STR 검사에서 관찰된 모자이시즘 사례

유하은¹ · 이상원^{1,2}
이승덕^{1,3} · 조소희³

¹서울대학교 의과대학 법의학교실

²서울대학교병원 병리과

³서울대학교 의학연구원
법의학연구소

Received: November 16, 2021

Revised: November 25, 2021

Accepted: November 29, 2021

Correspondence to

Sohee Cho

Institute of Forensic and
Anthropological Science, Seoul
National University College of
Medicine, 103 Daehak-ro, Jongno-gu,
Seoul 03080, Korea

Tel: +82-2-740-8359

Fax: +82-2-764-8340

E-mail: ssoya311@snu.ac.kr

Investigation of Mosaicism Detected in STR Typing

Haeun You¹, Sang Won Lee^{1,2}, Soong Deok Lee^{1,3}, Sohee Cho³

¹Department of Forensic Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea, ²Department of Pathology, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea, ³Institute of Forensic and Anthropological Science, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Short tandem repeats (STRs) are the most popular markers for human identification in forensics. These markers can be easily analyzed through a multiplex polymerase chain reaction and electrophoresis and provide high discrimination power. However, in STR analysis, several atypical phenomena can be observed such as allelic dropouts, drop-ins, or imbalance, which may be due to DNA polymerase slippage or DNA degradation effects. The observed atypical STR profiles can also provide information for mixed DNA samples or chromosomal abnormalities. In this study, we report a case of mosaicism detected in routine casework of paternity testing. Hair samples from a phenotypically normal male were tested, and the result presented a typical STR profile of a female for the amelogenin gene (XX). Through chromosome analysis using peripheral blood, it was found that 45,X/46,XY mosaicism resulted in the discrepancy between the genotype and the phenotype. In addition, the amount of Y chromosome detected was particularly low in hair compared to that in blood. This study shows that mosaicism can make interpretation difficult during STR analysis and suggests that sample types and repeated analysis should be considered even for routine STR testing.

Key Words: Short tandem repeats; Mosaicism

서론

일반적으로 법의학 분야에서는 개인을 식별하기 위해 유전자에서 나타나는 유전적 다형성을 확인한다. 특히 2-7개의 염기가 반복되는 짧은연쇄반복(short tandem repeat, STR)은 범죄 사건과 관련된 유전자 감식이나 친자 감정 등을 이유로 진행되는 유전자 검사에서 주요한 표식자로서 이용되어 왔다.

STR은 polymerase chain reaction (PCR)과 전기영동을 통해 간편하게 분석할 수 있고, multiplex 방식을 이용한 증폭 방법이 개발됨에 따라 여러 좌위를 동시에 분석할 수 있게 됨으로써 비교적 높은 식별력을 유지하고 있다.

그러나 STR 검사에서는 유전적 다형성이 생기는 기전과 유사한 이유로 polymerase slippage 등에 의한 allele drop-in이나 drop-out, 대립유전자 불균형(allelic imbalance) 등

여러 비전형적인 현상이 관찰될 수 있다. 낮은 농도의 시료의 경우 특히 PCR 과정에서 발생하는 확률적 영향(stochastic effect)으로 인해 해당 현상들이 발생할 가능성이 높다. DNA의 양이 적으면 PCR 프라이머가 DNA 주형 전체와 지속적으로 혼성화되기 어렵기 때문에, 두 개의 대립유전자가 존재하는 이형접합 좌위의 경우 불균형한 양의 복제 산물이 생성될 수 있다. 이는 대립유전자 피크(peak) 높이의 불균형을 유발하고, 심할 경우 특정 대립유전자가 drop-out되도록 한다[1]. 사건 현장 증거물에서 얻어지는 DNA는 환경에 의한 분해 등을 이유로 적은 양으로 존재하는 경우가 많기 때문에 STR 검사 과정에서 발생할 수 있는 다양한 현상들을 예측하고 이를 이해하는 것이 매우 중요하다.

한편, 대립유전자의 수나 피크 높이의 비율이 보편적인 단일 시료의 형태와 다르게 나타난 STR 검사 결과는 시료에 여러 DNA가 혼합되어 있거나 염색체 이상이 발생하였다는 정보를 제공하기도 한다. 혼합된 시료의 STR 검사 결과에서는 전반적인 STR 좌위에서 비전형적인 개수의 대립유전자가 존재하거나 이형접합 대립유전자들이 불균형한 높이로 관찰된다. 염색체 이상에 대한 정보는 특정 좌위에서 얻을 수 있는데, 예를 들어 21번 염색체가 3개 존재하는 다운 증후군은 D21S11 좌위에서 나타나는 대립유전자의 형태로 확인할 수 있고 성염색체 이상인 XYY 증후군이나 클라인펠터 증후군 등은 성별 확인을 위해 선택된 상염색체나 성염색체 좌위의 관찰을 통해 판단할 수 있다[2-4].

현재 법의 실무에서 사용되고 있는 여러 상용화된 STR 검사 키트는 대부분 피검사자의 성별을 확인할 수 있는 amelogenin 유전자를 함께 검사할 수 있도록 고안되어 있다. Amelogenin 유전자는 X 염색체와 Y 염색체에 대해 길이의 차이를 보이기 때문에 길이 다형성을 검사하는 방법으로 남성과 여성을 구분하기에 용이하며, 검사하는 유전자의 길이가 비교적 짧아 검사가 효율적이다. 다만, 다른 유전자에서와 마찬가지로 amelogenin 유전자 역시 다양한 변화를 보이는 것으로 알려져 있고, 이는 피검사자의 성별을 잘못 판단하게 되는 원인이 될 수 있다. 여러 연구에서 Y염색체의 amelogenin (AMELY)이 결실된 사례들이 보고되어왔으며 [5-8], 드물지만 PCR 프라이머 결합 서열에서의 돌연변이로 인해 X 염색체의 amelogenin (AMELX)이 증폭되지 않아 결과 해석에 혼란을 준 사례 또한 관찰되었다[9-11]. 이를 고려해 최근에는 성별의 결정을 위해 추가적으로 Y 염색체 상의 STR 유전자를 함께 검사하는 방법을 사용하고 있다.

본 연구에서는 일상적인 친자 감정을 위한 유전자 검사에서 남성의 표현형을 나타내는 피검사자가 amelogenin 유전자에 대해 여성의 유전자형(XX)을 보이는 사례를 보고한다. 피검사자의 표현형과 STR 검사에서 나타난 유전자형의 차이로 인해 해석에 어려움이 있었으나, 추가적인 검사에서 이러

한 현상은 모자이시즘(mosaicism)과 관련 있는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 이와 같은 사례의 보고를 통해 일상적으로 진행되는 유전자 검사에서 주의 깊게 관심을 기울여야 하는 요소들을 중심으로 분석하고 설명하고자 한다. 본 연구는 서울대학교 의과대학 및 서울대병원의 연구윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB)로부터 승인을 받았다(IRB No. 2108-243-1252).

증례 보고

본 연구자의 소속 기관에서 진행되는 친자감정 등의 개인식별 검사에서는 일상적으로 구강도말 방법을 통해 시료를 채취한다. 본 사례의 피검정인의 경우 검사 참여 당시 경미한 발열을 호소하여 구강도말 방법 대신 모발을 채취하여 검사를 진행하고자 하였다.

채취한 모발 시료로부터 QIAamp DNA Investigator kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 Qubit Flex Fluorometer (Invitrogen)로 정량한 후 상염색체와 Y염색체에 대한 일상적인 STR 검사를 진행하였다. 피검정인의 성별은 남성이었음에도 불구하고, PowerPlex Fusion System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용한 상염색체 STR 검사 결과 amelogenin 좌위에서 X 유전자만이 관찰되었으며 DYS391 좌위에서는 대립유전자의 결실이 확인되었다(Fig. 1A). 반면 Y-STR 검사에서 PowerPlex Y23 System (Promega), AmpFLSTR Yfiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 Yfiler Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)에 대한 반복 실험을 진행한 결과, 1 ng의 DNA에 대해 키트 각각에서 23개 중 14개, 17개 중 13개, 27개 중 10개의 좌위에서 결과가 관찰되었고 좌위의 종류는 무작위적이었다(Fig. 2). 15 ng의 DNA를 이용하여 Yfiler Plus 검사를 진행한 결과에서는 완전한 Y-STR 프로필을 얻을 수 있었다.

추가적인 검사를 위하여 피검정인에게 본 연구에 대한 설명 및 동의 과정을 거쳐 혈액 시료를 채취하고, 표현형과 유전자형 사이의 차이를 이해하고자 혈액 시료를 대상으로 핵형 분석을 진행하였다. 중기 염색체들을 GTG banding 방식으로 염색하여 염색체 이미지화 시스템인 ChIPS-Karyo (GenDix, Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 50개의 중기 상 세포에 대하여 45,X 핵형을 가지는 세포와 46,XY 핵형을 가지는 세포가 2:48의 비율로 존재함을 확인하였다(Fig. 3).

한편 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen)를 사용하여 혈액 시료로부터 DNA를 추출하고 모발과 동일한 키트를 이용하

A

B

Fig. 1. Electropherograms showing sex typing results of the amelogenin and DYS391. (A) A part of the PowerPlex Fusion profile obtained from Hair DNA. (B) A part of the PowerPlex Fusion profile obtained from Blood DNA.

여 상염색체와 Y염색체 STR 검사를 진행한 결과에서는 모두 정상 남성의 유전자형이 관찰되었다. 상염색체 STR 검사의 경우 amelogenin 유전자에 대해 남성의 유전자형(XY)이 관찰되었고, DYS391 좌위에도 피크가 관찰되었다(Fig. 1B). Y-STR 검사에서는 1 ng의 DNA에 대해 완전한 Y-STR 프로필을 얻을 수 있었다.

이와 같은 STR 검사 결과 간의 불일치를 이해하기 위하여 추출된 DNA를 대상으로 Y 염색체 특이적 정량을 수행하였다. 정량을 위해 Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)를 사용하였는데, 이 키트는 다양한 상염색체에 위치한 small autosomal (SA) 좌위와 Y염색체에 위치한 Y-chromosome (Y) 좌위를 타겟으로하여 시료에

Fig. 2. PowerPlex Y23 profile obtained from 1 ng of hair DNA.

존재하는 총 DNA 양과 남성 DNA 양을 동시에 측정할 수 있도록 한다. 반응은 QuantStudio 5 (Applied Biosystems)에서 실시하였고, 모발 1과 모발 1을 희석한 모발 2와 하나의 혈액 DNA에 대해 각각 세 번씩 반복하였다. SA 좌위의 측정 결과 모발 1, 모발 2, DNA 농도가 평균 1.5215 ± 0.0373 ng/ μ L, 0.2954 ± 0.0313 ng/ μ L, 0.2985 ± 0.0083 ng/ μ L임을 확인하였다. Y 좌위의 경우, 모발 1에서는 평균 0.0086 ± 0.0024 ng/ μ L, 모발 2에서는 평균 0.0020 ± 0.0014 ng/ μ L로 측정되었으며, 혈액에 대해서는 평균 0.2795 ± 0.0238 ng/ μ L로 측정되었다. 일반적인 남성 DNA에서 Y 좌위에 대한 SA 좌위 측정값의 평균 비율(SA/Y)은 1.08 ± 0.18 인데[12], 본 실험의 SA/Y 값은 모발 1에서 평균 185.63 ± 42.95 , 모발 2에서 평균 205.20 ± 117.81 , 혈액에서 평균 1.07 ± 0.06 으로 측정되었

다(Table 1). 혈액의 경우 보편적인 남성의 결과와 유사하였지만, 모발의 경우 1번 시료와 2번 시료 전부에서 Y 염색체 극소량 존재하는 것으로 확인되었다.

모자이시즘이 나타난 피검자의 혈액 시료에는 45,X 핵형을 갖는 세포가 낮은 비율로 나타났기 때문에, STR 검사와 Y 염색체의 정량 결과가 일반적인 남성에서 기대되는 결과와 일치했다. 반면, 모발의 경우 정량을 통해 Y 염색체의 양이 매우 적음이 확인된 것으로 보아 46,XY 핵형에 비해 45,X 핵형을 갖는 세포의 비율이 높은 것으로 추측된다.

고 찰

모자이시즘은 발생학적으로 수정란 분열의 특정 단계에서

Fig. 3. Karyotype of peripheral blood showing mosaicism of 45,X/46,XY.

Table 1. The result of DNA quantification from hair and blood

Sample	SA (ng/ μ L)		Y (ng/ μ L)		SA/Y	
	Quantity	Mean $\pm$ SD	Quantity	Mean $\pm$ SD	Quantity	Mean $\pm$ SD
Hair I	1.5207	1.5215 $\pm$ 0.0373	0.0077	0.0086 $\pm$ 0.0024	197.51	185.63 $\pm$ 42.95
	1.4847		0.0067		221.38	
	1.5592		0.0113		137.99	
Hair II	0.3314	0.2954 $\pm$ 0.0313	0.0015	0.0020 $\pm$ 0.0014	227.74	205.20 $\pm$ 117.81
	0.2789		0.0009		310.11	
	0.2757		0.0035		77.76	
Blood	0.3076	0.2985 $\pm$ 0.0083	0.3066	0.2795 $\pm$ 0.0238	1.00	1.07 $\pm$ 0.06
	0.2965		0.2696		1.10	
	0.2914		0.2622		1.11	

SA, small autosomal target; Y, Y-chromosome target; SD, standard deviation.

염색체 절단이나 비분리로 인한 이상 세포 분열이 발생하여 서로 다른 종류의 세포가 한 개체에서 나타나는 현상이다[13]. 여러 연구에서 체세포 또는 생식세포에서 발생하는 다양한 종류의 모자이시즘을 보고하고있으며 이 중 본 사례에서 관찰된 것과 같은 45,X/46,XY 모자이시즘 또한 드물게 관찰되어왔다. 45,X/46,XY 모자이시즘은 출생 전 진단된 경우 90%가 정상적인 남성 표현형을 나타내는 반면, 출생 후 진단되는 경우에는 핵형의 비율과 무관하게 광범위한 표현형을 나타낸다고 알려져 있다[14]. 출생 후 진단된 사례에서는 터너 증후군(Turner syndrome), 혼합생식샘발달장애(mixed gonadal dysgenesis), 남성 가성반음양증(male pseudohermaphroditism)과 같은 표현형을 보이거나, 일반적인 정상 남성의 표현형을 나타내기도 한다[14-17]. 실제로

한 연구에서는 46,XY 핵형이 우세하지만 터너 증후군 표현형을 나타내는 증례를 보고하였으나[17], 본 사례의 대상자는 46,XY 핵형이 우세한 45,X/46,XY 모자이시즘을 가지면서 정상 남성의 표현형을 나타냈다.

한편 본 사례에서는 혈액과 모발 시료에 대해 서로 다른 실험 결과가 나타났다. 모발에 대해 진행한 STR 검사에서는 여성의 유전자형이 관찰되었으나 혈액에 대한 검사에서는 정상 남성의 결과가 관찰되었으며, 추가 실험에서 이는 모발 DNA에 Y 염색체가 특히 적은 양으로 존재하기 때문임을 발견하였다. 모발에서는 핵형 분석을 통해 모자이시즘을 직접 확인할 수 없으나 혈액에서 확인된 모자이시즘을 바탕으로 45,X의 핵형을 갖는 세포가 우세한 상태인 것으로 추측된다. 모발에 포함된 적은 양의 DNA는 분해되기 쉽고, 모발 색소인 멜

라닌(melanin)이 PCR을 억제하며, 햇빛 등에 자주 노출되어 있기 때문에 DNA의 분석이 어렵다고 알려져 있다. 특히 휴지기 모근(telogen hair root)이나 모간(hair shaft)의 경우에서 이러한 현상이 심하게 나타난다[18]. 본 연구에서는 모근(hair root)에 비해 모간의 비율이 높은 모발 시료를 사용하여 실험을 진행하였기 때문에 특히 혈액과 차이가 나타났을 것으로 추측한다. 또한, 앞서 언급했듯[1], STR 검사 과정에서 부정확한 결과를 초래할 수 있다. 본 사례의 모발 시료에는 45,X 핵형을 가진 세포가 우세하여 정상 남성에 비해 Y 염색체가 상대적으로 적은 양 존재하였으므로 확률적 영향으로 인해 AMELY의 결실과 DYS391 좌위의 drop-out이 눈에 띄게 관찰되었을 것이다.

성별과 같은 기본적인 정보는 일상적인 STR 검사에서뿐만 아니라 범죄 수사 목적의 유전자 감식에서 필수적이므로, 검사에 영향을 끼칠 수 있는 다양한 요인들을 고려하고 결과를 면밀히 살피는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 일상적인 STR 검사에서 표현형과 유전자형으로 보여지는 성별 사이에 불일치가 나타났기 때문에 핵형분석을 통해 모자이시즘을 관찰할 수 있었다. 그러나 모자이시즘을 갖더라도 표현형과 유전자형이 나타내는 성별에 차이가 없는 경우 STR 검사에서는 모자이시즘이 관측되지 않을 수 있다. 본 사례에서는 유전자 검사가 모발에 대해 진행되었기 때문에 여성의 유전자형(XX)이 확인되어 모자이시즘을 관측할 수 있었으며, 이는 검사하는 시료의 종류에 따라 관측 여부가 달라질 수도 있음을 시사한다. 따라서 STR 검사에서는 시료에 따른 차이가 발생할 수 있음을 유의하고 임상적으로 성염색체 이상이 의심되는 경우에는 여러 부위의 시료를 이용하거나 검사를 반복하여 정확한 결과를 도출해야 한다. 또한, 추가적인 연구를 통해 모발 이외에도 이와 유사한 경우가 있는지를 확인해 볼 필요도 있다. 본 연구에서는 STR 검사를 통해 관측된 모자이시즘 사례의 보고를 통해 STR의 기본 속성을 정확히 이해하여 일상적인 STR 검사에서도 검사 결과를 주의 깊게 관찰해야 함을 강조하는 바이다.

ORCID: Haeun You: <https://orcid.org/0000-0002-7972-8197>; Sang Won Lee: <https://orcid.org/0000-0001-6264-7860>; Soong Deok Lee: <https://orcid.org/0000-0003-4270-4279>; Sohee Cho: <https://orcid.org/0000-0001-5764-5705>

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

1. Timken MD, Klein SB, Buoncristiani MR. Stochastic sampling effects in STR typing: Implications for analysis and interpretation. *Forensic Sci Int Genet* 2014;11:195-204.
2. Honda K, Tun Z, Matoba R. DNA testing of Klinefelter's syndrome in a criminal case using XY chromosomal STR multiplex-PCR. *J Forensic Sci* 2001;46:1235-8.
3. Liou JD, Chu DC, Cheng PJ, et al. Human chromosome 21-specific DNA markers are useful in prenatal detection of Down syndrome. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:319-23.
4. Young DR, Tun Z, Honda K, et al. Identifying sex chromosome abnormalities in forensic DNA testing using amelogenin and sex chromosome short tandem repeats. *J Forensic Sci* 2001;46:346-8.
5. Roffey PE, Eckhoff CI, Kuhl JL. A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *J Forensic Sci* 2000;45:1016-9.
6. Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int J Legal Med* 2002;116:121-3.
7. Steinlechner M, Berger B, Niederstätter H, et al. Rare failures in the amelogenin sex test. *Int J Legal Med* 2002;116:117-20.
8. Michael A, Brauner P. Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. *J Forensic Sci* 2004;49:258-9.
9. Caratti S, Voglino G, Cirigliano V, et al. Amplification failure of the amelogenin gene (AMELX) caused by a primer binding site mutation. *Prenat Diagn* 2009;29:1180-2.
10. Alves C, Coelho M, Rocha J, et al. The Amelogenin locus displays a high frequency of X homologue failures in Sao Tome Island (West Africa). *Int Congr Ser* 2006;1288:271-3.
11. Shadrach B, Commane M, Hren C, et al. A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. *J Mol Diagn* 2004;6:401-5.
12. Quantifiler HP and Trio DNA Quantification Kits, user guide [Internet]. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific; 2014-2018 [cited 2021 Oct 6]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>.
13. Hsu LY, Perlis TE. United States survey on chromosome mosaicism and pseudomosaicism in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 1984;4 Spec No:97-130.
14. Telvi L, Lebbar A, Del Pino O, et al. 45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases. *Pediatrics* 1999;104:304-8.
15. Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 2017;177:G1-70.
16. Layman LC, Tho SP, Clark AD, et al. Phenotypic spectrum of 45,X/46,XY males with a ring Y chromosome and bilaterally descended testes. *Fertil Steril* 2009;91:791-7.
17. Rasouli M, McDaniel K, Awadalla M, et al. Mosaic Turner syndrome presenting with a 46,XY karyotype. *Case Rep Obstet Gynecol* 2019;2019:3719178.
18. Muller K, Klein R, Miltner E, et al. Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA. *Electrophoresis* 2007;28:2835-42.