

조기 난소 부전증(Premature Ovarian Failure, POF) 환자에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자 변이 및 발현 양상에 대한 분석

김정욱[†] · 염혜원 · 이형송 · 송견지 · 천강우 · 박용석 · 김계현¹

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식 생물학 및 불임연구실, ¹산부인과 불임클리닉

Analysis of Gene Mutation and Expression Level of Follicle Stimulating Hormone Receptor in Premature Ovarian Failure(POF) Patients

Jeong-Wook Kim[†], Hye-Won Youm, Hyoung-Song Lee, Gyun-Ji Song, Kang-Woo Chun, Yong-Seog Park and Kye-Hyun Kim¹

Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, ¹Department of OB/GYN,
Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Korea
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, 100-380, Korea

요 약: 본 연구에서는 조기 난소 부전증 환자를 대상으로 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 돌연변이와 발현 양상을 분석하였다. 돌연변이 분석을 위해 환자의 말초혈액에서 genomic DNA를 분리하고 nucleotide 566을 포함하고 있는 exon 7에 특이적인 primer쌍을 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 전기 영동으로 반응산물을 확인한 다음, 돌연변이 여부를 조사하기 위하여 제한효소 절단분석(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)을 시행한 결과, 대조군과 조기 난소 부전증 환자군 모두에서 돌연변이를 관찰할 수 없었다. 난포 자극 호르몬 수용체의 발현양상을 확인하기 위해 시험관아기 시술과정 중 난자 채취과정에서 얻어진 황체화 과립세포에서 total RNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 반응 산물을 전기 영동하여 발현양상을 비교해 본 결과, 대조군에 비해 조기 난소 부전증 환자군에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현이 다소 낮은 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 보아 조기 난소 부전증 환자에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 돌연변이는 발견할 수 없었으며 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현이 대조군에 비해 낮아 과배란 유도시에 생식소 자극 호르몬에 대해 저적응증을 보이며 난포형성과정에도 장애를 받는 것으로 사료된다.

ABSTRACT: This study was investigated to analyze the inactivating point mutation and expression level of follicle-stimulating hormone(FSH) receptor mRNA. In first experiment, we analyzed the point mutation. Peripheral blood was collected from each patient. To screen individuals for the C566T mutation, PCR was performed for exon 7 of the FSH receptor gene in 10 patients. No inactivating point mutation of FSH receptor gene was identified in women with premature ovarian failure. To analyze the expression level of FSH receptor, mRNA expressions were examined by RT-PCR method using specific primers for the FSH receptor. The amount of FSH receptor mRNA expressed in POF patients was lower than that in the control group. But it was not significantly different. These finding suggests that lower expression of FSH receptor in premature ovarian failure patients might be the cause of the low response to the gonadotropin during the hyperstimulation in IVF-ET cycles.

Key words: POF, FSH receptor mutation, FSH receptor mRNA, RT-PCR.

서 론

조기 난소 부전증은 40세 이전에 무월경, 여성호르몬저하, 그리고 생식소 자극 호르몬 분비증가를 보이는 질환이다.

본 연구는 1999년도 제일의료장학재단 연구비 지원으로 수행되었음.
[†]교신저자: 서울시 중구 목정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실 (우) 100-380 (전) 02-2000-7592 (팩) 02-2265-5621 e-mail: reskim@lycos.co.kr

Coulam 등(1986)의 보고에 따르면 40세 이전의 여성에서 약 10%, 30세 이전의 여성에서 약 1%의 빈도로 나타나며 전체 여성의 2~3%가 이에 해당한다. 지금까지 조기 난소 부전증의 원인으로는 원인불명이 약 60%, 염색체 이상이 약 23%, 그리고 효소부족, 생식소 자극 호르몬 이상, 자가면역질환, 물리적 요인 등이 나머지를 차지하는 것으로 보고되고 있어 (Conway, 1997) 아직까지 정확한 원인이나 치료방법에 대한 연구는 미미한 실정이다. 또한 이러한 조기 난소 부전증 환자들의 경우에는 시험관아기 시술을 위하여 생식소 자극 호

르몬을 이용하여 과배란을 유도하여도 난포의 성숙이 잘 진행되지 않아 난자 회수율도 매우 낮다.

최근에 난포 자극 호르몬 수용체의 돌연변이가 조기 난소 부전증 환자에서 발견되었다 (Aittomaki, 1994; Aittomaki et al., 1995; 1996). 이들의 보고에 의하면 난포 자극 호르몬 수용체 유전자 중 extra cellular domain을 coding하는 7번 exon에서 missense mutation이 일어나, 호르몬과 수용체의 결합능력이 저하되어 결과적으로 second messenger인 cAMP가 감소된다고 하였다. 그러나 이것은 특정 국가의 환자를 대상으로 한 연구였으며 후에 발표된 다른 논문들에서는 이러한 유전자의 돌연변이가 전혀 발견되지 않는 것으로 보아 (de Fonte Kohek et al., 1998; 남윤성 등, 1998; Conway et al., 1999) 이러한 돌연변이는 조기 난소 부전증의 직접적인 원인이 아닌 인종, 국가 특이적인 현상으로 생각된다. 그러므로 난포 자극 호르몬 수용체의 돌연변이가 아닌 발현양상의 차이가 이런 조기 난소 부전증의 원인이 될 수 있다는 것을 시사해 주지만 이러한 수용체의 발현양상에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 조기 난소 부전증 환자와 대조군으로 남성불임 요인만을 갖는 여성환자를 대상으로 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 돌연변이 여부를 제한효소 절단분석방법 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 방법을 이용하여 알아보았고, 과배란 유도시 획득된 황체화 과립세포에서의 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현 양상을 RT-PCR (역전사 중합효소 연쇄반응) 방법을 이용하여 분석 후 조기 난소 부전증의 원인과 난포 자극호르몬 수용체의 관계를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 연구대상

1998년 9월부터 1999년 12월까지 삼성제일병원 불임클리닉에서 시험관아기 시술을 받은 환자 중 40세 이전에 무월경을 보이고 난포 자극 호르몬이 15 mIU/ml 이상의 농도를 보이는 환자 10명을 대상으로 하였으며 남성불임요인만으로 시험관아기 시술을 받은 정상적인 난소기능을 갖는 여성환자 10명을 대조군으로 하였다.

2. 연구방법

1) 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 돌연변이 분석

(1) Genomic DNA의 분리

환자의 말초혈액을 항 응고제가 처리된 vacuum tube에 채취한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 buffy coat만을 분리한 다음, DNA 추출 전까지 -70°C 에 보관하였다. Genomic DNA는 QIAamp Blood Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)를 이용하여 추출하였으며 추출한 DNA는 PCR 수행 전까지 4°C 에 보관하였다.

(2) 돌연변이 분석을 위한 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

C566T point mutation을 분석하기 위하여 중합효소 연쇄반응에 사용한 primer쌍은 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 전체 염기서열 중 nucleotide 566을 포함하고 있는 exon 7에 특이적인 sense primer (5'-GTTATTCAGATGGCTGAATAAG-3')와 antisense primer (5'-GCTCATCTAGTTGGGTC-3')를 사용하였으며 반응은 최종 20 μl 에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 각 0.2 mM dNTP, 20 pmol의 primer Taq, 0.5 units의 Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany), 그리고 50~100 ng의 환자 genomic DNA를 혼합하여 수행하였으며 DNA thermal cycler (Stratagene, CA, USA)에서 처음 94°C 에서 2분간 반응한 후, 94°C 에서 40 초, 62°C 에서 1분, 72°C 에서 1분간 35회 수행한 후 최종적으로 72°C 에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 증폭산물은 5% polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석하였다.

(3) 제한효소 절단 분석 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

전기영동으로 PCR 산물을 확인한 다음 mutation 여부를 조사하기 위하여 각 환자의 PCR 산물 0.5~1 μg 과 1 U의 Bsm I (New England Biolabs, Inc., USA)을 혼합한 후 65°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합액은 10% polyacrylamide gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색한 다음 UV transilluminator (Spectrolin, TR-312A, BMS)를 이용하여 반응 산물을 확인하였다.

2) 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현양상 비교

(1) 과배란 유도 및 황체화 과립세포의 획득

난자를 획득하기 위한 과배란 유도는 FSH/hMG와 GnRH-agonist를 병용하여 사용하였으며, 18 mm 이상의 난포가 2개 이상 존재하는 경우 10,000 IU의 hCG를 주사하였고, 주사 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 난자 채취시 얻어진 황체화 과립세포는 50~90% percoll gradient

로 원심 분리하여 적혈구 세포로부터 순수하게 분리하였다.

(2) 황체화 과립세포에서 total RNA의 추출

Percoll을 이용하여 분리된 순수한 황체화 과립세포를 500 μ l의 Trizol이 들어있는 eppendorf tube에서 마쇄하여 상온에서 5분간 방치한 다음 100 μ l의 chloroform을 첨가하여 15초간 잘 섞어준 다음, 다시 상온에서 2~3분간 방치하고 10,000 g로 4°C를 유지한 상태에서 15분간 원심분리하였다. 상층액과 동량의 isopropyl alcohol을 잘 섞은 후, 10분간 상온에서 방치한 다음 원심 분리하여 상층액은 버리고 300 μ l의 70% 에탄올을 첨가하고 진탕한다. 다시 원심분리하고 상층액은 버리고 공기 중에서 건조시킨다. 20 μ l의 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 증류수와 1 μ l의 RNase free DNase를 첨가하고 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨다. 그 후 70 μ l의 DEPC 증류수와 100 μ l의 phenol : chloroform : isopropanol (v:v:v = 25 : 24 : 1)을 첨가하여 진탕한 후 원심 분리하여 상층액을 새 tube로 옮긴다. 동량의 chloroform을 첨가하여 앞의 과정을 반복한 후 상층액을 새 tube에 옮기고 0.1배의 10 M ammonium acetate와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하고 잘 섞어준 다음 -70°C에서 30분간 방치한다. 다시 원심 분리하고 상층액을 버린 후 100 μ l의 70% ice cold ethanol을 첨가하고 불순물을 없애준 다음, 20 μ l의 증류수를 첨가하고 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 -70°C의 초저온 냉동기에 보관한다.

(3) 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현양상 비교를 위한 역전사 중합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)

Total RNA 2 μ g을 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTPs (Behringer Mannheim, BMS), 0.5 μ M의 oligo (dT)₁₅ primer (Behringer Mannheim, BMS), 40 U의 RNase inhibitor (Behringer Mannheim, BMS), 12 U의 Reverse transcriptase (Behringer Mannheim, BMS), AMV (Behringer Mannheim, BMS)가 들어 있는 혼합액에 넣어 잘 섞은 후, thermal cycler (DNA thermal cycler, Perkin Elmer 480, BMS)에서 65°C에서 10분, 42°C에서 60분, 99°C에서 10분간 반응시켜 역전사 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 혼합액은 PCR 수행 전까지 -20°C에서 보관하였다. PCR증폭을 위해서는 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTPs, 각 0.5 μ M의 5', 3'-primers (Bio-Synthesis Inc. Lewisville, USA), 0.5 U의 Taq polymerase (Behringer Mannheim, BMS)와 2 μ l의 역전사 반응 산물을 혼합하여 20 μ l의 혼합물을 만들어 시행하였다 (Robo cycler gradient 96, Stratagene, CA, USA). 중합효소 연쇄반응은

난포 자극 호르몬 수용체의 경우, sense primer (5'-GGCTGC-TATA TCCACATCTACC-3')와 antisense primer (5'-CAGAA-CCAGCAGAATCTTTGC-3') 10 pM, Taq polymerase 0.1 unit를 이용하였다. 반응 조건은 첫 cycle에서 94°C에서 5분, 62°C에서 1분, 72°C에서 2분간 수행하며 그 후에는 94°C에서 40초, 62°C에서 1분, 72°C에서 2분간 30회 반복 수행하고, 마지막 cycle에서는 94°C에서 40초, 62°C에서 1분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 중합효소 연쇄반응 여부를 확인하기 위하여 GAPDH의 경우에는 sense primer (5'-ACCACAGR CCATGCCA-TCAC-3')와 antisense primer (5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-TA-3') 10 pM, Taq polymerase 0.1 unit를 이용하여 첫 번째 cycle에서 94°C에서 5분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분간 수행하였으며 그 후에는 94°C에서 40초, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분간 23회 반복 수행하고, 마지막 cycle에서는 94°C에서 40초, 58°C에서 1분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 각각의 산물들을 10 μ l씩 2% agarose gel에 100 volt로 30분간 전기영동한 다음, 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide (Sigma Chem Co.)로 염색한 후 UV transilluminator (Spectroline, TR-312A, BMS)를 이용하여 반응 산물을 확인하였다. 발현정도를 확인하기 위해 UV image analyzer (vilberlourmat, France)를 이용하여 양적인 분석을 하였다.

결 과

1. 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 돌연변이 분석

난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 inactivating point mutation을 분석하기 위해 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 exon 7에 특이적인 primer쌍을 이용하여 PCR을 수행한 결과 대조군과 조기 난소 부전증 환자군에서는 78 bp의 PCR 산물이 관찰되었다. 각 환자의 PCR 산물들을 제한효소 Bsm I으로 처리하여 전기 영동해 본 결과 모든 대상 환자에서 양성 대조군과 같은 51 bp와 27 bp의 절편으로 잘라졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 따라서 본 실험에서 분석한 10명의 조기 난소 부전증 환자에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 nucleotide 566에는 돌연변이가 없는 정상적인 염기서열을 가지고 있음을 확인하였다.

2. 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현양상 비교

난포 자극 호르몬 수용체의 발현양상을 알아보기 위해 대조군과 조기 난소 부전증 환자를 대상으로 시험관아기 시술 시 얻어지는 황체화 과립세포에서 RNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응법을 시행하였다. 대조군과 조기 난소 부

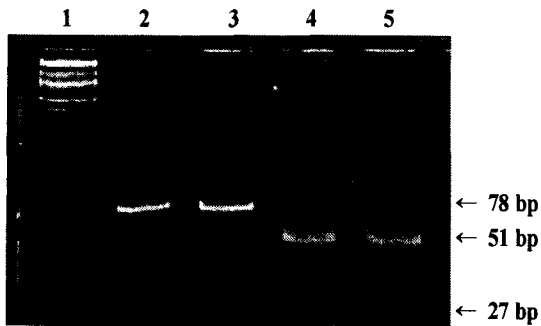


Fig. 1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis. A 78 bp PCR product comprising nucleotide 566 in exon 7 was digested with *Bsm* I and electrophoresed. In the wild-type, the PCR product is cleaved into fragments 51 bp and 27 bp in length. Lane 1: DNA MW marker XIV (100 bp ladder), lane 2: PCR product without *Bsm* I digestion (78 bp), lane 3: PCR product from POF patient without *Bsm* I digestion, lane 4: *Bsm* I-digested PCR product from control group (51 bp and 27 bp), lane 5: *Bsm* I-digested PCR product from POF patient.

전증 환자군 모두에서 house keeping gene인 GAPDH가 발현되었으며 (Fig. 2-A), 난포 자극 호르몬 수용체 유전자도 모든 환자에서 발현되었다 (Fig. 2-B). 그러나 UV image analyzer를 이용하여 GAPDH와 난포 자극 호르몬 수용체의 mRNA 양을 상대적으로 분석한 결과, 조기 난소 부전증 환자군이 대조군에 비해 난포 자극 호르몬 수용체의 유전자 발현이 다소 낮았으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig 2-C).

고 찰

조기 난소 부전증의 원인으로는 유전적 이상, 효소부족, 생식소 자극 호르몬 이상, 자가면역질환, 물리적 요인, 그리고 원인불명 등 여러 가지가 제시되었지만 아직까지 정확한 원인은 불분명한 상태이다 (Conway, 1997). 조기 난소 부전증 환자의 경우, 여러 가지 표현형으로 나타나는데, 이것은 난소 부전증이 발병한 시기에 따라 좌우된다. 실제로 난소 생검을 실시해 본 결과, 조기 난소 부전증 환자의 50%에서 조직학적으로 정상의 소견을 보이지만 (Maxson & Wentz, 1983; Talbert et al., 1984; Aiman & Smentek, 1985) 외부에서 생식소 자극 호르몬을 투여하여도 대부분의 환자에서는 생식소 자극 호르몬에 반응을 하지 않는 결과를 보였다. 이러한 환자들은 대부분 난포 자극 호르몬의 수치가 정상보다 높은 수준으로 나타나며 이것은 난포 내 과립세포에서 분비되는 스테로이드 호르몬에 의한 음성 되먹임 기작이 부적절하게 일어나기 때문으로 생각되며, 따라서 이러한 환자에서 난

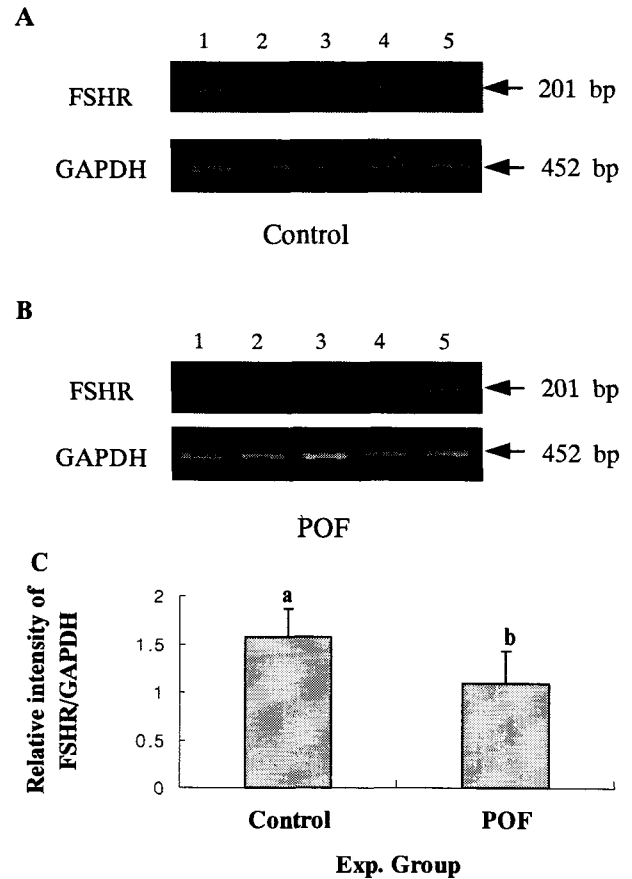


Fig. 2. Analysis of FSH receptor mRNA levels in luteinized granulosa cells from normal and premature ovarian failure patients. A, B the ethidium bromide stained gel containing the amplified RT-PCR products of FSH receptor in control group and POF group. The size of the amplified products (FSH receptor = 201 bp; GAPDH = 452 bp) were estimated by comparison of migration distance to a 100 bp DNA ladder. The relative intensity of the FSH receptor mRNA compared to GAPDH mRNA was analyzed by the RT-PCR technique using 2 μ g total RNA prepared from luteinized granulosa cells of male factor infertility patients (control group, n=5) and premature ovarian failure patients (n=5). Values are shown as mean \pm SEM. a vs b; $P > 0.05$.

포 자극 호르몬이 그 역할을 제대로 수행하지 못할 수도 있다는 것을 가정할 수 있다. 특히 조기 난소 부전증 환자들은 다른 요인의 불임환자에 비해 다량의 생식소 자극 호르몬을 투여하여도 난포의 발달이 늦고 회수되는 난자의 수도 매우 적다. 결국 다량의 호르몬을 투여하여도 그 호르몬의 생물학적 신호를 세포 내로 전달해 주는 수용체에 돌연변이가 있어서 호르몬이 수용체와 결합하지 못하거나 또는 결합한 후에도 세포질 내로의 적절한 신호전달이 이루어지지 못할 수도 있으며 또는 정상인에 비해 그 수용체의 발현이 매우 낮을

수도 있다는 것을 예측할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 가능성에 대한 연구를 진행하였다.

지금까지 생식소 자극 호르몬에 대해 저적응증을 보이는 환자에서 생식소 자극 호르몬의 결합이 주요 요인으로 생각되어 왔지만, 생식소 자극 호르몬 자체의 결합은 발견된 바가 없으므로 (Layman et al., 1993), 최근의 연구는 난포 자극 호르몬 수용체의 유전자 돌연변이에 대해 집중되었으며 몇몇 가계에서 이러한 돌연변이가 보고되어 조기 난소 부전증이 유전적인 원인에 일어날 수 있다는 것을 보여주었다 (Coulman et al., 1983; Mattison et al., 1984). 또한 이러한 돌연변이는 내분비 계통에서 신호전달체계에 영향을 주어 여러 가지 질병을 일으킬 수도 있다. 예를 들어 인슐린 수용체의 돌연변이가 일어날 경우, 생물학적 활성에 영향을 주어 인슐린에 저항성 질병을 유발한다는 보고가 있다 (Seino et al., 1990). 조기 난소 부전증 환자들을 대상으로 난포 자극 호르몬 수용체의 돌연변이를 조사한 대부분의 논문에서 돌연변이를 발견할 수 없었으며 (Whitney et al., 1995; Conway et al., 1997; 1999), 본 연구에서도 돌연변이가 발견되지 않았다. 그러므로 돌연변이를 보고한 몇몇 논문들의 경우, 특정 집단을 대상으로 한 연구이므로 돌연변이를 정확한 원인으로 보기는 어렵다. 하지만 본 연구에서는 수용체의 extracellular domain의 돌연변이만을 분석한 결과이므로 transmembrane loop domain과 cytoplasmic domain의 돌연변이 여부를 알 수 없다.

지금까지 조기 난소 부전증 환자를 대상으로 난포 자극 호르몬 수용체의 발현양상을 mRNA 수준에서 연구한 보고는 전무한 실정이었다. 그러므로 본 연구에서는 대조군과 조기 난소 부전증 환자군 각각 10명의 환자를 대상으로 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 시험관아기 시술시에 얻어진 황체화 과립세포에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자의 발현양상을 분석하였다. 본 연구결과에서 대조군과 환자군 모두에서 난포 자극 호르몬 수용체의 발현을 관찰할 수 있었으나 대부분의 조기 난소 부전증 환자군에서 대조군에 비해 낮은 유전자 발현양상을 보였다. 결국 이러한 환자들의 경우, 과배란 유도를 위해 다량의 생식소 자극 호르몬을 투여하여도 호르몬 수용체의 발현이 낮아 난포의 성장이 정상적으로 일어날 수 없다고 사료된다. 그러나 inhibin, activin 그리고 follistatin과 같은 peptide 호르몬들이 난포 형성과정에서 생식소 자극 호르몬 수용체의 양을 조절한다는 보고도 있으므로 (Xiao et al., 1992) 조기 난소 부전증 환자군이 난포 자극 호르몬 수용체의 발현이 원래 낮은 것인지 혹은 다른 요인에 의해 down regulation된 일시적인 결과인지를 확인하기 위한 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 조기 난소 부전증 환자들의 경우, 다량의 생식소 자극 호르몬에 반응하지 못하는 이유로 수용체 유전자의 돌연변이보다는 수용체 유전자의 발현에 문제가 있기 때문으로 생각된다. 그러나 본 연구에서는 대상 환자의 수가 적고 실제로 시험관아기 시술시에 얻어지는 황체화 과립세포의 양이 너무 작아 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용할 수밖에 없었으므로, 정확한 연구를 위해서는 보다 많은 환자를 대상으로 western blotting과 같은 방법을 이용하여 호르몬 수용체의 발현정도를 단백질 수준에서 비교하는 것이 필요할 것이다.

인용문헌

- Aiman J & Smentek C (1985) Premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 66: 9-14.
- Aittomaki K (1994) The genetics of XX gonadal dysgenesis. *American J Human Genetics* 54: 844-851.
- Aittomaki K, Lucena JLD, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J et al. (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82: 959-968.
- Aittomaki K, Herva UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O and de la Chapelle A (1996) Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J of Clinical Endocrinol and Metabol* 81: 3722-3726.
- Conway E, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M, Conway GS (1997) Mutations of the FSH receptor gene are rare in familial and sporadic premature ovarian failure[Abstract]. *J of Endocrinol* 152 (suppl):P257.
- Conway GS (1997) Premature ovarian failure. *Cur Opin in Obstet and Gynecol* 9: 202-206.
- Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll G and Simon M (1999) Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 51: 97-99.
- Coulman CB, Stringfellow S, Hoefnagel D (1983) Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril* 40: 693-695.
- Coulman CB, Adamson SC, Annegers JF (1986) Incidence

- of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 167: 604-606.
- De Fonte Kohek MB, Batista MC, Russell AJ, Vass K, Giacaglia LR, Mendonca BB et al. (1998) No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 70: 565-567.
- Layman LC, Shelley ME, Huey LO, Wall SW, Tho SPT, McDonough PG (1993) Follicle-stimulating hormone beta gene structure in premature ovarian failure. *Fertil Steril* 60: 852-857.
- Mattison DR, Evans MJ, Schwimmer W, White BJ, Jensen B, Schulman J (1984) Familial premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 36: 1341-1348.
- Maxon W & Wentz AC (1983) The gonadotropin resistant ovary syndrome. *Semin Reprod Endocrinol* 1: 147-160.
- Seino S, Seino M, Bell GI (1990) Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39: 129-133.
- Talbert LM, Raj MHG, Hammond MG, Greer T (1984) Endocrine and immunologic studies in a patients with resistant ovary syndrome. *Fertil Steril* 42: 741-744.
- Whitney EA, Lee A, Layman LC, Peak DB, Chan PJ, McDonough PG (1995) The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. *Fertil Steril* 64: 518-524.
- Xiao S, Robertson DM, Findlay JK (1992) Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131: 1009-1016.
- 남윤성, 김남근, 최명진, 박상희, 정기화, 이숙환 등 (1998) 한국인의 난포 자극 호르몬 수용체 유전자 변이에 대한 분석. *대한불임학회잡지* 25: 281-286.