

## FISH를 이용한 정자의 염색체 분석 Chromosome Analysis of Spermatozoa Using FISH

제주의대 산부인과

지 병 철

### I. 서 론

70년대 초반만 하더라도 정자의 염색체 검사는 소위 heterochromatism을 가지는 1번, 9번, Y 염색체 정도만을 염색하여 구분하는 수준이었으며, 개개의 염색체 검사가 가능하게 된 것은 Rudak 등 (1978)이 투명대 제거 햄스터 난자를 이용하면서부터이다. 이는 정자를 투명대 제거 햄스터 난자에 침입시킨 후 형성된 남성 전핵에서 세포분열 중기표본을 얻어 염색체를 관찰하는 방법이었다. 그러나 이러한 햄스터 난자를 이용하는 방법은 그 과정이 매우 복잡하고 많은 시간이 소요되므로 실제로 임상에 적용할 수는 없었다. 특히 남성 불임 환자의 정자는 수정능력이 낮아 투명대 제거 햄스터 난자내로의 침투가 용이하지 못하므로 투명대 제거 햄스터 난자를 이용한 정자의 핵형분석의 유용성은 다소 떨어진다. 비교적 최근에 각 염색체에 결합하는 특정 DNA probe가 개발되어 in situ hybridization 기법으로 많은 수의 정자를 단시간 내에 분석할 수 있는 전기가 마련되었다. 초기에는 방사선 동위원소를 결합시킨 DNA probe가 사용되었으나, 이후 형광물질 (fluorochromes)이 결합된 DNA probe가 개발됨으로써 현재의 fluorescence in situ hybridization (FISH) 기법으로 발전하게 되었다. 최근 이중 형광 필터 및 삼중 형광 필터의 개발과 더불어 여러 색의 형광물질 개발로 인해 소위 multi-color FISH로 발전하고 있다.

불임 분야에서 관심사 중 하나는 불임 남성의 유전적 결함이다. 이는 특히 난자세포질내 정자 주입술 (ICSI)의 도입으로 중증 남성 불임에서도 임신이 가능해짐에 따라 부계 기원의 염색체 이상이 관심사로 대두되었기 때문이다. 무정자증 환자를 포함한 남성 불임에서의 유전적 결함은 크게 세포유전학적 수준에서의 염색체 이상과 Y-염색체의 미세결손 (microdeletion)의 두 가지로 나뉘며, 세포유전학적 수준에서의 염색체 이상은 다시 체세포 염색체 이상과 생식세포 즉, 정자의 염색체 이상으로 나눌 수 있다. 최근 FISH 기법을 이용한 연구들에 의하면 불임 남성에서는 체세포 염색체는 정상이더라도 정자 수준에서의 염색체 이상이 매우 높은 빈도로 나타난다고 보고되고 있다.

### II. FISH의 기본 과정

FISH의 시행방법은 DNA probe의 준비, 정보를 얻고자 하는 세포의 슬라이드 제작, 슬라이드의 denaturation 및 탈수, probe mixture의 제조, DNA probe의 denaturation, DNA probe와 target DNA

의 hybridization, post-hybridization wash, immunocytochemistry (직접법의 경우 생략), 대조염색의 절차로 구성된다. 대조염색 후 적절한 형광 필터가 장착된 형광현미경하에서 형광 signal을 관찰하게 된다. FISH는 biotin 혹은 digoxigenin으로 표지된 DNA probe를 이용하는 간접법과 직접 형광 물질이 결합된 nucleoside triphosphate analogs를 결합시킨 DNA probe를 이용하는 직접법으로 구분된다. 직접법은 형광물질 (reporter)을 직접 DNA probe에 결합시킨 후 target DNA와 hybridization을 시행하여 형광현미경하에서 직접 형광 signal을 검색하는 방법으로 특히 단시간 내에 결과를 원할 경우 혹은 multi-color multi-probe FISH를 시행하고자 할 때 큰 장점이 있다. 간접법은 화학적으로 혹은 효소학적으로 reporter를 DNA probe에 도입시킨 후 affinity cytochemistry에 의해 형광 signal을 검색하는 방법으로 주로 크기가 작은 유전자, unique sequence 혹은 low-copy sequence를 검색하기에 적합하다. 최근 들어 다양한 DNA probe가 개발되었으며, 각 회사에서 여러 형태로 표지된 DNA probe를 공급하고 있다. 많이 쓰이는 DNA probe로는 centromeric probe, whole chromosome painting probe, unique sequence probe 및 telomeric probe가 있다.

#### 1. Centromeric probe

이 probe는 염색체의 centromere 혹은 pericentromere에 존재하는 repetitive DNA 서열을 가지며, 강한 signal을 발생하는데 짧은 hybridization 시간을 요한다. 증기 염색체와 간기 핵에서 이용할 수 있고, 염색체 수적 이상 (aneuploidy)을 빠르게 진단하는데 주로 이용되고 있으며, mosaicism 혹은 성 판정시 유리한 probe이다. 그러나 염색체 구조적 이상을 진단하는데는 효과적이지 못하다.

#### 2. Whole chromosome painting probe

단일 염색체내 특정 부위에 대한 각각의 서열들을 모은 많은 probe의 집합체로 증기 염색체에서 염색체 수적 이상, marker 염색체의 기원 및 전좌를 분석하는데 이용되고 있다. 그러나 동일 염색체내의 구조적 이상과 미세손실 부위를 검색하기에는 적당치 못하다.

#### 3. Unique sequence probe

Locus-specific DNA segment를 가지며 증기 염색체와 간기 핵에서 이용할 수 있다. 유전자 특이 혹은 유일한 서열을 검색하는데 이용할 수 있다. 특히 특정 염색체내의 microduplication 혹은 microdeletion을 검색하는데 이용될 수 있다.

#### 4. Telomeric 혹은 subtelomeric probe

가장 최근에 개발되기 시작한 probe로 태아의 핵형분석시 한쪽 부모에서 알려진 상호전좌 (reciprocal translocation) 보인자일 경우 이용할 수 있으며, dysmorphic feature, 원인불명의 정신박약을 가진 가계 혹은 반복 유산을 경험한 부부에서 숨겨진 전좌를 검색하고자 할 때 이용할 수 있다.

### III. 이수배수체의 판독

Nullisomy: 대상 염색체에 대한 signal은 없고 다른 염색체에 대한 signal은 한 개가 관찰될 때

Disomy: 대상 염색체에 대한 signal은 두 개면서 다른 염색체에 대한 signal은 한 개가 관찰될 때  
 Diploidy: 대상 염색체에 대한 signal은 두 개면서 다른 염색체에 대한 signal도 두 개가 관찰될 때

#### IV. 정자에서 FISH를 이용한 염색체 검사시 장점과 한계점

FISH 기법은 세포분열 간기 (interphase) 단계에서도 염색체의 분석이 가능하므로 세포분열 중기 표본을 얻기 위한 복잡한 과정이 필요 없으며, 비교적 단시간 내에 다량의 정자를 검사할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 정자수 자체가 매우 적은 중증의 희소정자증 (oligospermia)에서는 검사에 한계가 있다. FISH 방법은 hybridization failure가 일어날 수 있고 이것은 nullisomy와 감별이 안된다는 단점이 있다. 보통 hybridization efficiency는 100%가 안되므로 nullisomy의 빈도에는 약간의 hybridization failure의 경우가 포함되어 있다고 보아야 한다. 보통 nullisomy의 빈도는 disomy보다 높게 나오는데 원래 이론적으로 이 둘의 빈도는 같아야 한다. 따라서 전체 이수배수체의 빈도를 nullisomy + disomy로 하지 않고 disomy의 두 배로 계산하는 사람도 있다 (conservative estimate). FISH 방법의 최대 단점은 염색체의 구조적 이상에 대한 정보는 주지 못한다는 것과 사용한 DNA probe에 따른 특정 염색체의 정보만을 준다는 것이다.

#### V. 신뢰도 높은 검사를 위한 필수 사항

##### 1. 정자핵의 탈응축

정자의 두부 (head)에 있는 염색체는 매우 고밀도로 응축되어 있다. 따라서 DNA probe가 염색체에 접근하기 위해서는 탈응축 (decondensation)의 과정을 거쳐야 한다. 보통 dithiothreitol (DTT)를 탈응축 제재로 많이 사용하는데 이 처리 과정이 너무 짧거나 길면 DNA probe가 DNA에 접근하지 못하여 잘못된 결과를 얻을 수 있다.

##### 2. Sample size

관찰하는 정자수가 많아지면 그만큼 결과에 대한 신뢰도가 올라간다고 할 수 있다. 특히 매우 낮은 빈도의 이수배수체가 관찰될 때는 sample size를 그만큼 늘려야 할 것이다. 보통 관찰하는 정자수는 환자 당  $1 \times 10^4$  개 정도이다.

##### 3. Internal control의 이용

Internal control이란 disomy와 diploidy를 구분하기 위하여 추가로 사용하는 probe를 말한다. 성염색체의 이수배수성을 진단하기 위해서는 적어도 두 개의 probe가 필요하며 (한 개의 특정 probe + 한 개의 control probe), 성염색체의 이수배수성을 진단하기 위해서는 적어도 세 개의 probe가 필요하다 (X probe + Y probe + 한 개의 control probe).

##### 4. scoring의 기준

이수배수체의 진단은 기본적으로 정자 두부에서 관찰되는 형광 signal의 수를 counting하여 이루어지는데 주관적인 요인을 배제하기 위하여 signal의 판정은 매우 엄격히 할 필요가 있다. 즉,

**Table 1.** Available recent literatures regarding FISH studies in sperms of infertile males with normal constitutional karyotype

Authors (year)	DNA probe	Study Group	Aneuploidy (Disomy)	Diploidy
Guttenbach et al. (1997)	X/Y, 1, 7, 10, 17	Infertile male (n=45)	mean rates; 0.10% ~ 0.14% (ns)	0.10% (ns)
McInnes et al. (1998)	13, 21	Infertile male (n=9) control (n=18)	13; 0.28% vs. 0.13% (sig) 21; 0.48% vs. 0.37% (sig)	0.85% vs. 0.66% (sig)
Rives et al. (1999)	X/Y, 1, 13, 14, 18, 21, 22	Infertile male (n=50) control (n=10)	XY; 0.54% YY; 0.24%	
Pang et al. (1999)	X/Y, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21	OAT (n=9) control (n=4)	0~5.4% vs. 0.05~0.2%	0.4~9.6% vs. 0.04%
Damri et al. (2000)	X/Y, 18	ICSI candidates (n=12) control (n=3)	sex; 0.28 vs. 0.18% (ns) 18; 0.11 vs. 0.06% (ns)	0.11% vs. 0.05% (ns)
Gazvani et al. (2000)	X/Y, 21	Oligozoospermia (n=10) control (n=10)	sex; 1.16% vs. 0.15% (sig) 21; 0.26% vs. 0.05% (sig)	
Nishikawa et al. (2000)	X/Y, 18	OAT (n=10) control (n=5)	XY; 0.36% vs. 0.14% (sig) XX; 0.10% vs. 0.15% (ns) YY; 0.13% vs. 0.14% (ns) 18; 0.15% vs. 0.14% (ns)	0.14% vs. 0.10% (ns)
Schultz et al. (2000)	X/Y, 13, 18, 21	Infertile male (n=5) control (n=7)	sex; 0.44 vs. 0.43% (ns)	0.22% vs. 0.20% (ns)
Ushijima et al. (2000)	X/Y, 13, 18, 21	OAT (n=8) control (n=10)	13; 0.13% vs. 0.09% (sig) 18; 0.12% vs. 0.13% (ns) 21; 0.24% vs. 0.19% (sig) X/Y; 0.59% vs. 0.38% (sig)	0.29% vs. 0.16% (sig)

ns; not significantly different when compared with fertile control  
 sig; significantly different when compared with fertile control  
 OAT; oligoasthenotetozoospermia

정자 두부가 겹쳐 있을 때는 counting 하지 않아야 하며, 정자 두부내에 같은 형광 signal이 동일한 강도와 동일한 크기로 두 개 이상 보일 때 disomy로 진단한다. 이때 두 개의 같은 형광 signal은 각기 선명해야 하며 적어도 한 signal의 크기만큼 서로 떨어져 있어야 한다.

### 5. DNA probe

대상 염색체에 특이적이면서 선명한 signal을 보이는 probe가 이상적이라고 할 수 있다.

### VI. 불임 남성에서 정자의 FISH 결과

정액검사상 이상 소견을 보이는 불임 남성을 대상으로 시행한 연구들에서는 정자의 염색체 이상이 가임대조군에 비하여 높은 빈도로 나타난다는 보고가 많다 (Table 1). 이러한 FISH study 결과로 알 수 있는 것은 불임 남성에서 정액검사상의 이상, 즉, 희소정자증, 무력정자증, 기형정자증 등의 원인은 최소한 고환내에서 감수분열 도중 염색체 비분리의 빈도가 매우 높기 때문인 것

으로 추정할 수 있다. 특히 성염색체 중 XY disomy의 빈도가 높은 것은 감수분열 도중 X-Y 염색체간에 pairing이 잘못 일어날 가능성이 많기 때문으로 생각된다. 또한 이들 불임 남성에서는 체질적으로 mitotic instability의 소인이 있는 것으로 추정되며 이에 대한 증거로 불임 남성에서는 혈액의 임파구에서도 염색체 이상의 빈도가 높게 나타난다고 한다 (Gazvani et al., 2000).

한편 체세포 핵형은 정상이면서 고환 부전 (testicular failure)으로 인한 무정자증 환자의 경우가 최근 소개되었는데 13, 21, XY에 대한 disomy 및 diploidy의 빈도는 다행히도 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다 (Martin et al., 2000).

일부에서는 정상 핵형을 가지는 정자를 고르는 방법에 대한 연구가 진행중인데 아직까지 결과는 회의적이다. Swim-up 처리 전후로 염색체 이상의 빈도는 diploidy를 제외하고는 별반 변화가 없는 것으로 보고되었다 (Pfeffer et al., 1999). hemi-zona assay를 이용한 실험에서는 투명대에 결합하는 정자는 swim-up 과정을 거친 정자에 비해 이수배수체의 빈도가 현저히 낮다는 보고 (Van Dyk Q et al., 2000)는 투명대가 어느 정도 이수배수체의 정자의 결합을 막는 작용이 있음을 시사한다고 하겠다.

## VII. 체세포 염색체 이상 환자에서 정자의 FISH 결과

전통적으로 47,XXY 남성에서는 정원세포 (spermatogonia)가 핵형 이상으로 말미암아 감수분열의 능력이 없다고 믿었다. 따라서 이때 간혹 발견되는 정자는 1개의 X 염색체가 불활성화 (inactivation) 되는 기전으로 우연히 정상 핵형을 가지는 정원세포로부터 유래한다고 믿었다. 그러나 최근에는 47,XXY 생식세포도 감수분열의 능력이 있다고 생각하고 있다. 이와 같은 믿음은 47,XXY 환자에서 FISH를 이용하여 정자를 직접 분석함으로써 이루어졌다.

Guttenbach 등 (1997)은 Klinefelter의 핵형을 가지는 남성에서 three-colour FISH를 이용하여 성염색체의 수적 이상을 조사하였다. 모두 2,206개의 정자가 분석되었는데 정상 정자, 즉 23,X와 23,Y는 각각 43.4%, 48.8%였으며, 성염색체의 disomy 빈도는 2.68%로서 XX가 1.22%, XY가 1.36%, YY가 0.10%였고, diploidy의 빈도는 0.23%였다. 이를 정상가임군과 비교하였을 때 YY는 비슷한 빈도였지만 XX, XY 및 diploidy의 빈도는 유의하게 높았다.

한편, 47,XXY/46,XY mosaic Klinefelter 환자의 정자에서는 three-color FISH를 적용한 결과 24,XY의 빈도가 유의하게 증가한다고 보고되었으며 (Cozzi et al., 1994; Chevret et al., 1996), XXY/XXX/XY mosaic Klinefelter 환자의 정자에서는 24,XY 5.0%, 24,XX 2.0%, 25,XXY 0.5%에서 발견되어 전체적으로 hyperhaploidy의 빈도는 7.5%로 보고되었다 (Roland et al., 1998).

최근 보고로는 47,XXY 환자에서 성염색체의 disomy 및 diploidy의 빈도가 모두 증가하며, 47,XXY/46,XY 환자에서는 YY만을 제외한 성염색체의 disomy 및 diploidy의 빈도가 모두 증가한다고 하였다 (Rives et al., 2000).

47,XYY 환자에서는 diploidy의 빈도가 현저히 높은 것으로 보고 (Han et al., 1994) 되었으나 최근 보고에서는 diploidy는 차이가 없고 XX를 제외한 성염색체 및 13번, 18번 염색체의 disomy가 증가한다고 하였다 (Shi and Martin, 2000). 최근 47,XYY/46,XY mosaic 핵형을 가지는 두 case가 보고되었는데 한 환자에서는 XY disomy의 빈도만 대조군에 비하여 높았던 반면, 다른 환자에서는 XY, YY, 18번 disomy 및 diploidy의 빈도가 모두 높게 나타났다 (Lim et al., 1999).

Oligoastheneratozoospermia를 보이는 45,X/46,XY mosaicism 환자에서는 성염색체 및 18번 염색체에 대한 disomy가 현저히 증가된 것으로 보고되었다 (Newberg et al., 1998).

## VIII. 결 론

FISH 기법은 정자의 염색체 분석에 있어 매우 간편하고 효율적인 방법으로 자리잡았으며 임상적으로는 불임 남성에서 정자의 염색체 이상과의 연관성을 확립하는데 기여하였고 이에 힘입어 정자형성 과정에 있어서의 유전적 이상 및 고환내 감수분열의 기전 등을 연구하는데 필수적인 도구로 이용되고 있다. 향후 염색체 이상을 가진 정자를 sorting할 수 있는 방법의 개발이 더욱 진행되리라고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, et al. Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46,XY/47,XXY male. *Hum Genet* 1996; 97: 171.
- Cozzi J, Chevret E, Rousseaux S, Pelletier R, Benitz V, Jalbert H, Sele B. Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum Genet* 1994; 93: 32-4.
- Damri LE, Vutyavanich T, Fishel S. Comparison of sex chromosome aneuploidy in spermatozoa of fertile men and those requiring ICSI treatment detected by fluorescence in situ hybridization. *J Obstet Gynaecol Res* 2000; 26: 181-8.
- Gazvani MR, Wilson ED, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. Role of mitotic control in spermatogenesis. *Fertil Steril* 2000; 74: 251-6.
- Guttenbach M, Michelmann HW, Hinney B, et al. Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis. *Hum Genet* 1997; 99: 474.
- Guttenbach M, Martinez-Exposito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12: 468-73.
- Han TL, Ford JH, Flaherty SP, et al. A fluorescent in situ hybridization analysis of the chromosome constitution of ejaculated sperm in a 47,XYY male. *Clin Genet* 1994; 45: 67.
- Lim AS, Fong Y, Yu SL. Analysis of the sex chromosome constitution of sperm in men with a 47,XYY mosaic karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1999; 72: 121-3.
- McInnes B, Rademaker A, Greene CA, Ko E, Barclay L, Martin RH. Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 2787-90.
- Martin RH, Greene C, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Chernos J. Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 1121-4.
- Newberg MT, Francisco RG, Pang MG, et al. Cytogenetics of somatic cells and sperm from a 46,XY/45,X mosaic male with moderate oligoastheneratozoospermia (OAT). *Fertil Steril* 1998; 69: 146-51.
- Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K. Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile

- men using fluorescence in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 97-102.
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 1266-73.
- Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S, Kearns WG. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72: 472-8.
- Rives N, Joly G, Machy A, Simeon N, Leclerc P, Mace B. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 107-12.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, Mace B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999; 105: 266-72.
- Schultz H, Mennicke K, Schlieker H, Al-Hasani S, Bals-Pratsch M, Diedrich K, Schwinger E. Comparative study of disomy and diploidy rates in spermatozoa of fertile and infertile men: a donor-adapted protocol for multi-colour fluorescence in situ hybridization. *Int J Androl* 2000; 23: 300-8.
- Shi Q, Martin RH. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47,XXY male and a review of the literature. *Am J Med Genet* 2000; 93: 40-6.
- Van Dyk Q, Lanzendorf S, Kolm P, Hodgen GD, Mahony MC. Incidence of aneuploid spermatozoa from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound. *Hum Reprod* 2000; 15: 1529-36.
- Ushijima I, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2000; 15: 1107-11.
-