KISEP Original Articles
소아 · 청소년정신의학 제11권 제1호 2000
Korean J Child & Adol Psychiatr 11 : 3~15

자폐장애 환자에서 *FMR-1* 유전 삼염기 반복의 분자생물학적 분석

MOLECULAR BIOLOGIC ANALYSIS OF *FMR-1* GENE TRINUCLEOTIDE REPEATS IN AUTISTIC PATIENTS

곽호순* · 정철호**† · 전효진*** · 장은진**
김희철** · 김정범** · 박영남**

Ho Soon Kwak, M.D.,* Chul-Ho Jung, M.D.,† Hyo-Jin Chun, M.D.,***
Eun-Jin Chang, M.A., Hee-Cheol Kim, M.D.,****
Jung-Bum Kim, M.D., Young Nam Park, M.D.****

연구목적 : 자폐장애의 원인을 유전학적으로 규명하려는 연구가 시도되고 있으며, 그 중 fragile X 증후군과의 연관성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Fragile X 염색체(Xq27.3)는 세포유전학적 방법으로 증명할 수 있으나 검사에 많은 제약과 단점이 있으므로, 본 연구에서는 보다 신뢰성이 높은 분자생물학적 방법으로 *FMR-1* 유전자내 CGG 삼염기 반복부위를 분석하여 자폐장애와 fragile X 증후군의 연관성을 규명하고자 하였다.

방 법 : 자폐장애 환아(99명)와 정상대조군(8명)을 대상으로 *FMR-1* 유전자의 CGG 반복배열 부위를 sense와 antisense primer를 이용하여 PCR법으로 분석하였으며, 동시에 세포유전학적 검사도 시행하였다. PCR 분석에서 CGG 반복수가 50 이상인 경우에 대해서는 StB12.3 혹은 Pfxa3 probe를 이용한 Southern blot hybridization으로 확인하였다.

결 과 : *FMR-1* 유전자의 CGG 반복배열에 대한 PCR 분석 결과 CGG 삼염기의 반복배열의 수는 자폐장애 환자군과 정상대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.207). 자폐장애 환자에서 CGG 반복수가 50회 이상인 조기변이(premutation) 환자가 2명 있었으나 Southern blot hybridization 결과 완전변이(full mutation)로 판정할 수 있는 경우는 없었다. 세포유전학적 검사에서 환자군 모두에서 정상 핵형을 나타내었으며 fragile X 염색체는 확인되지 않았다.

결 론 : 이상의 결과에서 자폐장애 환자가 *FMR-1* 유전자의 CGG 삼염기 반복부위 이상, 즉 fragile X 염색체 이상을 동반하지 않았음을 증명할 수 있었다. 이는 fragile X 증후군을 자폐장애의 직접적인 원인이라고 보기에는 어려움이 있음을 시사한다.

중심 단어 : 자폐장애 · *FMR-1* 유전자 삼염기 반복 · 분자생물학적 분석.

*곽호순병원 *Kwak Ho Soon Mental Hospital, Taegu*
**계명대학교 의과대학 정신과학교실 및 의과학연구소 *Department of Psychiatry, Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science, Taegu*
***계명대학교 의과대학 임상병리학교실 및 의과학연구소 *Department of Clinical Pathology, Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science, Taegu*
†*Corresponding author*

서 론

자폐장애의 원인은 Kanner[1] 이후 현재까지 많은 연구에도 불구하고 분명히 밝혀지지 않았지만[2] 기질적 요인[3], 생화학적 요인[4], 유전적 요인[5] 등의 원인이 제시되고 있다. 이들 중 유전적 요인에 대한 연구는 염색체의 이상과 연관된 자폐장애가 보고되면서[6] 활발히 진행되고 있으며, 특히 자폐장애와 임상양상이 유사한 fragile X 증후군과의 연관성에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

자폐장애와 fragile X 증후군의 연관성에 대한 지금까지의 연구들은 대부분 염색체를 검사하는 세포유전학적 방법을 이용하였는데, 이 방법은 보인자의 색출이 불가능하며 조기변이(premutation)의 감지가 어렵다. 또한 위음성의 가능성이 높고 사용하는 약제인 methotrexate(MTX)의 영향으로 세포분열이 감소되고 충분한 중기세포(metaphase cell)를 얻지 못하는 등의 단점이 있다[7]. 따라서 보다 정확하고 객관적인 fragile X 증후군의 진단 방법이 필요하게 되었다. 최근 분자생물학적 연구가 발전함에 따라 fragile X 증후군의 원인 유전자가 Fragile Mental Retardation-1 gene(이하 *FMR-1* 유전자)이라는 것이 밝혀졌으며, 이 유전자가 클론됨으로써 nucleic acid technology를 이용한 분자생물학적 진단 방법이 이용되기 시작하였다[8]. 따라서 *FMR-1* 유전자의 exon Ⅰ에는 보통 cytosine, guanine, guanine(CGG) 삼염기의 반복배열로 이루어져 있는데, 이 삼염기의 반복배열이 200repeats 이상으로 길면 상부의 promotor region이 메칠화 되어 *FMR-1* 유전자의 mRNA가 전사되지 않아 유전자가 발현되지 않는다[8]. 따라서 *FMR-1* 유전자내의 p(CGG)n의 크기나 promotor의 메칠화 유무를 분자생물학적인 방법으로 증명하면 fragile X 증후군을 정확하게 진단할 수 있으며 이 방법은 신뢰도가 매우 높은 것으로 알려져 있다[9].

또한 자폐장애에서 fragile X 증후군의 존재 유무에 큰 관심을 가지는 이유는 현재까지 자폐장애의 뚜렷한 치료방법이나 예방법이 없는 상태에서 새로운 치료방법을 개발하고 예방법을 모색하는데 도움이 될 수 있기 때문이다. 즉, fragile X 증후군이 자폐장애를 일으키는 중요한 원인의 하나로 확인된다면 산전검사로 양수세포 배양이나 태아 혈청과 융모막의 융모세포를 배양하여 fragile X 증후군을 미리 진단하여 예방할 수도 있을 것이다[10]. 또한 fragile X 증후군이 동반된 자폐장애 환자에게 엽산을 투여하거나[11], 다량의 비타민을 투여하는 방법[12] 등을 통해 치료를 시도해 볼 수 있을 것이다.

따라서 이 연구의 목적은 *FMR-1* 유전자내의 p(CGG)n의 크기나 promotor의 메칠화 유무를 밝히는데 가장 신뢰도가 높은 것으로 알려져 있는 분자생물학적 방법을 이용하여, 자폐장애 환자에서 fragile X 염색체의 빈도와 양상을 확인함으로써 자폐장애 환자와 fragile X 증후군 사이의 연관성에 대해 규명하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1997년 1월부터 1998년 1월까지 계명대학교 동산의료원 정신과에 내원한 환아들 중 DSM-Ⅳ 진단기준에 의해 자폐장애로 진단된 환아 37명과, 1999년 6월 대구 소재 특수학교에 재학 중인 아동들 중에서 자폐장애로 진단된 62명을 합쳐 모두 99명을 연구 대상으로 하였고, 대조군은 자폐장애가 아닌 아동 8명을 대상으로 하였다. 자폐장애 환자군은 남자 83명, 여자 16명이었으며 평균연령은 107.03±49.13개월이었다(Table 1). 정상 대조군은 남자 4명, 여자 4명이고 평균연령은 115.67±59.77개월이었다.

2. 방 법

말초혈액 10ml를 heparin으로 처리한 시험관에 채취하였다. 이중 8ml는 DNA를 추출하여 PCR 및 Southern blot analysis에 이용하였으며 나머지 2ml는 배양하여 세포유전학적 검사를 실시하였다.

1) DNA 추출

Ficoll-Hypaque를 이용한 밀도구배 원심분리법(density gradient centrifugation)으로 단핵구층을 분리한 후 멸균 인산완충 생리적 식염수액으로 3회 세척하고 proteinase K(10mg/ml) 20㎕, SDS(10%) 25㎕를 가하여 37℃에서 16시간 반응시켰다. 이것을 phenol/chloroform법으로 처리하여 DNA를 추출하고 70% cold ethanol로 DNA를 침전시킨 후 건조시켰으며, 멸균증류수에 용해한 후 분광광도계로 DNA량을 측정하여 100 ng/㎕의 농도로 조정하여 -20℃에 보관하였다[13].

Table 1. Age and sex distribution of autistic patients

Age(months)	Sex		Total
	Male	Female	
0 - 36	5	1	6
37 - 72	18	4	22
73 - 108	27	3	30
109 - 144	17	3	20
145 - 180	7	3	10
181 -	9	2	11
Total	83	16	99

2) *FMR-1* 유전자의 CGG 반복서열 부위의 PCR

FMR - 1 유전자 CGG 반복서열 부위의 증폭은 Fig. 1에서와 같이 sense primer(5′-CGG TGA CGG AGG CGC CCG TGC CAG GG-3′)와 antisense primer(5′-CTT CTC TTC AGC CCT GCT AGC GCC G-3′)를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR을 실시 하였다. 50μl의 PCR 반응액에 50mM KCl, 100mM Tris-HCl(pH 9.0), 1% Triton X-100, 1.5 mM $MgCl_2$, 각 0.32mM의 dNTPs, 0.5μM의 sense와 antisense primer, 2.5단위의 Gold Taq DNA polymerase(Roche사, 미국) 및 50ng의 표적(target) DNA가 되게 하였으며, GC-rich region을 효과적으로 증폭하기 위해 betadine(N,N,N-trimethylglycine)을 최종농도가 2M이 되게 첨가하였다[14]. PCR의 온도 조건은 Gene-Amp 9600®(Perkin Elmer사, 미국) thermocycler에서 predenaturation을 94℃에서 10분간 실시하고, 98℃에서 20초간의 denaturation, 55℃에서 60초간의 annealing, 72℃에서 60초간 elongation을 실시하고 마지막으로 72℃에서 10분간 post-elongation을 실시하였다.

(1) 증폭산물 분석

PCR 산물의 분석은 증폭 산물 10μl를 취하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide 염색 후 증류수로 탈색시켜 UV-transilluminator로 관찰하거나, 더욱 더 자세한 분석을 위하여 6% native polyacrylamide gel에서 전기영동한 다음 은염색하여 분석하였다.

6% native polyacrylamide gel에서 전기영동은 Econo Sequencer® 전기영동기[바이오니아(주), 한국]를 이용하여 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 접착용액으로는 실리콘 용액을 전면 유리판에 각각 처리한 후 0.3 μm spacer를 사용하여 6% native polyacrylamide gel (19 : 1 acrylamide/bisacrylamide)로 casting 하였다. Sample loading은 PCR 산물 5μl에 4차 증류수 5μl와 6×gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll type 400) 5μl를 혼합한 용액 3μl를 가한 후 1×TBE 완충액(100 mM tris, 90mM boric acid, 1mM EDTA)으로 300 volt에서 5시간 혹은 200volt에서 12시간 수직상태에서 전기영동하였다.

6% native polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 DNA band는 Silver Stain Kit®[바이오니아(주), 한국]로 은염색하여 다음과 같은 방법으로 가시화 하였다. 먼저 겔(gel)이 접착되어 있는 전면유리판을 조심스럽게 분리한 다음 10% acetic acid 용액으로 30분간 고정시키고 4차 증류수로 2분간 수세하였다. 은염색용액에 30분간 반응시키고 4차 증류수로 5초간 수세하였다. 발색용액에서 띠(band)가 원하는 농도가 될 때까지 흔들어 준 다음 정지용액 10% acetic acid를 2분간 가하여 흐르는 물로 유리판을 잘 씻은 후 실온에서 gel을 건조시켰다. CGG 삼염기 반복서열의 분석은 view-box에서 육안으로 관찰하였으며, 원하는 DNA band가 관찰되면 scan하여 size marker의 거리와 증폭띠의 위치를 log-plot으로 분석하여 증폭된 *FMR - 1* 유전자의 CGG 염기의 크기를 분석하였다[15].

3) Genomic DNA의 Southern blot hybridization

FMR - 1 유전자의 genomic DNA의 Southern blot hybridization은 Fig. 1에서와 같이 *FMR - 1* 유전자의 promotor, CpG island와 CGG 삼염기 반복서열을 포함하는 exon 1을 포함하는 *Eco*RI 절편을 StB12.3 혹은 Pfxa3 probe를 이용하여 분석하였다.

(1) StB12.3 probe의 제작

StB12.3 probe는 전술한 *FMR - 1* 유전자 절편을 다시 제한효소 *Pst*I로 자른 절편으로서 Oostra 등[16]과, Warren과 Nelson[17]의 방법에 준하여 DNA를 분리하여 아래와 같은 방법으로 정제한 다음 digoxigenin으로 표지하였다.

Probe DNA 정제는 이를 Wizard® PCR Preps DNA Purification System(promega사, 미국)을 이용하여 DNA를 정제하였는데, 먼저 분리한 DNA 200μl, direct

purification buffer 100 μl와 1ml의 resin을 1.5 ml 소시험관에 가해 vortex mixer로 강하게 혼합하였다. Resin/PCR 산물 혼합액을 microcolumn으로 옮겨 2ml의 80% isopropanol로 세척한 다음 2분간 spin down하여 resin을 건조시켰다. 50 μl의 증류수를 micro-column에 가하고 20초간 spin down하여 DNA를 추출하여 분광광도계로 DNA 농도 및 순도를 측정하고 최종농도를 0.5 μg/μl이 되게 조정하였다.

Probe의 표지는 random prime labelling kit(Amersham사, 미국)를 이용하여 digoxigenin으로 표지하였는데, 2 μl 혹은 1 μg의 정제된 DNA를 증류수로 16 μl가 되게 조정하고 끓는 수조에서 10분간 denaturation시킨 다음 DIG-High Prime 4 μl를 가해 37℃에서 20시간 반응시켰다. 2 μl의 0.2mM EDTA 용액(pH 8.0)을 가하고 65℃로 10분간 처리하여 반응을 정지시킨 다음 증류수를 가해 probe의 농도가 1ng/μl이 되게 조정하였으며 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

표지한 probe의 control assay는 control DNA와 labelled probe의 농도가 결정이 되게 계단희석하여 Hybond plus(Amersham사, 미국)에 1 μl씩 각각 점적한 다음 nylon membrane을 120℃에서 30분 동안

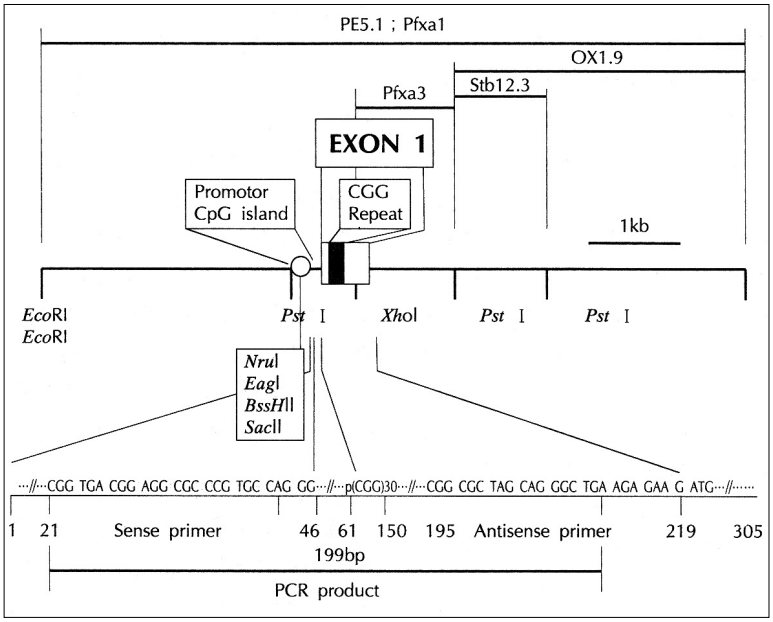

Fig. 1. Schematic representation of *FMR-1* gene *FMR-1* probes used for diagnostic Southern blot and PCR primers site used for amplification CGG repeat sequence. The EcoRI fragment in normal is 5.2kb in length. The circle represents the promotor region, and the box represents the first exon with the dark region, showing the location of the CGG repeats. Four major classes of probes and the location of the restriction enzyme site sequences of the PCR primers are shown(Oostra et al.[16], 1993).

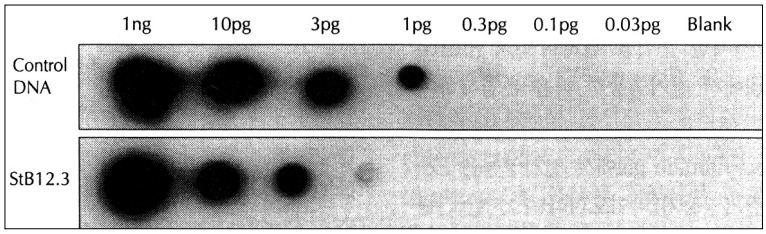

Fig. 2. Control assay of digoxigenin labeled StB12.3. The digoxigenin labeled StB12.3 probe DNA & control DNA were serially diluted and blotted on nylon membrane which were detected by immunological method as discussed in Materials and Methods. StB12.3 probe shown positive signal on X-ray film at DNA 1 pg concentration level.

Fig. 3. Pfxa3 probes, amplified by PCR, used for diagnostic Southern blot. A : Partial Sequence of *FMR-1* gene containing the Pfxa3 probe site. The localization of PCR primers(Pfxa3.1 and Pfxa3.2) are shown by solid line below. B : Amplification of Pfxa3 probe by PCR using Pfxa3.1 and Pfxa3.2 primers. PCR condition was described in Materials and Methods. The PCR products size was 462bp in length. SM : size marker.

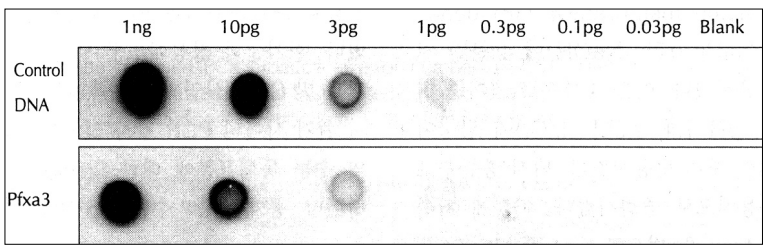

Fig. 4. Control assay of digoxigenin labeled of Pfxa3. The digoxigenin labeled Pfxa3 probe DNA & control DNA were serially diluted and blotted on nylon membrane which were detected by immunological method as discussed in materials and methods. Pfxa3 probe shown positive signal on X-ray film at 1 pg DNA concentration level.

baking하였다. 다시 nylon membrane은 immunologic detection kit(Amersham사, 미국)를 이용하여 효소발광법으로 분석하였는데, nylon membrane을 washing buffer(Roche random prime starter kit, 미국)로 1 5분 세척하고 blocking solution으로 30분간 반응시킨 다음 항체용액으로 30분간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 15분간 2회 세척하고 detection buffer로 안정시켰다. Nylon membrane을 DNA면이 위를 향하도록 hybridization bag에 넣고 CSPD ready - to - use를 가하여 37℃에서 10분간 배양하여 효소발광반응을 증가시켰다. 15 25℃상에서 Hyper film ECL(Amersham사, 미국) X - ray film에 15 25분간 노출시키고 현상하였다(Fig. 2).

(2) Pfxa3 probe의 제작

Fig. 3 - A에서와 같이 Pfxa3 probe가 *FMR - 1* 유전자의 EcoRI 절편내에 위치하면 Fig. 2의 genomic sequence를 이용하여 Pfxa3.1(5 ′- CGT AGC ATG CCC CGG ATC CCG TGG GAG ATG ATG - 3 ′)과 Pfx3.2(5 ′- GCC TAA GCT TCG GCG CTA GCA GGG CTG AAG AGA - 3 ′) primer 쌍을 이용하여 다음과 같은 조건으로 PCR로 증폭 합성하였다. 50 μl의 PCR 반응액에 50mM KCL, 100mM Tris - HCl(pH 9.0), 1% Triton X - 100, 1.5mM $MgCl_2$, 각 0.32mM의 dNTPs, 0.1 μM의 sense와 antisense 시발체, 2.5 단위의 AmpliTaq DNA polymerase(Roche사, 미국) 및 50ng의 표적 DNA가 되게 하였다.

CR의 온도조건은 GeneAmp 9600®(Perkin Elmer

사, 미국) thermocycler에서 predenaturation을 94℃에서 30초간 실시하고, 94℃에서 20초간의 denaturation, 55℃에서 40초간의 annealing, 72℃에서 60초간 elongation하는 주기를 40회 반복한 다음 postelongation을 72℃에서 5분간 실시하였다. 증폭산물 10 μl를 취하여 0.5μg/ml의 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과 462bp 크기의 PCR product가 확인되었다(Fig. 3-B). Pfxa3 probe의 digoxigenin 표지 및 산물, control assay는 StB12.3 probe와 동일한 방법으로 실시하였다(Fig. 4).

(3) Genomic DNA의 제한효소처리

5μg의 genomic DNA를 50 unit의 제한효소 *Eco*RI (BioLabs Inc.사, 미국) 혹은 *Eco*RI와 *Eag*I(BioLabs Inc.사, 미국) 100mM NaCl, 50mM tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT가 함유된 NEbuffer3(BioLabs Inc.사, 미국)로 37℃에서 12시간 처리하였다.

(4) Blotting

제한효소로 처리한 DNA를 0.7% agarose gel을 이용하여 5V/cm로 8시간 전기영동한 다음 gel을 0.25M HCl로 depurination하고 washing한 다음 denaturation solution으로 nylon membrane을 다시 denaturing 용액(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)에 45분간 천천히 흔들어 주며 반응시켰다. 이를 증류수로 씻어준 뒤 중화용액(1M Tris, pH 7.4, 1.5M NaCl)에 담구어 30분간 천천히 흔들어 주며 반응시켰다. 다시 증류수로 washing하고 중화용액으로 중화시켰다. 이렇게 처리한 gel은 capillary transfer법으로 transfer buffer를 이용하여 Hybond plus nylon membrane에 16시간 동안 transfer시켰다.

(5) Hybridization

앞서 언급한 방법으로 제작한 digoxigenin으로 표지한 StB12.3 혹은 Pfxa3 probe와 transfer된 filter를 hybridization jar에 넣고 Quick hybridization solution(Stratagene사, 미국) 10ml를 넣고 StB12.3은 68℃에서 Pfxa3는 50℃에서 각각 1시간 pre-hybridization하였다. 준비된 probe와 sonicated salmon sperm DNA(Stratagene사, 미국) 100μg을 섞어 3분간 끓인 후 급속 냉각하였다. StB12.3은 68℃에서 Pfxa3는 50℃에서 각각 2시간 hybridization한 뒤 2×SSC 용액으로 상온에서 15분간 2회, 1×SSC 상온에서 15분간 2회, 0.5×SSC 상온에서 15분간 2회, 0.5×SSC 55℃에서 15분간 2회, 0.5×SCS 60℃에서 15분간 2회, 0.2×SSC 55℃에서 15분간 2회, 0.2×SSC 60℃에서 15분간 2회의 순서로 세척하였다. 이러한 방법으로 처리한 filter는 hybridization bag으로 싼 뒤 앞서 언급한 면역학적인 방법으로 발색시키고 X-ray film으로 현상하였다[16)18)].

4) 세포유전학적 검사

Heparin 처리한 말초혈액 1ml를 고해상 분염을 얻기 위해 ethidium bromide(0.1mg/ml)를 첨가한 후 RPMI 1640배지에서 72시간 배양하였다. FudR(10 μM) 0.1ml를 넣고 24시간을 더 배양한 후 표준방법[19)]에 의하여 세포를 수확하고 슬라이드를 제작하였다. G-분염을 한 후 중기세포를 50개 계수하여 fragile X 염색체를 확인하였다. 제작한 슬라이드는 1,000배 배율의 현미경으로 검경하였고, fragile site 등의 이상은 최소 50개의 중기세포를 검경하여 fragile X 부위는 4% 이상에서 확인될 때 양성으로 판정하였고, 기타의 fragile site는 6% 이상인 경우 양성으로 판정하였다[20)].

3. 자료분석

통계 분석은 SPSS/PC Windows용 7.0판을 이용하였다. 환자군과 정상대조군 사이의 연령과 PCR반응의 결과 및 CGG 삼염기의 반복배열의 수, 남자 환자와 여자 환자 사이의 PCR 결과 및 CGG 삼염기의 반복배열의 수는 독립표본에 대한 Student's t-검증으로 비교하였다. 통계적 유의수준은 $p<0.05$로 하였다.

결 과

자폐장애 환자군을 대상으로 한 *FMR-1* 유전자의 CGG 삼염기 반복서열 부위를 sense와 antisense primer로 분석한 결과(Fig. 5, 6), 자폐장애 환자군은 206.24±12.2bp이었으며 남자 환자는 206.12±13.00bp, 여자 환자는 206.82±7.60bp로 나타났다. 정상대조군은 211.88±10.30bp이었으며, 자폐장애 환자군과 정상대조군 사이에는 유의한 차이가 없었고, 자폐장애 환자군에서 남자 환자와 여자 환자 사이에도 유의한 차이가 없었다. CGG 삼염기의 반복배열의 수에 있어서도 199

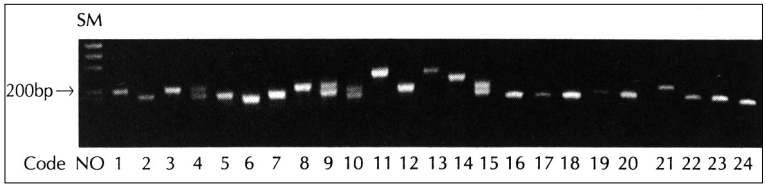

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of CGG repeat polymorphism at *FMR-1* gene on chromosome Xq27.3 in autistic patients. The observed PCR products sizes(or numbers of CGG repeats) in autistic patients were 190 - 265(27 - 52). PCR reaction was carried out using sense and anti-sense primers as described in materials and methods. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel. SM : size marker.

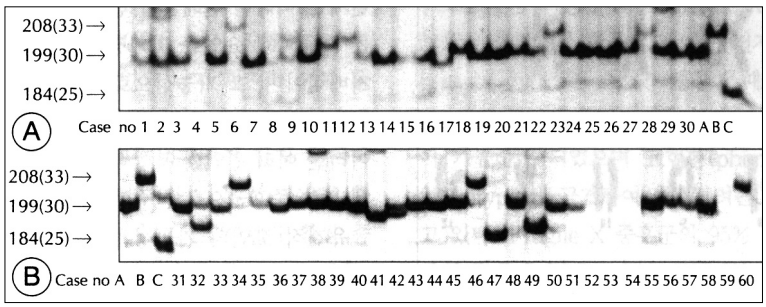

Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR amplification of CGG repeat polymorphism at *FMR-1* gene on chromosome Xq27.3 in autistic patient. The size of PCR products(or numbers of CGG repeats) in autistic patients was estimated by control DNAs(A, B, and C)which were 208(33), 199(30), and 184(25) in length (or numbers of CGG repeats), respectively. The observed PCR products sizes(or numbers of CGG repeats) in autistic patients were 190 - 265(27 - 52). PCR reactions were carried out by the Method described in Fig. 5. After PCR, the products were resolved using 6% native polyacrylamide gel electrophoresis. The bands were visualized by silver staining.

Table 2. The product size of base pair and CGG repeats in autistic patients and normal control group

	Autistic patients				Normal control				
	Male (n=83)	Female (n=16)	p^1	Total (n=99)	Male (n=4)	Female (n=4)	p^2	Total (n=8)	p^3
PCR product size(bp)	206.12 ±13.00	206.82 ±7.60	0.830	206.24 ±12.20	211.25 ±13.10	212.50 ±8.70	0.880	211.88 ±10.30	0.207
CGG repeats	32.02 ±4.40	31.96 ±2.60	0.954	32.01 ±4.10	34.08 ±4.40	34.50 ±2.90	0.878	34.29 ±3.50	0.130

p^1 : p value between autistic male patients and autistic female patients
p^2 : p value between normal male controls and normal female controls
p^3 : p value between total autistic patients and total normal controls

bp인 경우 30repeats에 해당하므로 이를 기준으로 계산한 결과 자폐장애 환자군은 32.01±4.10repeats 이었으며 남자 환자는 32.02±4.40repeats, 여자 환자는 31.96±2.60repeats로 나타났다. 정상대조군은 34.29 ±3.50repeats 이었으며 환자군의 남녀 사이와 정상대조군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

자폐장애 환자군 중 PCR 증폭 band가 정상보다 훨씬 증가된 것으로 나타난 13번(52repeats), 11번(51 repeats) 환자와 정상범위이지만 PCR 증폭 band가 증가된 환자 9명 등 총 11명을 대상으로 Southern blot hybridization을 시행한 결과 11명 모두 5.2kb에서 절단 band를 보여주었으며, PCR 검사상 불완전변이가 의심되었던 14번, 25번 환자도 정상 repeats를 갖는 기타 환자군에 비하여 부가적인 절단 band를 볼 수 없었다. Southern blot hybridization의 결과상 완전변이나 불완전변이로 판정할 수 있는 환자는 한 예도 없었다(Fig. 7).

자폐장애 환자군과 정상대조군 모두를 대상으로 fragile X 염색체를 찾기 위한 세포유전학적 검사에서 취

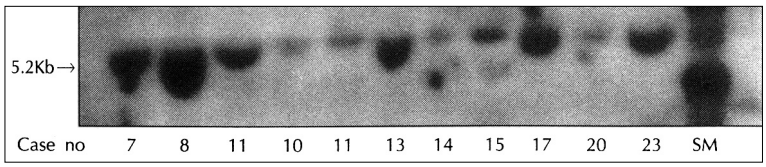

Fig. 7. The results of Southern blot analysis with EcoRI and StB12.3. All cases mentioned above were screened by PCR of CGG repeat sequence described in Figure 5 and 6, except case number 11 and 13, which were 51 and 52 CGG repeats belongs in premutation range, were normal CGG repeats range. SM ; PBR 322/HindIII digest.

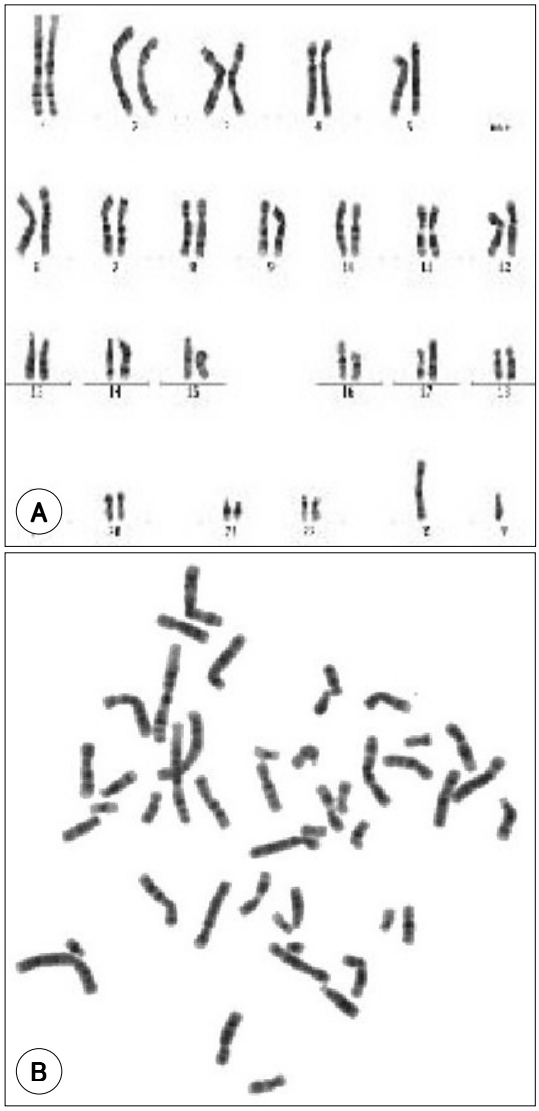

Fig. 8. G-banded Metaphase(A) and Karyotype(B) of autistic patient(case number 31). Karyotype of autistic male patient(case number 31) was normal 46, XY. Peripheral blood lymphocyte culture and G-banding methods for detection of fragile-X site were discussed in Materials and Methods.

약 염색체는 확인되지 않았으며 자폐장애 환자군 모두에서 정상 핵형을 나타내었다(Fig. 8 - A, B).

고 찰

자폐장애의 분명한 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다. 과거에는 자폐장애의 원인으로 심리적 요인[21]이나 잘못된 양육 등의 환경적 요인을 그 원인으로 생각했으나 현재는 이러한 견해들이 인정되지 않고 있다[22]. 최근에는 생물학적 요인을 자폐장애의 원인으로 보는 견해가 지배적이며 그 가능성으로 기질적 요인, 생화학적 요인, 유전적 요인 등이 제시되고 있다. 또한 자폐장애는 이러한 여러 원인의 복합적인 현상에 기인한 이질적 장애 또는 증후군으로 간주되기도 한다[22)23)].

유전적 요인의 가능성은 자폐장애 환자의 형제자매에서 자폐장애의 유병율이 일반 인구에서의 유병율 0.04 0.05%와 비교하여 50에서 200배 높은 빈도를 보인다는 보고[24)25)]와, 쌍생아 연구에서 자폐장애의 발병 일치율이 일란성 쌍생아에서 80%, 이란성 쌍생아에서 13%라는 보고[6)26)27)]에서 유전적 요인의 중요성을 뒷받침한다. 또한 자폐장애 환자에서 fragile X를 포함한 염색체 이상[28)]과 결절성 경화증[22)], 신경섬유종증[29)], 페닐케톤 뇨증[30)] 등의 유전질환들이 발견된 점도 자폐장애의 유전적 요인을 시사하고 있다.

Fragile X 증후군은 Lubs[32)]가 정신지체의 가족연구에서 처음으로 보고하였다. 당시 Lubs는 이 질환이 X염색체의 장완 말단부위의 협착 때문에 생긴다고 설명하였으며, 이후의 연구에서 이러한 사실이 확인되었다[32)]. Fragile X 증후군은 정신지체를 초래하는 염색체 이상 중에서 Down 증후군 다음으로 흔한 원인이라고 알려져 있다[33)]. Fragile X 증후군의 발생빈도는 남자의 경우 1,000 1,200명당 1명, 여자의 경우 2,000명당 1명이지만 여자 보인자(normal transmitting female)의 빈도는 700명당 1명으로 비교적 높은 빈도를 보인다[34)].

자폐장애의 유전적 요인에 대한 연구 중에서 염색체의 이상과 연관된 자폐장애가 보고된 이후로 자폐장애의 원인을 염색체 이상에서 찾기 위한 연구가 진행되어 왔다[7)35)]. 자폐장애와 fragile X 증후군은 서로 비슷한 임상양상을 나타내므로 이들 사이의 연관성에 대한 연구가 관심을 모으기 시작했다. 즉, 남자에서 여자보다 그 빈도가 3 5배 높고, 정신지체, 언어성 및 비언어성 의사소통의 장애, 상동적 행동, 대인관계 기피 등의 임상양상이 서로 비슷한 점이다. 이러한 유사성 때문에 상당 수의 fragile X 증후군 환자들이 자폐장애로 진단될 수 있으며[36)], 역으로 fragile X 증후군 환자 중에서 자폐장애의 진단기준에 부합되는 경우도 7 39%로 다양하게 보고되고 있다[7)37)].

본 연구에서는 99명의 자폐장애 환자군과 8명의 정상대조군을 대상으로 먼저 PCR을 실시 하였다. 그 결과 양군간 유의한 차이가 없었고 남자 환자와 여자 환자 사이에도 유의한 차이가 없었다. 반복배열의 수에 있어서도 정상대조군의 결과와 비교해서 남자 환자와 여자 환자 모두에서 유의한 차이가 없었다. 환자군 중 PCR 증폭 band가 정상범위이거나 정상보다 훨씬 증가된 것으로 나타난 11명을 대상으로 Southern blot hybridization을 시행한 결과 모두 정상 범위를 보여주었으며, 불완전변이가 의심되었던 환자들도 부가적인 절단 band를 볼 수 없었다. Southern blot hybridization 결과 완전변이나 불완전변이로 판정할 수 있는 환자는 한 명도 없었다. 병행한 세포유전학적 검사에서 환자군 모두에서 정상 핵형을 나타냈으며 fragile X 염색체는 확인되지 않았다.

본 연구에서는 fragile X 증후군의 원인으로 알려져 있는 *FMR-1* 유전자의 5 '에서 CGG 반복정도를 확인하기 위한 방법으로 DNA marker를 이용하였다. 과거에 사용되어온 전통적인 진단방법인 세포유전학적 방법은 배지에 methotrexate/thymidine 또는 methotrexate/bromodeoxyuridine을 첨가하거나 저엽산 농도의 배지를 이용하여 Xq27.3의 fragile site 발현을 관찰하는 것이었다[38)]. 이 방법은 완전변이를 보이는 남자 환자에서는 감수성이 매우 높지만, 증상이 없는 여자 보인자나 남자 보인자의 진단에는 감수성이 매우 떨어져 한계가 있고, 특이성도 매우 저조하며 5% 이상의 fragile site의 발현이 있을 경우에만 진단을 할 수 있다[20)39)]는 약점이 있었다. 이런 세포유전학적 방법은 엽산 결핍배지나 thymidine이 과하게 들어 있는 배지에서 fragile X(Xq27.3) 염색체가 나타나게 되는데 완전변이가 있는 경우라도 2 50% 정도의 양성율을 보이는 경우가 있고, fragile X 증후군이 아닌 자폐장애 환자에서도 fragile X 염색체가 나타나는 경우도 있어 정확한 방법으로는 이용하기 어려웠다. 김경모와 유한욱[40)]은 임상적으로 명확한 fragile X 증후군인 2 가계의 2명의 환자를 대상으로 엽산결핍 배지에서 Xq27.3 부위의 fragile site 발현율을 보고 하였는데 각기 38%와 16%이었다.

최근 fragile X 증후군의 결함 유전자의 위치가 알려진 이후 여러 RFLP(restriction fragment length polymorphism) DNA marker를 이용하여 linkage analysis로 진단하고자 하는 분자생물학적인 시도가 있었다. Verkerk 등[8)]과 Yu 등[41)]은 fragile X 증후군의 원인으로 *FMR-1* 유전자가 클론되고 이 유전자의 5 '의 CGG repeats의 불안정한 요소가 팽창함 때문이라는 것을 밝혔다. 이런 현상에 근거하여 보인자 및 환자의 정확한 진단이 가능하게 되었으며 표현형(phenotype)도 유전자형(genotype)에 근거하여 예측하려는 시도가 주축을 이루고 있다. Fragile X 증후군의 95% 이상이 *FMR-1* 유전자의 5 '에서 CGG repeats의 반복 배열의 신장 정도에 따라서 유전자의 메칠화 정도가 달라지므로 변이의 정도도 알 수 있다[42)]. Fragile X 증후군의 병인기전은 *FMR-1* 유전자의 5 '에서 CGG repeats의 증폭결과 CpG island의 메칠화를 조장하여 *FMR-1* 유전자를 하향조정(down regulation)하는 것으로 생각되고 있다[43)].

이와 같이 fragile X 증후군에 대한 분자생물학적 병인론의 이해가 증대되어 세포유전학적 검사 대신 분자생물학적 기법을 이용하여 진단을 하는 것이 현재의 추세이다. Hallmayer 등[36)]은 multiplex autism의 진단기준에 부합하는 35 가계에서 자폐장애 아동 79명을 대상으로 Southern blot analysis를 이용해 *FMR-1* 유전자를 확인해 보았으나 이들 사이에는 연관성이 없다고 보고하였다. Klauck 등[44)]도 141명의 비교적 많은 수의 자폐장애 환자를 대상으로 자폐장애와 *FMR-1* 유전자와의 연관성을 조사해 보았으나 양자 사이에 연관성이 없는 것으로 보고하였다. 최근 국내에서 강경미[45)]는 자폐장애 환자 66명을 대상으로 fragile X 증후군과의 연관성을 밝히기 위해서 분자생물학적 방법을 실시

하였으나 완전변이의 양상은 볼 수 없었다고 하여 지금까지 국내의 세포유전학적 방법으로 연구한 보고들[46)47)]과 결과가 일치하며 분자생물학적 방법을 이용한 이 연구의 결과와도 일치한다.

그러나 이와는 반대로 자폐장애 환자에서 fragile X 염색체의 발견 빈도가 일반 아동에서의 빈도보다 높아 fragile X 증후군이 자폐장애의 원인이라고 주장한 세포유전학적 연구[28)48)]와 분자유전학적 연구[10)]도 있었다. 자폐장애와 fragile X 증후군의 연관성에 대한 지금까지의 연구에서 결과들의 이러한 차이는 연구방법이나 대상 환자의 특성과 관계가 있을 것으로 추정된다. 이를 설명하면 첫째, 연구 방법에 있어서 과거 세포유전학적 방법으로는 결과들이 다양하게 나타나지만, 최근 분자생물학적 방법으로 실시한 연구들 모두에서 자폐장애에서 fragile X 염색체를 발견할 수 없었다는 것은 연구 방법상의 차이에 의해 확연히 구분되는 중요한 의미를 나타낸다고 할 수 있을 것이다. 즉 세포유전학적 방법에서 나타난 fragile X 양성의 결과는 위양성일 가능성이 있겠다. 둘째, 조직배양 중에 첨가되는 약제인 MTX의 영향이나 환자의 비타민 복용유무에 따라서 검사 결과는 차이가 있을 수 있다. Crowe 등[10)]은 20명의 자폐장애 환자에게 DNA probe를 사용하여 검사한 결과 2명이 양성으로 나타났는데 이들 2명중 1명은 처음에는 발견되지 않았으나 15개월후 재검사시 양성으로 나타나서 그 이유로 검사상의 문제이든지 또는 환자가 비타민을 복용한 사실 때문일 것이라고 하였다. 셋째, 대상 환자의 인지기능이나 자폐증상의 심한 정도의 차이 때문일 수도 있겠다[49)]. 기존의 연구에서도 수용기관에 있는 증상이 심한 자폐장애 환자에서 fragile X 염색체가 더 많이 발견되었다[48)]. 이는 아마 심한 정신지체가 동반되었기 때문으로 추정 되며, 따라서 정신지체로 인한 fragile X 염색체의 양성 반응일 가능성도 있을 것이다.

이 연구의 결과에서 자폐장애 환자군과 정상대조군을 대상으로 *FMR - 1* 유전자의 CGG 삼염기 반복의 분자생물학적 분석 결과 유의한 차이가 없었으며 fragile X 염색체가 확인되지 않았다는 것은 자폐장애와 fragile X 증후군과의 사이에 연관성이 없을 가능성도 있으므로 fragile X 증후군이 자폐장애의 직접적인 원인이라고 생각하기 어려울 수도 있겠다. 더욱이 세포유전학적 검사보다 더 객관적이고 정밀한 기술인 분자생물학적 방법을 이용해서 검사한 Crowe 등[10)]의 연구 결과는 20명 중 2명에서 양성으로 나타났으나, Hallmayer 등[36)], Klauck 등[44)], 강경미[45)]의 연구들에서 총 286명 모두 fragile X를 발견치 못했다는 결과는 두 질환의 관련성이 희박하다고 할 수 있겠다. 또한 자폐장애에서 fragile X 양성소견이 나온 경우들은 자폐장애에 동반된 정신지체의 영향 때문일 것으로도 생각해 볼 수 있겠다. 그 가능성으로는 남자 정신지체 아동을 대상으로한 국내 연구에서는 fragile X 염색체의 빈도를 1.3 6.0%로 보고하고 있으며[50)51)], 구선회와 박종우[7)]는 특수시설 수용중인 정신지체 아동을 대상으로 Southern blot hybridization을 이용하여 1.0%가 fragile X 증후군을 나타냄을 확인하였다. 국외의 보고에 의하면 남자 정신지체 환자의 6.3 13.6%에서 fragile X 증후군을 진단할 수 있었다고 한다[52)].

이러한 결과는 자폐아동과 *FMR - 1* 유전자간의 상관관계가 낮다는 보고[48)53)]나 최근 개발된 분자생물학적인 검사 결과 자폐장애 환자에서 fragile X 염색체를 발견할 수 없었다는 결과와도 일치한다[36)44)45)]. 이는 자폐장애가 비특이적인 여러 염색체의 이상으로 나타나거나 자폐장애의 유전양상이 단일 유전자(monogenic)의 이상에 의한 것이라기 보다는 다유전자(polygenic) 모델이나 유전적 소인 및 환경적인 요인이 병합된 다인자 질환(multifactorial disorder)일 가능성이 높다는 점도 시사해 줄 수 있다. 또한 단일 유전적 결함이 원인이라고 하더라도 다른 유전자나 환경적 요인과 상호 작용함으로써 다른 표현형을 나타낼 수도 있다[54)]는 점을 감안한다면 다각적인 시각에서 자폐장애의 유전적 원인을 규명할 필요가 있겠다. 특히 자폐장애에서 정신지체, 간질, 신경학적 이상 소견, 뇌실 확대 등이 정상인에 비해서 흔히 동반된다는 사실은 자폐장애가 여러 종류의 기질적 혹은 유전적 요인으로 인해 한가지 혹은 그 이상의 특이한 뇌기능 체계의 손상으로 인한 증후군일 가능성을 반영해 준다[55)].

References

1) **Kanner L** (1943) : Autistic disturbances of affective contact. Nerv Child 2 : 217-250
2) **American Psychiatric Association** (1994) : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th

Ed.(DSM-Ⅳ), Washington DC, American Psychiatric Press, pp66-71

3) **Ornitz EM, Ritvo E**(1976) : The syndrome of autism : a critical review. Am J Psychiatry 133 : 609-621
4) **Kuperman S, Beeghly JHL, Burns TL, Tsai LY** (1985) : Serotonin relationships of autistic probands and their first-degree relatives. J Am Acad Child Psychiatry 24 : 186-190
5) **Folstein S, Rutter M**(1977) : Infantile autism : a genetic study of 21 twin pairs. J Child Psychol Psychiatry 18 : 297-321
6) **Brown WT, Jenkins EC, Friedman E**(1982) : Autism associated with the fragile-X syndrome. J Autism Dev Disord 12 : 303-308
7) 구선회, 박종우(1996) : Fragile X 증후군의 유전자 진단. 대한임상병리학회지 16 : 119-124
8) **Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, Eussen BE, van Ommen GB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain Jl, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, Warren ST**(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 : 905-914
9) **Knight SJL, Voelkel MA, Hirst MC, Flannery AV, Moncla A, Davies KE**(1994) : Triplet repeat expansion at the FRAXE Locus and X-linked mild mental handicap. Am J Hum Genet 55 : 81-86
10) **Crowe RR, Tsai LY, Murray JC, Patil SR, Quinn J**(1988) : A study of autism using X chromosome DNA probes. Biol Psychiatry 24 : 473-479
11) **Gillberg C, Wahlstrm J, Johansson R, Tornblom M, Albertsson-Wikland K**(1986) : Folic acid as an adjunct in the treatment of children with the autism fragile-X syndrome(AFRAX). Dev Med Child Neurol 28 : 624-627
12) **Rimland B**(1987) : Megavitamin B6 and magnesium in the treatment of autistic children and adults. In Neurological Issues in Autism, Ed by Schopler E and Mesibov GB, New York, Plenum Press, pp389-405
13) **Chan VTW**(1992) : Extraction of nucleic acids from clinical samples and cultured cells. In Diagnostic Molecular Pathology : a practical approach, Ed by Herington CS and McGee JO'D, Oxford, IRL press, pp1-24
14) **Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA**(1997) : Betadine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequence. Nucleic Acids Res 25 (19) : 3957-3958
15) **Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL** (1994) : Fine structure of the human *FMR-1* gene. Human Mol Genet 3 : 684-685
16) **Oostra BA, Jacky PB, Brown WT, Rousseau F** (1993) : Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. J Med Genet 30 : 410-413
17) **Warren ST, Nelson DL**(1994) : Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. JAMA 271 (7) : 536-542
18) **Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT**(1992) : Detection of full fragile X mutation. Lancet 339 : 271-272
19) 김영재, 전효진, 전동석, 김재룡, 하경임(1992) : 염색체 이상 107예에 대한 분석. 대한임상병리학회지 12 : 513-522
20) **Jacobs PA, Glover TW, Mayer M, Fox P, Gevrard JW, Dunn HG, Herbst DS**(1980) : X-linked mental retardation, a study of 7 families. Am J Med Genet 7 : 471-489
21) **King PD**(1975) : Early infantile autism : relation to schizophrenia. J Am Acad Child Psychiatry 14 : 666-682
22) **Volkmar FR, Klin A**(2000) : Autism and the pervasive developmental disorders. In : Comprehensive Textbook of Psychiatry. 7th ed, Ed by Sadock BJ and Sadock VA, Baltimore, William & Wilkins, pp2662-2670
23) **Smalley SL**(1997) : Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders : autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Hum Genet 60 : 1276-1282
24) **Folstein S, Rutter M**(1988) : Autism, familial aggregation and genetic implications. J Autism Dev Disord 18 : 3-30
25) **Ritvo ER, Jorde LB, Mason-Brothers A, Freeman BJ, Pingree C, Jones MB, McMahon WM, Petersen PB, Jenson WR, Mo A**(1989) : The UCLA-University of Utah epidemiologic survey of autism : recurrence risk estimates and genetic counseling. Am J Psychiatry 146 : 1032-1036
26) **Ritvo ER, Freeman BJ, Mason-Brothers A, Mo A, Ritvo AM**(1985) : Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. Am J Psychiatry 142 : 74-77

27) **Wahlstrm J, Steffenburg S, Hallgren L, Gillberg C**(1989) : Chromosome findings in twins with early-onset autistic disorder. Am J Med Genet 32 : 19-21
28) **Gillberg C, Wahlstrm J**(1985) : Chromosome abnormalities in infantile autism and other childhood psychoses : a population study of 66 cases. Dev Med Child Neurol 27 : 293-304
29) **Gillberg C, Forsell C**(1984) : Childhood psychosis and neurofibromatosis-more than a coincidence? J Autism Dev Disord 14 : 1-8
30) **Friedman E**(1969) : The autistic syndrome in phenylketonuria. Schizophrenia 1 : 249-261
31) **Lubs HA**(1969) : A marker X chromosome. Am J Hum Genet 21 : 231-244
32) **Sutherland G**(1977) : Fragile sites on human chromosomes : demonstration of their dependences on the type of tissue culture medium. Science 197 : 265-266
33) **Hagerman RJ, McBogg P, Hagerman PJ**(1983) : The fragile X syndrome : history, diagnosis and treatment. J Dev Behav Pediatr 4 : 122-130
34) **Kremer EJ, Yu S, Prichard M, Nagaraja R, Heitz D, Lynch M, Baker E, Hyland VJ, Little RD, Wada M, Toniolo D, Vincent A, Rousseau F, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI** (1991) : Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X. Am J Hum Genet 49 : 656-661
35) **Burd L, Martsolf JT, Kerbeshian J, Jalal SM** (1988) : Partial 6p trisomy associated with infantile autism. Clin Genet 33 : 356-359
36) **Hallmayer J, Pintado E, Lotspeich L, Spiker D, Mc-Mahon W, Peterson PB, Nicholas P, Pingne C, Kraemer HC, Wong DL, Ritvo E, Lin A, Hebert J, Cavalli-Sfoza LL, Ciaranello RD**(1994) : Molecular analysis and test of linkage between the *FMR-1* gene and infantile autism in multiplex families. Am J Hum Genet 55 : 951-959
37) **Bregman JD, Leckman JF, Ort SI**(1988) : Fragile X syndrome : genetic predisposition to psychopathology. J Autism Dev Disord 18 : 343-354
38) **Glover TW**(1981) : FUdR induction of the X chromosome fragile site : evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. Am J Hum Genet 33 : 234-242
39) **Jenkins EC, Kastin BR, Krawczun MS, Lele PK, Silverman WP, Brown WT**(1986) : Fragile-X chromosome frequency is consistent temporally within replicate cultures. Am J Med Genet 23 : 475-482
40) 김경모, 유한욱(1994) : 한국인 Fragile-X 증후군 환자의 분자유전학적 진단. 울산의대학술지 3 : 12-19
41) **Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR**(1991) : Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. Science 252 : 1179-1181
42) **Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH, Holden JJA, Fenwick RGJ, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT**(1991) : Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability : resolution of the Sherman paradox. Cell 67 : 1047-1058
43) **Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, Mackinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U**(1991) : Physical mapping across the Fragile X : hypermethylation and clinical expression of the Fragile X syndrome. Cell 64 : 861-866
44) **Klauck SM, Mustermann E, Bieber-Martig B, Ruhl D, Lisch D, Lisch S, SchmOtzer G, Poustka A, Poustka F**(1997) : Molecular genetic analysis of the *FMR-1* gene in a large collection of autistic patients. Hum Genet 100 : 224-229
45) 강경미(1998) : 자폐아동에서 후레자일 X 증후군의 분자유전학적 연구(박사학위). 고려대학원
46) 정철호, 이제영, 박영남, 박종한, 김정범, 김재룡, 전효진(1994) : 자폐장애 환자의 세포유전학적 분석. 소아청소년정신의학 5 : 108-117
47) 정철호, 이인환(1991) : 자폐장애 아동의 유전연구－염색체 분석. 소아청소년정신의학 2 : 66-75
48) **Brown WT, Jenkins EC, Cohen IL, Fisch GS, Wolf-Schein EG, Gross A, Waterhouse L, Fein D, Mason-Brothers A, Ritvo E, Ruttenberg BA, Bentley W, Castells S**(1986) : Fragile X and autism, a multicenter survey. Am J Med Genet 23 : 341-352
49) **Levitas A, Hargerman RJ, Braden M, Rimland B, McBogg P, Matus I**(1983) : Autism and the fragile X syndrome. J Dev Behav Pediatr 4 : 151-158
50) **Moon HR, Moon SY**(1993) : Fragile site X chromosomes in mentally retarded boys. J Korean Med Science 8 : 192-196
51) 신선경, 유한욱(1994) : 특수교육기관에 수용중인 정신지체 아동의 원인적 분류. 소아과 37 : 1437-1448
52) **Cohen IL, Sudhalter V, Pfadt A, Jenkins EC,**

Brown WT, Vietze PM(1991) : Why are autism and the fragile-X syndrome associated? Conceptual and methodological issues. Am J Hum Genet 48 : 195-202

53) **Reiss AL, Freund L**(1990) : Fragile X syndrome, DSM-Ⅲ-R, and autism. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 29 : 885-891

54) **Hyman SE, Nestler EJ**(1993) : Overview of psychiatric genetics. In the Molecular Foundations of Psychiatry. Washington DC, American Psychiatric Press, pp173-192

55) **Reiss AL, Feinstein C, Rosenbaum KN**(1986) : Autism and genetic disorders. Schizophr Bull 12 : 724-734

ABSTRACT *Korean J Child & Adol Psychiatr 11 : 3~15, 2000*

MOLECULAR BIOLOGIC ANALYSIS OF *FMR-1* GENE TRINUCLEOTIDE REPEATS IN AUTISTIC PATIENTS

Ho Soon Kwak, M.D., Chul-Ho Jung, M.D., Hyo-Jin Chun, M.D., Eun-Jin Chang, M.A., Hee-Cheol Kim, M.D., Jung-Bum Kim, M.D., Young Nam Park, M.D.

Department of Psychiatry, Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science, Taegu

Objectives : There has been a rapid expansion of studies aimed at elucidating the genetic basis of autistic disorder, especially it's relationship to fragile-X syndrome. The detection of fragile X chromosome(Xq27.3) by cytogenetic analysis has revealed many difficulties in testing. Therefore, to explore the relationship between autistic disorder and fragile X syndrome, this study administered molecular biologic methods which examined an unstable CGG repeat within the fragile X mental retardation-1(FMR-1) gene.

Methods : Ninety nine autistic children and eight normal control children were tested. The number of CGG repeats within *FMR-1* gene was measured after amplification by PCR, and cytogenetic analysis was also carried out to detect fragile site Xq27.3. Southern blot hybridization, using StB12.3 and/or Pfxa3 probe, was done for the patients showing expansion of more than 50 CGG repeats (premutation).

Results : All but two autistic patients had no expansion in CGG repeats by PCR and there was no significant statistical difference in number of CGG repeat in comparison with normal control. Two autistic patients, considered as premutation by PCR analysis, had no full mutation or premutation by Southern blot hybridization. All autistic children tested did not have any abnormal karyotype or fragile site Xq27.3.

Conclusions : These results suggest that autistic patients may not have abnormality in *FMR-1* gene or abnormal expansion in CGG repeat. In conclusion, fragile X syndrome may not be antecedent of autistic disorder.

KEY WORDS : Autistic disorder · *FMR-1* gene trinucleotide repeats · Molecular biologic analysis.