

한국인 퇴행성 뇌질환 환자 및 정상 대조군에서 관찰되지 않는 Tau 유전자의 H2 일배체형과 Saitohin 유전자 Q7R 다형성

진희진 · 안수정 · 김윤중

한림대학교 일송생명과학연구소
한림대성심병원 신경과

Lack of H2 Haplotype of MAPT and Saitohin Q7R Polymorphism in Korean Neurodegenerative Disorders Patients and Controls

Heejin Jin, B.S., Soo-Jeong Ahn, M.S., Yun Joong Kim, M.D.

ILSONG Institute of Life Science, Hallym University, Department of Neurology, Hallym University Sacred Heart Hospital, Anyang, Korea

Background: Tau gene (MAPT) is implicated in several neurodegenerative disorders. Recently Saitohin gene located within intron 9 of MAPT was identified. It is controversial whether Q7R polymorphism of the Saitohin gene is overrepresented in Alzheimer's disease or in Progressive supranuclear palsy, and allelic frequencies vary considerably depending on ethnic groups. **Methods:** We analyzed MAPT haplotype and Saitohin Q7R polymorphism in Parkinson's disease, Progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease to investigate whether MAPT haplotype and/or Q7R polymorphism of the Saitohin gene is associated with neurodegenerative disorders in Korean population. A case-control association study comparing genotype and allelic frequencies was done in thirty four Parkinson's disease, eleven Alzheimer's disease, eight Progressive supranuclear palsy, and one hundred healthy control subjects. MAPT haplotype and Q7R polymorphism of the Saitohin gene was determined by PCR and restriction digestion of PCR products. **Results:** Unlike other reports in Western countries, MAPT haplotype was H1/H1 in all samples tested, and neither Q7R polymorphism of Saitohin gene, nor H2/H2 haplotype was identified. **Conclusion:** These findings suggest that interpretation of H1/H1 haplotype in diagnosing a neurodegenerative disorder should be cautious depending on ethnic groups.

Key Words: *Tau, Haplotype, Saitohin, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Progressive supranuclear palsy*

Address for correspondence

Yun Joong Kim, M.D.
ILSONG Institute of Life Science, Hallym University,
Department of Neurology, Hallym University
Sacred Heart Hospital, ILSONG B/D, 1605-4
Gwanyang-dong, Dongan-gu, Anyang 431-060,
Korea
Tel: +82-31-380-1666
Fax: +82-31-388-3427
E-mail: yunkim@hallym.ac.kr

*본 논문은 2003년도 학술진흥재단의 지원에
의하여 이루어졌음(KRF-2003-003-E00185).

서 론

유전성 치매 환자에서 원인 유전자로 tau 유전자(MAPT)의 변이가 확인된 이후[1], MAPT의 변이나 유전자 다형성과 퇴행성 뇌질환과의 상관 관계에 관한 관심이 증대되고 있다[2-4]. 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy)와 파킨슨병 환자에서 MAPT의 일차 일배체형(primary haplotype)인 H1은 H2에 비하여 더 흔히 나타나는 것으로(overrepresented) 보고되었다 [2,4]. Saitohin 유전자는 단일 exon으로 이루어진 유전자로서 크기가 387 염기쌍(base pair, bp)이며 MAPT의 9번째 intron 내에 존재한다. 최근 Saitohin 단백질의 7번째 아미노산이 글루타민(glutamine, Q)에서 아르기닌(arginin, R)으로 치환된 유전자 다형성이 알츠하이머병과 관련이 있다고 보고되었다[3]. 그러나 후속 보고들에 따르면 인종적 배경에 따라 유

전자형 빈도의 차이를 보이고, 치매와의 상관관계에 관한 결과도 일정치 않다[6-14]. 이에 본 연구자는 한국인을 대상으로 MAPT의 일배체형과 파킨슨병, 진행성 핵상마비 및 알츠하이머병 등의 퇴행성 뇌질환 간의 상관관계를 연구하였다.

대상 및 방법

2003년 4월부터 2004년 12월 사이 한림대학교 성심병원 신경과에 내원하여 파킨슨병, 진행성 핵상마비, 알츠하이머병으로 진단된 환자와 한림대 성심병원 건강검진센터에 내원하여, 정기 건강 검진상 이상이 없는 정상 대조군을 대상으로 유전자 분석을 하였다. 모든 대상 환자와 대조군은 한국인이었다. 모든 파킨슨병 환자는 UK Parkinson's disease Society Brain Bank cri-

teria의[15] definite clinical PD의 진단기준을 만족하였고, 레보도파(levodopa)에 의하여 파킨슨병 증상이 호전되었다. 알츠하이머병은 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) 진단 기준에서[16] probable인 경우를 알츠하이머병으로 진단하였다. 진행성 핵상마비는 National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Society for Progressive Supranuclear Palsy (NINDS-SPSP) 진단 기준에 따라[17] probable인 경우를 진행성 핵상마비로 진단하였다. 대표적인 tauopathy 질환인 전두측두엽 치매의 경우 대상 환자 수가 적어서 분석에서 제외하였다.

정상 대조군과 퇴행성 뇌질환의 진단명에 대한 정보가 없는 검사가 DNA 유전체(genomic DNA)를 DNA 추출 kit (QIAmp blood kit, Qiagen)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 환자의 말초혈액으로부터 추출하여 유전자 분석에 사용하였다. MAPT 일배체형 분석은 이전의 보고 방법에 따라 하였다[5]. 요약하면 DNA 표본을 시발체 세트(primer set)인 sense primer (5'-GG-AAGACGTTCTCACTGATCTG-3')와 antisense primer (5'-AGGAGTCTGGCTTCAGTCTCTC-3')를 사용하여 GeneAmp PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)으로 증폭시켰다.

다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 하였고 그 크기에 따라서 MAPT의 일배체형을 판별하였는데, PCR 산물의 크기가 484 bp인 경우를 H1 haplotype으로 판별하였고, 9번째 intron에 238 bp의 결실(deletion)에 의하여 246 bp 산물이 나오는 경우를 H2로 판별하였다[5]. Saitohin 유전자의 Q7R 변이는 이전의 보고와 같은 방법으로 분석하였다 [7]. Sense primer (5'-CCAAGTTCAGTTGCCATCTCC-3')와 antisense primer (5'-CTCTTGTGCATGGACCCTGTA-3')를 이용하여, PCR 혼합물을 95°C에서 60초 동안 변성시키고 62°C에서 90초 동안 아닐링(annealing)한 다음, 72°C에서 60초 동안 연장 반응을 시행하는 과정을 35회 반복하여 791 bp의 생성물을 얻었다. 증폭된 PCR 산물에서 Q7R 변이의 유무는 제한효소 HinfI (Promega)로 분해하여 확인하였다. Q allele이 있는 경우 PCR 산물은 4개의 HinfI 부위에서 절단되어 261, 243, 194, 54 그리고 39 bp의 다섯 단편으로 분해된다. 반면 R allele을 가진 경우는 새로운 제한효소 절단부위가 생성되고 194 bp의 단편은 두 개의 97 bp 조각으로 절단되게 된다(Fig. 1). HinfI에 의하여 분해된 단편은 2% agarose gel로 전기 영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 유전자형을 관찰하였다. 유전적 상관관계의 연구는 Fisher exact test를 이용하여 검증하였다.

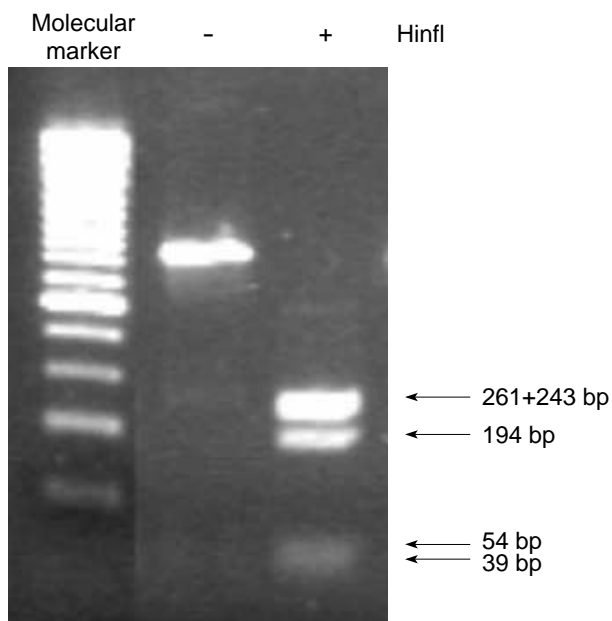


Fig. 1. Restriction digestion of PCR products using HinfI for the analysis of Saitohin Q7R polymorphism. PCR products including Q allele have four HinfI restriction sites resulting in five fragments (261, 243, 194, 54, 39 bp). 261 bp and 243 bp fragments which are overlapped on this gel was separated after extended running (data not shown). 54 bp 39 bp fragments which were obvious initially became faint because of small size and prolonged running. 97 bp fragment which appears only in the presence of R allele because of a new HinfI site is not seen on this gel.

결 과

파킨슨병 환자는 34명(남자 14명, 여자 20명)이었고, 평균 연령은 67.48 ± 8.14 (범위 52-82세)이었다. 파킨슨병 환자 중 2명은 파킨슨병의 가족력이 있었다. 알츠하이머병 환자는 11명(남자 6명, 여자 5명)이었고, 평균 연령은 75.82 ± 9.15 (범위 63-88세)이었다. 한국판 축약형 인지기능검사(Korean version of Mini-Mental State Examination, K-MMSE)는 17.27점 (범위 10-24), Clinical Dementia Rating (CDR)은 1.55 ± 0.65 (범위 0.5-2)이었다. 진행성 핵상마비 환자는 8명(남자 6명, 여자 2명)이었고, 평균연령은 68.13 ± 7.28 이었다. 100명의 정상 대조군은 남자 25명, 여자 75명이었고, 평균연령은 46.09 ± 4.57 이었다.

유전자 검사상 모든 대상 환자에서 MAPT 일배체형이 H1/H1이었으며, Saitohin의 유전형은 QQ이었다. 대조군에서도 역시 MAPT 일배체형은 모두 H1/H1이었으며, Saitohin의 유전형은 QQ이었다.

고 찰

본 연구 결과에 따르면 모든 한국인은 MAPT의 일배체형이 H1/H1이며, Saitohin 유전자의 7번째 아미노산 잔기는 글루타민(glutamine, Q)이다. MAPT의 H1 일배체형의 빈도가 퇴행성 뇌질환 환자에서 높다는 사실은 Conrad (1997) 등이 백인

(Caucasian) 진행성 핵상마비 환자를 대상으로 상관관계를 처음 보고 함으로써 관심을 가지게 되었다[2]. 이와 같은 관계는 후속 연구들에서 재확인 되었고[5, 18, 19], 특히 H2/H2 일배체형은 진행성 핵상마비 환자에서 매우 드물고, 따라서 MAPT의 H1 일배체형이 없는 환자는 진행성 핵상마비가 아닐 가능성이 높다고 한다[20]. 파킨슨병과 MAPT의 H1 일배체형과의 상관관계는 미약하거나(odds ratio, <2)[4, 21-23], 관계가 없다고 보고되었다[24]. 알츠하이머병과 MAPT의 일배체형 간에는 대부분의 연구에서 상관 관계가 없는 것으로 보고하였다[25-27]. 이들 연구 결과들 간의 차이는 연구대상 환자의 인종적 배경이 다르거나, 연구 대상 표본의 수가 작아서 발생하였을 가능성이 있다. 지금까지 보고되고 있는 MAPT 일배체형이나 Saitohin Q7R 다형성에 관한 연구에서 H1 일배체형의 유전형 빈도는 보고에 따라 56%에서 100%까지 차이를 보이는데 이것은 연구 대상 집단의 인종적 배경에 기인한다고 생각된다. 특히 최근 H2 일배체형이 백인에서만 특이적으로 존재하는 유전형이라는 최근 보고는 이와 같은 가설을 뒷받침 한다[28]. 본 연구결과에 따르면 한국인은 대조군과 질환군에서 모두 동일한 일배체형을 가지고 있으므로 한국인에서 MAPT 일배체형과 퇴행성질환과의 상관관계를 증명하거나 MAPT의 일배체형을 진단에 응용할 수는 없다고 생각된다.

Saitohin 유전자는 MAPT의 9번째 intron에 존재하는 단일 exon으로 이루어진 유전자이다. 흥미롭게도 Saitohin 유전자를 포함하는 MAPT의 일배체형은 17번 염색체의 17q21.31 부위의 2Mb 영역에서 염색체간의 교차(cross-over)가 일어나지 않는 것으로 밝혀졌다[29]. 따라서 Saitohin 유전자의 Q7R 유전자 다형성은 MAPT 내의 다른 single nucleotide polymorphism (SNP)들과 마찬가지로 MAPT 일배체형과 완전한 연관불균형(complete linkage disequilibrium) 상태에 있는 것으로 보고되어 왔는데[3, 9, 14], 본 연구결과도 이와 같은 사실을 시사한다.

특정 인종에서 MAPT의 H1 일배체형이 일부 퇴행성 뇌질환과 상관관계가 있는 것으로 보이나, 과연 이들이 퇴행성 뇌질환의 발병기전에 어떻게 관여하는지 여부에 관하여 거의 알려진 바가 없다. MAPT의 돌연변이가 tau 단백질의 isoform 간의 비율(3-repeat tau와 4-repeat tau간의 비율)을 변화시키는 것으로 알려졌으나[30], MAPT의 특정 일배체형은 이들 isoform간의 비율 변화와는 무관한 것으로 밝혀졌다[31]. 최근에는 H2 보다 H1 일배체형에서 tau 단백질의 발현이 증가 되는 것이 증명되었고, 결국 이것이 tau 단백질의 축적과 관련이 있는 것으로 추정하고 있다[32].

이와 같은 사실들을 종합하여 볼 때, MAPT의 H1 일배체형이 인종에 따라서 진행성 핵상마비 환자에서 의미 있는 유전적 배경일 수는 있으나, 이러한 유전형의 진단적 가치는 인종적 배경에 따라서 한계가 있으므로 유전자 검사를 해석할 때 주의하여야 한다고 생각된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 많은 도움을 주신 한림대학교 한림대성심병원 신경과 스텝과 전공의 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5-prime-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393: 702-5.
2. Conrad C, Andreadis A, Trojanowski JQ, Dickson DW, Kang D, Chen X, et al. Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1997; 41: 277-81.
3. Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Nat Acad Sci* 2002; 99: 7751-6.
4. Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. *JAMA* 2001; 286: 2245-50.
5. Baker M, Litvan I, Houlden H, Adamson J, Dickson D, Perez-Tur J, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 711-5.
6. Peplonska BC, Zekanowski C, Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Pfeffer A, et al. Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in the Polish population. *Neurosci Lett* 2003; 348: 163-6.
7. De Silva R, Hope A, Pittman A, Weale ME, Morris HR, Wood NW, et al. Strong association of the Saitohin gene Q7 variant with progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2003; 61: 407-9.
8. Oliveira SA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Small GW, Schmechel DE, et al. The Q7R Saitohin gene polymorphism is not associated with Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 2003; 347: 143-6.
9. Clark LN, Levy G, Tang MX, Mejia-Santana H, Ciappa A, Tycko B, et al. The Saitohin 'Q7R' polymorphism and tau haplotype in multi-ethnic Alzheimer disease and Parkinson's disease cohorts. *Neurosci Lett* 2003; 347: 17-20.
10. Combarros O, Rodero L, Infante J, Palacio E, Llorca J, Fernandez-Viadero C, et al. Age-dependent association between the Q7R polymorphism in the Saitohin gene and sporadic Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 16: 132-5.
11. Zekanowski C, Peplonska B, Styczynska M, Gustaw K, Kuznicki J, Barcikowska M. Mutation screening of the MAPT and STH genes in Polish patients with clinically diagnosed frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 16: 126-31.
12. Streffer JR, Papassotiropoulos A, Kurosinski P, Signorell A, Wollmer MA, Tzolaki M, et al. Saitohin gene is not associated with Alzheimer's

- disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 362-3.
13. Verpillat P, Ricard S, Hannequin D, Dubois B, Bou J, Camuzat A, et al. Is the *saitohin* gene involved in neurodegenerative diseases? *Ann Neurol* 2002; 52: 829-32.
 14. Cook L, Brayne CE, Easton D, Evans JG, Xuereb J, Cairns NJ, et al. No evidence for an association between *Saitohin* Q7R polymorphism and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 52: 690-1.
 15. Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 1992; 42: 1142-6.
 16. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
 17. Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin RC, et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 1996; 47: 1-9.
 18. Di Maria E, Tabaton M, Vigo T, Abbruzzese G, Bellone E, Donati C, et al. Corticobasal degeneration shares a common genetic background with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2000; 47: 374-7.
 19. Ezquerro M, Pastor P, Valldeoriola F, Molinuevo JL, Blesa R, Tolosa E, et al. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the *tau* gene highly associated to progressive supranuclear palsy in humans. *Neurosci Lett* 1999; 275: 183-6.
 20. Josephs KA, Dickson DW. Diagnostic accuracy of progressive supranuclear palsy in the Society for Progressive Supranuclear Palsy brain bank. *Mov Disord* 2003; 18: 1018-26.
 21. Maraganore DM, Hernandez DG, Singleton AB, Farrer MJ, McDowell SK, Hutton ML, et al. Case control study of the extended *Tau* gene haplotype in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2001; 50: 658-61.
 22. Golbe LI, Lazzarini AM, Szychala JR, Johnson WG, Stenroos ES, Mark MH, et al. The *Tau* A0 allele in Parkinson disease. *Mov Disord* 2001; 16: 442-7.
 23. Pastor P, Ezquerro M, Munoz E, Marti MJ, Blesa R, Tolosa E, et al. Significant association between the *tau* gene A0/A0 genotype and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 242-5.
 24. de Silva R, Hardy J, Crook J, Khan N, Graham EA, Morris CM, et al. The *tau* locus is not significantly associated with pathologically confirmed sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2002; 330: 201-3.
 25. Green EK, Thaker U, McDonagh AM, Iwatsubo T, Lambert JC, Chartier-Harlin MC, et al. A polymorphism within intron 11 of the *tau* gene is not increased in frequency in patients with sporadic Alzheimer's disease, nor does it influence the extent of *tau* pathology in the brain. *Neurosci Lett* 2002; 324: 113-6.
 26. Russ C, Powell JF, Zhao J, Baker M, Hutton M, Crawford F, et al. The microtubule associated protein *Tau* gene and Alzheimer's disease-an association study and meta-analysis. *Neurosci Lett* 2001 Nov 13; 314: 92-6.
 27. Baker M, Graff-Radford D, Wavrant DeVrieze F, Graff-Radford N, Petersen RC, Kokmen E, et al. No association between *TAU* haplotype and Alzheimer's disease in population or clinic based series or in familial disease. *Neurosci Lett* 2000; 285: 147-9.
 28. Evans W, Fung HC, Steele J, Eerola J, Tienari P, Pittman A, et al. The *tau* H2 haplotype is almost exclusively Caucasian in origin. *Neurosci Lett* 2004; 369: 183-5.
 29. Pittman AM, Myers AJ, Duckworth J, Bryden L, Hanson M, Abou-Sleiman P, et al. The structure of the *tau* haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1267-74.
 30. Lippa CF, Zhukareva V, Kawai T, Uryu K, Shafiq M, Nee LE, et al. Frontotemporal dementia with novel *tau* pathology and a Glu342Val *tau* mutation. *Ann Neurol* 2000; 48: 850-8.
 31. Liu WK, Le TV, Adamson J, Baker M, Cookson N, Hardy J, et al. Relationship of the extended *tau* haplotype to *tau* biochemistry and neuropathology in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2001; 50: 494-502.
 32. Kwok JB, Teber ET, Loy C, Hallupp M, Nicholson G, Mellick GD, et al. *Tau* haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 329-34.