

삼핵산 반복서열 질환인 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증, X-염색체 취약 증후군의 착상전 유전진단 방법에 대한 연구

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 산부인과학교실²

김민지¹ · 이형송¹ · 임천규¹ · 조재원¹ · 김진영² · 궁미경² · 송인옥² · 강인수² · 전진현^{1*}

Optimized Methods of Preimplantation Genetic Diagnosis for Trinucleotide Repeat Diseases of Huntington's Disease, Spinocerebellar Ataxia 3 and Fragile X Syndrome

Min Jee Kim¹, Hyoung-Song Lee¹, Chun Kyu Lim¹, Jae Won Cho¹, Jin Young Kim²,
Mi Kyoung Koong², In Ok Song², Inn Soo Kang², Jin Hyun Jun^{1*}

¹Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center, Kwandong University School of Medicine, Seoul, 100-380, Korea

Objectives: Many neurological diseases are known to be caused by expansion of trinucleotide repeats (TNRs). It is hard to diagnose the alteration of TNRs with single cell level for preimplantation genetic diagnosis (PGD). In this study, we describe methods optimized for PGD of TNRs related diseases such as Huntington's disease (HD), spinocerebellar ataxia 3 (SCA3) and fragile X syndrome (FXS).

Methods: We performed the preclinical assays with heterozygous patient's lymphocytes by single cell PCR strategy. Fluorescent semi-nested PCR and fragment analysis using automatic genetic analyzer were applied for HD and SCA 3. Whole genome amplification with multiple displacement amplification (MDA) method and fluorescent PCR were carried out for FXS. Amplification and allele drop-out (ADO) rate were evaluated in each case.

Results: The fluorescent semi-nested PCR of single lymphocyte showed 100.0% of amplification and 14.0% of ADO rate in HD, and 94.7% of amplification and 5.6% of ADO rate in SCA3, respectively. We could not detect the PCR product of CGG repeats in FXS using the fluorescent semi-nested PCR alone. After applying the MDA method in FXS, 84.2% of amplification and 31.3% of ADO rate were achieved.

Conclusions: Fluorescent semi-nested PCR is a reliable method for PGD of HD and SCA3. The advanced MDA method overcomes the problem of amplification failure in CGG repeats of FXS case. Optimization of methods for single cell analysis could improve the sensitivity and reliability of PGD for complicated single gene disorders of TNRs.

[Korean. J. Reprod. Med. 2007; 34(3): 179-188.]

Key Words: Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Trinucleotide repeats disease, Huntington's disease (HD), Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3), Fragile X syndrome (FXS)

인간의 보조생식술 (assisted reproductive technology, ART)의 발달로 인해 최근 체외수정 및 배아이식술

분야에서, 유전적으로 이상이 있는 환아를 출산할 확률이 높은 부부들에게 정상아의 출산 기회를 제공하고, 또한 습관성 유산이나 염색체의 수적, 구조적 이상으로 인해 임신 예후가 좋지 않은 부부들을 위해서 착상전 유전진단 (preimplantation genetic

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7592, Fax: (02) 2265-5621
e-mail: junjh55@hanmail.net

diagnosis, PGD) 방법이 도입되어 적용되고 있다. 이러한 착상전 유전진단은 기존의 산전진단 (prenatal diagnosis)에 비하여 유전적으로 비정상인 배아의 이식을 배제하고 정상적인 배아만을 선별적으로 이식하여, 유전질환을 갖는 태아의 임신과 비윤리적인 유산으로 인한 정신적, 육체적 부담을 감소시킬 수 있는 장점이 있다.

이러한 착상전 유전진단의 개념은 Edwards와 Gardner (1968)에 의해 처음으로 제안되었으며,¹ 그 후 착상전 유전진단의 성공적인 임상 적용은 1990년 Handyside 등에 의해 최초로 보고되었다.² 현재 착상전 유전진단은 염색체 전좌와 같은 염색체 구조적 이상에 따른 습관성 유산 환자를 대상으로 한 염색체 검사와 여러 종류의 단일 유전자 이상 또는 X-염색체 연관 유전질환의 이환 가능성이 높은 부부를 대상으로 전 세계적으로 약 50곳의 착상전 유전진단 센터에서 시행되고 있다.

국내에서도 1990년대 중반 이후 착상전 유전진단이 시행되고 있으며, 염색체의 수적 이상이나 구조적 이상을 대상으로 형광직접조합법 (fluorescent in situ hybridization, FISH)을 이용하여 시행한 사례들과³⁻⁶ 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy, DMD), ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, lactic acidosis 그리고 epidermolysis bullosa (EB) 등 단일 유전자 이상에 의한 유전질환을 대상으로 착상전 유전진단을 시행한 결과가 보고된 바 있다.^{7,8}

여러 종류의 단일 유전자 이상에 의한 질환들 가운데, 현재까지 14종류의 신경계 질환이 불안정한 삼핵산 반복서열 (trinucleotide repeats, TNRs)의 확장 (expansion)으로 인해 발병하는 것으로 알려져 있다.⁹ 이들 중 헌팅톤병 (Huntington's disease, HD), X-염색체 취약 증후군 (fragile X syndrome, FXS), 척수 소뇌성 운동실조증 (spinocerebellar ataxia 3, SCA3) 그리고 근육긴장성 장애 (myotonic dystrophy)의 경우 각각의 삼핵산 반복서열의 확장 정도를 확인할 수 있는 단일 세포 PCR 방법이 개발되어 성공적인 착상전 유전진단이 시행되었다.¹⁰⁻¹²

단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단 시행

에서 가장 중요한 점은 하나 또는 두 개의 할구에 있는 극소량의 DNA 시료를 이용한 PCR에서 오염과 allele drop-out을 최소화하면서 성공적으로 시료를 증폭하여 진단의 정확성을 높이는 것이다. 이러한 극소량의 DNA 시료에서 기인하는 여러 가지 문제점들을 해결하기 위해 primer extension preamplification (PEP)-PCR, degenerative oligonucleotide primed (DOP)-PCR 방법 등을 이용한 whole genome amplification이 시도되기도 하였다.^{13,14} 최근에는 기존의 방법 외에 바이러스에서 유래한 phi 29 polymerase를 이용한 DNA 시료 증폭 방법인 multiple displacement amplification (MDA)를 착상전 유전진단에 도입하여 그 효용성이 확인되었다.^{15,16} 본 연구에서는 삼핵산 반복서열 질환인 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증, X-염색체 취약 증후군 등을 대상으로 착상전 유전진단을 시행하기 위한 전임상 검사로서 단일 림프구 (single lymphocyte)를 이용한 fluorescent semi-nested PCR 방법과 MDA 방법을 이용하여 실제적인 착상전 유전진단 방법을 최적화하는 과정에서 얻은 결과들에 대해 기술하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 헌팅톤병 (Huntington's disease, HD)

헌팅톤병 (HD; OMIM 143100)은 점진적인 신경 퇴화성 질환 (neurodegenerative disease)으로 상염색체 우성 유전방식으로 이환되며, 10,000명당 1명의 발병률을 보이는 것으로 알려져 있다. 이 질환은 *Huntingtin* 유전자의 5' 말단에 위치하는 CAG TNRs의 불안정한 확장에 기인하며, 지금까지의 연구 결과에 따르면 CAG TNRs이 11~34 repeats일 경우 정상, 35~39일 경우는 증상이 나타날 가능성이 있으며, 40 repeats 이상으로 CAG repeats이 확장된 경우 발병하는 것으로 보고되고 있다.¹⁷ 본 연구에서의 헌팅톤병 가계의 경우 남편은 28/31 CAG repeats로 정상이었지만, 부인의 경우 CAG repeats가 27/62로 하나의 allele이 확장되어 있었다.

2. 척수소뇌성 운동실조증 (Spinocerebellar ataxia 3, SCA3)

척수소뇌성 운동실조증 (SCA3; OMIM 109150)은 상염색체 우성 유전방식으로 이환되는 신경퇴화성 질환으로 *MJD1* (Machado-Joseph disease) 유전자의 CAG TNRs 확장에 의해 발병된다. 이 CAG TNRs는 정상인에서도 매우 다양하여 12~43 repeats를 나타내며, SCA3 환자의 경우 보통 62~84 CAG repeats를 보이는 것으로 알려져 있다.¹⁸ 본 연구에서의 척수소뇌성 운동실조증 가계에서는 남편의 CAG repeats이 27/69로서 하나의 allele이 확장되어 있었으며, 부인의 경우에는 26/32 repeats로 정상이었다.

3. X-염색체 취약 증후군 (Fragile X syndrome, FXS)

X-염색체 취약 증후군 (FXS; OMIM 309550)은 정신 박약 또는 지체를 보이는 X-염색체 연관 질환으로 발병 원인으로는 *fragile X mental retardation-1 (FMR1)* 유전자의 5' untranslated region (5' UTR)에 위치하는 CGG TNRs의 확장이나 과메틸화 (hypermethylation)와 관련이 있다고 알려져 있다.^{19,20} 연구 결과에 의하면 200 repeats 이상일 경우 full mutation으로 질환이 발병하고, 55~200 repeats 사이일 경우 premutation range로 임상적으로 질환의 소견은 보이지 않으나 다음 세대로 그 X 염색체가 유전되면서 CGG repeats이 더욱 확장되어 결국은 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다.²¹ 본 연구에서의 X-염색체 취약 증후군 가계의 경우 남편은 31 CGG repeats로 정상이었으며, 부인의 경우 정상적인 28 repeats와 100 repeats 이상의 비정상 allele을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이들 부부의 첫 번째 임신에서 양수검사 결과 200 repeats 이상의 full mutation을 가지고 있는 것으로 확인되어 인공유산 후 본 센터에 내원하였다.

4. Genomic DNA의 분리와 single lymphocytes 준비

각 부부의 혈액으로부터 AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 사용 전까지 -20°C에 보관하였으며, 이를 이용하여 각 질환에 대한 부부의 관련 유전자의 TNRs의 수를 재확인하였다. 일차적으로 genomic DNA를 이용하여 각각의 TNRs 유전자에 대한 효과적인 primers를 선정하고 PCR 조건을 확립하였다 (Table 1). 이러한 조건의 효용성을 단일 세포 수준에서 확인하기 위해 각 환자의 혈액으로부터 Ficoll-Paque density gradient separation (Ficoll-Paque™ PLUS, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 방법으로 단일 림프구를 분리하였다. 배양접시에 Ca²⁺/Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS)로 소적을 만들고 그 소적에 분리된 림프구의 일부를 넣어 희석한 후 현미경 하에서 미세유리관을 이용하여 각각의 단일 림프구를 3 µl의 lysis buffer (200 mM KOH, 50 mM DTT)가 들어있는 각각의 PCR tube에 넣었다. 준비된 단일 림프구 시료는 사용 전까지 -70°C에 보관하였으며, 이를 이용하여 각 primers의 PCR 조건을 재확인하고, 증폭 성공률 그리고 allele drop-out (ADO) rate를 조사하는 착상전 유전진단에 대한 전임상 검사를 실시하였다. 그러나 X-염색체 취약 증후군의 경우 환자의 100 repeats 이상의 비정상 allele은 일반적인 PCR 방법으로 증폭하기가 어렵기 때문에, 28/34 repeats를 가지고 있는 heterozygous type의 정상인의 단일 림프구를 동일한 방법으로 준비하여 분석하였다.

5. Fluorescent semi-nested PCR analysis and fragment analysis

준비된 단일 림프구는 alkaline lysis buffer를 이용하여 용해시키고, neutralization buffer (900 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM KCl, 200 mM HCl)를 넣어 중화시켰다. PCR 특이성을 높이고 ADO rate을 줄이기 위해 fluorescent semi-nested PCR 방법을 사용하였으

Table 1. Primers used for preclinical assays of HD, SCA3 and FXS

	Sequences of primers	References
Huntington's disease (HD)		
HD-forward (outer)	5'-AGGCCTTCGAGTCCCTCAAGT-3'	Sermon <i>et al.</i> ²⁵
HD-forward (inner)*	5'-CTGAGGCAGCAGCGGCTGTG-3'	
HD-reverse	5'-GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA-3'	
Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3)		
SCA3-forward (outer)	5'-TCAGACTAACTGCTCTTGCATTC-3'	Kawaguchi <i>et al.</i> ²⁶
SCA3-forward (inner)*	5'-CCAGTGACTACTTTGATTCG-3'	
SCA3-reverse	5'-TGGCCTTTCACATGGATGTGAA-3'	
Fragile X syndrome (FXS)		
FXS-forward (outer)	5'-ACGTGACGTGGTTTCAGTGTTTAC-3'	O'Connell <i>et al.</i> ²⁷
FXS-forward (inner)*	5'-GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTCCGGT-3'	
FXS-reverse	5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3'	

* Primers are 5'-6-FAM labeled.

며, 이때 사용한 primers의 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 일차 PCR의 경우, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 10 pmol primers, 1 unit Taq DNA polymerase (GeneCraft Co, Munster, Germany)를 혼합한 후 전체 반응액이 30 µl가 되게 하였다. 일차 PCR은 DNA thermal cycler (ABI 2700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 96°C에서 10분, 94°C에서 40초 (처음 10 cycles에서는 96°C에서 40초), 각 primer의 annealing temperature에서 40초, 72°C에서 40초의 cycle을 25회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 일차 PCR의 증폭산물 1 µl를 사용하여 다음과 같은 조건에서 fluorescent semi-nested PCR을 진행하였다. 전체 반응액은 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP [fragile X syndrome의 경우 7-deaza-dGTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 사용], 1 pmol FAM - labeled primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 unit Taq DNA polymerase를 혼합한 후 20 µl가 되게 하였다. Semi-nested PCR의 반

응조건은 94°C에서 10분, 94°C에서 40초, 각 primer의 annealing temperature에서 40초, 72°C에서 40초의 cycle을 40회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭산물은 ABI 3100 Avant automatic genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 capillary electrophoresis한 후, GeneScan Analysis software version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)과 GeneScan-ROX 1000 Size Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 PCR fragment analysis를 수행하였다. 착상전 유전진단의 오진 원인 중 하나인 오염 여부를 확인하기 위하여 PCR 시 2개 이상의 음성 대조군 시료를 포함하여 모든 실험을 진행하였다.

6. Multiple displacement amplification (MDA)

Fluorescent semi-nested PCR 방법으로 대상 유전자의 분석이 어려운 경우 MDA 방법으로 whole genome amplification을 시도하였다. *FMRI* CGG repeat의 수가 28/34 repeats인 heterozygous type 정상인과 X-염색체 취약 증후군 환자 (28>100 repeats)의 혈

Table 2. Amplification and allele drop-out rates of preclinical assays for HD, SCA3 and FXS

	Huntington's disease (HD)	Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3)	Fragile X syndrome (FXS)
Applied methods	Fluorescent semi-nested PCR	Fluorescent semi-nested PCR	MDA* and fluorescent PCR
No. of single lymphocytes	86	57	19
No. of amplified cells	86	54	16
Amplification rate	100.0%	94.7%	84.2%
Allele drop-out rate	12/86 (14.0%)	3/54 (5.6%)	5/16 (31.3%)

* Multiple displacement amplification.

액을 이용하여 단일 림프구 시료를 준비하였으며, REPLI-g Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 을 사용하여 MDA를 수행하였다. 간단하게 MDA 방법을 설명하면, 준비된 단일 림프구 시료를 각각 2.5 µl PBS가 들어있는 0.2 ml PCR tube에 넣어 준비하였고, denaturation lysis buffer 2 (DLB 2 : 200 mM DTT, 400 mM KOH and 10 mM EDTA) 3.5 µl를 첨가한 후 얼음에 10분간 방치하여 용해된 세포의 DNA를 변성시켰으며 stop buffer (stop solution in REPLI-g Mini Kit) 3.5 µl를 넣어 반응을 중단시켰다. 이후 cell lysates에 40 µl의 master mix (DW 10 µl, reaction buffer 29 µl, phi 29 DNA polymerase 1 µl)를 첨가하여 30°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 phi 29 DNA polymerase의 불활성화를 위해 65°C에서 3분간 방치하였으며, 최종적으로 약 100 ng/µl의 증폭된 MDA 산물을 얻었다. MDA 산물을 1/50 비율로 희석하여, 위에서 기술한 방법으로 *FMRI* CGG repeats에 대한 fluorescent PCR을 수행하였다.

결 과

1. 헌팅톤병 (Huntington's disease, HD)

헌팅톤병 질환의 원인 유전자인 *huntingtin* 유전자의 5' 말단에 위치하는 CAG repeat를 증폭하기 위해 outer primers와 inner primer를 각각 고안하여 fluorescent semi-nested PCR을 수행하였다. Genomic DNA를 이용한 검사에서 남편은 각각 28개와 31개

의 CAG repeats를 가지고 있는 정상임을 재확인할 수 있었으며, 헌팅톤병 환자인 부인의 경우 27개의 CAG repeats과 62개의 비정상 CAG repeats를 가지고 있음을 재확인하였다. 단일 세포에서의 진단 효용성을 확인하기 위해 정상의 CAG repeats를 가지는 남편의 림프구 40개, 확장된 repeats를 가지고 있는 부인의 림프구 46개, 총 86개의 단일 림프구 시료를 이용하여 착상전 유전진단에 대한 전임상 검사를 실시하였다. 그 결과 PCR 증폭성공률은 남편 (40/40)과 부인 (46/46) 모두에서 100.0%를 나타내었으며, ADO rate는 남편의 경우 15.0% (6/40), 부인의 경우 13.0% (6/46)로 확인되었다. 결과적으로 총 86개의 단일 림프구 시료 모두 증폭에 성공하여 100.0%의 증폭성공률을 나타내었으며, 이 중 12개의 시료에서 ADO가 관찰되어 14.0% (12/86)의 ADO rate를 나타내었다 (Table 2, Figure 1).

2. 척수소뇌성 운동실조증 (Spinocerebellar ataxia 3, SCA3)

부부의 genomic DNA를 이용하여 각각의 *MJD1* 유전자의 CAG repeats를 fluorescent semi-nested PCR 방법으로 조사한 결과 남편은 27/69 repeats, 부인은 26/32 repeats를 가지고 있음을 재확인할 수 있었다. 실제적인 척수소뇌성 운동실조증에 대한 착상전 유전진단을 위해 확장된 CAG repeats를 가지고 있는 남편의 혈액으로부터 57개의 단일 림프구 시료를 준비하여 fluorescent semi-nested PCR 방법으로

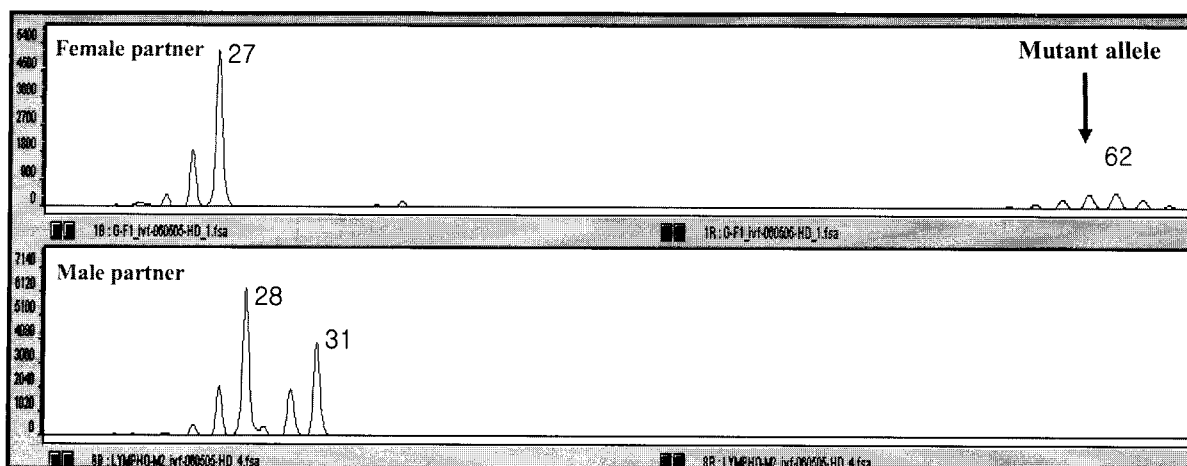


Figure 1. Electropherograms of the CAG repeats in the preclinical assay with fluorescent semi-nested PCR using female and male partner's lymphocytes for Huntington's disease. An arrow indicates the expanded mutant allele. Numbers represent the number of the CAG repeats.

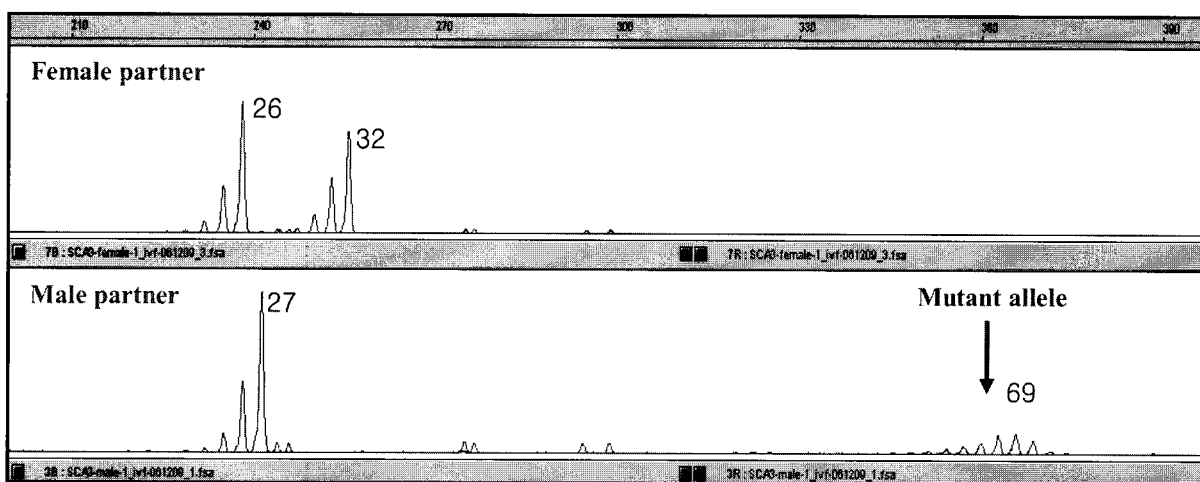


Figure 2. Electropherograms of the CAG repeats in the preclinical assay with fluorescent semi-nested PCR using female and male partner's lymphocytes. An arrow indicates the expanded mutant allele. Numbers represent the number of the CAG repeats.

전임상 검사를 수행하였다. 그 결과 총 57개의 시료 중 54개에서 증폭에 성공하여 94.7%의 증폭성 공률을 보였으며, 이 중 3개에서 ADO가 관찰되어 5.6% (3/54)의 ADO rate를 나타내었다 (Table 2, Figure 2).

3. X-염색체 취약 증후군 (Fragile X syndrome, FXS)

일차적으로 부부의 genomic DNA를 이용하여

FMRI 유전자의 CGG repeats를 fluorescent semi-nested PCR로 조사한 결과 남편은 31개의 정상 CGG repeats를 확인할 수 있었다. 부인의 경우 28개의 정상 CGG repeats는 확인되었으나, 예상한 바와 같이 부인의 100 repeats 이상의 mutant allele은 확인하지 못하였다. 따라서 정확한 ADO rate의 확인을 위해 28/34 TNRs를 가지는 정상인의 단일 림프구 시료를 전임상 검사에 사용하였다. 그러나 기존의 fluorescent semi-nested PCR 방법으로 전임상 검사를

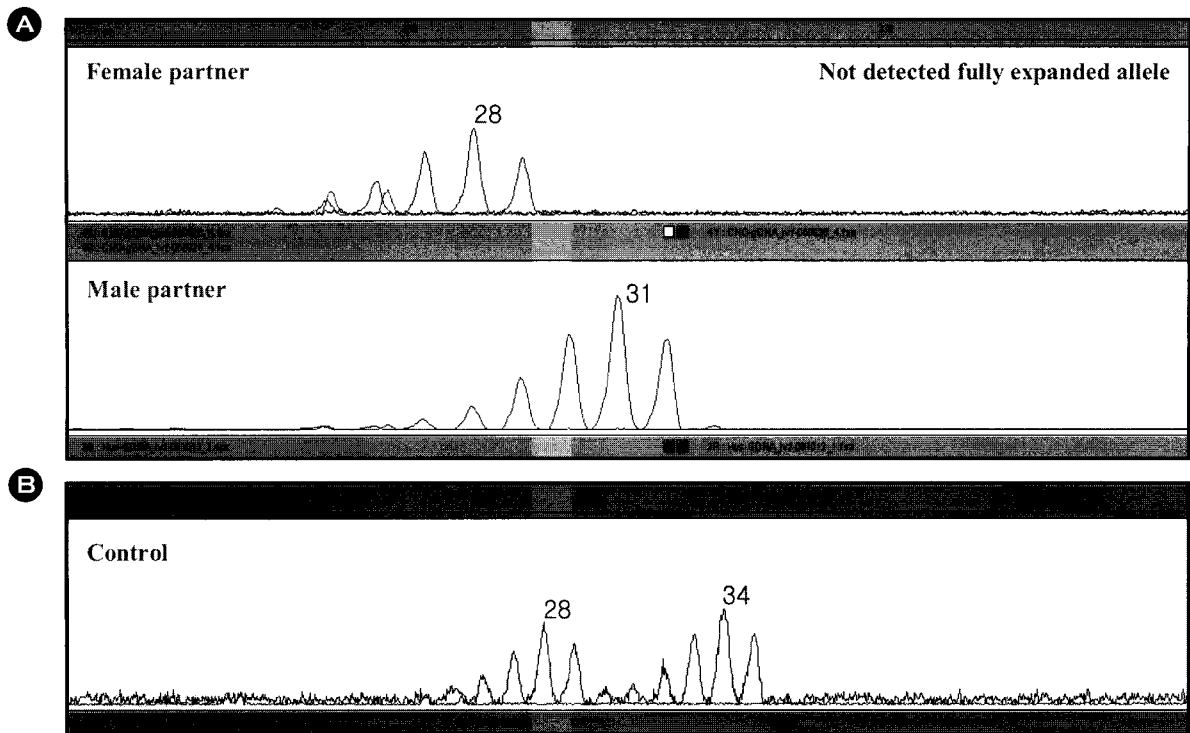


Figure 3. Electropherograms of the CGG repeats in the preclinical assay with multiple displacement amplification and fluorescent PCR using female and male partner's lymphocytes (A) and control (B). Expanded mutant allele (more than 100 repeats) of female partner was not detected (A). Normal 28/34 alleles of control were detected (B). Numbers represent the number of the CGG repeats.

실시하였으나, genomic DNA에서 얻은 결과와는 달리 heterozygous type (28/34 allele)의 단일 림프구 시료에서도 기대했던 결과를 확인할 수 없었다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 MDA 방법을 이용하여 whole genome amplification을 시도하였고, 그 MDA 산물을 이용하여 *FMRI* 유전자에 대한 fluorescent PCR을 수행하였다. 그 결과 총 19개의 단일 림프구 MDA 산물에서 CGG repeats를 조사한 결과 16개의 시료에서 정확한 CGG repeats 수를 확인할 수 있어 84.2% (16/19)의 증폭성공률을 보였으며, 이 중 5개의 시료에서 ADO가 관찰되어 31.3% (5/16)의 ADO rate를 나타내었다 (Table 2, Figure 3).

고 찰

단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단 분야

는 지속적으로 발전하고 있는 분자생물학적인 분석 방법을 효과적으로 접목하면서 그 적용 범위가 계속 확장되어 가고 있다. 그러나 하나 또는 두 개의 할구에서 유래한 극소량의 DNA 시료를 사용하여 PCR을 수행하기 때문에 모든 착상전 유전진단 논문들에서 언급하듯이 외부 DNA로부터의 오염 (contamination), 전체적인 PCR 증폭 실패 (amplification failure), 그리고 ADO와 같은 문제가 착상전 유전진단을 실시하는데 가장 큰 장애가 되고 있다.

이러한 문제점들을 최소화하고 실제 임상에서 착상전 유전진단을 성공적으로 진행할 수 있는 최적의 조건들을 확립하기 위해, 각 환자와 그의 배우자 또는 가족 등의 단일 림프구 시료 등을 이용하여 각각의 특정 유전자에 대한 증폭성공률을 높이고 ADO rate를 낮추어 진단의 정확성을 높이기 위해 전임상 검사가 반드시 진행되어야 한다.²² 이러한 전임상 검사의 기간은 각 연구실 연구원의 속

련도, 장비 등 여러 조건에 따라 차이가 있지만, 경험이 많은 착상전 유전진단 센터에서도 보통 1~2개월 정도 소요되고 있다.²³ 본 센터에서도 환자가 처음 내원한 후 그 가계에서 유전질환의 원인이 되는 돌연변이의 확인, 착상전 유전진단 방법 결정, 적절한 primers의 고안 및 선정, PCR 조건의 최적화, 단일 림프구 시료에서의 PCR 조건 재확인, 단일 림프구 시료에서의 증폭성공률과 ADO rate 조사 등의 일련의 과정을 거쳐 실제 착상전 유전진단을 시행할 수 있을 때까지 보통 약 2달 정도의 시간이 소요되고 있다.

근래에 DNA의 구조적 불안정성에 기인한 TNRs이 확장되어 질환이 발생하는 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증, X-염색체 취약 증후군 등에 대한 성공적인 착상전 유전진단 사례가 보고되고,¹¹ 국내에서도 이러한 질환들에 대한 착상전 유전진단이 요구됨에 따라 본 연구실에서도 이에 대한 단일 세포를 이용한 전임상 검사를 수행하였다. 일반적인 유전자에 비해 TNRs에 대한 분석은 상대적으로 primers의 선정과 PCR 조건의 최적화에 있어 많은 어려움이 발생하게 된다. 특히, X-염색체 취약 증후군의 mutant allele의 경우 *FMRI* 유전자의 CGG PCR 반응 시에 높은 변성 온도를 요구하고 PCR 과정에서 증폭산물들이 2차적인 구조를 형성할 가능성이 높아 PCR 방법으로 증폭이 매우 어렵다고 알려져 있다.²⁴ 따라서 mutant allele에 대한 직접적인 분석이 쉽지 않기 때문에 보다 정확한 진단을 위해 linked markers에 대한 동시적인 분석이 시행되어 왔다.¹⁶ 이와 같은 이유로 단일 세포에서 X-염색체 취약 증후군의 TNRs 분석에 소요되는 기간이 3개월 정도로 길어지게 되었으며, PCR 방법으로는 100 repeats 이상의 mutant allele에 대한 직접적인 확인이 어려웠다.

본 연구에서 척수소뇌성 운동실조증의 경우 증폭성공률은 94.7%, 헌팅톤병의 경우 100.0%의 성공률을 보여 다른 질환의 전임상 검사 결과와 비슷한 성공률을 보였으며, ADO rate 또한 각각 5.6%와 14.0%로 나타나 헌팅톤병에서 약간 높은 경향

을 보였지만 TNRs에 대한 진단의 어려움을 고려하면 실제적인 착상전 유전진단의 시행이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 X-염색체 취약 증후군의 경우 다른 질환과는 다르게 genomic DNA에서는 fluorescent semi-nested PCR 방법으로 예상했던 결과를 확인할 수 있었지만, 단일 세포를 대상으로 시행할 경우에는 기대했던 결과를 얻을 수 없었다. 이는 *FMRI* 유전자의 CGG repeats이 위치하는 부위의 GC-rich 염기서열의 특이성 때문에 적절한 primers 고안과 효과적인 PCR에 어려움이 있으며, 또한 단일 세포라는 극소량의 DNA를 사용하기 때문으로 생각된다. 따라서 이 질환에 대한 정확한 착상전 유전진단을 위해서는 whole genome amplification을 통해 충분한 양의 DNA를 확보한 후 PCR을 수행하는 것이 더욱 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이라 판단되었다. 최근에 Burlet 등은¹⁶ X-염색체 취약 증후군의 착상전 유전진단에 MDA 방법을 사용하여 증폭성공률을 85~95%로 높였으며, ADO rate 또한 7~34%로 낮췄다고 보고하였다. 이들은 X-염색체 취약 증후군에 대한 8사례의 착상전 유전진단에서 41~66%의 증폭성공률을 보였으며, MDA를 시행하지 않았을 경우 약 45% 정도는 결과를 얻을 수 없었던 반면, MDA를 시행한 후 진단을 하였을 경우 86%에서 성공적인 진단이 가능하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 MDA와 fluorescent PCR을 적용하여 84.2%의 증폭성공률과 31.3%의 ADO rate를 얻을 수 있었다. 다른 질환의 경우와 비교해 ADO rate가 다소 높은 경향을 보이지만, 실제적인 착상전 유전진단 과정에서는 여러 개의 polymorphic linked markers를 동시에 분석하면 보다 정확한 진단이 가능하리라 생각된다. 이러한 MDA 방법을 이용하면 충분한 양의 DNA 시료를 확보할 수 있어, 여러 종류의 polymorphic linked markers에 대한 분석이 가능하며 본 연구실에서도 이에 대한 효용성을 확인할 수 있었다 (data not shown).

결론적으로 헌팅톤병과 척수소뇌성 운동실조증에 대한 단일 림프구 시료를 이용한 전임상 검사에

서 fluorescent semi-nested PCR의 진단 효용성을 확인할 수 있어, 이 방법을 이용한 실제적인 착상전 유전진단이 가능함을 확인하였다. 또한, 단일 림프구 시료를 대상으로 시행한 X-염색체 취약 증후군의 전임상 검사에서는 기존의 fluorescent semi-nested PCR 방법으로는 진단이 불가능하였으며, MDA를 이용한 whole genome amplification과 fluorescent PCR 방법을 병행하였을 때 진단이 가능하였다. 이와 같이 유전자의 변이에 대한 분석이 쉽지 않은 TNRs 관련 단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단의 경우 다양한 유전자 분석 방법을 이용한 단일 세포에서의 진단 방법의 최적화 연구가 필수적으로 선행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Edwards RG, Gardner RL. Choosing sex before birth. *New Scientist* 1968; 38: 218-20.
2. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
3. 임천규, 함미현, 전진현, 송견지, 김정옥, 박소연 등. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아이식술에서 형광직접보합법을 이용한 착상전 유전자진단의 임상적 적용. *대한산부인과학회지* 2000; 43: 1147-53.
4. 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선 등. 유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. *대한불임학회지* 2002; 29: 269-78.
5. 임천규, 민동미, 이형송, 변혜경, 박소연, 류현미 등. 형광직접보합법을 이용한 착상전 유전진단 기법의 최적화와 경험 축적에 의한 임신율의 향상. *대한불임학회지* 2004; 31: 29-38.
6. Lim CK, Jun JH, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong MK, et al. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* 2004; 24: 556-61
7. 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수, 백은찬 등. 근이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상전 유전자진단. *대한불임학회지* 1996; 23: 109-14.
8. 이형송, 최혜원, 임천규, 민동미, 변혜경, 김진영 등. OTC 효소결핍증, 수포성 표피박리증 및 lactic acidosis 가계에서 duplex nested PCR 방법을 이용한 착상전 유전진단: OTC 효소결핍증 가계에서의 정상아 임신 및 출산. *대한산부인과학회지* 2004; 47: 708-18.
9. Masino L and Pastore A. A structural approach to trinucleotide expansion diseases. *Brain Res Bull* 2001; 56: 183-9.
10. Drusedau M, Dreesen JCFM, de Die-Smulders C, Hardy K, Bras M, Dumoulin JCM, et al. Preimplantation genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia 3 by (CAG)_n repeat detection. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 71-5.
11. Sermon K, Seneca S, De Rycke M, Goossens V, Van de Velde H, De Vos A, et al. PGD in the lab for triplet repeat diseases? Myotonic dystrophy, Huntington's disease and Fragile-X syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183: S77-85.
12. Stern HJ, Harton GL, Sisson ME, Jones SL, Fallon LA, Thorsell LP, et al. Non-disclosing preimplantation genetic diagnosis for Huntington disease. *Prenat Diagn* 2002; 22: 503-7.
13. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992; 13: 718-25.
14. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implication for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5847-51.
15. Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S. Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 376-80.
16. Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyerisen E, et al. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 647-52.
17. Ramaswamy S, Shannon KM, Kordower JH. Huntington's disease: pathological mechanisms and therapeutic strategies. *Cell Transplant* 2007; 16: 301-12.
18. Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 2005; 4: 2-6.
19. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable

- region of DNA. *Science* 1991; 252: 1179-81.
20. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1017-20.
 21. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-58.
 22. Choi HW, Lee HS, Lim CK, Koong MK, Kang IS, Jun JH. Reliability of the single cell PCR analysis for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Kor J Fertil Steril* 2005; 32: 293-300.
 23. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, et al. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 2006; 21: 670-84.
 24. Ioannis P, Carin L, Ulf K, Pierre A. A methylation PCR for detection of fragile X syndrom. *Hum Mutat* 1999; 14: 71-9.
 25. Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, et al. Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1427-36.
 26. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; 8: 221-8.
 27. O'Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA, Richie KL. Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet* 2002; 61: 13-20.

= 국문초록 =

목적: 본 연구에서는 삼핵산 반복서열 확장에 의해 발병하는 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증과 X-염색체 취약 증후군 등에 대한 착상전 유전진단을 시행하기 위한 전임상 검사에서 진단 방법을 최적화하는 과정을 통해 얻은 결과들에 대해 기술하고자 한다.

연구방법: 단일 림프구를 이용한 임상전 검사에서는 서로 다른 allele를 갖고 있는 환자의 단일 세포를 사용하였으며, 헌팅톤병과 척수소뇌성 운동실조증에서는 fluorescent semi-nested PCR 시행 후 fragment analysis를 수행하였다. X-염색체 취약 증후군의 경우 multiple displacement amplification (MDA) 방법을 이용한 whole genome amplification에서 얻어진 MDA 산물로 fluorescent PCR을 시도하였다.

결과: 헌팅톤병의 경우 단일 림프구 시료 모두에서 CAG repeats 증폭에 성공하여 100.0%의 증폭성공률과 14.0% allele drop-out (ADO) rate를, 척수소뇌성 운동실조증의 경우 94.7%의 증폭성공률과 5.6%의 ADO rate을 나타내었다. X-염색체 취약 증후군의 경우 fluorescent semi-nested PCR 방법만으로는 단일 림프구 시료에서 CGG repeats이 증폭되지 않았지만, MDA 산물을 이용한 fluorescent PCR 결과 84.2%의 증폭성공률과 31.3%의 ADO rate을 얻을 수 있었다.

결론: 본 연구를 통해 헌팅톤병과 척수소뇌성 운동실조증의 착상전 유전진단에는 fluorescent semi-nested PCR 방법의 적용이 가능함을 확인하였으며, X-염색체 취약 증후군의 경우에는 MDA를 이용한 fluorescent PCR 방법을 사용해야 함을 알 수 있었다. 유전자의 변이에 대한 분석이 쉽지 않은 단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단의 경우 다양한 유전자 분석 방법을 이용한 단일 세포에서의 진단 방법의 최적화 연구가 필수적으로 선행되어야 할 것으로 사료된다.

중심단어: 착상전 유전진단, 삼핵산 반복서열 질환, 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증, X-염색체 취약 증후군
