

한국인 가족성 비후성심근증가계에서 Beta Myosin Heavy Chain 유전자의 연관여부탐색

고려대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실*

박정희 · 이정호 · 김혜경 · 손정원* · 박길홍*

원자력병원 생화학연구소

이 제 호

= Abstract =

Screening of the Cardiac Beta Myosin Heavy Chain Gene for the Linkage to Familial Hypertrophic Cardiomyopathy in a Korean Family

Jeong Euy Park M.D., Cheong-Ho Yi, Hae-Kyung Kim M.D.,

Jeong-Won Sohn M.D.,* Gil-Hong Park M.D.*

Department of Internal Medicine & Biochemistry, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea*

Je-Ho Lee M.D.

Biochemistry Laboratory, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Background : Through a genome-wide search using the genetic markers(RFLP genetic markers), the familial hypertrophic cardiomyopathy(FHCM) with an autosomal dominant mode of inheritance has been firstly detected to be genetically linked to chromosome 14q1. The subsequent studies have shown that the point mutations at the exons encoding for the head and head/rod junction of the cardiac beta myosin heavy chain(β -MHC) are the most frequent type of mutation in the FHCM families with a linkage to β -MHC, whereas the α/β -MHC hybrid gene and a large deletion at the 3' region of β -MHC gene were also rarely detected. With the other families genetically implicated with the chromosomes 1, 11, 15, 16 and 18, FHCM also manifests locus heterogeneity, a phenomenon in which abnormalities at different genes are involved in different families. In addition, a korean FHCM family with 403^{Arg→Gln} mutation of β -MHC gene has been previously found by an american research group.

Methods : For clinical diagnosis, echocardiography and electrocardiography were performed on the individual members of a korean FHCM family. The microsatellite markers(MYO-I, MYO-II) located in the β -MHC gene region were amplified by PCR(polymerase chain reaction) and the polymorphism was analyzed for the possible linkage to the phenotypic expression of FHCM. Independently, the same PCR products of the exons 13 and 23 were digested with the specific restriction enzymes for the presence of the most frequently reported point mutations of β -MHC gene(403 and 908 amino acid mutations). Single strand conformation polymorphism(SSCP) of the exons 13 and 23 of the β -MHC gene was also analyzed for the mobility shift

expected if any point mutation is present at these two exons.

Results : The inheritance pattern of HCM(hypertrophic cardiomyopathy) in the family is considered as autosomal dominant. In this family(KU 101), one of the microsatellite markers (MYO-II) indicated the possible cosegregation between the allelic polymorphism and the disease phenotypes. However, the possible disease-linked allele was also present in the 32-year-old brother of the proband, who reveals no clinical signs of the disease. The other microsatellite genetic marker(MYO-I) was uninformative, without giving the discriminating power to verify the linkage to β -MHC gene. In the analysis for two common mutations of β -MHC gene by PCR-RFLP and PCR-SSCP, no evidence was found for 403 and 908 amino acid mutations and any point mutation in the exons 13 and 23.

Conclusions : Based on the linkage analysis using microsatellite genetic markers, there was a possibility that the disease could be linked to an abnormality in the β -MHC gene of the chromosome 14q1.

KEY WORDS : β -myosin heavy chain gene • Cosegregation • Familial hypertrophic cardiomyopathy • Linkage analysis • Genetic marker.

서 론

비후성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy)은 좌심실 심근의 비후를 일으킬만한 다른 심장성 혹은 전신성 원인이 없는 가운데 일어나는 원발성 심장병으로 비대칭적인 심실간 중격의 비후(asymmetric septal hypertrophy)를 가장 큰 특징으로 한다¹⁾. 병리조직학상 심근의 배열이상(muscular fibrillar dysarray)을 보이기도 하고 기능적으로 심장의 확장능 장애 및 좌심실 유출로의 차단(obstruction of left ventricular outflow)을 초래하기도 한다^{2,3)}. 임상적으로 상당수의 환자에서는 별 증상이 없을 수도 있고 운동시의 호흡곤란, 현기, 협심증등이 증상으로 나타나기도 하며 상당수의 젊은 환자에게서 급사가 유발된다^{3,4)}.

최근 심초음파검사(echocardiography)의 발달로 심장의 구조적 이상을 쉽게 진단할 수 있게 되어 비후성심근증의 진단과 연구가 비교적 용이하게 되었다^{4,5)}. 비후성 심근증은 높은 빈도로 가족성을 보여주는 것이 오래전부터 알려져 있어 가족성을 나타내는 경우를 가족성 비후성심근증(familial hypertrophic cardiomyopathy)이라고 한다^{5,6)}. 그 유전양식은 상염색체 우성(autosomal dominance)인 것으로 대부분의 연구자들이 보고하고 있다⁵⁻¹⁰⁾. 대략 56%의 비후성 심근증 환자가 가족성, 나머지 44% 정도가 가족력

없이 산발성(sporadic)을 보이며, 가족성인 가계의 약 60% 정도가 상염색체 우성의 유전양식을 보여주는 것으로 알려져 있다^{7,8)}.

또한 심초음파에 의해 관찰되는 이 질환의 가장 중요한 임상적 특징인 심실간중격의 비후는 상염색체 우성유전인 가계에서 한세대의 후손들에서 예상되는 반수에 정확히 도달되지 않는 경우가 많아 가족성 비후성심근증의 유전자의 침투도(penetrance : 가계 분석에 의해서 예상표현형이 실지로 나타난 가족구성원 수를 전체 가족수에 대비한 비율)가 불완전(<100%)한 것으로 알려져 있다⁷⁻¹⁰⁾. 또한 가계분석을 통하여 가족성비후성심근증의 유전자를 가지고 있는 것으로 추정되는 피침투개인(penetrant individual)들이 나타내는 본 유전질환의 발현도(expressivity)도 연령에 따라 달라지는데, 16세 이하의 어린 나이에서는 이상 유전자를 가지고 있으면서도 심초음파 검사에서 심실중격의 비후를 보이지 않다가 성인이 되면서 차츰 병이 발현할 수 있다¹¹⁾.

가족성 비후성심근증은 이제까지 알려진 여러 순환기 유전병 가운데 인체연관유전지도에 등재된 유전표지(genetic marker)¹²⁾를 이용하여 최근에 관련 유전자의 위치가 규명된 유전질환이다. 본 유전질환이 염색체 14번의 장완(long arm)부위(q1)에 연관되어 있음이 밝혀진 후^{13,14)}, 곧이어 염색체 14번의 q11·12 부위에 직렬로 나란히 위치한 cardiac alpha/ beta my-

osin heavy chain(α -MHC와 β -MHC)유전자의 hybrid gene¹⁵⁾과 β -MHC유전자의 단일염기치환(missense mutation)¹⁶⁾과 같은 돌연변이가 가족성 비후성심근증가계에서 나타남이 밝혀졌다. 많은 후속연구는 β -MHC유전자의 40개의 exon중에 특히 beta myosin heavy chain단백질의 head와 head-rod junction 부위에 점돌연변이가 일어난 유전자가 가족성 비후성심근증가계에서 유전되는데, 현재까지 12개의 상이한 exon에서 약 26가지의 서로 다른 유형의 missense mutation이 보고되었다¹⁶⁻²²⁾(Fig. 1). 최근에 Marian등²³⁾은 가장 흔한 missense mutation이나 alpha/beta hybrid gene과는 다른 β -MHC의 5'부위의 결실(deletion)이 나타난 가계를 보고하였다(Fig. 1).

또한 가족성 비후성심근증은 가계에 따라서 상이한 유전자가 연관되어 있는 유전자좌 이형성(locus heterogeneity)을 보인다²⁴⁻²⁷⁾. 염색체 14번 장완의 β -

MHC유전자와의 연관성이 없는 가족성 비후성심근증의 여러가계에서 다른 염색체 부위와의 연관성이 보고되었다. Kimura등²⁸⁻³¹⁾은 RFLP유전표지를 이용하여 여러 가계를 종합하여 연관분석한 결과 transthyretin (prealbumin)을 암호화하는 염색체 18번상의 유전자부위와 연관되어 있음을 보고하였고, 이태리의 한 가계는 염색체 16번의 새로운 연약부위(fragile site)가 비후성심근증과 동시분리됨을 Ferraro등³²⁾이 보고하였다. 최근에 Watkins등³³⁾은 microsatellite유전표지들을 이용한 연관분석을 통해서 염색체 14번과는 연관성이 없는 몇몇 미국의 가족성비후성 심근증가계에서 염색체 1번의 장완(q3)의 factor 13B의 유전자부위와 강한 연관성이 나타남을 보고하였고, 역시 염색체 14번과는 연관배제된 몇몇 프랑스의 가계에서는 염색체 11번으로 등재된 수개의 microsatellite 유전표지와 연관관계가 있음을 Carrier등³⁴⁾이 보고하였다. 또한

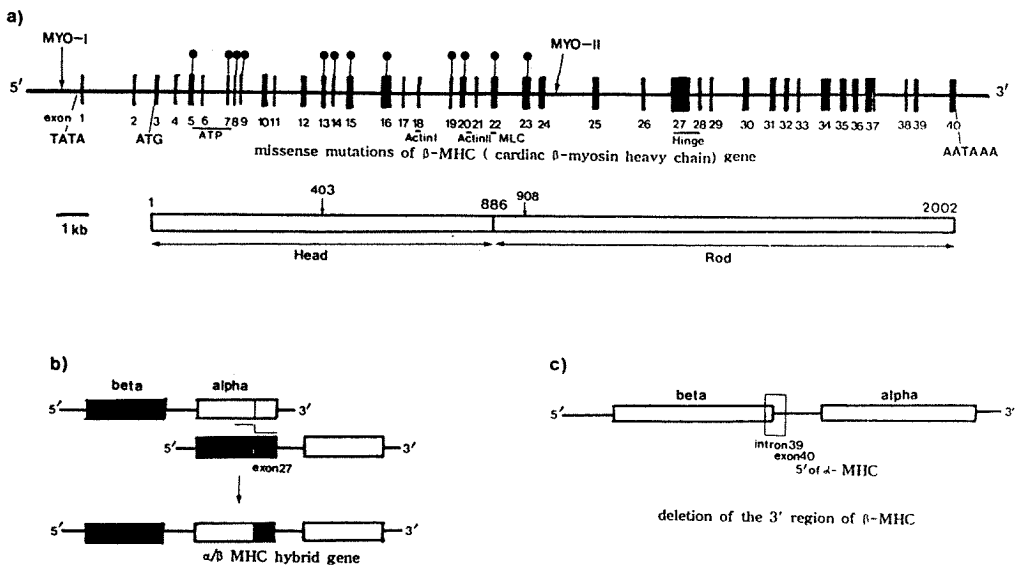


Fig. 1. The three mutation types of beta myosin heavy chain(β -MHC) gene in FHCM families with a linkage to β -MHC gene.

a) Missense mutations : 12 exons clustered in head and head/rod junction of β -MHC protein were observed in the families with familial hypertrophic cardiomyopathy(the mutated exons were designated as shaded circle).

MYO-I : (dC-dA)₁₅/(dG-dT)₁₅ polymorphism at promotor region

MYO-II : (dC-dA)₂₃/(dG-dT)₂₃ polymorphism at intron 24

TATA : Tata box ; ATG : translation start site ; AATAAA : polyadenylation site ; ATP : ATP binding site ; Actin I and Actin II : Actin binding sites ; MLC : myosin light chain binding site ; Hinge : protein hinge

b) Alpha/beta myosin heavy chain hybrid gene(adapted from Tanigawa et al¹⁵⁾).

c) Deletion of 3' region of β -MHC including intron 39, 40, and 5' of α -MHC.

Thierfelder³⁵⁾등도 염색체 15번의 15q2와 염색체 11번의 장완에 각각 연관이 있는 가계들을 보고 하였다.

이와 같이 가족성 비후성심근증은 서로 다른 두 유전자에서의 독립적인 이상(abnormality)에 의해서 비슷한 양상의 표현형을 보이는 유전병이지만, 가족성 비후성심근증을 보이는 가계의 30~40%정도가 염색체 14번의 β -MHC유전자의 이상을 보이는 것으로 알려져 있으므로(그 대부분은 β -MHC단백질의 head와 head/rod의 junction부분에 해당하는 exon 부위의 missense mutation)^{19,24,25)}, 한국인 가족성 비후성심근증가계에서도 염색체14번에 등재된 β -MHC 유전자와의 관련성을 살펴보는 연구가 첫단계일 것이다. 더욱이 미국에 거주하는 한 한국인 가족성 비후성심근증가계에서 β -MHC유전자의 403Arg→Gln 돌연변이가 비후성심근증의 표현형과 동시에 유전됨이 Fananapazir와 Epstein³⁶⁾에 의해 밝혀진 사례가 있다. 또한 이 403Arg→Gln 돌연변이는 β -MHC유전자의 missense mutation들 중에 가장 빈도가 높은 유형으로 알려져 있다.

이 연구의 목적은 비후성 심근증의 한국인가계에서의 유전 양상을 조사하고, 가장 먼저 가족성 비후성심근증의 유전자(FHC-1)로 알려진 beta-myosin heavy chain(β -MHC) 유전자내의 두 microsatellite 유전자표지^{37,38)}를 이용한 동시분리분석을 통해 염색체 14번의 β -MHC유전자와의 연관가능성을 탐색해 보고 부가적으로 가장 빈번한 것으로 알려진 β -MHC유전자의 두 돌연변이(403Arg→Gln와 908Leu→Val)의 여부를

살펴보는데 있었다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 고려대학교 부속병원 내과에 내원한 비후성 심근증 환자중에서 가족내에서 2인 이상이 전형적인 임상 소견을 보이며 이 질환에 의한 급사의 병력이 있는 한 가계 (KU101)를 대상으로 하였다. 이 가계의 가계도는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

2. 방 법

1) 임상적 표현형에 대한 검사

개개인에 대한 자세한 병력청취 및 이학적 검사를 실시하였다. 가족력, 특히 급사에 대한 부분은 사망 당시의 진단명 및 부검여부를 확인하였다. 심전도검사에 사용한 심전도기는 Marquette사제(Model Mac-15)로 12극을 동시에 기록하였다. 심초음파검사에 사용된 심초음파기는 Hewlett-Packard사제(Model 72085)였고 2.5 MHz의 변속기를 이용하였다. 환자의 좌측횡와위자세에서 흉골방 장축, 흉골방 단축, 심첨부 4방 및 M-mode영상을 기록하였다. 심실비후의 원인이 될 수 있는 고혈압등의 원인질환이 없는 사람중에 심실간 중격이 13mm 이상 되는 사람을 비후성심근증의 양성으로 간주하였다. 좌심실 유출로의 폐쇄정도는 continuous wave 심도플러를 이용하여 구하였다.

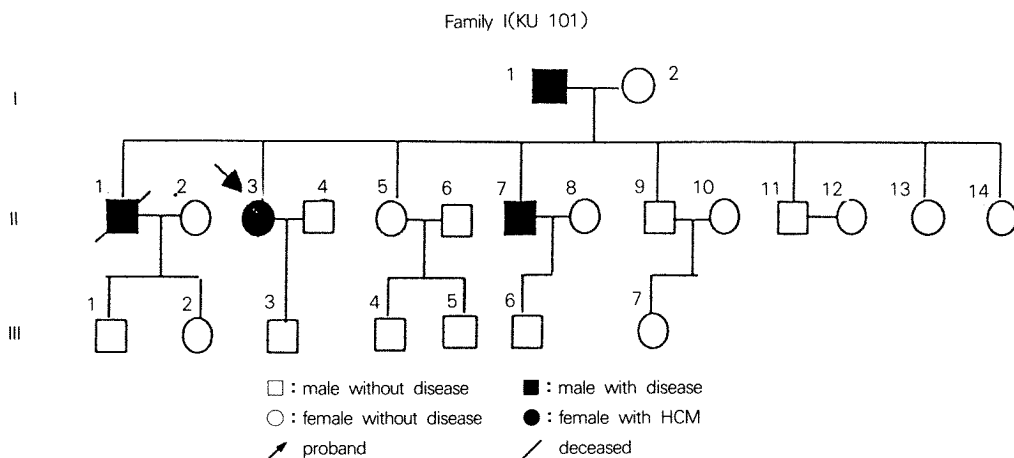


Fig. 2. The pedigree of a Korean family with the affected individuals of familial hypertrophic cardiomyopathy(KU 101).

2) 유전자 분석

DNA 추출을 위하여 성인은 정맥혈 40ml을, 소아에서는 10~20ml의 정맥혈을 heparin이 함유된 Vacutainer(Rutherford, NJ)를 이용하여 채혈하였다. 백혈구를 수확한 후 proteinase K를 처리한 후 phenol/chloroform으로 DNA를 추출하였다³⁹⁾.

β -myosin heavy chain(β -MHC)유전자부위의 두 microsatellite유전표지 각각과 가계내의 환자가 보여주는 비후성심근증이 동시분리(cosegregation)되고 있는지 여부를 확인하기 위해 PCR(polymerase chain reaction)로 β -MHC유전자의 promotor 부위의 (dC-dA)₁₅/(dG-dT)₁₅다형³⁷⁾과 intron 24의 (dC-dA)₂₃/(dG-dT)₂₃다형³⁸⁾을 포함하는 두 단편을 증폭하였다. 두 microsatellite유전표지의 β -MHC유전자상의 위치와 primer쌍의 서열은 각각 Fig. 1과 Table 1에 나타낸 바와 같다.

두 목적단편의 PCR증폭에는 전체반응부피를 50 μ l로 200ng의 시료 DNA를 이용하여 실시하였으며 사용된 각각의 primer쌍의 양은 MYO-I에 50 pmol, MYO-II에 10 pmol 이었고, Taq polymerase의 양, MgCl₂의 양, 단편증폭반응의 온도와 시간 조건은 두 유전표지를 개발한 Polymeropoulos등³⁷⁾과 Fougereousse등³⁸⁾이 제시한 양을 사용하였다. 증폭단편의 labeling에는 T4 polynucleotide kinase로 primer의 5'부위에 [γ -P³²]ATP를 연결시켜 labeling 한 후에 증폭반응을 실시하는 end-labeling 방법을 주로 이용하였다. PCR증폭된 단편은 95% formamide dye solution(10% bromophenol blue, 10% xylene cyanol)과 섞은 후 (1:1~1:10 비율), 6~8% polyacrylamide sequen-

cing gel(8M urea)에 2.5 μ l 정도 loading한 후 1~2시간 전기영동하였다. PCR증폭된 단편들의 길이는 서열이 알려진 M13mp18의 single-strand DNA를 주형으로 dideoxy chain termination sequencing reaction시킨 후에 같은 gel에 전기영동하여 비교하였다. 전기영동한 후의 gel은 진공펌프가 연결된 gel dryer에서 30분에서 1시간 말린후 intensifying screen이 있는 cassette에 X-ray film(Agfa)과 같이 넣어 -70°C에서 12-18시간 정도 노출시킨 후 현상하여 autoradiogram을 얻었다.

β -MHC유전자의 exon 13과 exon 23을 포함한 단편을 PCR증폭시키기 위한 primer와 PCR반응의 조건은 Epstein등¹⁷⁾이 발표한 것을 이용하였는데, primer쌍의 서열과 증폭단편의 제한효소단편다형분석(PCR-RFLP)에 이용한 제한효소는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 1) β -MHC유전자의 exon 13의 403^{Arg}→Gln과 exon 23의 908^{Leu}→Val 돌연변이를 확인하는 증폭단편의 제한효소단편다형분석(PCR-RFLP)에는 증폭반응이 끝난 용액 25 μ l를 포함하는 전체 50 μ l용액을 두 제한효소(*Dde* I, *Pvu* II)의 적정온도(37°C)에서 incubation하여 실시하였다. 제한효소절단반응이 끝난 용액을 bromophenol dye solution(0.5M EDTA, 25% glycerol)과 섞은 후에 8% polyacrylamide gel(non-denaturing)에 loading 하여 4°C에서 4~5시간 전기영동하였다. 단편길이의 비교를 위하여 ϕ X-174의 *Hae* III 절단단편들을 size marker로 이용하였고, 전기영동후의 gel은 ethidium bromide로 정색한 후에 ultraviolet fluorescence illuminator 위에 두고 흑백 Polaroid (Kodak)로 촬영하였다. 2) β -MHC유

Table 1. The oligonucleotide primer sets for microsatellite markers of β -MHC gene on chromosome 14

Marker locus	Primer sequences	Location
[MYO-I]		
(dC-dA) ₁₅ /(dG-dT) ₁₅	(GT strand)	2768-2830 ¹⁾
polymorphism at	5'-CTGCATCTGAGCATATGGGA-3'	
promoter region	(CA strand)	
	5'-CATTCACTATGCAGGGTT-3'	
[MYO-II]		
(dC-dA) ₂₃ /(dG-dT) ₂₃	(GT strand)	14630-14717 ¹⁾
polymorphism at	5'-ATGCCATGTCTATCTGTGCC-3'	
intron 24	(AC strand)	
	5'-AACATCCTCTAACCCCTACCCC-3'	

1) : The sequence numbers correspond to those of Liew et al⁴⁰⁾.

Table 2. The primer sets for amplifying the exons 13 and 23 of β -MHC gene and the restriction enzymes used for the diagnosis of the two common missense mutations(403^{Arg→Gln} and 908^{Leu→Val})

Target	Primer sequences	Length	PCR-RFLP
Exon 13	(5' primer)	267 bp	<i>Dde I</i>
	8708 ¹⁾		for 403 ^{Arg→Gln}
	5'-TTACAGGCATGAACCACACACC-3'		(129bp fragment is diagnostic
	(3' primer)		and normals show 161bp and
Exon 23	8974 ¹⁾	404 bp	105bp fragments)
	5'-TTACAGGCATGAACCACACACC-3'		
	(5' primer)		<i>Pvu II</i>
	13869 ¹⁾		for 908 ^{Leu→Val}
	5'-CCCTCCTATTTGAGTGATGTGC-3'		(161bp fragment is diagnostic
	(3' primer)		and normals show 243bp and
	14272 ¹⁾		140bp fragments
	5'-GGTCAGTATGCTCTGAGAGTCC-3'		

1) : The sequence numbers correspond to those of Liew et al⁴⁰⁾.

전자의 exon 13과 exon 23을 각각 포함하는 단편의 SSCP(single strand conformation polymorphism)분석⁴¹⁾을 위한 PCR증폭반응에는 [α -³²P]dCTP를 첨가하여 반응시키는 internal labelling을 이용하였다⁴²⁾. 증폭된 단편은 95% formamide dye solution(10% bromophenol blue, 10% xylene cyanol)과 1:1:~1:10의 비율과 섞고, 95°C에서 5분간 가열한 tube들을 얼음무지에 꽂아 5~10분간 두어 single strand로 만든 다음 4~6% polyacrylamide gel(non-denaturing gel)에 2.5 μ l씩 loading한 후 4°C에서 3~5시간 전기영동하였다. Autoradiogram은 microsatellite유전표지분석에서와 같은 방법으로 얻었다.

결 과

1. 임상적 표현형에 대한 검사

가계 KU101에 대한 이학적 검사, 심전도 및 심초음파 검사를 시행한 결과 임상적으로 전형적인 비후성심근증 소견을 보인 가족들은 Fig. 2, Table 3에서와 같다.

가계 KU101에서 proband는 II-3이었다(Fig. 2). Proband의 부친(I-1), 오빠(II-1), 남동생(II-7)이 비후성심근증이 있는 것으로 보인다. Proband인 II-3은 34세의 여자로 심초음파검사에 심실간 중격이 32mm, 좌심실후벽두께가 14mm로 심한 심실간 중격의 심한 비대칭적 비후(asymmetric septal hypertrophy)소견을 보이고, 승모판 전엽의 전방운동(systolic anterior mo-

vement)이 있으며, 좌심실 유출로를 통한 수축기 압력차가 50mmHg로 전형적인 폐쇄성(obstructive)의 비후성심근증 소견을 보였다(Table 3).

Proband의 부친(I-1)은 65세로 이미 10여년전부터 심장이상을 앓고 있었으며, 심첨부위에서 수축기잡음이 들리고 심초음파검사에서는 확장기에 심실간 중격이 13.9mm, 좌심실후벽두께가 10.7mm로 좌심실 비후의 소견을 보였고, 경도의 승모판막 폐쇄부전소견을 보였다. 이 사람에게서는 심실간 중격의 전형적인 비대칭비후 소견은 보이지 않았다(Table 3). Proband의 오빠(II-1)는 36세에 급사하였으며 사망 오래전부터 심장이상의 진단을 받고 있었다. Proband의 동생(II-7)은 proband와 아주 흡사한 심초음파소견을 보였다. 즉 심한 심실간 중격의 비후(25.4 mm)와 승모판 전엽의 전방운동이 관찰되는 폐쇄성 비후성심근증의 소견을 보였다(Table 3).

이상과 같이 이 가계에서는 16세 이상의 가족중 4명이 병력 및 초음파검사상에 가족성 비후성심근증이 있는 것으로 사료된다. Proband(II-3)과 남동생(II-7)의 심초음파소견은 유사하였으나, 부친(I-1)의 심초음파 소견은 경도의 좌심실비대를 보였고 심실간 중격의 비후는 있었으나 좌심실 유출로의 폐쇄소견은 없어서 한 가계에서도 심초음파소견이 환자마다 다르게 나타남을 보였다(Table 3). 사망한 오빠(II-1)의 검사소견은 기록을 찾지 못하였으나 생존해 있는 비후성심근증환자 세사람 모두 심전도 검사에서 명확한 이상소견을 보였다(Table 3). 가계 KU101에서 16세

Table 3. The echocardiographic and electrocardiographic findings from the family KU 101

Ped No.	Sex/Age	EKG	ASH	SAM	Echocardiography		other findings
					IVS	LVPW	
*I-1	M/65	LVH, LAH incomplete RBBB	—	—	13.9	10.7	mild MR
I-2	F/61	N	—	—	12.0	12.6	DM, LV enlargement
*II-3	F/34	LVH, LAD	+	+	32.0	14.0	obstructive type : PG 50mmHg
II-4	M/39	N	—	—	9.5	9.5	
*II-7	M/31	Q in II III aVF V ₅₋₆	+	+	25.4	10.2	obstructive type : PG 90 mmHg
II-9	M/31	N	—	—	8.0	8.0	
II-10	F/27	N	—	—	7.6	6.6	
II-11	M/29	N	—	—	8.0	8.0	
III-6	M/2	T inversion in V ₁₋₃	—	—	3.7	2.2	
III-7	M/10m	R in V ₁ T inversion in V ₁ -V ₃	—	—	5.6	4.7	

* : persons diagnosed as having FHCM on echocardiography

EKG : electrocardiography, ASH : asymmetric septal hypertrophy

SAM : systolic anterior motion of mitral valve, IVS : interventricular septum(mm),

left ventricular posterior wall(mm), N : normal, LAD : left axis deviation, LAH : left atrial hypertrophy,

LVH : left ventricular hypertrophy, MR : mitral regurgitation, PG : pressure gradient, RBBB : right bundle

branch block

미만의 어린이들에서는 심초음파나 심전도 소견에 특이한 이상 소견을 관찰할 수 없었다.

2. 염색체 14번의 beta myosin heavy chain 유전자의 검색

1) Microsatellite 유전표지를 이용한 동시분리분석
비후성심근증의 표현과의 동시분리(cosegregation) 여부를 분석하기 위하여 가계 KU101의 16세 이상의 가족구성원 10명(15세 이하 1명 포함)의 MYO-I과 MYO-II의 유전자형(genotype)이 결정되었다. MYO-I 유전자표지에서는 모두 4개의 대립인자가 확인되었으나 병이 있는 가족구성원들과 병이 없는 가족구성원들에서 동일한 하나의 대립인자(allele)가 나타나서 연관 여부를 결정할 유용한 정보를 제공하지 못하였다(Fig. 3).

MYO-II 유전표지의 유전자형결정결과는 Fig. 3 및 Fig. 4에서 보는 바와 같이 3가지 대립인자가 확인되었는데, 그 길이는 126bp, 122bp, 118bp로 각각 1,

2, 3번 대립인자로 표시하였다. Proband 아버지(I-1)의 유전자형은 1, 2가 되고, 어머니(I-2)는 2, 3이며, proband(II-3)는 1, 2로서 그의 아버지와 일치하였다. 비후성심근증을 가지고 있는 남동생(II-7)도 1번 대립인자를 공유하고 있어서(1, 3 유전자형), 이 질환의 표현이 1번 대립인자의 유전과 동시유전되고 있을 가능성을 보여 주었다. 하지만 심초음파 검사상에 이상소견이 없는 다른 남동생(II-9)도 1번 대립인자를 가지고 있기 때문에 절대적으로 확정 지을 수는 없었다(Table 3, Fig. 3). 이 남동생(II-9)의 경우 현재 32세로 유전자이상은 있으나 아직 비후성심근증이 발현 되지 않았을 가능성이 있다. 보고에 따르면 16세 이하의 나이에는 비후성심근증의 발현이 거의 없고, 나이가 증가하면서 차츰 발현율이 증가하는 양상을 보인다¹¹⁾. 다른 가능성은 이 남동생(II-9)은 가족성 비후성심근증과 MYO-I 유전표지 사이의 재조합(recombination)이 일어난 자녀일 가능성이 있다. 이와는 전혀 다르게 1번 대립인자가 우연히 병이 있는 가족

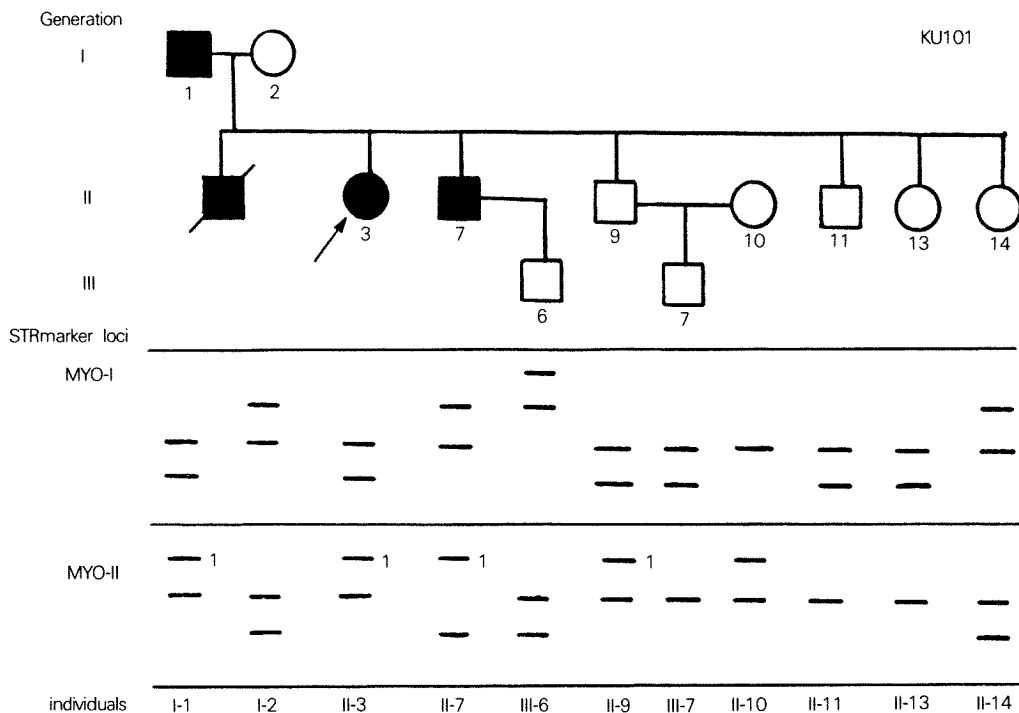


Fig. 3. The genotypes of individuals in the family KU101 at the two microsatellite marker loci, MYO-I and MYO-II, for β -MHC gene.

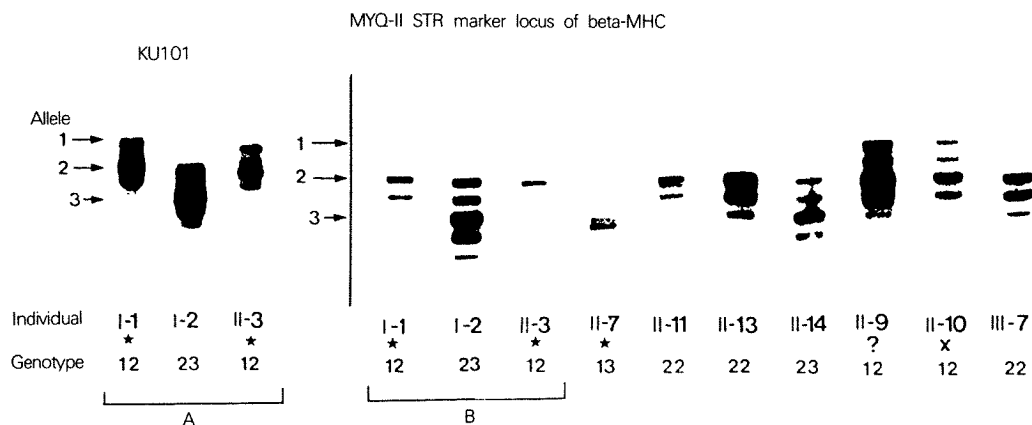


Fig. 4. The results of microsatellite marker analysis (MYO-II) on the individuals of the FHCM family KU 101. The alleles designated as 1, 2, and 3 have the respective sizes of 126bp, 122bp, and 118bp. The patients were marked with a star (★). The question mark (?) is the person (II-9) with no sign of the disease and the mark x indicates the person married to II-9. The left three lanes show the targeted two allelic bands specifically amplified in three heterozygous individuals (I-1, I-2, II-3). Comparison of the PCR amplification under the different reaction conditions can be made between the left three lanes and the first right three lanes for the same three individuals, showing the untargeted artifact bands two-base pair shorter than the target bands in the right lanes.

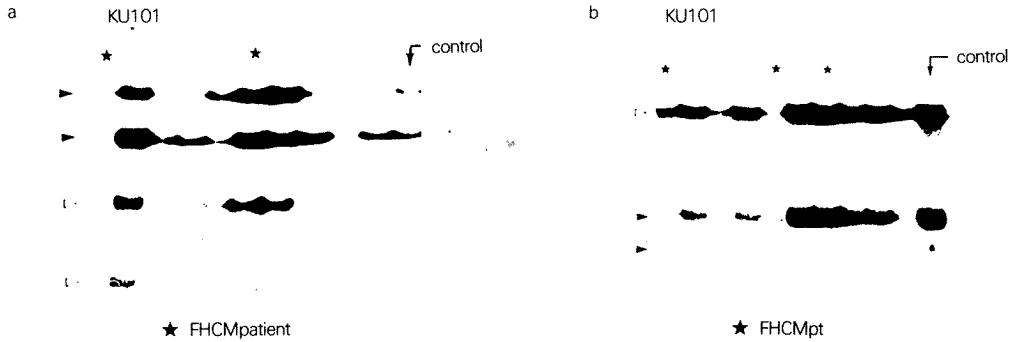


Fig. 5. The results of SSCP(single strand conformation polymorphism) analysis on the PCR-amplified sequences containing exon 13 and exon 23 of β -MHC gene.

- a) exon 13 : the PCR-amplified sequences of normal individuals were separated into four bands in the condition used in this study
b) exon 23 : the PCR-amplified sequences of normal individuals were separated into three bands in the condition used in this study

들과 일치하게 나타났을 가능성도 있다. 한편 II-10은 II-9의 배우자로 역시 1번 대립유전자를 지니고 있었으나 이 가계의 외부에서 들어온 사람으로 유전자 이상과 1번 대립유전자의 동시분리분석에서는 제외하였다.

2) β -MHC유전자의 exon 13과 exon 23부위의 돌연변이분석

가계 KU101에서 β -MHC유전자의 exon 13 부위를 PCR로 증폭하여 *Dde* I 제한효소로 자르면 403 아미노산 부위에 돌연변이가 있는 경우(403Arg→Gln)에 정상적인 161bp과 105bp의 단편외에 129bp 크기의 특징적인 단편이 나타나야한다. 그러나 이 가계의 가족구성원중에는 정상적인 161과 105염기서열 단편만이 보인점을 미루어 403아미노산의 돌연변이가 없는 것으로 판명되었다. β -MHC유전자의 exon 13 부위를 포함하는 PCR증폭단편의 SSCP분석을 실시한 결과는 Fig. 5의 (a)에서 보는 바와 같다. 만약에 exon 13 부위에 임의의 점돌연변이가 있다면 돌연변이를 가진 환자에게서 정상인과는 다른 mobility shift가 전기영동상에 나타나야 하지만, 가계 KU101에서는 이러한 결과가 보이지 않아 exon 13에는 점돌연변이가 없는 것으로 보인다.

β -MHC유전자의 exon 23부위를 PCR로 증폭하여 증폭된 단편을 *Pvu* II제한효소로 잘랐을 때에도 exon 23에 위치하는 908아미노산 돌연변이(908Leu→Val)의 존재시에 나타나는 161bp 크기의 부가적인 단편은

나타나지 않고 정상인에게서 나타나는 243bp와 140bp 크기의 단편만을 보여서 908아미노산의 돌연변이도 없는 것으로 확인되었다(Fig. 6). β -MHC유전자의 exon 23부위를 포함하는 증폭단편의 SSCP분석을 실시했을 때에도 환자들에게서 band의 mobility shift가 일어나지 않았기 때문에(Fig. 5b), exon 23부위의 점돌연변이 가능성은 배제되었다.

고 안

비후성심근증은 한국인에게서도 임상에서 비교적 드물지 않게 관찰되는 원발성심장병이다⁴³⁾. 그러나 국내에서 가족적 발생빈도와 양상, 유전양상 및 DNA수준에서의 관련유전자의 탐색등의 기본적인 연구가 이루어지지 않아서, 유전자이상의 검색이나 가족성 비후성심근증 가계의 구성원들을 위한 분자유전적조기 진단과 같은 임상적 응용이 아직 이루어지지 않았다.

본 연구의 대상가계는 전형적인 비후성심근증이 가족중에 다발성로 나타났고 세대를 건너지 않고 부친에게서 자녀에게 공히 유전되는 것으로 생각되기 때문에 상염색체 우성으로 유전하는 가계이다(Fig. 2).

몇몇 가족성 비후성심근증가계들을 대상으로 β -MHC유전자와의 동시분리검색에서 이 가계 KU101만이 동시분리의 가능성을 보였다(Fig. 3, Fig. 4). 한국인 집단에서의 여러 MYO-II대립인자의 빈도(fre-

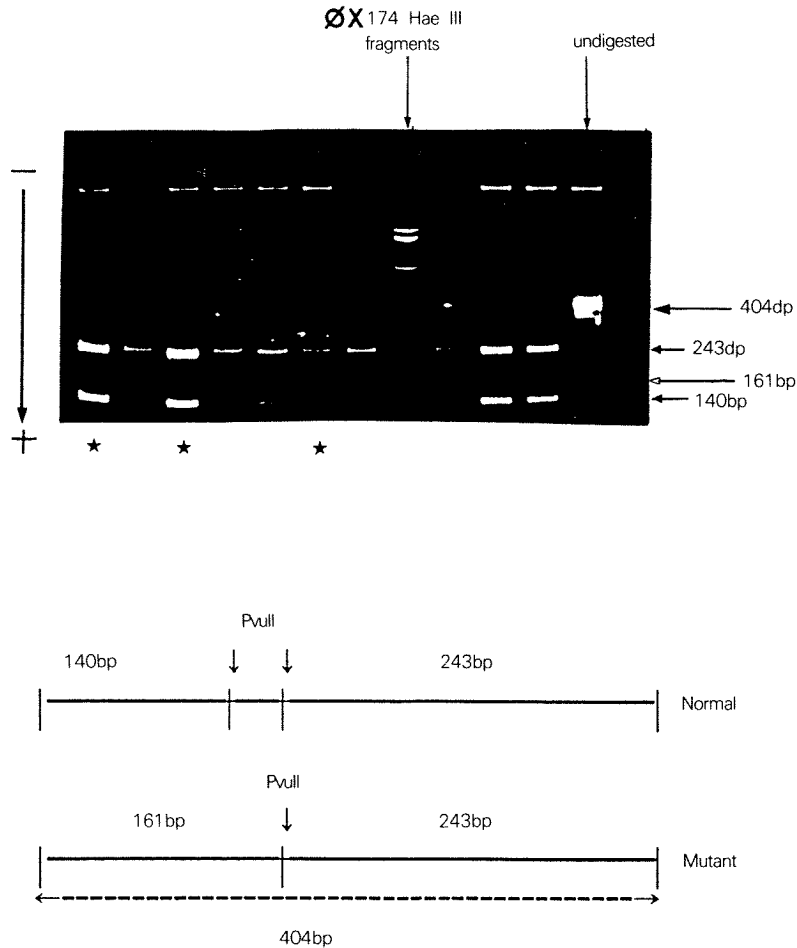


Fig. 6. The result of RFLP(restriction fragment polymorphism)analysis on the PCR-amplified fragment containing exon 23 of β -MHC gene.

Pvu II cleaves the PCR-amplified sequences of normal individuals into three fragments, two of which have the sizes of 140 bp and 243 bp, visible in the polyacrylamide gel. An additional 161 bp fragment becomes visible with a chromosome with 908^{Leu→Val} mutation, because Pvu II has only one cleavage site, producing the 161 bp and 243 bp fragments.

quency)추정이 이루어 지지 않았지만 백인집단에서 126bp의 대립인자(1번 대립인자)는 0.07의 빈도로 나타나는 것으로 미루어 보아³⁸⁾, 전체집단에서 발생 빈도가 희소한 가족성 비후성심근증과의 통계적 관련성을 생각할 때 빈도가 높은 주요대립인자들 보다는 관련성이 높을 것으로 추정할 수 있겠다. 따라서 아직 유전자형 결정이 않된 가족구성원을 대상으로 특히 MYO-II유전표지의 대립인자결정이 이루어 져야 할 것이다. 예를 들어 proband의 사망한 오빠(II-1)의 유전자형은 그의 아내와 자녀들의 유전자형이 결정 되면 부모의 유전자형과 비교하여 추론할 수 있을

것이다(Fig. 2). 또한 심전도 및 심초음파 소견상 정상인 proband의 남동생(II-9)도 가족내의 비후성심근증 환자들이 가지고 있는 1번 대립유전자를 가지고 있으므로 II-9를 대상으로 더욱 정밀한 임상적 검사를 시행해 볼 필요가 있다. 최근에 가계도상으로는 확실히 비후성심근증 유전자를 가지고 있는 것으로 추정되지만 심초음파나 심전도에는 이상이 없는 사람이 signal averaged electrocardiography(SAE)에는 이상을 보이는 경우가 보고되었다⁴⁴⁾. 또한 가족력은 있지만 전형적인 구조적 이상은 없고 심전도에만 이상이 있는 사람에게서 β -MHC유전자의 908^{Leu→Val} 돌연변이가

발견되기도 하였다⁴⁵⁾.

가계 KU101에서 MYO-I은 각각 다른 이형접합체인 proband의 아버지(I-1)와 어머니(II-2)에서 공통으로 나타나는 대립인자가 자녀들 모두에서 나타나는 양상을 보였다(Fig. 3). 따라서 MYO-I은 이 가계에서 비후성심근증의 환자와 정상인을 구별할 수 있는 유용한 표지의 구실을 하지 못하는 비정보성(uninformative) 유전자표지였다.

본 연구에서 분석된 가계는 최소한 β -MHC유전자의 두 missense mutation($403^{Arg \rightarrow Gln}$ 과 $908^{Leu \rightarrow Val}$)은 아니고 exon 13과 exon 23에서의 다른 임의의 점돌연변이(point mutation)의 가능성도 거의 배제된다. 미국으로 이민간 한 한국인 가계에서 β -MHC유전자의 $403^{Arg \rightarrow Gln}$ 이 비후성심근증과 완전한 동시분리를 보이는 사실과는 다른 결과이다³⁶⁾. 따라서 현재까지 보고된 약 26유형의 missense mutation들중 이들을 제외한 유형의 돌연변이를 검색해 보아야 할 것이다. 26유형중에 $403^{Arg \rightarrow Gln}$ 과 $908^{Leu \rightarrow Val}$ 처럼 돌연변이가 제한효소절단부위의 서열변화를 동반하는 것이 8가지가 있으므로, 나머지 6가지 유형은 PCR로 증폭시킨 단편을 제한효소로 절단하면 제한단편다형(RFLP)의 차이로 돌연변이 유무를 손쉽게 확인할 수 있다. 그 이외의 유형은 점돌연변이여부를 검색하는 여러가지 방법(예, SSCP)으로 살펴 볼 수 있을 것이다. 그런데 동양인 혹은 한국인들에게서 발견되는 missense mutation의 유형과 빈도가 구미인들에게서 나타나는 양상과 상당히 다를 수도 있으므로⁴⁶⁾, 현재 missense mutation이 나타나지 않은 다른 exon들도 돌연변이 가능성을 완전히 배제 해서는 안된다.

한국인 가족성 비후성심근증가계들을 대상으로 β -MHC유전자와의 동시분리를 검색하는 연구를 위해서는 본 연구에서 사용한 두 microsatellite유전자표지와 함께 다른 유형의 DNA다형(DNA polymorphism)에 기초된 β -MHC유전자내외의 유전자표지들도 이용 혹은 개발하여야 연관분석에 효율성을 기할 수 있겠다. Seidman그룹이 최초로 β -MHC유전자의 missense mutation을 밝히는 도중에 발견한 RFLP들¹⁵⁾과 Epstein등이 연관분석에 이용한 exon 3과 intron 6의 SSCP(single strand conformation polymorphism)²⁵⁾등을 이용하여 유전자표지로서의 가능성과 한국인 가계들에서의 정보성을 탐색해 보아야 할 것이다. 또한 연관에 대한 통계적 계산과 추론에는 이러한 유전자표지들의

집단유전학적 수치들도 아주 유용한 기초를 제공하므로⁴⁹⁾, 이 모든 유전자표지의 효과적인 이용을 위해서 한국인 집단에서의 각 유전자표지의 빈도추정도 동시에 이루어 져야 할 것이다. 본 연구의 동시분리분석에 사용한 두 microsatellite유전자표지 좌위의 대립인자의 빈도와 여러가지 유전적 모수(parameter)들도 아직 백인(Caucasian)집단에서만 추정되었기 때문에^{37,38)}, 황인종 혹은 한국인집단에서는 그러한 수치들이 크게 다를 수도 있다.

본 연구는 비교적 규모가 작은 가계를 분석하였는데 큰 가계를 확보하는 것이 정확한 통계적 추론(예, LOD score계산) 중요하므로⁴⁷⁾, 가계조사를 가능한 선까지 확대하여야한다. 그러나 가계 KU101의 경우는 proband의 아버지의 형제가 여럿이나 오래전 부터 전국에 흩어져 살고 서로의 연락이 끊긴 상태여서 더 이상의 가계확보가 어려웠다.

가족성 비후성심근증은 서로 다른 각각의 유전자 이상에 의해서 임상적으로 큰 차이 없이 거의 동일해 보이는 표현형이 나타나는 유전적 이형성(genetic heterogeneity)을 보이기 때문에 병발생의 근본적 원인이 되는 이상유전자의 동정과 병발생 기전(pathogenesis)에 대한 접근이 순수한 단일유전자성 유전병에 비해 상당한 복잡성을 띠고 있다. 그러나 유전적 이형성이 존재한다고 할 지라도 유전적 연관이나 유전자 이상을 밝히는 체계의 확립이 임상적인 유용성을 위해 필요하다. 이는 가계의 분자유전적검색을 통하여 유전자 이상이 밝혀지면 적어도 그 가계에 대해서는 유전자표지를 이용하여 가계내의 이상 유전자를 가진 사람을 산전진단하거나 증상전에 아주 어린나이에 서 부터 진단할 수 있게 되며, 조기진단후에 환자에게 유전적 상담을 할 수 있고, Verapamil등의 칼슘길항제를 조기부터 투여하여 병의 발현을 억제하거나 연기할 수 있는 가능성이 있기 때문이다.

한편 본 연구에서는 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하는 방법들이 사용되었기 때문에 시료 DNA의 양이 1~2회의 채혈에 의한 DNA추출로도 충분하였다. 그러나 장기간의 여러가지 분자유전학적 탐색을 거쳐야 확정적인 결론을 내릴 수 있는 유전병연구와 진단의 속성을 고려하거나 채혈이 어려운 나이 어린 가족구성원의 경우를 위해 계속적으로 DNA를 공급하는 체계를 확립할 필요가 있다. 혈액에서 수확한 백혈구를 Epstein-Barr virus로 형질전환

(lymphoblastic transformation)시켜서 영구화 세포선 (immortalized cell line)을 확립하는 방법이 유용할 것으로 보인다⁴⁸⁾.

요 약

연구배경 :

가족성 비후성심근증은 그 가계의 대부분이 상염색체 우성의 유전양상을 보이는 유전질환이다. RFLP (restriction fragment length polymorphism) 유전표지를 이용한 전체 지놈(genome) 규모의 연관분석(linkage analysis)을 통해서 가족성 비후성심근증이 염색체 14번의 장완부위와 연관이 있음이 밝혀졌고, 후속연구들에 의해서 그 부위의 beta myosin heavy chain(β -MHC) 유전자의 단일염기치환 돌연변이(missense mutation)가 가장 빈번한 유전자이상인 것으로 알려졌다. 염색체 14번의 장완부위와 연관이 있는 가계들 이외에도 염색체 1, 11, 15, 16, 18번의 특정 부위와 연관된 가계들이 보고되었기 때문에 가족성 비후성심근증은 유전자와 이형성(locus heterogeneity)이 있는 유전질환들중의 좋은 사례이다. 미국에 거주하는 한 한국인 가계에서 β -MHC 유전자의 403^{Arg}→Gln mutation이 밝혀진 바 있다.

방 법 :

고려대학교 부속병원 내과에 내원한 전형적인 비후성심근증 환자와 급사의 병력을 가진 한 가족성 비후성심근증가계들 대상으로 가계조사와 심전도 및 심초음파도를 통한 임상적 분석을 실시하였으며, β -MHC 유전자와의 연관여부의 확인을 위해 β -MHC 유전자의 두 microsatellite 유전표지(MYO-I와 MYO-II)의 유전자형을 결정하였다. 가장 빈번한 β -MHC 유전자의 두 missense mutation(403^{Arg}→Gln과 908^{Leu}→Val)의 여부를 확인하기 위해 PCR-RFLP와 PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism)를 실시하였다.

결 과 :

본 연구의 대상이 되었던 가족성 비후성심근증 가계의 유전 양식은 상염색체 우성이다. 가계 KU101은 총 3대의 가족 23명중 4명이 심초음파 검사상 전형적인 비후성심근증 소견을 보였다. Microsatellite 유전표지를 이용한 염색체 14번의 β -MHC 유전자와의 동시분석에서, MYO-I은 이 가계에서 비정보성 유전표

지였다. MYO-II에서는 비후성심근증환자들이 동일한 하나의 대립인자를 공유하는 것으로 나타나서 β -MHC 유전자의 이상일 가능성을 보였다. 단지 이 가계의 32세 남자에서는 임상적으로 질병이 없음에도 불구하고 상기한 대립인자를 보유하고 있어서 후속연구가 필요하다. 이 가계의 유전자이상은 가장 빈번한 두 β -MHC 유전자의 missense mutation (403^{Arg}→Gln과 908^{Leu}→Val)은 아닌 것이 분명하고 exon 13과 exon 23에서의 다른 임의의 점돌연변이(point mutation)의 가능성도 거의 배제되는 결과를 보였다.

결 론 :

유전표지를 이용한 동시분리분석에서 한 한국인 가족성 비후성심근증의 가계에서 염색체 14번에 자리하는 beta myosin heavy chain 유전자와의 연관되어 있을 가능성을 보이는 결과를 얻었다.

감사의 글

본 연구의 분자유전학적 실험방법의 확립을 위해서 초기의 몇가지 실험기법의 습득에 도움을 준 원자력 병원 생화학연구실 강영순연구원에게 감사의 뜻을 전한다. 또한 본 연구의 실험을 위하여 실험공간과 기자재의 사용을 허락한 고려대학교 생화학교실 황우익, 유충근교수께도 감사드린다.

References

- 1) Maron BJ, Epstein SE : *Hypertrophic cardiomyopathy : A discussion of nomenclature*. Am J Cardiol 43 : 1242-1244
- 2) Wynne J, Braunwald E : *The cardiomyopathies : Toxic, chemical and physical damage to the heart*. In : Braunwald (ed) *Heart Disease : A Textbook of Cardiovascular Disease*, 4th ed., W. B. Saunders Co., pp 1394-1450, 1992
- 3) Wigle ED : *Hypertrophic cardiomyopathy : A 1987 viewpoint*. Circulation 75 : 311-322, 1987
- 4) Maron BJ, Bonow RO, Cannon RO, Leon MB, Epstein SE : *Hypertrophic cardiomyopathy : Interrelations of clinical manifestations, pathophysiology and therapy*. N Engl J Med 316 : 780-789 ; 844-852
- 5) Maron BJ, Mulvi-Hill JJ : *The genetics of hypertrophic cardiomyopathy*. Annals Intern Med 105 : 610-613, 1986
- 6) Gilligan DM, Cleland JFG, Oakeley CM : *The genetics*

- of hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 66 : 193-195, 1991
- 7) Greaves SC, Groche AH, Neutze JM, Whitlock RML, Veale AMO : *Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy : A cross-sectional and M-mode echocardiographic study of 50 families.* *Br Heart J* 58 : 259-266
 - 8) Maron BJ, Nichols III PF, Pickle LW, Wesley YE, Mulvi-Hill JJ : *Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy : Assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography.* *Am J Cardiol* 53 : 1087-1094, 1984
 - 9) Bjarnason I, Jonsson S, Hardarson T : *Mode of inheritance of hypertrophic cardiomyopathy in Iceland : Echocardiographic study.* *Br Heart J* 47 : 122-129, 1982
 - 10) Haugland H, Ohm OJ, Boman H, Thorsby E : *Hypertrophic cardiomyopathy in three generations of a large Norwegian family.* *Br Heart J* 55 : 168-175, 1986
 - 11) Maron BJ, Spirito P, Wesley Y, Arce J : *Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy.* *N Engl J Med* 315 : 610-614, 1986
 - 12) Donn timer-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith D, Lander ES, Botstein D, Akots G, Rediker KS, Gravius T, Brown VA, Rising MB, Parker C, Powers JA, Watt DE, Kauffmann ER, Bricker A, Phipps P, Muller-Kahle H, Fulton TR, Siu NG, Schumm JW, Braman JC, Knowlton RG, Barker DF, Crooks SM, Lincoln SE, Daly MJ, Abrahamson J : *A genetic linkage map of the human genome.* *Cell* 51 : 319-337, 1987
 - 13) Jarcho JA, McKenna W, Pare P, Solomon S, Holcombe R, Dickie S, Levi T, Donn timer-Keller H, Seidman JG, Seidman CE : *Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1.* *N Engl J Med* 321 : 1372-1378, 1989
 - 14) Solomon SD, Geisterfer-Lowrance AAT, Vosberg HP, Hiller G, Jarcho JA, Morton CC, McBride WO, Mitchell AL, Bale AE, McKenna WJ, Seidman JG, Seidman CE : *A locus for familial hypertrophic cardiomyopathy is closely linked to the cardiac myosin heavy chain genes, CRI-436 and CRI-L329, on chromosome 14q11-12.* *Am J Hum Genet* 47 : 389-394, 1990
 - 15) Tanigawa G, Jarcho JA, Kass S, Solomon SD, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE : *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy : An alpha/beta cardiac myosin heavy chain hybrid gene.* *Cell* 62 : 991-998, 1990
 - 16) Geisterfer-Lowrance AAT, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna WJ, Seidman JG, Seidman CE : *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy : A beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation.* *Cell* 62 : 999-1006, 1990
 - 17) Epstein ND, Cohn GM, Cyran F, Fananapazir L : *Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the β -myosin heavy chain : A 908^{Leu \rightarrow Val} mutation and 403^{Arg \rightarrow Gln} mutation.* *Circulation* 86 : 345-352, 1992
 - 18) Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG : *Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy.* *N Engl J Med* 326 : 1106-1114, 1992
 - 19) Mares A, Marian AJ, Yu QT, Czernuszewicz GZ, Gooch G, Tapscott T, Kelly D, Towbin J, Perryman MB, Roberts R : *Genetic screening of 75 families with hypertrophic cardiomyopathy show missense mutations the most common genetic defect.* *Circulation* 86 : 1-228, 1992
 - 20) Hejtmancik JF, Brink PA, Towbin J, Hill R, Brink L, Tapscott T, Trakhtenbroit A, Roberts R : *Localization of gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1 in a diverse US population.* *Circulation* 83 : 1592-1597, 1991
 - 21) Nish H, Kimura A, Harada H, Toshima H, Sasazaki T : *Novel missense mutation in cardiac beta myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy.* *Biochem Biophys Res Commun* 188 : 379-387, 1992
 - 22) Fananapazir L, Dalakas M, Cyran F, Cohn G, Epstein N : *Central core disease is present in hypertrophic cardiomyopathy with distinct mutations in the beta myosin heavy chain gene.* *Circulation* 86 : 1-229, 1992
 - 23) Marian AJ, Yu QT, Mares A, Hill R, Roberts R, Perryman MB : *Detection of a new mutation in the β -myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy.* *J Clin Invest* 90 : 2156-2165, 1992
 - 24) Solomon SD, Jarcho JA, McKenna W, Geisterfer-Lowrance AAT, Germain R, Salerni R, Seidman JG, Seidman CE : *Familial hypertrophic cardiomyopathy is a genetically heterogeneous disease.* *J Clin Invest* 86 :

993-999, 1990

- 25) Epstein ND, Fananapazir L, Lin HJ, Mulvi-Hill J, White R, Lalouel JM, Lifton RP, Nienhuis AW, Leppert M : *Evidence of genetic heterogeneity in five kindreds with familial hypertrophic cardiomyopathy*. *Circulation* 85 : 635-647, 1992
- 26) Schwartz K, Beckmann J, Dufour C, Faure L, Fourgerousse F, Carrier L, Henfstenberg C, Cohen D, Vosberg HP, Sacrez A, Ferriere M, Desnos M, Cambien F, Dubourg O, Komajd M : *Exclusion of cardiac myosin heavy chain and actin gene involvement in hypertrophic cardiomyopathy of several French families*. *Cir Res* 71 : 3-8, 1992
- 27) Ko YL, Lien WP, Chen JJ, Wu CW, Tang TK, Liew CC : *No evidence for linkage of familial hypertrophic cardiomyopathy and chromosome 14q1 locus D14S26 in a Chinese family : Evidence of genetic heterogeneity*. *Hum Genet* 89 : 597-601
- 28) Kimura A, Nishi H, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H : *Genetic linkage analysis of hypertrophic cardiomyopathy(HCM) in Japanese* In : Opie LH, Sugimoto K (eds) *Cardiomyopathy, Update 4, Tokyo University Press, pp 189-196, 1992*
- 29) Nishi H, Kimura A, Sasaki M, Wakisaka A, Matsuyama K, Koga Y, Toshima H, Sasazuki T : *Localization of the gene for hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 18q*. *Circulation* 80 : II-457, 1989
- 30) Harada H, Kimura A, Nishi H, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H : *Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy*. *Circulation* 86 : I-591, 1992
- 31) Onozuka H, Mikami T, Noguchi M, Sato H, Sakamoto S, Kitabatake A : *Relationship between genetic factors and echocardiographic patterns of left ventricular hypertrophy in familial cardiomyopathy*. *Circulation* 86 : I-448
- 32) Ferraro M, Giampaolo S, Ambrosini M : *Cosegregation of hypertrophic cardiomyopathy and a fragile site on chromosome 16 in a large Italian family*. *J Med Genet* 27 : 363-366
- 33) Watkins H, MacRae C, Thierfelder L, Chou YH, Frenneaux M, McKenna W, Seidman JG, Seidman CE : *A disease locus for familial hypertrophic cardiomyopathy maps to chromosome 1q3*. *Nature Genet* 3 : 333-337, 1993
- 34) Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, Guicheney P, Dufour C, Bercovici J, Dausse E, Berbi-Bertrand I, Wisniewsky C, Pulvenis D, Fetrler L, Vignal A, Weissenbach J, Hillaire D, Feingold J, Bouhour JB, Hagege A, Desnos M, Isnard R, Dubourg O, Komajda M, Schwarz K : *Mapping of a novel gene for hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11*. *Nature Genet* 4 : 311-313
- 35) Thierfelder L, MacRae C, Watkins H, McKenna W, Vosberg H-P, Seidman JG, Seidman CE : *Two new loci for hypertrophic cardiomyopathy map to chromosome 15q(CMH3) and 11q(CMH4)*. *Circulation* 88 : I-573, 1993
- 36) Fananapazir L, Epstein ND : *Genotype-phenotype studies in hypertrophic cardiomyopathy : Insights provided by comparisons of kindreds with identical beta myosin heavy chain gene mutations*. *Circulation* 86 : I-228
- 37) Polymorpoulos MH, Xio H, Rath DS, Merrill CR : *Dinucleotide repeat polymorphism at the human cardiac beta-myosin gene*. *Nucl Acids Res* 19 : 4019, 1991
- 38) Fourgerousse F, Dufour C, Roudaut C, Beckmann JS : *Dinucleotide repeat polymorphism at the human gene for cardiac beta-myosin heavy chain(MYH6)*. *Hum Mol Genet* 1 : 64, 1992
- 39) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K : *Current Protocol in Molecular Biology*. *Greene Publishing Associate and Wiley Interscience, New York, 1987*
- 40) Liew CC, Sole MJ, Yamauchi-Tachihara K, Kellem B, Anderson DH, Lin L, Liew JC : *Complete sequence and organization of the human cardiac β -myosin heavy chain gene*. *Nucl Acids Res* 18 : 3647-3651
- 41) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K : *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. *Genomics* 5 : 874-879, 1989
- 42) Weber JL, May PE : *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. *Am J Hum Genet* 44 : 388-396, 1989
- 43) 임상옥 · 하종원 · 김한수 · 권 준 · 권혁문 · 정남식 · 심원홍 · 조승연 · 김성순 : 한국인에서 비후성 심근증의 심초음파도에 의한 형태적 특징(초록). *순환기* 23(5) : 916, 1993
- 44) Epstein ND, Lin HJ, Fananapazir L : *Genetic evidence of dissociation(generational skips) of electrical from morphological forms of hypertrophic cardiomyopathy*. *Am J Cardiol* 66 : 627-631, 1990
- 45) Al-Madawi S, Chamberlain S, Cleland J, Nihoyanno-

- poulos P, Gilligan D, French J, Choudhury L, Williamson R, Oakeley C : *Identification of a mutation in the β -cardiac myosin heavy chain gene in a family with hypertrophic cardiomyopathy. Br Heart J* 69 : 136-141
- 46) Harada Y, Nishi H, Kimura A, Matuyama K, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H : *Seven missense mutations of cardiac β myosin heavy chain gene found in Japanese familial hypertrophic cardiomyopathy. Circulation* 88 : I-140, 1993
- 47) Ott J : *Analysis of Human Genetics Linkage. Revised Ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1992*
- 48) Neitzel H : *A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastic cell lines. Hum Genet* 73 : 320-326, 1986