

Phenotypic Analysis of Neurofilament Light Chain E397K Mutant in Cultured Cells

Sung-Kuk Kim and Jong-Soo Chang[†]

Department of Life Science, College of Natural Science, Daejin University, Kyeonggido 487-711, Korea

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is known as one of the inherited disorder of peripheral nervous system. Recently, it was found that point mutations in the neurofilament light subunit (NF-L) gene cause CMT. Neurofilaments (NFs) are heteropolymers consist of NF-L, NF-M and NF-H. To assess the relationship between CMT and NF-L mutation in cellular level, we performed phenotypic analysis of the mutant NF-L (E397K) using cultured cell lines. Vimentin-deficient human adrenal carcinoma SW13 (Vim-) cells have a potential to form the intermediate filaments when the cells are expressing both NF-L and NF-M. Our results show that co-expression of wild type NF-L with NF-M showed intermediate filament formation in SW13 (Vim-) cells, while E397K with NF-M did not. This result means that E397K mutant lost its ability to form the intermediate filament *in vivo*, and further suggests that the E397K mutation is closely related to CMT.

Key Words: Neurofilament light chain subunit, Charcot-Marie-Tooth, Intermediate filament, E397K, SW13 cells, PC12 cells

서 론

신경섬유 단백질은 축삭의 발달과 구조유지에 있어 중요한 역할을 하는 중간섬유이다. 신경섬유 단백질은 크게 세 가지의 소단위체로 구성되는데, 각각의 소단위체는 단백질 분자량에 따라 200 kDa의 heavy (NF-H), 160 kDa의 middle (NF-M) 그리고 68 kDa의 light chain (NF-L)으로 구분된다. 각 소단위체는 모두 세 영역으로 구성되는데 α -나선이 풍부한 중심부의 rod 영역, 아미노 말단 부위의 head 영역 그리고 카복시 말단 부위의 tail 영역이다 (Lee and Cleveland, 1996; Grant and Pant, 2000). 이 중에서 아미노 말단 부위에 존재하는 head 영역은 이차전령에 의존하는 단백질 키나아제에 의하여 인산화됨으로서 필라멘트의 조립을 조절하는 영역으로 알려져 있다 (Pant and Veeranna, 1995). 세 가지 소단위체 중에서 NF-L은 *in vitro*에서도 자가조립을 할 수 있으나 (Geisler and Weber, 1981; Leem and Hutchison, 1982), NF-M이나 NF-H는 그렇지 못하다. *In vivo*에서는 자가조립된 NF-L이 NF-M이나 NF-H와 다시 조립됨으로써 이형 중합체의 완전한 신경섬유를 형성한다 (Ching and Liem, 1993;

Lee and Cleveland, 1996).

Charcot-Marie-Tooth (CMT)라는 신경질환은 피질 신경계가 파괴되어 일어나는 유전병이다 (Suter and Scherer, 2003; Perez-Olle et al., 2002; Shy et al., 2006). 또한 CMT는 근육에 연결되어 있는 뉴런의 퇴화로 인하여 근육 조절의 상실과 근육의 약화 등으로 나타나는 근위축증을 유발하기도 한다 (Fuch and Weber, 1994; Grant and Pant, 2000; Al-Chalabi and Miller, 2003). 최근에 와서, CMT 환자들의 DNA를 조사한 결과, 이들의 NF-L 소단위체의 일부 아미노산이 돌연변이 되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Mersiyanova et al., 2000; De Jonghe et al., 2001; Jordanova et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). CMT 환자에서 나타난 최초의 NF-L 소단위체 돌연변이는 NF-L 단백질의 rod 영역에서 나타났고, 두 번째 돌연변이는 NF-L 소단위체의 head 영역에서 보고되었다 (Mersiyanova et al., 2000; De Jonghe et al., 2001). 그 외 CMT 환자들에서 광범위하게 나타나는 NF-L 소단위체 유전자의 돌연변이가 지속적으로 보고되고 있다 (Georgiou et al., 2002; Jordanova et al., 2003; Yamamoto et al., 2004; Züchner et al., 2004). E7K, P8R 및 E22T는 head 영역에 위치하였고, N97S와 Q333P는 rod 영역에 존재하였다. 그리고 D469N과 E528del은 tail 영역에 위치하고 있었다.

이에 본 연구에서는 위에서 보고된 NF-L 소단위체의 돌연변이 유전자를 제작한 후 이를 배양세포에서 발현시켜 봄으로서 그 표현형을 야생형 NF-L의 것과 비교 분석하고자 하였다. 즉, 지금까지 보고된 CMT와 관련한 NF-L 돌연변이는

*논문 접수: 2006년 9월 25일
수정재접수: 2006년 11월 13일

[†]교신저자: 장종수, (우) 487-711, 경기도 포천시 선단동, 대진대학교 자연과학대학 생명과학과
Tel: 031-539-1853, Fax: 031-539-1850
e-mail: jchang@daejin.ac.kr

그 환자에서 분리한 DNA를 직접 분석한 것이다. 따라서 이들 돌연변이체 유전자를 직접 제작한 후 이를 배양 중인 세포에서 발현해 봄으로서 그 표현형이 정상적으로 나타나는지 그렇지 않은지를 세포수준에서 확인하고자 하였다. 그 이유는 알려진 NF-L 돌연변이가 실제로 CMT와 관련이 있는지를 세포수준에서 확인할 수 있기 때문이다. 실험방법은 SW13 세포주를 이용하는데 이 세포주는 사람의 adrenal carcinoma 세포주 (Sarria et al., 1994)로서 중간섬유인 vimentin을 가지고 있는 것 (Vim+)과 그렇지 않은 것 (Vim-)이 있는데 후자인 vimentin이 결실된 세포주 (Vim-)는 설치류 (rodent)의 NF-L의 경우 이를 NF-M 혹은 NF-H와 동시에 발현시킬 경우 세포 내에서 중간섬유를 형성할 수 있는 특징을 가지고 있다 (Ching and Liem, 1993; Lee et al., 1993). 그러나, 사람의 NF-L을 암호화하는 유전자는 NF-L 단독으로도 SW13 세포에서 중간섬유를 형성하는 것으로 나타났다 (Carter et al., 1998).

본 연구에서는 최근에 새로이 보고된 변이형 NF-L 중의 하나인 E397K (Züchner et al., 2004)의 중간섬유 형성능을 분석하고자 하였다. Rat NF-L 유전자를 주형으로 하여 E397K를 제작한 후 이를 SW13 (Vim-) 세포에서 NF-M과 동시에 발현시킴으로서 이 변이형 단백질이 형성하는 중간섬유를 야생형의 NF-L/NF-M이 형성하는 중간섬유와 비교 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

PC12 세포의 배양은 Gibco사 (USA, California)에서 구입한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 5%의 horse serum, 10%의 fetal bovine serum 그리고 100 U의 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 배지에서 37°C로 유지하여 배양하였다. 사람 신장 암 세포주인 SW13 세포는 역시 Gibco의 RPMI-1640에 10%의 FBS를 첨가한 배지에서 배양하였다.

2. DNA construction

야생형 NF-L과 E397K NF-L의 중간섬유 표현형의 차이를 비교하기 위하여 rat NF-L 소단위체 유전자 (ATCC에서 구입)를 이용하여 재조합 DNA를 제작하였다. 야생형 NF-L 유전자는 양 말단에 EcoRI과 SalI 제한 효소 영역이 포함된 primer를 이용하여 유전자를 증폭한 후, 이를 각각 GST 발현 벡터 (GST-5x-1; Amersham Pharmacia Biotech), 녹색 형광 단백질 (GFP)이 발현되는 벡터 (pEGFP-C2; Clontech) 및 FLAG epitope이 표시된 벡터 (pFLAG CMV-2; Sigma) 등에 재조합하였다. 각 재조합 벡터들의 구체적인 제작과정은 다음과 같다. E397K 돌연변이 NF-L은 PCR을 기초로 한 site-

directed mutagenesis로 제작하였다. 먼저, GST 벡터에 재조합한 야생형 NF-L 유전자를 주형으로 하여 397번 글루탐산이 리신으로 치환되도록 primer를 제작 (5'-TTCGCCTTCAAG-AGTTT-3', 5'-AACTCTTGAAAGGCGAA-3')하여 E397K NF-L 유전자를 얻어낸 후 이를 EcoRI과 SalI 제한 효소를 이용하여 GST 벡터에 먼저 재조합한 다음 이를 다시 pFLAG CMV-2 벡터에 삽입하여 발현되는 단백질의 아미노 말단에 9개의 아미노산으로 구성된 FLAG epitope을 부가하였다. 이 재조합 벡터를 사용해 다시 PCR을 실시하여 FLAG이 부가된 각각의 NF-L cDNA를 pEGFP C-2 벡터에 삽입하였다. 또한 rat NF-M cDNA (Columbia대학의 R.K.H. Liem 박사의 호의) 또한 EcoRI과 SalI 제한 효소를 이용하여 pFLAG CMV-2에 삽입하였다. 모든 재조합 벡터 DNA는 Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen Inc., Santa Claritia, CA)로 순수 분리하였고, 유전자 서열 분석법으로 발현 부위와 돌연변이 부분을 확인하였다.

3. Transfection

세포에 DNA를 transfection하기 위하여 6-well plate에 커버 글라스를 넣고 그 위에서 세포를 배양하였다. PC12 세포는 커버 글라스 위에서 잘 붙도록 하기 위하여 Gibco사의 poly-L-lysine을 coating하여 주었다. 커버 글라스 위에서 하루 동안 배양한 다음, Promega사 (Madison, WI)의 Profection mammalian transfection system을 사용하여 DNA를 transfection 하였다. PC12 세포에는 녹색 형광 단백질이 발현되는 pEGFP-NF-L과 pEGFP-NF-L E397K DNA를 2 M CaCl₂와 2 X HBS transfection 완충액 (50 mM HEPES, pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄)에 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후, 세포에 transfection하였다. 8시간 후에 glycerol shock 용액 (1 X HBS, 15 % glycerol)으로 자극을 주어 transfection 효율을 높여주었다. Transfection한지 48시간 만에 4% paraformaldehyde로 세포를 고정하고 세포를 형광 현미경으로 관찰하였다. 중간섬유 형성 여부를 관찰하기 위하여 사람 신장 암 세포주인 SW13 세포에 유전자를 transfection하였다. pEGFP-NF-L/pFLAG-NF-M 유전자와 pEGFP-NF-L E397K/pFLAG-NF-M 유전자를 각각 SW13 세포에 co-transfection 하였다. Transfection은 PC12 세포와 동일한 방법을 사용하였다. Transfection한지 48시간 만에 세포를 고정하였으며 고정된 세포를 anti-NF-M 항체로 1시간 동안 염색하였다. 이를 다시 rhodamine이 conjugation된 2차 항체로 30분간 염색한 후 세포를 mount하고 형광 현미경으로 관찰하였다.

4. Immunoblotting

SW13 세포에 transfection한 NF-M/NF-L 혼합 유전자가 정상적으로 발현되었는지 알아보기 위하여 immunoblotting을 수행하였다. 앞서 제작한 pREFA-FLAG-NF-L과 pREFA-

Table 1. Point mutations of NF-L subunit that cause CMT

Mutations of NF-L	Location	References
E7K	Head	Perez-Olle et al., 2004
P8R	Head	Brownlees et al., 2002
P22T	Head	Sasaki et al., 2006
N97S	Rod	Perez-Olle et al., 2004
Q333P	Rod	Brownlees et al., 2002
E397K	Rod	Züchner et al., 2004
D469N	Tail	Perez-Olle et al., 2002
E528del	Tail	Yamamoto et al., 2004

FLAG-NF-L E397K 돌연변이 유전자를 각각 pFLAG-NF-M 과 혼합하여 SW13 세포에 위와 동일한 방법으로 transfection 하였다. Transfection 한 후 48시간 만에 세포를 Igepal buffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Igepal CA-630, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM sodium orthovanadate)로 용해하여 단백질을 추출한 다음 BCA 법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 정량 후 30 µg을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 실시한 후, nitrocellulose membrane (PROTRAN, Germany)에 transfer하였다. Transfer 후 비특이적인 면역 반응을 없애기 위하여 5% non-fat dry milk (Bio-Rad, USA)를 이용해 막을 blocking하였으며, anti-FLAG 항체 (Sigma, USA)로 2시간 동안 1차 항체 반응을 하였다. 이후 1차 항체를 특이적으로 인식하는 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-mouse 항체 (Santacruz, USA)로 반응한 다음, enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Pharmacia Biotech)으로 발색하여 X-ray 필름 (Kodak, USA)에 감광하였다.

결 과

1. CMT에서 나타나는 NF-L 돌연변이

CMT 환자들에게서 나타난 다양한 NF-L 돌연변이를 Fig. 1에 나타내었다 (Mersyanova et al., 2000; De Jonghe et al., 2001; Yoshihara et al., 2002; Georgiou et al., 2003; Jordanova et al., 2003; Sasaki et al., 2006; Züchner et al., 2004). 환자들에게서 나타난 돌연변이형 아미노산은 head 영역에서는 7번째 글루탐산이 리신으로, 8번째 프롤린이 아르기닌으로, 22번째 프롤린이 트레오닌으로 치환된 형태로 나타났다. Rod 영역에서는 97번째 아스파라긴이 세린으로, 333번째 글루타민이 프롤린으로 치환되었고, tail 영역에서는 469번째 아스파르트산이 아스파라긴으로, 그리고 528번째 글루탐산이 결손된 형태로 나타났다 (Fig. 1 및 Table 1). 위 돌연변이 아미노산 중

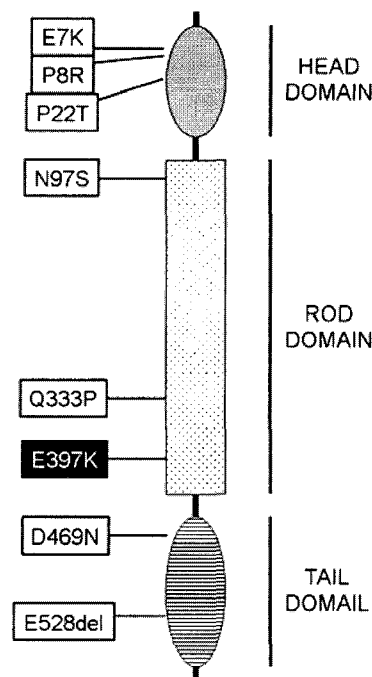


Fig. 1. NF-L mutations appeared in CMT disease.

E397K를 제외한 다른 유전자들은 이전 연구에서 CMT와 관련되어 있다는 것이 세포수준에서 확인된 바 있다: E7K (Perez-Olle et al., 2004), P8R (Brownlees et al., 2003), P22T (Sasaki et al., 2006), N97S (Perez-Olle et al., 2004), Q333P (Brownlees et al., 2002), D469N (Perez-Olle et al., 2002) 그리고 E528del (Yamamoto et al., 2004). 이에 본 연구에서는 가장 최근에 발견된 관계로 아직까지 세포수준에서 중간섬유의 형성능이 확인되지 않은 E397K 변이를 이용하여 중간섬유의 형성능을 확인하고자 하였다.

E397K NF-L 소단위체 유전자는 site-directed mutagenesis 법을 이용하여 PCR로 증폭한 후, 이를 야생형 NF-L과 함께 녹색 형광 단백질이 발현되는 pEGFP 벡터에 각각 융합하였다. 재조합 DNA 제작 후 유전자 서열 분석을 통해 397번째 글루탐산이 리신으로 치환되었음을 확인하였다 (Fig. 2).

2. SW13 세포에서 E397K 발현

야생형의 rat NF-L과 변이형 E397K의 중간섬유 형성능을 비교하기 위하여 이들 각각을 NF-M 유전자와 혼합하여 SW-13 (Vim-) 세포에 co-transfection하였다. Transfection 후 48시간이 경과한 시간에 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 고정된 세포는 다시 anti-NF-M 항체를 이용하여 염색하였고 다시 이를 rhodamine이 conjugation된 2차 항체로 염색하였다. Fig. 3A에 나타나는 immunocytochemistry image에서 보듯이, 야생형 NF-L은 정상적으로 중간섬유를 형성하는 것으로 나타났다 (Fig. 4A). 그러나 E397K은 정상적으로

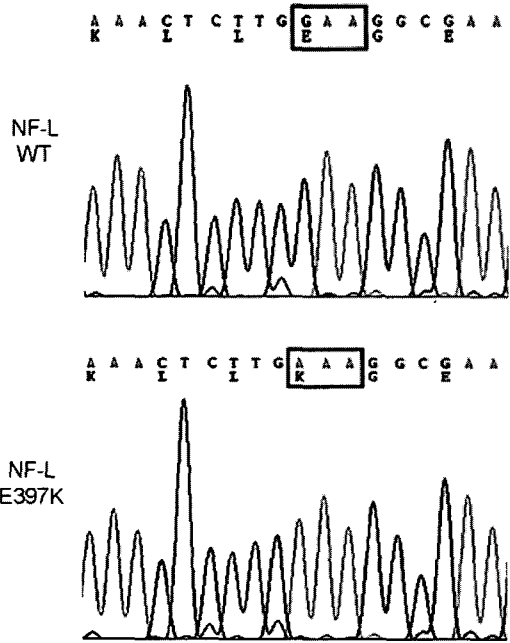


Fig. 2. The sequence analysis of wild-type and E397K NF-L gene.

중간섬유를 형성하지 못하고 NF-L과 NF-M 단백질이 세포질 전체에 흩어진 상태로 존재하는 것이 확인되었다. 이는 397번의 글루탐산이 리신으로 치환되면서 NF-L이 자가조립을 하지 못하기 때문인 것으로 판단된다. 야생형과 변이형 NF-L 그리고 NF-M의 발현 정도를 확인한 결과 이들 단백질들은 모두 SW13 세포에서 정상적으로 발현되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B).

3. PC12 세포에서의 E397K 발현

PC12 세포는 신경분화 연구에 있어서 유용하게 사용되는 세포주로서 신경성장 인자 (NGF)를 처리하면 세포는 neurites를 형성하게 된다. 녹색 형광이 발현되는 pEGFP C-2 벡터에 융합된 야생형의 NF-L 유전자와 변이형 E397K 유전자를 각각 PC12 세포에 transfection한 후 중간섬유의 형성 여부를 확인하였다. Fig. 4와 같이 PC12 세포에서는 야생형 NF-L과 E397K 둘 다 정상적으로 중간섬유를 형성함이 확인되었다. 야생형 NF-L 유전자는 PC12 세포 내부에 존재하는 NF-L과 작용하여 전구체 필라멘트를 형성하고 NF-M 혹은 NF-H와 상호작용 함으로써 신경섬유를 형성한 것으로 추측된다. E397K의 경우에도 PC12 세포에서는 정상적으로 신경섬유를 형성하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). E397K는 SW13 세포에서는 중간섬유를 형성하지 못하였으나 PC12 세포에서는 야생형과 마찬가지로 정상적으로 중간섬유를 형성하였는데 그 이유는 SW13 세포에는 오로지 변이형 E397K 단백질만 존재하는 반면에 PC12에서는 세포 자체가 보유하고 있는 야

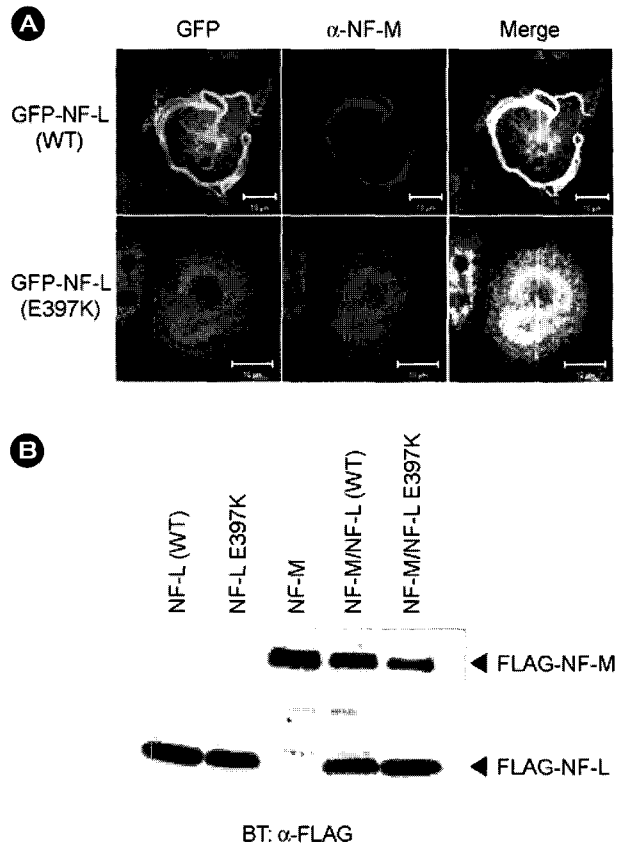


Fig. 3. Expressions of wild-type and E397K NF-L in SW13 cells. **A.** SW13 cells transfected with either pEGFP-NF-L (wild)/NF-M or EGFP-NF-L (E397K)/NF-M were stained with anti-NF-M followed by rhodamine-conjugated anti-mouse antibody. Bars, 10 μ m. **B.** The expression levels of NF-L and NF-M proteins in SW13 cells were measured by immunoblotting with α -FLAG antibody.

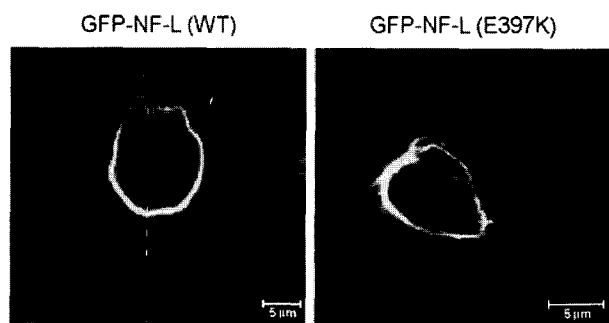


Fig. 4. Expressions of wild-type and E397K NF-L in PC12 cells. Forty eight hours later after transfection, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and observed with a confocal laser beam microscope. Bars, 5 μ m.

생형의 NF-L이 있어서 이 단백질과 자가조립된 것으로 판단된다.

고 찰

신경단백질 대사의 교란은 여러 가지 신경질환의 진행을 일으키는 원인 중의 하나가 된다. NF-H 소단위체의 돌연변이는 루게릭병의 요인이 되고 있음이 보고되었고 (Figlewicz et al., 1994; Tomkins et al., 1998; Al-Chalabi et al., 1999), 최근 연구에 따르면 NF-M 소단위체의 돌연변이는 파킨슨 질병에 대한 원인 중의 하나임이 알려졌다 (Lavedan et al., 2002). 또한 루게릭병이나 알츠하이머 등과 같은 몇몇 신경장애 질환에서는 신경섬유의 축적이 원인이 됨을 보고하고 있다 (Julien, 1999; Cleveland and Rothstein, 2001; Miller et al., 2002). 말초 신경이 퇴화되어 나타나는 근위축증인 CMT 질병 역시 신경 단백질의 돌연변이로 일어나는 대표적인 신경계통 질환 중의 하나이다 (Perez-Olle et al., 2002). 특히 CMT는 NF-L 소단위체 유전자의 돌연변이로 일어나게 되며, 이미 수많은 CMT 환자들에게서 NF-L 소단위체 유전자의 돌연변이가 일어나 있음이 밝혀졌다 (Mersivanova et al., 2000; De Jonghe et al., 2001; Yoshihara et al., 2002; Georgiou et al., 2003; Jordanova et al., 2003; Sasaki et al., 2006; Züchner et al., 2004).

본 실험에서 사용한 rat NF-L 소단위체의 397번 위치에 있는 글루탐산이 리신으로 치환된 돌연변이 역시 CMT 환자들에게서 나타난 돌연변이이다 (Züchner et al., 2004). SW13 (Vim-) 세포는 rat의 NF-L을 NF-M 혹은 NF-H와 공동발현시킬 경우에 세포수준에서 중간섬유를 형성할 수 있는 특징을 가지고 있고 (Ching and Liem, 1993; Lee et al., 1993), 여타의 중간섬유 단백질이 존재하지 않기 때문에 중간섬유 형성을 확인하는 데 있어 좋은 재료가 된다. 따라서 SW13 (Vim-) 세포 내부에서 형성된 중간섬유는 외부에서 transfection된 유전자가 발현되어 나타난 것이다. 이러한 점으로 인하여 야생형 NF-L 유전자와 CMT에 관련된 돌연변이 유전자가 발현되었을 때 나타나는 표현형으로 중간섬유 형성 여부를 관찰할 수 있는 것이다. 본 연구결과에서는 야생형 NF-L 유전자가 NF-M과 co-transfection되었을 때 정상적인 자가조립으로 인한 중간섬유 형성 이루어졌으나, 397번 아미노산이 돌연변이되면서 NF-L 소단위체의 자가조립이 저해되고 전구체 필라멘트를 형성하지 못하게 하여 결국 중간섬유 형성 능력이 파괴된 것으로 판단된다. 그러나 PC12 세포에서는 야생형 NF-L 소단위체 유전자와 E397K 유전자를 각각 transfection하였을 때 양쪽 모두에서 정상적인 중간섬유 (신경섬유)가 형성됨을 확인할 수 있었다. PC12 세포 속에는 본래 신경섬유 단백질인 NF-L, NF-M 그리고 NF-H가 모두 존재하기 때문에 돌연변이 된 E397K NF-L이 세포 내부의 정상적인 NF-L 단백질과 전구체 필라멘트를 형성하고 이후 NF-M 혹은 NF-H와 상호작용하여 중간섬유를 형성한 것으

로 생각된다. 결국 E397K는 정상적인 NF-L 단백질이 존재할 때에는 자가조립이 가능하지만 돌연변이 된 단백질끼리 즉, E397K만 존재할 때에는 자가조립을 할 수가 없다는 사실이 증명되었다. 따라서 본 연구에서 나타난 결과는 결국 NF-L의 397번 아미노산이 신경섬유 단백질 회합에 있어 중요한 역할을 하고 있다는 것을 보여주는 것이며, 나아가 이 아미노산이 돌연변이 되면 축삭돌기의 분화가 억제되어 CMT와 같은 신경질환을 유발할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

Rat NF-M의 cDNA를 제공해 주신 컬럼비아대학교의 Liem 박사께 감사드립니다. 이 연구는 대전대학교 교내 연구비 지원 (2006)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Al-Chalabi A, Anderson PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ CR, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 1999. 8: 157-164.
- Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 2003. 25: 346-355.
- Brownlee J, Ackerley S, Grierson AJ, Jacobsen NJ, Shea K, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC. Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport. *Hum Mol Genet.* 2002. 11: 2837-2844.
- Carter J, Gragerov A, Konvicka K, Elder G, Weinstein H, Lazzarini RA. Neurofilament (NF) assembly; divergent characteristics of human and rodent NF-L subunits. *J Biol Chem.* 1998. 273: 5101-5108.
- Ching GY, Liem RK. Assembly of type IV neuronal intermediate filaments in nonneuronal cells in the absence of preexisting cytoplasmic intermediate filaments. *J Cell Biol.* 1993. 122: 1323-1335.
- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci.* 2001. 2: 806-819.
- De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Evgrafov O, Timmerman V. Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann Neurol.* 2001. 49: 245-249.
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP. Variants of the heavy neurofilament

- subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 1994. 3: 1757-1761.
- Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994. 63: 345-382.
- Geisler N, Weber K. Self-assembly in Vitro of the 68,000 molecular weight component of the mammalian neurofilament triplet proteins into intermediate-sized filaments. *J Mol Biol.* 1981. 151: 565-571.
- Georgiou DM, Zidar J, Korosec M, Middleton LT, Kyriakides T, Christodoulou K. A novel sequence variants in the neurofilament-light gene in a Japanese population: analysis of Charcot-Marie-Tooth disease patients and normal individuals. *J Peripher Nerv Syst.* 2002. 7: 221-224.
- Grant P, Pant HC. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol.* 2000. 29: 843-872.
- Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, Takashima H, De Vriendt E, Ceuterick C, Martin JJ, Butler IJ, Mancias P, Papasozomenos SCh, Terespolsky D, Potocki L, Brown CW, Shy M, Rita DA, Tourné I, Kremensky I, Lupski JR, Timmerman V. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2003. 126: 590-597.
- Julien JP. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 1999. 9: 554-560.
- Lavedan C, Buchholtz S, Nussbaum RL, Albin RL, Polymeropoulos MH. A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci Lett.* 2002. 322: 57-61.
- Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci.* 1996. 19: 181-217.
- Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol.* 1993. 122: 1337-1350.
- Liem RK, Hutchison SB. Purification of individual components of the neurofilament triplet: filament assembly from the 70,000-dalton subunit. *Biochemistry* 1982. 21: 3221-3226.
- Mersyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet.* 2000. 67: 37-46.
- Miller CC, Ackerley S, Brownlees J, Grierson AJ, Jacobsen NJ, Thornhill P. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci.* 2002. 59: 323-330.
- Pant HC, Veeranna. Neurofilaments phosphorylation. *Biochem Cell Biol.* 1995. 73: 575-592.
- Perez-Olle R, Leung CL, Liem RK. Effects of Charcot-Marie-Tooth-linked mutations of the neurofilament light subunit on intermediate filament formation. *J Cell Sci.* 2002. 115: 4937-4946.
- Perez-Olle R, Jones ST, Liem RK. Phenotypic analysis of neurofilament light gene mutations linked to Charcot-Marie-Tooth disease in cell culture models. *Hum Mol Genet.* 2004. 13: 2207-2220.
- Reilly MM. Classification of the hereditary motor and sensory neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2000. 13: 561-564.
- Sarria AJ, Lieber JG, Nordeen SK, Evans RM. The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *J Cell Sci.* 1994. 107: 1593-1607.
- Sasaki T, Gotow T, Shiozaki M, Sakaue F, Saito T, Julien JP, Uchiyama Y, Hisanaga S. Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants. *Hum Mol Genet.* 2006. 15: 943-952.
- Shy ME, Garbern JY, Kamholz J. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurol.* 2002. 1: 110-118.
- Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci.* 2003. 4: 714-726.
- Tomkins J, Usher P, Slade JY, Ince PG, Curtis A, Bushby K, Shaw PJ. Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport* 1998. 9: 3967-3970.
- Yamamoto M, Yoshihara T, Hattori N, Sobue G. Glu528del in NEFL is a polymorphic variant rather than a disease-causing mutation for Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *Neurogenetics* 2004. 5: 75-77.
- Yoshihara T, Yamamoto M, Hattori N, Misu K, Mori K, Koike H, Sobue G. Identification of novel sequence variants in the neurofilament-light gene in a Japanese population: analysis of Charcot-Marie-Tooth disease patients and normal individuals. *J Peripher Nerv Syst.* 2002. 7: 221-224.
- Züchner S, Vorgerd M, Sindern E, Schroder JM. The novel neurofilament light (NEFL) mutation Glu397Lys is associated with a clinically and morphologically heterogeneous type of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromuscul Disord.* 2004. 14: 147-157.