

## 한국인 뒤티엔느형 및 베커형 근디스트로피의 유전자 결손분석

연세대학교 의과대학 재활의학과 및 임상병리과<sup>1</sup>

강성웅 · 문재호 · 송경순<sup>1</sup> · 전세일

=Abstract=

### Gene Deletion Pattern in Korean Patients with Duchenne or Becker Muscular Dystrophy

Seong Woong Kang, M.D., Jae Ho Moon, M.D., Kyung Soon Song, M.D.<sup>1</sup>  
and Sae Il Chun, M.D.

Department of Rehabilitation Medicine, Clinical Pathology

Duchenne and Becker muscular dystrophies are X-linked, recessive disease characterized by progressive muscular weakness. Since they are serious disorders for which at present there is no effective treatment, a great deal of emphasis has been given to prevention. To date, however, no precise analysis is available on the mutation of dystrophin gene in Korean patients, thus it is difficult to provide proper genetic counselling.

In this study, we investigated the deletion pattern of dystrophin gene which is the most common cause of the mutation of the dystrophin gene to develop a effective strategy for detecting deletion and to provide a basic data for genetic counselling in Korean patients. We analyzed DNA samples taken from 82 Korean patients from 80 families with clinical picture suspected to having Duchenne or Becker muscular dystrophy using polymerase chain reaction with 19 pairs of primers and Southern hybridization with cDNA 4-5a probe. The results were as follows:

- 1) At least one DNA fragment could not be amplified from the peripheral blood DNA of the 43 patients from 41 families by polymerase chain reaction. Two pairs of brothers showed same deletion pattern.
- 2) Exon 49 was the most frequently deleted(20 patients from 19 families). Only one of the 19 amplified fragment was deleted in 27.9%(12/43), more than 1 exon was deleted in the remaining 72.1%(31/43). Deletion were more frequent in central region(34/43) than in the 5' terminal region(9/43).
- 3) Additional deletion was not found by the Southern hybridization using cDNA 4-5a probe in the patients whom deletion in polymerase chain reaction could not be found.

According to the above results, we can eliminate the need for invasive, expensive, and time consuming procedure such as biopsy or Southern hybridization for about half of patients suspected to having Duchenne or Becker muscular dystrophy. The use of multiplex polymerase chain reaction encompassing the primer pairs corresponding to the exon 17, 45, 49, and 51 would have detected 76.7%(33/43) deletions found in Korean patients. With this

\*본 논문은 1994년도 한국과학재단 특정기초연구비 지원에 의해 이루어졌음(과제번호 94-0403-01-2).

observation, our approach to detect deletion will initially be the polymerase chain reaction including the primers of the exon 17, 45, 49, and 51. When a deletion is not found in them, the remaining patients were examined with the rest pairs of primers. If no deletion was found in polymerase chain reaction, then the Southern hybridization with cDNA probe will be carried out.

**Key Words:** Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, Dystrophin gene, Deletion, Polymerase chain reaction

## 서 론

뒤시엔느(Duchenne)형 및 베커(Becker)형 근디스트로피는 진행성 근력약화를 일으키는 질환으로서 성 염색체에 의해 열성 유전되는 질환이다. 뒤시엔느형 근디스트로피는 약 3,500명의 출생 남아중 1명의 빈도로 발생되며, 대개 2~3세에 근력약화에 의한 보행장애등의 임상증상이 나타나고 대부분의 경우 12세 이전에 보행능력을 상실하게 되는, 평균 사망 연령이 20세인 치명적인 질환이다. 베커형 근디스트로피는 뒤시엔느형 근디스트로피와 동일한 유전자상의 이상에 의해 발병하며, 비슷한 임상증상을 나타내지만, 발병이 늦으며 근력약화의 진행속도가 느린 질환이다. 베커형 근디스트로피는 18,000내지 31,000출생 남아 중 1명의 빈도로 발생하며, 보행능력의 상실은 평균 30대이고, 평균 사망 연령은 42세이다<sup>20,54)</sup>.

뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피는 X 염색체의 단완(Xp21)에 위치한 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 변이에 의해 발생한다<sup>6,30)</sup>. 디스트로핀 유전자는 약 240만 bp 크기로 79개의 exon을 함유하며, X 염색체의 약 1%를 차지하는 커다란 유전자이다<sup>17,47)</sup>. 이 유전자는 디스트로핀이라는 단백질을 합성하는 데, 디스트로핀 단백질은 디스트로핀 연관 단백질 복합체(dystrophin-associated protein complex)와 함께 근 세포막의 안정성을 유지하는 데 중요한 역할을 담당하고 있다. 디스트로핀유전자의 변이에 의해 디스트로핀 단백질의 양이 감소하거나, 크기의 변화를 일으킬 경우, 혹은 변이된 디스트로핀이 디스트로핀 연관 단백질 복합체와 결합을 하지 못하게 되면, 근 섬유막의 구조적 약화로 인해 근 섬유막의 안정성에 장애를 유발시켜 근력약화를 초래하게 된다<sup>20)</sup>. 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피와 관련된 유전자의 변이

는, 50~70%가 dystrophin 유전자의 결손으로 알려져 있으며, 유전자 중복이 약 5~10% 정도이며, 나머지 25~30% 정도는 점돌연변이(point mutation)에 의한 것으로 보고되고 있다<sup>4,5,11,16,28,35)</sup>.

이러한 디스트로핀 유전자 변이를 규명하기 위한 분자 생물학적 기법으로는 디스트로핀 cDNA probe를 이용한 Southern hybridization과 디스트로핀 유전자의 각종 exon에 대한 시발체(primer)를 이용한 중합효소 연쇄반응법, 그리고 제한 효소 분절길이 다형성 연쇄분석(restriction fragment length polymorphism linkage analysis)이 널리 이용되고 있다.

유전자 결손이나 중복과 같은 변이가 있는 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피 환자들에서는 Southern hybridization과 중합효소 연쇄반응을 시행하여 확진이 가능하며, 보인자 검색 및 산전진단이 가능하다<sup>4,9,45)</sup>. Southern hybridization은 제한효소에 절단된 DNA 조각들을 전기영동에 의해 분리하고 nitrocellulose 또는 나일론 막에 옮긴 후 적절한 probe로 보합결합시켜 특정 DNA 조각을 찾아내는 방법으로서 거의 정확히 유전자 결손이나 중복을 찾아낼 수 있지만 시간과 노력이 많이들고 방사선 동위원소를 사용해야 된다는 단점이 있다. 디스트로핀 cDNA를 이용한 Southern hybridization과 중합효소 연쇄반응에서 유전자 변이를 확인하지 못한 약 30%의 가계에서는 제한 효소 분절길이 다형성 연쇄분석을 환자를 포함한 각 가계의 보인자일 가능성 있는 여자들을 대상으로 실시하여, 변이를 전달하는 염색체의 대립인자를 결정함으로서 산전진단과 보인자 진단이 가능하다<sup>5,11,14,29,30)</sup>. 그러나 제한 효소 분절길이 다형성 연쇄분석은 시간이 많이 소요되고, 검사를 위해서는 다수의 가족을 검사해야 하며, 특히 환자나 주요 가족 구성원이 사망등으로 인하여 검사에 포함되지 못할 경

우 적절한 정보를 얻을 수 없다는 문제점이 있다<sup>5,45)</sup>. 이에 비해 중합효소 연쇄반응은 검사가 신속하고 단순하며 방사선 동위원소를 사용하지 않는다는 장점 때문에 많은 유전질환의 검사에 사용되고 있으며, 디스트로핀의 염기서열이 밝혀지고 이에 따른 시발체의 지속적인 개발로 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피에서도 최근 널리 이용되기 시작하였다<sup>4,36)</sup>.

최근 분자 생물학적 기법의 발달로 여러 유전 질환에서 보다 정확한 진단법이 도입되고 있으며, 외국에서는 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피에서도 분자 생물학적 기법을 이용한 병의 진단, 보인자 진단 및 산전진단에 대한 많은 연구 결과들이 보고되고 있다<sup>1,7,15,27,28,35,44,51)</sup>. 그러나 아직 우리나라에서는 한국인 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피에서의 유전자 변이에 대한 정확한 분석이 되어 있지 않아서 환자 가족들에 대한 적절한 유전상담에 한계가 있다.

본 연구에서는 디스트로핀 유전자 변이 중 가장 빈도가 높은 유전자 결손을 찾기 위해 1990년 Chamberlain 등<sup>8)</sup>과 1990년 Beggs 등<sup>5)</sup>이 사용한 각각 9종, 10종의 시발체를 주문 합성하여 중합효소 연쇄반응으로 유전자 결손 부위를 일차 검색하여 유전자 결손의 양상을 알아보고, 중합효소 연쇄반응 결과 결손 부위가 발견되지 않은 환자를 대상으로 디스트로핀 유전자의 cDNA probe를 사용하여 Southern hybridization을 시행하여 추가적인 유전자 결손의 유무를 알아 보았다. 이 결과를 토대로 한국인 환자에서의 결손 양상을 분석하여 보다 효율적으로 환자를 진단할 수 있는 있는 방법을 모색하고자 하였다. 나아가서 출생전 산전진단을 용모막 체취등을 통해 유전자 수준에서 실시하여 출생전 산전진단을 통한 질환의 예방에 도움을 줄 수 있는 기초자료를 마련하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1) 대상

연구대상은 모두 남자 환자로서 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피의 임상 양상을 보이며, 혈중 creatine kinase치가 상승되어 있고, 전기진단 검사상 근육병변 소견을 보인 82명을 대상으로 하였다. 모든 환자를 대상으로 중합효소 연쇄반응을 시행하여 유전자 결손을 검사하였으며, 중합효소 연쇄반응상 유전자 결

손이 발견되지 않은 환자에서는 6종의 디스트로핀 cDNA subclone(1-2a, 2b-3, 4-5a, 5b-7, 8, 9-14) probe 중 중합효소 연쇄반응에 사용한 시발체에 대한 exon이 포함되어 있지 않은 cDNA 4-5a probe를 이용하여 Southern hybridization을 시행하였다.

### 2) 연구 방법

(1) Genomic DNA의 추출: EDTA 퓨브에 채혈하여 냉동 보관하였던 10 ml의 전혈을 실온에서 녹인 후 동량의 PBS로 회석시켰다. 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 침전되어 남은 백혈구를 추출 완충액(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1 M EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS)에 재부유시킨 후 proteinase K를 최종 농도가 100 µl/ml 되게 첨가한 뒤 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 실온으로 식힌 후 동량의 0.5M Tris-Cl(pH 8.0)으로 포화된 폐놀을 가한 후 10분간 잘 섞는다. 3,500 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층의 수용액총만을 취한 뒤, 다시 한번 폐놀로 씻어준 후 동량의 chloroform: isoamylalcohol(24:1)로 한번 더 씻어준다. 상층의 수용액총을 취하여 상층액 용량의 1/10에 해당하는 3 M sodium acetate(pH 5.2)를 가하여 잘 섞은 후 2배 부피에 해당하는 100% 에탄올을 첨가하여 퓨브를 위 아래로 흔들어 DNA뭉치를 만든다. DNA뭉치를 전져낸 후, 70%에탄올로 다시 한번 씻어낸 다음 DNA를 전조시키고 전조된 DNA를 1×TE(10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0)에 용해시킨 다음 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 DNA농도를 측정하였다.

(2) 중합효소 연쇄 반응: (주)한국생공으로부터 1990년 Chamberlain 등<sup>8)</sup>이 개발한 9종의 시발체(exon 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51)와 1990년 Beggs 등<sup>5)</sup>이 개발한 10종(exon 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60, muscle-specific promotor)의 시발체를 합성 주문하여 사용하였다(Table 1). Taq buffer와 Taq polymerase는 (주)한국생공으로부터, dNTP는 Phamarcia사(LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)로 부터 구입하였다. 검사는 19종의 시발체를 3쌍 혹은 4쌍의 시발체를 포함하는 5개의 조합으로 나누어 복합 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 제 1조합은 exon 43, 44, 45, 그리고 48에

Table 1. Sequences of Primers for Polymerase Chain Reaction of Dystrophin Gene

Primer <sup>1</sup>	Sequence(5'-3')	Primer	Sequence(5'-3')
P <sup>3</sup>	GAGATCTAGACAGTGGATAACATAACAAATGCATG	PR <sup>2</sup>	TTCTCCGAAGGTAATTGCCCTCCAGATCTGAGTCC
3F	TCATTCAATCATCTCGGCAGATTAA	3R	CAGGGGGTAGAGTATGCCAAATGAAAATCA
4F	TGTGCGGFTCTCTGTTGTCAGTG	4R	CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC
6F	CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA	6R	GTCTCAGTAATCTTCTACCTATGACTATGG
8F	GTCCTTTACACACTTACCTGTTGAG	8R	GGCTCTATTCTCATGTTCTAAATTAG
12F	GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC	12R	GAAGGCACGCAACATAAGATAACACCT
13F	ATAGGAGTACCTGAGATGAGCAGAAAT	13R	CTGACCTTAAGTTGTTCTCCAAGCAG
17F	GAECTTCCGATGTTGAGATTACTTTCCC	17R	AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTCC
19F	TTCTACCACATCCCATTTCCTCCA	19R	GATGGCAAAAGTGTGAGAAAAAGTC
43F	GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG	43R	ATATATGTTTACCTAACCTTGTGGTCC
44F	CTTGATCCATATGCTTTACCTGCA	44R	TCCATCACCCCTTCAGAACCTGATCT
45F	AAACATGGAAACATCCTTGGGGAC	45R	CATTCCCTATTAGATCTGTGCCCTAC
47F	CGTTGTTGCCATTGGTCTGTTCAAGTTAC	47R	GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG
48F	TTGAATACATGGTTAAATCCCAACATG	48R	CCTGAATAAAGTCTTCCTTACACAC
49F	GTTGCCCTTAATGTTACAGGGAGAAATTG	49R	GCAATGACTCGTTAAATGCCCTTAAGATC
50F	ACCAAATGGATTAAGATGTTCAATGAAT	50R	TCTCTCAACCAGTCACTTCATAG
51F	GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC	51R	GGAGAGTAAAGTGAATTGGTGGAAAATC
52F	ATGCAGGATTGGAACAGAGGGTCC	52R	TTCGATCCGTAATGATGTGTTCTAGCCTC
60F	AGGAGAAATTGGCGCTCTGAAAGAGAACG	60R	CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGGTCAGG

1. Primers are named for the exon they amplify.

2. Muscle-specific promoter.

3. Forward relative to the coding sequence.

4. Reverse relative to the coding sequence.

대한 시발체를 사용하였고, 제 2 조합은 exon 12, 13, 17, 그리고 19에 대한 시발체, 제 3 조합은 exon 4, 8, 49, 그리고 muscle-specific promotor에 대한 시발체, 제 4 조합은 exon 47, 50, 51, 그리고 52에 대한 시발체, 제 5 조합은 exon 3, 6, 그리고 60에 대한 시발체를 사용하였다(Table 2). 5'-시발체와 3'-시발체를 각각 12.5 pmol씩 준비하고, dNTP 각 0.8 mM, 반응완충액(10×Taq buffer) 5 μl를 혼합하고, 이 혼합액에 추출한 genomic DNA 4 μl(100 ng/μl)를 첨가한 후 증류수를 합하여 46 μl되게 반응 혼합물을 만들었다.

이 반응 혼합물을 mineral oil로 덮은 다음 thermocycler(Hybaid thermal reactor, Hook Tucken Instrument, LTD, UK)에 넣고, 95°C에서 5분간 1회 변성시킨 후, 72°C상태에서 Taq polymerase 4 unit(1 unit/μl)를 혼합액에 가하였다. 그리고 94°C에서 1분간 변성, 65°C에서 2분간 결합(annealing), 72°C에서 3분간 합성(extension)시키는 과정을 32회 반복 시행하고 72°C에서 10분간 1회 더 합성시켰다. 증폭된 산물을 ethium bromide로 염색한 1.5% agarose gel에서 100 V로 40분 동안 0.5 × TBE 완충용액하에서 전기영동한 후 자외선하에서 원하는 증폭산물의 크기를 확인하였다.

### (3) cDNA probe를 이용한 Southern hybridization:

① Genomic DNA의 제한효소 절단: 추출한 genomic DNA 10 μg을 10 X buffer 3 μl, Hind III(Phamarcia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)제한효소 2.5 μl(20 unit/μl)와 혼합하여 30 μl되게하여 37°C 수조에서 4시간 반응시켜 절단한 후 0.8% agarose gel 전기영동을 실시하여 절단된 DNA를 분리하였다.

② Southern blotting: 전기영동이 끝난 gel을 자외선하에서 완전분해상을 확인한 후 gel을 탈퓨린용액(0.25 M HCl)에 담그고 10분간 가볍게 흔들어 주고 증류수로 세척한 후 변성용액(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 담가 45분간 흔들어 주었다. 다시 증류수로 세척한 후 중화용액(1.5 M NaCl, pH7.5, 0.5 M Tris HCl)에서 30분간 흔들어 주면서 2번 중화시켰다.

이전을 위해서 플라스틱 통속에 이전 완충용액(20

**Table 2. Multiplex Polymerase Chain Reaction of Dystrophin Gene**

Set	Exon number			
Set 1	45(547)	48(506)	43(357)	44(268)
Set 2	19(459)	17(416)	12(331)	13(238)
Set 3	P'(535)	49*439)	8(360)	4(196)
Set 4	51(388)	50(271)	47(181)	52(113)
Set 5	3(310)	6(202)	60(139)	

1. Muscle-specific promotor  
( ): Product size(bp)

X SSC)을 붓고 gel 크기보다 큰 유리판을 장치하고 2~3겹의 Whatmann 3 MM을 유리판 위에서 용기 밑바닥에 닿을 정도의 크기로 잘라 이동완충용액에 적신 다음 유리판 위에 올려놓은 후 유리봉으로 밀어 기포를 제거하였다. Gel의 크기 보다 조금 크게 자른 3 MM 여과지 3장을 증류수에 완전히 가라앉을 때까지 10분 정도 적신 후 이동완충용액에 10분 정도 적시고 중화된 gel을 유리판 위의 3 MM 여과지 위에 위면이 아래쪽으로 향하도록 올려 놓고 gel 이외에는 용액이 이동하지 않도록 비닐랩으로 gel 주위를 덮었다. Gel의 크기보다 조금 크게 자른 양극을 뛴 나일론 막을 gel 위에 올려 놓고, 그 위에 적셔둔 3 MM 여과지를 포개 놓고 그 위에 gel의 크기로 자른 흡수지(paper towel)를 10 cm 정도 높이로 쌓은 다음 유리판으로 덮고 500g 정도의 물체로 누른 상태로 18시간 정도 방치시켰다. 이전이 끝나면 나일론 막을 gel로부터 분리하여 6×SCC에서 15분간 흔들면서 씻은 후 흡수지 위에서 물기를 제거하고 80°C에서 2시간 구웠다.

③ cDNA probe 제조: 디스트로핀 cDNA probe의 subclone 4-5a가 삽입된 vector를 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)으로부터 구입하여 JM107 host에 transformation 시킨 후 LB media에 배양하였다. Mini 혹은 Med-preparation법으로 plasmid를 분리 정제한 후 삽입시킬 때 사용한 EcoRI제한효소로 잘라서 전기영동 시킨 후, gene-clean kit를 이용하여 정제하여 농도를 측정하고 Random primed DNA labelling kit(Phamracia LKB, Biothechnology, Uppsala, Sweden)를 이용하여 제작하였다.

이중가닥의 DNA 50 ng과 증류수를 혼합하여 9  $\mu$ l로 만든 후 10분간 95°C에서 처리한 후 얼음에 재빨리 넣어 냉각시켰다. 여기에 0.5 mM 농도의 dATP, dGTP, dTTP 혼합용액(1:1:1) 3  $\mu$ l, 반응 혼합용액 2  $\mu$ l, [ $\alpha^{32}$ P]dCTP (50  $\mu$ Ci; 3,000Ci/mmol) 5  $\mu$ l, Klenow enzyme 1  $\mu$ l(2 units/ $\mu$ l)를 첨가하여 20  $\mu$ l로 만든 후 37°C에서 30분내지 2시간 반응시켰다. pH 8.0, 0.2 M EDTA 용액 2  $\mu$ l 첨가하여 반응을 중지시키고 Sephadex G50 column에 통과시켜 결합 형태와 유리형태를 분리한 후 결합 형태만을 모아 5분간 끓인 후 바로 얼음에 냉각시켜 probe로 사용하였다.

④ 보합결합(Hybridization); 이전된 나일론 막을 비닐 주머니에 넣고 3×SSC 용액에서 30분간 65°C에서 흔들어 준 후 15 ml의 전보합결합 용액(5×SSC, 1×Denhardt 용액, 1% SDS)을 넣은 후 비닐 주머니의 기포를 제거하고 접합기로 밀봉하여 65°C에서 1시간 이상 흔들어 주면서 반응시켰다. 반응이 끝나면 전보합결합 용액을 제거한 후  $^{32}$ P로 표지된 probe와 15 ml의 보합결합 용액(0.75 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1×Denhardt 용액, 1% SDS, 50 g/ml denatured salmon testes DNA; sigma [9007-49-2])을 비닐 주머

니에 넣어 하룻밤 동안 반응시켰다.

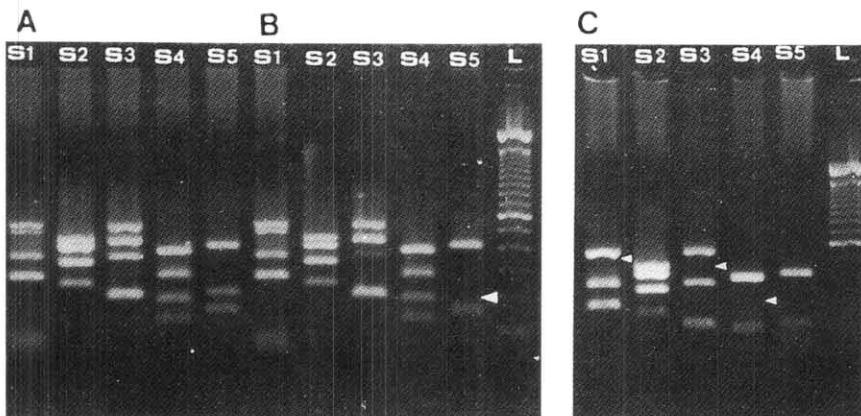
보합결합 용액을 전부 제거한 후 나일론 막을 상온에서 2×SSC, 0.1% SDS에서 각 10분간 2회 세척한 후 1×SSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 각 30분간 2회 세척하였다. 세척이 충분하지 않은 경우에는 0.2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 세척을 시행하였다. 나일론 막을 상온에서 건조시킨 후 랩으로 싼 다음 intensify screen이 장착된 카세트에 넣고, X-ray 필름을 넣은 후 -70°C에서 24~48시간 노출시킨 다음 현상하였다.

## 결 과

### 1) 종합효소 연쇄반응

종합효소 연쇄반응을 실시한 총 대상 환자는 82명으로서, 2가계에서는 각각 2명의 형제가 검사를 시행 받았다. 종합효소 연쇄반응 시행 결과 43명의 환자에서 최소한 1개 이상의 exon이 증폭되지 않았으며 (Fig. 1), 이들 환자의 진단시 평균 나이는 94.2개월이었으며, 이중 2명의 형제가 포함된 2가계(18번과 19번 환자, 그리고 28번과 29번 환자)에서는 형제간에 동일한 유전자 결손 양상을 보였다(Table 3).

디스트로핀 유전자상의 결손을 보인 41가계 43명의



**Fig. 1.** Analysis of dystrophin gene by multiplex polymerase chain reaction. Mutiplex polymerase chain reaction of nineteen pairs of primers are divided into five sets of reaction. S1: exons 45, 48, 43, and 44. S2: exons 19, 17, 12, and 13. S3: muscle-specific promotor, exons 49, 8, and 14. S4: exons 51, 50, 47, and 52. S5: exons 3, 6, and 60. A: normal control. B: a patient who deleted single exon(exon 6). C: a patient who deleted multiple exons(exons 48, 49, and 50). Arrows represent the deleted exon.

Table 3. Patterns of Dystrophin Gene Deletions Detected by polymerase Chain Reaction

Patient	Age <sup>1</sup> (months)	Exon number																	
		P <sup>2</sup>	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	47	48	49	50	51	52
1	106	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2	67	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
3	30	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
4	49	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
5	99	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
6	38	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7	89	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
8	96	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
9	42	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
10	130	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
11	61	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
12	168	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
13	79	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
14	81	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
15	31	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
16	95	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
17	113	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
18	214	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
19	120	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
20	72	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
21	80	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
22	112	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
23	96	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
24	63	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
25	72	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
26	156	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
27	71	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
28	13	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
29	90	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
30	78	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
31	95	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	419	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
33	99	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
34	95	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
35	62	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
36	65	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
37	71	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
38	100	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
39	82	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
40	65	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
41	70	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
42	79	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
43	138	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

1. Age at diagnosis    2. Muscle-specific promoter    3. Deletion

환자중 19가계의 20명의 환자에서 49번 exon에 대한 시발체가 증폭되지 않아 49번 exon이 가장 빈번하게 결손되는 exon이었으며, 그외 exon의 결손 빈도는 exon 48이 43.9%, 47번과 50번 exon이 각각 41.5%, 51번 exon이 34.1%, exon 45번과 52번이 각각 31.7%와 26.8%였으며, 60번 exon과 promotor에서 결손을 보인 환자는 없었다(Table 4). 따라서 17번, 45번, 49번, 51번 exon에 대한 시발체를 사용하여 복합 중합효소 연쇄반응을 시행할 경우, 이 4종의 시발체만 사용하더라도 76.7%(33/43)의 결손 가계를 찾아낼 수 있으며, 이 시발체조합에서 결손을 보이지 않을 경우, 3번, 6번, 12번, 19번, 43번, 44번, 47번 exon에 대한 시발체들을 추가로 사용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하면 19종의 시발체를 다 사용하지 않더라도 유전자 결손이 발견된 43명 모두에서 유전자 결손을 찾아 낼 수 있을 것이다(Table 3). 디스트로핀 유전자의 5부위의 exon들(exon 3~19)에서 결손이 있었던 환자는 9명이었으며, 유전자 중앙 부위의

exon들(exon 43~52)에서 결손이 있었던 환자가 34명으로서, 결손은 유전자의 중간부에서 높은 빈도로 나타났다. Exon 46을 제외한 43번에서 52번까지의 exon은 연속적으로 연결되어 있으므로 유전자 중앙 부위에 결손이 있었던 34명중 26명의 26명의 환자에서 유전자 결손의 근위부 경계를 알 수 있었다. 따라서 유전자 결손의 근위부 경계가 45번 exon인 경우가 10명으로서, 결손이 44번과 45번 exon 사이에서 시작되는 경우가 가장 많음을 알 수 있었다(Table 3).

한개의 exon의 결손을 보인 환자는 12명으로서 결손을 나타낸 전체 환자의 27.9%였으며, 네개의 exon이 결손된 환자가 9명, 두개의 exon이 결손된 환자가 8명, 일곱개의 exon이 결손된 환자가 6명, 세개의 exon이 결손된 환자가 4명, 그리고 다섯개의 exon과 여섯개의 exon이 결손된 환자가 각각 2명이었다 (Table 5).

## 2) cDNA 4-5a probe를 이용한 Southern hybridization

중합효소 연쇄반응에서 결손을 보이지 않았던 39명의 환자중 디스트로핀 cDNA subclone 4-5a probe를 이용하여 Southern hybridization을 시행한 환자는 추적 검사가 가능하였던 20명이었으며, 이 환자들에서는 추가 결손이 발견되지는 않았다(Fig.2).

**Table 4.** Numer of Families with Dystrophin Gene Deletions According to the Involved Exon (n=41)

Exon number	No. of families(%)
P	0( 0.0)
3	1( 2.4)
4	1( 2.4)
6	1( 2.4)
8	2( 4.9)
12	3( 7.3)
13	3( 7.3)
17	5(12.2)
19	2( 4.9)
43	2( 4.9)
44	5(12.2)
45	13(31.7)
47	17(41.5)
48	18(43.9)
49	19(46.3)
50	17(41.5)
51	14(34.1)
52	11(26.8)
60	0( 0.0)

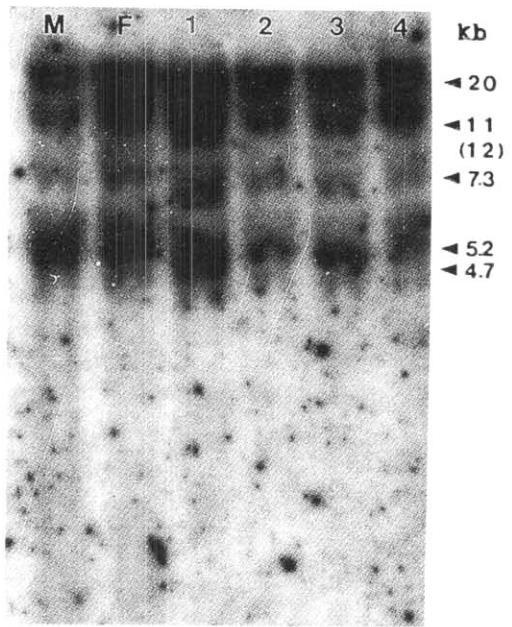
P: muscle-specific promoter

**Table 5.** Number of Cases with DMD<sup>1</sup>/BMD<sup>2</sup> According to the Extent of Exon Involvement

No. of deleted exon	No. of cases(%)
One exon	12( 27.9)
Two exons	8( 18.6)
Three exons	4( 9.3)
Four exons	9( 20.9)
Five exons	2( 4.7)
Six exons	2( 4.7)
Seven exons	6( 13.9)
Total	43(100.0)

1. Duchenne muscular dystrophy

2. Becker muscular dystrophy



**Fig. 2.** Southern blotting with Hind III digested DNA using cDNA 4-5a probe. Closely migrating fragments appear as cluster(11 kb and 12 kb bands). Lane 1 is the male control(M). Lane 2 is female control(F). Lanes from 3 to 6 are from the patient's genomic DNA (1-4). The patient's Hind III restriction pattern shows no deletion.

## 고 찰

디스트로핀 유전자의 결손은 genomic probe인 pERT 87과 XJ probe를 이용하여 뒤시엔느형 및 베커형 디스트로피 환자를 검색하여 약 6~10%의 환자에서 유전자 결손을 보고한 것이 최초였다<sup>34,40)</sup>. 그후 14 kb 크기의 디스트로핀 유전자의 전체 cDNA가 cloning됨으로써 cDNA subclone을 이용한 유전자 결손에 대한 연구가 활발히 진행되어 많은 연구 결과가 보고되기 시작하였다. Koenig 등(1987)<sup>33)</sup>은 디스트로핀 cDNA를 이용한 Southern hybridization 분석을 시행한 결과 뒤시엔느형 근디스트로피 환자의 50%에서 유전자 결손이 있음을 보고하였고, Darras 등(1988a)<sup>12)</sup>은 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피 환자의 66%에서, Laing 등(1991)<sup>35)</sup>은 69%에서 디스-

트로핀 유전자상에 1개 이상의 exon의 결손이 있음을 보고하였다. 그러나 이러한 cDNA 탐색자를 이용한 Southern hybridization방법은 비용이 비싸고, 약 5~7 일간의 많은 시간과 노력이 필요하다<sup>5, 9, 36)</sup>. 특히 진단 당시, 환자 가계의 보인자 가능성성이 있는 여성이 임신이 되어있을 경우에는 신속한 검색기능으로 이용하기에 적당하지 못하다<sup>35, 45)</sup>. 중합효소 연쇄반응은 Southern hybridization에 비해 소량의 DNA로도 분석이 가능하고 검사가 단순하다는 장점을 가지고 있으나, 디스트로핀 유전자는 크기가 240만 bp나 되며, 79개의 많은 exon을 가지고 있으므로 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피 진단에 이용하기에 어려움이 있었다. 그러나 여러 연구에서 디스트로핀 유전자 결손은 대부분이 유전자의 중간부위와 5' 끝부분의 2곳에 모여 있으므로<sup>3, 16, 21, 33)</sup>, 전체 exon에 대한 시발체를 모두 사용하지 않고 일부만 사용하더라도 대부분의 결손을 찾아낼 수 있다는 연구 결과가 보고됨으로써, 디스트로핀 유전자 결손 검색에 중합효소 연쇄반응이 이용되기 시작하였다<sup>8, 9)</sup>. 그 후 시발체의 지속적인 개발로 디스트로핀 유전자 cDNA probe를 이용한 Southern hybridization에서 유전자 결손이 확인된 환자의 98%까지 중합효소 연쇄반응을 이용하여 찾을 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>1, 4, 44)</sup>.

1988년 후반부터 디스트로핀 유전자 검색에 사용되기 시작한 중합효소 연쇄반응법은 DNA polymerase반응을 연속적으로 반복시켜 단시간내에 원하는 부분의 DNA를 증폭시켜 유전자에 대한 정보를 비교적 단순한 과정을 거쳐 신속히 얻을 수 있으므로<sup>4, 48)</sup>, Southern hybridization의 문제점들을 해결하는데 많은 도움을 주었다. 1988년 Chamberlain 등<sup>9)</sup>은 6종의 시발체(exon 8, 17, 19, 44, 45, 48)를 이용한 복합 중합효소 연쇄반응 실험 결과 디스트로핀 cDNA probe에 의해 유전자 결손이 확인된 환자의 70%에서 유전자 결손을 확인할 수 있었다고 보고하였으며, 1990년<sup>8)</sup>에는 3종(exon 4, 12, 51)을 더 추가하여 시행한 결과 80%에서 결손을 찾아내었다. 또한, 1990년 Beggs 등<sup>4)</sup>은 기존의 9종의 시발체외에 10종(exon 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60, promotor gene)의 시발체를 추가로 사용하여 검사한 결과, cDNA probe를 이용한 Southern hybridization에서 유전자 결손이 확인된 환자의 98%가 중합효소

연쇄반응에서도 결손을 나타내었다고 보고 하였다<sup>1,4,42)</sup>. cDNA probe를 이용한 Southern hybridization 방법은 유전자의 결손 뿐만 아니라 중복을 확인하기 위해 유용하게 사용될 수 있으나<sup>5,17,26)</sup> 시간과 노력이 많이 소요되는 문제점 외에도, 제한 효소에 의해 절단된 분절들이 비슷한 크기일 경우 전기영동시 분리되지 않은 상태로 같이 이동하는 경우가 있으며, 분절 크기가 적을 경우 보합결합이 약하게 되는 등 제한 효소에 의한 분리 양상이 복잡하여 판독이 어려운 경우가 많다<sup>11,13,24,32)</sup>. 중합효소 연쇄반응에서도 시발체가 결합하는 부위의 염기서열의 변이로 인해 시발체가 결합되지 않아 유전자상의 표적 부위가 증폭되지 않음으로서 판독이 잘못되는 문제점이 있지만, 2개 이상이 연속적으로 결합 장애를 일으키는 경우는 거의 없기 때문에 1개의 exon이 증폭되지 않은 경우만 결합 온도를 조절하여 중합효소 연쇄반응을 실시하면 거의 정확한 결과를 얻을 수 있다고 한다<sup>1,41,52)</sup>. 즉 유전자 결손 검색에서 환자의 예후 판정을 위한 정확한 결손 범위의 분석이 필요하지 않은 경우에는 중합효소 연쇄반응이 간편하고 신속하면서도 Southern hybridization과 비슷한 검색율을 나타내므로, 특히 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피의 가장 많은 원인인 유전자 결손을 찾아내기 위한 일차 검색에는 가장 효과적인 방법으로 이용될 수 있다. 그리고 기존에 많이 사용되고 있는 19쌍의 시발체를 이용한 중합효소 연쇄반응에서 결손이 확인되지 않은 환자에서도 cDNA probe를 이용한 Southern hybridization을 바로 시행하는 것보다는 다른 exon에 대한 시발체를 합성하여 중합효소 연쇄반응을 추가로 실시하는 것이 효율적인 방법이라고 하였다<sup>41,44)</sup>.

본 연구에서는 중합효소 연쇄반응을 실시한 82명의 환자중 43명의 환자에서 유전자 결손을 발견하여 뒤시엔느형 혹은 베커형 근디스트로피가 의심되는 환자 중 약 52.4%에서 유전자 결손을 보였다. 디스트로핀 유전자의 결손율은, 중국인 환자에서는 약 45%에서 결손이 있었다는 보고도 있고<sup>51)</sup>, 이스라엘인 환자에서는 약 37%의 결손이 있었다는<sup>50)</sup> 보고도 있지만 대부분의 연구에서는 60~70%의 결손율을 보고하고 있다. 일본의 경우도 1992년 Kitoh 등<sup>31)</sup>이 일본인 환자의 40%에서 결손이 있었다고 보고하였지만, 이는 10개의 exon에 대한 시발체만을 사용하였기 때문이며, 그후

전체 cDNA를 이용한 Southern hybridization 방법에 의한 검색에서는 일본인 환자중 60%의 환자에서 결손이 있었다고 보고하였다<sup>27)</sup>.

뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피는 임상증상과 혈청 creatine kinase치, 그리고 유전양상등으로 진단이 가능하지만<sup>11,54)</sup>, 약 1/3 정도는 새로운 돌연변이에 의해 발병하므로 환자의 가계내에 가족력 없이 1명의 환자만이 있는 경우는 DNA분석이나 디스트로핀 단백질의 측정없이는 진단을 내리기가 어렵다<sup>2,11,25,55)</sup>. 특히 상동 염색체 열성유전의 사지 근위근 위약형 (limb-girdle type) 근디스트로피중 유아 발병형은 뒤시엔느형 근디스트로피와, 성인 발병형은 베커형 근디스트로피와 임상적으로 거의 구별이 불가능하기 때문에 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피의 확진을 위해서는 디스트로핀 유전자나 단백질의 분석이 필요하다<sup>18,38)</sup>. 사지 근위근 위약형으로 진단 받은 환자중 분자 유전학적 검사상 디스트로핀 유전자상의 이상이 있었던 경우가 17% 정도되며<sup>2)</sup>, 뒤시엔느형 혹은 베커형 근디스트로피로 진단 받은 환자에서 분자 유전학적 검사상 디스트로핀 유전자상의 이상이 없는 것으로 판명된 경우도 약 8~12%정도로 보고되고 있다<sup>27,56)</sup>. 따라서 이러한 잘못된 분류는 유전상담시 문제가 될 수 있으므로, 정확한 진단을 위해서는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 확인하거나 단백질의 분석이 선행되어야 한다고 하였으며, 특히 1명의 환자만이 있어 유전양상을 알 수 없는 가계에서는 전형적인 임상양상을 보이지 않더라도 분자 유전학적 검사를 실시하여야 한다는 주장이 많다<sup>2,23,25,43,49,52)</sup>.

따라서 본 연구의 대상 환자 82명 중에도 임상적으로 감별진단이 어려운 사지 근위근 위약형등이 포함되었을 가능성성이 있으며, 본 연구에서 실시한 시발체에 포함된 exon과 cDNA 4-5a probe에 해당되지 않은 부분에서의 유전자 결손 가능성도 예상할 수 있으므로, 한국인 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피 환자에서의 실제 유전자 결손 비율은 본 연구에서 확인된 52.4% 보다 높을 것으로 추정된다.

뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피에서 디스트로핀 유전자의 결손은 유전자상의 두 곳의 “hot spot”인 5' 끝부분에서 500 kb이내에 위치한 최초 20개의 exon 부위와 첫번째 exon으로부터 약 1,200 kb 위치인 44번에서 55번 exon부위에서 대부분 나타난다

고 보고되고 있으며, 이중에서도 1,200 kb위치인 유전자의 중간 부위에서의 결손 빈도가 가장 높다고 보고되고 있다<sup>3,27,33</sup>. 즉 cDNA 4-5a와 9-14 probe에 해당되는 부위에서는 결손의 빈도가 낮으며, 특히 유전자의 3'부분인 60번에서 79번까지의 exon에서는 결손이 매우 드물게 나타나므로 cDNA를 이용한 Southern hybridization 방법에 의한 디스트로핀 유전자 검색시 cDNA 1-3, 5b-7, 그리고 8 probe를 사용하여 일차 검색을 실시하는 것이 효율적이라고 하였다<sup>3,12,46,53</sup>.

본 연구에서도 muscle specific promotor와 cDNA probe 9~14에 포함되는 60번 exon에서는 결손을 보이지 않았고 cDNA probe 4-5a를 이용하여 Southern hybridization을 실시한 20명의 환자에서도 결손이 검출되지 않았으며, 유전자의 5'근위부와 중앙부에서의 결손양상을 비교하였을 때에도 유전자의 중앙 부위에서 결손을 보인 환자가 34명으로서 중앙부의 결손빈도가 높게 나타났다. 따라서 한국인에 있어서의 디스트로핀 유전자의 결손 부위도 외국의 경우와 비슷한 양상을 보임을 알 수 있었다.

디스트로핀 유전자의 평균 intron의 크기는 35 kb이며, exon의 평균 크기는 0.2 kb로 알려져 있으며<sup>18</sup> 특히 44번과 45번 exon사이의 intron의 크기는 160 ~180 kb의 커다란 크기로서, 그 크기 때문에 돌연변이가 가장 빈발하는 부위로 알려져 있다<sup>17,31</sup>. 본 연구에서도 유전자 결손이 43번과 52번 exon 사이에 위치하여 유전자 근위부 경계를 알 수 있었던 환자 26명 중 10명이 45번 exon은 결손을 나타내었고 44번 exon은 결손을 나타내지 않아 44번과 45번 사이에서 결손이 시작된 경우가 많음을 확인할 수 있었다.

뒤시엔느형과 베커형 근디스트로피는 동일한 유전양상과 비슷한 임상양상을 보이기 때문에 8세 이전에 발병한 베커형 근디스트로피의 경우는 임상적으로 뒤시엔느형 근디스트로피와 감별진단이 힘들다<sup>20</sup>. 뒤시엔느형 근디스트로피는 97%에서 11세 이전에 보행능력을 상실하게 되고 베커형 근디스트로피의 경우는 97%에서 11세 까지도 보행능력을 유지하기 때문에 임상적으로는 이 시기에서의 보행능력 상실 유무에 따라 두 질환을 감별진단할 수 있다<sup>19</sup>. 그러나 1988년 Monaco 등<sup>39</sup>이 "reading frame" 가설을 제시함으로서 문자 생물학 기법으로 보다 빠른 시기에, 보다

용이하게 이 두 질환의 감별진단이 가능하게 되었다. 디스트로핀 유전자 결손시 결손 부위가 mRNA의 translational reading frame을 이동(shifting)시킬 경우 전체 codon 서열의 변화가 유발되어 중단 codon이 있는 실제 위치보다 앞쪽에서 중단 codon이 발현되게 됨으로써 translation이 초기에 종식하게 되며, 따라서 유전자는 근섬유막에 부착하여 근섬유막의 안전성을 유지시키는데 중요한 역할을 하는 디스트로핀 단백질의 carboxyl-terminus를 생성하지 못하게 되어 증상이 심한 뒤시엔느형이 발현되게 된다. 그러나 결손이 있더라도 reading frame이 유지될 경우에는 molecular weight가 작은, 부분적으로 결손된 비정상적인 단백질이 생성되게 되나 대개의 경우 단백질의 carboxyl-terminus가 유지되어 증상이 경미한 베커형이 나타나게 된다고 하였다<sup>3,10,11,22,32,38,52</sup>. 이러한 "reading frame" 법칙으로 3번에서 7번 exon의 결손, 45번 exon의 결손, 그리고 30개 이상의 exon의 결손이 있는 경우 등 일부의 경우를 제외한 약 92%의 환자들에서 두 질환의 감별진단이 가능하다고 하였다<sup>11,22,37,43</sup>.

본 연구에서는 뒤시엔느형과 베커형 근디스트로피의 감별진단은 목적이 아니었으므로 각각의 환자에서 reading frame의 보존여부 확인에 필요한 정확한 유전자 결손 범위를 파악하지는 않았다. 그러나 44번 exon과 51번 exon사이에 결손이 있었던 환자중 14가계의 15명의 환자에서는 본 연구의 결과만으로도 정확한 결손 범위의 파악이 가능하였다(12번에서 16번, 18번에서 21번, 33번에서 36번, 40번, 그리고 41번 환자). 이를 환자를 1993년 Roberts 등<sup>47</sup>이 작성한 79개 exon에 대한 각 exon 경계부의 위치를 참고로 하여 "reading frame" 법칙에 적용시켜 분류하여 보면 형제인 18번과 19번 환자, 20번 환자, 그리고 33번 환자는 베커형 근디스트로피였으며 나머지 환자는 뒤시엔느형 근디스트로피인 것을 알 수 있었다. 따라서 뒤시엔느형과 베커형 근디스트로피의 감별진단을 위해 정확한 결손 범위의 파악이 필요한 경우에는 중합효소 연쇄반응 결과 결손이 발견된 exon을 중심으로 추가적인 시발체를 합성하여 중합효소 연쇄반응을 실시하거나 cDNA probe를 사용하여 Southern hybridization을 진행시켜 나감으로서 효율적인 검사를 시행할 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 뒤시엔느형 혹은 베커형이 의심되는 한국인 환자에서는 17, 45, 49, 그리고 51번 exon에 대한 시발체를 사용하여 복합 중합효소 연쇄반응을 시행할 경우 유전자 결손이 있는 가계의 약 76.7%에서 결손을 찾아 낼 수 있으므로, 최초 복합 중합효소 연쇄반응 조합 구성시 이 4가지의 시발체를 포함하여 검사를 시행하고 검사 결과 결손이 발견되지 않을 경우 다른 exon에 대한 시발체를 사용하여 검사를 실시하며, 이러한 중합효소 연쇄반응에서 결손이 검색되지 않은 환자를 대상으로 cDNA probe를 사용하여 Southern hybridization을 시행하는 것이 유전자 결손을 확인을 위해서는 바람직한 방법이라고 할 수 있겠다. 또한 뒤시엔느형과 베커형의 감별진단을 위해 정확한 결손 범위의 파악이 필요할 경우에도 중합효소 연쇄반응 결과를 토대로 결손이 발견된 exon을 기준으로 cDNA probe를 사용하여 검사를 진행시켜 나감으로서 검사의 효율성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

한국인 뒤시엔느형 및 베커형 근디스트로피 환자에서 디스트로핀 유전자의 결손 양상을 알아보기 위해 임상적으로 뒤시엔느형 혹은 베커형 근디스트로피가 의심되는 80가계의 82명의 환자를 대상으로 중합효소 연쇄반응을 시행한 후 중합효소 연쇄반응에서 결손이 나타나지 않은 환자에서는 디스트로핀 유전자 cDNA subclone 4-5a probe를 이용하여 Southern hybridization을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 중합효소 연쇄반응에서 디스트로핀 유전자의 결손이 43명의 환자에서 발견되었으며, 형제가 같이 검사를 실시한 2가계의 형제간은 동일한 유전자 결손 양상을 보였다.

2) 가장 빈번하게 결손을 보였던 exon은 19가계의 20명의 환자에서 증폭되지 않았던 49번 exon이었다. 한 개의 exon이 결손된 경우가 27.9%(12/43)였으며, 두 개 이상의 exon이 결손된 경우가 72.1%(31/43)로서, 한 개 이상의 exon이 결손된 경우가 많았다. 디스트로핀 유전자의 5'단위부에서 결손의 보인 경우가 20.9%(9/43), 유전자 중간부의 결손을 보인 경우가 79.1%(34/43)로서 유전자 중간부위에서의 결손이

높은 빈도로 나타났다.

3) 중합효소 연쇄반응에서 결손을 보이지 않았던 환자중 cDNA 4-5a probe를 이용하여 Southern hybridization을 실시한 20명의 환자에서는 결손이 발견되지 않았다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 뒤시엔느형 혹은 베커형 근디스트로피가 임상적으로 의심되는 환자중 최소한 50%의 환자에서 조직 검사와 같은 침습적인 검사나 시간과 노력이 많이 드는 Southern hybridization을 시행하지 않고도, 소량의 DNA로 분석이 가능하고 검사가 신속하고 단순한 중합효소 연쇄반응을 이용하여 확진이 가능하며, 이를 토대로 적절한 유전상담이 가능하다고 할 수 있다. 복합 중합효소 연쇄반응의 시발체의 조합 구성시 exon 17, 45, 49, 51에 대한 시발체를 사용할 경우 유전자 결손 가계중 76.7%(33/43)에서 결손을 찾아 낼 수 있으므로, 이 4종의 시발체를 최초의 중합효소 연쇄반응에 포함시켜 검사를 시행하고, 검사결과 결손이 발견되지 않을 경우 다른 exon에 대한 시발체를 사용하여 검사를 실시하는 것이 효율적일 것으로 생각된다. 그리고 이러한 중합효소 연쇄반응에서 결손이 검색되지 않은 환자를 대상으로 cDNA probe 사용하여 Southern hybridization을 시행하는 것이 유전자 결손을 확인을 위해서는 바람직한 방법이라고 생각한다. 또한 뒤시엔느형과 베커형의 감별진단을 위해 정확한 결손 범위의 파악이 필요할 경우에도 중합효소 연쇄반응 결과를 토대로 결손이 발견된 exon을 기준으로 cDNA probe를 사용하여 검사를 진행시켜 나감으로서 검사의 효율성을 높일 수 있을 것으로 추정된다.

## 참 고 문 헌

- 1) 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 hybridization shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 1991; 28: 304-311
- 2) Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, Nonaka I, Sugita H, Arahata K: The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 1991; 41: 1491-

- 3) Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell BS, Caskey CT: Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989; 39: 465-474
- 4) Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86: 45-8
- 5) Beggs AH, Kunkel LM: Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990; 85: 613-619
- 6) Boyd Y, Buckle VJ: Cytogenic heterogeneity of translocations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 1986; 29: 108-115
- 7) Bronzova J, Todorova A, Kalayadjieva L: Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD-BMD families. *Hum Genet* 1994; 93: 170-174
- 8) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT: Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, New York, London: Academic Press 1990; p27, 2-281
- 9) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1141-56
- 10) Clemens PR, Ward PA, Caskey TC, Bluman DE, Fenwick RG: Premature chain termination mutation causing Duchenne's muscular dystrophy. *Neurology* 1992; 42: 1775-82
- 11) Darras BT, Harper JF, Francke U: Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1987; 316: 985-992
- 12) Darras BT, Blattner P, Harper JF, Spiro AJ, Alert S, Frabcke U: Introngenic deletion in 21 Duchenne muscular dystrophy(DMD)/Becker muscular dystrophy(BMD) families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglII exon containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 620-629
- 13) Darras BT, Francke U: Normal human genomic restriction-fragment patterns and polymorphism revealed by hybridization with the entire dystrophin cDNA. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 612-619
- 14) Darras BT, Koenig TM, Kunkel LM, Francke U: Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy using entire dystrophin cDNA. *Am J Med Genet* 1988; 29: 713-726
- 15) Darras BT: Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Pediatr* 1990; 117: 1-14
- 16) Den Dunnen JT, Bakker E, Klein-Breteler EG, Pearson PL, van Ommen GJB: Direct deletion of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. *Nature* 1987; 329: 640-642
- 17) Den Dunnen JT, Grootscholten PM, Bakker E, Blonden LAJ, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HMB, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJB: Topography of the Duchenne muscular dystrophy(DMD) gene: FISH and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 835-847
- 18) Emery AEH: *Duchenne muscular dystrophy*, 2nd ed, Oxford: Oxford Medical Publications 1993; p169-189
- 19) Emery AEH, Skinner R: Clinical studies in benign(Becker-type) X-linked muscular dystrophy. *Clin Genet* 1976; 10: 189-201
- 20) Engel AG, Yamamoto M, Fishbeck KH: Dystrophinopathies. In Engel AG, Franzini-Armstrong C: *Myology*, 2nd ed, New York: McGraw-Hill, Inc., 1994; p1130-1187
- 21) Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies KE: Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 1987; 329: 638-640
- 22) Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AHM, Thompson MW, Sutherland J, Oss I, Bodrug SE, Klamut HJ, Ray PN, Worton RG: Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy(DMD) gene. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 507-520
- 23) Gold R, Kress W, Meurers B, Meng G,

- Reichmann H, Muller CR: *Brief communication: Becker muscular dystrophy: Detection of unusual disease courses by combined approach to dystrophin analysis.* Muscle Nerve 1992; 15: 214-218
- 24) Hentemann M, Reiss J, Wagner M, Cooper DN: *Rapid detection of deletions in the Duchenne muscular dystrophy gene by PCR amplification of deletion-prone exon sequences.* Hum Genet 1990; 84: 228-232
- 25) Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, Harris JB: *Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing.* Neurology 1989; 39: 1011-1017
- 26) Hu X, Burghes AHM, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG: *Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophy.* J Med Genet 1988; 25: 369-376
- 27) Imoto N, Arinami T, Hamano K, Matsumura K, Yamada H, Hamaguchi H, Takita H: *Topographic pattern of the rearrangement of the dystrophin gene in Japanese Duchenne muscular dystrophy.* Hum Genet 1994; 92: 533-536
- 28) Ioannou P, Christopoulos G, Panayides K, Kleanthous M, Middleton L: *Detection of Duchenne and Becker muscular dystrophy carriers by quantitative multiplex polymerase chain reaction analysis.* Neurology 1992; 42: 1783-1790
- 29) Katayama S, Montano M, Slotnick RN, Lebo RV, Golbus MS: *Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy by restriction fragment length polymorphism analysis with pERT 87 deoxyribonucleic acid probes.* Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 548-55
- 30) Kingston HM, Sarfarazi M, Thomas MT, Harper PS: *Localization of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X-chromosome by linkage to cloned DNA sequences.* Hum Genet 1984; 67: 6-17
- 31) Kitoh Y, Matsuo M, Nishio H, takumi T, Nakajima T, Masumura T, Koga J, Nakamura H: *Amplification of ten deletion-rich exons of the dystrophin gene by polymerase chain reaction shows deletions in 36 of 90 Japanese families with Duchenne muscular dystrophy.* Am J Med Genet 1992; 42: 453-457
- 32) 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
- 33) Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scerpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Recan D, Chelly J, Kaolan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser G, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen JD, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Wrogemann K, Blonden LAJ, van Paassen HMB, van Ommen GJB, Kunkel LM: *The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion.* Am J Hum Genet 1989; 45: 498-506
- 34) Kunkel LM, Monaco P, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA: *Specific cloning of DNA fragments absent from DNA of a male with an X-chromosome deletion.* Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4778-4782
- 35) Laing NG, Mears ME, Chandler DC, Layton MG, Thomas HE, johson RD, Goldblatt J, Kakulas BA: *The diagnosis of Duchenne muscular dystrophies: two years' experience in a comprehensive carrier screening and prenatal diagnostic laboratory.* Med J Aust 1991; 154: 14-18
- 36) Lynch JR, Brown JM: *The polymerase chain reaction: current and future clinical applications.* J Med Genet 1990; 27: 2-7
- 37) Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow BM, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG: *Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy.* Science 1988; 242: 755-759
- 38) Miller G, Wessel HB: *Diagnosis of dystrophinopathies: Review for the clinician.* Pediatr Neurol 1993; 9: 3-9
- 39) Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM: *Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment.* Nature 1985; 316: 842-845

- 40) Monaco AP, Bertelson CJ, Gallati SL, Moser H, Kunkel LM: *An explanation for the genetic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.* Genomics 1988; 2: 90-95
- 41) Multicenter study group: *Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction.* JAMA 1992; 267: 2609-2615
- 42) Nicholson LVB, Johnson MA, Bushby MD, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, van Ommen GJ, Harris JB: *Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1trends across the clinical group.* J Med Genet 1993a; 30: 728-736
- 43) Nicholson LVB, Johnson MA, Bushby MD, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, van Ommen GJ, Harris JB: *Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3.differential diagnosis and prognosis.* J Med Genet 1993b; 30: 728-736
- 44) Nieman-Seyde S, Slomski R, Rininsland F, Ellermeyer U, Kwiatkowska J, Reiss J: *Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy.* Hum Genet 1992; 90: 65-70
- 45) Prior TW, Friedman KJ, Highsmith WE, Perry TR, Silverman LM: *Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies.* Clin Chem 1990; 36: 441-445
- 46) Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR: *Determination of the exon structure of the distal portion of the dystrophin gene by vectorrette PCR.* Genomics 1992; 13: 942-950
- 47) Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley: *Exon structure of the human dystrophin gene.* Genomics 1993; 16: 536-538
- 48) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GP, Mullis KB, Erlich HA: *Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science 1988; 239: 487-491
- 49) Shapiro F, Specht AL: *Current concepts review. The diagnosis and orthopedic treatment of inherited muscular diseases of childhood.* J Bone Joint Surg 1993; 75-a: 439-454
- 50) Shomart R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y: *Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients.* Am J Med Genet 1994; 49: 369-373
- 51) Soong BW, Tsai TF, Su Ch, Kao KP, Hsiao KJ, Su TS: *DNA polymorphisms and deletion analysis of the Duchenne-Becker muscular dystrophy gene in the Chinese.* Am J Med Genet 1991; 38: 593-600
- 52) Specht LA, Beggs AH, Korf B, Kunkel LM, Shapiro F: *Prediction of dystrophin phenotype by DNA analysis in Duchenne/Becker muscular dystrophy.* Pediatr Neurol 1992; 8: 432-436
- 53) Sugino S, Fujishita S, Kamimura N, Matsumoto T, Wapenaar MC, Deng HX, Shibuya N, Miike T, Niikawa N: *Molecular-genetic study of Duchenne and Becker muscular dystrophies: deletion analysis of 45 Japanese patients and segregation analyses in their families with RFLPs based on data from normal Japanese females.* Am J Med Genet 1989; 34: 555-561
- 54) Swash M, Schwartz MS: *Neuromuscular diseases. A practical approach to diagnosis and management, 2nd ed.* London: Springer-Verlag, 1988, pp 273-282
- 55) Tachi N, Tachi M, Sasaki K, Nagata N, Chiba S: *Dystrophin analysis in the differential diagnosis of autosomal recessive muscular dystrophy of childhood and Duchenne muscular dystrophy.* Pediatr Neurol 1990; 6: 265-268
- 56) Vanizof M, Pavanello RCM, Pavanello-Filho I, Rapaport D, Passos-Bueno MR, Zubrzycka-Gaarn, EE, Bulman DE, Zata M: *Screening of male patients with autosomal recessive Duchenne dystrophy through dystrophin and DNA studies.* Am J Med Genet 1991; 39: 38-41