 350 uM, 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>와 1.9 unit Expand<sup>TM</sup> long template enzyme mixture (Roche, Germany)을 포함하는 25

l 반응물을 준비한 후, Gene Amp PCR systems 9700 (Applied Biosystems, USA)에서 수행하였다. PCR 산물을 아가로스 겔을 사용하여 전기영동하였을 때, 정상 시료에서 나타나는 약 5.8 kb의 밴드보다 훨씬 작은 0.8 kb 정도의 강한 밴드를 환자 시료로부터 확인할 수 있었다(Fig. 3-B). 정상인에게 나타나는 5.8 kb DNA 밴드는 환자에게도 관찰되었지만 매우 약했다. 환자에서만 증폭되어 나타난 약 0.8 kb의 밴드는 겔로부터 추출한 후 자동염기서열분석기(ABI 3100, Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하여 정확한 결손부위를 확인하였다(Fig. 3-C). Sequencing 반응은 BigDys<sup>TM</sup> Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하였으며, 서열의 판독은 CHROMAS (Ver. 2.23) 프로그램을 이용하였다. 결손이 일어난 양 부위에 13 bp의 동일한 반복서열(direct repeat)이 있음을 발견하였다(5' -ACCTCCCT CACCA-3').

## 고 찰

사립체 질환은 특징적인 임상 양상과 운동에 의해 유발되는 젓산의 증가, 근육 생검의 병리학적 소견, 분자유전학적 검사 등에 의해 진단할 수 있다.<sup>6</sup> 사립체 질환과 관련된 호흡 사슬(respiratory chain)은 두 가지의 서로 다른 유전체, 즉 핵 유전체(nuclear genome)와 사립체 유전체(mitochondrial genome)에 의해 조절되며, 이들을 구성하는 유전자들의 돌연변이에 의한 다양한 사립체 질환 증후군들이 보고되었다.<sup>7</sup> 사립체 질환에서 신경손상은 에너지 생산체계의 결함에 의해 산화적 인산화에 장애가 생기고 결과적으로 세포의 에너지 고갈이 발생되어 일어난다.<sup>8</sup> 특징적인 근육병리 소견으로 횡문근형질막(sarcolemma) 아래 부위에 비정상적인 형태를 가진 사립체들의 축적에 의한 불균일 적색근섬유가 관찰된다. Zeviani 등은 7명의 KSS 환자에서 근육 생검 및 분자유전학적 검사를 시행하여 사립체 DNA에 거대 결손이 발생한 것을 보고하였다.<sup>4</sup> 이와 함께 근육 조직에 존재하는 사립체 DNA에서 거대 결손을 보이는 경우는 약 80% 정도인 것으로 보고하였다.<sup>4</sup>

본 환자는 14세때 중증근무력증으로 오진되어 아세틸콜린 분해효소 억제제를 복용하였으나 효과가 없었다. 6년이 지난 후 다시 진찰한 결과 KSS의 임상적 특징을 충족하고 있었으므로 유전자 검사를 시행하게 되었다. 그러므로 KSS 환자들은 양쪽 안검하수와 안구운동 장애 등의 증상으로 인해 중증근무력증으로 오진될 가능성이 크다고 하겠다. 본 증례에서와 같이 반복신

경자극검사 및 아세틸콜린 수용체 항체가 정상이고, 오전과 오후 증상의 차이가 뚜렷하지 않으면 중증근무력증보다는 다른 질환일 가능성을 고려해 보아야 할 것으로 생각되며, 이와 함께 망막검사, 근전도검사, 근육조직검사 및 유전자검사 등을 시행한다면 정확한 진단을 내리는 데 도움이 될 것으로 생각된다.

저자들은 양안의 안검하수와 외안근 마비 등의 증상이 있을 때, 진단적 선별검사의 하나로 사립체 DNA의 분자유전학적 검사가 유용하다고 생각하며, 이 환자의 사립체 DNA의 유전자 검사를 시행한 결과 5-kb의 결손을 확인할 수 있었다. KSS 환자에서 5-kb의 거대 결손은 이미 알려져 있으며 비교적 흔한 것으로 보고되어 있다.<sup>4,9-10</sup> 환자의 long-template PCR 산물에서는 정상인에서는 증폭되지 않은 0.8 kb의 결손형 밴드가 확인되었다. 본 환자에게서 정상인의 5.8 kb 밴드도 아울러 관찰되어 결손은 정상 mtDNA (wild type)와 돌연변이형(mutant type)이 모두 존재하는 heteroplasmy 상태임을 알 수 있었다. 일반적으로 PCR의 특성상 작은 크기의 DNA가 큰 DNA보다 증폭율이 높게 나타난다. 그러므로 환자에서 결손을 나타내는 0.8 kb 밴드에 비해서 5.8 kb가 훨씬 약하게 나타난 것은 이와 일치하였다. 본 환자에게서 관찰된 0.8 kb 돌연변이형 밴드를 아가로스 겔에서 분리하여 염기서열을 분석하였을 때 정확히 8,469-13,447 bp 사이의 4,977 bp 결손을 확인할 수 있었으며, 결손의 양 지점에는 13-bp의 반복서열(direct repeat)이 관찰되었다. 본 조사에서 밝혀진 결손 지점의 반복서열은 mtDNA의 결손형 돌연변이형에서 흔히 나타나는 현상과 잘 일치하였다.<sup>10</sup>

## REFERENCES

1. Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005;37:222-232.
2. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348:651-653.
3. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990; 61: 931-937.
4. Zeviani M, Moraes CT, Dimauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988;38:1339-1346.
5. Choi CH, Sunwoo IL, Kim TS, Jeon P. MRI followup study and 1H-MR spectroscopic finding in a patient with Kearns-Sayre syndrome. *J Korean Neurol Assoc* 1998;16:388-391.
6. Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P, Timonen R, Haltia M, Weissenbach J, et al. An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1995;9:146-151.
7. Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial

- DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic acids Res* 1990; 18:6927- 6933.
8. Johns DR. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995;333: 638-644.
9. Wong LJ. Recognition of mitochondrial DNA deletion syndrome with non-neuromuscular multisystemic manifestation. *Genet Med* 2001;3:399-404.
10. Solano A, Gamez J, Carod FJ, Pineda M, Playan A, Lopez-Gallardo E, et al. Characterisation of repeat and palindrome elements in patients harbouring single deletions of mitochondrial DNA. *J Med Genet* 2003;40:e86.