

유전성 대사 질환의 분자 유전학적 진단

기창석, 이수연, 김종원

성균관 대학교 의과대학, 삼성서울병원 진단검사의학과

≡ Abstract ≡

Molecular Genetic Diagnosis of Inherited Metabolic Diseases

Chang-Seok Ki, M.D., Ph.D., Su-Yon Lee, M.D., Ph.D., Jong-Won Kim, M.D., Ph.D.

Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center,

Sungkyunkwan University School of Medicine

Inherited metabolic diseases (IMD) comprise a large class of genetic diseases involving disorders of metabolism. The majorities are due to defects of single genes that code for enzymes that facilitate conversion of various substances into others. Because of the multiplicity of conditions, many different diagnostic tests are used for screening of IMD. Molecular genetic diagnosis is the detection of pathogenic mutations in DNA and/or RNA samples and is becoming a much more common practice in medicine today. The purpose of molecular genetic testing in IMD includes diagnostic testing, pre-symptomatic testing, carrier screening, prenatal diagnosis, preimplantation testing, and population screening. However, because of the complexity, difficulty in interpreting the result, and the ethical considerations, an understanding of technical, conceptual, and practical aspects of molecular genetic diagnosis is mandatory.

Keywords: Inherited metabolic disease, genetics, diagnosis, review

서론

최근 유전학이 급속도로 발전함에 따라 다양한 유전자의 기능과 질환과의 관련성이 밝혀지고 있고, 유전성 대사 질환 분야에서도 많은 질환의 원인 유전자가 밝혀지고 있다. 또한, 분자유전학적 기법의 발전으로 질환의 원인 유전자를 분석하여 돌연변이를 확인하는 과정이 비교적 간편해지고 빨라지게 되었다. 이처럼 유전성 대사 질환의 원인 유전자가 밝혀지고, 이를 분석하는 기법이 발전함에 따라 질환의 진단을 위해 측정된 대사 물질을 정량하거나 효소의 활성을 측정하던 기존의 방법 외에 원인 유전자의 돌연변이를 분석하는 분자 유전학적 진단법이 임상적으로도 흔히 이용되게 되었다. 즉, 윌슨병(Wilson disease; OMIM 277900)의 진단을 위해서는 전통적으로 혈중 세룰로플라즈민(ceruloplasmin)을 측정하고, 24시간동안 소변으로 배출되는 구리를 정량하는 방법이 사용되었으나, 최근에는 *ATP7B* 유전자의 돌연변이를 흔히 분석하고 있다^{1, 2)}. 또한, 헌터증후군(Hunter syndrome 또는 mucopolysaccharidosis type II; OMIM 309900)의 진단을 위해서도 과거에는 소변으로 배출되는 뮤코다당류(mucopolysaccharides)를 정량하고 iduronate 2-sulfatase (IDS) 효소의 활성을 측정하였으나, 최근에는 *IDS* 유전자의 돌연변이 분석이 시행되고 있다³⁾.

유전성 대사 질환은 비교적 질환의 발생 빈도가 높은 유대인 등 일부 민족들에서 신생아 선별 검사나 보인자 검사를 통해 질환을 조기에 진단하고자 많은 노력을 기울여 왔고, 분자 유전학적 진단을 이용한 돌연변이의 종류 및 빈도 파악, 돌연변이 종류에 따른 표현형 등에 대한

연구를 활발하게 진행하고 있다⁴⁻⁶⁾. 그러나, 질환의 발생 빈도가 낮다고 알려진 우리 나라의 경우 아직 유전성 대사 질환에 대한 관심이 부족하고, 주요 질환의 발생율이나 돌연변이 종류 및 빈도 등에 대한 자료가 부족한 상황이다. 하지만, 최근 시행되고 있는 탠덤 질량 분석기를 이용한 신생아 선별 검사의 확산으로 여러 가지 유전성 대사 질환이 발견되고 있고, 따라서 이러한 질환들에 대한 분자 유전학적 진단의 중요성도 증가하고 있다⁷⁻⁹⁾.

분자유전학적 진단방법

유전성 대사 질환의 진단은 주로 대사 산물이나 효소 활성 등을 측정하는 생화학 유전 검사와 DNA 혹은 RNA를 직접 검사하는 분자 유전학 검사로 나눌 수 있으며, 분자 유전학 검사의 경우 원인 유전자를 직접 검사하는 직접 검사법(direct testing)과 원인 유전자 주위의 표지자(marker)를 이용하여 질환의 유전 여부를 판정하는 간접 검사법(indirect testing) 혹은 연관 분석(linkage analysis)로 분류할 수 있다¹⁰⁾. 직접 검사법을 이용한 분자 유전학적 진단은 특정 질환이 의심되는 환자의 말초 혈액 등으로부터 분리한 DNA 혹은 RNA를 이용하여 해당 질환의 원인 유전자 전체 혹은 일부를 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR) 등의 방법으로 증폭한 후 염기 서열을 분석하는 과정으로 진행된다. 이러한 과정은 대부분의 유전 질환에서와 동일하며, 주로 사용되는 분자 유전학적 기법은 직접 염기 서열 분석법(direct sequencing)을 이용하여 유전자 염기 서열을 분석하거나 염기 서열 변이를 스캐닝하는 방법, 그리고 이미 알려진 돌연변이만을 확인하는 방법

등이 있다(Table 1). 직접 염기 서열 분석법은 표준 방법으로 인정되고 있는 반면 큰 유전자 전체 염기 서열을 분석할 경우 비용과 시간이 많이 들기 때문에 염기 서열 변이를 스캐닝하여 변이 부위를 빠르게 탐색하는 방법들도 이용되고 있다¹¹⁻¹³. 특정 염기 서열 변이만을 확인하는 방법은 직접 염기 서열 분석법으로 발견된 변이를 다시 확인하거나, 이미 돌연변이가 발견된 환자의 가족들을 검사하거나, 특정 인종이나 민족에서 흔히 발견되는 돌연변이를 선별적으로 검사할 때 이용된다¹⁴⁻¹⁶.

Table 1. Various methods for molecular genetic analysis of mutatio

Catego	Metho
Direct sequencing	Entire coding region
	Selected exons
Mutation scanning	Single-strand conformation polymorphism (SSCP)
	Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)
Targeted mutation analysis	Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
	Amplification refractory mutation system (ARMS)
	Minisequencing (e.g. SNaPshot, MALDI-TOF MS)

분자유전학적 진단의 목적과 의의

유전성 대사 질환을 분자 유전학적으로 검사하는 목적은 증상이 있거나 질환이 의심되는 환자의 진단(diagnostic testing)이나 질환에 이환될 가능성이 있는 가족에 대한 증상 전 진단

(predictive testing), 보인자 진단(carrier testing)¹⁷, 산전 진단(prenatal testing), 착상 전 진단(preimplantation testing), 그리고 신생아 선별 검사(newborn screening) 등이 있다(Table 2)¹⁸. 이처럼 분자 유전학적 검사를 이용한 진단법은 다양한 목적으로 시행될 수 있으며, 일반적으로 임상 검사실에서 시행되는 다른 검사들과 같은 방법으로 검사를 의뢰 받아서 시행하게 된다. 그러나, 분자 유전학적 검사는 비용이 비싸고, 검사 과정이 비교적 복잡하며 생화학 유전 검사 또는 세포 유전 검사 결과와 함께 해석해야 하는 경우가 빈번하고, 특히 검사 결과가 환자 본인 뿐만 아니라 환자 가족에게도 영향을 미치기 때문에 유전 검사에 대한 검사 전 상담(pre-testing consultation 또는 counseling) 및 사전 동의서 작성 등의 과정이 반드시 필요하다. 또한, 검사 결과에 대한 해석, 유전 양상에 따른 가족들의 위험도 분석, 증상 전 진단, 보인자 진단 및 산전 진단 등에 대한 검사 후 상담(post-testing consultation 또는 counseling) 반드시 시행되어야 한다^{10, 16}.

유전 검사는 때로 임상 검사(clinical test) 혹은 연구용 검사(research 또는 investigational test)로 분류하기도 한다^{10, 16}. 임상 검사는 환자의 진단, 예방 및 치료의 목적으로 검사 비용을 받고 시행되며 반드시 정해진 기간 내에 검사 결과를 보고하는 검사를 말하는 반면, 연구용 검사는 질환의 연구나 임상 검사의 개발을 위해 시행되거나, 임상적 의의가 불분명한 검사로서 환자에게 검사의 결과를 알려줄 의무가 없는 검사를 말한다.

Table 2. Uses of genetic testing: purpose and points to consid

<p>Diagnostic testing</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) DNA testing may yield diagnostic information at a lower cost and with less risk than other procedures 2) Diagnostic testing is appropriate in symptomatic individuals of any age 3) Confirming a diagnosis may alter medical management for the individual 4) Diagnostic testing of an individual may have reproductive or psychosocial implications for other family members as well 5) Establishing a diagnosis may require more than one type of genetic test <p>DNA testing may not always be the best way to establish a clinical diagnosis</p>
<p>Predictive testing</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Predictive testing is medically indicated if early diagnosis allows interventions which reduce morbidity or mortality 2) Even in the absence of medical indications, predictive testing can influence life planning decisions 3) Because predictive testing can have psychological ramifications, careful patient assessment, counseling, and follow-up are important 4) Many laboratories will not proceed with predictive testing without proof of informed consent and genetic counseling 5) Identification of the specific gene mutation in an affected relative or establishment of linkage within the family should precede predictive testing 6) Predictive testing of asymptomatic children at risk for adult onset disorders is strongly discouraged when no medical intervention is available
<p>Carrier testing</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Identifying carriers allows reproductive choices 2) Genetic counseling and education should accompany carrier testing because of the potential for personal and social concerns 3) Molecular genetic testing of an affected family member may be required to determine the disease-causing mutation(s) present in the family 4) In some situations, DNA testing may not be the primary way of determining carrier status 5) Carrier testing can improve risk assessment for members of racial and ethnic groups more likely to be carriers for certain genetic conditions

Prenatal testing

- 1) A laboratory that performs the disease-specific test of interest must be identified before any prenatal diagnostic test procedure is offered
- 2) All prenatal diagnostic test procedures have an associated risk to the fetus and the pregnancy; therefore, informed consent is required, most often in conjunction with genetic counseling
- 3) In most cases, before prenatal diagnosis using molecular genetic testing can be offered, specific gene mutation(s) must be identified in an affected relative or carrier parent(s)
- 4) Prenatal testing for adult-onset conditions is controversial. Individuals seeking prenatal diagnosis for these conditions should be referred to a professional trained in genetic counseling for a complete discussion of the issues

Preimplantation testing

- 1) Preimplantation testing is only performed at a few centers and is only available for a limited number of disorders
- 2) Preimplantation testing is not possible in some cases due to difficulty in obtaining eggs or early embryos and problems with DNA analysis procedures
- 3) Due to possible errors in preimplantation diagnosis, traditional prenatal diagnostic methods are recommended to monitor these pregnancies
- 4) The cost of preimplantation testing is very high and is usually not covered by insurance

Newborn screening

- 1) Newborn screening programs are usually legally mandated and vary from country to country
- 2) Newborn screening is performed routinely at birth, unless specifically refused by the parents in writing
- 3) Screening tests are not designed to be diagnostic, but to identify individuals who may be candidates for further diagnostic tests
- 4) Many parents do not realize that newborn screening has been done (or which tests were included), even if they signed a consent form when their child was born.
- 5) Education is necessary with positive screening results in order to avoid misunderstandings, anxiety and discrimination

임상적 의의가 불분명한 변이의 해석

염기 서열 분석을 비롯한 분자 유전학적 기법이 보편화되면서 임상적으로 의의가 불분명한 변이가 자주 발견된다. Human Genome Variation Society에서는 기준에 보고되지 않은 염기 서열 변이가 발견된 경우 반복 검사를 통해 검사 과정의 오류를 배제하고, 가족 검사(family study)를 시행하여 질환의 유전 양상과 일치하는지 확인하며, 50명의 정상 대조군에서 동일한 변이가 관찰되는지 파악하도록 권장하고 있다. 그러나, 이런 과정을 거쳤음에도 불구하고 여전히 임상적 의의가 불분명한 경우가 있으며, 특히 염기 서열 변이에 의해 아미노산 서열에 변이가 초래되는 과오 돌연변이(missense mutation)에서 이러한 경우가 많다. 즉, 변이의 결과로서 정상적인 단백질의 생성되지 않는 nonsense 돌연변이(nonsense mutation)나 삽입 혹은 결실 돌연변이(insertion/deletion mutation)의 경우 질환과 관련되었을 것으로 추정하는 데 무리가 없으나, 단백질을 구성하는 많은 아미노산 중 하나가 다른 아미노산으로 치환된 경우 이러한 변이가 질환과 관련되었을 가능성을 추정하는 것은 매우 어렵다. 이러한 경우 정상 단백질과 변이 단백질의 기능을 평가하는 과정이 필요하지만, 모든 변이에 대해 이런 실험을 시행하는 것은 현실적으로 불가능하다. 다른 방법으로 동일한 단백질의 서열을 여러 가지 다른 종에서 비교하여 발생학적으로 보존된 아미노산 서열임을 확인하는 방법이 사용되고 있으나 그 유용성은 제한적이다. 최근에는 생물정보학(bioinformatics) 기법을 이용하여 아미노산 서열 변화가 단백질의 기능에 미치는 영향을 추정하는 방법들이 소개되고 있으나, 아직까지 임상적

으로 활용하기에는 무리가 있다^{19, 20)}.

국내 현황

우리 나라에서도 이미 많은 임상 검사실에서 다양한 유전성 대사 질환의 분자 유전학적 진단을 시행하고 있으며, 건강보험요양급여행위로 인정 받은 검사는 율슨병, 혈색소침착증(hemochromatosis; OMIM 235200), 당원축적병 제 1a형(glycogen storage disease type Ia; OMIM 232200), 갈락토스혈증(galactosemia; OMIM 230400), 요소회로 장애(urea cycle disorders), 레쉬-니한 증후군(Lesch-Nyhan syndrome; OMIM 300322), 선천성 부신과형성증(congenital adrenal hyperplasia; OMIM 201910), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolemia; OMIM 143890), 유전성 당뇨(maturity-onset diabetes of the young 또는 MODY 3; OMIM 600496), 크리글러-나자 증후군(Crigler-Najjar syndrome; OMIM 218800 및 606785) 등 10가지 이상이 있다. 또한, 한국인을 대상으로 율슨병²⁾, 당원축적병 제 1a형²¹⁾, 헌터 증후군³⁾, 페닐케톤뇨증²²⁾ 등을 비롯한 다양한 유전성 대사 질환의 주요 돌연변이와 그 빈도를 밝히는 연구도 많이 시행되고 있다.

맺음말

개별 질환의 빈도는 낮은 유전성 대사 질환의 특성을 고려할 때 각 질환별로 매우 다양한 대사 물질이나 효소 활성을 측정하는 생화학적 진단 방법에 비해 DNA 혹은 RNA를 이용하여 유사한 방법으로 검사를 시행할 수 있는 분자 유전학적 진단 방법은 앞으로 더 많이 활용될

것이다. 그러나, 앞서 논의된 바와 같이 검사의 목적과 의의에 대한 이해를 바탕으로 적절한 분자 유전학적 진단 기법을 선택하는 한편, 환자 및 가족에게 검사 과정과 방법 및 결과 해석 등에 대한 상담을 시행하고, 검사 결과의 임상적 의의를 정확하게 평가하는 과정 등 어느 것이라도 생략되거나 소홀히 취급될 경우 부적절하고 불필요한 검사가 될 수 있으므로 매우 세심한 주의를 기울여야 할 것이다.

References

- 1) Ferenci P. Diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:157-65.
- 2) Yoo HW. Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease. *Genet Med* 2002;4:43S-8S.
- 3) Kim CH, Hwang HZ, Song SM, et al. Mutational spectrum of the iduronate 2 sulfatase gene in 25 unrelated Korean Hunter syndrome patients: identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat* 2003;21:449-50.
- 4) Sakallah SA, Sansieri C, Kopp DW, Cooper DL, Barranger JA. A new diagnostic test for Gaucher disease suitable for population screening. *PCR Methods Appl* 1994;4:1-5.
- 5) Beutler E, Gelbart T, Kuhl W, Sorge J, West C. Identification of the second common Jewish Gaucher disease mutation makes possible population-based screening for the heterozygous state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10544-7.
- 6) Myerowitz R, Costigan FC. The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *J Biol Chem* 1988;263:18587-9.
- 7) Han YJ, Lee DH, Kim JW. Newborn screening in Korea. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34 Suppl 3:81-4.
- 8) Yoon HR, Lee KR, Kim H, Kang S, Ha Y, Lee DH. Tandem mass spectrometric analysis for disorders in amino, organic and fatty acid metabolism: two year experience in South Korea. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34 Suppl 3:115-20.
- 9) 오종권, 정영수, 유병훈, 이동근, 임인석. 신생아 선별 검사인 Tandem Mass Spectrometry에 의해 발견된 단풍당뇨증 1례. *대한신생아학회지* 2003;10:88-93.
- 10) In: GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Educational Materials: What is Genetic Testing? Copyright, University of Washington, Seattle. 1993-2005. (Accessed June 17, 2005, at <http://www.genetests.org>.)
- 11) Andersen PS, Jespersgaard C, Vuust J, Christiansen M, Larsen LA. Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening. *Hum Mutat* 2003;21:455-65.
- 12) Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat* 2002;19:334-42.
- 13) Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001;17:439-74.
- 14) Gut IG. DNA analysis by MALDI-TOF mass

- spectrometry. *Hum Mutat* 2004;23:437-41.
- 15) Kristensen VN, Kelefiotis D, Kristensen T, Borresen-Dale AL. High-throughput methods for detection of genetic variation. *Biotechniques* 2001;30:318-22, 24, 26 passim.
 - 16) Strom CM. Mutation detection, interpretation, and applications in the clinical laboratory setting. *Mutat Res* 2005;573:160-7.
 - 17) Vallance H, Ford J. Carrier testing for autosomal-recessive disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40:473-97.
 - 18) In: *GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Educational Materials: Uses of Genetic Testing. Copyright, University of Washington, Seattle. 1993-2005. (Accessed June 17, 2005, at <http://www.genetests.org>.)
 - 19) Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W, 3rd, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* 2001;10:591-7.
 - 20) Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001;11:863-74.
 - 21) Ki CS, Han SH, Kim HJ, et al. Mutation spectrum of the glucose-6-phosphatase gene and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with glycogen storage disease type Ia. *Clin Genet* 2004;65:487-9.
 - 22) Lee DH, Koo SK, Lee KS, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. *J Hum Genet* 2004;49:617-21.