

산성 알파 글루코시다아제가 감소한 근육병에서 Whole Exome Sequencing을 이용한 *DYSF* 유전자 복합이형접합돌연변이의 규명

이화여자대학교 의과대학 목동병원 신경과^a, 연세대학교 의과대학 신경과학교실^b

박형준^a, 최지현^a, 최영철^b, 박기덕^a

Identification of Compound Heterozygous *DYSF* Mutations Using Whole Exome Sequencing in a Myopathy with Decreased Acid-Alpha Glucosidase Activity

Hyung Jun Park, MD^a, Ji-Hyun Choi, MD^a, Young-Chul Choi, MD, PhD^b, Kee Duk Park, MD, PhD^a

^aDepartment of Neurology, Mokdong Hospital, Ewha Womans University School of Medicine; ^bDepartment of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

KEYWORDS

Limb-girdle muscular dystrophy, *DYSF*, Glycogen storage disease type II, Whole exome sequencing

Background: This study was designed to identify the genetic cause in myopathy family with decreased acid-alpha glucosidase activity.

Methods: Clinical and laboratory features of two affected family members were analyzed. Then, whole exome sequencing (WES) was performed.

Results: The proband (a 54-year-old woman) and her sister (a 57-year-old woman) presented to our neurologic clinic with proximal muscle weakness. They recalled very active and sporty life since adolescence. At the late teens, they first noticed difficulty in climbing stairs. Neurological examination revealed muscle weakness and atrophies of proximal muscles, predominantly at lower limbs. Electromyography revealed chronic myopathic finding and serum creatine kinase level was elevated in the proband. In addition, serum acid-alpha glucosidase activities were decreased in two patients. WES identified compound heterozygous mutations (c.5713C>T and c.937+1G>A) in *DYSF*, which were previously reported to be an underlying cause of limb-girdle muscular dystrophy 2B.

Conclusions: We identified compound heterozygous *DYSF* mutations in a myopathy family with decreased acid-alpha glucosidase activity. This result demonstrated the usefulness of WES for the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy.

서론

팔다리이음근디스트로피(limb-girdle muscular dystrophy)는 골반과 어깨 근육의 점진적인 약화와 위축을 특징으로

하는 유전성 근육질환이다. 팔다리이음근디스트로피는 유전양상으로 상염색체우성유전을 하는 1형과 상염색체열성유전을 하는 2형으로 구분되며 현재까지 각각 8개와 22개의 원인유전자가 밝혀져 있다.¹ 고전적인 진단방법은

Received: August 28, 2015 / Accepted: November 2, 2015

Address for correspondence: Kee Duk Park, MD
Department of Neurology, Ewha Womans University School of Medicine, 1071 Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 07985, Korea
Tel: +82-2-2650-6010, Fax: +82-2-2650-2652, E-mail: pkd1165@ewha.ac.kr

병력청취 및 신경학적 검사, 검사실 검사, 근육병리, 근육 조직 내의 단백분석으로 원인유전자를 추정하고 해당 유전자에 대한 염기서열분석으로 확인하는 순차적인 방법이다.^{2,3} 그러나 이러한 방법만으로는 다양한 임상양상 및 병리소견을 보이는 팔다리이음근디스트로피의 특징 때문에 원인유전자를 선별하지 못하거나 잘못된 원인유전자를 추정하는 경우가 빈번하였다. 다만, 차세대염기서열분석의 발전으로 적은 노동 및 낮은 비용으로 많은 유전자에 대한 검사가 가능해져서 이러한 문제점들이 보완되고 있다.⁴

저자들은 혈중 산성 알파 글루코시다아제가 감소되어 폼페병을 의심했던 상염색체열성의 근육병 자매에서 전체엑솜염기서열분석(whole exome sequencing, WES)으로 원인유전자를 규명하였다.

대상과 방법

1. 환자 및 임상분석

연구는 근육병환자인 발단자(II-3, Fig. 1A)와 언니(II-2, Fig. 1A)를 대상으로 진행하였다. 두 자매에서 병력을 청취하고, 인지기능, 뇌신경기능, 근력, 감각, 관절의 구축,

및 건반사의 변화를 확인하였다. 발단자는 신경전도검사 및 근전도검사의 전기생리학적 검사, 혈청 크레아틴 카나아제, 심전도 및 흉부 X선 검사를 받았다. 또한 두 자매 모두에서 혈청 내 산성 알파 글루코시다아제를 측정하고 WES를 시행하였다.

2. 유전자분석

다음의 순서로 두 자매의 WES를 시행하였다. QuickGene DNA whole blood kit S (Kurabo, QuickGene, Kurabo, Japan)를 이용하여 환자 혈액에서 DNA를 추출하였다. 유전체 염기서열 중 단백질을 코딩하는 엑손 부위만을 선별하기 위한 라이브러리 Agilent Sureselect Target Enrichment Ver. 5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. DNA 시료의 구분을 위해서 6 bp index sequence (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 그리고 차세대 염기서열분석은 NextSeq500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA)으로 시행하였다.

3. 변이분석

생산된 염기서열정보는 6 bp index sequence의 정보로

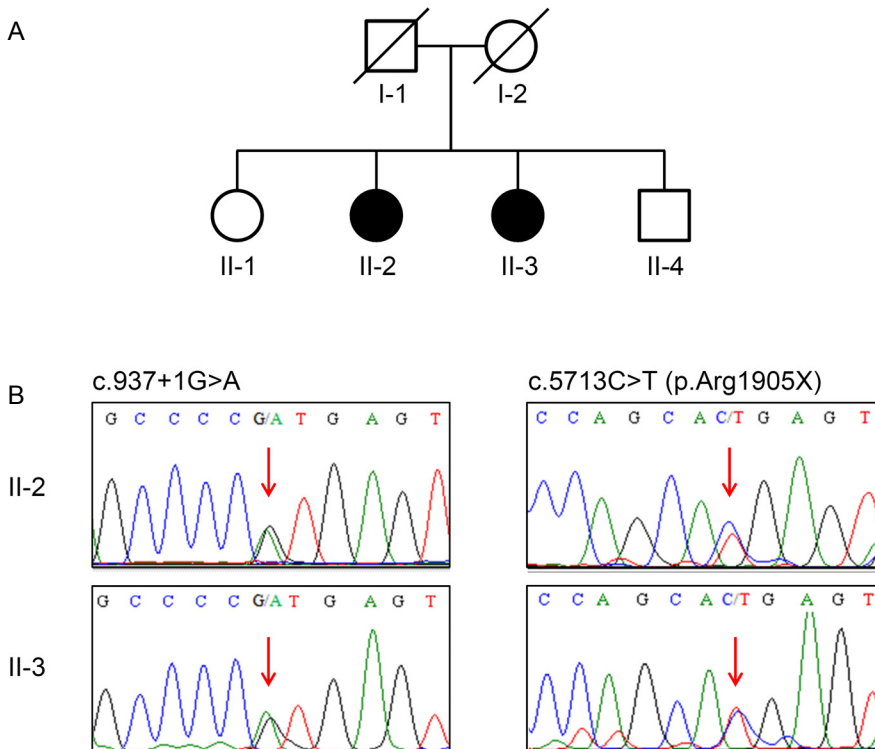


Figure 1. Pedigree and sequencing chromatograms. (A) Pedigree of Korean patients with compound heterozygous DYSF mutations (square: male; circle: female; filled: affected; and non-filled: unaffected). (B) Sequencing chromatograms of DYSF mutations c.937+1G>A and c.5713C>T (p.Arg1905X). Arrows indicate mutation sites.

일차적으로 분류하였다. 분류된 fastq 파일을 표준염기서열인 hg19 참조서열에 정렬(alignment)하기 위해서 Burrows-Wheeler Aligner (BWA) algorithm (ver. 0.6.2)을 이용하였다.⁵ 파일의 형식전환을 위해서 SAMtools (ver.0.1.19)로 분류하고 Picard tools (ver.1.102)로 중복을 제거한 후 the genome analysis toolkit (GATK; ver. 3.2.2)로 알려진 삽입-결실부위(indel site)의 재배열과 base quality score recalibration (BQSR)을 시행하였다. 그리고 변이확인을 위해서 SAMtools와 GATK Haplotype Caller, freebayes (ver. 0.9.18) 알고리즘을 이용하였다.^{6,7} 변이분석을 위해서 최소 두 개 이상의 알고리즘에서 확인된 변이를 대상으로 loci depth가 10 이상이고 variant frequency가 0.5 이상인 경우 또는 loci depth가 20 이상이고 variant frequency 0.25 이상인 변이만을 선택하였다. 변이의 in-silico 분석정보(SIFT, Polyphen2, LRT, MutationTaster)와 데이터베이스의 대립 유전자의 빈도정보(1000 Genomes Project phase 3 data, UK10K cohorts data, ExAC consortium data and the NHLBI Exome Sequencing Project ESP6500 data)의 확인을 위해서 dbNSFP (ver. 2.4)을 사용하여 snpEff (ver. 4.0c)로 주석을 달았다. 다음 두 환자에서 공통적으로 발견되는 근육병 원인유전자의 변이를 선별하였다. 미국의학유전학 및 유전체학회(the American college of medical genetics and genomics, ACMG)와 분자병리학회(the association for molecular pathology, AMP)의 진단지침으로 병원성을 판단하였다.⁸ 마지막으로 원인 돌연변이에 대해서 고전적 염기서열분석(Sanger sequencing)으로 재확인하였다.

결 과

1. 임상양상

발단자(54세 여자, II-3)와 발단자의 언니(57세 여자, II-2)

는 팔다리의 근력약화로 방문하였다. 두 자매에서 발단자가 우측발의 기형으로 3세에 수술을 받은 것을 제외한 다른 병력은 없었다. 두 자매의 아버지와 어머니는 치매로 투병 후 83세와 86세에 사망하였으나, 치매가 악화되기 전까지 팔다리의 근력약화는 없었다고 하였다. 두 자매는 10대 중반까지 운동을 잘하는 편이었으나 10대 후반부터 양하지의 근력약화와 근위축을 느꼈다고 하였다. 30대부터 난간을 잡고 계단을 올랐고, 40대부터 팔의 힘이 약해지고 보행기를 사용하였으며, 50세부터 휠체어로 이동하게 되었다. 신경학적 검사상 인지기능과 뇌신경의 기능은 정상이었다. 근력약화와 근위축은 팔다리의 몸통 쪽 근육에서 심했고 허벅지 근육이 가장 약했다. 감각은 정상이었으며 건반사는 저하되었다. 발단자의 신경전도검사 및 근전도검사는 전신형 근육병에 합당한 소견이었으나 근긴장성 방전(myotonic discharge)은 없었다. 혈청 크레아틴 키나아제는 34세에 2,752 IU/L (정상값: ≤185 IU/L)와 54세에 789 IU/L로 증가되어 있었다. 두 자매 모두 심장기능 및 호흡기능 저하와 관련된 증상호소는 없었고, 발단자의 심전도 및 흉부 X선 검사는 정상이었다. 전체 산성 알파 글루코시다아제의 혈중농도는 발단자에서 17.0 nmol/hr/mg protein (정상값: ≥30 nmol/hr/mg protein)과 발단자의 언니에서 19.6 nmol/hr/mg protein으로 낮았고, 아카보오스를 처리한 값도 발단자에서 8.4 nmol/hr/mg protein (정상값: ≥10 nmol/hr/mg protein)과 발단자의 언니에서 5.5 nmol/hr/mg protein으로 낮았다. 그러나 아카보오스를 처리한 값과 전체의 산성 알파 글루코시다아제의 비율은 발단자에서 49.4% (정상값: ≥25%)와 발단자의 언니에서 49.4%로 정상범위였다.

2. 유전자검사

두 자매의 혈액검사상 산성 알파 글루코시다아제의 혈

Table 1. Whole exome sequencing analysis for two individuals

Samples	II-2	II-3
Total yields (Gbp)	8.2	8.7
Mappable reads of total reads (%)	80.2	81.8
Coverage of target region (≥1X)	97	96.8
Coverage of target region (≥20X)	71.2	73.8
Total number of SNPs	67,788	68,088
Total number of indels	4,348	4,248
Number of coding SNPs	22,783	22,876
Number of nonsynonymous variants	12,160	12,208
Number of functionally significant variants in myopathy related genes	28	37
Cosegregating variants in myopathy related genes	18	

SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 2. Functionally significant variants in myopathy-related genes

Gene	Map	Ref Seq ^a	Variants		dbSNP138	1000G (2014 Sep)	SIFT ^b	Poly-Phen2 ^c	Description
			Nucleotides	Amino acids					
<i>CPT2</i>	1p32.3	NM_000098	c.1102G>A	p.V368I	rs1799821	0.5000	1.00	0.011	Benign
<i>CRYAB</i>	11q23.1	NM_001885.1	c.324+4T>G	-	rs11603779	0.2669	0.04	-	Benign
<i>PFKM</i>	12q13.11	NM_000289.5	c.512G>A	p.R171Q	rs2228500	0.1690	0.34	0.052	Benign
<i>GAA</i>	17q25.2-q25.3	NM_001079803.1	c.668G>A	p.R223H	rs1042395	0.6122	0.58	0.206	Benign
			c.1726G>A	p.G576S	rs1800307	0.0508	0.02	1.000	Benign
<i>NEB</i>	2q22	NM_001271208.1	c.2065G>A	p.Q576S	rs1800309	0.0902	0.71	0.092	Benign
			c.3081A>T	p.K1027N	rs6735208	0.6190	0.58	0.982	Uncertain significance
<i>COL6A3</i>	2q37	NM_004369.3	c.10809G>C	p.W3603C	rs10172023	0.2504	0.07	1.000	Uncertain significance
			c.3287C>T	p.R1096C	rs114852262	0.0013	0.01	1.000	Uncertain significance
<i>DYSF</i>	2p13.3-p13.1	NM_003494.3	c.937+1G>A	-	rs201869739	0.0004	-	-	Pathogenic
			c.5713C>T	p.R1905X	rs121908959	-	1.00	-	Pathogenic
<i>COL6A2</i>	21q22.3	NM_001849.3	c.2039G>A	p.R680H	rs1042917	0.4423	0.09	1.000	Benign
<i>TMEM43</i>	3p25	NM_024334.2	c.504A>T	p.K168N	rs4685076	0.3301	0.36	0.203	Benign
			c.536T>C	p.M179T	rs2340917	0.4551	1.00	0.000	Benign
<i>GMPPB</i>	3p21.31	NM_013334.3	c.551A>G	p.Q184R	rs1466685	0.9890	0.08	0.000	Benign
<i>DOK7</i>	4p16.2	NM_173660.4	c.887A>G	p.Q296R	rs6811423	0.2559	0.48	0.465	Benign
<i>MYOT</i>	5q31	NM_006790.2	c.220A>C	p.K74Q	rs6890689	0.9880	0.38	0.000	Benign
<i>DPM2</i>	9q34.13	NM_003863.3	c.227C>G	p.T76S	rs7997	0.7056	1.00	0.000	Benign

Sep, september; Ref Seq, reference sequence; SIFT, sorting intolerant from tolerant; PolyPhen2, prediction of functional effects of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs).

^aGenBank registration number of reference sequence; ^bSIFT: <0.05 predicted to be deleterious; ^cPolyPhen2: ~1 indicates prediction of pathogenicity.

중농도는 정상 값보다 낮았지만 폼페병의 대표적인 임상 양상인 호흡기능장애가 없어서 다음 검사로 WES를 시행하였다. 두 환자의 엑솜분석데이터는 Table 1에 요약하였다. 자매에서 공통된 근육병 원인유전자의 변이는 총 18개로 Table 2에 정리하였다. ACMG/AMP 진단기준을 바탕으로 *DYSF* 유전자의 c.937+1G>A와 c.5713C>T (p.Arg1905X) 두 변이가 병적 변이(pathologic variant)로 분류되었고, 실제로 두 변이 모두 팔다리이음근디스트로피2B의 원인유전자로 여러 차례 보고된 것이었다.^{9,10} 이 돌연변이들은 고전적 염기서열분석으로 재확인할 수 있었다(Fig. 1B). 혈중 산성 알파 글루코시다아제 혈중농도의 감소와 관계하여 *GAA* 유전자의 c.1726G>A 변이와 c.2065G>A 변이를 확인하였다.¹¹ 이 *GAA* 유전자의 변이들은 산성 알파 글루코시다아제의 거짓결핍과 연관되지만 이전 보고와는 달리 동형변이(homozygous variant)가 아닌 이형변이(heterozygous variant)로 존재하였다.

고 찰

본 연구에서 산성 알파 글루코시다아제의 혈중농도가 감소로 폼페병이 의심된 근육병 가족에서 *DYSF* 유전자

의 복합이형접합돌연변이(c.937+1G>A, c.5713C>T)를 확인하였다. 이 두 돌연변이는 ACMG/AMP 진단기준으로 병적 변이로 분류되었고 이 돌연변이들은 스플라이싱 돌연변이(splicing site mutation)와 무의미 돌연변이(nonsense mutation)로 디스펠린(dysferlin) 단백질형성에 심각한 영향이 예상되고, 실제 팔다리이음근디스트로피 2B형의 원인 돌연변이로 보고되었기에 두 자매 근육병의 원인으로 생각하였다.

팔다리이음근디스트로피 2B형의 원인유전자인 *DYSF* 유전자(MIM *603009)는 염색체 2p13.3-p13.1에 위치하고 디스펠린 단백을 부호화한다.¹² 디스펠린단백은 근육원섬유 마디(sarcomere)에 존재하는 막단백(membrane protein)으로 정확한 기능은 모르나, 세포막의 수리, T-세관의 합성 및 근육재생, 근육모세포(myoblast)의 분화에 관계할 것으로 추측하고 있다.¹³⁻¹⁵ 현재까지 *DYSF* 유전자의 2,300여 개의 원인돌연변이가 보고되었고(www.dmd.nl/nmdb/home.php?select_db=DYSF), 한국인에서는 c.2494C>T와 c.663+1G>C가 가장 흔한 돌연변이로 알려져 있다.^{16,17}

두 자매는 유년기에는 좋은 운동능력을 보이다가 10대 후반부터 하지의 근력약화와 근위축이 나타나고, 40대부터 팔의 힘이 약해졌다. 또한 혈중 크레아틴 키나아제 수

치가 보행가능 시기에는 정상 값보다 15배이고, 발병 30년 후에도 4배 이상으로 증가되어 있었다. 이것은 팔다리염근디스트로피 2B형의 전형적인 임상양상이다.¹⁸ 반면, 두 자매에서 모두 산성 알파 글루코시다아제의 혈중농도는 감소되었지만 호흡기능부전과 근육긴장증(myotonia) 없는 근긴장성 방전(myotonic discharge)과 같은 폼페병을 시사하는 임상특징은 없었다.¹⁹

폼페병에서 치료제가 실용화됨에 따라서 유전진단이 되지 않은 근육병 환자에서 폼페병을 찾기 위한 노력들이 활발히 이루어지고 있고, 선별검사로 산성 알파 글루코시다아제 혈중농도 검사가 가장 널리 사용되고 있다.^{20,21} 그러나 효소의 혈중농도의 분석만으로는 위양성과 위음성의 위험이 있어서 확진을 위한 근육조직검사, 섬유모세포(fibroblast)에서의 재측정 또는 유전자검사가 필요하다.²² 실제로, 두 자매의 전체 산성 알파 글루코시다아제 농도와 아카보오스를 처리 후 농도는 정상 값보다 낮았으나, 아카보오스를 처리한 값과 전체 산성 알파 글루코시다아제 값의 비율은 정상이었다. 이것은 산성 알파 글루코시다아제의 거짓결핍을 보이는 환자에서 나타날 수 있는 소견이다.²³ 비록 본 연구의 두 환자 모두에서 거짓결핍의 원인으로 알려진 *GAA* 유전자의 c.1726G>A 변이와 c.2065G>A 변이를 확인하였지만, 이 두 변이는 현재까지 연구에서는 항상 같은 대립유전자에 존재해서 동형접합변이(homozygous variant) 상태로만 보고되어 왔다.^{24,25} 따라서 두 자매의 산성 알파 글루코시다아제의 감소한 원인에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 그러나 두 자매의 부모님은 사망하였고 정상인 형제들의 검사는 거부하여서 연구를 더 이상 진행할 수 없었다.

WES는 차세대 유전자염기서열분석(next generation sequencing)을 기반으로 전체 엑손영역을 분석하여 유전학적 원인을 찾는 매우 경제적이고 효율적인 분석방법이다.⁴ 그러나 WES도 몇몇 제한점을 갖고 있다.²⁶ 첫째, 현재까지 알려진 엑손의 위치정보가 완벽하지는 않다. 둘째, 한 번에 읽을 수 있는 염기서열이 100- 150개 염기쌍(base pair) 정도로 제한적이다. 셋째, DNA 염기서열 중 구아닌(guanine)과 시토신(cytosine)의 함량이 높거나 반복 염기서열로 된 경우는 정확도가 감소한다. 넷째, 유전체의 구조변화와 유전자 발현을 조절하는 유전자 조절부위에 대한 정보는 확인하기 어렵다.

본 연구에서 폼페병의 특징적인 임상양상은 관찰되지는 않았으나 산성 알파 글루코시다아제 혈중농도가 감소되어 있었던 유전성 근육병 자매에서 WES를 이용하여 *DYSF* 유전자의 복합이형접합돌연변이(compound hetero-

zygous mutation)와 *GAA* 유전자의 변이를 확인하였다. 유전성 근육병은 매우 다양한 임상표현형을 보일 수 있고, 이것을 설명할 수 있는 다양한 유전학적 원인 규명을 위해서 본 연구에서와 같이 WES가 유용할 수 있기에 이를 보고하는 바이다.

REFERENCES

- Kaplan JC, Hamroun D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 2014;24:1123-1153.
- Norwood F, de Visser M, Eymard B, Lochmuller H, Bushby K. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur J Neurol* 2007;14:1305-1312.
- Bushby K. Diagnosis and management of the limb girdle muscular dystrophies. *Pract Neurol* 2009;9:314-323.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011;12:745-755.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-1760.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43:491-498.
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Current Protoc Bioinformatics* 2013;11:11. 10.1-11.10.33.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-424.
- Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology* 2003;60:1799-1804.
- Vilchez JJ, Gallano P, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Freixas A, et al. Identification of a novel founder mutation in the *DYSF* gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol* 2005;62:1256-1259.
- Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, et al. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab* 2010;99:379-383.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31-36.
- Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423:168-172.
- Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in

- dysferlinopathy. *Skelet Muscle* 2011;1:10.
15. Klinge L, Harris J, Sewry C, Charlton R, Anderson L, Laval S, et al. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2010;41:166-173.
 16. Park YE, Kim HS, Lee CH, Nam TS, Choi YC, Kim DS. Two common mutations (p.Gln832X and c.663+1G>C) account for about a third of the DYSF mutations in Korean patients with dysferlinopathy. *Neuromuscul Disord* 2012;22:505-510.
 17. Shin HY, Jang H, Han JH, Park HJ, Lee JH, Kim SW, et al. Targeted next-generation sequencing for the genetic diagnosis of dysferlinopathy. *Neuromuscul Disord* 2015;25:502-510.
 18. Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, et al. New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:946-953.
 19. Teener JW. Late-onset Pompe's disease. *Semin Neurol* 2012;32:506-511.
 20. Gutiérrez-Rivas E, Bautista J, Vilchez J, Muelas N, Díaz-Manera J, Illa I, et al. Targeted screening for the detection of Pompe disease in patients with unclassified limb-girdle muscular dystrophy or asymptomatic hyperCKemia using dried blood: a Spanish cohort. *Neuromuscul Disord* 2015;25:548-53.
 21. Musumeci O, la Marca G, Spada M, Mondello S, Danesino C, Comi GP, et al. LOPED study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015 Mar 17. pii: jnnp-2014-310164.
 22. American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. Diagnostic criteria for late-onset (childhood and adult) Pompe disease. *Muscle Nerve* 2009;40:149.
 23. Okumiya T, Keulemans JL, Kroos MA, Van der Beek NM, Boer MA, Takeuchi H, et al. A new diagnostic assay for glycogen storage disease type II in mixed leukocytes. *Mol Genet Metab* 2006;88:22-28.
 24. Kroos MA, Mullaart RA, Van Vliet L, Pomponio RJ, Amartino H, Kolodny EH, et al. p.[G576S; E689K]: pathogenic combination or polymorphism in Pompe disease? *Eur J Hum Genet* 2008;16:875-879.
 25. Tajima Y, Matsuzawa F, Aikawa S, Okumiya T, Yoshimizu M, Tsukimura T, et al. Structural and biochemical studies on Pompe disease and a "pseudodeficiency of acid alpha-glucosidase". *J Hum Genet* 2007;52:898-906.
 26. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461:272-276.