

Forensic STR Analysis of Mixed Chimerism after Allogeneic Bone Marrow Transplantation

Yong-Bin Eom[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, Cheonan 330-718, Korea

Multiplex PCR-based short tandem repeat (STR) analysis is considered as a good tool for monitoring bone marrow engraftment after sex-mismatched allogeneic transplantation and provides a sensitive and accurate assessment of the contribution of both donor and/or recipient cells in post-transplantation specimens. Forensic STR analysis and quantitative real time PCR are used to determine the proportion of donor versus recipient each contained within the total DNA. The STR markers were co-amplified in a single reaction by using commercial PowerPlex[®] 16 system and AmpFISTR[®] Identifier[®] / Yfiler[®] PCR amplification kits. Separation of the PCR products and fluorescence detection were performed by ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer with capillary electrophoresis. The GeneMapper[™] ID software were used for size calling and analysis of STR profiles. Extracted DNA was quantified by the Quantifiler[™] Human DNA / Y Human Male DNA Quantification Kit. The intent of this study was to analyze the ratio of donor versus recipient cells in the post-transplant peripheral blood, spleen, lung and kidney specimens. Specimens were taken from the traffic accident male victim who had been engrafted from bone marrow female donor. Blood and spleen specimens displayed female donor DNA profile. Kidney specimen showed male recipient DNA profile. Interestingly, lung tissue showed mixed profiles. The findings of this study indicate that the forensic STR analysis using fluorescence labeling PCR combined with capillary electrophoresis is quick and reliable enough to assess the ratio of donor versus recipient cells and to monitor the mixed chimeric patterns.

Key Words: Short tandem repeat (STR) analysis, Allogeneic transplantation, Mixed chimerism

서 론

각종 사건 현장 증거물에서 유전자형 검출에 의한 법의학적 개인식별은 피의자 또는 피해자의 사건 현장 존재 여부를 확정하는데 중요하다 (Eom, 2009). 그러나, 최근 들어 동종 골수 이식 등 첨단 의료기술에 따른 공여자와 수혜자의 조혈이 복합적으로 나타나는 키메라 현상(chimerism)에 의해 유전자형 검출에 의한 개인식별에 주의가 필요하다. 동종 골수 이식은 종종 복합 면역결핍 증후군, 재생불량성 빈혈, 급성 백혈병 뿐만 아니라 만성 골수성 백혈병, 악성 림프종 및 기타 유전 질환에서도 중요한 치료법으로 인정되고 있다 (Beutler et al., 1995). 성별

불일치 골수 이식에서 키메라 현상을 검출하기 위한 여러 가지 방법들이 있는데, X와 Y 염색체 특이 탐색자를 이용한 형광 제자리 부합화 (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) 방법 (Dumam et al., 1989; Wessman et al., 1989), 일렬반복 변이수 (variable number of tandem repeat, VNTR) 또는 단기일렬반복 (short tandem repeat, STR) 마커의 PCR 기반 증폭 방법들이 (Lawler et al., 1991; Leclair et al., 1995; Bader et al., 1996) 효과적이고 신속한 기법으로 알려져 있다. STR 마커는 법의학 분야에서 오랫동안 사용되어 왔으며 매우 소량의 검체만으로 성별 불일치 골수 이식에서 키메라 현상의 공여자와 수혜자의 비율에 대한 정보를 알 수 있는 장점이 있다 (Thiede et al., 1999).

본 연구의 목적은 현재 법의학 유전자분석 기법으로 사용되고 있는 DNA 프로파일 분석을 13개 유전자좌의 STR 마커와 X-Y 염색체 분석을 위해 Amelogenin 유전자좌를 모두 포함하는 PowerPlex[®] 16 시스템, AmpFISTR[®] Identifier[®]와 Yfiler[®] PCR amplification 키트를 사용해서 성별 불일치 골수 이식을 받은 사람의 혈액, 비장, 허파,

*접수일: 2010년 7월 12일 / 수정일: 2010년 8월 23일
채택일: 2010년 8월 25일

[†]Corresponding author: Yong-Bin Eom, Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, 456 Ssangyong-Dong, Seobuk-Gu, Cheonan-City, Chung Nam 330-718, Korea.
Tel: +82-41-570-4166, Fax: +82-41-570-4258
e-mail: omnibin@kornu.ac.kr

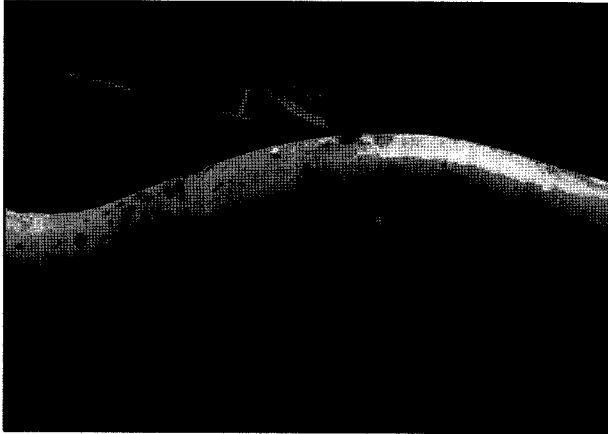


Fig. 1. Blood stains on the front bumper of the accident car.

콩팥 조직에서 공여자와 수혜자의 DNA 비율을 정량적으로 분석하고 유전자 프로파일을 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

혈흔 및 조직 시료

2008년 2월 경부고속도로 하행성 서초 IC 진입로에서 승용차에 의해 1차 충격 후 쓰러진 피해자를 좌측 앞범퍼 부분으로 2차 충격한 화물차량에 묻은 혈흔과 이 교통사고로 사망한 남성 피해자의 혈액, 비장, 허파, 콩팥 조직 시료에 대해 중복 실험을 원칙으로 하여 실시하였다 (Fig. 1).

DNA의 추출

충격 화물차량에서 채취한 혈흔에서는 QIAamp® DNA Micro Kit를, 피해자의 혈액, 비장, 허파 및 콩팥 조직에서는 QIAamp® DNA Mini Kit를 QIAcube™ (QIAGEN® Hilden, Germany) 자동화 기기에서 각각의 사용자 매뉴얼에 따라 genomic DNA를 추출하였다.

DNA의 정량

추출한 DNA는 2% agarose gel에서 control DNA (K562)와 함께 전기 영동하여 육안으로 확인한 후, 각각의 시료에서 사람 genomic DNA 전체 양은 Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, CA, USA)를, 남성 genomic DNA 양은 Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, CA, USA)를 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA)에서 사용하여 각각 정량화하였다.

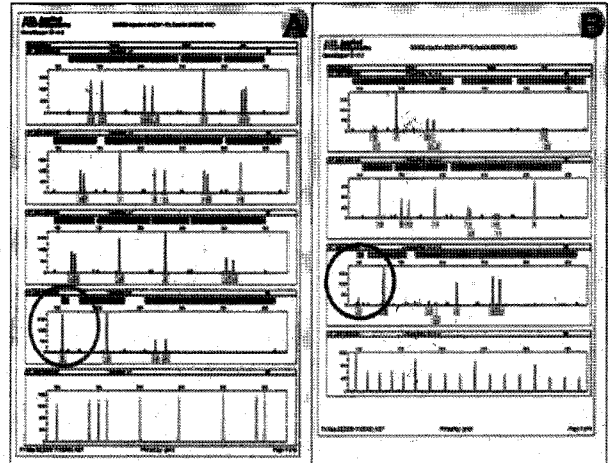


Fig. 2. Electropherograms of the victim's blood and the blood stains on the accident car. STR profiling from the victim's blood and the bloodstains were analyzed on an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer after co-amplification of thirteen STRs plus the Amelogenin system. A. STR profiles of the victim's blood with AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit, B. STR profiles of the bloodstains on the accident car with PowerPlex® 16 System.

DNA 프로파일링

정량된 DNA를 1 ng 농도로 맞추어 AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, CA, USA), PowerPlex® 16 System (Promega, WI, USA), AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, CA, USA) 각각의 사용자 매뉴얼에 따라 GeneAmp® 9700 system (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 증폭하였다. 증폭 산물의 유전자형은 ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 분석하였고, DNA profiles은 GeneMapper™ ID Software를 사용하여 결정하였다.

결 과

충격차량 혈흔과 피해자 혈액의 DNA 프로파일 비교

2차 충격한 화물차량에 묻은 혈흔과 남성 피해자 혈액의 DNA 프로파일링 결과는 13개 STR 유전자좌에서 모두 똑같은 대립유전자를 보였지만 성별 마커인 Amelogenin 유전자좌에서 여성을 나타내는 XX를 보였다 (Fig. 2).

피해자 혈액의 Y-STR 프로파일

남성 피해자의 혈액이 Amelogenin 유전자좌에서 XX를 보였기 때문에, Y 염색체 마커를 PCR 증폭하는 Y-STR

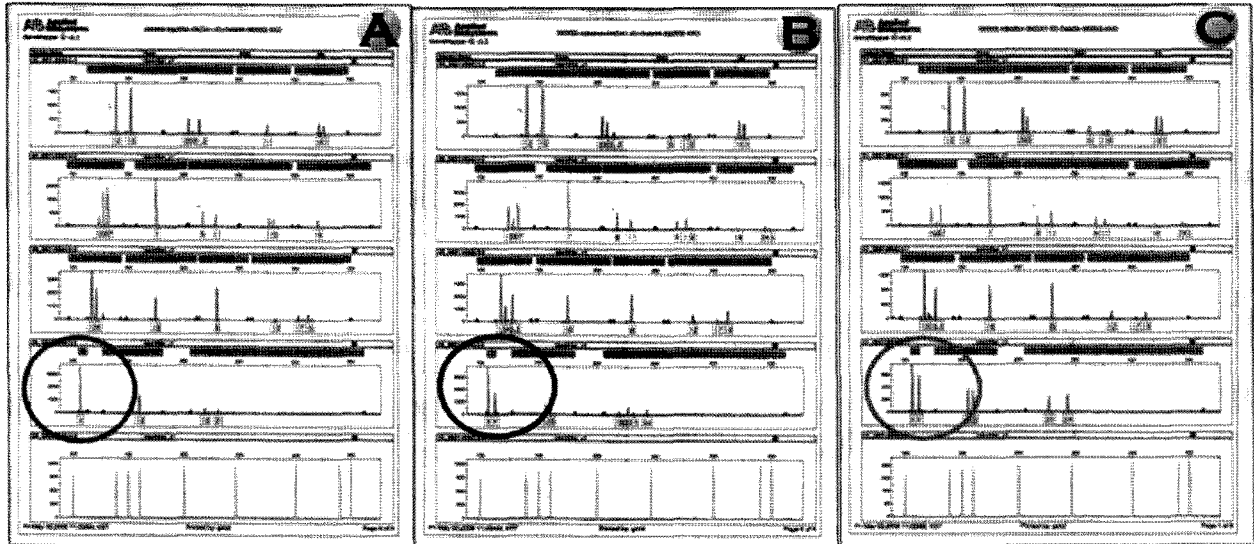


Fig. 3. Electropherogram of the victim's tissues. STR profiles were analyzed on an ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer after co-amplification of thirteen STRs plus the Amelogenin system with AmpFISTR[®] Identifier[®] PCR Amplification Kit. A. STR profiles of the victim's spleen tissue show that the Amelogenin locus is XX, B. STR profiles of the victim's lung tissue show mixed XX-XY profiles, C. STR profiles of the victim's kidney show that the Amelogenin locus is XY.

Table 1. Real-time quantitative PCR results of DNA isolated from the victim's tissues

DNA	Tissue	Kidney	Lung	Spleen	Blood
Male DNA quantification [†]		19.52 ng/μl	10.16 ng/μl	5.55 ng/μl	0.0 ng/μl
Human DNA quantification [‡]		51.57 ng/μl	19.33 ng/μl	202.09 ng/μl	1.3 ng/μl

[†] Y chromosome male DNA quantity was analyzed by Quantifiler[™] Y Human Male DNA Quantification Kit,

[‡] Human DNA quantity was analyzed by Quantifiler[™] Human DNA Quantification Kit with 7500 Real-Time PCR System.

프로파일링을 실시하였다. 그 결과 남성 Y-STR 프로파일에 해당하는 대립유전자를 관찰할 수 없었다 (Data not shown). 이러한 결과는 과거에 이 남성 피해자가 여성으로부터 성별 불일치 골수 이식을 받았기 때문에 남성 수혜자의 혈액이 여성 공여자의 혈액으로 완전히 대체되었기 때문인 것으로 판단되었다.

피해자 비장, 허파, 콩팥의 DNA 프로파일

비장 조직은 여성 공여자의 DNA 프로파일을 보였고 (Fig. 3A), 허파 조직은 남성 수혜자와 여성 공여자의 DNA 프로파일이 혼합된 키메라 현상의 결과를 보였고 (Fig. 3B), 콩팥 조직은 남성 수혜자의 DNA 프로파일만을 보였다 (Fig. 3C).

남성 DNA의 정량화

남성 피해자의 혈액, 비장, 허파 및 콩팥에서 추출한 DNA의 정량화 결과에서 Y 염색체 남성 DNA는 콩팥

(19.52 ng/μl) > 허파 (10.16 ng/μl) > 비장 (5.55 ng/μl) > 혈액 (0 ng/μl) 순이었다 (Table 1).

고 찰

골수 이식 치료를 받는 사람이 증가함에 따라 법의학 적 유전자형 분석에 의한 개인식별에서 잘못 판단할 위험성 또한 증가하고 있다 (Cecilia et al., 2009).

등종 골수 이식 치료의 성공은 병적인 환자의 골수 조혈 세포들이 정상적인 공여자의 조혈 세포로 완전하게 전환되는 것이지만, 이식 후 조혈 세포의 재구성에 따라 세 가지 형태로 나타날 수 있다. 첫째, 골수 수혜자의 모든 조혈 모세포가 화학 요법이나 방사선 조사에 의해 완전하게 제거되고 투여된 공여자의 조혈 모세포로 완전하게 치환되는 공여자 키메라 현상으로 이식 거부 반응이나 재발 위험성이 적은 이상적인 상태이다. 둘째, 화학 요법이나 방사선 조사와 같은 전처리 후에도 골수 수

혜자의 악성 세포가 남아 있는 경우로 이는 재발과 관계 있는 최소 잔존 질환과 연관이 있다. 셋째, 수혜자의 모든 악성 세포는 제거되나, 수혜자의 정상 조혈 세포가 소수 남게 되는 경우로 이를 혼합 키메라 현상이라 한다 (McCann et al., 1993).

Fig. 3의 결과는 남성 수혜자의 모든 혈액세포가 여성 공여자의 혈액세포로 완전하게 치환되어 장기 특성상 혈액을 많이 포함한 비장조직은 여성 공여자의 DNA 프로파일을 주로 보였고, 허파조직은 남성 수혜자의 폐조직 DNA 프로파일과 여성 공여자의 혈액세포 프로파일이 혼합된 키메라 현상을 보였으며, 콩팥조직은 고형장기로 남성 수혜자의 DNA 프로파일을 보인 것으로 McCann 등의 연구와 비교하여 해석될 수 있으리라 사료된다.

동종 골수 이식 치료의 성공은 임상적으로 바람직하지만, 만약 법의학적 유전자형 분석에 의한 개인식별을 실시하는 경우에 이러한 키메라 현상은 결과 해석 과정에서 잘못 배제 (false exclusion)시키거나 두 명의 유전자가 혼합된 것으로 오인되어 DNA 프로파일 해석 결과와 정황 증거가 일치하지 않는 혼란을 초래할 수도 있다.

본 연구에서는 표현형 상으로는 정상적인 남성 수혜자의 혈액이 여성 공여자의 혈액 세포로 완전히 치환되어 여성 유전자 프로파일만이 검출되었다. 이러한 법의학적 유전자형 분석 결과와 정황 증거가 일치하지 않아 다른 장기 조직으로 확인한 결과, 고형 실질 장기인 콩팥에서는 남성 수혜자의 유전자 프로파일이, 혈액이 많이 포함된 비장에서는 여성 공여자의 유전자 프로파일이 검출되었으며 허파 조직에서는 남성 수혜자와 여성 공여자의 유전자 프로파일이 혼합되어 검출되었다.

따라서 법의학적 개인식별을 목적으로 하는 STR 마커를 이용한 유전자형 분석 결과와 정황 증거가 불일치할 때는 우선 실험 과정의 오류를 점검하고 나서, 대조 시료로 혈액 이외의 사건 관련자의 신체 다른 부위에서 채취한 모발, 구강상피세포 도말 또는 장기 조직 등에 대해 추가적인 확인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2010년도 나사렛대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

REFERENCES

- Bader P, Holle W, Klingebiel T. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.* 1996. 16: 1759-1763.
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. Williams Hematology. 5th ed. 1995. pp. 172-194. New York, McGraw-Hill, Co.
- Cecilia M, Karina M, Eugenia A, Andrea B, Alejandra L, Nidia M. A case of chimerism in a paternity study. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series.* 2009. 2: 228-229.
- Durnam DM, Anders KR, Fisher L. Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific *in situ* hybridization assay. *Blood* 1989. 74: 2220-2226.
- Eom YB. Evaluation of DNA Extraction Methods from Low Copy Number (LCN) DNA Samples for Forensic DNA Typing. *J Exp Biomed Sci.* 2009. 15: 229-232.
- Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991. 77: 2504-2514.
- Leclair B, Fregeau CJ, Aye MT, Fourney RM. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a comparative study of current technologies. *Bone Marrow Transplant.* 1995. 16: 43-55.
- McCann SR, Lawler M. Mixed chimerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1993. 112: 91-94.
- Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* 1999. 23: 1055-1060.
- Wessman M, Ruutu T, Volin L, Knuutila S. *In situ* hybridization using a Y-specific probe - a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1989. 4: 283-286.