

유전성 대사 질환의 DNA 진단

서울아산병원 의학유전학클리닉

김 구 환

서 론

DNA 진단은 특정한 질병 또는 상태의 원인을 확인할 목적으로 질병 유전자 (Morbid gene)를 분석하는 것이다. 질병 유전자의 돌연변이를 확인함으로써 질병에 대한 확진에 도움을 주고, 그 가계에서의 유전 상담의 기초를 제공할 뿐 아니라, 산전 진단에 활용할 수 있는 자료를 제시한다. 인간 게놈 프로젝트 이후, 15,000여 질병 유전자가 확인되어 있고, 질병 유전자의 작용 기작이 속속 알려지고 있어, DNA 진단이 가능한 유전자의 수가 매년 높은 비율로 증가하고 있다. DNA 진단은 특정 질병에 상응하는 정확한 질병 유전자를 선택하는 것을 시작으로 하여, 질병 유전자의 특

성 및 구조에 따라 검사의 방향을 결정하고, 문헌 조사 등을 통하여 결과물에 대한 정확한 해석을 제공하여 유전자 이상과 질병의 관련을 결정해주는 과정을 포함한다. DNA 진단을 위해서는 질병 유전자의 구조나 위치가 알려져 있어야 하며, 가능하면 locus heterogeneity가 없어야 하고, 특정 인구에서의 유전적 역학 자료가 많이 축적되어 있어야 한다. 건강한 사람에게서 미래의 질병을 예측할 목적으로 이용되거나, DNA 진단만으로 독립된 질병의 이환 여부를 확정할 수 없는 검사 및 집단 검진을 목적으로 하는 DNA 진단은 철저한 정도 관리 및 심사를 요한다. DNA 진단에 대한 개요는 Fig. 1에 도식화하였다. 질병 유전자의 위치와 염기 서열이 모두 정해져 있으면, 이를 기

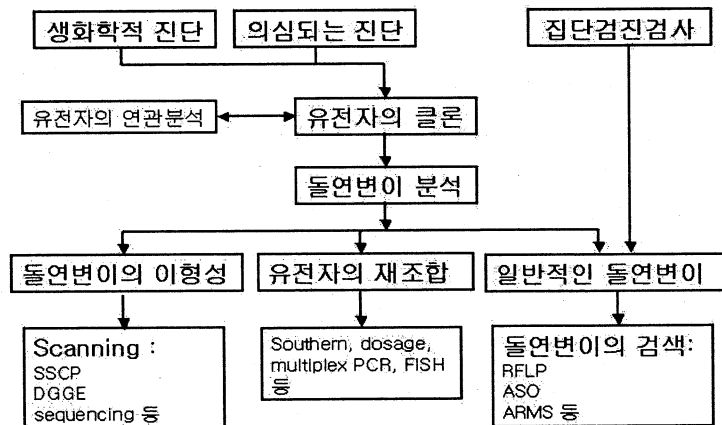


Fig. 1. DNA 진단 이용의 도해

준으로 하여 유전자 내의 변이를 찾아내는 검사를 하게 되는데, 돌연변이가 특정 부위에서만 나타나는 경우(common mutation), 전체 유전자에 걸쳐서 고루 나타나는 경우(돌연변이의 heterogeneity), 및 유전자의 재조합에 의한 경우로 각각에 따라, scanning, 선별법, 및 유전자 재조합의 검사법을 이용한다. DNA 진단을 위한 검사 방법들에 대해 고찰해 보았다.

본 론

1. 질병 유전자의 검색

우선 DNA 진단이 가능한지의 여부를 확인하기 위하여 질병 유전자에 대한 검색을 시행하여야 한다. 인간 유전자의 데이터베이스는 EMBL¹⁾과 Genbank²⁾로 크게 두 가지이며, 목적에 따라 많은 데이터베이스가 제공되어지고 있다. 질병 유전자의 검색을 위하여 질병에 상응하는 정확한 유전자의 명칭을 알아야 한다. 이것은 OMIM³⁾에서 확인이 가능하며, Genbank로 직접 연결되어 있어 유전자의 검색이 용이하다.

2. DNA 진단 방법의 결정

질병 유전자가 검색되어 지면, 문헌 조사를 통하여 DNA 진단에 적합한 방법을 선택하여야 한다. 단일 유전자 결합 질병의 대부분은 exon의 염기 서열 결정을 위하여 PCR 및 염기 서열 분석을 주로 사용하지만, 고셔병(Gaucher disease)이나 선천성 부신 과형성증(CAH; Congenital adrenal hyperplasia) 등과 같이 가성 유전자가 존재하는 경우, 일반적인 방법을 통해서 DNA 진단이 어렵다. 또한, hot spot의 존재 여부를 확인함으로써 DNA 진단의 순서 결정에도 도움을 받을 수 있다. 문헌 조사 후, 진단에 이용할 PCR의 primer를 제

작하는데, 주로 문헌에서 언급되어진 primer를 사용하는 것을 권장하지만, 문헌에 언급되어진 primer를 구할 수 없거나, 부적절한 경우에는 자체적으로 제작하여 사용한다. Sense와 antisense의 GC 조성, primer 간 또는 primer 내의 상보적인 염기 서열의 배제, primer의 길이 및 hairpin loop의 형성 등을 고려하여 제작하여야 한다. Primer3 (Whitehead Institute/MT Center for Genome Research, Cambridge, MA, USA), PrimerExpress (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), VectorNTI (Infomax, Carlsbad, CA, USA) 등의 Primer 제작 프로그램이 잘 개발되어져 있어 이를 이용할 수 있다.

3. DNA 진단 방법의 종류

DNA 진단은 최종적으로 염기 서열을 확인함으로써 정상군과의 염기 서열차이를 찾아내는 것으로 크게 유전자 재조합의 확인, 특정 변이의 선별, 그리고 유전자의 scanning 3가지로 나눌 수 있다.

1) 유전자 재조합의 확인

선천성부신과형성증(CAH; Congenital adrenal hyperplasia)나 Gaucher병의 경우, 가성 유전자가 진성 유전자와 나란히 존재하여 일반적인 PCR-염기 서열 분석을 통하면 가성 유전자에 의한 false-positive를 보일 수 있다. CAH는 전체 돌연변이의 25-30%정도가 진성 유전자의 결실에 의하는 것으로 *TaqI*과 *BglIII*를 이용한 서던교잡법으로 확인이 가능하다. 염기 서열의 확인을 위한 PCR primer는 가성 유전자와 진성 유전자의 염기 서열의 차이를 이용하여 진성 유전자만을 선별적으로 증폭할 수 있도록 제작되는데, 이러한 방법을 allele-specific PCR 법이라고 한다⁴⁾.

Gaucher병의 경우, 유전자 재조합의 존재 여부에 따라 다른 type이 된다고 보고되어 있어, 재조합의 확인이 중요하다⁵⁾. 재조합의 여부를 확인하기 위하여 *SstII*, *SspI*, *EcoRI*, *HincII*을 이용하여 서던교잡법을 시행하고, allele-specific PCR 및 염기서열 분석을 통하여 재조합의 시작점을 결정한다. Dystrophin 유전자의 결핍으로 인한 Progressive muscular dystrophy의 경우, 60%가 유전자의 재조합에 의한 exon의 결실에 의하는 것으로 이러한 경우, multiplex PCR을 통하여 exon의 결실 여부를 확인할 수 있다⁶⁾. Spinal muscular atrophy의 경우 95% 정도가 유전자 재조합에 의한 SMN1 유전자의 결실에 의하는데, carrier detection을 위하여 gene dosage를 확인하는 방법을 사용한다⁷⁾.

2) 특정 변이의 선별법

Achondroplasia (FGFR3 유전자의 G380R)나 congenital lipid adrenal hyperplasia (StAR 유전자의 Q258X) 등과 같이 특정 돌연변이가 환자의 대부분을 차지하거나, 또는 이미 알고 있는 변이의 검색을 위하여 사용되는 방법으로 높은 빈도의 돌연변이를 보이는 질병 이외에, 알고 있는 가계 내의 돌연변이 검색이나, 집단에서의 SNP 선별 등에 사용되어진다. 특정 변이의 선별법은 이미 알고 있는 변이의 검색을 위한 방법들로, 새로운 변이의 검색에는 사용되지 못한다.

① RFLP : Restriction fragment length polymorphism

염기의 변화에 의해 제한 효소에 대한 감수성이 생성되거나 소멸되는 현상을 이용한 방법으로 PCR 증폭 후, 적절한 제한 효소를 처리하여 전기 영동을 통하여 제한 효소에 대한 감수성 여부를 확인할 수 있다. 민감도가 좋고 비용면에서 유리하나, 대용량의 검사에 부적

합한 방법이다.

② ARMS : Amplification refractory mutation system

염기의 변화가 있는 부위를 PCR 증폭을 위한 primer의 3' 말단으로 하여 PCR 증폭시킨 후, 증폭의 여부를 확인함으로써 변이의 유무를 확인하는 방법이다. 한번의 PCR로 결과를 볼 수 있다는 이점이 있지만 민감도가 떨어진다. 단점이 있다.

③ OLA : Oligonucleotide ligation assay

염기의 변화가 있는 부위를 정상과 돌연변이의 염기를 각각 포함하도록 제작된 oligo를 환자의 DNA에 교잡시킨 후, 탐식자 oligo와의 ligation을 유도하여 ligation의 여부에 따라 DNA의 변이를 확인하는 방법이다. 대용량의 검사에 적합하지만, 탐식자 oligo의 제작에 비용이 많이 들고, 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다.

④ ASO : Allele specific oligonucleotide

Dot blot의 원리를 이용하며, 정상과 돌연변이의 염기를 포함하는 oligonucleotide를 환자의 DNA에 교잡시켜 교잡의 여부에 따라 변이를 확인하는 방법으로 최근에는 real-time PCR을 이용하여 대용량의 검사가 가능해 졌다.

⑤ SNaPshot : Single base Primer extension reaction

각각의 형광 물질이 표식된 ddNTP를 이용하여 환자의 DNA를 주형으로 하여 한 개의 염기만을 extension하여 extension된 ddNTP를 확인함으로써 변이의 여부를 확인하는 방법으로 대용량의 검사가 가능하지만, 표식된 ddNTP의 비용이 많이 들고, 고가의 장비가 필요하여 비용면에서 불리하다.

⑥ dHPLC : denaturation high pressure liquid chromatography

PCR 산물의 single strand conformation polymorphism의 차이를 이용한 것으로 특정 변이의 chromatography의 차이를 확인함으로써 변이의 여부를 확인하는 방법이다. SSCP의 차이를 보이는 chromatogram을 위한 조건이 까다롭고, 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있지만, 높은 민감도와 대용량의 검사가 가능하다는 이점이 있다.

⑦ DNA oligo chip

ASO와 동일한 원리로, 변이 염기를 포함하는 oligonucleotide를 chip 위에 위치시킨 후, 환자의 DNA를 교잡시켜 교잡된 여부를 확인함으로써 변이를 확인하는 방법으로 많은 수의 알려진 돌연변이를 대용량으로 동시에 검사하기 적합하지만, chip의 제작에 많은 비용이 소요되고 고가의 장비를 필요하며 oligonucleotide의 제작 조건이 까다롭다는 단점이 있다.

3) Scanning 방법

원하는 유전자에서의 새로운 변이를 찾고자 할 때 사용되는 방법으로 염기 서열 분석법을 제외한 대부분은 낮은 민감도를 보인다. 최종적으로는 염기 서열 분석을 통하여 변이의 여부를 확인하는 것을 목적으로 한다.

① SSCP : Single strand conformation polymorphism

PCR 산물을 denaturation시킨 후 급격히 냉각시키면, 무작위의 DNA 엉킴현상이 생기게 되는데, 이때 유전자 변이의 여부에 따라 DNA 엉킴 현상에 차이가 있게 되고, 이를 전기 영동을 통하여 확인하는 방법으로, Orit⁸⁾ 등에 의해 고안된 후, 다양한 방법으로 개발 보완되어 사용되어지고 있다. 민감도가 떨어진다는 단점이 있지만, 경제적이고 쉽게 사용할 수 있

다는 점에서 아직까지 많은 부분에서 응용되어지고 있는 방법이다.

② DGGE/TGGE : Denaturation/Temperature gradient gel electrophoresis

겔 상에 Urea 또는 온도의 차이를 줌으로써 denaturation되어지는 차이에 따라 염기의 변이를 확인하는 방법으로 높은 민감도를 보이지만 대용량의 검사에는 부적합하고, gradient의 조건이 까다롭다는 단점이 있다. Dystrophin 유전자의 변이 검색에 사용된 예가 있다⁹⁾.

③ Heteroduplex assay

PCR 산물을 denaturation 시킨 후, 서서히 냉각시키므로써 renaturation을 유도하게 되면 염기의 차이가 있는 곳에서 이형 접합자가 나타나 bubble을 형성하게 된다. 이러한 bubble이 전기 영동 상에서 이동 속도의 차이 (mobility shift)를 보여 염기의 변이 여부를 확인할 수 있게 한다. 주로 small deletion이나 insertion등의 돌연변이를 동반할 경우 검색에 주로 사용되며, 비용이 적게 들고 쉽게 검색할 수 있다는 장점이 있으나, 민감도가 낮으며, 적절한 heteroduplex를 얻기 위한 GC clamp의 제조 등의 조건이 까다로우며 대용량의 검색에 한계가 있다는 단점이 있다.

④ TDGE : Two dimensional gel electrophoresis

heteroduplex 분석의 원리를 이용하는 방법으로 BRCA1, BRCA2의 변이의 검색을 위하여 van Orsouw 등¹⁰⁾ 이 고안한 방법으로 한 개의 겔에서 두 차례의 heteroduplex 분석을 통하여 다수의 exon에서의 변이 여부를 동시에 확인하고자 하였다. multiplex PCR을 도입하여 많은 수의 PCR 산물을 동시에 검색할 수 있는 장점이 있으나, multiplex PCR primer제작의 까다로움과 결과물의 해석이 어렵다는 단점이

있다.

⑤ EMC/CMC : Enzymatic/Chemical mismatch cleavage

염기의 차이에 의해 생겨난 heteroduplex bubble을, 특정 효소 및 화학 물질을 이용하여 파괴함으로써 염기의 변이 여부를 확인하는 방법이다. Yuzi 등¹¹⁾이 MutY와 TDG를 이용하여 ATM 유전자의 변이 여부를 확인하였다. 독성 화학 물질 등을 사용하여야 하고, 검사의 조건이 까다로운 단점이 있으나, 일단 검사 조건이 확립되면 높은 민감도를 보이며 넓은 범위의 유전자를 한번에 검색할 수 있는 장점이 있다.

⑥ 염기 서열의 분석

염기 서열 분석법은 Maxim-Gilbert 방법과 Sanger dideoxy 방법이 비슷한 시기에 고안되었으나, 현재는 Sanger의 dideoxy 방법이 사용되고 있다. 4가지의 dideoxy NTP를 이용하여 연쇄 중합 반응을 하게 되면, dideoxy NTP가 결합되어진 가닥은 더 이상 중합 반응이 진행되지 않게 되고, 이를 전기 영동하게 되면 중합 반응이 중단된 크기가 서로 다른 절편들이 분리되어져 염기 서열을 결정할 수 있게 된다. 방사선 동위 원소를 이용하여 각각의 ddNTP가 들어간 절편들을 만든 후, polyacrylamide gel상에서 분리시킨 후, X-ray film에 감광시키는 방법을 사용하였는데, 최근에는 4가지 ddNTP에 각각 다른 형광 물질을 표식하여 반응시킨 후, 레이저를 이용하여 실시간으로 염기 서열을 확인하는 방법이 사용되어진다. 염기의 변이를 확인할 수 있는 최종의 방법이며 검사 비용이 많이 든다는 단점이 있다.

4) 최신 기법들

최근에 소개되어지는 새로운 방법들에 대해 조사해 보았다.

① Nano-DNA 검사법¹²⁾

Oligo chip의 원리를 이용한 방법으로 oligo probe에 일치되는 DNA절편이 oligo probe와 교잡이 일어날 때 전류가 흐르게 되어 DNA의 변이 여부를 확인 할 수 있는 방법이다. 전기적 방법을 이용한 것으로, 휴대할 수 있는 검사 kit로의 개발이 가능할 것으로 전망하지만, 검사에 필요한 chip의 제작에 많은 어려움이 동반되며, 아직은 상용화가 이른 실정이다.

② Detection of Pyrophosphate release¹³⁾

DNA 중합 반응과 함께 유리되어지는 pyrophosphate를 실시간으로 검출함으로써 염기 서열을 분석하는 방법으로 한 번 반응의 비용이 적게 든다는 장점이 있지만, 민감도가 낮고, 결과물의 해석에 어려움이 있으며, 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다. 현재는 형광 물질을 이용한 염기 서열 분석법에 비해 사용이 적은 편이다.

③ SPC-sequencing : Solid phase capturable¹⁴⁾

Solid phase capturable ddNTP를 이용하여 DNA의 중합 반응을 유도한 후, MALDI-TOF mass spectrophotometry를 이용하여 각각의 ddNTP를 검출하는 방법으로 민감도 및 속도에서 유리하나, 고가의 장비를 필요로 하고 아직 검증되지 않은 방법이라는 단점이 있다.

4. 결과물의 정확한 해석을 위한 문헌 조사

DNA 진단을 통하여 발견되어진 유전자의 변이에 대한 해석을 위하여 인터넷을 통한 돌연변이 데이터베이스의 검색과 함께 문헌 조사가 반

드시 병행되어야 한다. 질병 유전자의 돌연변이 데이터베이스는 NCBI의 OMIM 이외에 human genome mutation database¹⁵⁾와 MutDB¹⁶⁾가 있다. 이들 데이터베이스를 이용하여 유전자의 변이가 이미 보고된 변이인지의 여부를 확인하고, 참고 문헌의 조사를 통하여 질병에 정확히 연관되어 있는 변이 인지의 여부를 반드시 확인하여야 한다.

발견되어진 변이가 보고되지 않은 새로운 변이인 경우, 질병과의 연관성을 확인하기 위하여 정상군에서의 보인 여부를 확인(allele frequency)하여 polymorphism의 가능성을 배제하고, 중간 비교를 통하여 conserve한 부위인지를 확인한 다음, 효소 분석이 가능하다면 *in vitro* 발현연구를 통해 유전자 산물의 결손을 검증하여야 한다.

고 찰

유전자 돌연변이의 확인을 목적으로 하는 DNA 진단은, 염색체 분석, 생화학적 분석 및 간접적 유전자 검색(연관 분석 등)을 포함하는 genetic test의 하나로서, 질병 또는 상태의 정확한 진단의 위한 하나의 진단 도구이다. 이를 위하여 질병 유전자의 검색과 적절한 검사 방법의 선택, 그리고 질병에 대한 최신 정보의 습득이 필요하다. 인간 게놈 프로젝트 이후 많은 질병 유전자가 밝혀지고, 유전자와 질병과의 관련이 연구되고 있어 질병의 진단에 있어서 DNA 진단의 비중이 높아지고 있는 추세이다. DNA 진단에 의한 결과는 그 가계에 있어서의 유전 상담의 기초 자료가 되며 산전 진단을 가능하게 한다. 또한 차후에 유전자 요법의 기초 자료로서 활용 되어질 것이어서, DNA 진단의 중요성이 높아지고 있다. 하지만 DNA 진단법에 대한 중요도가 높아지는 만큼, 건강한 사람에게서의 질병 예측이나, 과학적 근거가

없는 소인 검사, 개인 유전자 정보의 보안 문제 등 사회 윤리적, 법적 대책도 함께 강구되어야 할 것이다.

DNA 진단의 궁극적인 목적은 염기 서열 분석을 통한 염기의 변이를 확인하는 것이지만, 염기 서열 분석법이 비용이 많이 드는 방법으로 이러한 비용을 최소화하기 위해 다양한 선별법 및 scanning 방법들이 고안되어져 왔다. 여기서는 이러한 선별법과 scanning의 대표적인 방법들에 대하여 고찰해 보았다. 앞으로의 DNA 진단의 방향은 적은 비용과 노력으로 빠른 시간 안에 많은 변이를 정확하게 확인하는 것으로, 다양한 방법들이 계속해서 고안되어지고, 시행착오 끝에 소멸되어지고 있다. DNA 진단법은 고정되어진 방법이 아니고, 상당히 유동적인 것으로서 새로운 기법들을 부단하게 모니터링하고 연구되어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Stoesser G, Moseley MA, Sleep J, McGowran M, Garcia-Pastor M, Sterk P, The EMBL nucleotide sequence database. Nucleic Acids Research 1998;26:8-15.
- 2) Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF, GenBank. Nucleic Acids Research 1998;26:1-7.
- 3) Online Mendelian Inheritance in Man, Available from : URL://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM.
- 4) Catherine EK, Anthony AK. An Overview of Molecular Diagnosis of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. J Mol Diag 2001;3: 49-54.
- 5) Nahid T, Barbara KS, Joseph KP, Eduard O, Jamie MW, Mary EL, et al. Reciprocal and Nonreciprocal Recombination at the Glucocerebrosidase Gene Region: Implications for Complexity in Gaucher Disease. Am J Hum Genet 2003;72:519-34.
- 6) Alan HB, Michel K, Frederick MB, Louis M

- K · Detection of 08% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;86:45-8.
- 7) Markus F, Verena S, Radu W, Thomas FW, Brunhilde W. Quantitative Analyses of SMN1 and SMN2 Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable Carrier Testing and Prediction of Severity of Spinal Muscular Atrophy. *Am J hum Genet* 2002;70:358-68.
 - 8) Orita M, Suzuki Y, Sakiya T, Hayahi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.
 - 9) Robert MWH, Inge MM, Rolf V, Pia AM, Marian K, Ieke BG, et al. DGGE-Based Whole-Gene Mutation Scanning of the Dystrophin Gene in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients. *Hum Mutat* 2004;23:57-66.
 - 10) van Orsouw NJ, Dhanda RK, Elhaji Y, Narod SA, Li FP, Eng C, et al. A highly accurate, low cost test for BRCA1 mutations. *J Med Genet* 1999;36:747-53.
 - 11) Yuzhi Z, Manjit K, Brendan DP, Sotirios T, Makrigrigors GM. An Amplification and ligation-based method to scan for unknown mutations in DNA. *Hum Mutat* 2002;20:139-47.
 - 12) Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with Nanoparticle probes. *Science* 2002;295:1503-6.
 - 13) Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem* 1996;242:84-9.
 - 14) Ruparal H, Ulz ME, Kim S, Ju J. Digital detection of genetic mutations using SPC-sequencing. *Genome Res* 2004;14: 296-300.
 - 15) Stenson PD, Ball EV, Mort M, Philips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human gene mutation database (HGMD) : 2003 Update. *Hum Mutat* 2003;21:577-81. Available from URL://<http://www.hgmd.org>.
 - 16) Mooney SD, Altman RB. MutDB: A Platform For Annotating Mutation Data With Functionally Relevant Information. *Bioinformatics*, in press. Available from URL://<http://www.mutdb.org>.