

상염색체 우성유전 거대혈소판중후군 가족의 임상적 특징과 *MYH9* 유전자 돌연변이에 관한 연구

전남대학교 의과대학 소아과학교실¹, 진단검사의학교실², 내과학교실³,
약리학교실⁴, 전남대학교 의과대학연구소⁵

국 훈^{1,5} · 남호송^{1,5} · 백희조^{1,5} · 김영옥^{1,5} · 엄광현^{4,5} · 기해진^{4,5} · 조 덕^{2,5}
신명근^{2,5} · 이제중^{3,5} · 김형준^{3,5} · 국 현^{4,5} · 황태주^{1,5}

Clinical Characteristics of Autosomal Dominant Giant Platelet Syndromes and Mutation Analysis of *MYH9*

Hoon Kook, M.D.^{1,5}, Ho Song Nam, M.D.^{1,5}, Hee Jo Baek, M.D.^{1,5}, Young Ok Kim, M.D.^{1,5},
Gwang Hyeon Eom^{4,5}, Hae Jin Kee, Ph.D.^{4,5}, Duck Cho, M.D.^{2,5}, Myung-Geun Shin, M.D.^{2,5},
Je Jung Lee, M.D.^{3,5}, Hyeoung Joon Kim, M.D.^{3,5}, Hyun Kook, M.D.^{4,5} and Tai Ju Hwang, M.D.^{1,5}

Departments of ¹Pediatrics, ²Laboratory Medicine, ³Internal Medicine and ⁴Pharmacology,
Chonnam National University Hwasun Hospital, ⁵Medical Research Center for Gene Regulation,
Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Background: The autosomal dominant giant platelet syndromes (GPS), characterized by triads of giant platelets, thrombocytopenia, and Döhle-like leukocyte inclusions are caused by *MYH9* mutation, a gene encoding the nonmuscle myosin heavy chain-IIA. This study was aimed to identify the Korean GPS patients and to define clinical findings and molecular characteristics on them.

Methods: After taking a family history, platelets were counted using hematologic autoanalyzer and peripheral blood smear (PBS) was examined for platelet size and number, and the presence of leukocyte inclusions. Mutation of *MYH9* was studied from mononuclear cells from PB by direct sequencing of previously known 8 exons after PCR amplification of genomic DNA.

Results: Twenty patients from 5 unrelated families were diagnosed as GPS. Giant platelets, greater than red cells on PBS, were found to be 3.1% of platelet (range, 1~11%). The median platelet count was 61,000/ μ L. Inclusion bodies were found in 3 families. Two families had previously reported mutations. Family I had Arg1944Ter in exon 40, located in the tail portion of myosin, while Family IV had Lys373Asn in exon 10, located in the proximal portion of myosin head. The mutations were found only in affected patients, but not in normal siblings or unrelated families.

Conclusion: In this study, we identified several families with autosomal dominant GPS. Two families had known *MYH9* mutations, Arg1944Ter and Lys373Asn. The search for unknown mutations in the remaining families as well as study of protein structural and functional alteration seems to be necessary for further delineation of these rare genetic disorders. (*Korean J Hematol* 2006;41:16-27.)

Key Words: *MYH9* mutation, Giant platelet syndrome, Arg1944Ter, Lys373Asn

접수 : 2006년 1월 25일, 수정 : 2006년 2월 18일

승인 : 2006년 3월 5일

교신저자 : 국 훈, 전라남도 화순군 화순읍 일심리 160번지

☎ 519-809, 전남대학교 의과대학 소아과학교실
화순전남대병원 조혈모세포이식센터

Tel: 061-379-7693, Fax: 061-379-7697

E-mail: hoonkook@chonnam.ac.kr

Correspondence to : Hoon Kook, M.D.

Department of Pediatrics, Chonnam National University Medical
School, Blood & Marrow Transplantation Center, Chonnam
National University Hwasun Hospital
160, Ilsim-ri, Hwasun 519-809, Korea

Tel: +82-61-379-7693, Fax: +82-61-379-7697

E-mail: hoonkook@chonnam.ac.kr

서 론

유전성 혈소판감소증을 보이는 질환은 매우 드물지만 다양한 형태를 보이는 질환군으로 구성되어 있다. 이들 중 일부는 혈소판 계열에만 이상이 있는가 하면 다른 종류는 전신 장기를 침범하는 경우도 있으므로 이들의 임상 소견을 관찰하고, 혈소판 부피를 측정하여 질환군을 분류할 수 있다. 유전성 거대혈소판 증후군은 현재까지 약 14 종류가 밝혀져 있으며 유전양상과 임상 증상, 그리고 최근에는 유전자 이상 및 구조 이상에 따라 분류할 수 있게 되었다.^{1,2)}

상염색체 우성유전을 하면서 거대혈소판을 보이는 질환 중 May-Hegglin anomaly, Sebastian 증후군과 Fechtner 증후군은 거대혈소판, 혈소판 감소증과 과립구에 특징적인 Döhle 소체와 비슷한 세포질 봉입체를 3주정으로 갖는 질환이다(Table 1).^{3,4)} 이 중 Fechtner 증후군은 신염, 청각장애 및 백내장 등 Alport 증후군과 비슷한 증상을 가진다.⁵⁾ Epstein 증후군은 Alport 증후군과 연관된 또 하나의 상염색체 우성유전 거대혈소판 질환이나 백혈구의 봉입체가 없다.⁶⁾ May-Hegglin anomaly와 Sebastian 증후군과의 감별은 봉입체의 미세 구조 차이로 구별할 수 있다.⁷⁾

하지만 최근의 유전학적 진단의 발달로 May-Hegglin anomaly, Sebastian 증후군, Fechtner 증후군, Epstein

증후군들이 MYH9 유전자의 돌연변이로 발생한다는 것이 밝혀졌다.^{4,8-10)} MYH9는 non-muscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA)를 암호화하는 유전자로 혈소판, 신장, 백혈구, 그리고 와우각 등 여러 조직에서 표현된다. 또한 최근에는 다른 증상과 동반되지 않는 상염색체 우성 청각장애질환(DFNA 17)에서도 NMMHC-IIA가 발견되어¹¹⁾ 현재까지 NMMHC-IIA 이상은 임상 표현형이 구별되는 5가지 질환과 연관됨이 알려졌다. 따라서 이처럼 거대혈소판 및 혈소판감소증, 과립구에 NMMHC-IIA의 비정상 분포를 가지며 신장염, 청각장애, 그리고 백내장 등의 임상표현을 다양하게 보이는 질환군을 MYH9-연관 질환이라고 명명하고 있다.^{4,12)}

현재까지 국내에서는 1992년 첫 보고¹³⁾ 이후 8가족의 May-Hegglin anomaly,^{14,15)} Epstein 증후군과¹⁶⁾ Fechtner 증후군이 각각 한 가족에서 보고되었지만,¹⁷⁾ 아직 이들의 병인이 되는 MYH9 유전자의 돌연변이에 대한 대단위 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 전남대학교병원에서 유전성 거대혈소판 증후군으로 진단 받은 5가족 20명의 환자들을 대상으로 이들의 임상양상, 혈액학적 소견, 유전양상을 관찰하고, 이들의 병인으로 알려진 MYH9 유전자의 돌연변이 양상을 관찰하기 위하여 기존에 알려진 8개의 exon에 대한 genomic DNA를 중합효소연쇄반응을 한 후 염기분석을 시행하여 국내 거대혈소판 증후군의 특징을 구명해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

2001년부터 전남대학교병원 소아과에 내원하여 혈소판감소성 자반증으로 진단 받은 환자를 대상으로 자세한 병력과 가족력을 청취하였고, 이들의 혈액검사에서 mean platelet volume (MPV)이 크거나 자동혈구계수기에서 거대혈소판이 의심되는 경우 말초혈액 도말검사를 시행하여 실제로 거대 혈소판의 존재 여부를 육안으로 확인하였다. 병력으로는 가족 중에 혈소판감소성 자반증으로 치료를 받았던 과거력을 확인하였고, 청각 장애 여부, 보청기 사용 여부 및 가족 중에 백내장으로 수술을 받았거나 혈뇨나 단백뇨 혹은 신장 질환으로 진찰 받은 가족이 있는지를 확인하였다.

유전성 거대혈소판 증후군이 의심되는 경우는 가족들에게 동의를 받은 후에 10mL의 EDTA 처리된 전혈을 채취하여 자동혈구계수기(Sysmax XE-2100, ADVIA 120)로 혈구수를 측정하였고, 지정된 판독자 2명이 말

Table 1. Discriminating features of MYH9-related disorders (Modified from ref. 1)

	Macro-thrombocytopenia	Hearing loss	Cataract	Renal defect	Leukocyte inclusions*
MHA	Yes	No	No	No	Yes (type1)
SBS	Yes	No	No	No	Yes (type2)
FTNS	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes (type2)
EPS	Yes	Yes	No	Yes	No
DFNA17	No	Yes	No	No	No

*Ultrastructure of leukocyte inclusion: type 1, clusters of ribosomes aligned along parallel filaments; type 2, dispersed filaments and randomly distributed ribosomes.

Abbreviations: MHA, May-Hegglin anomaly; SBS, Sebastian syndrome; FTNS, Fechtner syndrome; EPS, Epstein syndrome; DFNA17, nonsyndromic autosomal dominant form of deafness.

초혈액 도말검사에서 혈소판의 크기와 거대혈소판의 빈도를 조사하였고, 백혈구 내에 Döhle 유사소체 여부를 확인하였다. 소변검사에서 혈뇨와 단백뇨의 유무와 혈청 BUN, creatinine 농도를 측정하였다.

2. Bioinformatics

사람 *MYH9* 유전자는 40개의 exon과 5' 끝에 5'UTR을 포함하는 추가 exon으로 구성되어 있다. *MYH9* 유전자(NCBI GI: NM_002473)의 exon정보는 The Wellcome Trust Sanger Institute에서 제공하는 <http://www.ensembl.org>를 이용하였으며 Vega gene (ID: OTTHUM-G00000030429) 또는 Ensembl gene (ID: ENSG00000100345) sequence로부터 그 정보를 얻었다. *MYH9* 유전자의 염색체 부위는 22번이었으며, genomic location은 34949140부터 35055849 bp까지 약 34.9 Mbp에 걸쳐 존재하였다.

한편 기존의 논문에 발표된 돌연변이 정보를 얻기 위하여 NIH에서 제공하는 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)에 *MYH9* 유전자 염기서열을 넣었고 각 돌연변이에 해당하는 exon정보를 얻었다. 이후 Ensembl web site에서 *MYH9* 유전자에 대한 exon정보를 얻고 display되는 intron의 범위를 조절하여

exon을 5'쪽과 3'쪽으로 각각 flanking하는 150 bp의 sequence를 얻었다. 이로부터 Vector NTI software (Version 6.0 InforMax)를 이용하여 적절한 primer를 고안하였고 PAGE purification한 primer를 주문하였다.

Pfam database (www.sanger.ac.uk)를 통하여 multiple alignment나 단백질 도메인 구조(protein domain architecture)들을 비교해 보았다. 본 실험에서는 *MYH9* 단백질의 일차원적 구조를 분석하고 돌연변이가 일어나는 아미노산이 어느 기능을 하는 부위의 도메인에 영향을 미치는지를 예측해 보기 위하여 Pfam 기능을 이용하였다.

돌연변이된 아미노산 부위가 잘 보존되어(conserved) 있는 곳인지 확인하기 위하여 NCBI와 Ensembl로부터 homologue를 얻었고 이를 Vector NTI의 alignment기능에 대입하여 유사성을 분석하였다.

3. 단핵세포의 분리 및 Genomic DNA 분리

방부제가 들어있지 않은 헤파린으로 처리된 주사기로 채취한 10 mL의 전혈을 RPMI 1640 배지와 1 : 1의 비율로 혼합한 후 Ficoll-Hypaque에 의한 밀도구배 원심침전법으로 1,500×g로 10분간 원심하여 단핵세포를 분리하였다. 단핵세포로부터 Qiagen사의 genomic DNA isolation kit를 제조사의 protocol에 따라 이용하

Table 2. Primer set for exon amplifications

Primer sets	Amplimer	Sequence	Mutation to detect
MYH9-1	502	GTAATGTGTTGTCCTTCTCCTCCCCGC CCCCCTTCTCAACCAGAGAGCCAGG	N93K
MYH9-10	119	CCCCGTGGCTTTCTTCTCTCTGCTC CTGGGCGTGAAGCCTTGAGTGTGC	L373N
MYH9-16	407	CTGTAGCGACCCCCCTCCCTTAGGCTC GGTGGAAAAGAGAAGGAGGTGGGGAAG	R702C R702H R705H
MYH9-25	445	GCCATCCTAAGTGCCATGATTGTGACC GTGTGTGTGTGTGTGTCAGAGGCC	T1155I
MYH9-26	454	GCTATGGGATAGATGGCTAGGAGGGGC GCACGAGTCACAAAGCCCTTAGAAG	R1165C
MYH9-30	433	GGGGGAGGCGGTTTCATAACTGGGC GAAGGAGAGGAAATGCAAAGGATGGGG	D1424H D1424N
MYH9-38	406	GCCCCAGACCTCTTTTCCAGTTACATAG CTGCCCTTCTCACTGCCCCACCAGC	E1841K
MYH9-40	431	CTTTGAGATGTGTGGGCTGTGCTGTGG CTTTGGTATCAGATTCTGAGCAGGGGAGG	R1944Ter

여 genomic DNA를 분리하였다.

4. 중합효소 연쇄반응(PCR) 증폭 및 염기서열 분석

앞서 기술한 방법으로 PAGE 정제한 primer를 얻고 1, 10, 16, 25, 26, 30, 38, 40번 등 8개의 exon에 대해 genomic DNA를 중합효소 연쇄반응을 한 후 각 exon을 PCR 증폭하기 위해 이용했던 primer들을 sequencing primer로 이용하여 양방향에서 염기분석을 시행하였고 ABI Prism software로부터 얻은 sequencing curve를 이용하여 dual peak가 있는지 여부를 확인하여 분석하였다. 본 실험에 사용한 primer sequence정보는 Table 2에 기술하였다.

결 과

1. 혈액 검사 소견

혈액학적 소견 및 가족력에서 거대혈소판 증후군의

로 진단할 수 있었던 가족은 5가족이었다. 혈액 검사 결과, 제I 가족에서는 5명 중 4명, 제II 가족은 4명 중 2명, 제III 가족은 9명 중 6명, 제IV 가족은 14명 중 6명, 그리고 제V 가족에서는 4명 중 2명으로 총 검사한 36명 중에서 20명이 거대혈소판 증후군을 가지고 있었다(Table 3). 환자들의 나이는 2세에서 80세까지였고(평균 연령, 32.5세), 성비는 남자 12명, 여자 8명이었다.

자동혈구계수기로 환자들의 혈소판 수를 측정한 결과 제II 가족의 아버지(280,000/ μ L)를 제외한 19명에서는 모두 감소된 소견을 보였고, 이들의 중앙값은 61,000/ μ L (범위, 4,000~280,000/ μ L)이었다(Table 3).

이들의 mean platelet volume (MPV)은 중앙값 17.2fL (범위, 7.4~22.7fL)로 정상 범위인 7.4~10.4fL보다 매우 증가되어 있었다. 환자 중 2예에서는 MPV가 정상 범위였다.

이들에서 보인 거대혈소판의 크기는 적혈구 크기의 절반에서부터 적혈구 크기의 1.5배까지 다양하였고

Table 3. Clinical and hematologic findings of patients with Giant Platelet syndromes

Family, Initial diagnosis, Mutation	Patients	Age in yr/ Sex	MPV	Platelet count	% of platelets by diameter size			Inclusion body in granulocyte	Hearing impair- ment	Cata- ract	Nep- hritis
					>8 μ m	4~8 μ m	<4 μ m				
I MHA/SBS Arg1944Ter	IA	2/F	21.0	84	3	16	81	+	-	-	-
	IB	33/M	19.4	40	2	11	87	+	-	-	-
	IC	26/F	8.6	4	ND	ND	ND	+	-	-	-
	ID	59/F		10	5	21	74	+	-	-	-
II MHA/SBS	IIA	15/M	10.9	63	1	1	98	+	-	-	-
	IIB	51/M	7.4	280	5	2	93	+	-	-	-
III MHA/SBS	IIIA	61/M	22.7	12	7	37	56	+	-	-	-
	IIIB	32/M	12.5	8	11	40	49	+	-	-	-
	IIIC	3Y6M/M	20.4	28	1	16	83	+	-	-	-
	IIID	8M/M	10.8	5	7	31	62	+	-	-	-
	IIIE	3Y2M/	18.1	22	3	21	77	+	-	-	-
	IIIF	33/F	21.5	26	3	31	66	+	-	-	-
IV EPS Lys373Asn	IVA	11/M	16.8	101	1	10	89	-	-	-	-
	IVB	44/M	20.3	63	3	25	72	-	-	-	P
	IVC	16/F	15.4	66	1	9	90	-	-	-	-
	IVD	80/F	19.9	66	1	16	83	-	-	-	-
	IVE	46/M	13.4	107	1	4	93	-	-	-	-
	IVF	42/M	18.0	67	1	7	92	-	-	-	-
V EPS	VA	8/F	17.6	108	1	12	87	-	-	-	-
	VB	38/M	11.1	59	ND	ND	ND	-	+	-	RF

Normal values: MPV, 7.4~10.4fL; Platelet count $150-350 \times 10^9/L$.

Abbreviations: MPV, mean platelet volume; MHA, May-Hegglin anomaly; SBS, Sebastian syndrome; ND, not done; EPS, Epstein syndrome; P, proteinuria; RF, renal failure.

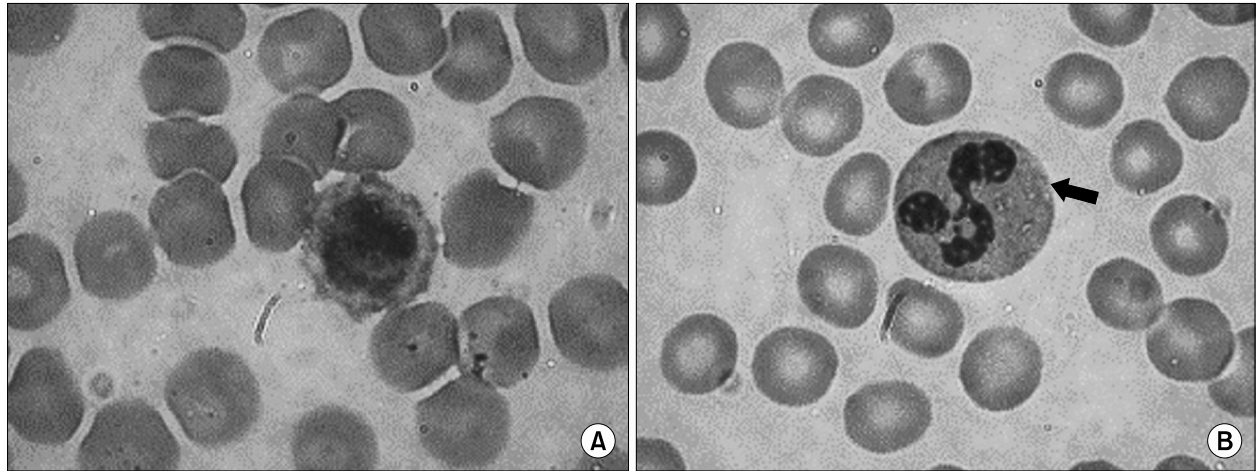


Fig. 1. (A) Blood smear shows thrombocytopenia with giant platelets. (B) Döhle-like inclusion body in leukocyte in patient 3C (arrow) (Wright's Giemsa $\times 1,000$).

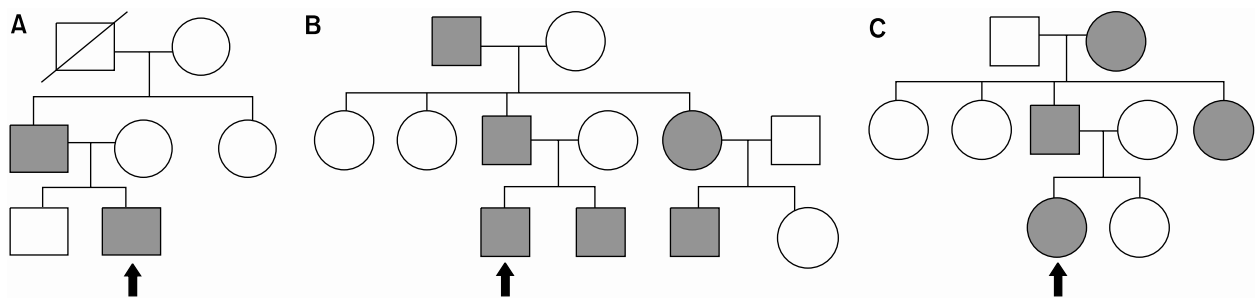


Fig. 2. Pedigrees of the Family II (A), Family III (B) and Family V (C). All the families show the autosomal dominant inheritance spanning 3 generations.

(Fig. 1A), 적혈구의 크기보다 큰 $8\mu\text{m}$ 이상의 혈소판의 백분율은 평균 3.1% (범위, 1~11%)이었고, 적혈구 크기의 절반보다 크지만 적혈구보다는 작은 혈소판 ($4\sim 8\mu\text{m}$)의 백분율은 평균 18.1% (범위, 1~40%)이었다.

과립구 내에 Döhle 유사소체는 혈액도말 슬라이드의 May-Grünwald-Giemsa 염색상 중성구의 1/4~1/3에서 관찰되었다(Fig. 1B). 봉입체가 관찰된 가족은 제I, II, III 가족이었다. 이들에서 전자현미경적 미세구조는 관찰하지 못하였다.

2. 임상소견

동반될 수 있는 질환 중 청각 장애와 신장질환을 가진 경우는 두 명이 있었는데, 제V 가족의 38세 된 아버지로 10대 후반부터 양측 청력이 감소하여 35세부터 보청기를 착용하였고, 34세 때 만성 신부전으로 진단

받고 후 37세에 신장이식을 받았다. 또 다른 환자는 제IV 가족의 44세 된 아버지로 수년 전부터 청력이 감소하였으나 보청기는 사용하지 않았고, 10년 전부터 중등도의 단백뇨가 있어 약을 복용 중이었으나, 신부전의 소견은 없었다.

3. 유전양식 및 임상적 의의

5가족 중 2대에서만 검사가 된 제II 가족을 제외한 4가족에서는 3대에 걸쳐 본 질환을 가지고 있으며, 자녀 중 성별을 가리지 않고 자녀의 약 반 수에서 질환이 표현되는 것으로 보아 공히 상염색체 우성유전함을 알 수 있었다(Fig. 2).

유전양식, 임상적 소견과 과립구내 봉입체의 여부로 MYH9 관련 질환으로 알려진 5가지 질환 중에 대입하여 보면(Table 1) 제I, II, III 가족은 청각, 시각 및 신장 질환이 없고, 봉입체가 있으므로 May-Hegglin anomaly

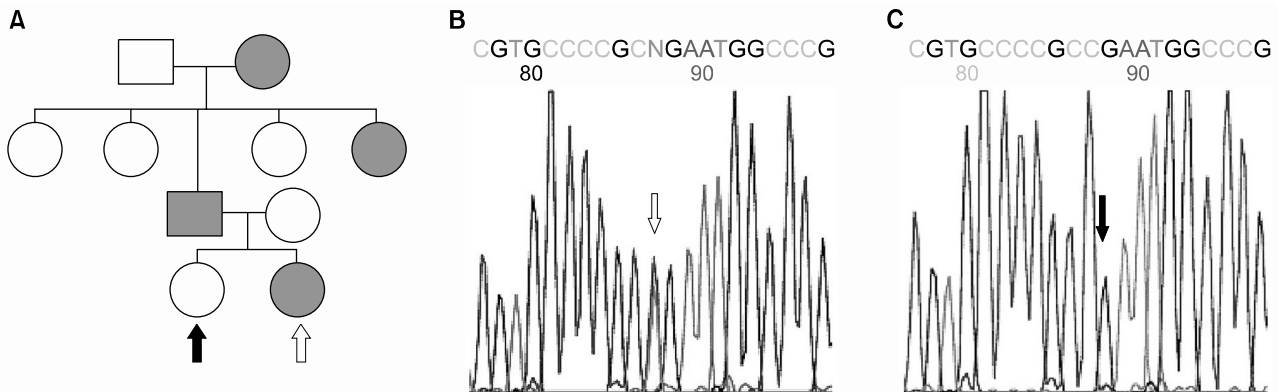


Fig. 3. Pedigree and electropherograms showing genetic alterations of MYH9 gene in the Family I. The candidate exons of MYH9 in the affected patients and in their normal siblings were subjected to genotyping after PCR amplification. (A) Pedigree shows the typical autosomal dominant trait of penetrance. (B, C) Electropherogram showing the alteration of single nucleotide in the 40th exon in the proband (white arrow in A & B), comparing with the normal sibling (black arrow in A & C). Note that equal amounts of thymidine (T) and cytidine (C) were reported as N, suggesting two different alleles are present. No other mutations were found in the patient. And this mutation was present only in this family.

Table 4. Summary and locations of the single nucleotide mutations in 2 identified families

Family	Proband	Exon	Nucleotide	Amino acid	Comments
I	Bae xx	41	T5797G	R1944X	Known (Martignetti, 2000)
IV	Lee xx	11	G1119C	K373N	Known (Heath, 2002)

와 Sebastian 증후군의 가능성이 있으나 미세구조 연구가 되어있지 않으므로 두 질환 간의 구분은 할 수 없었다. 제IV, V 가족은 청각과 신장 질환의 가족력이 있고, 봉합체가 존재하지 않았으므로 Epstein 증후군에 해당하였다.

4. MYH9 유전자의 돌연변이 발견을 위한 후보 exon의 직접 염기서열분석

기존에 알려진 MYH9 유전자의 돌연변이를 알기 위하여 OMIM database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=160775>)에서 May-Hegglin anomaly는 MIM155100, 그리고 Fechtner 증후군은 MIM 153640으로, 그리고 ExPASy (ID: P35579, <http://ca.expast.org/cgi-bin/niceprot.pl?P35579>)에서 면밀히 검색하였다.

기존에 알려진 exon 1, 10, 16, 25, 26, 30, 38, 40번 등 8개 exon의 11개의 보고된 MYH9 돌연변이를 직접 염기서열분석을 시행하였다. 기존에 알려진 목록 돌연변이와 본 실험에 사용한 primer는 Table 3에 나열하였다.

직접 염기서열분석을 통해 본 연구에서는 제I 가족

과 제IV 가족에서 기존에 알려진 돌연변이를 발견할 수 있었다(Table 4). 제I 가족에서는 40번 exon에 해당하는 5797번째 핵산이 G 대신 T 또는 G로 치환되어 Arg1944Ter 돌연변이를 일으켰다(Fig. 3). 즉 electropherogram 분석상 정상인에서 나타나는 C에 해당하는 파란색 curve (검정 화살표) 대신 푸른 색 C peak 이외에도 붉은 색의 T peak가 같은 위치에서 나타나 sequence 분석상 N으로 보고되었다. 이는 두개의 대립유전자 중 하나는 C를, 나머지 하나는 T를 갖고 있는 것으로서 두개의 대립유전자가 이형(heterogeneous)임을 의미한다. 이렇게 5,797번째 핵산이 G 대신 T로 치환됨으로써 arginine을 만드는 CGA 대신 stop codon인 TGA로 변환되어(nonsense mutation) 단백질 합성이 일찍 종료되는 mutant를 생성하였다. 그러므로 이 환자 가족에서는 한 개의 세포 내에서 정상 MYH9 단백질과 또한 끝 부분 수십여 개의 아미노산이 덜 생성되는 Arg1944Ter mutant form이 공존하고 있음을 의미하고 있다.

제IV 가족에서는 11번 exon에 해당하는 1,119번째 nucleotide가 G 대신 C 또는 G로 바뀌었는데 이는 373

번째 lysine을 암호화하는 AAG가 asparagine을 암호화하는 AAC로 바뀐 것으로서(missense mutation) Lys373 Asn 치환을 의미한다(Fig. 4). 즉 이 환자에서는 한 세포 내에 373번째 아미노산이 Lys인 정상 *MYH9* 단백질과 Asn인 비정상 단백질이 공존함을 의미하고 있다.

두 가족에서 관찰된 상기 mutation은 혈액학적, 그리고 임상적으로 거대혈소판증후군의 소견을 보인 환자에서만 관찰되었고, 가족 내 증상이 없는 정상인이나 다른 가족, 그리고 10인의 정상인에서 이 exon들을 증폭하여 검사하였는데 전혀 관찰되지 않았다. 또한 이 환자들에서 관찰된 한 군데 이외의 다른 돌연변이는 없었다.

5. 선형 단백질구조 예측에서 아미노산 mapping과 각종(species)간 아미노산 보존

MYH9 유전자의 선형 단백질구조의 예측은 pfam

(www.sanger.ac.uk)으로부터 얻을 수 있었고 본 연구에서 밝혀진 돌연변이의 상대적 위치를 알아보았다(Fig. 5). 제IV 가족에서 원인이 되었던 Lys373Asn는 myosin globular head 부위에 위치하였고, 제I 가족에서 원인이 되었던 Arg1833은 tail 부위에 위치하였다.

본 실험에서 각 species 간에 아미노산이 보존되는지를 보기위해 사람 *MYH9* (NMMHC IIA)와 상동 유전자인(homologous gene)인 닭 *MYH9*, 흰쥐 *MYH9*, enopus *MYH9* 및 생쥐 *MYH11*의 유전자들과 사람의 paralogous 유전자(duplication되어 생긴 유사 유전자)인 *MYH10* (NMMHC IIB)의 단백질 sequence를 비교해 보았다. 그 결과 제I 가족에 해당하는 Arg1944과 제IV 가족에 해당하는 Lys373은 모든 단백질들에서 잘 보존되어 있어 기능상 중요한 아미노산임을 알 수 있었다.

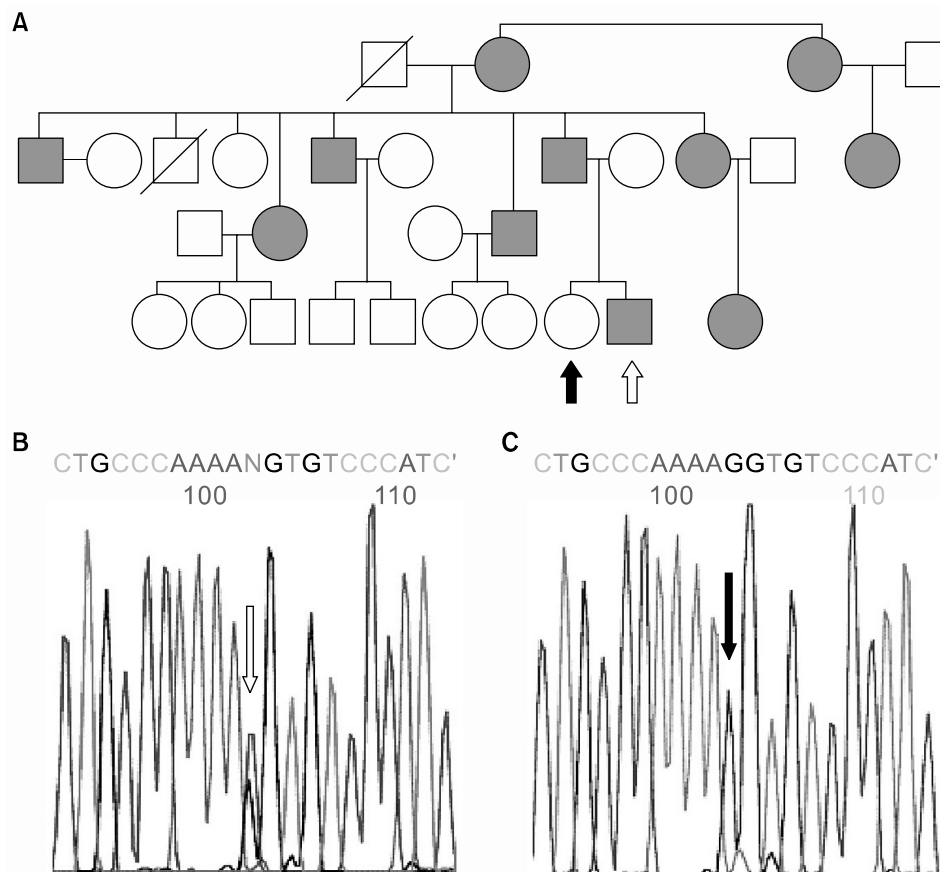


Fig. 4. Pedigree and electropherograms showing genetic alterations of *MYH9* gene in the Family IV. The candidate exons of *MYH9* in the affected patients and in their normal siblings were subjected to genotyping after PCR amplification. (A) Pedigree shows the typical autosomal dominant trait of penetration. (B, C) Electropherogram showing the alteration of single nucleotide in the 10th exon in the proband (white arrow in A & B), comparing with the normal sibling (black arrow in A & C). Genotyping of 10th exon shows the patient has two different alleles of cytidine (C) and guanosine (G).



Fig. 5. The linear protein structure was obtained from pfam (www.sanger.ac.uk) and the relative location of the mutations was pointed out. One mutation from the Family IV was located in the head portion of the myosin, while that of the Family I was at the tail portion of the protein.

고 찰

최근까지 ‘MYH9 연관성 질환’의 진단은 혈액형태학적 관찰로 혈소판의 크기와 수를 관찰하고, 백혈구 내의 봉입체의 존재 유무, 그리고 청력소실, 백내장, 혹은 신장침범 여부로 구분하였으나(Table 1)^{1,7,18)} 이러한 기준으로 환자를 분류하는 데에는 한계가 있다. 말초혈액 도말검사에서는 혈소판의 5~40%가 적혈구보다 큰 거대혈소판을 보이며, 대개 경한 정도에서부터 심한 정도까지 혈소판감소증을 가지고 있다.^{1,2)} 본 연구의 20명의 환자에서는 적혈구보다 큰 거대혈소판은 1~11%를 차지하였으나, 적혈구의 반 이상 되는 큰 혈소판까지 포함하면 2~44%까지 차지하였다(Table 2). MYH9 연관성 질환군의 대부분에서는 백혈구의 25~70%에서 중성구 내 봉입체를 관찰할 수 있는데 이는 감염 시 보이는 Döhle body와 비슷하여 ‘Döhle-유사소체’라 칭하며 본 연구에서는 3 가족에서 관찰되었다(Fig. 1, Table 3). 이 봉입체의 전자현미경적 미세구조로 May-Hegglin anomaly와 Sebastian 증후군을 감별할 수 있으나⁷⁾ 본 연구에서는 미세구조 연구는 시행하지 않았다.

본 연구에서 관찰된 환자들의 혈소판 수치는 자동혈구계수기로 측정한 결과 중앙값 61,000/ μ L로 1명을 제외한 19명에서 감소 소견을 보였다. 특기할 사항으로 제I 가족의 IC와 ID 환자는 각각 IA 환자의 26세 된 고모와 59세 된 할머니로서(Fig. 2) 만성 특발성 혈소판감소성 자반증으로 수년째 치료를 받고 있었는데 IC 환자는 면역억제제로서 cyclophosphamide를 경구 투여하고 있었고, ID 환자는 비장적출술을 시행하였어도 전혀 치료에 반응을 하지 않고 있었다. 그러다가 IA 환자도 혈소판이 감소됨을 알고 유전성 질환여부를 찾게 되어 진단되었다. 또한 제IV 가족의 한 환자에서도(혈액 검사 시행 못함) 만성 혈소판감소성 자반증으로 비장적출술을 시행하였으나 전혀 호전이 없었다. 그 외의 여러 환자에서도 혈소판감소증의 진단으로 감마글로불린 투여 및 반복적인 검사 및 추적 관찰을 하고

있었는데 이는 자동혈구계산기에 의해 정상보다 큰 혈소판이나 거대혈소판을 혈소판으로 인지하지 못하여 실제보다 혈소판 수를 낮게 인식하여 오진을 초래하였을 것으로 생각된다. 따라서 혈소판감소성 자반증이 있는 환자에서 특히 가족력이 있을 때는 말초혈액도말 검사를 시행하여 직접 혈소판의 크기와 수, 그리고 백혈구의 봉입체의 존재 유무를 확인하여야 할 것이다.

MYH9 연관성 질환군에서 볼 수 있는 증상들로는 출혈경향, 고주파 청력감소, 망막침범과 백내장을 보일 수 있다. 출혈 경향은 대개는 경하나, 드물게는 생명을 위협하는 출혈이 있을 수 있다. 출혈 경향은 신생아기부터 나타날 수 있으며, 쉽게 멍이 들거나, 월경과다, 코피가 나는 것이 가장 흔한 증상이다. 신장 침범, 청력감소, 시력 감소의 발생시기는 신생아 초기에서부터 성인까지 다양하게 나타난다. 신장침범의 정도는 현미경적 혈뇨에서 말기 신부전까지 다양할 수 있는데,^{1,2)} 본 연구에서도 제V 가족의 V B 환자는 10대 후반부터 양측 청력이 감소하였고, 34세 때 만성 신부전으로 진단 받았으나, VA 환자는 8세로 아직 청력과 신장기능의 이상은 보이지 않았다. 또한 제IV 가족에서도 IV B 환자는 30대 중반부터 중등도의 단백뇨가 있었으나 80세의 할머니(환자 IV D)를 포함한 그 가족의 다른 환자에서는 청력 및 신장기능의 이상은 없었다. 이처럼 한 가족 내에도 신장 질환 등의 동반 여부가 달랐고, 혈액학적 소견의 심한 정도가 다른 것은 개인에 따라, 또한 나이에 따라 질환의 표현도가 다른 것으로 생각되었다.

본 질환의 분자생물학적 진단을 보면 1999년에 Kunishima 등¹⁹⁾이 genome-wide linkage 분석을 통하여 May-Hegglin anomaly의 유전자가 22번 염색체 장완의 22q12.3-q13.2의 13.6-cM 부위에 위치한다고 밝혔고, Kelly 등^{8,20)}이 본 질환에서 NMMHC-A를 암호화하는 MYH9 유전자의 이상을 밝혔다. 계속되는 linkage 분석연구와 유전자 검사에서 May-Hegglin anomaly 이외에 과거에 Sebastian 증후군 및 Fechtner 증후군이라고 알려진 봉입체를 동반한 상염색체 우성 거대혈소판 증후군에서도 동일한 22번 염색체 장완 12~13에 위치한

NMMHC-IIA의 돌연변이를 밝혔다.^{4,21)}

NMMHC-IIA는 MYH9에 의해 암호화 되는데 혈소판, 신장, 백혈구 그리고 와우각에서 표현되는데 비해²²⁾ 또 다른 NMMHC인 NMMHC-B는 17q13 위치의 유전자에 의해 암호화 된다.²³⁾ 두 유전자는 모두 7.5Kb의 길이를 가지고 있는데, 아미노-터미널 1/3 (아미노산 58~718)에서는 두 유전자가 아미노산 단계에서 89% 동일하고 핵산 단계에서는 74%가 동일하다. NMMHC-IIA는 2개의 heavy chain과 4개의 light chain으로 이루어진 hexameric 효소인데, 두 heavy chain의 이합체화(dimerization)는 두 개의 극성 구조를 형성한다.^{1,24,25)}

2000년에 May-Hegglin/Fechtner 증후군 컨소시엄에서는 May-Hegglin anomaly, Sebastian 증후군, Fechtner 증후군을 갖는 서로 다른 가족의 7명의 환자 중에서 6개의 MYH9 돌연변이를 발견하였다.⁴⁾ 분자모델 연구에서 myosin 머리 부위를 침범한 2가지 돌연변이는 정전기(electrostatic) 그리고 입체형태(conformational) 변화를 초래할 것으로 예측되었고, 절단(truncated) 돌연변이는 카르복시-터미널의 꼬리부위(tailpiece)를 소실할 것으로 예측되었다. 그 외의 다른 과오돌연변이(missense mutation)는 모두 잘 보존된 coiled-coil 도메인을 침범하여 정전기를 불안정화시켜 극화 변화를 초래하였다.⁴⁾ 또한 Kelly 등²⁰⁾은 May-Hegglin anomaly 환자에서 linkage 분석을 통해 MYH9를 선별검사하여 α -helical coiled-coil 부위 혹은 tailpiece 도메인에 위치한 3가지 염기서열 변형을 발견하였다. Kunishima 등²⁶⁾도 아시아인 가족들에서 3가지 과오돌연변이, 한 가지 nonsense 돌연변이, 그리고 한 가지 조기종결을 초래한 deletion 돌연변이 등 총 6가지 돌연변이를 발견하였다. 최근까지 서로 다른 77가족에서 22가지 다른 MYH9 돌연변이가 보고되었는데, 이들은 각각 1, 10, 16, 25, 26, 30, 38, 40번 등 8개의 exon에 분포하고 있다.^{4,8,10,12,26-28)} 이들 돌연변이의 위치와 이에 따른 아미노산의 변화는 Table 3에 열거하였다. 이들 중의 대부분은 과오돌연변이나, 작은 inframe deletion, nonsense, frameshift 돌연변이도 소수에서 보고되었다.^{1,4,8,10,26,27)}

돌연변이가 발생한 부위와 임상양상과의 관계를 알아보려는 연구들이 있었는데, myosin의 N-terminal은 motor 도메인으로 이곳의 돌연변이는 심한 신장 질환과 관계가 있고, coiled-coil domain의 C-terminal의 돌연변이는 신장 질환이 없는 경우에서 주로 관찰된다고 하였다. 하지만 같은 돌연변이가 서로 다른 표현형을 초래할 수 있는데, 이는 변형된 MYH9 유전자와 상호

작용하는 유전자들과의 복잡한 작용 때문임을 시사하는 소견이다.^{1,4,26,29)}

본 연구에서는 기존에 알려진 exon 1, 10, 16, 25, 26, 30, 38, 40번 등 8개 exon의 11개의 보고된 MYH9 돌연변이를 직접 염기서열분석을 시행하여 제I 가족과 제IV 가족에서 기존에 알려진 돌연변이를 발견할 수 있었다. 제I 가족에서 관찰된 Arg1944Ter 돌연변이는 Martignetti 등³⁰⁾이 2000년에 보고한 MayHegglin 이태리 가족과 동일한 돌연변이였다. 제IV 가족에서 관찰된 Lys373Asn 돌연변이는 Heath 등²⁷⁾이 2001년에 보고한 독일계 가족과 동일한 돌연변이였다. 본 연구에서 밝혀진 돌연변이의 상대적 위치를 기존에 알려진 다른 기능성 모티프(motif)와의 연관성으로부터 일차원적 단백질 구조에 대한 기능을 예측하게 하는 Pfam으로부터 알아보았는데 제IV 가족에서 원인이 되었던 Lys373Asn는 myosin globular head 부위에 위치하였고, 제I 가족에서 원인이 되었던 Arg1944는 tail 부위에 위치하였다(Fig. 5).

본 연구에서 electrophoretogram 분석상 정상인의 대립유전자와 돌연변이된 대립유전자가 이형(heterogeneous)소견을 보였는데 이는 한 개의 세포 내에서 정상 MYH9 단백질과 돌연변이형 단백질이 공존함을 의미하였는데, 상염색체 우성유전 질환에서는 하나의 대립유전자에 의한 정상 단백질 또 다른 대립유전자에 의한 변형된 단백질에 의해 dominant negative 양상의 억제를 보임으로 질병이 초래할 수 있다.^{31,32)}

본 실험에서 돌연변이에 의한 단백질 기능상 중요함을 알아보기 위하여 하위동물의 상동유전자와 같은 개체 내에서 gene duplication에 의해 생성된 paralogous 단백을 찾아 그 sequence homology를 비교하였다. 생명체가 수십만 년에 걸쳐 진화해 오는 도중 겪는 많은 돌연변이 중 전체 단백질의 기능에 아주 중요한 부위의 돌연변이는 '선택(selection)'과정을 통해 잘 보존(conserved)되어 있고, 또한 세포 기능에 중요한 단백질일수록 gene duplication과정을 통해 비슷한 구조를 가진 비슷한 단백질을 만들므로 기능에 필수적인 아미노산들은 거의 원형과 비슷하게 유지된다.³³⁾ 본 연구에서 제I 가족에 해당하는 Arg1944와 제IV 가족에 해당하는 Lys373은 하위 동물의 상동유전자와 paralogous 유전자 단백질에서 잘 보존되어 있어 기능상 중요한 아미노산임을 알 수 있었다.

NMMHC-IIA는 정상인의 세포에서는 균일하게 분포되어 있는 데 반해, 본 질환군에서는 Döhle-유사소체 안에 밀집되어 있고,³³⁾ NMMHC-IIA에 대한 특이

항체를 이용한 면역조직화학검사에서도 Döhle-유사소체 내에 존재하는 것으로 확인되었다.^{3,33)} 최근에 Kunishima 등³⁾은 NMMHC-IIA의 다클론성 항체를 이용한 면역형광분석을 통해 백혈구 내 NMMHC-IIA 과립의 숫자, 크기 및 모양으로 MYH9-연관 질환군을 3가지로 분류할 수 있음을 시사하였다.

본 연구에서 제II, III, V 가족에서는 기존에 알려진 exon의 돌연변이를 찾을 수가 없었다. 이들에게서 새로운 돌연변이를 알아내기 위한 방법으로는 단백체로부터 mRNA를 분리한 후 총 cDNA를 합성한 후 이를 여러 개의 겹치는 부위로 나누어 PCR을 시행하여 의심이 가는 exon의 amplicon을 직접 염기분석을 시행해 볼 수 있을 것이다. 또한, 최근에 Toren 등³⁴⁾은 임상적으로 May-Hegglin anomaly가 의심된 환자에서 MYH9이 아닌 fibulin-1 유전자의 변형이 연관되었음을 보고하였다. 따라서 MYH9 이외의 유전자의 유전적 변이도 연구를 해보아야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 임상적 소견과, 혈액학적 소견으로 상염색체 우성유전 거대혈소판증후군 5가족을 발견할 수 있었으며, 이들 중 2가족에서 NMMHC-IIA를 암호화하는 MYH9 유전자의 돌연변이를 알 수 있었다. 본 질환이 의심되는 경우, 가족들도 말초혈액도말검사를 시행하여 혈소판의 크기와 수, 그리고 백혈구의 봉입체의 존재 유무를 확인함으로써 본 질환에 이환된 환자를 파악하여 특발성 혈소판감소증 등으로 오인에 의한 불필요한 검사나 치료를 막을 수 있고, 청력, 시력, 그리고 신장기능에 대한 적절한 검사와 악화를 늦추거나 예방할 수 있는 방법을 모색할 수 있을 것이다.

요 약

배경: 유전성 거대혈소판증후군은 현재까지 14종류가 밝혀진 드문 질환 군으로 유전양상, 임상증상, 구조이상 및 유전자 이상에 따라 구별할 수 있다. 본 연구에서는 전남대학교병원에서 진단받은 5가족 20명의 유전성 거대혈소판증후군 환자들을 대상으로 이들의 임상양상, 유전양상을 관찰하여 이에 따른 분류를 시도하고 이들의 병인으로 알려진 MYH9 유전자의 돌연변이 양상을 관찰하여 국내 거대혈소판 증후군의 특징을 알아보고자 하였다.

방법: 환자와 가족에서 자세한 문진을 시행한 후 말초혈액을 채취하여 슬라이드 도말하여 혈소판 크기와 수를 관찰하였고, 백혈구 내에 봉입체의 존재유무를

확인하였다. NMMHC-IIA를 암호화하는 MYH9 유전자의 돌연변이를 알아보기 위하여 말초혈액의 단백체포를 분리하여 기존에 알려진 8개의 exon에 대해 genomic DNA를 중합효소연쇄 반응을 한 후 염기분석을 시행하였다.

결과: 총 5가족 중 본원에서 검사를 시행한 가족 36명 중 유전성 거대혈소판증후군으로 진단 받은 환자는 20명이었다(제I 가족 5명 중 4명; 제II 가족 4명 중 2명; 제III 가족 9명 중 6명; 제IV 가족 14명 중 6명; 제V 가족 4명 중 2명). 이들의 유전 양식은 모두 상염색체 우성유전이었다. 혈액도말상 적혈구보다 큰 거대혈소판은 평균 3.1% (범위 1~11%), 그리고 적혈구 크기 반 이상인 큰 혈소판은 평균 18.1% (범위 1~40%)이었다. 환자의 혈소판 수의 중앙값은 61,000/ μ L (범위, 4,000~280,000/ μ L)이었다. 백혈구 내의 Döhlelike 봉입체는 제I, II, III 가족의 환자에서 관찰되었다. 제V 가족의 아버지는 만성신부전과 청력장애 소견이 있었고, 제IV 가족의 아버지도 청력장애와 단백뇨의 소견이 있었다. 총 5가족 중 제I, IV 가족에서 기존에 알려진 돌연변이를 확인할 수 있었다. 제I 가족은 40번 exon에 해당하는 5,797번째 nucleotide가 C 대신 T 또는 C로 치환되어 Arg1944Ter 돌연변이를 일으켰고, 제IV 가족에서는 10번 exon에 해당하는 1,119번째 nucleotide가 G 대신 G 또는 C로 치환되어 Lys373Asn 돌연변이를 유발하였다. 1,944번째 아미노산은 MYH9 유전자의 단백질 구조상 tail 부분에 해당하며 Arg1944 Ter 변이에 의해 1,960개의 아미노산 중 32개의 아미노산이 짧게 truncation되었다. Lys373 부분은 myosin head 부분에 해당하며 이들이 rat, mouse, xenopus, chicken 등의 species와 사람의 NMMHC-IIB에서 잘 보존(conserved)되어 있어 구조적으로 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. Arg1944Ter와 Lys373Asn 돌연변이는 환자에게서만 관찰되었고, 가족 내 정상인 및 환자 가족과 관련이 없는 일반 정상인에서는 전혀 관찰되지 않았다.

결론: 본 연구에서 국내에도 상염색체우성유전 거대혈소판증후군 환자가 상당수 있음을 알 수 있었고, 이들의 진단을 위해 가족력 청취와 혈액도말 현미경 검사의 중요성을 알 수 있었다. 5가족 중 2가족에서 기존에 알려진 돌연변이 Arg1944Ter과 Lys373Asn을 발견할 수 있었으나, 다른 가족에게서도 기존에 알려지지 않은 돌연변이를 찾는 노력을 시행하여야 하고 이들 돌연변이에 의한 단백질의 구조나 기능 변화에 대한 연구도 필요할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Balduini CL, Iolascon A, Savoia A. Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy. *Haematologica* 2002;87:860-80.
- 2) Mhaweche P, Saleem A. Inherited giant platelet disorders. Classification and literature review. *Am J Clin Pathol* 2000;113:176-90.
- 3) Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, et al. Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Lab Invest* 2003;83:115-22.
- 4) Seri M, Cusano R, Gangarossa S, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000;26:103-5.
- 5) Peterson LC, Rao KV, Crosson JT, White JG. Fechtner syndrome: a variant of Alport's syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia. *Blood* 1985;65:397-406.
- 6) Epstein CJ, Sahud MA, Piel CF, et al. Hereditary macrothrombocytopathia, nephritis and deafness. *Am J Med* 1972;52:299-310.
- 7) Greinacher A, Nieuwenhuis HK, White JG. Sebastian platelet syndrome: a new variant of hereditary macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *Blut* 1990;61:282-8.
- 8) Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL, Korczak JF. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet* 2000;26:106-8.
- 9) Kunishima S, Kojima T, Matsushita T, et al. Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood* 2001;97:1147-9.
- 10) Seri M, Savino M, Bordo D, et al. Epstein syndrome: another renal disorder with mutations in the nonmuscle myosin heavy chain 9 gene. *Hum Genet* 2002;110:182-6.
- 11) Lalwani AK, Goldstein JA, Kelley MJ, Luxford W, Castelein CM, Mhatre AN. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet* 2000;67:1121-8.
- 12) Seri M, Pecci A, Di Bari F, et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:203-15.
- 13) Lee AN, Nam CH, Kim BS, Song KS. A family case of May-Hegglin anomaly. *Korean J Hematol* 1992;27:195-9.
- 14) Lee HY, Seo JJ. Ultrastructural and functional study on the platelet of May-Hegglin anomaly. *Korean J Pediatr Hematol-Oncol* 1995;2:62-73.
- 15) Song KS, Choi JR, Song JW, Ha SK. A nonsense C5797T (R1933X) mutation of MYH9 gene in a family with May-Hegglin anomaly. *Korean J Hematol* 2001;36:253-6.
- 16) Baek HJ, Kook H, Byun HS, et al. MYH9-related disorder in a family (Autosomal dominant Epstein giant platelet syndrome). *Korean J Pediatr Hematol-Oncol* 2003;10:99-104.
- 17) Park JA, Kim EK, Park ES, et al. A case of Fechtner syndrome. The 54th annual fall meeting of Korean Pediatric Society 2004:258.
- 18) Gershoni-Baruch R, Baruch Y, Viener A, Lichtig C. Fechtner syndrome: clinical and genetic aspects. *Am J Med Genet* 1988;31:357-67.
- 19) Kunishima S, Kojima T, Tanaka T, et al. Mapping of a gene for May-Hegglin anomaly to chromosome 22q. *Hum Genet* 1999;105:379-83.
- 20) Kelley MJ, Jawien W, Lin A, et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly) is linked to chromosome 22q12-13. *Hum Genet* 2000;106:557-64.
- 21) Toren A, Rozenfeld-Granot G, Rocca B, et al. Autosomal-dominant giant platelet syndromes: a hint of the same genetic defect as in Fechtner syndrome owing to a similar genetic linkage to chromosome 22q11-13. *Blood* 2000;96:3447-51.
- 22) Marigo V, Nigro A, Pecci A, et al. Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains. *Genomics* 2004;83:1125-33.
- 23) Simons M, Wang M, McBride OW, et al. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* 1991;69:530-9.
- 24) Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000;1496:3-22.
- 25) Strehler EE, Strehler-Page MA, Perriard JC, Periasamy M, Nadal-Ginard B. Complete nucleotide and encoded amino acid sequence of a mammalian myosin heavy chain gene. Evidence against intron-dependent evolution of the rod. *J Mol Biol* 1986;190:291-317.

- 26) Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, et al. Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *J Hum Genet* 2001;46:722-9.
- 27) Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, et al. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:65-74.
- 28) Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et al. Non-muscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2001;69:1033-45.
- 29) Ghiggeri GM, Caridi G, Magrini U, et al. Genetics, clinical and pathological features of glomerulonephritis associated with mutations of nonmuscle myosin IIA (Fechtner syndrome). *Am J Kidney Dis* 2003;41:95-104.
- 30) Martignetti JA, Heath KE, Harris J, et al. The gene for May-Hegglin anomaly localizes to a <1-Mb region on chromosome 22q12.3-13.1. *Am J Hum Genet* 2000;66:1449-54.
- 31) Hu A, Wang F, Sellers JR. Mutations in human non-muscle myosin IIA found in patients with May-Hegglin anomaly and Fechtner syndrome result in impaired enzymatic function. *J Biol Chem* 2002;277:46512-7.
- 32) Lodish H, Berk A, Matsudaira P, et al. Chap. 9: Molecular genetic techniques and genomics. In: *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman and Company, 2004:351-403.
- 33) Pecci A, Noris P, Invernizzi R, et al. Immunocytochemistry for the heavy chain of the non-muscle myosin IIA as a diagnostic tool for MYH9-related disorders. *Br J Haematol* 2002;117:164-7.
- 34) Toren A, Rozenfeld-Granot G, Heath KE, et al. MYH9 spectrum of autosomal-dominant giant platelet syndromes: unexpected association with fibulin-1 variant-D inactivation. *Am J Hematol* 2003;74:254-62.