

## 한국인 Marfan 증후군의 유전자 변이 분석

가천의과대학교 순환기내과학교실,<sup>1</sup> 연세대학교 심혈관연구소,<sup>2</sup>  
이화여자대학교 의과대학 순환기내과학교실,<sup>3</sup> 연세대학교 의과대학 심장내과학교실,<sup>4</sup> 홍부외과학교실<sup>5</sup>  
신미승<sup>1,2</sup> · 박현영<sup>2</sup> · 임양미<sup>2</sup> · 신길자<sup>3</sup> · 장양수<sup>2,4</sup> · 장병철<sup>2,5</sup> · 정남식<sup>2,4</sup>

### Identification of Molecular Defects in Korean Patients with Marfan Syndrome

Mi-Seung Shin, MD<sup>1,2</sup>, Hyun-Young Park, MD<sup>2</sup>, Yangmi Lim, PhD<sup>2</sup>, Gil-Ja Shin, MD<sup>3</sup>,  
Yangsoo Jang, MD<sup>2,4</sup>, Byung Chul Jang, MD<sup>2,5</sup> and Namsik Chung, MD<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Division of Cardiology, Gachon Medical School, <sup>2</sup>Yonsei Cardiovascular Research Institute,

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Ewha Womans University, <sup>4</sup>Division of Cardiology and

<sup>5</sup>Department of Thoracic Surgery, Yonsei University, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

**Background and Objectives** : Marfan syndrome is an autosomal dominant heritable disease of connective tissue which is characterized by cardinal features mainly in the cardiovascular, ocular and skeletal systems. Aneurysms or dissections of the aorta are the major cardiovascular complications of the disorder causing early mortality. Mutations in the fibrillin-1 (FBN1) gene on chromosome 15q21.1 have been found to be major causes of Marfan syndrome. The purpose of this study was to characterize the molecular defect in Korean Marfan patients, thus contributing to the effort of correlating the genotype with the phenotype. **Subjects and Methods** : We screened all 65 exons of the FBN1 gene in 14 subjects diagnosed as Marfan syndrome by the method of single strand conformation polymorphism-heteroduplex analysis. **Results** : We found mutations in only 10 among 14 patients. This study identified 8 novel mutations and 2 previously reported mutations in 14 Korean Marfan patients. Two cases were nonsense mutations and 8 were missense mutations, including 3 frameshift. Seven cases of the mutations occurred in one of the 43 calcium binding epidermal growth factor-like domains within an FBN1 gene. Mutations in Marfan patients occurred variably over the whole field of this FBN1 gene. **Conclusion** : Our results will contribute to the establishment of a database of Korean Marfan patients. Extending this study and using the database will help early detection of the disease and prevention of complications. (Korean Circulation J 2003;33 (11):1018-1027)

**KEY WORDS** : Marfan syndrome ; Fibrillin-1 ; Mutation.

## 서론

Marfan 증후군은 인구 10,000명 당 한 명 정도의 유

논문접수일 : 2003년 4월 30일

심사완료일 : 2003년 8월 20일

교신저자 : 박현영, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134

연세대학교 심혈관연구소

전화 : (02) 361-7350 · 전송 : (02) 365-1878

E-mail : hypark@yumc.yonsei.ac.kr

병률을 갖는 상염색체 우성 유전 질환으로 환자의 약 25%는 새로운 돌연변이에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.<sup>1)2)</sup> Marfan 증후군은 비교적 흔한 유전성질환으로 결체조직에 이상을 유발하여 심혈관계, 눈, 골격계에 특징적인 변화를 일으키며 대동맥 기시부의 확장 과 박리, 대동맥 파열, 대동맥 판막 폐쇄 부전증을 동반한 심부전 등이 조기 사망과 유병률을 초래한다.<sup>3)4)</sup>

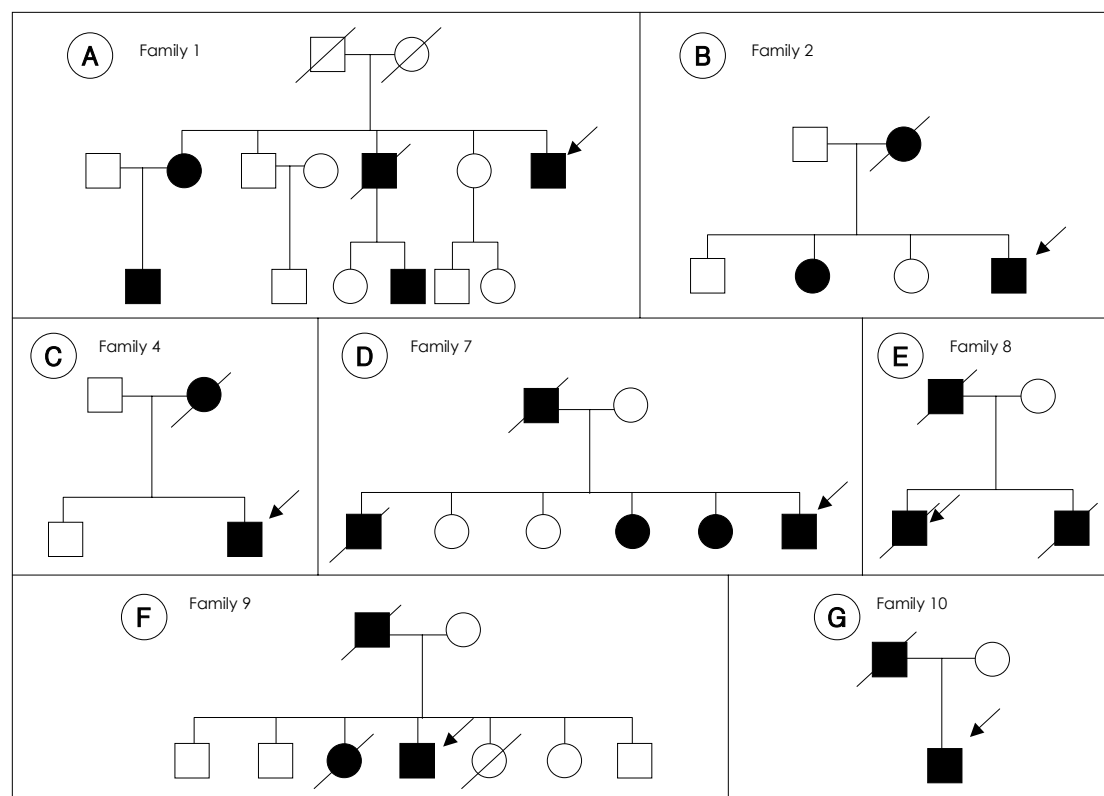
Marfan 증후군 환자들의 결체조직 단백질에 이상이

있다는 것이 발견된 후, 이를 발현시키는 유전자를 찾기 위해 많은 연구가 진행되었다. 1980년대에 fibrillin의 이상과 Marfan 증후군과의 관련성이 Sakai 등<sup>5)</sup>에 의해 처음으로 확인되었으며, 유전학적인 분석을 통해 15번 염색체의 장완에 위치하는 두 개의 유전 표식자들 사이에 존재하는 fibrillin-1(FBN1, MIM134797)가 Marfan 증후군과 직접적으로 관련이 있음이 증명되었다.<sup>6-8)</sup> 현재까지 Marfan 증후군 혹은 의심환자에서 약 430개에 달하는 FBN1 유전자내 돌연변이가 보고되었다. Fibrillin은 당단백질의 일종으로 엘라스틴(elastin)과 관련된 결합조직인 미세원섬유(microfibrils)의 주요 구성성분이며 미세원섬유는 대동맥, 골막(periosteum), 섬모 근육 소대(ciliary muscle zonules), 피부, 그 외의 Marfan 증후군에 포함된 다른 조직들에 특히 풍부하게 존재한다.<sup>9)</sup>

Marfan 증후군 환자들은 대개 심혈관계의 합병증인 대동맥 확장 및 파열에 의하여 사망하는데, 이들의

조기 발견과 예방적 치료로 사망률을 감소시킬 수 있어 이에 대한 조기 진단의 필요성이 높아지게 되었다.<sup>10)</sup> 그러나, Marfan 증후군 환자의 임상 양상이 개인에 따라 다양하게 나타나고 표현형의 발현시기에도 많은 차이를 보이고 있기 때문에 임상양상에만 의존하여 진단하는 것에는 한계가 있어 FBN1 유전자 돌연변이 분석을 통한 유전적 진단이 필요하다. Marfan 증후군의 주요 원인이 FBN1 유전자의 돌연변이에 의한다는 것은 이미 보고 되었으나 유전학적 진단은 최근에서야 활발히 이루어지고 있다.

본 연구의 목적은 한국인 Marfan 증후군 환자의 유전자 변이를 검색하여 분석함으로써 돌연변이의 특징을 알아내고자 하였다. 따라서 심장혈관계의 이상을 주증상으로 하는 14명의 Marfan 증후군 환자의 유전자를 분석하여 검색된 FBN1 유전자의 돌연변이 10가지를 보고하는 바이다.



**Fig. 1.** Pedigree of the Marfan patients with family history. Blackened symbols denote affected individual. The arrow indicates the proband.

## 대상 및 방법

### 대 상

1998년부터 2001년까지 대동맥확장 혹은 박리를 주소로 내원한 환자 중 Ghent Nasology에 준하여 Marfan 증후군으로 진단받거나 강력히 의심되는 환자 14명을 대상으로 하였다.<sup>11)</sup>

대상 환자들은 심장내과의 진료 기록을 검색해서 찾았으며 진단은 계보 발단자(proband)에서 확인하였고 이러한 상염색체 우성 유전의 50%의 위험을 갖는 일등친(first-degree relatives)을 중심으로 가능한 가족들을 신체검사, 심초음파 검사 및 안과적 검사를 통해 선별하였다. 가족이 사망하고 없는 경우에는 가족들의 진술에 의거하였다. 환자들의 가계도(Fig. 1)를 작성하였고 가족으로부터 유전학적인 검사를 허락 받은 가계에서는 DNA 표식자 검사를 통해 FBN1 유전자와의 연관성(linkage)을 확인 후 돌연변이 검색을 진행하였으며 정상 대조군 10명을 함께 분석하여 유전자다형성을 배제하였다.

### 방 법

#### 혈액채취 및 DNA 추출

환자에게 동의를 받은 후 주정맥에서 혈액 7 mL을 채취하여 EDTA가 첨가된 시험관에 DNA 분리 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. Wizard DNA preparation kit (Promega Co., Madison, Wisconsin, USA)를 이용하여 말초단핵구로부터 DNA를 추출하였다.

#### 유전자 변이 검색

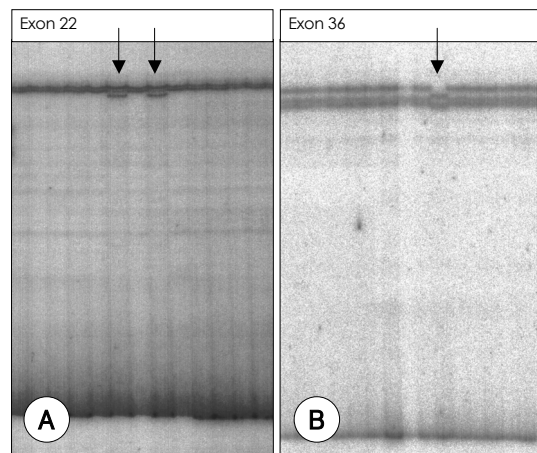
##### 유전자 증폭

15번 염색체에 있는 FBN1 유전자의 엑손 부위의 유전체 증폭을 위해 1995년 Nijbroek 등<sup>17)</sup>이 발표한 방법에 의한 시발체(primer)를 사용하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction ; PCR)으로 증폭시켰다. 시발체 중 하나를 T4 polynucleotide kinase(Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여  $[\gamma-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 와  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 이상 반응시켜 표지(end-labeling)하였다. 유전자 증폭은 50 ng의 genomic DNA,  $[\gamma-$

$^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 로 표지한 sense primer와 antisense primer를 각각 10 pmol, 62.5  $\mu\text{M}$ 의 dNTPs, 1.5 mM의  $\text{MgCl}_2$  그리고 0.4 units의 Taq polymerase와 반응완충용액 [50mM의 KCl, 10 mM의 Tris-HCl(pH 8.3)]을 포함하는 20  $\mu\text{L}$ 의 반응 혼합물을 증폭하였다. PCR은  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 두어서 DNA를 단일체로 변성(denaturation)시킨 후,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 변성,  $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 두어서 primer가 대상 DNA의 염기와 보합결합을 이루도록 재결합(annealing)시키고  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 두어서 primer가 Taq polymerase에 의해 신장(extension)되도록 하는 과정을 35회 반복시행하고, 마지막으로  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 신장시켰다.

#### Single strand conformation polymorphism(SSCP)-Heteroduplex analysis

PCR 산물에 변성용액(stop solution ; 95% formamide containing 20 mmol/L EDTA, 0.05% xylene cyanol)을 첨가 후  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 이상 변성시킨 후 일부 유전자 증폭 산물이 heteroduplex 형태를 이룰 수 있도록 실온에 10분간 방치 한 다음, 0.5% 돌연변이 검출 증진[Mutation Detection Enhancement (MDE)] 겔(gel) (FMC BioProducts Co., Rockland, Maine, USA)의 상부에 4  $\mu\text{L}$ 씩 부하(load)하였다. 전기영동은



**Fig. 2.** Mutation detection by SSCP-heteroduplex in Marfan patients. Single strand DNA has tendency to fold up an complex structure and the electrophoretic mobility of single strand DNA on non-denaturing gels depends on the length and the conformation. The arrows indicate the shifted bands on MDE gel suggesting the genetic variation.

실온에서 5 W의 일정 전류를 가하며 15~25시간동안 이루어졌다. 전기영동 후 겔을 건조시키고 phosphor-imaging plate reader (Bio-imaging analyzer system 2500®, Fuji Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 자가방사선상(autoradiograms)을 보고 전기영동상의 이동속도에 차이가 있는지를 분석하였다(Fig. 2). 이동속도에 차이가 있는 유전자 증폭 산물이 관찰되는 경우 변이 여부 및 변이의 위치를 파악하기 위하여 염기서열을 분석하였다.

#### 염기서열분석

SSCP-heteroduplex 분석 결과 전기영동상 이동속도에 차이를 보여 변이가 의심되었던 유전자 증폭 부위는 직접 염기서열분석 혹은 클로닝을 통해 염기서열을 분석하였다. 클로닝에 의한 염기 서열 분석은 엑손부위를 유전자 증폭 후 T cloning vector (pGEMT vector, Promega Co., Madison, Wisconsin, USA)에 삽입하고 T7 혹은 SP6 시발체를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

### 특징적인 임상양상 및 조직병리학 소견

FBN1 유전자 돌연변이가 검색된 10명의 Marfan 증후군 환자들의 임상 특징은 Table 1에서 보여주는 바와 같다. 모든 환자들은 대동맥 확장과 대동맥 판막 역류증이 심하거나 대동맥 박리의 소견을 보여 수술을 받았고 이 때 대동맥의 조직을 얻을 수 있어 조직병리학적 검사를 하였다. 대부분의 환자들은 유사한 병리학적 변화를

보였는데 탄력섬유(elastic fibers)의 손실 또는 심한 분절화 소견과 대동맥의 media 층에 acid mucopolysaccharide material이 침착되는 심한 낭성 증층 변성(cystic medial degeneration)의 소견을 보였다(Fig. 3).

### FBN1 유전자 돌연변이의 검색결과

본 연구에서 밝혀진 유전자 변이는 Fig. 4와 같으며 돌연변이의 명칭, 부위 등을 Table 2에 요약하였다. 발견된 돌연변이 중 R364X, R2776X 두 유전자변이는 이미 보고된 바 있으나(Universal Mutation Database, <http://www.umd.necker.fr>),<sup>2)</sup> 나머지 8가지 돌연변이는 본 연구에서 처음으로 밝혀진 것이었다. C1818S (G5453C) 유전자 변이의 경우 동일한 부위에 변이가 발견되었으나 기존의 변이는 C1818Y로 서로 다른 아미노산으로 치환된 경우이다.<sup>12)</sup> 변이 유형을 살펴보면 2에는 nonsense 돌연변이였고 8에는 missense 돌연변이로 이 중 3예가 G 염기 결손에 의한 frameshift를 유발하는 것이었다. 모든 돌연변이는 각각의 개체에 특징적이었으며 돌연변이의 위치는 칼슘 결합 표피 성장인자(calcium binding epidermal growth factor : cbEGF) 유사 영역에 7예로 가장 많았고, 형질전환 성장인자 beta 1(transforming growth factor-β1 ; TGF-β1)-결합 단백질 유사 영역에 1예, Fib motif 1예, 그리고 COOH의 특정 부위(COOH unique region)에 1예이었다. C1491A, C534R, C1818S, 7499delG의 돌연변이는 시스테인(cysteine)을 다른 아미노산으로 치환시켰고 각각 엑손 36, 13, 44, 60의 cbEGF 영역에서 일어났다.

**Table 1.** Clinical characteristics of 10 patients diagnosed as Marfan syndrome

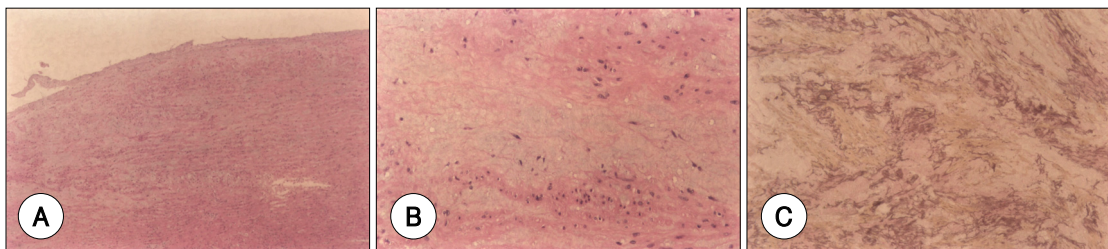
| Case | Age/sex   | Cardiovascular system | Skeletal system | Ocular system | Skin | Family history | Diagnosis         |
|------|-----------|-----------------------|-----------------|---------------|------|----------------|-------------------|
| 1    | 35/male   | M                     | m               | 0             | 0    | M              | Classic MFS       |
| 2    | 21/male   | M                     | m               | 0             | 0    | M              | Classic MFS       |
| 3    | 28/male   | M                     | m               | 0             | 0    | 0              | Highly suggestive |
| 4    | 21/male   | M                     | m               | 0             | 0    | M              | Classic MFS       |
| 5    | 31/male   | M                     | m               | 0             | 0    | 0              | Highly suggestive |
| 6    | 35/female | M                     | m               | M             | 0    | 0              | Classic MFS       |
| 7    | 24/male   | M                     | M               | M             | 0    | M              | Classic MFS       |
| 8    | 19/male   | M                     | m               | 0             | 0    | M              | Classic MFS       |
| 9    | 62/male   | M                     | 0               | m             | 0    | M              | Classic MFS       |
| 10   | 38/male   | M                     | m               | 0             | m    | M              | Classic MFS       |

M : indicates major involvement, m : minor involvement, 0 : not involved, MFS : Marfan syndrome

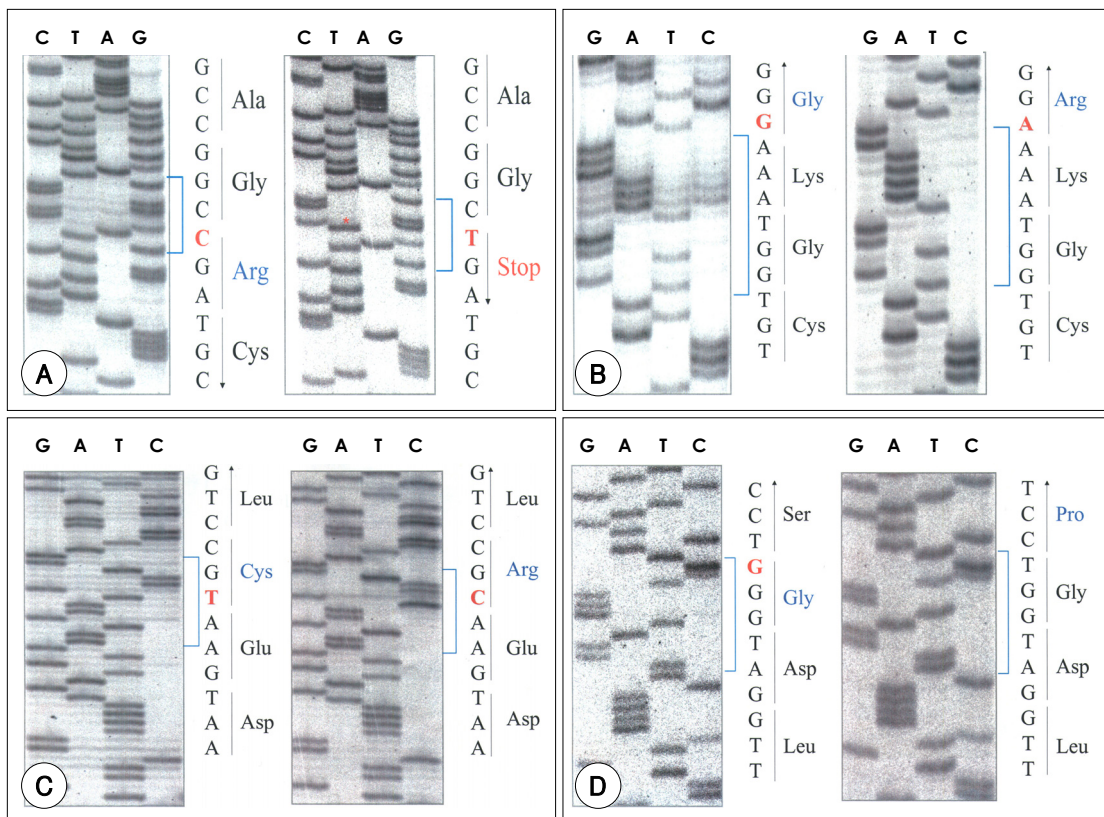
## 고 찰

Marfan 증후군은 여러 기관에 영향을 미치는 상염색체 우성 유전질환으로 특징적인 심장혈관계 이상은 근위부 대동맥의 확장과 대동맥 박리이다.<sup>3)</sup> 상행 대동맥류나 대동맥 박리의 가족력이 있는 경우 종종 Marfan 증후군의 특징적인 골격구조와 피부의 변화를 가지고 있어 Marfan 증후군을 의심하나 진단하기가 어려운 경우가 많다. 이는 Marfan 증후군 환자에서 표현형이 다양

하게 나타날 뿐 아니라,<sup>13)</sup> 동일 유전자변이를 가진 한 가족 내에서도 구성원들 사이에 표현형이 심한 이질성을 보이고 있기 때문이다. 더욱이, 20~30%의 높은 특발성은 진단의 어려움을 가중시킨다. 1996년 de Paepe 등<sup>11)</sup>에 의해 Marfan 증후군의 임상진단 기준이 강화되었는데 각 장기별 표현형을 major, minor로 나누고 가족력이 없는 경우 적어도 두 가지 장기이상에서 major 기준을 만족시키는 경우에 진단이 가능하다. 하지만, 심혈관계와 눈에서 특징적인 소견이 나타나지 않는 경우 뇌의 전산



**Fig. 3.** Typical pathologic findings of Marfan patients. A : H & E stain of histologic section of aorta at low power ( $\times 100$ ). B : H & E stain at high power ( $\times 400$ ) showing loss or fragmentation of elastic fibers and accumulation of pools of acid mucopolysaccharide material in the media (cystic medial degeneration). C : elastic van Gieson stain revealed highly fragmented elastic fibers and accumulation of acid mucopolysaccharide material in the media.







**Table 2.** The mutations of fibrillin-1 gene in 10 patients with Marfan syndrome

| Case | Exon | Nucleotide change | Amino acid substitution | Protein domain                    |
|------|------|-------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 1    | 9    | C1090T            | R364X                   | TGF $\beta$ 1-bp-like domain*     |
| 2    | 22   | G2695A            | G899R                   | Fib motif <sup>†</sup>            |
| 3    | 36   | T4471C            | C1491A                  | cbEGF-like motif #22 <sup>‡</sup> |
| 4    | 48   | Frameshift        | 5982delG                | cbEGF-like motif #30              |
| 5    | 60   | Frameshift        | 7499delG                | cbEGF-like motif #39              |
| 6    | 61   | Frameshift        | 7797delG                | cbEGF-like motif #40              |
| 7    | 13   | T1600C            | C534R                   | cbEGF-like motif #04              |
| 8    | 44   | G5453C            | C1818S                  | cbEGF-like motif #26              |
| 9    | 60   | A7507C            | T2503P                  | cbEGF-like motif #39              |
| 10   | 65   | C8326T            | R2776X                  | COOH unique region                |

\* : TGF  $\beta$  1-bp-like domain : transforming growth factor  $\beta$  1-binding protein-like domain, <sup>†</sup> : single cystein-rich sequence, <sup>‡</sup> : cbEGF-like motif #22 : calcium-binding epidermal growth factor-like motif #22

전자변이가 확인되어 유전학적인 진단이 필요함을 시사한다.<sup>14)</sup>

1991년 Dietz 등<sup>13)</sup>에 의해 Marfan 증후군 환자에게서 처음으로 FBN1 유전자의 돌연변이가 검색되었으며 상염색체 우성 유전의 경향을 보이는 키가 큰 가족을 대상으로 유전자를 분석한 결과에서도 Marfan 증후군이 FBN1 유전자와 관련됨을 보여 주었고 profibrillin 과정을 차단하는 돌연변이가 밝혀졌다.<sup>7)</sup> FBN 단백질은 347kD의 당단백질로 미세원섬유의 주요 성분이며 미세원섬유는 인간의 대부분의 조직과 기관에 존재하는 세포외 기질의 중요한 구성 성분이다. Marfan 증후군의 혈관 질환은 FBN1 유전자 변이가 미세원섬유의 결합(assembly)에 이상을 초래해서 탄력섬유의 성숙을 차단하거나 탄력섬유의 국소적인 분절화를 일으키고 대동맥 중막에 무정형의(amorphous) 기질이 축적될 때 일어나는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 본 연구의 대상 환자들에서도 이에 합당한 병리소견을 보여 주었다(Fig. 3). FBN 단백질은 주로 47개의 표피 성장인자(epidermal growth factor ; EGF)와 유사한 소단위체(subunit)들과 7개의 TGF- $\beta$ 1과 유사한 소단위체들로 구성되어 있는데, 이는 FBN 단백질과 세포외 기질의 다른 단백질과의 상호작용이 많이 존재함을 시사한다(Fig. 5).<sup>7)16)17)</sup> 또한 47개의 EGF 유사 영역(domain) 중에 43개는 칼슘과 결합할 수 있는 아미노산이 포함되어 있는데, 이들은 서로 이황화 결합을 형성하여 fibrillin polypeptide의 안정성에 기여한다.<sup>18)</sup> 돌연변이 중 가장 처음 검색되었고 가장 흔한 종류는 EGF 영역에서 시스테인과 시

스테인 사이의 결합에 중요한 역할을 하는 시스테인 중의 하나가 치환되어 발생한 것이다.<sup>14)19)</sup> FBN은 fibrillin-1과 fibrillin-2의 두 가지의 동종(homologous) 단백질로 존재하는데, 각각 15q21과 5q23 염색체에 있는 FBN1 유전자와 FBN2 유전자의 서로 다른 유전자에 의해 부호화(encode) 된다.<sup>5)20)</sup> FBN1 단백질은 신체에 널리 분포되는 10 nm 크기의 미세원섬유의 주요 성분이며 탄력섬유의 침착과 형성의 골격(scaffold)으로서 역할을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>5)</sup> 대동맥의 외막, 수정체의 지지인대, 피부 같은 어느 정도의 부하와 스트레스에 견뎌내야 하는 구조에 주로 존재한다. FBN2 단백질은 탄력소 형성에 중요하고 엘라스틴을 배향(orientation)시키고 연골, 대동맥의 중막, 기관지, 기타 엘라스틴이 풍부한 모든 조직에 주로 존재한다. 따라서 대동맥 같은 탄력성이 있는 동맥에서 FBN1 단백질은 동맥벽의 내막, 중막, 외막의 전체 3층에 모두 존재하며 FBN2 단백질은 중막에 집중되어 있다. 현재까지의 보고에 의하면 Marfan 증후군 환자의 대부분은 FBN1이상에 의하며 FBN2에 돌연변이가 발생한 경우 congenital contractural arachnodyly를 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>21)</sup>

인간의 FBN1 유전자는 110 kb에 이르고 65개의 exon으로 구성되어 있는데<sup>16)</sup> 이러한 심한 대립유전자의 비균질성(allelic heterogeneity)이 FBN1 유전자에서 새로운 돌연변이가 자주 일어나게 하는 원인이 되며 돌연변이가 FBN1 유전자 전반에 걸쳐 광범위하게 분포되어 있어 Marfan 증후군의 여러 가지 임상 양상을

나타나게 한다. 표현형의 다양성은 유전자의 비균질성과 대립유전자의 차이 때문이며, 이는 정상 FBN 단백질의 양적 감소에 의한 경한 형태와, 중합반응 기전의 변화에 의한 FBN의 비정상적인 구조로 인해 생긴 음성 우세성(negative dominance)을 보이는 심한 형태의 두 가지로 나타난다.

임상적으로 이상이 있을 것으로 의심이 되는 유전자 분석방법의 선택은 유전자내의 비균질성이나, 검사의 민감도, 가능한 검사 방법의 비용 등 여러가지 요인에 의해 영향을 받는다. 특정 유전자에서 돌연변이를 검색하기 위해서 SSCP, heteroduplex의 효소중내 절단법, 직접 염기서열 분석(direct sequencing), 최근에는 mass spectrophotometry, denaturing HPLC 등이 이용되고 있다. 본 연구에서는 SSCP-heteroduplex 방법을 이용하였는데, 기존의 SSCP에 일부 heteroduplex를 형성하게 한 후 전기영동을 하는 방법으로, 보고에 의하면 유전자 변이의 검출효율을 SSCP에 비해 높이는 것으로 보고되었다.<sup>22)</sup> 본 연구에서는 14명 중 10명의 환자에서 이 방법을 이용하여 돌연변이를 발견할 수 있었는데, 10명 중 1예만이 heteroduplex의 전기영동상 이동변화가 관찰되었고 나머지는 single strand에서 이동변화와 관찰되어 SSCP 분석에 비해 검색효율을 뚜렷하게 증가시키지는 못하였다. SSCP의 변이검출의 효율은 35~95%로 다양하게 보고되어 있다.<sup>23)24)</sup> SSCP-heteroduplex 방법으로 돌연변이를 발견할 수 없었던 4예의 환자들은 직접염기서열분석이나 denaturing HPLC 등의 효율이 높은 방법으로 분석을 진행하여야 할 것이다.

현재까지 약 430여개의 FBN1 유전자의 돌연변이가 보고 되었으며 이들은 주로 missense 돌연변이로 FBN1 유전자 전반에 걸쳐 많이 보이는 cbEGF 영역에 분포하였다.<sup>2)25)26)</sup> 본 연구에서도 10가지 중 7가지 돌연변이는 cbEGF 영역에 위치하였다. Marfan 증후군을 일으키는 돌연변이에 대한 연구들에 의하면, 대다수가 한 영역내에서 이황화 결합(disulfide linkage)에 변화를 일으키거나 단백질의 형태를 변화시키는 것으로 보인다.<sup>19)</sup> EGF 영역에서 칼슘 결합에 중요한 시스테인이나 아미노산에 영향을 주는 돌연변이 또는 전체 EGF영역의 삭제는 고전적인 Marfan 증후군의 표현형을 나타낸다.<sup>27)</sup> 본 실험결과도 cbEGF영역에서 시스테인의 치환이 Mar-

fan 증후군의 표현형을 초래했다는 것을 보여주었다. 본 연구에서 cbEGF 유사 영역에 있는 7가지의 돌연변이 중 3예는 G 염기 삭제에 의한 frameshift로 변이부위 이후에 전체적인 단백질 구조의 변화를 일으켜 fibrillin의 기능이상을 초래한다. Universal Mutation Database의 자료를 근거로 할 때 FBN1 돌연변이 중 frameshift의 빈도는 약 16%이며, 심혈관계증상이 주증상인 경우에도 17%임에 고려할 때, 본 연구에서는 다소 높은 빈도에서 발견되었다. 돌연변이는 아미노산의 변화양상에 따라 missense, frameshift를 포함하는 nonsense, splicing 변이 등으로 분류할 수 있는데, 현재까지는 이러한 유형과 Marfan 증후군의 표현형간의 상관관계는 없는 것으로 보고되었다.<sup>28)</sup> 한국인에서도 6개의 유전자변이가 보고되었는데 모두 새로이 발견된 돌연변이였으며, 이 중 1개의 frameshift가 관찰되었다.<sup>29)</sup> 실제 한국인에서 frameshift의 빈도가 증가되어 있는지를 알기 위해서는 더 많은 환자들을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

유전성 질환에 있어 유전자 분석의 가장 적절한 활용은 어떤 개인이 그 가족 구성원에서 보이는 것과 같은 임상 증상을 나타낼 위험을 가지고 있는지를 결정하는 것이다. 유전자 분석을 통해 환자는 증상이 나타나기 전이나 태어나기 전에 진단을 받음으로써 도움을 받을 수 있는데, Marfan 증후군과 같은 질환에서의 조기 진단은 대동맥 벽의 부하를 줄임으로써 대동맥확장을 지연시키거나 대동맥류나 대동맥 박리의 수술적 치료를 조기에 받을 수 있게 함으로써 유병기간의 단축이나 생명연장을 기대할 수 있다.

결론적으로 본 연구는 SSCP-heteroduplex 분석을 이용하여 14명의 한국인 Marfan 증후군 환자에서 8가지의 새로운 돌연변이와 2개의 이미 보고된 돌연변이를 알아내었다. 본 연구 결과는 한국인 성인 Marfan 증후군 환자의 유전적 분석결과가 부족한 현 상황에서 이들의 유전적 정보 구축에 기여할 것이며, 이 연구를 확장하여 더욱 많은 환자에게 적용시키고 그 결과를 이용한다면 환자나 그 가족에서 Marfan 증후군의 조기 진단이 가능하고, 이미 진단 받은 환자를 대상으로 심초음파 검사를 포함한 단기 추적 검사와 베타 차단제의 약물을 사용하여 대동맥 확장의 진행을 지연시키는 등 합병증 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.



## 요 약

### 배경 및 목적 :

Marfan 증후군은 심장혈관계, 눈, 골격계의 변화를 일으키는 상염색체 우성 유전 질환이며 조기 사망을 가져오는 주요 원인은 상행 흉부 대동맥의 동맥류나 박리 또는 대동맥 파열 등 심장혈관계의 합병증이다. 1991년 Marfan 증후군 환자에서 처음으로 FBN1 유전자의 돌연변이가 검출된 이후로 현재까지 430여개 이상의 FBN1 유전자의 돌연변이가 보고되었다. 본 연구의 목적은 한국인 Marfan 증후군 환자에서 유전자 변이를 특장지어 유전적 정보구축에 기여하고 유전형과 표현형을 연관짓는데 도움을 주고자 하였다.

### 방 법 :

Marfan 증후군으로 진단받은 14명의 환자에서 임상적 특성의 분석과 함께 이들의 심장혈관계 합병증을 진단하기 위해 심초음파 검사를 시행하여 상행 대동맥의 직경을 측정하였고 동맥류나 대동맥 박리의 유무를 확인하였다. 또한 가계도 검사를 하여 가족력의 유무를 확인하였다. 돌연변이 검색은 분리한 DNA로 FBN1 유전자의 65 엑손을 증폭 후 단일쇄 형태변환 다형성 분석(single strand conformational polymorphism(SSCP) - heteroduplex analysis)을 이용하여 검사하였다.

### 결 과 :

10명의 환자 중 7명은 가족력이 있었으며 3명은 특발성인 경우였다. 두 명의 환자는 nonsense 돌연변이였고 8명의 환자는 frameshift를 포함하는 missense 돌연변이였으며, 10가지 돌연변이 중 8가지는 새로 발견된 돌연변이였다. 10가지 돌연변이 중 7가지는 FBN1 유전자의 43 cbEGF 영역에서 발견되었다. 그 외에 TGF- $\beta$ 1 결합 단백질 유사 영역, Fib motif, COOH의 특정 부위에서 각각 1가지씩 발견되었다. 본 연구에서 발견된 돌연변이들은 FBN1 유전자 전반에 걸쳐 다양하게 나타났으며 대부분은 missense 돌연변이였고 frameshift 돌연변이가 높은 비율로 나타났다.

### 결 론 :

본 연구는 10명의 한국인 Marfan 증후군 환자에서 8가지의 새로운 돌연변이를 발견하였는데 이러한 결과는 한국인 Marfan 증후군 환자의 유전적 정보 구축에 기여할 것이며 이를 확대시키고 그 결과를 활용한다면 Marfan 증후군 환자의 조기 진단과 단기 추적 관찰을

통한 합병증 예방에도 도움을 줄 것이다.

**중심 단어 :** Marfan 증후군 ; fibrillin-1 ; 돌연변이.

### ■ 감사문

본 연구를 수행하는데 있어 도움을 주신 김지영, 황은경씨에게 감사를 드립니다.

본 연구는 연세의대 심혈관연구소 연구비 및 보건 의료유전체연구개발사업(HNP-00-GN-01-0001)의 지원으로 이루어짐.

## REFERENCES

- 1) Pyeritz RE, McKusick VA. *The Marfan syndrome: diagnosis and management. N Engl J Med* 1979;300:772-7.
- 2) Collod-Beroud G, Beroud C, Ades L, Black C, Boxer M, Brock DJ, Holman KJ, de Paepe A, Francke U, Grau U, Hayward C, Klein HG, Liu W, Nuytinck L, Peltonen L, Perez AB, Rantamaki T, Junien C, Boileau C. *Marfan database (third edition): new mutations and new routines for the software. Nucleic Acids Res* 1998;26:229-3.
- 3) Pyeritz RE. *The Marfan syndrome. In: Royce PM, Steinmann B, editors. Connective Tissues and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects. New York: Wiley-Liss: 1993. p.437-68.*
- 4) Pepe G, Giusti B, Attanasio M, Comeglio P, Porciani MC, Giurlani L, Montesi GF, Calamai GC, Vaccari M, Favilli S, Abbate R, Gensini GF. *A major involvement of the cardiovascular system in patients affected by Marfan syndrome: novel mutations in fibrillin 1 gene. J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1877-84.
- 5) Sakai LY, Keene DR, Engval E. *Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. J Cell Biol* 1986;103:2499-509.
- 6) Kainulainen K, Pulkkinen L, Savolainen A, Kaitila I, Peltonen L. *Location on chromosome 15 of the gene causing Marfan syndrome. N Engl J Med* 1990;323:935-9.
- 7) Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curreistin SM, Stetten G, Meyers MA, Francomano CA. *Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. Nature* 1991;352:337-9.
- 8) Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsiouras P, Ramirez F, Hollister DW. *Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin gene. Nature* 1991;352:330-4.
- 9) Hollister DW, Godfrey M, Sakai LY, Pyeritz RE. *Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome. N Engl J Med* 1990;323:152-9.
- 10) Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL, Kuzma JW, McKusick VA. *Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. N Engl J Med* 1972;286:804-8.
- 11) de Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC, Pyeritz RE. *Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. Am J Med Genet* 1996;62:417-26.
- 12) Perez AB, Pereira LV, Brunoni D, Zatz M, Passos-Bueno MR. *Identification of 8 new mutations in Brazilian families with Marfan syndrome. Hum Mutat* 1999;13:84.

- 13) Dietz HC, Pyeritz RE. *Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. Hum Mol Genet 1995;4:1799-809.*
- 14) Loeys B, Nuytinck L, Delvaux I, de Bie S, de Paepe A. *Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. Arch Intern Med 2001;161:2447-54.*
- 15) Ramirez F, Pereira L. *Mutation of extracellular matrix components in vascular disease. Ann Thorac Surg 1999;67:1857-8.*
- 16) Pereira L, D'Alessio M, Ramirez F, Lynch JR, Sykes B, Pangilinan T, Bondadio J. *Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. Hum Mol Genet 1993;2:961-8.*
- 17) Nijbroek G, Sood S, McIntosh L, Francomano CA, Bull E, Pereira L, Ramirez F, Pyeritz RE, Dietz HC. *Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. Am J Hum Genet 1995;57:8-21.*
- 18) Karttunen L, Raghunath M, Lonnqvist L, Peltonen L. *A compound-heterozygous Marfan patient: two defective fibrillin alleles result in a lethal phenotype. Am J Hum Genet 1994;55:1083-91.*
- 19) Dietz HC, Saraiva JM, Pyeritz RE, Cutting GR, Francomano CA. *Clustering of fibrillin (FBN1) missense mutations in Marfan syndrome patients at cysteine residues in EGF-like domains. Hum Mutat 1992;1:366-74.*
- 20) Zhang H, Apfelroth SD, Hu W, Davis EC, Sanguineti C, Bonadio J, Mecham RP, Ramirez F. *Structure and function of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. J Cell Biol 1994;124:855-63.*
- 21) Maslen C, Babcock D, Raghunath M, Steinmann B. *A rare branch-point mutation is associated with missplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly. Am J Hum Genet 1997;60:1389-98.*
- 22) Yuan B, Thomas JP, von Kodolitsch Y, Pyeritz RE. *Comparison of heteroduplex analysis, direct sequencing, and enzyme mismatch cleavage for detecting mutations in a large gene, FBN1. Hum Mutat 1999;14:440-6.*
- 23) Michud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G. *Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutation in human ornithine delta-aminotransferase gene. Genomics 1992;13:389-94.*
- 24) Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. *The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 1993;16:325-32.*
- 25) Peres AB, Pereira LV, Brunoni D, Zatz M, Passos-Bueno MR. *Identification of 8 new mutations in Brazilian families with Marfan syndrome. Hum Mutat 1999;13:84.*
- 26) Matsukawa R, Iida K, Nakayama M, Mukai T, Okita Y, Ando M, Takamoto S, Nakajima N, Morisaki H, Morisaki T. *Eight novel mutations of the FBN1 gene found in Japanese patients with Marfan syndrome. Hum Mutat 2001;17:71-2.*
- 27) Child AH. *Marfan syndrome-current medical and genetic knowledge: how to treat and when. J Card Surg 1997;12 (Suppl):131-5.*
- 28) Hayward C, Brock DJ. *Fibrillin-1 mutation in Marfan syndrome and other type-1 fibrillinopathies. Hum Mutat 1997;10:415-23.*
- 29) Oh MR, Kim JS, Beck NS, Yoo HW, Lee HJ, Kohsaka T, Jin DK. *Six novel mutations of the fibrillin-1 gene in Korean patients with Marfan syndrome. Pediatr Int 2000;42:488-91.*