

항체 검사에 의한 Fragile X 증후군의 진단

김강영 · 윤인숙** · 김종봉* · 진동규***

*대구효성가톨릭대학교 생물학과

**대구과학대학교 임상병리학과

***삼성의료원 소아과

Diagnosis of Fragile X Syndrome by Antibody Test

Kim Kang Young, Yoon In Sook**, Kim Jong Bong* and Jin Dong Kyu***

**Department of Biology, Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu, Korea*

***Department of Medical Technology, Taegu Science College, Taegu, Korea*

****Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Seoul, Korea*

Abstract

This research was carried out for evaluating diagnostic value of antibody test in Fragile X syndrome. In antibody test of control individuals and carriers with a premutation, FMRP were detected in the lymphocytes, whereas the lymphocytes of male Fragile X syndrome patients were devoid of FMRP. Five Fragile X syndrome male patient, two Fragile X syndrome female patients, three carriers were diagnosed by southern blot. Five boys who were diagnosed as the patients by antibody test were turned out full mutation and having multiple smear beside normal single band. However, fragile site of X chromosome was not expressed in Fragile X syndrome patients by chromosome analysis. These results showed that antibody test was a fast and simple method, but the diagnostic power was "perfect" for males, whereas the results were less specific for females.

Key words – Fragile X syndrome, Mental Retardation, Southern blot, Antibody test

서 론

Fragile X 증후군은 유전적 정신지체의 가장 흔한 형태로, 남자는 1500명당 1명, 여자는 2000명당 1명의 비율로 발생하며, X 염색체의 장완 말단 부위인 Xq 27.3 부위에 절단, 응축이 나타나는 것으로 알려져 있다[6,17,18].

임상적인 특징은 정신지체와 과민한 행동, 주의력 부족, 상동증을 수반하는데, 이러한 특징은 Fragile X 증후군 환

자의 일부에서만 특징적으로 나타난다[2,11]. 심대와 성인에 이르면서 임상적 특징은 더 명확히 수반되는데 길고 호인형의 얼굴, 길고 돌출된 턱과 귀, 거대 고환, 행동과 언어 장애가 두드러지게 되며, 연령과 성별에 따라 다양하다 [10,15].

Fragile X 증후군은 X 염색체 말단 Xq 27.3 부위가 염산이 결핍된 조건에서 응축, 절단 등이 관찰되는 특징이 있어 염색체 분석을 통하여 진단하여 왔다[12]. 그러나 Fragile X

*Corresponding author

syndrome 남자의 세포에서는 4~60%의 절단 부위가 관찰되고, 여성 보인자의 대부분에서는 절단 부위가 관찰되지 않아 세포유전학적인 검사 방법만으로는 진단의 정확도를 기대할 수 없다[10].

또 다른 Fragile X 증후군의 진단은 FMR-1 gene의 분석에 의한 것이다[16]. Fragile X syndrome을 일으키는 FMR-1 gene에 존재하는 CGG 반복부위의 변이가 Fragile X 증후군의 발현과 관계가 있음이 밝혀졌다[16]. 정상인에서 CGG 염기의 반복 횟수는 평균 30회(6~55회)이나, NTM (normal transmitting male)이나 여성 보인자에서는 반복 횟수가 56~230 회로 증가하고(pre-mutation), 이환된 환자(full mutation)의 경우 수백에서 수천 회로 증가된다고 밝혀져 있다[1,3,5]. 230회 이상 반복으로 Fragile X 증후군인 환자에서 FMR-1 gene은 메틸화되어 불활성 된다[9,14].

이러한 반복 횟수와 메틸화 상태는 PCR(polymerase chain reaction)과 southern blot analysis로 확인할 수 있으며, 이러한 DNA를 이용한 분자 유전학적 방법의 이용으로 세포 유전학적 검사에 의해 불완전하게 이루어져 왔던 Fragile X syndrome의 진단율을 99% 이상으로 높일 수 있게 되었다[8,13]. 그러나 DNA분석의 경우 PCR과 southern blot을 둘다 실시 해야 하는 어려움이 있다. Methylation은 FMR-1 gene의 silencing과 연관이 있어 단백질의 생성을 억제하며, FMRP(Fragile X Mental Retardation Production) protein의 결여는 Fragile X syndrome 환자의 임상적 특징 중 하나인 정신지체를 유발한다[7,9,14].

Willemsen은 Fragile X syndrome 환자의 증폭된 반복 배열 수가 FMR-1 gene에서 발생하는 promoter region의 methylation을 통해 전사를 억제시키므로 FMR-1 gene의 산물인 FMRP protein이 결여되며, FMRP protein의 발현유무로 Fragile X syndrome 환자를 검색하는 면역 세포 화학 진단법(antibody test)을 개발하였다[4,19].

면역 세포 화학 진단법(antibody test)은 3단계 면역 배양 과정을 통해 FMRP protein 발현을 확인할 수 있고, 단 한 방울의 혈액으로 시행되며, 검사당일에 결과를 알 수 있는 장점이 있어 PCR이나 southern blot analysis에 비해 빠르고 간편하게 환자 검색에 이용될 수 있다. 태아기의 진단은 장막 돌기나 양막의 분비세포에서 FMRP protein의 발현을 검사할 수 있어 산전 진단에도 이용 가능하다[24].

그러나 Fragile X syndrome 환자중 이환된 남자의 림프

구에서만 FMRP protein이 발현되지 않으며, 정상인, 보인자와 여자환자의 림프구에는 FMRP protein이 발현되므로 antibody test는 여자환자, 보인자의 경우 정확한 진단을 내릴 수 없다. 그러나 병명이 밝혀지지 않은 많은 정신박약자들을 대상으로 할 때 간편하고 빠른 antibody test로 Fragile X syndrome 환자들을 검색하고, 그 가계를 대상으로 southern blot analysis와 PCR을 이용하여 진단함이 유용하리라 보며, 현재 우리나라에서는 그 진단적 가치는 평가된 바 없다.

이에 본 연구에서는 세포 유전학적인 진단 방법인 염색체 분석과 분자 유전학적인 진단 방법인 DNA 분석, 면역 세포 화학적인 진단 방법인 antibody test를 병행 실시하여 antibody test의 진단적 가치를 평가해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험 대상

Fragile X syndrome 환자를 진단하기 위하여 특수학교, 치료원 등에 수확하고 있는 정신박약자 195명과 Fragile X syndrome 환자로 진단된 환자의 모친 3명을 대상으로 본 연구를 수행하였다. 이들은 모두 선천성 정신박약자로서 Fragile X syndrome의 임상적 특징인 얼굴이 길고, 돌출된 귀를 가진 사람을 1차 대상으로 하였고, 이들의 연령은 7~15세(모친 30~40세)이고, 이중 남자가 174명, 여자가 24명이었다.

실험 방법

Antibody test

혈액 1방울을 slide위에 도말 하고 공기 건조시킨 후 0.1 M phosphate buffer에 10분간 담그고 고정시키고 20분간 methanol 을 처리하였다. 그 후 0.1M PBS 처리 후 0.1 M PBS+ 로 wash 하고 3단계 면역 배양 과정을 실시하였다. 이 때 내인성 alkaline phosphatase 활성을 막기 위해 substrate solution 에 levamisole을 처리하였다. 3단계 면역 배양 실시후 0.1M tris로 2회 처리하고 haematoxylin으로 2초간 염색하여 FMRP protein의 발현을 관찰하였다.

염색체 분석

말초 혈액의 buffy coat 0.5 ml를 저염산 농도의 medium TC 199(HEPES buffered)을 사용한 배지에서 37°C, 72시간

배양하였다. Harvest 1시간 전 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 colcemid 용액 0.2 ml로 처리하여 유사분열 세포 증기 상을 유도한 후 5 ml의 저장성 용액(0.075 M KCl)으로 처리하고 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액으로 고정하였다. 슬라이드에 점적 후 0.025% trypsin 용액에서 슬라이드를 25초간 처리한 후 0.85% NaCl로 세척하고 4분간 giemsa 용액으로 염색하여 fragile X site를 관찰하였다.

Genomic DNA 분리

Genomic DNA를 추출하기 위하여 EDTA가 담긴 튜브에 말초 혈액 10 ml를 채혈한 후 2000rpm으로 10분간 원심 분리하여 buffy coat만 취하여 PBS로 세정하였다. 증류수를 가해 잘 섞고 5 ml의 1.8% NaCl 용액과 혼합한 후, 2000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 얻어진 환약에 2.5 ml의 완충액(10 mM tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl), 10% SDS, proteinase K를 가하여 56°C에서 3시간 반응시켰다. Phenol 추출 후 ethanol로 침전시키고 TE 완충액에 용해시켜 genomic DNA를 추출하였다.

Southern blot analysis

혈액에서 추출된 8 μg 의 DNA를 Southern(1975)의 방법에 따라 EcoR I으로 처리하고, 0.7% agarose gel에 loading 하여 전기 영동 하였다. 전기 영동에 의하여 분리된 DNA를 Hybond H⁺ membrane에 southern transfer하였다.

정제된 Oxford 1.9 probe를 random primed DNA labelling kit를 사용하여 표지 하였다. Membrane을 진공건조기에서 건조시킨 후 50% formamide, 6X SSC, dextran sulfate, 1% SDS용액에서 prehybridization 시키고, 65°C에서 12시간 hybridization을 실시한 후 0.3X SSC, 0.1% SDS, 65°C에서 세척 후 X-ray film에 감광시켰다.

결 과

Antibody test

198명의 림프구를 관찰한 결과 정상인과 일반정박자의 림프구는 붉게 염색된 FMRP protein의 발현을 관찰할 수 있었으나, Fragile X syndrome 환자의 경우 FMRP protein의 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 1).

DNA analysis

DNA 분석에서 Fragile X syndrome 남자 환자 5명, 여

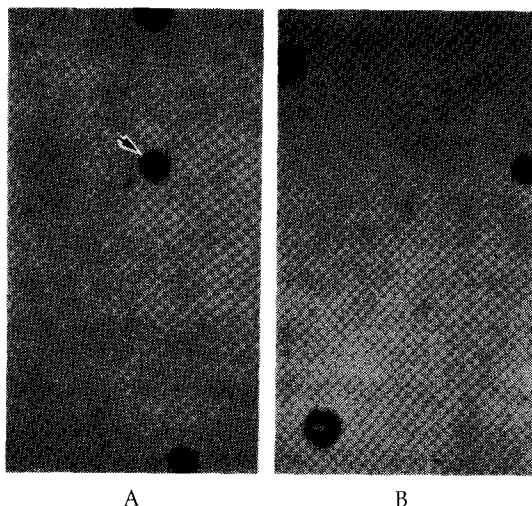


Fig. 1. FMRP expression in lymphocytes.

Expression of FMRP was shown in normal(A) while FMRP was absent in the Fragile X syndrome patients(B).

자 환자 2명, 보인자 여자 3명을 진단하였다. 분자 유전학적 검사상 완전 돌연변이 상태인 이환된 남자는 FMR-1 gene이 아주 불완전해서 정상 단일 band의에도 복잡한 smear양상을 보였다(Fig. 2).

염색체 분석

Antibody test, DNA analysis(southern blot)의 결과 Fragile X syndrome으로 진단된 환자와 보인자를 대상으로 세포 유전학적 방법인 folate 결핍 배지에 증기 염색체를 배양하여 Xq27.3 좌위의 절단 점을 찾는 염색체 분석을 시행하였다. 본 실험에서 X 염색체 상의 fragile site는 발현되지 않았다.

고 찰

Fragile X syndrome은 X 염색체 장완 말단 부위인 Xq 27.3 부위에 위치한 유전자가 돌연변이하여 쉽게 갈라지거나 손상을 입게되어 X 염색체상에 절단, 응축, 간극이 관찰되는 유전질환으로 정신지체, 학습장애, 자폐성향과 함께 얼굴이 길고, 귀와 고환이 매우 큰 특징을 지닌다[4,5, 6,11].

Fragile X syndrome의 진단은 세포 유전학적인 방법인

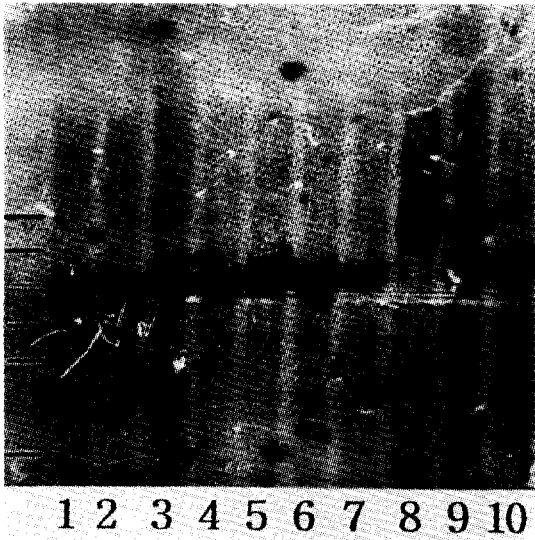


Fig. 2. Detection of Fragile X mutations of DNA by southern blot analysis using Oxford 1.9 probe. Normal control lanes; 1-4, 6, 7, 10. Carrier female lanes; 5. Lanes 8, 9 for affected individuals show fragments of higher than normal molecular weight because of amplification.

엽산 결핍 배지에 염색체를 배양하여 Xq 27.3 좌위의 fragile X site를 찾는 방법을 시행하여 왔다. 또한 Fragile X syndrome의 진단에 사용되고 있는 분자유전학적인 방법인 southern blot analysis의 경우에는 CGG 반복 부위의 길이를 분석하여 환자 및 보인자 여부를 판정한다.

본 연구에서 antibody test와 DNA 분석을 통해 Fragile X syndrome 환자로 진단된 환자를 대상으로 염색체 분석을 실시하였으나 fragile X site가 발현되지 않았다. Fragile X syndrome 환자라 할지라도 fragile X site 발현은 일정치 않음을 확인할 수 있었다.

그리고 Ox. 1.9 probe를 이용하여 DNA analysis를 수행한 결과 antibody test에서 FMRP protein의 발현이 결여된 남자 환자 5명에서 정상 단일 band 이외의 복잡한 smear 양상을 확인할 수 있었으며, 이환된 남자의 가계를 분석한 결과 보인자로 추정되는 환자의 모친들에서 premutation 소견을 보여 보인자임을 확인할 수 있었다. 따라서 염색체 검사에 의한 진단 법은 fragile site의 발현율이

낮아 염색체 검사만으로는 진단의 어려움이 있고, 분자유전학적 방법인 DNA 분석은 진단율이 99%이상으로 정확성은 증가하였으나 많은 수의 정박자를 대상으로 할 때 시간과 비용이 많이 드는 문제점이 뒤따른다.

한편 림프구의 FMRP protein의 발현 유무를 검색하여 Fragile X syndrome 환자를 진단하는 항체 실험은 많은 수의 환자를 대상으로 그 결과를 하루 안에 확인할 수 있는 신속하고 간편한 진단 방법이다. 본 실험에서 198명을 대상으로 blood smear를 실시하여 검색한 결과 남자 환자 5명의 림프구에서 FMRP protein의 발현이 결여되었다. 이들의 DNA 분석 결과 모두 완전 돌연변이를 한 Fragile X syndrome 환자임이 판명되었다. 그러나 여자 환자와 보인자의 경우 FMRP protein이 발현되었는데 이는 FMR-1 gene에서의 전사가 이루어져 FMRP protein을 생성하기 때문이다. 그러므로 antibody test는 여자와 보인자에 대해서는 특이성이 낮다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 Fragile X syndrome의 진단에 있어 염색체 검사로는 Fragile X syndrome 환자들의 fragile X site의 발현 빈도가 낮아 진단에 어려움이 있고, antibody test는 신속하고 간편한 진단 방법이나 보인자, 여자 환자의 진단에는 주의를 요하고 반드시 southern blot analysis로 확인 할 필요가 있다. 그러나 병명이 밝혀지지 않은 많은 수의 정박자를 대상으로 할 때 먼저 antibody test를 실시하여 남자 환자를 진단한 후 그 가계를 대상으로 DNA 분석을 실시한다면 누락되어 있는 많은 Fragile X syndrome 환자를 진단해 내는데 크게 도움이 되리라 본다.

참고 문헌

1. Fu, Y. H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S. and Verkerk, A. J. M. H. 1983. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**, 1-20.
2. Hagerman, R. J., Amiri, K. and Cronister, A. 1991. The Fragile X checklist. *Am J Med Genet.* **38**, 283.
3. Heitz, D., Rousseau, F., Devys, D., Saccone, S., Abderrahim, H. and Le Paslier, D. 1991. Isolation of sequences that span the Fragile X - related CpG island. *Science*.

4. Khandjian, E., Corbin, F., Woerly, S. and Rousseau, F. 1993. The Fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nature Genet.* **12**, 91-93.
5. Kremer, E. J., Pritchard, M. and Lynch, M. 1991. Mapping of DNA instability at the Fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)n. *Science* **252**, 171.
6. Nussbaum, R. L. and Ledbetter, D. H. 1986. Fragile X syndrome : a unique mutation in Man. *Ann. Rev. Genet.* **20**, 109-45.
7. Pieretti, M., Zhang, F. and Fu, Y. H. 1989. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* **66**, 817-820.
8. Rousseau, F., Heitz, D. and Biancalana, V. 1991. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Engl. J. Med.* 1674-1681.
9. Snow, K., Doud, L. K., Hangerman, R., Pergolizzi, R. G., Erster, S. H. and Thibodeau, S. N. 1993. Analysis of a CGG Sequence at FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* **53**, 1217-1228.
10. Sutherland, G. R. and Baker, E. 1990. The common fragile site in band q27 of the human X chromosome is not coincident with the fragile X. *Clin. Genet.* **37**, 167-169.
11. Sutherland, G. R. and Baker, E. 1992. Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 111-114.
12. Sutherland, G. R., Baker, E. and Fratini, A. 1985. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet.* **22**, 433-436.
13. Sutherland, G. R., E. A. Haan, E. Kremer, M. Lynch, M. Pritchard, S. Yu and R. Richards. 1991. Hereditary unstable DNA : a new explanation for some old genetic question ? *Lancet* **338**, 289-292.
14. Tarlton, J. C. and Sanl, R. A. 1993. Molecular genetic advances in Fragile X syndrome. *J. Pediatr.* **122**, 169-172.
15. Turner, G. A. and Frost, D. M. 1980. X-linked mental retardation, macroorchidism, and the Xq27 fragile site. *J. Pediatr.* **96**, 837-840.
16. Verkek, A. J. M. H., Pieretti, M. and Sutcliffe, J. S. 1991. Identification of a gene(FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905-907
17. Warren, S. T. and Nelson, D. L. 1994. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *Jama* **271**, 536-540.
18. Webb, T. 1989. The epidermology of fragile X syndrome, pp. 40-55, In : Davies K. E.(ed). The fragile X syndrome. Oxford University Press.
19. Willemsen, R. S., Mohkamsing, B., DeVries, D., Deveys A. and J. L Mendel. 1995. Rapid antibody test for Fragile X syndrome. *The Lancet* **345**, 1147-1148.