

## 여아 환자에서의 취약 X 증후군의 분자유전학적 진단

아주대학교 의과대학 의학유전학과

정선용 · 양정아 · 김현주

### Molecular diagnosis of fragile X syndrome in a female child

Seon-Yong Jeong, Jeong-A Yang and Hyon J. Kim

Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea

**Purpose :** Fragile X syndrome (FXS) is the most common heritable cause of cognitive impairment. FXS is caused by hyperexpansion and hypermethylation of a polymorphic CGG trinucleotide repeat in the 5' untranslated region of the fragile X mental retardation-1(FMR1) gene. Combination of Southern blotting and simple polymerase chain reaction(PCR) amplification of the FMR1 repeat region is commonly used for diagnosis in females. To give a definite diagnosis in a female child suspected of having FXS, we carried out the molecular diagnostic test for FXS using the recently developed Abbott Molecular Fragile X PCR Kit.

**Methods :** The PCR amplification of the FMR1 repeat region was performed using the Abbott Molecular Fragile X PCR Kit. The amplified products were analyzed by size-separate analysis on 1.5% agarose gels and by DNA fragment analysis using Gene scan.

**Results :** Agarose gel and Gene scan analyses of PCR products of the FMR1 repeat region showed that the patient had two heterozygous alleles with a normal 30 repeats and full mutation of >200 repeats whereas her mother had two heterozygous alleles with the normal 30 repeats and premutation of 108 repeats, suggesting that the premutation of 108 repeats in her mother may have led to the full mutation of >200 repeats in the patient.

**Conclusion :** We diagnosed FXS in a female patient using a simplified molecular diagnostic test. This commercially available diagnostic test for FXS, based on PCR, may be a suitable alternative or complement method to Southern blot analysis and PCR analysis and/or methylation specific(MS)-PCR analysis for the molecular diagnosis of FXS in both males and females.

**Key Words :** Fragile X syndrome, Molecular diagnosis, Fragile X mental retardation-1(FMR1), CGG repeats

## 서 론

취약 X 증후군(fragile X syndrome, FXS)은 가장 흔한 유전성 정신지체(mental retardation) 질환으로, 남자는 약

1,500-4,000명당 1명, 여자는 약 2,500-8,000명당 1명의 유병률을 나타낸다<sup>1,2)</sup>. 취약 X 증후군 환자의 95% 이상에서 fragile X mental retardation-1(FMR1) 유전자의 5' 비해독부위(untranslated region)에 있는 CGG 3염기 반복의 확장(expansion)이 발병 원인으로 밝혀졌다<sup>3-5)</sup>. CGG 3염기 반복수는 정상인에서는 6-54회이고, 보인자는 55-200회(premutation allele), 환자의 경우 200회 이상(full mutation

책임저자: 김현주, 경기도 수원시 영통구 원천동 산5  
아주대학교병원 유전질환전문센터  
Tel : 031)219-4522, Fax : 031)219-4521  
E-mail : genetics@kornet.net

allele)이며<sup>1,3)</sup>, premutation allele이 다음세대에 전해지게 되면 full mutation allele으로 CGG 반복수가 더 증폭된다는 사실이 밝혀졌다<sup>6,7)</sup>. 여자와 남자에서의 premutation의 유병률은 260-500명당 1명과 800명당 1명으로 비교적 높게 추정되고 있다<sup>8,9)</sup>. FMR1 유전자의 CGG 반복수가 200회 이상으로 과잉 증폭이 일어나면 5' 비해독부위에 있는 CpG island에서 메틸화(methylation)가 발생하여 FMR1 유전자의 전사가 저해되어 발병한다는 분자 기전이 밝혀졌다<sup>10)</sup>.

취약 X 증후군을 유전학적으로 진단하기 위해 세포유전학적인 분석, polymerase chain reaction(PCR), methylation specific PCR(MS-PCR), Southern blotting, Gene scan 등의 다양한 방법들이 이용되고 있다<sup>11-16)</sup>. 현재 가장 일반적으로 사용되고 있는 분자유전학적 진단방법은 PCR, MS-PCR, Southern blotting 방법이다. 즉, 남자의 경우는 MS-PCR과 Southern blot 분석을 병용하는 방법이 주로 사용되며, 여자의 경우는 PCR과 Southern blot 분석을 병용하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 하지만, Southern blot 분석법은 검사 과정이 복잡하고, 장시간이 소요되며, 많은 양의 DNA 샘플이 필요하다. 그리고 결과해석이 어렵기 때문에 이를 대체할 새로운 방법의 필요성이 제기되어 왔다<sup>16)</sup>. 또한, 여자의 경우 이러한 방법들을 이용한 취약 X 증후군의 분자유전학적 진단이 남자에 비해 훨씬 어렵기 때문에, 여자에서 premutation allele과 full mutation allele을 효과적으로 진단할 수 있는 방법이 필요하다.

본 연구에서는 기존의 PCR/MS-PCR과 Southern blot 분석에서 얻을 수 있는 정보를 동시에 신속하고 정확하게 알 수 있는 방법으로 최근 개발된 Abbott Molecular Fragile X PCR Kit를 사용하여, 취약 X 증후군이 의심되는 여아 환자에 대해 분자유전학 진단을 수행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

중증 정신지체를 주소로 아주대병원 유전학클리닉에 내원한 6.9세의 여아와 그의 양쪽 부모를 연구 대상으로 하였다. 임상유전학적 진단을 위하여 내원한 여아에 대해 말초혈액을 대상으로 G banding 핵형분석(karyotyping)을 실시한 결과, 조사한 50개 백혈구 세포 중에서 46개는 46,XX의 정상으로 나타났으나(Fig. 1A), 4개의 세포에서 X 염색체 말단의

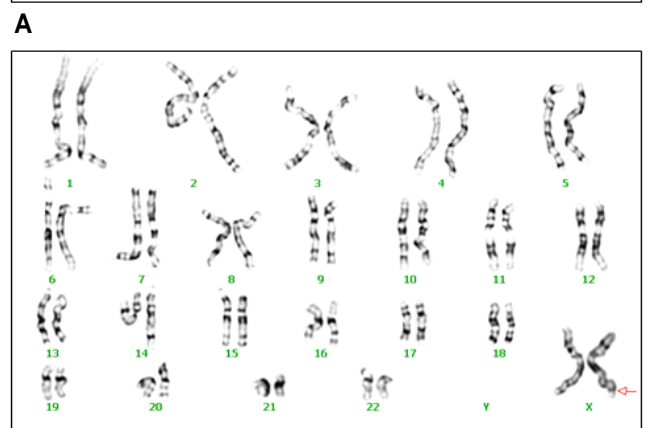
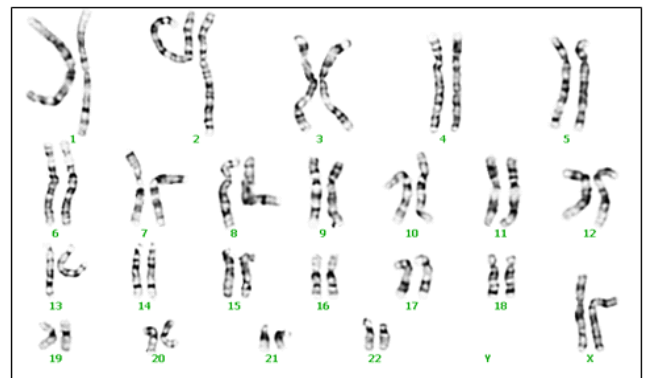
절단이 발견되었다(Fig. 1B). 이 결과로부터 취약 X 증후군이 의심되어 분자유전학적인 진단을 시행하였다. 대조 실험을 하기 위하여 취약 X 증후군 보인자(여자)와 이환자(남자)의 genomic DNA를 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) DNA 분리정제

채혈한 말초혈액 3 mL에서 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, MD, U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 분리 정제한다. 정제한 DNA의 농도와 순도를 측정 후, 50-60 ng의 genomic DNA를 PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

### 2) PCR



**Fig. 1.** Karyotypes of the patient with fragile X syndrome. G-banding result shows the mosaicism of two cell types with normal karyotype (46,XX) (A) and abnormal karyotype, X chromosome breakage (46,XX,q27,3) (B). An arrow indicates the derivative chromosome.

(1) Master mixture solution

Abbott Molecular Fragile X PCR Kit(Abbott, IN, U.S.A.)에 포함되어있는 10× high GC PCR buffer, Fragile X primer set, Gender primer set, TR PCR enzyme mix, DNase free 증류수를 제시한 용량만큼 사용하여 master mixture solution을 만들었다.

(2) PCR 반응 조건

PCR 반응은 2단계로 시행하였다. 우선 98.5°C에서 10초, 58°C 1분, 75°C에서 6분으로 15 회 실시한 후, 98.5°C에서 10 초, 56°C(매 cycle마다 0.1°C 상승) 1분, 75°C에서 6분으로 15 회 touch-up PCR을 실시하였다.

3) Agarose gel 전기영동 분석

PCR 산물 20 μL 중에서 5 μL를 1.5% agarose gel에 loading하여 40분간 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel 을 etidium bromide에 염색하여 band 양상을 분석하였다. Agarose gel에서 640회 이상의 CGG 반복은 검출할 수 없다.

4) Gene scan 분석

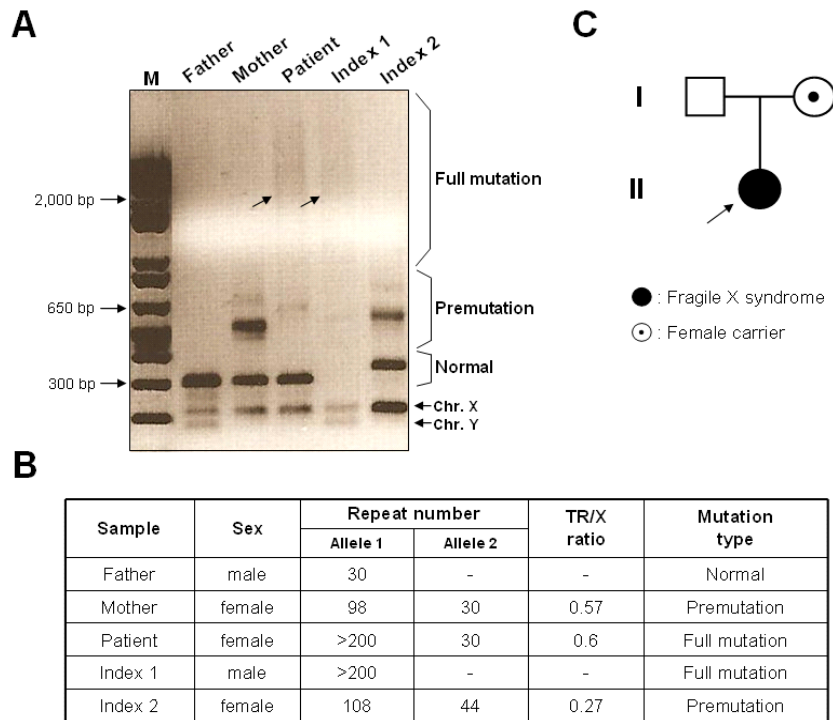
FMR1 유전자의 5' 비해독부위에 존재하는 CGG 3염기 서열의 정확한 반복수를 확인하기 위하여 PCR 산물을 Gene scan으로 분석하였다. PCR 산물 2 μL와 Abbott Molecular Fragile X PCR Kit에 포함되어있는 Cleanup enzyme mix 3 μL를 혼합한 후, 75°C에서 10분간 반응시킨다. 이 반응물을 ABI 3100 genetic analyzer(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)에서 분석한 후, Genemapper(Ver. 4.0) 프로그램을 사용한 PCR 산물의 DNA fragment 크기의 해석을 통하여 FMR1 유전자의 CGG 반복수를 결정한다. 또한, FMR1 유전자의 CGG allele이 heterozygous인지 homozygous인지를 확인하기 위하여 TR/X ratio(triplet repeat/X chromosome ratio)의 값을 구한다. TR/X ratio는 Gene scan에서 분석된 Triplet repeat peak height를 X chromosome peak height로 나눈 값이다. 이 TR/X ratio가 >1.0의 경우는 homozygous, <0.85의 경우는 heterozygous, 0.85-1.0의 경우는 불명확 (grey zone)으로 판정한다.

결 과

염색체 검사에서 X 염색체 말단의 절단이 확인되어 취약 X 증후군이 의심된 정신지체를 가진 6.9세의 여아를 확진하기 위하여 분자유전학적인 진단을 시행하였다. Abbott Molecular Fragile X PCR Kit에 포함되어있는 시약을 사용하여 FMR1 유전자의 5' 비해독부위에 있는 CGG 3염기 반복 영역을 PCR로 증폭하였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 PCR band의 크기를 확인하였다(Fig. 2A). 환자의 경우 normal allele에 해당하는 PCR band와 더불어 200 반복이상의 full mutation일 때 나타나는 2,000 bp 이상 부분에서 smear가 검출되었다. 또한, 대조실험으로 사용한 full mutation을 가진 fragile X 증후군 남자 환자에서도 2,000 bp이상 부분에서 smear를 확인할 수 있었다. 따라서, 환자는 normal FMR1 allele과 full mutation의 FMR1 allele을 가지고 있는 것이 밝혀졌다. 환자의 어머니와 대조실험으로 사용한 premutation을 가진 여자 보인자에서 premutation에 해당하는 PCR band가 검출되었으며, 환자의 아버지에서는 normal allele에 해당하는 한 개의 PCR band만 검출되었다.

정확한 CGG 반복수를 분석하기 위하여, PCR 산물을 Gene scan 방법으로 DNA fragment 분석을 시행하였다(Fig. 2B). 환자의 아버지는 normal allele의 CGG 3염기 반복수가 30이었으며, 어머니는 normal allele은 30이었고 premutation allele은 108이었다. 환자의 경우 agarose gel 상에서 smear로 나타난 full mutation은 정확한 CGG 반복수를 확인할 수 없기 때문에 >200 으로 나타냈으며, normal allele은 CGG 3염기 반복수가 30이었다. 여자의 경우 두 개의 FMR1 allele이 heterozygous인지 homozygous인지를 확인할 수 있는 TR/X ratio를 측정하였다. 환자와 어머니의 TR/X ratio는 각각 0.6과 0.57로 두 명 모두 두개의 FMR1 allele이 heterozygous인 것을 알 수 있었다.

Fig. 2C에 나타낸 환자 가족의 가계도로부터(Fig. 2), 어머니의 108회의 premutation allele이 환자에게 유전되면서 >200회의 full mutation allele로 CGG 반복수가 크게 증폭된 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 FMR1 유전자의 CGG 3염기 반복의 신장(expansion)은 다음 세대에 전달될 때 더 증폭되는 'dynamic mutation'이라는 이전의 보고<sup>6,7,17)</sup>와 일치한다. 상기의 결과를 통하여 중증 정신지체를 가진 6.9세



**Fig. 2.** Detection of the type and number of CGG expansions of the FMR1 alleles in the patient with fragile X syndrome and her parents. A, Agarose gel analysis of the PCR products of the FMR1 repeat region. The size of PCR bands gives information as to the type of CGG expansions, and whether the genotype is normal, permutation, or full mutation. The PCR bands (one or two) at the bottom of the gel indicate the PCR amplification of genes in the X and Y chromosomes with gender primers. Index 1 and Index 2 represent the positive controls of a male patient with a full mutation allele and a female carrier with a premutation allele, respectively. Arrows in the lanes of Patient and Index 1 indicate smeared full mutations. B, Gene scan analysis of the PCR products of the FMR1 repeat region. The repeat number of each allele and RT/X ratios are shown. C, Pedigree of the patient's family. The pedigree shows inheritance of the expanded allele (108 repeats) by the daughter (>200 repeats) from her mother, indicating dynamic transmission of the FMR1 CGG repeat.

의 여아는 취약 X 증후군 환자로 최종적으로 확인되었다.

### 고 찰

취약 X 증후군은 원인유전자가 X 염색체에 존재하기 때문에 남자 환자가 여자 환자에 비해 훨씬 많다. 환자의 약 95% 이상은 FMR1 유전자의 5' 비해독부위에 있는 CGG 3 염기 반복의 확장이 원인으로 보고되고 있으며<sup>3-5)</sup>, 매우 적은 경우에서 FMR1 유전자의 미세 결실(small deletion), FMR1 유전자를 포함하는 큰 결실(large deletion), FMR1 유전자의 mosaic 결실(mosaic deletion), 점돌연변이(point mutation) 등이 발견되었다<sup>18, 19)</sup>.

최근에, FMR1 유전자의 CGG 반복 premutation을 가진

고령의 남자 보인자에서 fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)라 불리는 떨림(tremor), 보행 및 팔다리 조화운동불능(ataxia), 파킨슨증후군 증상을 나타내는 진행성 신경질환에 대해 보고되었다<sup>20, 21)</sup>. 또한, premutation을 가진 고령의 여자 보인자에서도 FXTAS가 보고되는데 여자에서는 남자에 비해 증상이 가볍다<sup>21-23)</sup>. 여자의 경우 두 개의 X 염색체를 가지기 때문에, 한쪽 allele이 premutation 또는 full mutation 일 지라도 다른 쪽의 normal allele에서 정상적인 FMR1 유전자의 발현이 일어나기 때문에 거의 발병하지 않으며, 매우 드물게 skewed X-inactivation에 의해 발병하더라도 증상이 가볍다<sup>23, 24)</sup>. 하지만, 여자의 premutation이 유전되어 full mutation을 초래하기 때문에 여자 보인자에 대한 진단은 매우 중요하다<sup>17)</sup>. 본 연구의 환자는 6.9세

의 어린 나이에서 발병하였고 임상 소견을 종합적으로 고려해본 결과 FXTAS가 아닌 FXS라고 판단된다.

FMR1 유전자의 CGG 3염기 반복의 확장을 진단하기 위해 가장 많이 사용하는 방법 중에서 Southern blot 분석법은 CGG 반복수가 많은 normal allele과 CGG 반복수가 비교적 적은 premutation의 구별이 어렵고, PCR/MS-PCR의 경우는 CGG 반복수가 많은 premutation allele과 full mutation을 검출할 수 있는 특이성이 낮다는 단점이 지적되고 있다<sup>13-16)</sup>. 본 연구에서는 최근 개발된 Abbott Molecular Fragile X PCR Kit의 특이성, 감수성, 정확성 등의 유효성과 편리성, 경제성 등의 유용성을 취약 X 증후군 의심환자의 샘플을 사용하여 확인하였다. 이 kit를 사용하는 방법은 PCR 후의 agarose gel 전기영동과 Gene scan의 간단한 분석을 통하여, CGG 반복 확장에 의한 돌연변이 양상뿐만 아니라 normal 및 premutation의 경우는 정확한 CGG 반복수를 알 수 있기 때문에 매우 유용한 방법이라 생각된다. 또한 Southern blotting, MS-PCR과 같은 어렵고 복잡한 과정을 거치지 않기 때문에 편리성 향상, 시간 단축, 비용절감과 같은 많은 장점이 있다. 특히 Southern blot 분석에 의해서만 확인이 가능했던 full mutation의 대략적인 CGG 반복수의 확인이 가능하며, full mutation과 premutation이 혼합된 mosaicism의 경우도 분석이 가능하다는 큰 장점이 있다. 하지만, 640회 이상의 CGG의 반복수가 매우 많은 full mutation은 검출할 수 없다는 단점도 있다.

결론적으로 Abbott Molecular Fragile X PCR Kit를 사용한 진단방법을 통하여, 거의 보고 되지 않은 full mutation을 가진 여자 취약 X 증후군 환자를 확진할 수 있었다. 본 연구에서 소개한 방법은 진단이 복잡하고 어려운 취약 X 증후군의 분자유전학적인 진단에 매우 유용한 방법이라고 생각된다.

### 한글요약

**목적** : 취약 X 증후군(fragile X syndrome)은 FMR1 유전자의 5' 비해독부위에 있는 CGG 3염기 반복의 확장에 의해 발생하는 유전성 질환이다.

**방법** : 본 연구에서는 임상 소견과 핵형분석에서 취약 X 증후군으로 진단 받은 여아 환자와 그 부모를 대상으로 Abbott Molecular Fragile X PCR Kit를 이용하여 CGG 3염기 영역을 PCR로 증폭하여 normal, premutation, full mu-

tation의 CGG 반복의 유형을 확인하였으며, premutation과 normal allele의 경우에는 정확한 CGG 반복수를 분석하였다.

**결과** : 환자는 30회와 >200회의 CGG 3염기가 반복된 FMR1 대립유전자를 갖고 있는 것으로 확인되어 취약 X 증후군으로 진단되었다. 또한 환자의 어머니에서 30과 98회의 반복 allele을 확인함으로써, 이 환자의 full mutation allele은 모계의 premutation allele로부터 유래한 것임을 알 수 있었다.

**결론** : Abbott Molecular Fragile X PCR Kit를 사용한 진단방법은, 취약 X 증후군환자의 경우에서 통상적으로 시행되고 있는 PCR, MS-PCR, Southern blotting을 병행하는 방법에 비해 신속하고 정확한 분자유전학적 진단이 가능한 유용한 방법이라 생각된다.

### 참고문헌

- 1) Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9:901-8.
- 2) Crawford DC, Acua JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001;3:359-71.
- 3) 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.
- 4) Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, et al. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 1991;252:1711-4.
- 5) Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-14.
- 6) Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet* 1992;29:794-801.
- 7) Turner AM, Robinson H, Wake S, Laing SJ, Leigh D, Turner G. Counselling risk figures for fragile X carrier females of varying band sizes for use in predicting the likelihood of retardation in their offspring. *Am J Med Genet* 1994;51:458-62.
- 8) Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene-and implications for the population

- genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;57:1006-18.
- 9) Dombrowski C, Lvesque S, Morel ML, Rouillard P, Morgan K, Rousseau F. Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet* 2002; 11:371-8.
  - 10) Florencia G, Irene S, Veronica F. Fragile-X mental retardation: molecular diagnosis in Argentine patients. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:766-73.
  - 11) Dewald GW, Buckley DD, Spurbeck JL, Jalal SM. Cytogenetic guidelines for fragile X studies tested in routine practice. *Am J Med Genet* 1992;44:816-21.
  - 12) Oostra BA, Willemsen R. Diagnostic tests for fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:226-32.
  - 13) Khaniani MS, Kalitsis P, Burgess T, Slater HR. An improved Diagnostic PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (FMR1). *Mol Cytogenet* 2008; in press.
  - 14) Nolin SL, Ding XH, Houck GE, Brown WT, Dobkin C. Fragile X full mutation alleles composed of few alleles: implications for CGG repeat expansion. *Am J Med Genet A* 2008;146A:60-5.
  - 15) Zhou Y, Lum JM, Yeo GH, Kiing J, Tay SK, Chong SS. Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. *Clin Chem* 2006;52:1492-500.
  - 16) Zhou Y, Law HY, Boehm CD, Yoon CS, Cutting GR, Ng IS, et al. Robust fragile X (CGG)<sub>n</sub> genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet* 2004;41:e45.
  - 17) Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003;72:454-64.
  - 18) De Boule K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 1993;3:31-5.
  - 19) Coffee B, Ikeda M, Budimirovic DB, Hjelm LN, Kaufmann WE, Warren ST. Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1358-67.
  - 20) Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, Grigsby J, Zhang L, Brunberg JA, et al. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet* 2003;72:869-78.
  - 21) Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, et al. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA* 2004;291:460-9.
  - 22) Zhlke Ch, Budnik A, Gehlken U, Dalski A, Purmann S, Naumann M, et al. FMR1 premutation as a rare cause of late onset ataxia-evidence for FXTAS in female carriers. *J Neurol* 2004;251:1418-9.
  - 23) Berry-Kravis E, Potanos K, Weinberg D, Zhou L, Goetz CG. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation. *Ann Neurol* 2005;57: 144-7.
  - 24) Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet A* 2008; 146A:1009-16.
  - 25) Han XD, Powell BR, Phalin JL, Chehab FF. Mosaicism for a full mutation, premutation, and deletion of the CGG repeats results in 22% FMRP and elevated FMR1 mRNA levels in a high-functioning fragile X male. *Am J Med Genet A* 2006;140:1463-71.