

Turner 증후군 환자에서 중합효소연쇄반응을 이용한 Y-특이 염기서열의 동정

장영우 · 전효진 · 김은진 · 전동석 · 김재룡 · 이영재* · 김영재**

계명대학교 의과대학 임상병리학교실, 의과학연구소*, 마산삼성병원 임상병리과**

PCR-based Analysis for Y-specific Sequence in Patients with Turner Syndrome

Young Woo Jang, M.D., Hyo Jin Chun, M.D., Eun Jin Kim, M.D., Dong Seok Jeon, M.D., Jae Ryong Kim, M.D.,
Young Jae Lee, Ph.D.*, and Young Jae Kim, M.D.**

Department of Clinical Pathology, Institute for Medical Science*, College of Medicine, Keimyung University, Taegu
Department of Clinical Pathology**, Masan Samsung Hospital, Masan, Korea

Background : In patients with Turner syndrome, it is known that the presence of Y-specific sequence is correlated with the risk of gonadoblastoma development. Y-specific sequence are frequently present in marker chromosome which can not be easily identified by cytogenetic method, because it is very small in size and unstable during mitosis. So, in this study, karyotype of 30 patients with Turner syndrome analyzed by cytogenetic method and the presence of Y-specific sequence was identified by polymerase chain reaction (PCR).

Methods : Cytogenetic analysis was performed by Phytohemagglutinin (PHA)-stimulated lymphocyte culture and G-banding by Wright stain without trypsin treatment. Four Y-specific sequences were amplified by PCR using specific primer for Sex determination on Y (SRY), Amelogenin like gene (AMGL), Y1.1-1.2 repeat sequence (Y1.1-1.2) and B fragment of DYZ1 (DYZ1-B). DNAs for PCR analysis were extracted from peripheral blood lymphocytes of preserved cell pellets which were harvested for cytogenetic analysis.

Results : Cytogenetic analysis revealed various karyotypes in Turner syndrome such as 45,X, 46,X,i(X)(q10), 46,X,del(X) including four cases of 46,X,+mar and three cases of 46,X,+r. It is could not identify Y-chromosome in this 30 patients with Turner syndrome. By PCR, three patients (10%) with Turner syndrome had at least one Y-specific sequence; one case of 45,X karyotype was amplified in SRY; one case of 45,X[9]/46,X,i(X)(q10)[1]/46,XX[10] was amplified in AMGL, Y1.1-1.2; one case of 46,X,i(X)(q10) was amplified in SRY, AMGL and Y1.1-1.2. None of case was amplified in DYZ1-B.

Conclusions : PCR for amplification of Y-specific sequence was thought to be useful in detection of Y-chromosome, which might be helpful in early diagnosis of gonadoblastoma in patients with Turner syndrome. (*Korean J Clin Pathol* 1998; 18: 271-8)

Key words : Turner syndrome, Y-specific sequence, PCR, Gonadoblastoma

서론

Turner 증후군의 출생빈도는 여아 약 2,500내지 3,500명당 1명으로 알려져 있고 왜소증, 성선 기능 저하, 익상경 등의 임상적인

증상을 특징으로 하고 있다. Turner 증후군에서 관찰되는 핵형은 45,X가 가장 흔한 핵형으로 알려져 있고, 45,X/46,XX 모자이크형, i(Xq)형, 45,X/47,XXX 혹은 기타 'super female' 세포군 모자이크형, X-환상(ring) 염색체, 45,X/46,XY 모자이크형 및 X-염색체의 구조적 이상을 동반한 경우로 매우 다양하게 나타난다[1,2]. 모자이크형 및 X-염색체의 구조 이상을 동반한 Turner 증후군 환자의 6%는 Y-염색체 또는 Y-특이 유전 물질을 보유한다고 알려져 있다[3]. 이들 환자가 Y-특이 유전물질을 보유하면 성선모세포종(gonadoblastoma)이 발생할 위험이 있다고 알려져 있다. 그러나

접 수 : 1998년 2월 2일 접수번호: KJCP1117
수정본접수 : 1998년 3월 13일
교신저자 : 장영우
우 700-310 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 동산의료원 임상병리과
전화 : 053-250-7220, Fax : 053-250-7275

Y-특이 유전 물질은 염색체 검사로는 그 유래를 밝힐 수 없는 표식(marker)염색체에 존재하는 경우가 많고, 또한 이 염색체는 매우 불안정하여 흔히 세포분열 과정에서 소실되기 때문에 염색체검사로 그 존재를 증명할 수 없는 경우가 많다. 표식 염색체상의 SRY 유전자 등의 Y-특이 유전물질은 중합효소연쇄반응 등의 분자 생물학적 방법으로 규명할 수 있으며[4,5], Nagafuchi 등[6]은 표식 염색체를 보유한 Turner 증후군 환자의 57%에서 이 염색체가 Y-염색체에서 유래하였음을 중합효소연쇄반응으로 증명하였다.

Page[7]에 의하면 여성에서 Y-염색체상의 gonadoblastoma 유전자(gonadoblastoma gene on Y chromosome, GBY)가 존재하는 경우 성선이발생증(gonadal dysgenesis)과 관련하여 성선모세포종이 발생할 수 있다고 한다. 이 GBY 유전물질이 과거에는 Y-염색체의 장완에 존재하는 것으로 생각되어졌지만, DNA에 기초를 둔 유전자지도 연구에서 Y-염색체의 단완이나 중심체 근처에 위치하는 것으로 밝혀지고 있다[4, 7].

이에 이 연구에서는 Turner 증후군 환자에서 염색체검사로 핵형을 조사하고, 그 유형에 따른 Y-특이 유전물질의 보유 여부를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 조사하여 성선모세포종 발생위험을 예측하고 치료방침을 결정하는데 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대 상

1992년 1월부터 1997년 2월까지 계명대의 동산의료원 임상병리과에 유전성질환을 의심하여 염색체 검사가 의뢰된 2,900명중 Turner 증후군으로 확진된 30명의 환자를 대상으로 하였다. 이들 환자들은 애소증과 성선기능저하증 등의 특징적인 Turner 증후군의 증상을 가지고 있었다.

2. 염색체 검사

염색체 검사는 환자의 말초혈액 림프구를 Phytohaemagglutinin (PHA)으로 자극한 후 72시간 단기 배양하여 실시하였는데[8], 검사방법을 요약하면 다음과 같다. 말초혈액 검체는 검체 도착 즉시 성인의 경우는 1 mL, 소아나 신생아의 경우는 0.5 mL를 15% 우태아혈청, 0.1% penicillin-streptomycin, PHA가 포함된 RPMI 1640배지에 이식하고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 72 시간 배양하였다. 세포를 얻기 위해 colcemid (10 µg/mL)를 배지 10 mL당 0.05 mL씩 가하여 37°C에서 90분 처리후 원심 분리하여 상층액을 제거하고 37°C, 0.075 M KCl 용액으로 8분간 처리 후 원심 분리하여 상층액을 제거 하였다. Methanol과 glacial acetic acid를 3:1로 혼합한 고정액으로 3 회 세척한 후 적당한 세포농도의 세포부유액을 만들고 미리 냉각된 고정액에 담구어 두었던 슬라이드에 1 미터의 높이에서 세포부유액을 적하하여 건조시켰다. 분염은 김 등[9]의

방법으로 trypsin 처리 없이 Wright 염색액으로 G-분염법을 실시하였다.

결과의 판독은 G-분염한 표본 슬라이드를 1,000 배율 광학현미경하에서 30개 이상의 중기세포를 관찰하여, 3개 이상의 동일한 수적이상이나 2개 이상의 동일한 구조이상이 있을 때 이를 이상 세포군으로 인정하고, 염색체 명명을 위한 An International System for Human Cytogenetics Nomenclature 1995 (ISCN)의 기준[10]에 따라 명명하였다.

3. 중합효소연쇄반응

1) DNA 분리

DNA분리를 위해 Turner 증후군 환자의 말초혈액 5 mL를 Ficoll-Hypaque 밀도구배 원심분리법으로 분리한 림프구를 사용하였으며, 말초혈액을 얻을 수 없었던 경우는 염색체검사 후 고정액으로 처리하여 -70°C에 보관하였던 세포침사를 사용하였다. DNA 분리 방법을 요약하면, 림프구 또는 세포침사액 1.5 mL를 12,000 rpm에서 20 분간 원심하고 침사를 TEN 완충액[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 mM NaCl] 300 µL로 재부유한 후 10% SDS 25 µL와 100 mg/mL의 proteinase K 20 µL를 가하고 강하게 진탕하였다. 이를 37°C에 2 시간에서 14 시간 방치하고 원심 분리한 후 석회산(phenol) 200 µL와 chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 200 µL를 첨가하여 30 초간 진탕하였다. 다시 12,000 rpm에서 5 분간 원심한 후, 상층액을 취하여 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 동량 가하여 5초간 진탕하여 12,000 rpm에서 5 분간 원심하였다. 상층액에 10 µL의 5M NaCl을 가하여 혼합하고 100 µL의 무수에탄올을 가하여 잘 혼합하여 -20°C에서 30분간 방치한 후 20 분간 원심하여 DNA 침사를 얻었다. 1 mL의 70% 에탄올을 DNA 침사에 가하여 잘 혼합한 후 12,000 rpm에서 20 분간 원심하여 정제된 DNA 침사를 얻었다. 분리된 DNA는 검사 전까지 -20°C에 보관하였다.

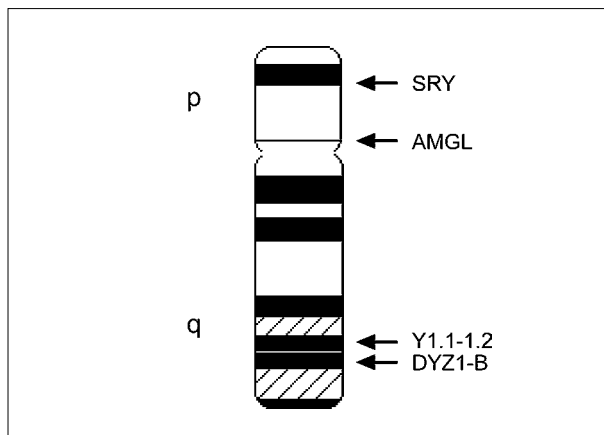


Fig. 1. Map of Y-specific markers used in this PCR-based study of Turner syndrome.

Table 1. Oligonucleotide primers for amplification of Y-specific DAN markers

Markers	Primers	Sequences (5'-3')	Product size (bp)	References
SRY	SRY-1F	AGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT	270	[27]
	SRY-2R	CTTCCGACGAGGTCGATACTTATA		
Ameglonin like gene	Outer primers		647	[28]
	AMGL-1	CTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG		
	AMGL-2	TAAAGAGATTCACTTAACCTTGACTG		
	Inner primers			
	AMXY-3FY	TGACCATTCGGATTGACTCTTTC		
	AMXY-4R	TTCATTGTAAGAGCAAAGCAAACA		
Y1.1-1.2 repeat sequence	Y1.1	TCCACTTTATTCCAGGCCTGTCC	154	[29]
	Y1.2	TTGAATGGAATGGGAACGAATGC		
B fragment of DYZ1	Y1-6F	AATTTGAGCATTCGTGTCCATTCT	1,024	[30]
	Y1-4R	ATGCCCTTGAATTAATGGACT		

2) 시발체

Y-특이 염기서열의 분석을 위해 실험에 사용한 각 시발체는 바 이오니아(주, 한국)에 주문 제작하여 사용하였다. 이 연구에서 중합효소연쇄반응으로 분석한 Y-특이 표지자는 모두 4종으로 Nakahori 등[11]에 의해 deletion mapping된 23 loci 중 Fig. 1에서와 같이 Y-염색체 단원에 위치한 SRY와 AMGL 그리고 Y-염색체 장완에 위치한 Y1.1-1.2 반복염기서열(Y1.1-1.2)과 DYZ1의 B분절(DYZ1-B) 등이었다.

각 시발체의 영역, 염기서열 및 PCR 증폭 산물의 크기는 Table 1과 같은데 AMGL의 경우는 2차 중합효소연쇄반응(nested-PCR)을 시행하였고, 기타 표지자는 1차 중합효소연쇄반응(single round-PCR)을 시행하였다.

3) 중합효소연쇄반응의 수행

중합효소연쇄반응을 위한 thermocycler는 hot-air capillary 형인 FTC-2000[대한메디칼(주), 한국]을 이용하였으며, 반응용기는 모세관(10 μ L volume at 2 inch, idaho사, 미국)을 사용하였다. 반응 혼합물은 1 μ L의 피검자 DNA를 가하여 10 μ L가 되도록 하였으며 각각 5 M의 시발체, 0.5 units의 Taq polymerase (Promega 사, 미국), 50 mM Tris HCl(pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 500 μ g/mL 우혈청알부민(Sigma사, 미국)과 각각 2 mM의 dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)가 함유되도록 최종 농도를 조정하였다. 반응 혼합물을 모세관에 주입하여 불꽃으로 양끝을 봉합한 다음 SRY와 Y1.1-1.2에서는 predenaturation을 94°C에서 10 초간 시행하고 denaturation을 94°C에서 1초, annealing은 65°C에서 1초, elongation은 72°C에서 20초의 조건에서 35회 반복한 후, post-elongation은 72°C에서 20 초간 실시하였다. AMGL은 SRY 및 Y1.1-1.2와 동일한 조건에서 1차 중합효소연쇄반응을 실시하고, 1차 중합효소연쇄반응 증폭산물 1 μ L를 2차 중합효소연쇄반응의 표적 DNA로 하여 1차 중합효소연쇄반응과 동일한 방법으로 증폭하였다. DYZ1-B는 predenaturation은 94°C에서 10 초간 시행하고, dena-

turation을 94°C에서 1초, annealing을 54°C에서 1초, elongation을 72°C에서 20초의 조건으로 35회 반복한 후, post-elongation은 72°C에서 20초간 시행하였다.

중합효소연쇄반응 산물의 확인을 위하여 1.6% synergel (Diversified Biotech 사, 미국)과 0.8% agarose가 혼합된 gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색한 다음 UV transilluminator하에서 Y-특이 증폭산물의 띠를 관찰하고 폴라로이드 카메라로 촬영하였다.

결 과

1. Turner 증후군 환자의 핵형 (Table 2)

염색체 검사에 의한 Turner 증후군 환자 30명의 핵형을 유형별로 보면 전형적인 45,X 이외에 46,X,i(X)(q10), 46,X,+r, 46,X,

Table 2. Various karyotypes of 30 patients with Turner syndrome

Karyotype	No. of cases
45,X	8
45,X	7
45,X,t(4;13)(p12;p12)	1
46,X,i(X)(q10)	4
45,X/46,X,i(X)(q10)	5
45,X/46,XX	2
45,X/46,X,+r	4
46,X,+mar	2
45,X/46,X,+mar	1
46,X,del(X)(q11.2)	1
46,X,del(X)(q22)	1
45,X/46,X,i(X)(q10)/46,XX	1
45,X/47,XXX	1
Total	30

+mar, 46,X,del(X) 같이 구조적 이상을 동반한 경우와 모자이크형 등으로 다양하였다(Fig. 2). 핵형의 빈도별로 보면, 45,X가 8예(27%), 46,X,i(X)(q10)가 5예(17%), 45,X/46,X,i(X)(q10) 모자이크형이 4예(13%), 45,X/46,XX가 2예(7%)였으며, 표식 염색체를 가진 경우는 3예(10%), 환상 염색체를 가진 경우도 4예(13%)에서 관찰되었다. 46,X,i(X)(q10)와 46,X,i(X)(q10) 모자이크형 핵형을 보인 경우는 모두 10예(33%)였다.

2. 중합효소연쇄반응에 의한 Y-특이 염기서열의 동정 (Table 3, Fig. 3-6)

30 예의 Turner 증후군 환자중 염색체 검사로는 Y-염색체의 존재가 확인된 경우는 1 예도 없었으나 중합효소연쇄반응으로 Y-특이 염기서열이 동정된 환자는 모두 3 예(10%)였다. Y-특이 염기서열이 동정된 Turner 증후군 환자의 핵형은 전형적인 45,X 가 1예(증례 1번), 45,X[9]/46,X,i(X)(q10)[1]/46,XX[10]가 1예(증례 3번)와 46,X,i(X)(q10)가 1예(증례 5번)였다. 증례 1번은 SRY에만 증폭되었고, 증례 3번은 AMGL과 Y1.1-1.2에 증폭되었으며, 증례 5번은 SRY, AMGL과 Y1.1-1.2에 증폭되었다. DYZ1-B에는 증폭된 예가 없었으며 표식 염색체를 동반한 3 예와 환상 염색체를 가진 4 예의 환자에서는 Y-특이 염기서열이 증폭되지 않았다.

대상환자 30 예중 9 예에서만 초음파에서 흔적 성선(rudimentary gonad)이 관찰되었고, 성선의 조직검사까지 실시한 경우는 없었다. 증례 3번은 양성 생식기를 주소로 한 생후 4일된 신생아로 요도하열, 고환이 있는 우측 음낭과 질낭 이열 음낭을 동반하였고, 앞서 언급된 바와 같이 말초혈액으로 염색체검사를 실시하여, 45,

X[9]/46,X,i(X)(q10)[1]/46,XX[10]의 핵형을 보였으나, 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 AMGL과 Y1.1-1.2에 증폭되었으며, 복부 초음파상 자궁과 좌측 불하강 고환이 발견되어 성선제거술을 시행하였다.

고 찰

이형성선을 가진 환자가 Y-염색체를 가지고 있거나 Y-염색체의 전위된 분절을 가지고 있을 경우 성선모세포종이 발생할 가능성이 높은 것으로 알려져 있으며[12], 그 발생빈도는 25%내지 70%로 보고[13, 14]되고 있다. Marquez-Monter 등[15]은 이형 성선을 가진 20 예의 환자에 대해 조직학적 연구를 하였는데, 이중 2 예의 환자에서 성선모세포종이 발생하였고 2 예 모두에서 Y-염색체를 발견하였으며 Y-염색체가 생식세포의 이상 분화에 관여하여 성선모세포종이 발생한다고 주장을 하였다. 전형적인 'mixed-genesis'를 가진 환자는 양성의 생식기, 한쪽에 이형 고환, 다른 쪽에 흔적 성선을 가지고 있으며 염색체검사상 45,X/46,XY 핵형을 보이는 경우로서 성선모세포종의 발생 빈도가 가장 높은 환자로 알려져 있다. 이들 환자군에서 성선모세포종의 발생 위험도는 연령이 증가할수록 높아져 30 대에는 50%~70%, 40 대에는 80% 정도인 것으로 알려져 있으므로 조기에 성선제거술을 실시하는 것이 좋다[16, 17].

Sinisi 등[18]은 이형성선을 가진 Turner 증후군 환자에서 성선모세포종이 발생한 4 명의 환자를 보고하였는데, 이들은 염색체검사법으로는 Y-염색체가 동정되지 않았다. 이들 환자의 경우는 분자생물학적 방법으로 Y-염색체 또는 Y-염색체 유래의 유전물질을

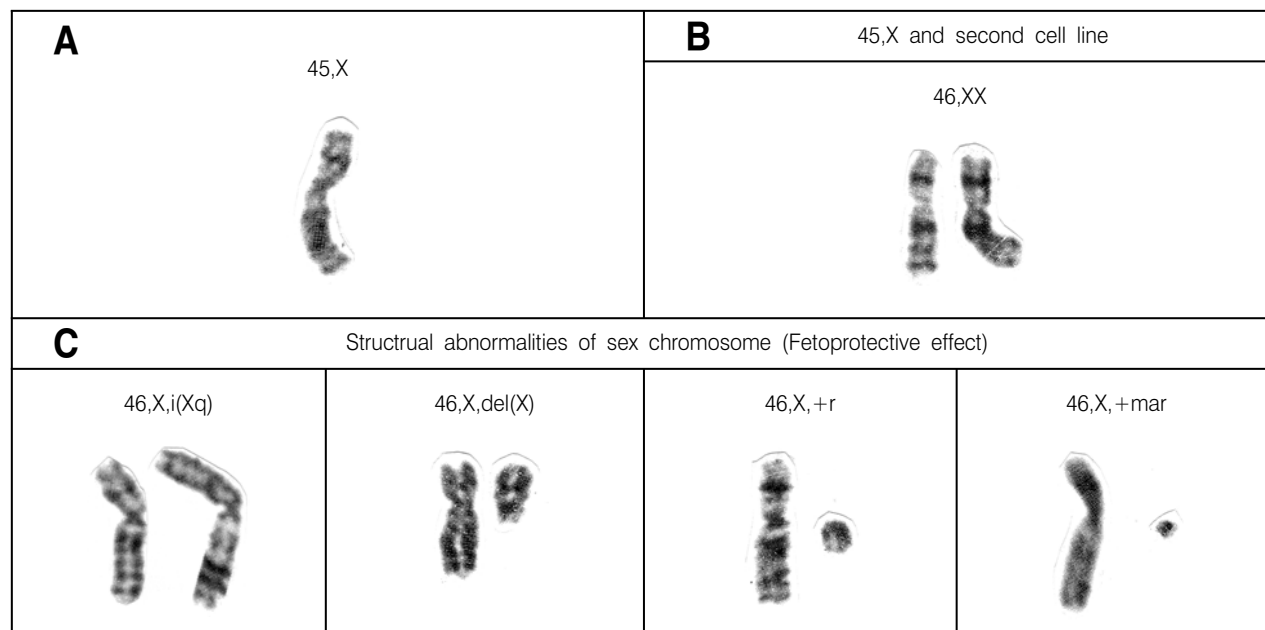
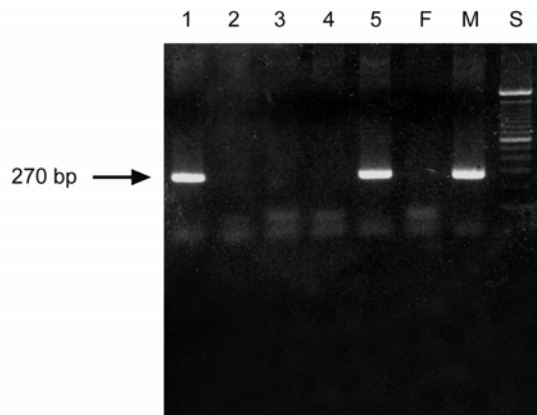
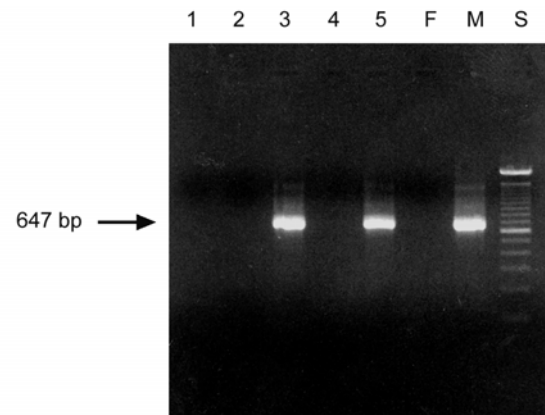


Fig. 2. Schematic presentation of partial karyotypes in Turner syndrome patients. (A) Classic 45,X, (B) Mosaic type with 45,X and 2nd cell lines (46,XX), (C) Various structural abnormalities of sex chromosome with fetoprotective effect.

Table 3. Summary of karyotype, Y-specific sequence amplification and ultrasonographic finding of the 30 Patients with Turner syndrome

Patients	Age	Karyotype	External genitalia	Y-specific sequence amplification				Ultrasonographic finding
				SRY	AMGL	Y1.1.-1.2	DYZ1	
1	18	45,X	Female	+	-	-	-	Unchecked
2	16	45,X	Female	-	-	-	-	Unchecked
3	4일	45,X/46,X,i(X)(q10)/46,XX	Ambiguous genitalia	-	+	+	-	Rt rudimentary testis, Lt abdominal undescended testis, ovary
4	20	45,X,t(4;13)	Female	-	-	-	-	Unchecked
5	23	46,X,i(X)(q10)	Female	+	+	+	-	Unchecked
6	21	45,X/46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Unchecked
7	22	45,X	Female	-	-	-	-	Unchecked
8	18	45,X/46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Unchecked
9	18	45,X	Female	-	-	-	-	Unchecked
10	17	46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Agenesis of ovary and uterus
11	10	45,X	Female	-	-	-	-	Rudimentary uterus, both ovary(-)
12	26	46,X,del(X)	Female	-	-	-	-	Hypoplastic uterus, Rt ovary(-)
13	17	45,X/46,X,+r	Female	-	-	-	-	Unchecked
14	20	45,X/47,XXX	Female	-	-	-	-	Unchecked
15	33	45,X/46,X,+mar	Female	-	-	-	-	Unchecked
16	8	45,X/46,X,+r	Female	-	-	-	-	Unchecked
17	2	46,X,+mar	Female	-	-	-	-	Unchecked
18	9	45,X/46,XX	Female	-	-	-	-	Unchecked
19	30	46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Unchecked
20	24	46,X,del(X)	Female	-	-	-	-	Uterus(-), Both ovary(-)
21	5	45,X/46,X,+r	Female	-	-	-	-	Unchecked
22	29	45,X/46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Rudimentary uterus, both ovary(-)
23	28	45,X	Female	-	-	-	-	Unchecked
24	13	45,X/46,X,+r	Female	-	-	-	-	Uterus(-), Both ovary(-),
25	9	45,X/46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Unchecked
26	16	46,X,+mar	Female	-	-	-	-	Uterus(-), Both ovary(-)
27	23	45,X/46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Hypoplastic uterus, both ovary(-)
28	28	45,X/46,XX	Female	-	-	-	-	Unchecked
29	30	46,X,i(X)(q10)	Female	-	-	-	-	Unchecked
30	1	45,X	Female	-	-	-	-	Unchecked

**Fig. 3.** Gel electrophoresis of the PCR product of Yp-specific sequences of SRY marker: Lane 1 and 5; 270 bp PCR products from case 1 and 5, Lane 2,3 and 4; absence of 270 bp PCR products from case 2,3 and 4, F; absence of 270 bp PCR products from normal female control (negative control), M; 270 bp PCR products from normal male control (positive control), S; DNA size marker (repeat of a 100bp DNA).**Fig. 4.** Gel electrophoresis of the PCR product of Yp-specific sequences of AMGL marker: Lane 1,2 and 4; absence of 647 bp PCR products from case 1, 2 and 4, Lane 3 and 5; 647 bp PCR products from case 3 and 5, F; absence of 647 bp PCR products from normal female control (negative control), M; 647 bp PCR products from normal male control (positive control), S; DNA size marker (repeat of a 100bp DNA).

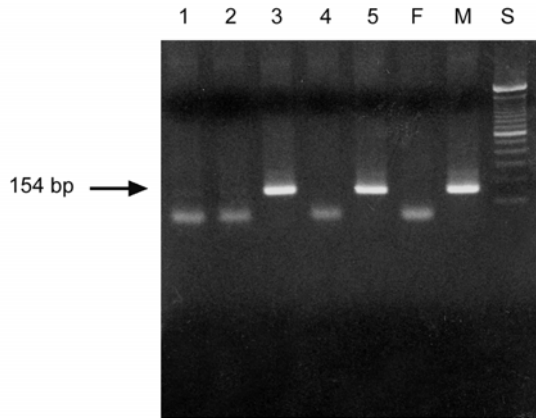


Fig. 5. Gel electrophoresis of the PCR product of Yq-specific repeat sequences of Y1.1-1.2 marker: Lane 1,2 and 4; absence of 154 bp PCR products from case 1,2 and 4. Lane 3 and 5; 154-bp PCR products from case 3 and 5, F; absence of 154 bp PCR products from normal female control(negative control), M; 154 bp PCR products from normal male control(positive control), S; DNA size marker (repeat of a 100bp DNA).

동정하지 않았기 때문에 확실한 것은 알 수 없었지만 Turner 증후군 환자에서 Y-염색체가 존재하지 않으면 성선모세포종이 발생할 확률은 거의 없다고 추측하였다. 또한 성선이발생증을 동반한 Turner 증후군 환자에서 성선모세포종 발생을 유도하는 인자는 GBY 유전자라는 가설이 있었으며, Y-염색체의 부분 결손을 가진 환자와 성선모세포종을 가진 환자에서 Y-DNA 보합결합에 의한 방법으로 GBY 유전자가 Y-염색체의 단완 혹은 중심체 근처에 위치한다는 사실이 밝혀졌다[7, 19]. Y-염색체 단완에는 남성 생식선 분화에 중요한 역할을 하는 유전자들이 존재하고 있음이 밝혀지고 있는데[20, 21], SRY는 사람의 고환 결정인자(testis-determining factor, TDF)로 알려져 있다. 이러한 가설은 여성 생쥐(XX)에 생쥐의 TDF인 Sry 유전자를 주입함으로써 남성 생쥐(XY)로 전환된다는 실험으로써 증명되었다[22]. 또한 인간에 있어서 난포는 존재하고 고환 조직은 존재하지 않는 46,XY 여성에서 돌연변이된 SRY 유전자가 발견되었고, SRY 유전자가 존재하지 않는 46,XX 환자에서 진성 반음양이 많이 발생한다는 현상 등이 SRY 유전자가 남성 생식선 분화에 관여한다는 사실을 뒷받침 해주고 있다[20, 21].

Y-특이 염기서열을 동정하는 분자생물학적 방법으로는 서던 블롯팅법과 중합효소연쇄반응법이 있다. 이중 중합효소연쇄반응법이 예민도가 높고 간편, 신속하여 임상검사에서 가치가 높으며, 이형성선을 동반한 환자에서 Y-염색체 존재여부를 확인함으로써 성선모세포종 발생가능성을 조기에 예측하여 이들 환자의 치료 방침을 결정하는데 효과적인 방법으로 알려져 있다[23-26]. Coto 등[24]은 18 예의 Turner 증후군 환자에서 중합효소연쇄반응으로 Y-염색체 단완의 특이 염기서열을 동정한 결과 11 예가 특이 염기서열의 증폭을 보였고, 이중 6 예에서 성선이발생증의 소견을 보여 성선 제거술을 실시하였다고 보고하였다.

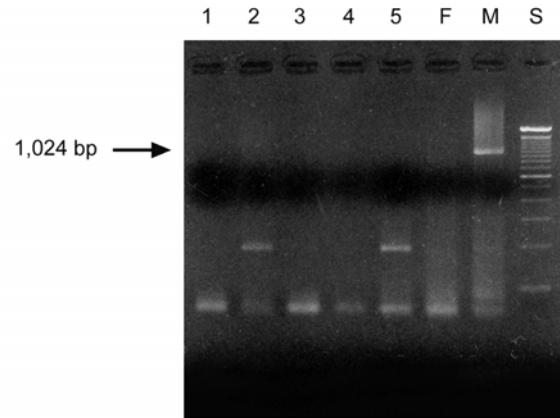


Fig. 6. Gel electrophoresis of the PCR product of Yq-specific sequences B fragment of DYZ1 marker: Lane 1 to 5; absence of 1024 bp PCR products from case 1 to case 5, F; absence of 1024 bp PCR products from normal female control (negative control), M; 1024 bp PCR products from normal male control (positive control), S; DNA size marker (repeat of a 100bp DNA). All patients with Turner syndrome had no amplified 1024 bp PCR product of Yq-specific sequences B fragment of DYZ1 marker.

이 연구에서는 i(X)(q10)의 핵형을 보유한 2 예와 45,X를 보유한 1 예에서 Y-특이 염기서열이 동정되었는데, i(X)(q10)을 가진 2 예에서는 이 등원염색체(isochromosome)에 Y-염색체가 전위되었을 가능성이나 Y-염색체의 'low-grade' 모자이크형을 생각해볼 수 있었는데, 전자의 가능성에 대해서는 fluorescence in situ hybridization에 의한 조사가 필요하다고 생각한다. 45,X 핵형을 가진 증례 1번의 경우 Y-특이 염기서열이 중합효소연쇄반응법으로 동정된 점은, Y-염색체의 'low-grade' 모자이크형일 가능성을 시사한다. 이는 구조 이상을 동반한 X 또는 Y-염색체는 매우 불안정하여 분열과정에서 소실되기 때문이며, 염색체검사로 45,X 핵형으로 오판되는 경우가 많다[25]. Medlej 등[26]은 45,X 핵형을 가진 40 예의 환자중 1 예에서, Kocova 등[23]은 18 예 중 6 예에서 Y-특이 염기서열이 증폭되었다고 보고 하였으며 이들은 주장하기를 45,X 핵형을 가진 환자에서 Y-염색체의 존재가 강력히 의심 될 때는 염색체검사에서 90개 이상의 중기세포를 관찰해야 한다고 주장하였다. 그러나 이 연구에서는 증례 1번의 경우 중기세포수가 적어 50개의 중기세포만을 관찰하였으나 Y-염색체를 발견하지는 못하였다.

이 연구에서는 SRY, AMGL, Y1.1-1.2 및 DYZ1-B 등의 Y-특이 염기서열을 중합효소연쇄반응법으로 동정하였다. SRY는 X-Y 상동영역인 pseudoautosomal boundary인 Yp 11.3에 위치하고 있고 남자의 생식선 발달에 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있다[20, 27]. AMGL은 Y-염색체의 중심체 부근에 있고 여성에 있어 ameglonin gene (AMG)과 상동성을 보이는 남성 특이 유전자 및, 유전자 성장인자로 알려져 있으며[28] Y1.1-1.2와 DYZ1-B는 Y-염색체 장완의 heterochromatic region의 중요한 부위를 차지하고 있고, DYZ1 family의 중요한 반복염기서열인 pHY10의 일부로 분류된다[29, 30].

이 연구의 증례 3번과 증례 5번은 동일한 DYZ1 family에 속하는 Y1.1-12와 DYZ1-B 중에서 Y1.1-12만 증폭되고 DYZ1-B는 증폭되지 않았는데, 그 이유는 DYZ1 부위에 변이나 결손의 가능성을 고려할 수 있었으나, 표지자에 따른 중합효소연쇄반응법의 증폭효율 차이에 기인하였을 가능성도 배제할 수 없었다.

Bisat 등[31]은 이형성선을 가진 45,X 핵형의 Turner 증후군 환자에서 Y-염색체의 존재 여부를 말초혈액, 피부조직과 성선조직에 대해 Y-특이 염기서열을 이용하여 비교 연구한 결과, 말초혈액에서는 Y-특이 염기서열이 동정되지 않았지만, 피부조직과 성선조직에서는 Y-특이 염기서열이 동정되었다고 보고 하였다. 따라서 말초혈액만으로는 Y-염색체의 모자이크형을 완전히 배제할 수 없다고 주장하고 피부조직이나 성선조직을 이용하여 정확한 분자생물학적 규명이 반드시 필요하다고 주장하였다. 이 연구에서는 Y-특이 염기서열이 존재할 것으로 기대되었던 표식 염색체에서 이 표지자의 증폭이 없었는데, 이러한 현상은 상기한 조직에 따른 차이일 수도 있었으나 표식 염색체의 유래가 Y-염색체가 아니거나, 조사한 Y-특이 염기서열 이외의 Y-염색체의 분절을 보유하였을 가능성도 배제할 수 없었다.

Coto 등[24]은 SRY 단독으로는 Turner 증후군 환자에서 Y-염색체 단완의 존재여부를 확실히 나타낼 수는 없다고 주장하였다. 이 연구에서도 증례 3번의 경우 성선 이형성증이 동반된 환자였으므로 SRY 증폭을 기대하였으나 SRY가 증폭되지 않았으며 Y-염색체 단완의 AMGL과 장완의 Y1.1-1.2가 증폭되었다.

이 연구에는 포함되지 않았으나 전형적인 Turner 증후군의 임상양상을 보이지 않고, 일차적 무월경을 주소로 본원을 내원하여 실시한 복부 초음파촬영에서 자궁이 관찰되지 않았고, 정상 양쪽 난소가 관찰된 21세의 여자환자를 대상으로 염색체검사를 실시하여 46,X,+mar의 핵형을 보였으며 이 표식 염색체가 SRY, AMGL, Y1.1-1.2과 DYZ1-B에 모두 증폭이 되어 유래가 Y-염색체 유래였음을 알 수 있었다.

이 연구에서 Turner 증후군 환자에 대해 피부조직 혹은 성선 조직검사를 실시하지 못하였으며 이 환자들에 대한 장기적인 추적조사가 없어서, Y-특이 염기서열의 존재와 성선모세포종 발생 위험도와의 관계를 알 수 없었지만, Turner 증후군 환자에서 이형성선을 동반하여 Y-염색체나 Y-염색체 유래의 유전물질의 존재가 의심되지만, 기존의 염색체검사방법으로 이를 동정할 수 없는 경우에, 중합효소연쇄 반응을 이용함으로써 Y-특이 염기서열을 동정할 수 있을 것이라고 생각되어진다.

이상의 결과로서 PCR 검사는 Y-특이 염기서열을 동정하는데 유용하고 간단한 방법으로 생각되며, Turner 증후군 환자에서 Y-염색체 유래의 유전물질이 존재 하는 경우에 성선모세포종 발생 위험을 예측하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

배경 : Turner 증후군환자가 Y-특이 염기서열을 보유하고 있

면 흔적 성선에서 성선모세포종이 발생할 가능성이 있다고 알려져 있다. Y-특이 염기서열은 염색체검사상 그 유래를 밝힐 수 없는 표식 염색체에 존재하는 경우가 많고, 이 염색체는 흔히 세포분열 과정에서 소실되어 염색체검사로 그 존재를 증명할 수 없는 경우가 있다. 이에 이 연구에서는 염색체검사로 Turner 증후군 환자의 핵형을 분석하고 중합효소연쇄반응을 이용하여 Y-특이 염기서열을 동정하고자 하였다.

방법 : 대상은 1992년 1월부터 1997년 2월까지 계명대 동산의료원 임상병리과에 유전성질환을 의심하여 염색체 검사가 의뢰된 2,900 명중 Turner 증후군으로 확진된 30 명의 환자로 하였다. 염색체검사에서는 환자의 말초혈액의 림프구를 phytohaemagglutinin으로 자극한 후 72 시간 배양하여, trypsin 처리 없이 Wright 염색액으로 G-분염을 시행하였다. Y-특이 염기서열의 동정은 Y-염색체 단완의 SRY와 AMGL과 Y-염색체 장완의 Y1.1-1.2과 DYZ1-B 등의 4 가지 표지자에 대해 중합효소연쇄반응법으로 실시하였고, 검체는 말초혈액 혹은 염색체검사 후 보관하였던 세포침사를 사용하였다.

결과 : 염색체검사에서 Turner 증후군 환자의 핵형은 전형적인 45,X 이외에 46,X,i(X)(q10), 46,X,+r, 46,X,+mar, 46,X,del(X) 같이 구조적 이상을 동반한 경우와 모자이크형 등으로 다양하였으며 Y-염색체의 존재가 확인된 예는 없었다. 중합효소연쇄반응으로 Y-특이 염기서열이 동정된 환자는 모두 3 예(10%)로 1 예는 45,X의 핵형으로 SRY에만 증폭이 되었고, 1 예는 46,X,i(X)(q10)의 핵형을 가지고 SRY, AMGL과 Y1.1-1.2에 증폭이 되었다. 1 예는 45,X[9]/46,X,i(X)(q10)[1]/46,XX [10]의 핵형으로 AMGL과 Y1.1-1.2에 증폭 되었으며 복부 초음파 검사상 고환이 발견되어 성선제거술을 시행하였다. DYZ1-B에 증폭된 예는 없었다.

결론 : 이상의 결과로서 중합효소연쇄반응검사는 Y-특이 염기서열을 동정하는데 유용하고 간단한 방법으로 생각되며, Turner 증후군 환자에서 Y-염색체 유래의 유전물질이 존재하면 속발할 가능성이 있는 성선모세포종 발생 위험을 예측하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Kleczkowska A, Dmoch E, Kubien E, Fryns JP, Van den Berghe H. Cytogenetic series of 478 patients with Turner syndrome. *Genet Couns* 1990; 1: 227-33.
- 박헌찬, 전효진, 이문희, 박수진, 최귀진, 전동석 등. Turner 증후군 태아의 생존에 관한 세포유전학적 분석. *대한임상병리학회지* 1995; 15: 677-84.
- Verp MS, Simpson JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 25: 191-218.
- De Arce MA, Costigan JR, Lawler M, Humphries P. Future evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of the gonadoblastoma in Y-bearing mosaic Turner syndrome. *Clin Genet* 1992; 41: 28-32.
- Wegner RD, Scherer G, Pohlschmidt M, L'Allemand D, Gal A.

- Ring Y chromosome: cytogenetic and molecular characterization. *Clin Genet* 1992; 42: 71-5.
6. Nagafuchi S, Tamura T, Nakahori Y, Takano K, Nishi Y, Iwatani N, et al. The majority of the marker chromosome in Japanese patient with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosome. *Hum Genet* 1992; 89: 590-2.
 7. Page DC. Hypothesis: Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 1987; 101(suppl): 151-5.
 8. Verma RS, Babu A, ed. *Human chromosomes: Manual of basic techniques*. 1st ed. New York: Pergamon Press, 1989: 4-51.
 9. 김영재, 전효진, 전동석, 김재룡, 하경임. 염색체이상 107예에 대한 분석. *대한임상병리학회지* 1992; 12: 47-66.
 10. Mitelman F, ed. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (1995), S. Memphis Tennessee USA. Karger Publishers Inc. 1995: 1-114.
 11. Nakahori Y, Tamura T, Nakafuchi S, Fujieda K, Minowada S, Fukutani K, et al. Molecular cloning and mapping of 10 new probe on human Y chromosome. *Genomics* 1991; 9: 765-9.
 12. Isurugi K, Aso Y, Ishida H. Prepubertal XY gonadal dysgenesis. *Pediatrics* 1977; 59: 569-73.
 13. Jones HW, Ferguson-Smith MA, Heller RH. The pathology and cytogenetics of gonad. *Obstet Gynecol* 1963; 87: 578-600.
 14. Manuel M, Katayama KP, Jones HW. The age of occurrence of gonadal tumors in intersex patients with a Y chromosome. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 124: 293-300.
 15. Marquezu-Monter H, Armendae S, Buentello L. Histopathologic study with cytogenetic correlation in 20 cases of gonadal dysgenesis. *Am J Clin Pathol* 1972; 57: 449-56.
 16. Schellhas HF. Malignant potential of dysgenetic gonad. *Obstet Gynecol* 1974; 44: 298-309.
 17. Donahoe PK, Crawford JD, Hendren WH. Mixed gonadal dysgenesis, pathogenesis and management. *J Pediatr Surg* 1979; 14: 287-300.
 18. Sinisi AA, Perrone L, Quarto C, Barone M, Bellastella, A Faggiano M. Dysgerminoma in 45,X Turner syndrome: report of a case. *Clin Endocrinol* 1988; 28: 187-93.
 19. Magenis RE, Tochen ML, Holahan KP, Carey T, Allen L, Brown MG. Turner syndrome resulting from partial deletion of Y chromosome short arm localization of male determinants. *J Pediatr* 1984; 105: 916-9.
 20. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348: 448-50.
 21. Jäger RJ, Anvert M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 1990; 348: 288-94.
 22. Koopman M, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117-21.
 23. Kocova M, Siegel SF, Wenger SL, Lee PA, Trucco M. Detection of Y chromosome sequences in Turner syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 1993; 342: 140-3.
 24. Coto E, Joaquin FTI, Maria J, Menendez, Hernando I, Plascencia A, et al. PCR-based study of presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 57: 393-6.
 25. Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, et al. Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet* 1995; 48: 6-11.
 26. Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P, Belon C, Leheup B, Toubanc JE, et al. Screening for Y-derived sex determining gene SRY in 40 patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1289-92.
 27. Nakagome Y, Seki S, Fukutani K, Nakafuchi S, Nakahori Y, Tamura T. PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet* 1991; 41: 112-4.
 28. Nakagome Y, Seki S, Nakafuchi S, Nakahori Y, Sato K. Absence of fetal cells in maternal circulation at level of 1 in 25000. *Am J Med Genet* 1991; 40: 506-8.
 29. Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of tandem array of pentanucleotides. *Nucl Acids Res* 1986; 14: 7569-80.
 30. Nakagome Y, Nakafuchi S, Seki S, Nakahori Y, Tamura T, Yamada M, et al. A repeat unit of the DYZ1 family on the human Y chromosome consist of segments with partial male-specificity. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 56: 74-7.
 31. Bist T, May K, Litwer S, Broecker B. Y chromosome mosaicism in the gonads, but not in the blood, of a girl with the Turner phenotype and virilized external genitalia. *Clin Genet* 1993; 44: 142-5.