

# Methylation Specific PCR-RFLP 방법을 이용한 Beckwith Wiedemann Syndrome의 진단

<sup>1</sup>울산대학교 의과대학, 서울아산병원 소아청소년병원, 의학유전학클리닉, <sup>2</sup>소아청소년과

김구환<sup>1</sup> · 이진주<sup>1</sup> · 최성훈<sup>1</sup> · 이주연<sup>1</sup> · 이범희<sup>1,2</sup> · 유한욱<sup>1,2</sup>

## Genetic Diagnosis of Beckwith Wiedemann Syndrome using Methylation Specific PCR-RFLP Method

Gu-Hwan Kim<sup>1</sup>, Jin-Joo Lee<sup>1</sup>, Seung Hoon Choi<sup>1</sup>, Joo Yeon Lee<sup>1</sup>,  
Beom Hee Lee<sup>1,2</sup> and Han-Wook Yoo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Center, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Asan Medical Center Children's Hospital, Seoul, Korea

**Purpose:** Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) is an overgrowth malformation syndrome caused by a methylation abnormality at chromosome 11p15, consisting of two imprinting centers, BWSIC1 (*IGF2*, *H19*) and BWSIC2 (*LIT1*, *KvDMR*). This study evaluated the applicability of a methylation-specific (MS) PCR RFLP method for the genetic diagnosis of BWS.

**Materials and Methods:** A total of 12 patients were recruited based on clinical findings. Karyotyping was performed using peripheral blood leukocytes, and genomic DNA was treated with bisulfate and amplified using methylation-specific primers. RFLP was conducted with restriction enzymes in differentially methylated regions of *LIT1*, *H19*, and *IGF2*.

**Results:** The 12 BWS patients had normal karyotypes. Abnormal methylation patterns in the BWSIC2 (*LIT1*) region were identified in seven patients (58.3%) using the MS-PCR RFLP method.

**Conclusions:** The MS-PCR RFLP method is a simple, economical genetic test. It detected genetic abnormalities in 50-60% of BWS patients, suggesting that it can be used as a screening test. A more precise method is required, however, to enhance the detection rate of genetic abnormalities, especially in BWSIC1 region.

**Key Words:** Beckwith-Wiedemann syndrome, Methylation, Genetic testing, RFLP, BWSIC1, BWSIC2, *LIT1*

## 서 론

Beckwith Wiedemann 증후군(BWS)은 1963년 Beckwith JB와 1964년 Wiedemann HR에 의해 처음 보고된 질환으로<sup>1</sup>, 거구증(macrosomia), 대설증(macroglossia), 배꼽탈장(omphalocele), ear creases, viceromegly (신장이나 간 등의 비대증), embryonal tumor, hemihyperplasia, 부신피질세포저대증(adrenocortical cytomegaly), 그리고 저혈당증 등의

접 수: 2010년 11월 28일

수정본접수: 2010년 12월 10일

게재승인일: 2010년 12월 15일

게재일: 2010년 12월 31일

책임저자: 유한욱

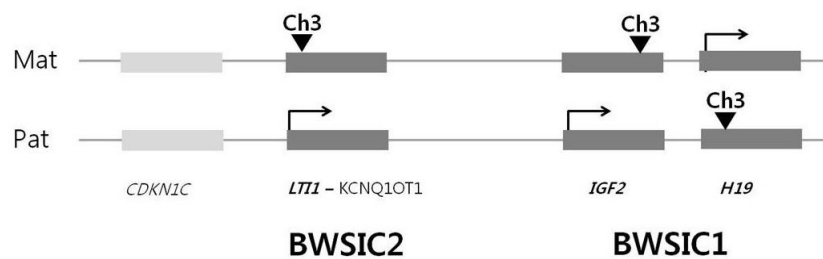
우138-736 서울특별시 송파구 풍납동 388-1  
울산의대 서울아산병원 소아청소년병원 소아청소년과  
Tel: 02)3010-3374, Fax: 02)473-3725  
E-mail: hwyoo@amc.seoul.kr

주요 증상을 특징으로 한다. BWS는 11번 염색체에서의 유전체 각인(genomic imprinting)의 이상에 의해 발생되며, 11p15 위치에 있는 *H19* DMR (differentially methylated region)로 알려진 BWSIC1과 *KCNQ1* DMR로 알려진 BWSIC2인 두 개의 imprinting center가 연관되어 있다<sup>3)</sup>. BWSIC1은 종양 억제 기능을 가지는 non-coding RNA에 대한 유전자인 *H19*와 *IGF2* (insulin-like growth factor2) 유전자의 발현 조절에 관여하는 메틸화 군집으로 부계로부터 유래된 allele이 메틸화되어 있다. BWSIC2는 voltage-gated potassium channel 유전자인 *KCNQ1*의 *LIT1* (Long QT intronic transcript 1, 또는 *KCNQ1OT1*)에서의 메틸화된 군집으로 모계로부터 유래된 allele이 메틸화되어 존재한다(Fig. 1). BWS 환자의 약 40%는 BWSIC2에서 메틸화 이상을 보이며, 이는 가장 흔한 빈도를 보이는 유전적 이상이다. BWS 환자의 20-25%는 11p15부위에서 부계 유래의 uni-parental disomy (UPD)를 보이고, 약 10%의 BWS 환자는 BWSIC1의 돌연변이에 의한 *H19* 및 *IGF2*의 비정상적 메틸화를 보이며, 나머지 약 30%의 환자는 정상 메틸화 양상을 보인다<sup>4)</sup>. 따라서, 11번 염색체의 메틸화 양상을 확인함으로써 전체 BWS 환자의 약 70%에 대한 유전적 진단이 가능하다. 일반적으로 유전체 메틸화 양상을 확인하는 방법은 DNA에 bisulfite를 처리하여 메틸화되지 않은 cytosine 염기를 uracil로 변성시킨 후, 변성이 방지된 메틸화된 cytosine과 구분하는 methylation specific PCR (MS-PCR) 방법<sup>5)</sup>이 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 11

번 염색체의 BWSIC1과 BWSIC2의 메틸화 양상을 확인할 수 있는 MS-PCR 방법을 이용한 BWS의 유전적 진단에 관하여 보고하고자 한다.

### 대상 및 방법

서울아산병원 의학유전학클리닉으로 의뢰된 12명의 BWS 환자를 대상으로 하였다. Genomic DNA는 PUREGENE DNA isolation kit (Gentra, Minneapolis, USA)를 이용하여 환자의 말초혈액으로부터 분리하였다. 분리된 genomic DNA 1ug에 bisulfite 용액을 처리하여 50°C에서 16시간 동안 DNA 변성을 유도한다. Bisulfite 용액은 20 mM hydroquinone을 포함한 1N NaOH에 3.5M sodium bisulfate를 녹여 사용하였다. 변성된 DNA는 잔존하는 bisulfite를 제거하기 위하여 column방식의 DNA 분리키트인 GeneAll (Generalbiosystems, Korea)를 이용하여 정제한 후 PCR반응의 주형으로 사용하였다. PCR 반응에 사용된 시발체의 염기서열은 bisulfite에 의해 변성된 염기들에 대한 염기서열을 반영하였고 Table 1과 같다. PCR 반응은 20 ul를 최종용적으로 100 ng의 변성된 주형 DNA, 1pmole의 각각의 시발체, 200 uM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM TrisCl (pH 8.3) 조건에서 1 unit의 Taq polymerase (Promega, USA)를 이용하여, 94°C 30초 분리, 60°C에서 30초간 교잡, 72°C에서 45초간 반응과정을 PTC200 (MJ-Research, USA)을 이용하여 35회 반복하



**Fig. 1.** Scheme of the imprinted gene cluster on chromosome 11p15. “Mat” indicates a maternal allele, “Pat” indicates a paternal allele, and “Ch3” represents a methylation site. Arrows indicate the directions. Two BWSICs are shown below the genes.

**Table 1.** List of Primer Sequences and Restriction Enzymes for MS-PCR of the Genes on 11p15

Gene	Forward	Reverse	Restriction enzyme	Reference
<i>H19</i>	tgtatagtatatgggtattttggaggttt	tcctataaatatcctattcccaataacc	<i>XmnI</i>	AF087017
<i>IGF2</i>	gggaaaggggttaggattttat	ataatttactccccctcaacctc	<i>BsaBI</i>	AC005809
<i>LIT1</i>	ttagatttttyggttaatgataggaCa	accrttctacctaataaactacraaa	<i>NlaIII</i>	U90095

The “C” was introduced in the primer sequence to provide an *NlaIII* recognition site for the unmethylated portion of *LIT1*. The character Y represents a “C” or “T” base and “R” indicates an “A” or “G”.

였다. 증폭된 산물은 1.5% agarose 젤에서 증폭 여부를 확인하였고, 증폭된 산물 4 ul에 제한효소 *XmnI*, *BsaBI*, *NaIII* (NEB, USA)을 각각 1 unit 처리하여 37°C에서 3시간 반응하였다. 그 후 제한효소의 절단 여부를 확인하기 위해 8% polyacrylamide 젤 전기영동을 시행하였다.

## 결 과

총 12명의 BWS 환자(남: 6명, 여: 6명) 중 *in vitro* fertilization에 의하여 쌍둥이로 출생한 환자는 1명(8.3%)이었다. 8명(66.7%)의 환자가 미숙아로 출생하였다. 진단 시 나이는  $0.6 \pm 1.4$ 세(0.0–4.9)였다. 모든 환자가 대설증을 보였고, 8명(66.7%)이 일시적 저혈당증을 경험하였다. 6명(50.0%)의 환자가 귀의 기형을 가졌고, 4명(33.3%)의 환자가 배꼽 탈장을 보였다. 2명(16.7%)에서 편측비대(hemihyperplasia)가 발견되었다. 복부 장기에 대한 검사 상 간비대(2명, 16.7%), 콩팥비대(2명, 16.7%), 췌장비대(1명, 8.3%)가 발견되었다.

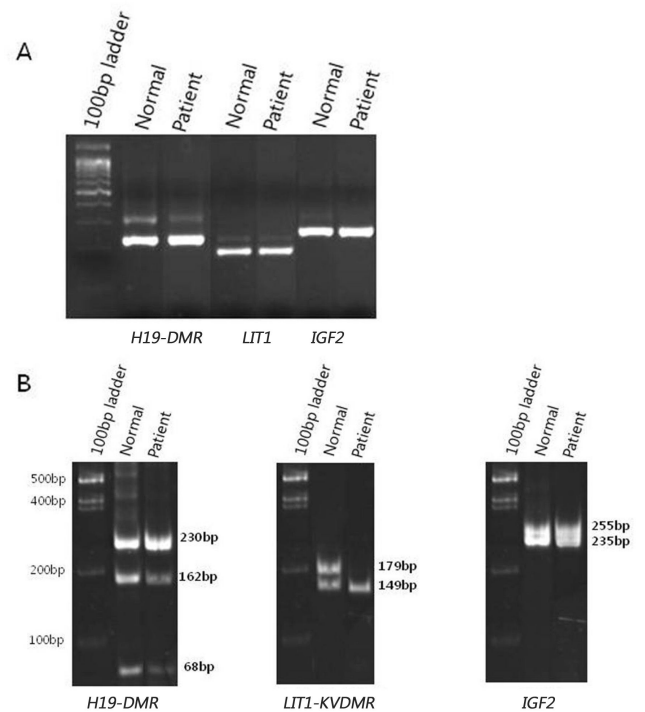
이들 12명의 환자들을 대상으로 염색체 검사를 시행하였고, 모두 정상이었다. MS-PCR을 시행하였으며, *H19*, *IGF2*, *LIT1* 부위는 각각 230bp, 255bp, 179bp의 크기로 증폭되었다(Fig. 2A). 제한효소 처리 후 결과에서 *H19*의 경우 메틸화된 부계 allele에 제한효소 *XmnI*이 작용하여, 162bp와 68bp의 절단산물이 나타났고, *IGF2*는 메틸화된 모계 allele에 제한효소 *BsaBI*이 작용하여 235bp와 20bp의 절단산물이 나타났다. *LIT1*은 비메틸화된 부계 allele에 제한효소 *NaIII*가 작용하여 149bp와 30bp의 절단산물이 나타났다(Fig. 2B).

12명의 BWS 환자 중, 7명의 환자(58.3%)에게서 *NaIII*에 의해 모두 절단되어지는 비정상적 메틸화 양상이 *LIT1* 부위에서 관찰되었다. 이는 모두 비메틸화된 양상을 보이는 것으로, 부계로부터 유래된 *LIT1*만을 가지고 있는 것을 의미한다. *H19*와 *IGF2*에서의 비정상적 메틸화 양상은 관찰되지 않았다.

## 고 찰

BWS는 임상적으로 overgrowth malformation syndrome을 특징으로 하며, 11번 염색체의 유전체 각인이상에 의한 질환으로 알려져 있다. 세포유전학적 방법인 말초혈액의 염색체 분석이나 fluorescent in situ hybridization (FISH) 등을 통해 11번 염색체의 증복, 전좌, 역위 등을 확인할 수 있으며, 이는 BWS 환자의 약 1–2%에 해당한다. 또한, microsatellite 분석

을 통해 부계 유전 UPD 여부를 확인 가능하며, 이는 전체 환자의 10–20% 정도에서 발견된다. 현재까지의 보고에 의하면 MS-PCR을 통하여 약 50–60%의 BWS 환자에서 비정상적인 메틸화 양상을 확인할 수 있으며<sup>4)</sup>, 대부분은 BWSIC2 즉 *LIT1* 부위에서 비정상적 메틸화 양상이 발견된다. 본 연구에서도 이와 비슷하게 58.3%의 환자에서 이상이 발견되었다. 최근에 소개된 MS-MLPA (methylation specific-multiplex ligation dependent probe amplification) 방법은 microdeletion, UPD, imprinting defect의 확인이 가능한 방법으로서<sup>6,7)</sup>, 이를 통하여 부분적 메틸화 이상을 발견할 수 있으므로 BWS 환자에서의 유전적 진단 양성률을 70–80%까지 높일 수 있다. 또한, BWSIC2에 의해 발현에 영향을 받는 *CDKN1C* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) 유전자의 돌연변이에 의한 BWS도 보고되고 있다. 우성유전의 가족력이 있는 환자의 약



**Fig. 2.** Amplified fragments of *H19*, *LIT1*, and *IGF2* and the products of restriction enzyme digestion. (A) 1.2% agarose gel electrophoresis. PCR amplifications were carried out using the methylation-specific primers listed in Table 1 after DNA modification by bisulfite. The products were 230bp, 179bp, 255bp for *H19*, *LIT1*, *IGF2*, respectively. (B) 8% polyacrylamide gel electrophoresis. Restriction enzymes were used to treat the amplified PCR products: *XmnI* digested the methylated paternal part of *H19*, producing 162bp and 68bp fragments; *NaIII* digested the unmethylated paternal part of *LIT1*, producing 149bp and 30bp fragments; *BsaBI* digested the methylated maternal part of *IGF2*, producing 235bp and 20bp fragments. The patient showed loss of maternal *LIT1*.

**Table 2.** Molecular Genetic Methods for the Diagnosis of BWS<sup>6-8)</sup>

Method	Detected mutations	Rate
Cytogenetics	Cytogenetic duplication, translocation, or inversion	1-2%
Microsatellite analysis	Paternal UPD	10-20%
MS-PCR	Methylation abnormal at BWSIC1 and BWSIC2	50-60%
MS-MLPA	Duplication, microdeletion, UPD, methylation abnormal	70-80%
Sequence analysis	<i>CDKN1C</i> mutation	5-10%

CDKN1C, Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C; MS-MLPA, methylation specific-multiplex ligation dependent probe amplification; MS-PCR, methylation specific PCR; UPD, uni-parental disomy

40%, 그리고 가족력이 없는 환자의 5-10%의 BWS 환자가 *CDKN1C* 유전자의 돌연변이를 보인다<sup>8,9)</sup>. BWS의 진단에 관련된 분자유전학적 방법은 Table 2에 정리하였다. BWSIC1에 위치하는 *H19*는 종양 억제 기능을 가지며, *IGF2*는 성장인자로 서로 길항적으로 작용한다. *H19*의 경우, 부계 allele이 메틸화되어 있어 zinc finger protein인 CTCF (CCCTC-binding factor)의 영향을 받지 않아 부계로부터 유래된 allele에서는 발현이 되지 않는 반면 *IGF2*가 발현이 되고, 모계로부터 유래된 allele에서는 CTCF binding domain이 비메틸화되어 있어 CTCF가 결합하게 되고 결과적으로 *H19*가 발현됨으로써 *IGF2*의 발현이 억제된다. *H19* DMR 부위에서 모계 allele이 메틸화되면, 결과적으로 *IGF2*가 과메틸화(hypermethylation) 되면서 *H19*의 발현억제과 *IGF2*의 과발현을 초래함으로써 BWS가 유래된다. 반대로 부계의 *H19* DMR이 비메틸화되어 *IGF2*가 저메틸화(hypomethylation)이 되면, *H19*가 과발현되고 *IGF2*의 발현이 억제됨으로써 성장이 저해되는 Silver-Russell syndrome이 초래된다<sup>10)</sup>. 이러한 과메틸화 또는 저메틸화는 완전한 LOM 또는 GOM (Loss of -, Gain of methylation)이 아닌 부분적인 메틸화 이상에 의해서도 야기될 수 있다<sup>10)</sup>. MS-PCR RFLP 방법을 이용하면, 완전한 LOM/GOM이 아닌 부분적인 메틸화에 의해 정상 혹은 비정상의 allele의 증폭이 이루어지므로 비정상여부의 판별이 불가능하며, MS-MLPA를 통하여 확인이 가능하다.

본 연구를 통하여 bisulfite 처리를 이용한 MS-PCR RFLP 방법으로 약 60%의 BWS 환자에 대한 유전적 진단이 가능하였다. 하지만, 본 방법으로는 부분적 메틸화 이상을 발견할 수는 없었으며, 진단 양성률을 높이기 위한 방법의 도입이 필요하다고 판단된다. 그러나 FISH, microsatellite 분석, MS-MLPA 방법 등이 고가의 장비와 시약 비용이 필요한 방법이므로, 여기서 소개한 MS-PCR RFLP 방법은 비교적 경제적이고 사용자에게 친화적인 손쉬운 방법으로 선별적 유전자 검사로 용의하게 이용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 희귀내분비질환의 분자유전학적 진단 및 치료지침 개발 과제(A080588)의 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

## 국문초록

**목적**: Beckwith-Wiedemann 증후군(BWS)은 11p15 부위의 메틸화 양상의 이상으로 인한 overgrowth malformation syndrome이다. 11p15 부위에는 두 가지 imprinting center, 즉 BWSIC1 (*IGF2*, *H19*)와 BWSIC2 (*LIT1*, KvDMR)가 존재한다. 본 연구에서는 methylation-specific (MS) PCR RFLP 방법을 이용한 BWS의 유전적 진단을 보고하고자 한다.

**대상 및 방법**: 임상 소견을 바탕으로 12명의 BWS 환자가 포함되었다. 환자의 말초혈액으로부터 염색체 핵형을 조사하였다. 분리한 DNA에 bisulfite를 처리한 후, *LIT1*, *H19*, *IGF2* DMR부위는 각각의 MS primer를 이용하여 증폭하였다. 적절한 제한효소를 이용하여 절단 여부를 PAGE로 확인함으로써 각각의 DMR 부위에 대한 메틸화 이상 여부를 확인하였다.

**결과**: 12명의 환자는 모두 정상 핵형을 보였다. MS-PCR RFLP 상 총 7명(53.8%)의 환자가 이상 소견을 보였으며, 모두 BWSIC2 (*LIT1*)에 비정상적 메틸화를 보였고 모두 부계 유래의 비메틸화된 allele만이 발견되었다.

**결론**: 본 연구를 통해 MS-PCR RFLP 검사로 BWS 환자의 약 50-60% 정도에서 유전적 진단이 가능함을 알 수 있었으며, 이는 BWSIC2 부위의 메틸화 이상을 발견하는데 손쉽게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나, BWSIC1 부위의 메틸화 이상은 발견이 어려우며, 이 부위의 이상을 발견하기 위해서는 메틸화를 정량적으로 분석할 수 있는 방법이 필요하다.

## References

- 1) Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith–Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005;137:12–23.
- 2) Wiedemann HR. Familial malformation complex with umbilical hernia and macroglossia: “A new syndrome?” *J Genet Hum* 1964;13:223–32.
- 3) Reik W, Maher ER. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith–Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 1997; 13:330–4.
- 4) Blik J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, et al. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* 2001;10: 467–76.
- 5) Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5–methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89: 1827–31.
- 6) Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, Nygren AO, Birch JM, Cole TR, et al. Methylation–specific multiplex ligation–dependent probe amplification (MS–MLPA) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation. *J Med Genet* 2008;45:106–13.
- 7) Kim GH, Lee BH, Yoo HW. MLPA applications in genetic testing. *J Genet Med* 2009;6:146–54.
- 8) Shuman C, Smith AC, Weksberg R. Beckwith–Wiedemann syndrome. 2008. May. *GenReviews* PMID20301568. Available from: <http://www.genetests.org>
- 9) Li M, Squire J, Shuman C, Fei YL, Atkin J, Pauli R, et al. Imprinting status of 11p15 genes in Beckwith–Wiedemann syndrome patients with CDKN1C mutations. *Genomics* 2001;74:370–6.
- 10) Ulaner GA, Vu TH, Li T, Hu JF, Yao XM, Yang Y, et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of CTCF–binding site. *Hum Mol Genet* 2003;12:535–49.