

cDNA 미세배열 비교게놈교잡법 (cDNA microarray-based comparative genomic hybridization)을 이용한 염색체 이상 질환의 최신 고속 산전 유전 진단

‡ *
, †
BK21
* †
‡ * * * † † * * * †

Rapid prenatal diagnosis for chromosomal aneuploidy using cDNA microarray-based comparative genomic hybridization

Young Ho Yang, M.D.*[†], Sun Young Rha, M.D.[‡], Yong Wook Jung, M.D.*,
Eun Suk Yang, M.D.*[†], Kwi Yeon Lee[†], Chan Hee Park[‡], In Kyu Kim, M.D.*[†],
Han Sung Hwang, M.D.*[†], Yong Won Park, M.D.*[†], Jae Kyung Roh, M.D.[‡]

^{*}Department of Obstetrics and Gynecology, [†]The Institute of Genetic Science,
[‡]Cancer Metastasis Research Center, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Objective: Prenatal cytogenetic diagnosis is limited to metaphase karyotype analysis of cultured cells obtained by amniocentesis or chorionic villus sampling. Moreover, genome wide analysis cannot be performed by FISH analysis using specific probe. Array comparative genomic hybridization (CGH) offers a number of advantages over conventional cytogenetic analysis and FISH. Microarray CGH can be highly comprehensive, amenable to very high resolution, sensitive and fast. The objective of this study was to determine the clinical use of cDNA microarray CGH for detection of fetal aneuploidy.

Methods: 21 amniotic fluid samples and 6 chorionic villi samples were obtained from 27 pregnant women in 9-19 gestational weeks. Genomic DNA was extracted from each sample and amplified. For cDNA microarray CGH analysis, test DNA sample and reference DNA sample were labeled with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP, respectively. Each sample of labeled test and reference DNA was hybridized to microarray. The result was analysed with axon scanner and compared with cytogenetic analysis and FISH.

Results: In 27 cases, 3 cases with trisomy 21 and 1 case with trisomy 18 had increased hybridization signals on chromosome 21 and chromosome 18. One case with 45,X had decreased signals on chromosome X. One case with 46,X,i(Xq) had decreased signal on short arm of chromosome X and increased signal on long arm. And one case with 47,XYY had two fold increased signal on Y chromosome. cDNA microarray based CGH correctly identified fetal aneuploidy in all of the 7 cases with aneuploid fetuses.

Conclusion: Prenatal genetic diagnosis by cDNA microarray-based CGH is an useful, innovative, rapid and accurate method. It is promising technique allowing rapid screening for whole chromosomal changes including aneuploidy, and may augment standard karyotyping techniques for prenatal genetic diagnosis by providing additional molecular information. This method may aid the discovery and description of minor genetic aberration, potentially enhancing future prenatal genetic diagnostic application.

Key Words: cDNA microarray-CGH, Prenatal diagnosis, Aneuploidy

: 2005. 1. 17.
:
E-mail: ob@yumc.yonsei.ac.kr
* 2003
* 90 (2004.10.23)

서 론

매년 신생아의 2-3%에서 출생 시 선천성 결함을 갖고 태어나며, 20-25%가 염색체 이상 혹은 단일 유전자 결함 등에 의한다.¹ 임신 1분기 자연 유산의 경우에 약 50%에서 염색체 이상이 그 원인이 되며, 임신 2분기와 3분기 유산에서도 각각 36%와 5%에서 염색체 이상이 그 원인이 된다고 보고되고 있다.^{2,3} 또한 태아의 염색체 이상은 산모의 연령이 증가할수록 그 빈도도 증가하는 것으로 알려져 있고⁴ 만혼의 사회적인 상황과 맞물려 태아의 염색체 이상의 빈도는 앞으로 더욱 증가할 것으로 예상된다. 이처럼 태아의 염색체 이상은 임신에서 중요한 문제이므로 산전에 태아의 염색체 이상을 진단하는 것은 매우 중요하다.

태아의 염색체 이상을 확진하기 위해 사용되는 기존 검사방법에는 임신초기 (11-13주)에 시행하는 융모막용 모생검법과 임신 중기 (15-20주)에 시행하는 양수천자법과 제대혈천자법에 의한 염색체검사법이 있다. 이들 검사방법은 세포 배양 (2주)이 필요하고 전문 인력에 의한 기술적인 많은 노력과 고가의 비용이 요구되고, 검사 결과 후 산모의 임상적 치료 선택 및 결정에 문제점을 야기할 수도 있다. 형광동소교잡법 (Fluorescence in situ hybridization, FISH)을 통한 진단의 경우에는 세포 배양 과정이 생략되어 결과를 얻는 데까지 24-48시간이 소요되는 장점이 있으나 염색체 특이 탐침 (chromosome specific probe)을 사용하므로 검사 대상이 되는 염색체 이상은 밝혀낼 수 있으나 그 이외의 염색체 이상은 밝혀낼 수 없다는 단점이 있다.⁵ 따라서 이러한 기존 염색체 검사 방법의 단점을 보완할 수 있는 새롭고 혁신적인 진단 방법의 필요성이 대두되고 있다.

염색체의 수적, 구조적 변화와 발암과의 상관 관계를 연구하는데 주로 이용되어 온 염색체 비교유전자교잡법 (chromosomal comparative genomic hybridization, cCGH)을 태아 염색체 이상의 산전 진단에 응용하고자 하는 노력이 시도되었다.⁶ 더 나아가 Solins-Toldo 등과 Pinkel 등이 종양 세포에서 gene dosage alteration 및 염색체의 증폭, 결손 같은 수적 변화를 진단하는데

있어 microarray-CGH 방법이 고전적인 방법들 보다 우수함을 입증하였다.^{7,8} 이 후 cDNA가 접적되어 있는 cDNA microarray 위에 genomic DNA를 보합시킴으로써 수만의 염색체 상의 변화를 한번의 실험으로 관찰할 수 있는 cDNA 미세배열 비교게놈교잡법 (cDNA microarray-based comparative genomic hybridization, cDNA microarray-CGH) 기법을 이용하여 Hughes 등은 *Saccharomyces*의 홀배수체 연구를 시행하였고,⁹ Pollack 등은 종양 세포주에서 DNA 수적 변화를 통해 염색체의 증폭 및 결손에 대한 연구를 시행하였다.¹⁰ Sudbrak 등은 X 염색체에서 미세한 불균형 유전자 재배열 (unbalanced chromosome rearrangement)에 대한 연구를 시행하였으며,¹¹ Gross 등은 21번 삼배성 염색체 (trisomy 21) 태반에서 유전자 발현을 분석하여 산전 진단 방법으로서의 가능성을 제시하였다.¹² 이러한 연구들을 통해 cDNA microarray-CGH가 태아의 산전 염색체 진단에 이용될 수 있음을 시사하였다.

그러나 cDNA microarray-CGH 등의 high throughput 기법을 이용한 산전 유전 진단 영역에서의 연구는 아직 미진한 실정이며 국내에서도 아직 이를 이용한 산전 유전진단에 대한 연구 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 산전 유전진단에 있어서 선천성 기형을 포함한 염색체 이상 질환이나 유전자 발현을 검사하는데 있어 cDNA microarray-CGH의 기법의 임상적 유효성을 규명하고자 한다.

연구 대상 및 방법

연구 대상은 본원 의과대학 산부인과 외래를 방문한 산모 중 산전 태아 염색체 검사 및 산전 유전 상담의 적응증이 되어 융모막용모검사 또는 양수 천자를 시행한 산모 27예를 대상으로 하여 이를 정상 염색체 소견을 보인 20예와 염색체 이상이 발견된 7예로 분류하여 산모의 동의 하에 세포유전학 검사, FISH, microarray-CGH를 시행하였으며, 세포 유전학 검사와 microarray-CGH의 검사 결과를 서로 비교하고 FISH 검사를 통해 확진하였다.

1. 검체 채취

1) 용모막 용모 생검

임신 9-11주 사이에 복부 초음파를 이용하여 태아의 크기 및 상태, 태반의 위치를 확인한 후 태반 부위 중 가장 두꺼운 부위로 자궁경부를 통해 생검 카테터를 삽입하여 용모 조직을 흡인하였다.

2) 양수 천자

임신 18-24주 사이에 복식 초음파를 이용하여 태반의 위치 및 태아의 크기를 확인한 후 초음파 유도하에 22 gauze의 척수 천자 바늘을 이용하여 약 20 mL 정도의 양수를 얻는다. 이 중 18 mL를 세포 배양에 이용하고 2 mL를 microarray-CGH에 이용하였다.

2. 염색체 검사 방법

1) 세포유전학적 검사 (Cytogenetic analysis)

양수 천자를 통해 무균적으로 얻어진 양수를 실험실로 옮겨 약간 흔들어 준 후 양수 5 mL를 조직 플라스크에 넣고 동량의 배양액 (change media)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양하기 시작한 후 4-5일이 되어 세포가 자라기 시작하면 새로운 배양액으로 갈아주고 이를 매 3일마다 되풀이하여 도립 현미경 (inverted microscope) 하에 자라는 형태를 확인하면서 2-3주 배양하였다. 세포 군집이 충분히 관찰되면 계대 배양 (subculture)하고 2-3일 후 유사 분열이 보이면 10 ng/mL의 colcemid를 0.5 mL 넣고 2-5 시간 동안 5% CO₂ 배양기에 둔 후 배양액을 완전히 제거하고 세포수확의 관례적인 절차에 따라 세포를 수확하여 염색체 표본을 만들었다. 슬라이드를 공기 건조시킨 후 G-banding 등을 하며 20-50개의 세포를 관찰하고 잘 퍼진 중기 상태 염색체를 사진 촬영하여 염색체 핵형을 분석하였다.

용모막 용모 생검한 경우는 용모조직을 배양액이 들어 있는 Petri dish에 넣고 소독한 가위로 잘게 자른 다음 0.2 mL 배양액을 넣어 세포 부유액을 만든 다음 50

cc 조직 배양 플라스크 표면에 세포 부유액을 분산시켜 5 cc 배양액을 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 배양액을 3-4일마다 갈아주며 배양하면서 충분한 유사분열이 관찰되면 colcemid를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 배양액을 완전히 제거하고 0.25% trypsin 용액으로 세포를 유리시킨 후 900 rpm에서 8 분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거하고 0.075 mol KCl 용액을 넣고 37°C 배양기에 20분간 넣어 배양하였다. 다시 원심 분리 후 상등액을 제거하고 고정액을 넣고 세포 부유액을 만들어 슬라이드 위에 떨어 뜨려 공기 건조시킨 후 Giemsa 염색 및 G-banding으로 염색체 핵형을 분석하였다.

2) FISH analysis

Microarray-CGH 기법의 정확도를 검증하기 위하여 기존의 FISH 방법을 이용하여 이의 시료들을 조사하였다. FISH는 슬라이드를 50°C에서 2X SSC/Tween-20 용액으로 5분씩 3번 세척한 후 50°C에서 70%, 90% 에탄올에 차례로 1분씩 처리한 후 건조 시켰다. 73°C에 맞춘 변성용액에 1분간 담근 후 73°C에서 70%, 85%, 100% 에탄올에 각각 1분씩 처리한 후 준비된 탐색자 혼합물 (probe mixture)을 46-50°C 뜨거운 평판에서 슬라이드에 부합화 (hybridization) 시킨 후 주위를 밀봉하고 37°C 습식방 (humidity chamber)에서 밤새 배양하였다. 배양 후 슬라이드 위에 있는 coverslip을 제거한 후 50% formamide/2X SSC에서 세척하였다. 2X SSC에서 10분간 2X SSC/NP-40에서 5분간 세척 후 어두운 곳에서 공기 건조시킨 후 검정하였다.

3) cDNA microarray based Comparative Genomic Hybridization (Microarray-CGH)

① Genomic DNA 추출 및 효소 처리

전체 gDNA는 검사하고자 하는 시료 (양수, 용모, 혈액의 림프구)와 reference로 사용하고자 하는 태반조직에서 phenol/chloroform/isoamylalcohol을 이용한 표준기법을 사용하였다. 400 µl DNA lysis buffer에서 42°C로 12-24시간 동안 용해하였다. 배양된 산물은 효

소활성을 억제하기 위해 100°C에서 10분 동안 가열하고 단백질을 제거하기 위해 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol로 처리한 후 10 µl 10 M ammonium acetate와 2 µl glycogen, 300 µl의 100% 에탄올을 첨가한 후 13,000 rpm에서 20분간 침전시켰다. 그리고 나서, 600 µl 70% 에탄올로 헹군 후 침전물을 실온에 건조시키고 30 µl 증류수에 용해시켰다. DNA 농도와 순도는 자외선 분광광도계와 전기영동으로 확인하고 실험까지 -20°C에 보관한다.

② 전체 게놈 DNA의 증폭

추출된 100 ng의 gDNA는 Phi29 whole genomic DNA amplification 방법을 이용하여 증폭하였다. 1 µl (100 ng/µl)의 gDNA에 9 µl의 샘플 완충액 (sample buffer)을 첨가한 후, 95°C에서 3분간 가열하였다. 얼음에서 5분간 시료를 식히고 9 µl의 반응 완충액 (reaction buffer)과 1 µl의 효소 혼합물과 섞어 30°C에서 16-18시간 동안 증폭하였다. 증폭된 gDNA는 에탄올 침전기법으로 정제하였다.

③ Microarray-CGH 실험

Microarray-CGH는 CMRC protocol을 따라 진행하였다. 6 µg 증폭된 gDNA는 37°C에서 2시간 동안 DpnII를 이용하여 분해하고 효소 처리가 끝난 DNA를 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany)를 이용하여 정제하고 Bioprime labeling kit (Invitrogen, California, USA)를 이용하여 fluorescent dye (Cy-3, Cy-5)를 표지하였다. 반응이 끝나면 0.5 M EDTA (pH 8.0) 5 µl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 17 K의 cDNA microarray는 3.5X SSC, 0.1% SDS, 10 mg/mL BSA가 포함된 용액 내에서 42°C 1시간 동안 blocking을 시행하였다. 형광염료의 표지가 끝난 시료에 30 µl Human Cot-1 DNA, 2 µl poly (dA)-(dT) (10 µg/µl)와 10 µl yeast tRNA (10 µg/µl)를 첨가하고 Micocon-30 filter를 이용하여 정제하였다. 마지막 준비를 위해 혼합물에 총 90 µl의 부피가 되도록 15.3 µl의 20X SSC와 2.7 µl의 10% SDS를 첨가하

였다. 100°C에서 90초간 가열하여 변성시키고 17 K cDNA microarray에 적용시킨 후, 17 K cDNA microarray는 3.5X SSC에 의해 습도를 유지하면서 보합 작용은 65°C에서 16시간 동안 시행하였다. 보합 작용이 끝난 슬라이드는 0.2% SDS와 2X SSC에서 2-5분간, 0.1% SDS와 1X SSC, 0.2X SSC에서 2-3분, 그리고 0.05X SSC에서 2-3분간 세척하였다. 씻어낸 이후 슬라이드는 5분간 600 rpm으로 원심분리하여 말린 후, GenePix 4,000B 스캐너 (Axon instruments, Foster city, CA, USA)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

④ 결과 분석

유전자 분석을 위한 spot의 형광의 밝기는 GenePix Pro 4.0을 이용하여 배경의 강도를 제거한 spot의 밝기로 결정하였다. 얻어진 수치화된 결과는 표준화 과정과 여과과정을 시행하였고, 형광염료 각각의 log₂ (R/G) ratio를 계산하여 추후 분석에 사용하였다. Microarray-CGH결과의 이미지화는 본원 암전이연구센터에서 개발한 CAMVS (CGH Analyzer and Map Viewer using S-plus) 프로그램을 이용하였다. 발현의 차이가 나는 유전자 군을 통계학적인 방법을 이용하여 선정하고 그 유전자들의 염색체 상의 위치를 지도화하여 염색체 변이와 질병과의 관계를 아래와 같이 분석하였다.

결 과

총 27예의 산모의 임신 주수는 9-19주였으며 용모막 용모검사와 양수천자법을 시행한 환자는 각각 6예, 21예 이었다.

산전 유전 상담의 적응증은 초음파상 태아 기형을 보인 경우가 4예, 삼중 표지자 선별검사 상 양성인 경우가 10예, 노산 8예, 기왕력 상 불량한 임신 예후를 보인 경우가 5예 였다.

세포 유전학 검사 결과와 FISH 법과 cDNA microarray CGH의 결과를 비교한 총 27예에서 모두 결과가 일치하였으며, 염색체 이상을 나타낸 예는 7예

로서 21번 삼배성 염색체 이상이 3예 이었고, 18번 삼배성 염색체 이상이 1예 이었으며, 45,X, 46,X,i(Xq) 및 과잉 Y 염색체 (47,XYY) 예가 각각 1예 였다 (Table 1).

정상 염색체의 변화정도를 결정하기 위해 10예의 46,XX, 46,XY 염색체를 가진 정상 임파구를 이용해 microarray-CGH를 시행하였으며, 정상 조직에서의 염색체별 변화는 $-0.3-0.3 \log_2 (R/G)$ ratio 범위 내에 있었으며, 정상 조직에서의 변화 정도를 이용하여 genomic DNA의 증폭 및 결손 등을 검사하였다 (Fig. 1).

1. 정상 여자 및 남자 태아에서의 microarray-CGH

세포 유전학 검사상 46,XX의 정상염색체 소견을 보이는 태아의 양수 및 용모막 용모에서 얻은 gDNA를 세포 유전학 검사상 46,XY 및 46,XX의 정상 염색체 소견을 보인 태반조직의 gDNA와 각각 sex-matched, sex-mismatched 실험방법을 이용하여 비교하였다. 정상 태아의 46,XX의 gDNA를 정상외 46,XX 태반조직의 gDNA와 실험한 경우는 $\log_2 (R/G)$ ratio가 $-0.3-0.3$ 내에서 일정하게 유지된 반면 (Fig. 2A, sex-matched

Table 1. Comparison of conventional cytogenetic analysis with microarray-CGH and FISH Associated clinical characteristics of patients. (CV: Chorionic villi, AF: Amniotic fluid, PH: Past history, US: Ultrasonography)

Case no.	Sample	Gestational age	Indication	Cytogenetic analysis	cDNA array CGH	FISH
1	CV	10	Elderly	46,XX	46,XX	46,XX
2	CV	9	PH or Down syndrome	46,XX	46,XX	46,XX
3	AF	19	Elderly	47,XY,+21	47,XY,+21	47,XY,+21
4	CV	10	Preulons IUFD	46,XX	46,XX	46,XX
5	CV	9	Elderly	46,XY	46,XY	46,XY
6	CV	10	Elderly	46,XY	46,XY	46,XY
7	AF	17	Heart anomaly on US	47,XX,+21	47,XX,+21	47,XX,+21
8	AF	18	Elderly	46,XY	46,XY	46,XY
9	AF	17	Fetal ascites on US	45,X	45,X	45,X
10	AF	18	Cystic hygroma on US	47,XX,+18	47,XX,+18	47,XX,+18
11	CV	11	Preulons IUFD	46,XY	46,XY	46,XY
12	AF	17	Elderly	46,XX	46,XX	46,XX
13	AF	17	Elderly	46,XY	46,XY	46,XY
14	AF	18	Elderly	46,XY	46,XY	46,XY
15	AF	17	FH or Down syndrome	46,XY	46,XY	46,XY
16	AF	18	Renal cyston US	46,XY	46,XY	46,XY
17	AF	18	Triple test postive	46,XX	46,XX	46,XX
18	AF	17	Triple test postive	46,XI(Xq)	46,XI(Xq)	46,XI(Xq)
19	AF	18	Triple test postive	46,XX	46,XX	46,XX
20	AF	18	Triple test postive	46,XY	46,XY	46,XY
21	AF	19	Triple test postive	46,XX	46,XX	46,XX
22	AF	18	Triple test postive	46,XY	46,XY	46,XY
23	AF	17	Triple test postive	47,XX,+21	47,XX,+21	47,XX,+21
24	AF	19	Triple test postive	46,XY	46,XY	46,XY
25	AF	17	Triple test postive	46,XY	46,XY	46,XY
26	AF	17	Triple test postive	46,XY	46,XY	46,XY
27	AF	17	Triple test postive	47,XYY	47,XYY	47,XYY

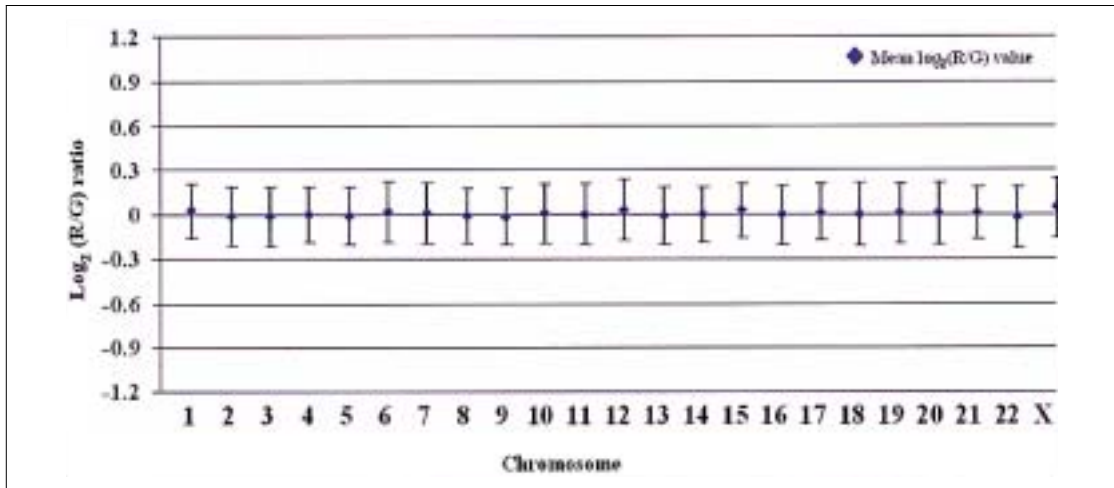


Fig. 1. Mean \log_2 (R/G) ratio of each chromosome in 6 cases of normal female (46,XX) samples with microarray-CGH. All autosome and sex-chromosomal genes were within $-0.3-0.3 \log_2$ (R/G) ratio.

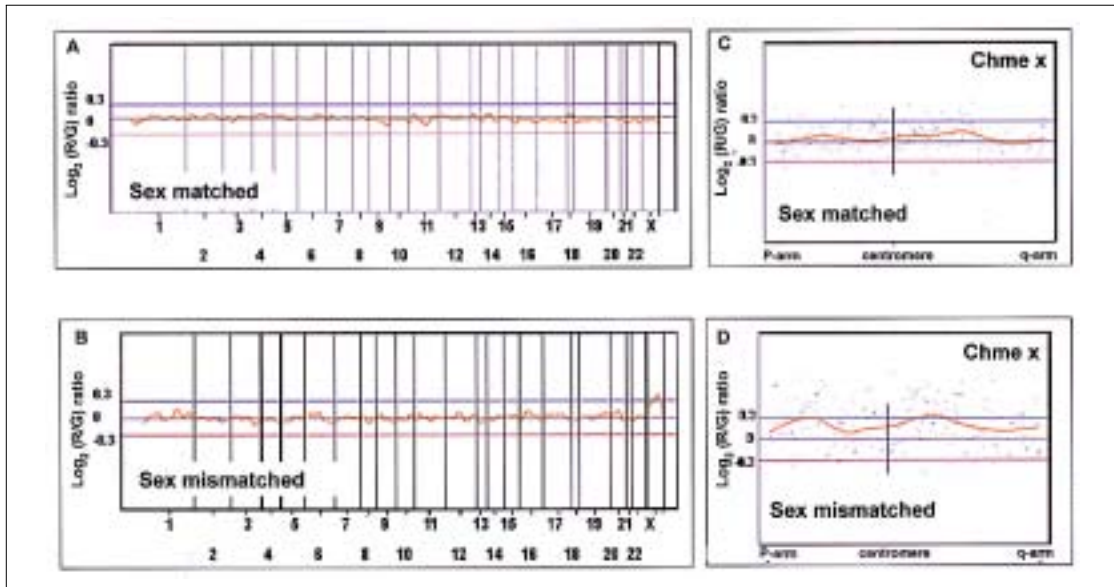


Fig. 2. Genetic alteration patterns of microarray-CGH with normal samples using CAMVS (CGH Analyzer and Map Viewer using S-Plus).

- A. Genetic pattern with all chromosomal genes in a sex- matched (46,XX vs. 46,XX) experiment, showing no genetic alterations.
- B. Genetic pattern with all chromosomal genes in a sex- mismatched (46,XX vs. 46,XY) experiment, showing single copy amplification of X chromosome.
- C. \log_2 (R/G) ratio of each X chromosomal gene in a sex- matched (46,XX vs. 46,XX) experiment, showing no genetic alterations.
- D. \log_2 (R/G) ratio of each X chromosomal gene in a sex- mismatched (46,XX vs. 46,XY) experiment, showing the amplification in more than 50% of X chromosome genes. Yellow line displays the lowest line of \log_2 (R/G) ratio of all genes. ·denotes each gene.

양영호 외 9인. cDNA 미세배열 비교게놈교잡법을 이용한 염색체 이상 질환의 최신 고속 산전 유전 진단

실험) 46,XY의 정상 태반조직의 gDNA와 실험한 경우는 X 염색체에서 \log_2 (R/G) ratio는 0.3 이상 증가하고, Y 염색체에서 \log_2 (R/G) ratio는 -0.3 이상 감소한 관측치를 보였다 (Fig. 2B, sex-mismatched 실험). 이러한 결과는 46,XY 태아에서 얻은 test DNA와 reference DNA를 서로 반응시킨 경우에도 동일하게 나타났으며 이를 통해 본 검사의 신뢰성을 검증하였다.

2. 3예의 21번 삼배성 염색체 태아에서의 microarray-CGH

3예의 21번 삼배성 염색체 태아에서 세포 유전학 검사 결과는 2예의 47,XX,+21과 1예의 47,XY,+21이었으며,

이들의 microarray-CGH의 결과는 3예 모두 21번 염색체에서 \log_2 (R/G) ratio 0.3 이상으로 증가하였으며 (Fig. 3A, 4A, Fig. 3B, 4B), FISH 검사 (Fig. 3C, 4C)를 통해서 이들이 21번 삼배성 염색체임을 확인하였다.

3. 1예의 18번 삼배성 염색체 태아에서의 microarray-CGH

증례 10의 경우 세포 유전학 검사 결과는 47,XX,+18로 18번 삼배성 염색체였으며 microarray-CGH결과 역시 18번 염색체에서 \log_2 (R/G) ratio 0.3 이상 증가한 소견을 보였으며 (Fig. 5A, 5B), FISH 검사 (Fig. 5C)를 통해 18번 삼배성 염색체임을 확인하였다.

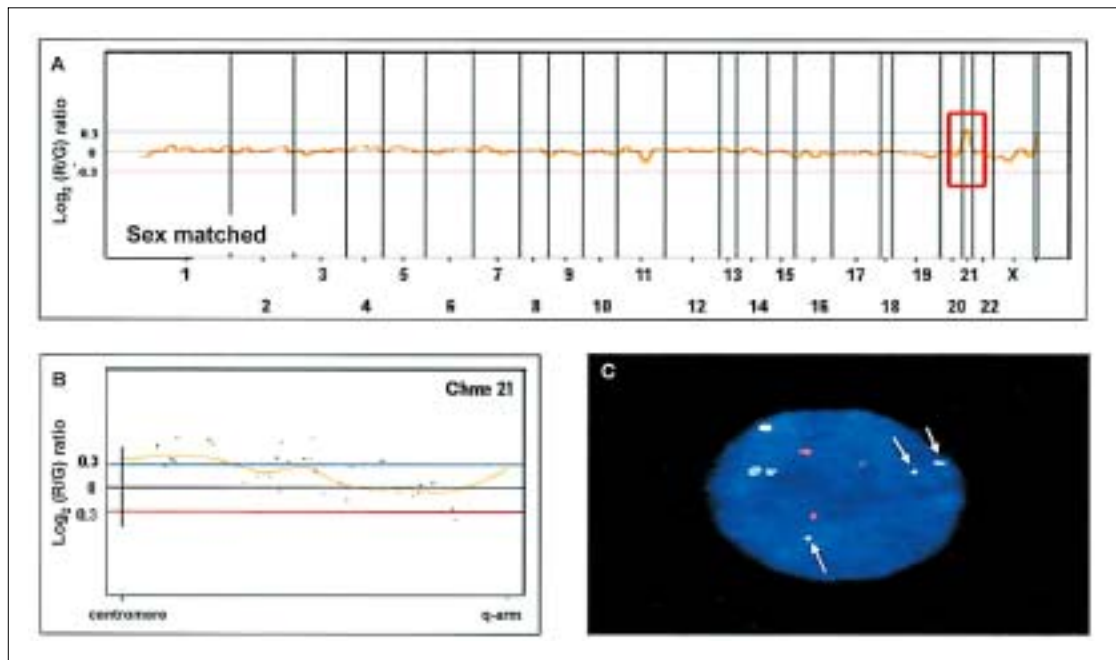


Fig. 3. Comparison of microarray-CGH and FISH in a male patient with trisomy 21 (case no. 11), Down Syndrome. A. Genetic pattern with all chromosomes using CAMVS, showing the amplification of 21 chromosome. B. Genetic pattern of 21 chromosome located genes. Over 80% genes, located in 21q11.1-21q21.3, showed an abnormal genetic alterations, while 21q22.11-telomere located genes showed no genetic alterations. C. FISH analysis showed a trisomy of 21 chromosome. (Yellow line, lowest line; ·, each gene; white arrow, 21 chromosome)

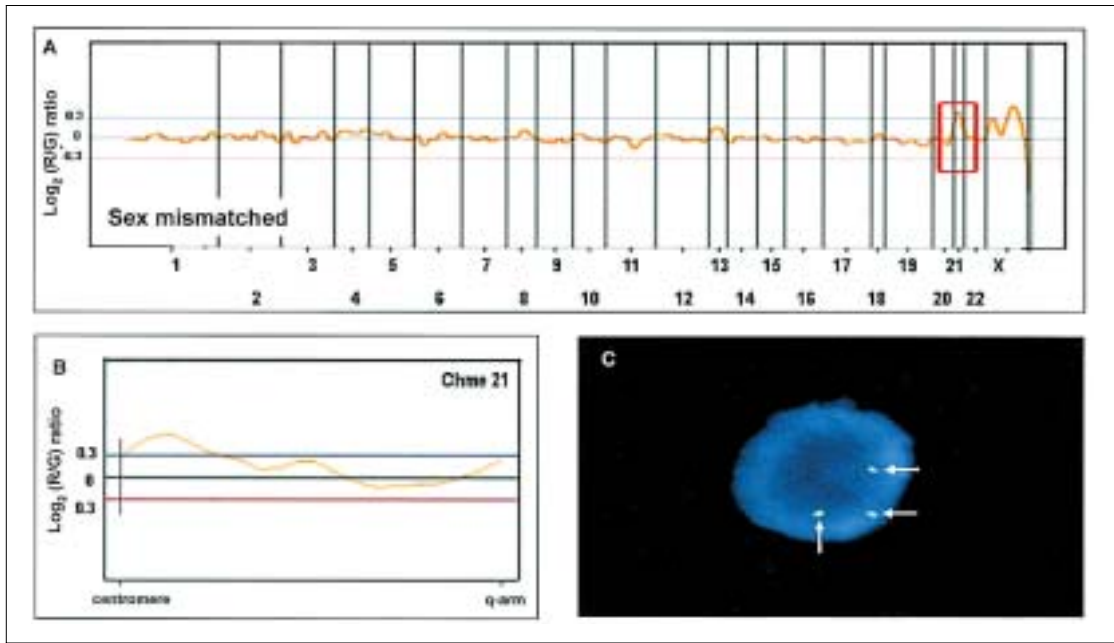


Fig. 4. Comparison of microarray-CGH and FISH in a female patient with trisomy 21 (case no. 8), Down Syndrome. A. Genetic alteration pattern with all chromosomes using CAMVS, showing the amplifications of 21 chromosome and X chromosome. A single copy amplification of X chromosome is due to the usage of sex-mismatched placenta (XY) as a reference sample. B. Genetic pattern of 21 chromosome located genes. Over 87% genes, located in 21q11.1-21q21.3, showed an abnormal genetic alterations and 10% of 21q22.11-telomere located genes showed amplifications. C. FISH analysis showed a trisomy of 21 chromosome. (Yellow line, lowest line; ·, each gene; white arrow, 21 chromosome)

4. 45,X 태아에서의 microarray-CGH

증례 9의 태아에서 X 염색체의 $\log_2 (R/G)$ ratio는 46,XX의 정상 염색체 태아의 X 염색체와 비교해 0.3 감소한 Microarray-CGH 관측치를 보였으며 (Fig. 6A, 6B), 이를 바탕으로 45,X로 추정하였고, FISH 검사 결과 (Fig. 6C)를 통해 이를 확인하였다.

5. 46,X,i(Xq) 태아에서의 microarray-CGH

증례 18의 태아에서는 Microarray-CGH 결과 X 염색체의 장완은 $\log_2 (R/G)$ ratio가 0.3 증가한 반면 단완은 $\log_2 (R/G)$ ratio가 0.30 감소한 소견을 보였으며

(Fig. 7A, 7B) 세포유전학 검사 결과 46,X,i(Xq)로 두 검사결과가 일치하였으며, FISH 결과 (Fig. 7C)를 통해서 이를 확인할 수 있었다.

6. 과잉 Y 염색체 (47,XYY) 태아에서의 microarray-CGH

증례 27의 경우에서 reference로 46,XX를 이용하여 시행한 검사결과 Y염색체의 $\log_2 (R/G)$ ratio가 0.6으로 증가한 소견을 보여 (Fig. 8A) Y 염색체가 2개로 증가한 과잉 Y 염색체 (47,XYY)일 것으로 추정하였고, FISH 검사 (Fig. 8B)를 통해 이를 확인하였다.

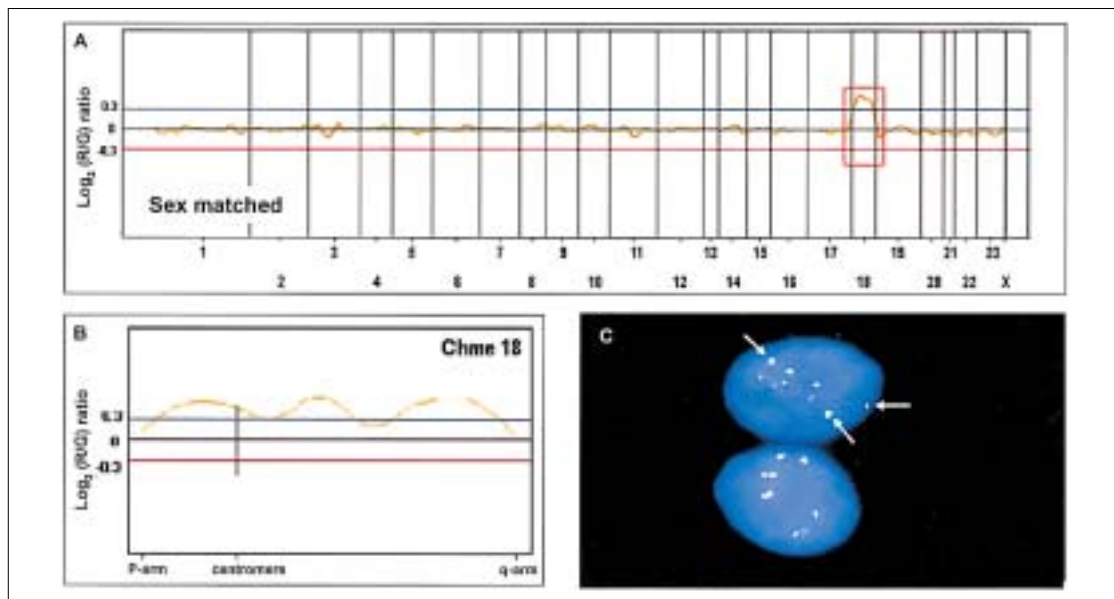


Fig. 5. Comparison of microarray-CGH and FISH in a female patient with a trisomy 18 (case no. 10), Edward's Syndrome.

A. Genetic alteration pattern with all chromosomes using CAMVS, showing the amplification of 18 chromosome.

B. Over 70% genes, which are located in 18 chromosome, showed an abnormal genetic alterations.

C. FISH analysis showed a trisomy of 18 chromosome.

(Yellow line, lowest line; ; each gene; white arrow, 18 chromosome)

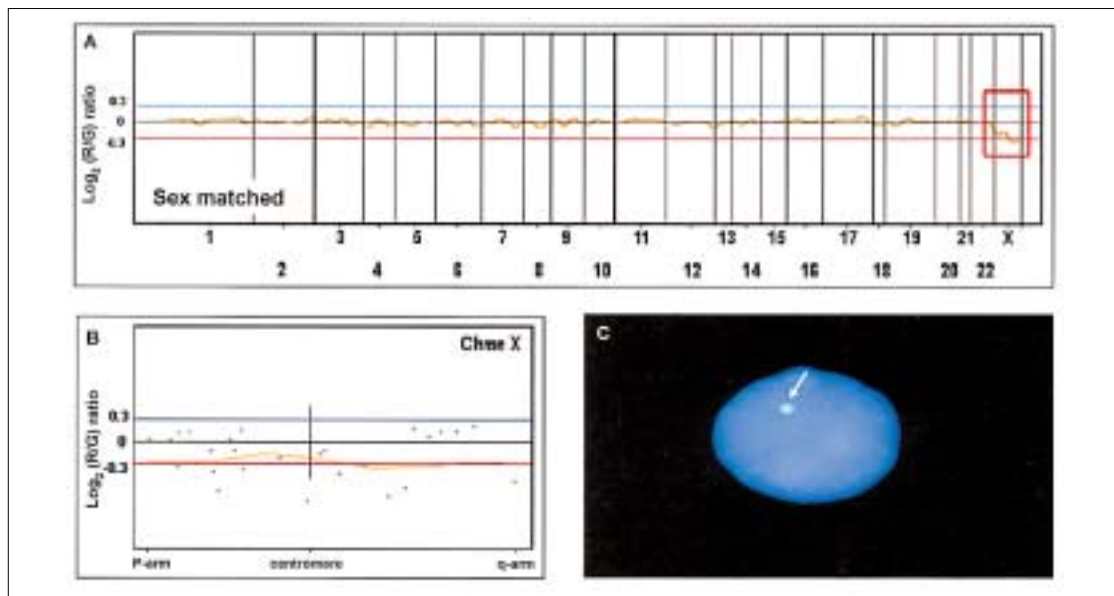


Fig. 6. Comparison of microarray-CGH and FISH in a patient with 45,X (case no. 9), Turner syndrome.

A. Genetic alteration pattern with all chromosomes using CAMVS.

B. Over 61% genes, which are located in X chromosome, showed decreased \log_2 (R/G) ratios.

C. FISH analysis showed a monosomy of X chromosome.

(Yellow line, lowest line; ; each gene; white arrow, X chromosome)

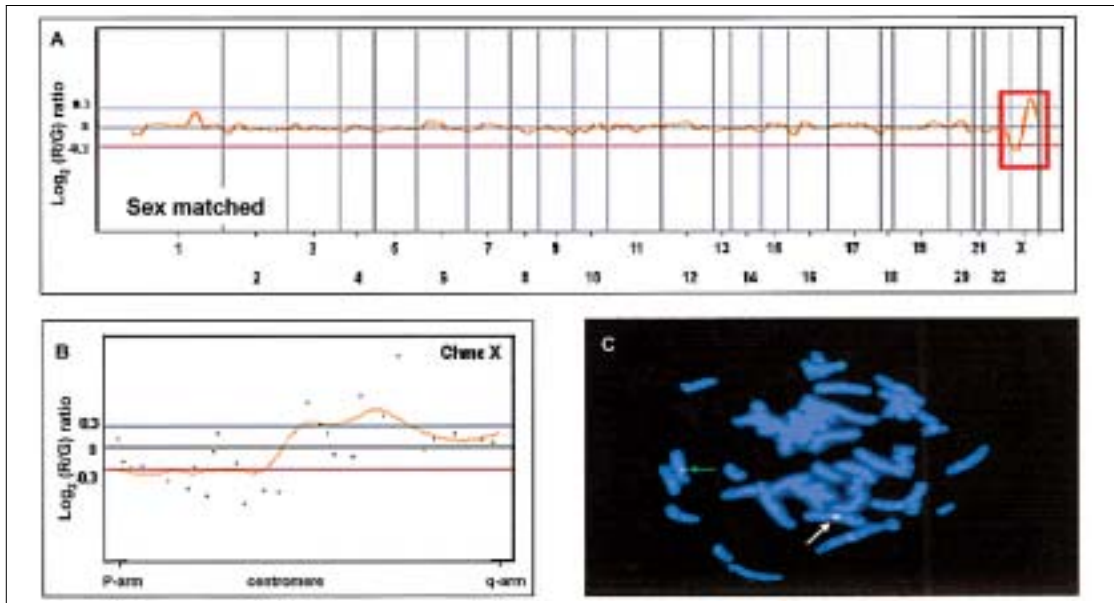


Fig. 7. Comparison of microarray-CGH and FISH in a patient with 46,X,i(Xq) (case no. 18).
 A. Genetic alteration pattern with all chromosomes using CAMVS, showing p-arm deletion and q-arm amplification of X chromosome.
 B. Genetic pattern of X chromosome genes, p-arm located genes showed deletions and q-arm located genes showed amplifications.
 C. FISH analysis of X chromosome showed a deletion of p-arm and an amplification of q-arm.
 (yellow line, lowest line; ; each gene; white arrow, iso X chromosome; green arrow, normal X chromosome)

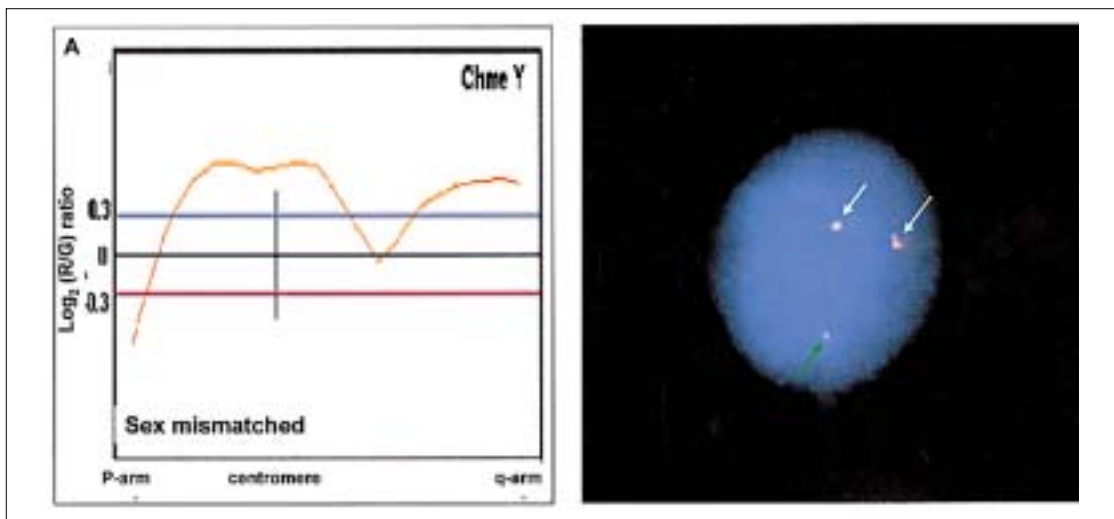


Fig. 8. Comparison of microarray-CGH and FISH in a patient with 47,XXY (case no. 27).
 A. Genetic pattern of Y chromosome using CAMVS, showing the amplification of Y chromosome.
 B. FISH analysis showed an amplification of Y chromosome.
 (Yellow line, lowest line; ; each gene; white arrow, Y chromosome; green arrow, X chromosome)

고 찰

High throughput method로서 최근 개발되어 많은 연구에 사용되고 있는 microarray 기법은 유리판 위에 많은 수의 유전자들을 점적하여 한번의 실험으로 수천 수만의 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다. 유리판 위에 점적하는 분자의 종류는 매우 다양하여 cDNA, oligonucleotide, bacterial artificial chromosome (BAC), 단백질 등을 올려놓을 수 있으며 그 종류에 따라서 단순히 유전자의 발현 정도뿐만 아니라 돌연변이의 확인, Single nucleotide polymorphism (SNP) 발굴, 질병의 진단과 예후를 예측할 수 있는 생물학적 표지자의 선정 등에 다양하게 이용되고 있다. 이 기법의 발달로 1-2일의 짧은 기간에 수천에서 수만 개의 유전자 발현을 평가할 수 있으며 비용효과 (cost effectiveness)가 좋고 상대적으로 접근이 용이하다는 장점 때문에 암의 발병기전, 진단 및 전이와 관련된 유전 인자, 암의 치료 및 예후 판정과 관련된 연구와 바이러스 질환의 진단 및 치료효과와 관련된 유전자 발현의 연구 등에 널리 사용되고 있다.¹³⁻¹⁷

태아 염색체 이상의 산전 진단 방법 가운데 고전적인 세포 유전학적 핵형 분석은 대부분의 염색체 이상을 판별할 수는 있지만 세포를 배양하는데 약 2주간의 시간이 필요하며 미세 결손 (microdeletion)과 같은 염색체 내의 미세한 변화는 감지할 수 없다는 단점이 있고, FISH 기술은 특정 탐침을 이용하기 때문에 미세 결손과 같은 염색체 이상을 검진할 수는 있지만 한번의 실험으로 전체 염색체를 관찰하는 것은 불가능하다. 또한 cCGH는 전체 염색체의 수적 구조적 변화를 볼 수는 있지만 염색체의 형광 반응을 현미경으로 직접 관찰해야 하기 때문에 해상력에 한계가 있다. 이에 반해 microarray 기법을 CGH에 도입한 microarray CGH 기법은 유리판 위에 점적하는 분자의 종류에 따라 연구자가 원하는 충분한 해상도를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 자동화가 보다 용이하고 CGH의 장점인 genome-wide screening도 동시에 실현할 수 있는 방법이다.

이에 본 저자들은 유리판 위에 cDNA를 점적한 cDNA

microarray-CGH를 이용하여 양수 및 용모막 용모에서 추출한 DNA로 태아 산전 염색체 이상을 진단하기 위한 연구를 실시하였다. 세포 유전학적 검사는 세포 배양 기간을 통해 검사 결과를 얻기까지 평균 15일이 소요된 데 반해 cDNA microarray-CGH를 시행하는 데는 약 2일 정도의 기간이 소요되었다. 또한 cDNA microarray-CGH를 이용해 7예의 홀배수체 (aneuploid) 태아를 모두 정확히 진단할 수 있었다.

cDNA microarray-CGH를 이용한 산전 태아 염색체 진단에 대한 연구가 많지 않아 본 저자들의 연구 결과를 다른 연구자들의 결과와 객관적으로 비교하기는 어려우나 Paige 등은 양수의 상청액 (supernatant)에서 얻어낸 cell free fetal DNA를 이용하여 microarray-CGH를 통한 산전 태아 염색체 진단 연구에서 4예의 염색체 이상 태아 -3예의 21번 삼배성 염색체와 1예의 터너증후군 (45,X)-를 정확히 진단하였다.¹⁸ 그러나 이들의 연구는 양수 상청액의 cell free fetal DNA를 이용하여 연구를 시행하였기 때문에 72예의 검체 가운데 단 17예에서만 검체를 얻을 수 있었던 반면 본 연구자들은 양수 및 용모를 직접 이용하여 DNA를 얻었으며 DNA 증폭을 통해 실험 예 모두에서 원하는 양의 DNA를 얻을 수 있었다.

Buckley 등은 22번 염색체에 있어서 microarray를 사용함으로써 DiGeorge syndrome과 neurofibromatosis 2를 포함한 질병에서 22번 염색체의 미세 결손 및 증폭 등을 정확히 진단하였고,¹⁹ Schaeffer 등도 41예의 자연 유산된 임신 산물에 대해 cDNA microarray-CGH를 시행하여 세포 유전학 검사에서 발견하지 못한 염색체의 미세 이상을 발견하였다.²⁰ Shaw-smith 등은 학습 장애나 정신 지체와 dysmorphic feature가 동반된 환자를 대상으로 cDNA microarray-CGH를 시행하여 세포 유전학적 검사로는 발견하지 못한 미세 염색체 결손 및 증폭을 보고하였다.²¹ Microarray CGH는 이처럼 유리 슬라이드 위에 점적하는 물질에 따라 연구자가 해상도를 조절할 수 있으며 세포 유전학 검사에서 발견할 수 없는 염색체의 미세 결손 및 증폭 등의 미세 이상을 진단할 수 있다고 보고되고 있다. 그러나 본 연구 대상

에서는 cDNA microarray-CGH 상에 세포 유전학 검사에서 발견할 수 없는 미세 이상이 발견된 예가 없었다.

Microarray-CGH는 염색체의 미세 결손 외에도 염색체의 구조적인 이상 및 수적 이상도 진단할 수 있다. Albertson 등은 non reciprocal translocation을 포함한 염색체 이상에서 microarray CGH의 유용성을 보고하였고,²² Gunn 등도 18번 염색체의 장완에 결손이 의심되는 환자에서 세포 유전학적 방법으로 발견하지 못한 18번 염색체와 4번 염색체의 장완 간의 cryptic unbalanced translocation을 확인하였다.²³ 본 저자들도 증례 18의 46,X,i(Xq) 태아에서 cDNA microarray-CGH 결과 상 X 염색체의 장완은 형광 비율이 0.3 증가한 반면 단완에서는 형광 비율이 0.3 감소한 것을 확인하였으며 이를 통해 46,X,i(Xq)를 추정할 수 있었고 FISH와 세포유전학 검사를 통해 이를 최종적으로 확인하였다. 또한 증례 27의 경우에서 Y 염색체의 형광 비율이 reference (46,XX)에 비해 0.6 증가한 것을 통해 파인 Y 염색체 (47,XYY)로 추정하였고 FISH 및 세포 유전학 검사를 통해 이를 확인하였다. 46,XY를 test로 하고 46,XX를 reference로 하여 cDNA array CGH를 검사한 결과와 Case no. 27의 47,XYY만 갖고 특정 염색체의 수에 따라 fluorescence ratio가 일정하게 증가한다고 일반화 하기는 어려우나, Pollack 등이 45,X, 46,XX, 47,XXX 등 다양한 수의 X 염색체를 갖고 있는 세포주를 이용하여 cDNA microarray-CGH를 시행하여 X 염색체의 수에 따라 형광 비율이 일정하게 증가함을 확인한 것에 비추어 볼 때 본 연구의 결과와 서로 일치한다고 할 수 있겠다.¹⁰

유전병을 일으키는 염색체 이상은 다배수체, 홀배수체, 균형 전좌 (balanced translocation), 증폭, 결손과 미세 결손 등이 있다. Microarray-CGH는 이 가운데 이미 예시한 것처럼 대부분의 진단에 이용될 수 있다. 그러나 microarray CGH의 실험 원리상 다배수체와 균형 전좌의 경우에는 그 진단이 어려운 단점이 있다. 하지만 다배수체 태아의 경우는 정상적으로 출생할 확률이 매우 낮고, 균형 전좌를 갖고 태어나는 태아의 경우

에도 태아의 출생 시 그 표현형에 미치는 영향이 적기 때문에 microarray-CGH를 태아의 산전 염색체 진단이나 유전병의 진단기술로 이용하는데 큰 장애가 되지는 않으리라 생각된다.

그러나 앞서 열거한 많은 장점들에도 불구하고 cDNA microarray-CGH의 높은 해상도로 인해 이전에는 발견하지 못했던 미세 염색체 이상을 발견하더라도 그 임상적 중요성이 알려져 있지 않은 상태에서 이들을 검사자가 판독하는데 많은 어려움이 따를 것으로 생각되며 검사자의 주의도 필요할 것이다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 지속적인 연구를 통해 미세결손과 출생 후 태아의 예후에 관한 자료의 축적이 필요하며 염색체 이상을 정확하게 진단하기 위한 진단 지침이 마련되어야 할 것이다. 보다 많은 환자를 대상으로 한 지속적인 연구와 자료의 축적이 이루어진다면 cDNA microarray-CGH는 보다 확고한 태아 산전 유전 진단 방법으로 자리잡게 될 것이며 이전의 세포 유전학적 방법으로는 발견할 수 없었던 미세 염색체 이상을 찾아내고 추가적인 정보를 얻을 수 있으며 FISH 등의 추가적인 실험의 필요성도 사라지며 비용, 시간, 인력 등의 절감효과 등도 가져올 수 있을 것이다. 이 검사 방법을 통해 미세한 유전자 이상까지 찾아냄으로써 앞으로의 산전 유전 진단 발전에 기여할 수 있다.

참고 문헌

1. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Chapter 36 Genetics. Williams Obstetrics. 21st ed. McGraw-Hill companies; 2001, p939-71.
2. Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M. Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: Data from the New York City study. In Human Embryonic and Fetal Death, Porter IH, Hook EB(eds). New York, Academic Press; 1980, 261-87.
3. Fantel AG, Shepard TH, Vadheim-Roth C, Stephens TD, Coleman C: Embryonic and fetal phenotypes: Prevalence and other associated factors in a large study of spontaneous abortion. In Human Embryonic and Fetal Death, Porter IH, Hook EB(eds). New York, Academic press; 1980, 71-87.
4. Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM. Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. JAMA 1983; 249: 2034-6.
5. 양영호, 강지용, 양은석, 장시영, 조재성, 박용원 등. 유전질환

- 진단에 있어서의 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)법의 임상적 유용성. 대한산부회지 2002; 45: 1016-24.
6. 양영호, 김성훈, 김세광, 박용원, 조재성, 김인규 등. 모체의 말초 혈액에 존재하는 태아 세포 분리에 의한 새로운 기형아 진단 -microdissection에 의한 CGH 기법의 사용. 대한산부회지 2002; 45: 213-9.
 7. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, et al. Matrix based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20 (4): 399-407.
 8. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-11.
 9. Hughes TR, Roberts CJ, Dai H, Jones AR, Meyer MR, Slade D, et al. Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat Genet* 2000; 25: 333-7.
 10. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes Using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23: 41-6.
 11. Sudbrak R, Wiczorek G, Nuber UA, Mann W, Kirchner R, Erdogan F, et al. X chromosome specific cDNA arrays: identification of genes that escape from X-inactivation and other applications. *Hum Mol Genet* 2001; 10(1): 77-83.
 12. Gross SJ, Ferreira JC, Morrow B, Dar P, Fnke B, Khabele D, et al. Gene expression profile of trisomy 21 placentas: A potential approach for designing noninvasive techniques of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 457-62.
 13. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
 14. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, et al. Carcinoma: association with liver cirrhosis. *Oncogene* 2003; 22(19): 3007-14.
 15. Kraus J, Pantel K, Pinkel D, Albertson DG, Speicher MR. High resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 159-66.
 16. Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsuhashi S, et al. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumor progression and prognosis. *J Pathol* 2003; 200(5): 640-6.
 17. Kawaguchi K, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Shirota Y, Kobayashi K. Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1701-4.
 18. Larrabee PB, Johnson KL, Pestrova E, Lucas M, Wilber K, Leshane ES, et al. Microarray analysis of cell free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 485-91.
 19. Buckley PG, Mantripragada KK, Benetkiewicz M, Tapia-Paez I, Diaz De Stahl T, Rosenquist M, et al. A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet* 2002; 11(25): 3221-9.
 20. Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Martin CL. Comparative genomic hybridization - Array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1168-74.
 21. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridization (array CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J med Genet* 2004; 41: 241-8.
 22. Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum mol genet* 2003; 12: 145-52.
 23. Gunn SR, Mohammed M, Reveles XT, Viskochil DH, Palumbos JC, Johnson-Pais TL, et al. Molecular characterization of a patient with central nervous system dysmyelination and cryptic unbalanced translocation between chromosomes 4q and 18q. *Am J Med Genet* 2003; 120A: 127-35.

= 국문초록 =

목적: 산전유전진단에 사용되는 염색체핵형 검사는 2-3주간 요하고, FISH는 특이한 탐침을 이용하므로 동시에 여러 염색체 이상을 검사할 수 없다. 최근에 개발된 cDNA microarray-based CGH는 high resolution과 sensitivity를 보여주어 미세한 염색체 이상도 짧은 시간 (3-4일)에 검사할 수 있다. 이에 본 연구는 최신 novel 기법인 Microarray-CGH를 이용 산전유전진단에 있어 이의 유용성을 규명하고자 하였다.

연구 방법: 본원에 내원한 산전유전검사 및 유전상담이 적용되는 임신부 27예에서 양수 21예와 용모막용모 6예를 채취하였다. 채취한 샘플에서 genomic DNA를 추출 증폭 후, test (genomic DNA)를 Cy3로, reference (genomic DNA)를 Cy5로 표지 후 cDNA microarray에 hybridization 후, axon scanner로 분석하고 이를 염색체 핵형, FISH 결과와 비교 분석하였다.

결과: Microarray-CGH를 시행한 27예에서 20예는 정상이었고, 7예는 염색체 이상으로서 3예 trisomy 21, 1예 trisomy 18이었고, 1예 45,X, 1예 46,X,i(Xq), 그리고 1예의 47,XYY로서 염색체 핵형 및 FISH 분석 결과와 일치하였다.

결론: cDNA 미세배열 비교계놈교잡법을 이용한 산전유전진단법은 빠르고 정확한 획기적인 방법으로 임상적으로 유효하게 이용할 수 있을 것으로 사료되며, 추후 더 많은 연구를 요한다.

중심단어: cDNA 미세배열 비교계놈교잡법, 산전유전진단, 염색체이상
