

류마티스 관절염에서 발견되는
면역글로불린 kappa 경쇄의 11개
아미노산 CDR3

연세대학교 대학원
의과학과 박사과정

박 용 범

류마티스 관절염에서 발견되는
면역글로불린 kappa 경쇄의 11개
아미노산 CDR3

지도 교수 이 수 곤

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원
의과학과

박 용 범

류마티스 관절염에서 발견되는
면역글로불린 kappa 경쇄의 11개
아미노산 CDR3

박용범의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

연세대학교에서 의학을 전공할 수 있도록 길을 열어주시고, 대학원 박사 과정까지의 긴 과정을 인도해주신 하나님께 감사드립니다.

본 연구를 계획하고 진행하는데 끊임없는 관심과 학문적인 지도로 이끌어 주신 은사 이수곤 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 연구를 진행하는데 있어 귀한 조언을 주셨던 김세종 교수님, 홍천수 교수님, 이민걸 교수님, 민유홍 교수님께 감사를 드립니다. 실험의 진행 중 어려움을 같이 했던 박민정 선생님과 김혜정 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 이 논문이 완성되기까지 참 긴 시간이었습니다. 위의 분들이 계시지 않았다면 이 논문은 완성되기 어려웠을 것입니다. 도와주신 여러 선생님들께 다시 한번 깊이 감사드립니다.

언제나 한결같은 사랑과 관심으로 기도하며 격려해 주시는 아버님, 어머님, 장모님, 늘 힘이 되며 함께 해 온 사랑하는 아내 민영, 기쁨이 되는 강빈과 신혜에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 연구 대상 및 방법	6
1. 대상 환자	6
2. Cell sorting	6
가. 단핵구 (mononuclear cell) 분리	7
나. CD19 ⁺ 세포의 분리	7
다. IgM ⁺ IgD ⁻ 세포와 IgM ⁺ IgD ⁺ 세포의 분리	8
3. Single cell PCR	10
가. Cell lysis	10
나. Primer extension DNA preamplification	11
다. Two-stage nested PCR	11
라. DNA extraction	13
4. 면역글로불린의 유전자분석 및 CDR3의 길이분석	14
III. 결 과	15
1. DNA 분리	15
2. 면역글로불린 kappa 경쇄의 single cell PCR	15
3. 면역 글로불린 kappa 경쇄의 분석	17
가. Productive sequences의 V _k family 분포	17
나. Nonproductive sequences의 V _k family 분포	18
다. Productive sequences의 V _k 유전자 사용	19
라. Nonproductive sequences의 유전자 사용	20
마. Productive sequences의 J _k family 분포	23
바. Nonproductive sequences의 J _k family 분포	24
4. 면역 글로불린 kappa 경쇄의 CDR3 길이	25
가. Productive sequences의 CDR3 길이	25
나. Nonproductive sequences의 CDR3 길이	27
다. Productive sequences의 CDR3의 N-addition	29

라. Non-productive sequences의 CDR3의 N-addition	30
IV. 고 찰	31
V. 결 론	34
참고문헌	36
영문요약	41

그림 차례

그림 1. 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수세포에 존재하는 CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ immature B 림프구	9
그림 2. 류마티스 관절염 환자와 정상인의 말초혈액에 존재하는 CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺ mature B 림프구	10
그림 3. β -actin을 이용 DNA preamplification 산물 확인	16
그림 4. Nested PCR을 통해 증폭된 second PCR 산물	16
그림 5. Productive sequences의 Vk family 분포	17
그림 6. Nonproductive sequences의 Vk family 분포	19
그림 7. Productive sequences의 Jk family 분포	24
그림 8. Nonproductive sequences의 Jk family 분포	25
그림 9. Productive sequences의 CDR3 길이 분포	26
그림 10. 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수에서 발견된 11개 아미노산으로 구성된 CDR3을 가진 immature B 림프구	27
그림 11. Nonproductive sequences의 CDR3 길이 분포	28
그림 12. Productive sequences에서 CDR3의 N-addition의 개수	29
그림 13. Nonproductive sequences에서 CDR3의 N-addition의 개수	30

표 차례

표 1. Family-specific external primers for the first stage PCR	12
표 2. Family-specific internal primers for the second stage PCR	13
표 3. V κ genes in productive sequences	21
표 4. V κ genes in nonproductive sequences	22

국문요약

류마티스 관절염에서 발현되는 면역글로블린 kappa 경쇄의 11개 아미노산 CDR3

류마티스 관절염의 병인에 있어 B 림프구는 중요한 역할을 한다. 류마티스 관절염 환자에서 발현되는 면역글로블린 kappa 경쇄를 분석해보면 말초혈액에서 11개 아미노산으로 구성된 CDR3를 가진 kappa 경쇄가 정상인에 비해 많이 발견되고 환자의 활막에서 더욱 두드러진다. 골수에서 일어나는 면역글로블린 kappa 경쇄의 유전자재조합 과정에는 TdT에 의한 N-addition이 없어 이론상 11개 아미노산 CDR3이 만들어질 수 없다고 알려져 있다. 본 연구에서는 류마티스 관절염 환자와 정상인 간의 B 림프구 발생 단계에 있어 면역글로블린 kappa 경쇄의 CDR3를 비교함으로써, 류마티스 관절염에서 발현되는 면역글로블린 kappa 경쇄의 11개 아미노산 CDR3의 생성기전에 대해 알아보하고자 하였다.

6년의 병력을 가진 혈청양성 류마티스 관절염 환자와 특이 질병력이 없었던 건강한 성인에서 골수세포와 말초혈액세포를 채취하였다. 세포 표지자인 CD19, IgM, IgD를 이용해 immature B 림프구와 mature B 림프구를 분리하여, single cell PCR과 direct sequencing을 통해 immature B 림프구와 mature B 림프구의 면역글로블린 kappa 경쇄 sequence들의 repertoire를 분석하였다.

CDR3 부위에 대부분 9개와 10개 아미노산을 함유하고 있었으나, CDR3에 11개 아미노산을 함유하는 kappa 경쇄 유전자가 류마티스 관절염 환자의 골수내 immature B 림프구와 말초 혈액의 mature B 림프구에서 모두 발견되었고, 정상인에서도 immature B 림프구와 mature B 림프구에서 모두 관찰되었다. 그러나, 11개 아미노산 CDR3를 가진 productive sequence는 류마티스 관절염 환자의 말초혈액에서는 발견된 반면 정상인의 말초혈액에서는 발견되지 않았다. 류마티스 관절염 환자와 정상인 간의 immature B 림프구의 kappa 경쇄 CDR3 부위의 아미노산 길이는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. N-addition은 류마티스 관절염 환자나 정상인의 골수 immature B 림프구와 말초 mature B 림프구에서 모두 관찰되었다.

이는 류마티스 관절염이 면역글로블린 유전자의 유전적 소인을 갖고 있는 병이

라기보다는 항원에 의해 면역반응이 유도되는 병임을 시사하는 소견으로 생각된다. 면역글로블린 kappa경쇄의 11개 아미노산 CDR3 생성에 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수에서 kappa 경쇄의 유전자 재조합 과정 중 N-addition이 기여함을 관찰하였다.

핵심되는 말: 류마티스 관절염, kappa 경쇄, 유전자 재조합, CDR3, N-addition, Single cell PCR

류마티스 관절염에서 발견되는 면역글로블린 kappa 경쇄의 11개 아미노산 CDR3

<지도 이 수 곤 교수>

연세대학교 대학원 의과학과

박 용 범

I. 서 론

류마티스 관절염은 전 인구의 대략 1%가 이환되어 있는 대표적인 만성질환으로 우리나라에도 약 40만 명의 환자가 있을 것으로 추산된다. 류마티스 관절염에 의한 관절의 기능 손실은 개인적인 일상생활의 장애와 사회적 노동력 상실, 의료비 지출의 증대 등 사회적, 경제적으로 지대한 손실을 끼친다. 뿐만 아니라 류마티스 관절염에 의한 수명의 단축 및 만성 합병증이 심각한 문제가 된다. 현재 치료에 사용되는 약제는 항염증제와 항류마티스제이다. 그러나, 이러한 약제의 사용에도 불구하고 류마티스 관절염의 치료는 불완전하다고 알려져 있다. 즉 초기에 치료를 시작하여도 20-25%의 환자에서만 관해의 기회가 있고, 일정한 관해 기간이 지나면 대부분 재발하고 있다. 뿐만 아니라, 사용되고 있는 치료약제의 부작용으로 상부 위장관 출혈, 신장 및 간장 기능장애, 감염, 면역기능장애 등이 야기된다고 알려져 있다. 따라서 부작용이 적으면서 류마티스 관절염을 완전하게 치료하는 수단의 개발은 중요한 문제로 생각되어 진다.

류마티스 관절염에 대한 치료가 불완전한 중요한 이유는 류마티스 관절염의 원인을 정확하게 모르고 있으며, 관절염이 만성화되는 기전을 완전히 이해하지 못함에 기인한다. 현재까지 류마티스 관절염을 일으키는 원인 물질들로 제시된 것으로는 외인성으로 Mycoplasma, Staphylococcus 또는 Streptococcus 등의 세균과 Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Parvo virus, Rubella 등의 바이러스, 내인성으로 제 2형 콜라젠, 류마티스 인자, MHC gene 중 HLA-DR4 등이 원인으로 주장

되었으나, 많은 연구들에도 불구하고, 현재까지 어느 한 종류의 미생물 및 내적 인자가 관절염을 일으키는 직접 요인이 되었다는 증거는 아직 없는 실정이다.¹⁻⁵ 따라서 이 질병의 근본적인 치료를 위해서는 면역학 혹은 분자 생물학적 연구를 통해 확실한 원인의 규명이 절실하게 요구된다고 하겠다.

류마티스 관절염의 원인을 밝히지 못하는 주된 이유는 아마도 원인 물질 혹은 항원이 류마티스 관절염의 발병 초기에 면역 반응을 시작시킨 후 자신은 관절 염증 조직에서 소실되었기 때문일 것으로 추정된다. 즉 최초 항원에 의하여 자극되어진 면역체계가 원인 물질 혹은 항원이 없는 상태에서 자동적으로 활막 세포 혹은 혈액으로부터 모여든 각종 염증 세포들의 자동적이고 악순환적인 염증 반응을 지속시키는 것이다. 그런데, 우리 생체에는 원인이 되었던 항원을 특이적으로 인식하고, 또 그 인식을 기억할 수 있는 면역기전이 존재한다. 그것은 T림프구의 항원 인식 분자인 T 세포 수용체와 B 림프구의 항원 인식 분자인 면역 글로블린이다. 이론의 중요한 부분은 항원 특이 B 림프구 및 T 림프구가 존재한다는 사실이며 이들이 특이 항원에 대하여 클론성 팽창을 한다는 점이다. Hapten을 포함하는 특정 항원에 의하여 유도되어지는 일차 면역 반응에서 얻어지는 항체는 항원에 특이한 중쇄와 경쇄를 사용하며, B 림프구도 클론성 팽창을 한다. 따라서 류마티스 관절염에 특정 항원이 면역 반응을 시작하였다면 제한된 클론의 팽창과 특이한 면역글로블린의 제한된 사용이 관찰될 것이다. 최근 수년간 류마티스 관절염의 활막조직내에서 발현되는 T 세포 및 B 림프구 수용체의 클론성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 여러 연구자에 의하여 제한된 클론성이 발견되고 있는 바 이는 류마티스 관절염의 발병 기전이 항원에 의하여 유도되어짐을 시사하는 결과라고 생각되어 진다.⁶⁻⁹

류마티스 관절염에서 B 림프구의 역할은 다클론성 B 림프구 활성화^{8,9}, 류마티스 인자 생성, 면역복합체 형성 외에 최근 활막염의 병태생리에 있어 그 중요성이 강조되고 있다. B 림프구는 자신을 자극하는 IL-6나 대식세포를 활성화하는 TNF- α 등의 사이토카인을 분비하여 염증 반응을 촉진시키며, 항원 전달 세포인 수지상 세포에 대해 IL-10을 분비한다.¹⁰⁻¹² B 림프구는 항원 전달 세포로서 역할을 담당하여 염증성 싸이토카인을 분비하는 T 림프구의 활성을 유도하고 유지시키는 역할을 한다. 최근 연구는 B 림프구가 류마티스 관절염의 활막에서 CD4+T 림프구를 지속적으로 유지시키는 유일한 항원 전달 세포임을 주장하고 있다.^{10,13} 또한, B 림프구와 형질 세포는 IgG또는 IgM 류마티스인자나 자가항체들을 생산하여 보체 반응을 유도하거나 염증 반응을 촉진시킨다.¹⁴ 이들 자가항

체는 B 림프구를 영속화하는 자극이 될 수 있으며, 대식세포를 활성화시킬 수도 있다.

류마티스 관절염 환자에서 B 림프구에서 발현되는 면역글로불린에 대해 그동안 연구가 활발히 진행되어 왔다. 만성 류마티스 관절염 환자의 활막 염증 조직 내에 류마티스인자 및 각종 자가 항체를 만들어내는 Humkv325, Humkv328, VH51P1 등과 같은 유전자들이 선택적으로 많이 표현되어짐이 보고되었다.^{15,16} 항원 결합 부위로 알려진 상보성 결정부위(complementarity determining region, CDR)의 체형 변이(somatic mutation)가 골격 부위/framework region; FR)에 비하여 많으며, 면역글로불린의 아미노산 치환 변이가 발생하였을 때는 arginine, histidine, glutamic acid 등의 전위를 가진 아미노산으로의 치환이 두드러지는데,¹⁷ 이들 현상은 항원에 의해 면역 글로불린이 보다 더 선택되고 있다는 반증으로 생각된다.^{18,19} 또한, 특정 B 림프구가 클론성 팽창을 하는 증거가 관찰되어 류마티스 관절염의 발병 기전에 특정 항원이 관여할 것이라는 주장이 제시되었다.²⁰⁻²³

최근 흥미로운 연구결과로 면역글로불린의 CDR 가운데 가장 변이가 심하다고 알려진 CDR3부위의 아미노산 길이가 11개로 구성된 kappa 경쇄가 류마티스 관절염 환자에서 관찰되었다는 보고가 있었다.^{16,18,20,24} 류마티스 관절염 환자에서 아미노산 11개로 구성된 CDR3를 가진 면역글로불린 kappa 경쇄가 발견된다는 점은 매우 흥미로운 사실이다. Kappa 경쇄의 CDR3 길이는 일반적으로 9개에서 10개의 아미노산으로 알려져 있다.²⁵ Kappa 경쇄의 CDR3의 아미노산 길이는 kappa 유전자 분절의 재조합 과정 중 exonuclease 활성화에 의하여 재조합 유전자의 말단 부위에서 nucleotide가 몇 개씩 절단되게 되므로 대부분 9개의 아미노산을 가지게 되며, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)에 의한 N-region addition이 없는 kappa 경쇄의 경우에는 11개 아미노산은 이론적으로 불가능하다. N-region addition은 면역글로불린 중쇄의 유전자 재조합이 일어나는 pro-B 세포기에 일어나며, 경쇄의 재조합은 중쇄의 재조합이 일어난 후인 Pre-B 세포기에 일어나는데 이때에는 TdT의 발현이 중지된 상태로 N-region addition이 일어나지 않는 것으로 알려져 왔다. 그동안 정상적인 말초혈액, 마우스태아 간장에서 kappa 경쇄의 N-region addition의 기전은 없다고 생각되었었다. 그러나, 최근 정상인에서도 11개 아미노산을 포함하는 긴 CDR3가 발견되었고,²⁶⁻²⁸ 면역글로불린 kappa 경쇄 CDR3 아미노산 길이를 류마티스 관절염 환자의 활막, 말초혈액, 정상인의 말초혈액에서 비교하였을 때 류마티스 관절염 환자의 활막, 말초 혈액,

정상인의 말초혈액 순으로 11개 아미노산으로 이루어진 CDR3변이가 많음이 관찰되었다.²⁴ 그러나, 이론적으로 11개 아미노산으로 이루어진 CDR3를 가진 kappa 경쇄는 생성될 수 없으므로, 그 이유를 밝히고자 본 연구를 계획하게 되었다.

류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수와 말초혈액에서 분화과정 중에 있는 B 림프구들의 면역글로블린 kappa 경쇄의 CDR3를 분석한다면 N-region addition이 어느 과정에서 기인하는지 알 수 있을 것이다. 두가지 가설이 가능한데, 첫째는 원인 항원의 자극에 의해 류마티스 관절염 환자의 활막 등에서 면역글로블린의 이차적 유전자 재조합이 일어난 결과라는 것이고, 둘째는 류마티스 관절염 환자에서 정상인과 달리 골수의 경쇄의 Vk-Jk 유전자 재조합 과정에서 N-region addition이 존재하여 kappa 경쇄에 N-region addition을 가진 B 림프구가 말초혈액으로 나왔을 것이다라는 가설이다. 전자는 류마티스 관절염이 항원에 의해 유발되었다는 반증이 되며, 후자는 류마티스 관절염은 유전적 소인을 가진 질병이라는 반증이 될 것이다.

본 연구를 통해 류마티스 관절염 환자와 정상인 사이의 B 림프구 발생단계에 있어 면역 글로블린의 CDR3 부위를 비교함으로써, 면역글로블린 kappa 경쇄의 11개 아미노산 CDR3의 생성과정의 차이를 발견함으로써 류마티스 관절염에서 일어나는 유전자 재조합의 과정을 이해하고, 이를 통해 류마티스 관절염의 병적 기전을 규명하려고 한다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 대상 환자

류마티스 관절염 환자의 골수세포와 말초혈액세포는 1987년 개정된 미국류마티스 학회의 진단기준(1987 revised American College of Rheumatology criteria)에 의해 진단된, 6년의 병력을 가진 류마티스인자 양성인 59세 여자 환자에서 공여 받았고, 대조군으로 사용한 골수세포와 말초혈액세포는 특이 질병력이 없었던 건강한 25세 성인으로부터 공여받았다.

2. Cell Sorting

가. 단핵구(mononuclear cell) 분리

류마티스 관절염 환자와 정상인으로부터 골수혈액과 말초혈액을 각각 20 ml과 10 ml씩 골수천자와 정맥천자를 통해 채취한다. 골수혈액과 말초혈액은 heparin 처리 후 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 단핵구를 분리한다. 골수혈액은 지방층을 분리하기 위해 2000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리를 한 후 상층액을 버리고, 하층 세포들을 동량의 PBS로 희석한 후, 이를 Ficoll-Hypaque 위에 조심스레 loading 한 후 2700 rpm에서 20분간 4°C에서 원심분리를 시행한다. 원심분리 후 Ficoll-Hypaque 위의 하얀 층(buffy coat)을 상층의 plasma나 하층의 Ficoll이 섞이지 않도록 조심스레 떠내어 5배의 PBS를 넣고 잘 섞어준 후 2000 rpm에서 10분간 원심분리를 4°C에서 시행한다. 상층액은 버리고, 하층세포들을 다시 한번 PBS에 10 ml에 잘 섞는다. 이 중 10 µl를 떠내어 90 µl의 trypan blue와 섞은 뒤 hemocytometer를 이용하여 현미경하에서 세포 수를 센다. 나머지 용액은 1000 rpm에서 10분간 원심분리를 4°C에서 시행하여 세포를 다시 한번 씻어주어 최종적으로 단핵구를 얻는다. 말초혈액도 같은 방법을 이용하되, 지방을 분리하는 작업은 하지않고, 처음 Ficoll-Hypaque위에 혈액을 loading하여 원심분리를 할 때 4°C에서 2000 rpm, 20분으로 하는 점만 다르고 다른 과정은 동일하다.

나. CD19⁺ 세포 분리

골수단핵구와 말초단핵구에서 B계통 림프구들만을 얻기 위해 microbead를 이용하여 세포를 분리하는 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) 방법을 통해 CD19이 세포 표면에 발현되어 있는 B 림프구들만을 선택적으로 column을 이용 분리한다.

먼저 MACS buffer 준비를 하는데, 조성은 다음과 같다. MACS buffer를 50 ml을 만든다면 2 mM EDTA(0.0372g), 0.5% FBS(10% 2.5 ml), 그리고, 나머지를 PBS 로 채운다. 그 후 30분간 degassing을 해주어 거품이 없게 한다. 이후 과정은 다음과 같다.

- ① 10^7 cell 기준으로 buffer 80 µl, bead 20 µl을 넣고, 4°C에서 15분간 incubation 한다.

- ② MACS buffer를 5 ml 정도 넣고 inverting 후 4°C에서 1,500 rpm으로 10분간 원심분리 한다.
- ③ ②의 과정동안 column을 자석에 장치하고 3 ml의 MACS buffer로 적셔준다. 1 mL씩 3번 넣는다.
- ④ ②의 pellet을 cell이 적으면 1 ml, 많으면 2 ml의 MACS buffer를 넣고 suspension시킨 후 column에 loading한다.
- ⑤ Pellet의 loading이 끝나면, 3 ml의 MACS buffer로 column을 3번 washing한다.
- ⑥ Column을 장치에서 떼어내어 1 ml MACS buffer로 elution시킨다. 나머지 column에 붙어 있는 용액을 syringe로 밀어서 얻는다.
- ⑦ 최종 세포수를 hemocytometer를 통해 측정한다.

이상의 MACS 방법을 통해 CD19 표면항체를 가지고 있는 B계통 세포들을 분리한다.

다. IgM⁺IgD⁻ 세포와 IgM⁺IgD⁺ 세포의 분리

골수단핵구로부터 immature B 림프구, 말초혈액의 단핵구로부터 mature B 림프구를 얻는다. Immature B 림프구는 표면항체를 IgM만 가지고 있고 IgD을 발현하지 않는다. 반면, mature B 림프구는 두 가지 표면항체를 다 발현하므로 IgG, IgD monoclonal 항체를 이용하여 flow-cytometry (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 통해 세포를 분리한다.

먼저 washing buffer와 binding buffer를 준비하는데, washing buffer는 PBS를 0.2 μm filter를 통해 filtration하고 사용전 4°C에 보관한다. Binding buffer는 2% fetal bovine serum를 PBS에 섞어 만들어 4°C에 보관한다. 이후 과정은 다음과 같다.

- ① MACS column을 통해 얻어진 세포를 15 ml conical tube로 옮겨 wash buffer로 씻어준다. 4°C, 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한다.
- ② 세포를 binding buffer에서 잘 섞어준 후 농도를 5×10^6 cells/ml로 맞춘다.
- ③ 상기 cell suspension 중 200 μl(1×10^6 cells)를 Falcon tube(2052, 5 ml)에 옮긴다.
- ④ 여기에 fluorochrome-conjugated 단클론항체를 넣는다. Mouse anti-human IgD (fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC), Becton Dickinson) 항체와 IgD에 대한 FITC-labeled negative control (anti-mouse IgG2a)는 20 μl씩, mouse anti-human IgM (PE, Serotec) 항체와 IgM에 대한 PE-labeled negative control

(mouse anti-IgG)는 10 µl씩 넣는다.

- ⑤ 얼음 위에서 상기 혼합물을 15분에서 45분간 incubation시킨다.
- ⑥ 차가운 wash buffer를 3 ml 넣는다.
- ⑦ 4°C에서 5분간 2000 rpm 에서 원심분리하고 상층액을 버린다.
- ⑧ 하층의 세포들에 PBS를 500 µl 넣고 suspension시킨다.(1×10^6 cells/mL의 농도가 이상적) FACS기계에 loading한다.
- ⑨ 먼저, control 항체를 이용 골수 B 림프구와 말초 B 림프구의 control plot을 gating한 뒤, immature B 림프구(IgM⁺IgD⁻) (그림 1), mature B 림프구(IgM⁺IgD⁺)의 세포분획을 구분한 뒤 각각을 세포분리해 낸다(그림 2).
- ⑩ FACS 의 cell sorter를 이용, 원하는 cell을 한 개씩 96 well plate의 각 well에 분주 한다.

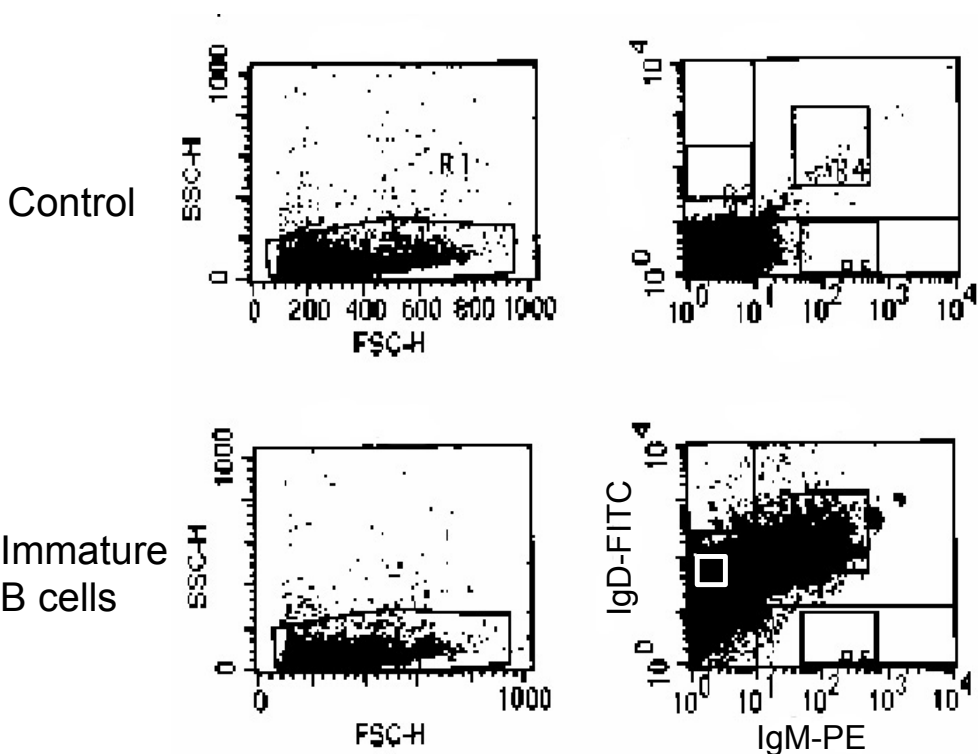


그림 1. 류마티스관절염 환자와 정상인의 골수세포에 존재하는 CD19⁺IgM⁺IgD⁻ immature B 림프구. FACS로 gating하여 흰색 정사각형 안에 있는 CD19⁺IgM⁺IgD⁻ immature B 림프구들을 분주함

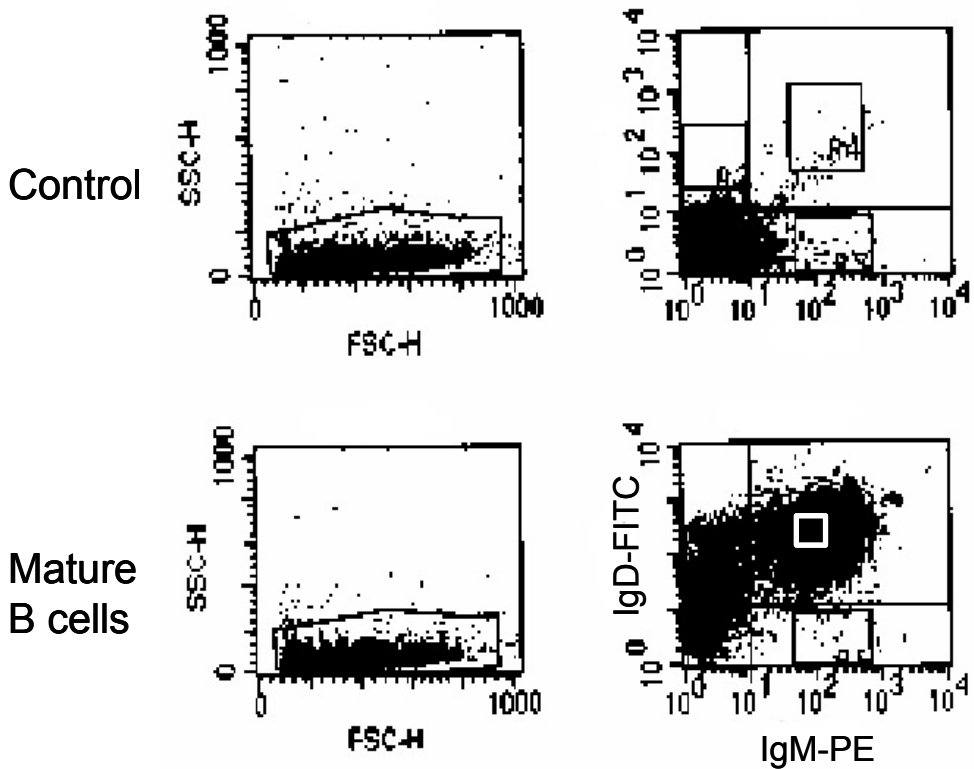


그림 2. 류마티스관절염 환자와 정상인의 말초혈액에 존재하는 CD19⁺IgM⁺IgD⁺ mature B 림프구. FACS로 gating하여 흰색 정사각형 안에 있는 CD19⁺IgM⁺IgD⁺ mature B 림프구들을 분주함.

3. Single Cell PCR

가. Cell lysis

FACS cell sorter를 통해 20 μ l의 lysis buffer가 담겨진 well에 세포 1개씩 들어 가도록 sorting한다. 세포가 한 개씩 분주되는 지 확인하기 위해 slide glass위에 형광이 붙은 microbead를 1개, 2개, 5개, 10개씩 분주해서 암실에서 형광 현미경으로 확인해 본다.

Cell lysis buffer 20 μ l의 조성은 18 μ l DNase-free ddH₂O + 2 μ l proteinase K: 16.4 mg/mL(Boehringer Mannheim, Germany) 이다. 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation하여 cell

lysis 후 95°C에서 15분간 incubation하여 효소를 비활성화 시킨다.

나. Primer extension DNA preamplification (PEP)

Lysis된 세포에서 얻은 DNA는 두 가닥에 불과하므로, 일반적인 PCR을 하게 될 경우 원하는 부위를 증폭할 수 없게 된다. 따라서, 많은 양의 주형(template)을 얻기 위해 DNA preamplification과정을 거쳐야 한다.

Template(single cell + lysis buffer) 20 µl에 MgCl₂(25 mM, Applied Biosystems, USA) 6 µl(7.5 mM), dNTP(10 mM, Promega, USA) 1.8 µl(300 µM), D/W 2.2 µl를 넣고, wax(AmpliWax PCR Gem 100; Applied Biosystems)로 78°C에서 10분간 sealing 한 후, 그 위에 10×PCR buffer(Applied Biosystems, USA) 6 µl, random primer 4 µl (400 pmol) (15 mer, 100 pmol/µl, TIB MOLBIOL, Germany), GoldTag Polymerase (5U/µl, Applied Biosystems, USA) 1 µl, D/W 19 µl를 넣고 GeneAmp PCR system 9700(Perkin Elmer Co., Norwalk, CT)을 이용 95°C에서 10분 반응시킨 후, 37°C에서 2분, 그 후 37°C에서 ramping기능을 이용하여(10초/°C) 55°C까지 올린 후, 55°C에서 4분을 1회 시행한다. 그 뒤 94°C에서 1분 반응시킨 후 37°C에서 2분, 그 후 37°C에서 ramping기능을 이용하여(10초/°C) 55°C까지 올린 후, 55°C에서 4분을 59회 시행한다.

DNA preamplification의 성공 여부를 알기 위해 생성된 반응산물 2 µl, Taq DNA polymerase(Promega Corp., Madison, WI) 1 U, 그리고 β-actin primers (sense primer: 5'-GAGGCCAGAGCAAGAGAGG-3'; antisense primer: 5'-TCACCGGAGTCCATCCGATG-3') 각각 1 µl (20 pmole)를 혼합하여 PCR을 시행하였다. 보다 정확성을 기하기 위해 primer가 인식하는 부위가 다른 F-primer를 이용하여(sense primer: 5'-GCGACGAGGCCAGAGCAAG-3'; antisense primer: 5'-CGGCCAGCCAGGTCCAGACG-3') β-actin을 재 검정하였다. PCR cycle은 94°C에서 3분 반응시킨 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 40회 시행하고 72°C에서 7분간 반응시킨다. PCR 산물 10 µl를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 300 bps의 띠 (F-actin 400 bp)를 확인한다.

다. Two-stage nested PCR

(1) 제 1단계 PCR

증폭된 DNA를 주형으로 사용하여 two-stage nested PCR를 실시하여 면역글로불린 kappa 경쇄의 가변부위(variable region)를 증폭시킨다. 먼저 제 1단계 PCR에서는 면역글로불린 경쇄의 유전자로부터 유래된 전사체를 증폭시키기 위하여 각 family (Vk1-6) leader부위의 염기서열을 이용하여 합성한 family-specific sense 5' oligo- nucleotide와 J segment(Jk1-5)의 염기서열을 이용하여 합성한 anti-sense J k oligo- nucleotide를 선정하여 시발체로 사용한다 (Table 1).

Table 1. Family-specific external primers for the first stage PCR

Name	Gene	Description	Orientation	Sequence(5' → 3')
PYB11	Vk 1	Leader	Sense	GACATCCAGWTGACCCAGTCTCC
PYB12	Vk 2b	Leader	Sense	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
PYB13	Vk 2/4/6	Leader	Sense	GATATYGTGMTGACCCAGTCTCC
PYB14	Vk 3	Leader	Sense	GTCTKTGTCTCCAGGGGAAAGAG
PYB15	Vk 5	Leader	Sense	GAAACCACACTCACGCAGTCTCC
Jext1-4	Jk1-4	Jk1-4(5')	Antisense	TACTTACGTTTGATCTCCASCTTG
Jext5	Jk5	Jk5(5')	Antisense	GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTG

W=A/T, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=G/C

제 1단계 PCR은 DNA(preamplification product) 5 µl, Jk primer(10 pmol/ µl, TIB MOLBIOL, Germany) 1 µl(10pmol), Vk primer(10pmol/ µl, TIB MOLBIOL, Germany) 1 µl(10pmol), 10 PCR buffer(Applied Biosystems, USA) 5 µl, MgCl₂(25 mM Applied Biosystems, USA) 4 µl, dNTP(10 mM, Promega, USA) 1 µl(200 µM), Gold Tag Polymerase(5U/ µl, Applied Biosystems, USA) 0.4 µl, dH₂O을 넣고 반응 총량을 50 µl로 맞춰 PCR을 시행한다. Jkext 1-4, Jkext 5, Vk1, Vk2b, Vk2/4/6, Vk3, Vk5를 각각 pair로 하여 한 세포 당 10개의 반응을 시행한다.

GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems, USA) 95°C에서 10분 반응시킨 후, 94°C에서 1분 반응시키고 65°C에서 90초, 그 후 72°C에서 2분을 35회 시행한다. 마지막 cycle 후 72°C에서 15분간 final extension 시킨다.

(2) 제 2단계 PCR

증폭된 제 1단계 PCR 결과물을 주형으로 하여 제 2단계 PCR을 시행한다.

Forward-internal 시발체들은 1단계 PCR 수행할 때 사용했던 같은 primer를 사용하고, anti-sense 시발체의 5'에 nesting하는 Jk oligonucleotide segment로 reverse-internal 시발체들을 제작하여 Vk-Jk 유전자의 증폭을 시행한다(Table 2).

Table 2. Family-specific internal primers for the second stage PCR

Name	Gene	Description	Orientation	Sequence(5' → 3')
PYB11	Vk 1	Leader	Sense	GATATYGTGMTGACCCAGTCTCC
PYB12	Vk 2b	Leader	Sense	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
PYB13	Vk 2/4/6	Leader	Sense	GATATYGTGMTGACCCAGTCTCC
PYB14	Vk 3	Leader	Sense	GTCTKTGTCTCCAGGGGAAAGAG
PYB15	Vk 5	Leader	Sense	GAAACCACACTCACGCAGTCTCC
Jint1/4	Jk1/4	Jk1-4(5')	Antisense	ACGTTTGATYTCCACCTTGGTCCC
Jint2	Jk2	Jk2(5')	Antisense	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Jint3	Jk3	Jk3(5')	Antisense	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Jint5	Jk5	Jk5(5')	Antisense	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC

W=A/T, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=G/C

제 2단계 PCR은 DNA(first PCR product) 4 µl, Jk primer(10pmol/ µl, TIB MOLBIOL, Germany) 1 µl(10pmol), Vk primer(10 pmol µl/, TIB MOLBIOL, Germany) 1 µl(10 pmol), 10×PCR buffer(Applied Biosystems, USA) 5 µl, MgCl₂(25 mM, Applied Biosystems, USA) 4 µl, dNTP(10 mM, Promega, USA) 1 µl(200 µM), Gold Tag Polymerase(5 U/µl, Applied Biosystems, USA) 0.4 µl, dH₂O을 넣고 반응 총량을 50 µl로 맞춰 PCR을 시행한다. Jint 1/4, Jint 2, Jint 3은 한 tube에 넣었고, Jint 5는 분리하여 다른 tube에 넣는다. Jk internal primer들과 Vk primer는 1st PCR과 마찬가지로 각각 pair로 한 sample 당 10개의 반응을 시행한다.

GeneAmp PCR system 9700(Perkin Elmer Co., Norwalk, CT) 95°C에서 10분 반응시킨 후, 그 뒤 94°C에서 1분 반응시키고 65°C에서 90초, 그 후 72°C에서 2분을 39회 시행한다. 마지막 cycle 후 72°C에서 15분간 final extension시킨다. PCR 산물 10 µl를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 300 bps의 띠로 확인한다.

라. DNA extraction

증폭이 확인된 제 2차 PCR 산물 50 µl를 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후

300 bps의 띠를 확인하고, 이 띠를 절단하여 DNA extraction kit(Bioneer Gel purification kit, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한다.

- ① 2nd PCR product를 1.5% agarose gel에 loading하여 약 320bp의 band를 자른다.
- ② Agarose gel의 무게를 측정하여 agarose gel 무게의 5배의 GB buffer를 넣는다.
- ③ 50°C에서 약 10분 이상 두어 gel을 완전히 녹인다.
- ④ 2-3분마다 vortex해준다.
- ⑤ Gel이 완전히 녹은 후 혼합물이 노란색인지 확인한다.(오렌지나 빨강을 띠면 3 M sodium acetate, pH 5.0, 10 µl을 넣고 잘 섞어준다.)
- ⑥ Absolute isopropanol을 잘라낸 gel 무게와 같게 넣고 잘 섞어준다.
- ⑦ Binding column tube를 2 ml tube에 넣고, 혼합물을 binding column tube에 넣는다.
: 최대 750 µl가 들어간다. 750 µl가 넘는다면 원심분리 후 여과액을 버리고 나머지 혼합물을 넣는다.
- ⑧ 30-60 초 동안 원심분리 후 여과액을 버리고 column은 다시 2 ml tube로 넣는다.
- ⑨ GB buffer 500 µl넣고 60초 원심분리 후 여과액을 버리고 column은 다시 2 ml tube로 넣는다.
- ⑩ W buffer 500 µl 넣고 5 분간 incubation 한다(E buffer를 50°C에 데워 놓는다)
- ⑪ 60초동안 원심분리 후 여과액을 제거하고, W buffer 250 µl 넣고 60 초간 원심분리한다.
- ⑫ 여과액은 버리고 column을 다시 2 ml tube로 넣은 후 2분간 원심분리한다.
- ⑬ Column을 1.5 ml tube로 이동하여 3 분간 실온에서 건조시킨다.
- ⑭ 50°C로 데워놓은 E buffer 20~30 µl를 넣고 약 3 분간 상온에 방치한다. (E buffer를 넣을 땐 유리섬유 가운데에 넣는다)
- ⑮ 1 분간 원심분리후 column을 제거한다.
- ⑯ 1% agarose gel에 product를 1 µl씩 loading하여 확인한다.

4. 면역글로블린의 유전자 분석 및 CDR3의 길이 분석

추출된 DNA를 양을 spectrophotometer로 확인 후, 면역글로블린 kappa 경쇄 가

변부위의 아미노산 염기서열을 automatic DNA sequencer(3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)를 사용하여 확인한다.

류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수의 immature B 림프구군 또는 말초혈액의 mature B 림프구에서 얻은 sequence의 면역글로블린 kappa 경쇄 가변부위의 염기분석과 CDR3의 아미노산 길이, N-region addition등을 분석하고 Vk, Jk 유전자 분절의 사용을 IMGT/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr>)을 통해 비교분석 한다.

III. 결 과

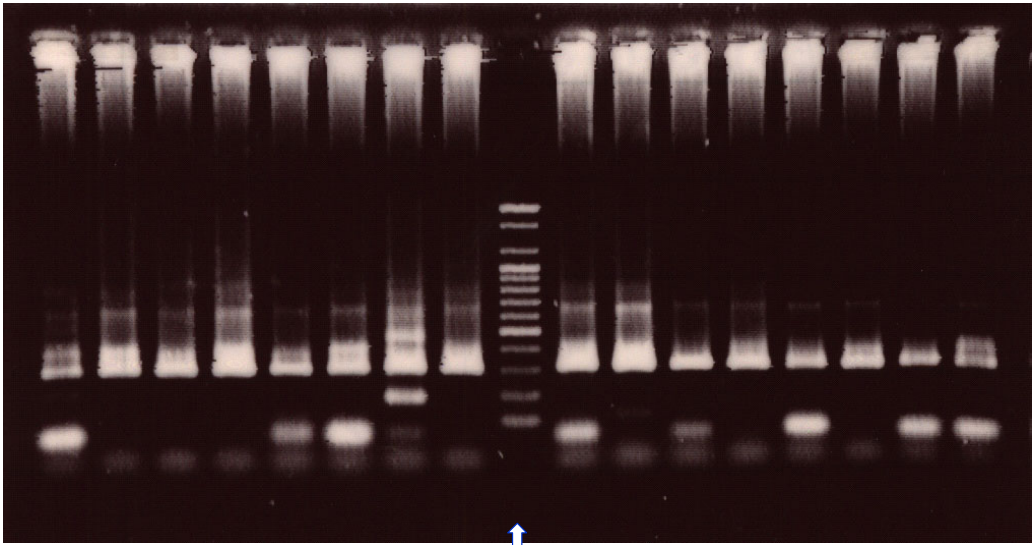
1. DNA 분리

MACS와 FACS과정을 통해 골수세포로부터 immature B 림프구, 말초혈액에서 mature B 림프구를 분리하였다. 분리된 세포를 single cell로 분리하여, 각각의 세포를 lysis buffer를 이용하여 DNA를 추출하고, random 15-mer oligonucleotide 전사체를 이용하여 pre-amplification 과정을 거쳐 DNA 양을 증폭하였다. DNA증폭의 성공 여부를 확인하기 위해 beta-actin primers를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동하여 300 bps에 해당하는 β -actin의 띠를 확인하였다 (그림 3).

2. 면역글로블린 kappa 경쇄의 single cell PCR 결과 확인

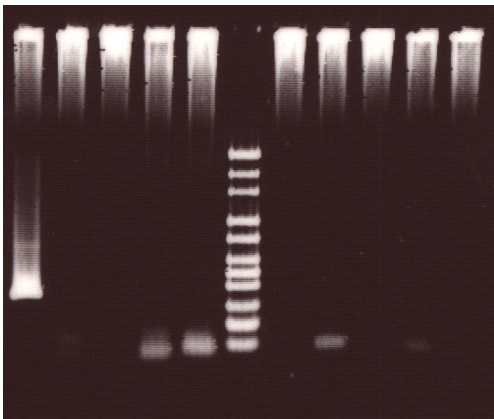
Preamplification DNA 2 μ l를 주형으로 면역글로블린 kappa 경쇄 가변부위의 leader 부위 염기서열을 이용하여 합성한 family-specific forward primers와 kappa 경쇄 Jk 유전자 분절의 염기서열을 이용하여 합성한 antisense primer를 이용하여 제 1단계 PCR을 시행하였다.

제 1단계 PCR 산물을 주형으로 하여 kappa 경쇄 가변부위의 family-specific forward primers(1단계 PCR과 동일한 primer)와 kappa 경쇄 Jk 유전자 분절의 말단부위에 nesting하는 antisense primer를 reverse primer로 하여 면역글로블린 kappa 경쇄 가변부위를 증폭하였으며, 1% agarose gel에서 300bps의 띠를 확인하였다 (그림 4).

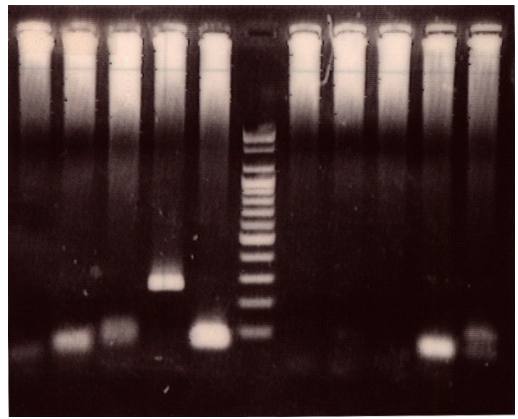


Size marker

그림 3. β -actin을 이용해서 300 bp에 해당되는 DNA preamplification 산물을 확인하였다.



Vk1-Jk1-4



Vk3-Jk1-4

그림 4. Nested PCR을 통해 증폭된 second PCR 산물. 좌측 그림은 Vk1과 Jk1 ~4 primer를 이용하여 증폭된 sequence이며, 우측 그림은 Vk3와 Jk1 ~4 primer를 이용하여 증폭된 sequence이다.

3. 면역 글로블린 kappa 경색의 분석

Immature B 림프구와 Mature B 림프구에서 증폭된 DNA sequence를 비교하였다. 정상인에서 89 sequences, 류마티스 관절염 환자에서 85 sequences 등 총 174 sequences를 분석하였다.

가. Productive sequences의 Vk family 분포

Productive sequences은 총 84개로 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 19개, 말초혈액 mature B 림프구 18개, 정상인의 골수 immature B 림프구 22개, 말초혈액 B 림프구 25개이다. Vk family의 이용은 다음과 같다 (그림 5).

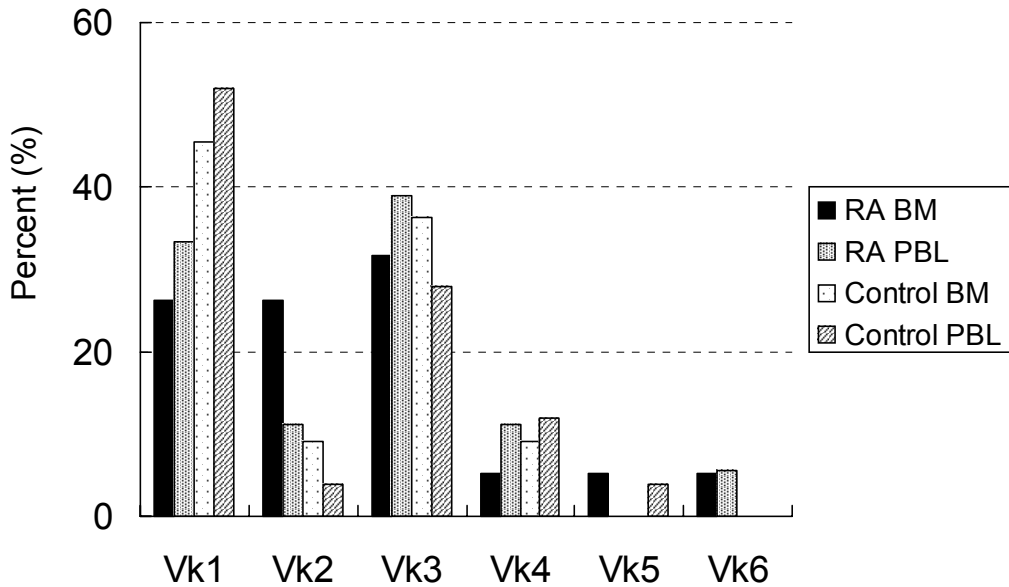


그림 5. Productive sequence의 Vk family 분포. 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 경우 Vk1 family 26.3%, Vk2 family 26.3%, Vk3 family 31.6%, Vk4 family 5.3%, Vk5 family 5.3%, Vk6 family 5.3%로 3번 family가 가장 많았다. 류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구도 Vk1 family 33.3%, Vk2 family 11.1%, Vk3 family 38.9%, Vk4 family 11.1%, Vk6 family 5.6%로 3번 family가 가장 많았다. 정상인의 골수 immature B 림프구 경우 Vk1 family 45.5%, Vk2 family 9.1%, Vk3 family 36.4%, Vk4 family 9.1%로 1번 family가 가장 많았다. 정상인의

말초 mature B 림프구도 Vk1 family 52 %, Vk2 family 4%, Vk3 family 28%, Vk4 family 12%, Vk5 family 4%로 1번 family가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구(19개) 경우 Vk1 family인 것 5개(26.3 %), Vk2 family인 것 5개(26.3%), Vk3 family인 것 6개(31.6%), Vk4 family인 것 1개(5.3%), Vk5 family인 것 1개(5.3%), Vk6 family인 것 1개(5.3%)로 3번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구(18개) 경우는 Vk1 family인 것 6개 (33.3 %), Vk2 family인 것 2개(11.1%), Vk3 family인 것 7개(38.9%), Vk4 family인 것 2개(11.1%), Vk5 family인 것 없고, Vk6 family인 것 1개(5.6%)로 3번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 골수 immature B 림프구(22개) 경우 Vk1 family인 것 10개(45.5%), Vk2 family인 것 2개(9.1%), Vk3 family인 것 8개(36.4%), Vk4 family인 것 2개(9.1%), Vk5 family와 Vk6 family는 없었다. 1번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 말초 mature B 림프구(25개) 경우는 Vk1 family인 것 13개(52%), Vk2 family인 것 1개(4%), Vk3 family인 것 7개(28%), Vk4 family인 것 3개(12%), Vk5 family인 것 1개(4%), Vk6 family인 것 없었다. 1번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

나. Nonproductive sequences의 Vk family 분포

Nonproductive sequences는 총 90개로 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 21개, 말초혈액 mature B 림프구 27개, 정상인의 골수 immature B 림프구 26개, 말초혈액 B 림프구 16개이다. Vk family의 이용은 다음과 같다 (그림 6).

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구(21개) 경우 Vk1 family인 것 11개 (52.4 %), Vk2 family인 것 6개(28.6%), Vk3 family인 것 3개(14.3%), Vk4 family인 것 1개(4.8%), Vk5 family와 Vk6 family인 것은 없었다. 1번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구(27개) 경우는 Vk1 family인 것 12개(44.4%), Vk2 family인 것 8개(29.6%), Vk3 family인 것 5개(18.5%), Vk4 family인 것 2개(7.4%), Vk5 family와 Vk6 family는 없었다. 1번 family에 속하는

sequence가 가장 많았다.

정상인의 골수 immature B 림프구(26개) 경우 Vk1 family인 것 13개(50%), Vk 2 family인 것 9개(34.6%), Vk3 family인 것 4개(15.4%)였고, Vk4 family, Vk5 family, Vk6 family는 없었다. 1번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 말초 mature B 림프구(16개) 경우는 Vk1 family인 것 9개(56.3%), Vk 2 family인 것 4개(25%), Vk3 family인 것 2개(12.5%), Vk4 family인 것 없고, Vk 5 family인 것 1개(6.3%), Vk6 family인 것 없었다. 1번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

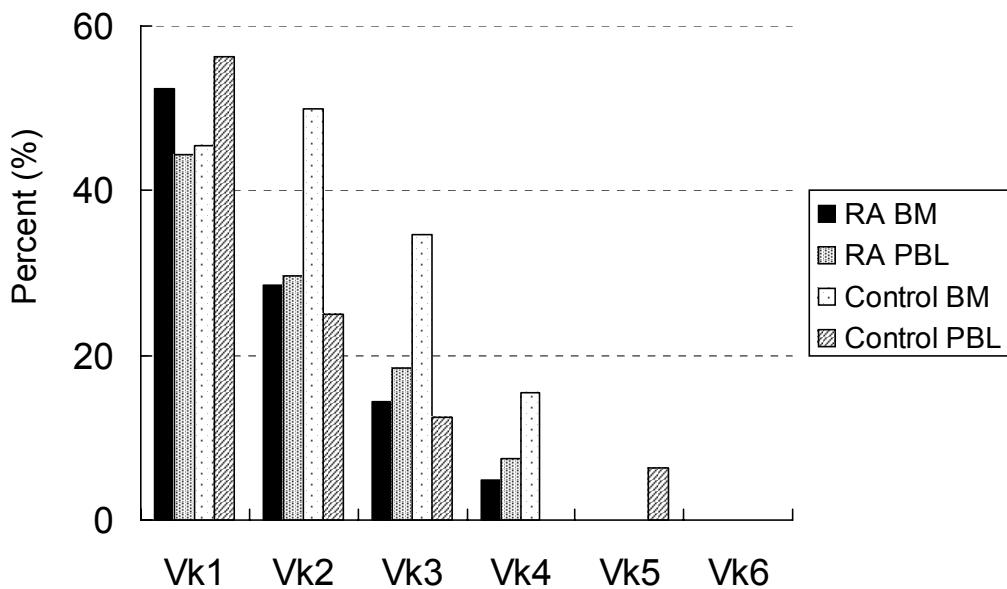


그림 6. Nonproductive sequences의 Vk family 분포. 류마티스관절염 환자의 골수 immature B 림프구 경우 Vk1 family 52.4%, Vk2 family 28.6%, Vk3 family 14.3% Vk4 family 4.8%로 1번 family가 많았다. 류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 경우도 Vk1 family 44.4%, Vk2 family 29.6%, Vk3 family 18.5%, Vk4 family 7.4%로 1번 family가 많았다. 정상인의 골수 immature B 림프구 경우 Vk1 family 50%, Vk2 family 34.6%, Vk3 family 15.4%로 1번 family가 가장 많았다. 정상인의 말초 mature B 림프구 경우도 Vk1 family 56.3%, Vk2 family 25%, Vk3 family 12.5%, Vk5 family 6.3%로 1번 family가 가장 많았다.

다. Productive sequences의 Vk 유전자 사용

Productive sequences의 Vk 유전자 사용은 표 3과 같다. 류마티스 관절염 환자의 골수의 immature B 림프구군과 정상인의 immature B 림프구군, 류마티스 관절염 환자의 말초혈액 mature B 림프구군과 정상인의 말초혈액의 mature B 림프구군 4군을 각각 비교하였을 때 Vk 유전자 사용에 있어 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 하지만, 특기할 만한 것은 류마티스 인자를 생성하는 것으로 알려진 A27(humkv325) 유전자의 사용인데,^{29,30} 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구에서는 전체 repertoire의 11.1%가 이 유전자를 사용하였고, 말초혈액의 mature B 림프구에서는 이 유전자를 전체의 27.8%가 사용하였다. 이에 반해 정상인의 골수의 immature B 림프구는 4.5%, 말초혈액의 mature B 림프구는 12%가 이 유전자를 사용하였다.

라. Nonproductive sequences의 Vk 유전자 사용

Nonproductive sequences의 Vk 유전자 사용은 표 4과 같다. 류마티스 관절염 환자의 골수의 immature B 림프구군과 정상인의 immature B 림프구군, 류마티스 관절염 환자의 말초혈액 mature B 림프구군과 정상인의 말초혈액의 mature B 림프구군 4군을 각각 비교하였을 때 Vk 유전자 사용에 있어 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 특기할 만한 소견은 A3 유전자의 사용인데, 골수내 immature B 림프구의 repertoire에 있어서는 류마티스 관절염 환자와 정상인에서 각각 4%와 8%에서 사용되었으나, 말초혈액 mature B 림프구 repertoire에서는 류마티스 관절염 환자에서는 24%가 사용된 반면 정상인에서는 사용되지 않았다.

3. V κ genes in productive sequences (%)

V κ gene	V κ family	RA BM	RA PBL	Control BM	Control PBL
B3	V κ IV	5.6	11.1	9.1	12
B2	V κ V	5.6	0	0	4
L12a	V κ I	5.6	0	4.5	12
L11	V κ I	0	0	0	0
L10 or L25	V κ III	0	0	4.5	0
L9	V κ I	0	5.6	0	0
L8	V κ I	0	0	0	0
L6	V κ III	11.1	5.6	13.6	4
L5/L19a	V κ I	11.1	0	4.5	0
L4	V κ I	0	0	0	0
L2(humkv328)	V κ III	5.6	5.6	4.5	8
L1	V κ I	0	0	0	0
A30	V κ I	0	0	4.5	4
A27(humkv325)	V κ III	11.1	27.8	4.5	12
A26/10	V κ VI	5.6	5.6	0	0
A23	V κ II	0	0	0	0
A21	V κ II	0	0	0	0
A20	V κ I	0	5.6	0	0
A19/A3	V κ II	16.7	0	4.5	0
A18	V κ II	0	0	0	4
A17	V κ II	0	5.6	0	0
O18/O8	V κ I	0	5.6	9.1	12
O14/O4	V κ I	0	5.6	4.5	0
O12/O2	V κ I	5.6	11.12	0	16
O11/O1	V κ II	0	0	0	0
A1	V κ II	5.6	5.6	0	0
A2	V κ II	5.6	0	4.5	0
A4	V κ I	0	0	0	0
A7	V κ II	0	0	0	0
A11	V κ III	5.6	0	0	0
L15	V κ I	0	0	0	0
L16	V κ III	0	0	0	0
L19	V κ I	0	0	0	0
L20	V κ III	0	0	9.1	4
L23	V κ I	0	0	13.6	8
L24	V κ I	0	0	4.5	0
L25	V κ III	0	0	0	0

⌘ 4. V κ genes in nonproductive sequences (%)

V κ gene	V κ family	RA BM	RA PBL	Control BM	Control PBL
B3	V κ IV	8	8	0	0
B2	V κ V	0	0	0	6.3
L12a	V κ I	0	0	12	6.3
L11	V κ I	4	4	0	0
L10 or L25	V κ III	0	0	0	0
L9	V κ I	0	0	16	12.5
L8	V κ I	0	0	0	0
L6	V κ III	0	0	0	0
L5/L19a	V κ I	0	0	0	0
L4	V κ I	0	0	0	0
L2(humkv328)	V κ III	12	12	4	0
L1	V κ I	0	0	4	6.3
A30	V κ I	4	12	0	0
A27(humkv325)	V κ III	8	8	8	6.3
A26/10	V κ VI	0	0	0	0
A23	V κ II	0	0	0	0
A21	V κ II	0	0	0	0
A20	V κ I	0	0	4	0
A19/A3	V κ II	4	24	8	0
A18	V κ II	0	0	4	0
A17	V κ II	8	8	16	18.8
O18/O8	V κ I	8	8	8	18.8
O14/O4	V κ I	0	0	4	6.3
O12/O2	V κ I	4	4	4	0
O11/O1	V κ II	0	0	0	0
A1	V κ II	0	0	0	0
A2	V κ II	4	0	8	6.3
A4	V κ I	0	0	0	0
A7	V κ II	0	0	0	0
A11	V κ III	0	0	0	0
L15	V κ I	0	0	0	0
L16	V κ III	0	0	0	0
L19	V κ I	0	0	0	0
L20	V κ III	0	0	0	6.3
L23	V κ I	12	12	0	6.3
L24	V κ I	0	0	0	0
L25	V κ III	0	0	0	0

마. Productive sequences의 Jk family 분포

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구(19개) 경우 Jk1 family인 것 1개(5.3%), Jk2 family인 것 8개(42.1%), Jk3 family인 것 없고, Jk4 family인 것 5개(26.3%), Jk5 family인 것 5개(26.3%)로 2번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구(14개) 경우는 Jk1 family인 것 없고, Jk2 family인 것 9개(50%), Jk3 family인 것 1개(5.6%), Jk4 family인 것 5개(27.8%), Jk5 family인 것 3개(16.7%)로 2번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 골수 immature B 림프구(22개) 경우 Jk1 family인 것 없고, Jk2 family인 것 12개(54.5%), Jk3 family인 것 1개(4.5%), Jk4 family인 것 5개(22.7%), Jk5 family인 것 4개(18.2%)로 2번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 말초 mature B 림프구(25개) 경우는 Jk1 family인 것 없고, V κ 2 family인 것 12개(48%), Jk3 family인 것 2개(8%), Jk4 family인 것 8개(32%), Jk5 family인 것 3개(12%)로, 2번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

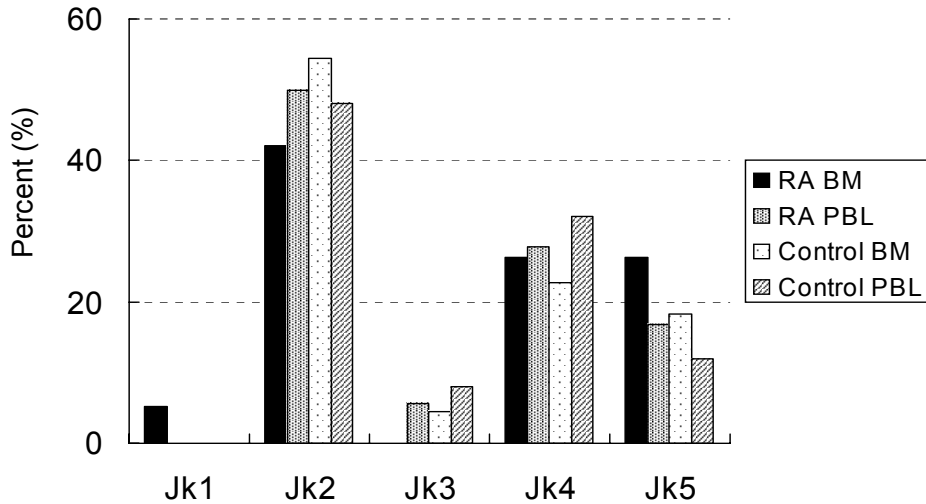


그림 7. Productive sequence의 Jk family 분포. 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 경우 Jk1 family 5.3%, Jk2 family 42.1%, Jk4 family 26.3%, Jk5 family 26.3%로 2번 family가 가장 많았고, 류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 경우도 Jk2 family 50%, Jk3 family 5.6%, Jk4 family 27.8%, Jk5 family 16.7%로 2번 family가 가장 많았다. 정상인의 골수 immature B 림프구 경우 Jk2 family 54.5%, Jk3 family 4.5%, Jk4 family 22.7%, Jk5 family 18.2%로 2번 family가 가장 많았고, 정상인의 말초 mature B 림프구 경우 Jk2 family 48%, Jk3 family 8%, Jk4 family 32%, Jk5 family 12%로, 2번 family가 가장 많았다.

바. Nonproductive sequences의 Jk family 분포

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구(21개) 경우 Jk1 family인 것 1개(4.8%), Jk2 family인 것 7개(33.3%), Jk3 family인 것 없고, Jk4 family인 것 9개(42.9%), Jk5 family인 것 4개(19%)로 4번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구(27개) 경우는 Jk1 family인 것 2개(7.4%), Jk2 family인 것 12개(44.4%), Jk3 family인 것 없고, Jk4 family인 것 12개(44.4%), Jk5 family인 것 1개(3.7%)로 2번, 4번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 골수 immature B 림프구(26개) 경우 Jk1 family인 것 2개(7.7%), Jk2 family인 것 14개(53.8%), Jk3 family인 것 2개(7.7%), Jk4 family인 것 7개(26.9%), Jk5 family인 것 1개(3.8%)로 2번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

정상인의 말초 mature B 림프구(16개) 경우는 Jk1 family인 것 1개(6.3%), Vk2 family인 것 6개(37.5%), Jk3 family인 것 없고, Jk4 family인 것 7개(43.8%), Jk5 family인 것 2개(12.5%)로, 4번 family에 속하는 sequence가 가장 많았다.

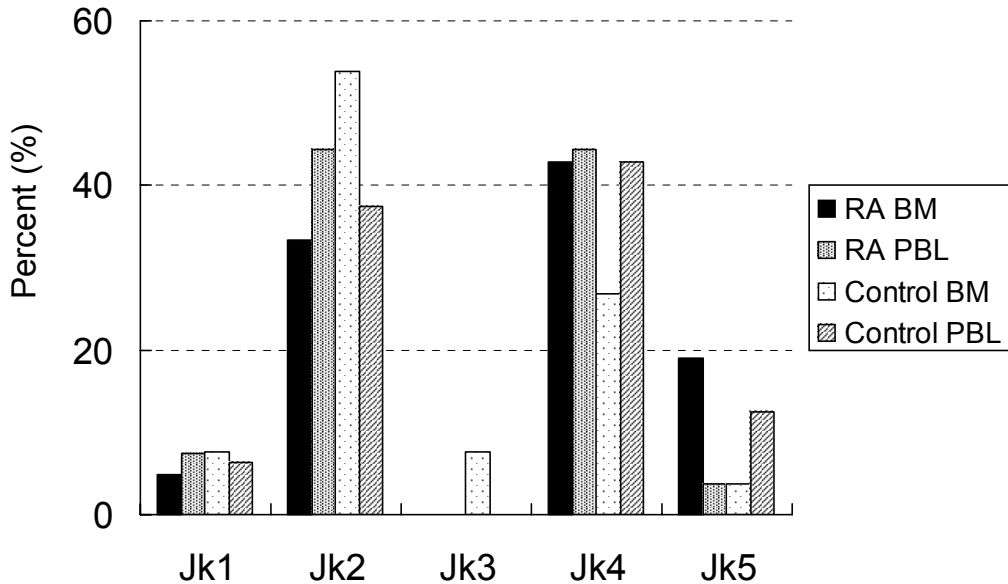


그림 8. Nonproductive sequences의 Jk family 분포. 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 경우 Jk1 family 4.8%, Jk2 family 33.3%, Jk4 family 42.9%, Jk5 family 19%로 4번 family가 가장 많았고, 류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 경우는 Jk1 family 7.4%, Jk2 family 44.4%, Jk4 family 44.4%, Jk5 family 3.7%로 2번과 4번 family가 가장 많았다. 정상인의 골수 immature B 림프구 경우 Jk1 family 7.7%, Jk2 family 53.8%, Jk3 family 7.7%, Jk4 family 26.9%, Jk5 family 3.8%로 2번 family가 가장 많았고, 정상인의 말초 mature B 림프구 경우는 Jk1 family 6.3%, Jk2 family 37.5%, Jk4 family 43.8%, Jk5 family 12.5%로, 4번 family가 가장 많았다.

4. 면역 글로블린 kappa 경쇄의 CDR3 길이

가. Productive sequences의 CDR3부위의 길이

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구(19개) 경우 CDR3에 아미노산이 8개 있는 것이 4개(21.4%), 9개 있는 것이 9개(47.4%), 10개 있는 것이 4개

(21.1%), 11개 있는 것이 2개(10.5%)로, CDR3의 길이는 아미노산 9개가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구(18개) 경우는 CDR3에 아미노산이 8개 있는 것이 2개(11.1%), 9개 있는 것이 8개(44.4%), 10개 있는 것이 7개(38.9%), 11개 있는 것이 1개(5.6%)로, CDR3의 길이는 아미노산 9개가 가장 많았다.

정상인의 골수 immature B 림프구(22개) 경우 CDR3에 아미노산이 8개 있는 것이 1개(4.5%), 9개 있는 것이 9개(40.9%), 10개 있는 것이 10개(45.5%), 11개 있는 것이 2개(9.1%)로, CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다.

정상인의 말초 mature B 림프구(25개) 경우는 CDR3에 아미노산이 8개 있는 것이 2개(8%), 9개 있는 것이 15개(60%), 10개 있는 것이 8개(32%), 11개 있는 것은 없었고, CDR3의 길이는 아미노산 9개가 가장 많았다 (그림 9).

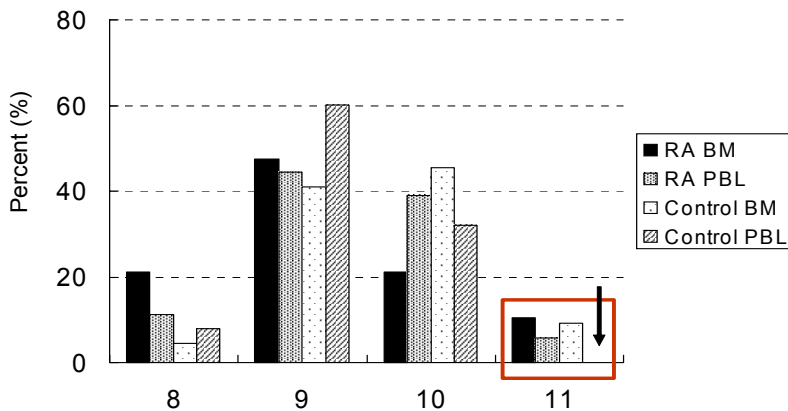


그림 9. Productive sequences의 CDR3 부위의 길이 분포. 류마티스관절염 환자의 골수 immature B 림프구 경우 CDR3에 아미노산 8개 21.1%, 9개 47.4%, 10개 21.1%, 11개 10.5%로, 아미노산 9개가 가장 많았다. 류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 경우도 CDR3에 아미노산 8개 11.1%, 9개 44.4%, 10개 38.9%, 11개 5.6%로, 아미노산 9개가 가장 많았다. 정상인의 골수 immature B 림프구 경우 CDR3에 아미노산 8개 4.5%, 9개 40.9%, 10개 45.5%, 11개 9.1%로, 아미노산 10개가 가장 많았다. 정상인의 말초 mature B 림프구 경우는 CDR3에 아미노산 8개 8%, 9개 60%, 10개 32%, 11개는 없었고, CDR3의 길이는 아미노산 9개가 가장 많았다. 아미노산 11개로 구성된 CDR3을 가진 sequence만 비교하면, 류마티스 관절염 환자에서는 골수와 말초혈액에서 모두 관찰되는데(직사각형), 정상인에서는 골수에서만 관찰되고 말초혈액에서는 관찰되지 않았다(화살표).

아미노산 11개로 구성된 CDR3을 가진 sequence만 비교하면, 류마티스 관절염 환자에서는 골수와 말초혈액에서 모두 관찰되는데 (그림10), 정상인에서는 골수에서만 관찰되고 말초혈액에서는 관찰되지 않았다 (그림9) .

RA BM

	105	107	109	113	115	117		CDR3-IMGT
	104	106	108	110	114	116	118	frame length
	C	L	Q	H	D	N	F	L
#1 BRII64VK5	tgt	cta	caa	cat	gat	aat	ttc	ctc
								c
								atg
								tac
								act
								ttt
								+
								11

Control BM

	105	107	109	113	115	117		CDR3-IMGT
	104	106	108	110	114	116	118	frame length
	C	Q	Q	R	S	N	W	P
#1 BCII5VK3	tgt	cag	cag	cgt	agc	aac	tgg	c
								cc
								ctc
								act
								ttc
								+
								11

그림 10. 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수에서 발견된 11개 아미노산으로 구성된 CDR3을 가진 immature B 림프구들. 류마티스 관절염 환자의 골수에서 관찰된 BRII64Vk5 sequence는 2개의 N-addition이 있고, 정상인의 골수에서 관찰된 BCII5Vk3 sequence는 6개의 N-addition이 있다.

나. Nonproductive sequences의 CDR3 부위의 길이

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구(21개) 경우 CDR3에 아미노산이 8개있는 것이 1개(4.8%), 9개 있는 것이 11개(52.4%), 10개 있는 것이 6개(28.6%), 11개 있는 것이 3개(14.3%)로, CDR3의 길이는 아미노산 9개가 가장 많았다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구(27개) 경우는 CDR3에 아미노산이 7개 있는 것이 1개(3.7%), 8개 있는 것이 2개(7.4%), 9개 있는 것이 9개(33.3%), 10개 있는 것이 12개(44.4%), 11개 있는 것이 2개(7.4%), 12개 있는 것이 1개(3.7%)로 CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다.

정상인의 골수 immature B 림프구(26개) 경우 CDR3에 아미노산이 8개 있는 것이 1개(3.8%), 9개 있는 것이 10개(38.5%), 10개 있는 것이 11개(42.3%), 11개 있는 것이 3개(11.5%), 12개 있는 것이 1개(3.8%)로 CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다.

정상인의 말초 mature B 림프구(16개) 경우는 CDR3에 아미노산이 9개 있는 것이 4개(25%), 10개 있는 것이 10개(62.5%), 11개 있는 것이 2개(12.5%)로 CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다.

Nonproductive sequences의 경우 11개 아미노산으로 구성된 CDR3를 가지는 sequence가 류마티스 관절염 환자나 정상인의 골수와 말초혈액 모두에서 발견되었고, 류마티스 관절염 환자의 말초혈액과 정상인의 골수에서는 12개짜리 아미노산으로 구성된 sequence도 관찰되었다 (그림 11).

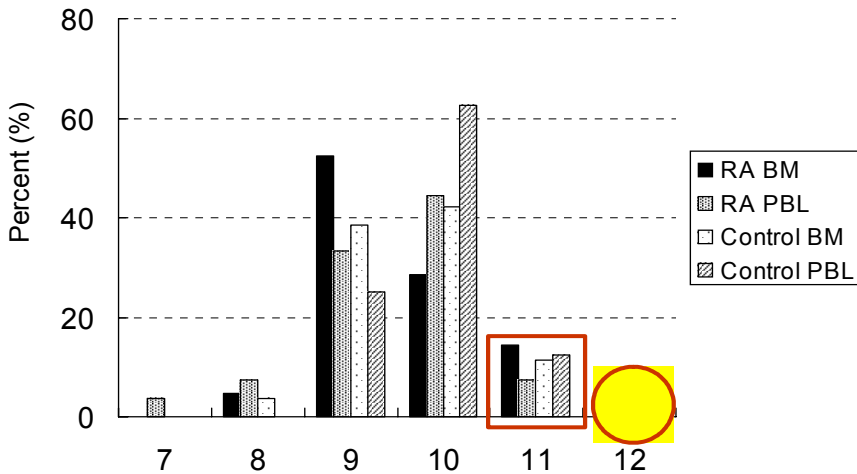


그림 11. Nonproductive sequences의 CDR3 길이 분포. 류마티스관절염 환자의 골수 immature B 림프구 경우 CDR3에 아미노산 8개 4.8%, 9개 52.4%, 10개 28.6%, 11개 14.3%로, CDR3의 길이는 아미노산 9개가 가장 많았다. 류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 경우는 CDR3에 아미노산 7개 3.7%, 8개 7.4%, 9개 33.3%, 10개 44.4%, 11개 7.4%, 12개 3.7%로, CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다. 정상인의 골수 immature B 림프구 경우 CDR3에 아미노산이 8개 3.8%, 9개 38.5%, 10개 42.3%, 11개 11.5%, 12개 3.8%로 CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다. 정상인의 말초 mature B 림프구 경우는 CDR3에 아미노산, 9개 25%, 10개 62.5%, 11개 12.5%로 CDR3의 길이는 아미노산 10개가 가장 많았다. Nonproductive sequences의 경우 11개 아미노산으로 구성된 CDR3를 가지는 sequence는 모든 군에서 발견되었고(직사각형), 류마티스 관절염 환자의 말초와 정상인의 골수에서는 12개도 관찰되었다(동그라미).

다. Productive sequence의 CDR3 부위의 N-addition

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 11개(61.1%), 1개 있는 것이 2개(11.1%), 2개 있는 것이 3개(16.7%), 3개 있는 것이 1개(5.6%), 6개 있는 것이 1개(5.6%) 등이었다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 11개(64.7%), 1개 있는 것이 5개(29.4%), 4개 있는 것이 1개(5.9%) 등이었다.

정상인의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 16개(80%), 1개 있는 것이 1개(5%), 3개 있는 것이 1개(5%), 6개 있는 것이 1개(5%), 7개 있는 것이 1개(5%) 등이었다.

정상인의 말초 mature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 17개(73.9%), 1개 있는 것이 1개(4.3%), 2개 있는 것이 2개(8.7%), 3개 있는 것이 1개(4.3%), 5개 있는 것이 1개(4.3%), 6개 있는 것이 1개(4.3%) 등이었다 (그림 12).

N-addition이 있는 경우는 류마티스 관절염 환자의 경우 골수에서 38.9%, 말초에서 35.3%, 정상인에서 골수에서 20%, 말초에서 26.1%였다.

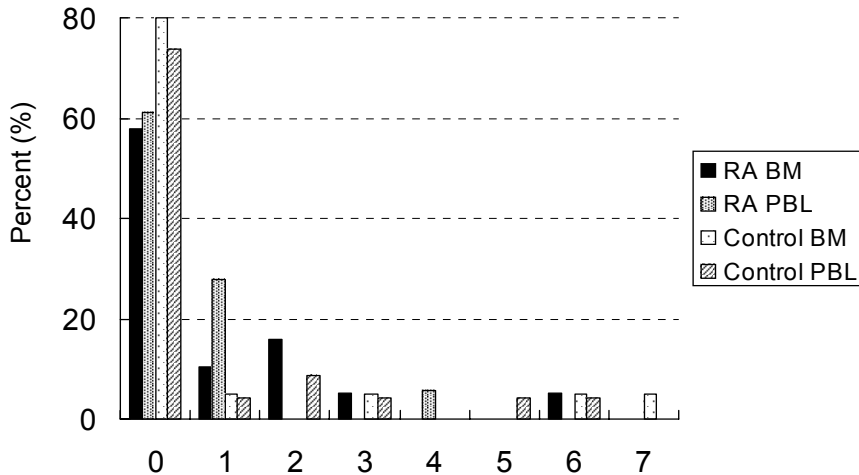


그림 12. Productive sequence에서 CDR3부위의 N-addition의 개수. 류마티스관절염 환자의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 61.1%, 1개 11.1%, 2개 16.7%, 3개 5.6%, 6개 5.6% 등이며, 말초 mature B 림프구 중 N-addition이 없는 것 64.7%, 1개 29.4%, 4개 5.9% 등이었다. 정상인의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 80%, 1개 5%, 3개 5%, 6개 5%, 7개 5% 등이며, 말초 mature B 림프구 중 N-addition이 없는 것 73.9%, 1개 4.3%, 2개 8.7%, 3개 4.3%, 5개 4.3%, 6개 4.3% 등이었다.

라. Nonproductive sequences의 CDR3부위의 N-addition

류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 14개(77.8%), 1개 있는 것이 1개(5.6%), 4개 있는 것이 1개(5.6%), 7개 있는 것이 2개(11.1%) 등이었다.

류마티스 관절염 환자의 말초 mature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 18개(78.3%), 1개 있는 것이 3개(11.1%), 2개 있는 것이 1개(3.7%), 9개 있는 것이 1개(3.7%) 등이었다.

정상인의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 17개(81%), 1개 있는 것이 2개(9.5%), 5개 있는 것이 1개(4.8%), 7개 있는 것이 1개(4.8%) 등이었다.

정상인의 말초 mature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 12개(80%), 1개 있는 것이 1개(6.7%), 2개 있는 것이 1개(6.7%), 3개 있는 것이 1개(6.7%) 등이었다 (그림 13).

N-addition이 있는 경우는 류마티스 관절염 환자의 경우 골수에서 22.2%, 말초에서 21.7%, 정상인에서 골수에서 19%, 말초에서 20%였다.

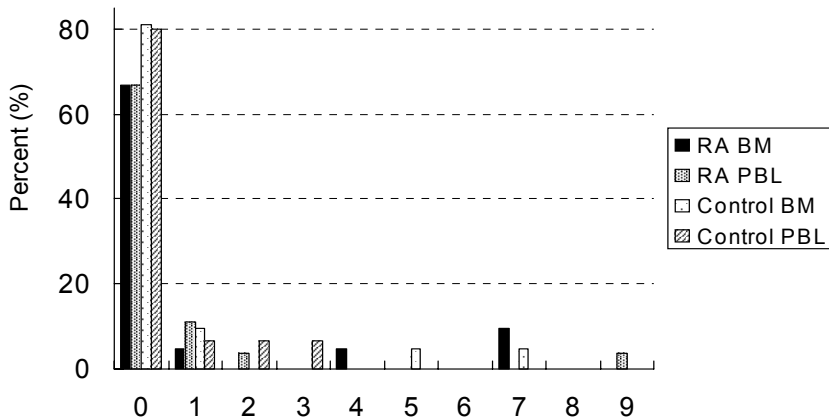


그림 13. Nonproductive sequences에서 CDR3부위의 N-addition의 개수. 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 77.8%, 1개 5.6%, 4개 5.6%, 7개 11.1% 등이며, 말초 mature B 림프구 경우 N-addition이 없는 것이 78.3%, 1개 11.1%, 2개 3.7%, 9개 3.7% 등이었다. 정상인의 골수 immature B 림프구 중 CDR3에 N-addition이 없는 것이 81%, 1개 9.5%, 5개 4.8%, 7개 4.8% 등이며, 말초 mature B 림프구 경우 N-addition이 없는 것이 80%, 1개 6.7%, 2개 6.7%, 3개 6.7% 등이었다.

IV. 고 찰

면역글로불린은 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄로 이루어져 있으며, 이들 중쇄와 경쇄는 각각 가변부위와 불변부위로 이루어져 있다. 가변부위는 아미노산의 변화가 많은 세 개의 상보성 결정부위(CDR)와 변화가 적은 네 개의 골격부위로 구성되어 있다. 중쇄와 경쇄의 3개 CDR 중에서 제 3 상보성 결정부위(CDR3)가 가장 많은 변이를 보이는데, 왜냐하면 V-(D)-J 유전자 분절의 재조합에 의해 CDR3가 이루어지기 때문이다. Crystallography 연구에 의하면 CDR3가 항원 결합부위의 중앙에 위치하며, 항체의 컴퓨터 모형에 의하면 CDR의 길이가 항체의 모양에 지대한 영향을 주며, 한 아미노산의 차이라도 항체의 전체 반응에 있어 중요한 변화를 제공할 수 있다. 따라서 CDR3의 아미노산의 길이의 변화는 면역글로불린의 결합 특이성과 친화도에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.^{31,32}

본 연구에서는 류마티스 관절염 환자에서 관찰되는 11개 아미노산 CDR3를 가진 면역글로불린 kappa 경쇄의 생성과정을 밝히고자 류마티스 관절염 환자와 정상인의 B 림프구 발생단계에서 B 림프구 repertoire를 비교 분석하였는데, 각각 세포의 sequence를 밝히기 위해 single cell PCR방법을 사용하였다.^{14,33} 전통적인 PCR방법은 c-DNA를 이용하므로 활성화된 세포가 더 많은 m-RNA를 생산하기 때문에 휴식기에 있는 세포보다 활성화된 세포쪽으로 편향되어 PCR증폭이 될 수 있고, PCR primer가 특정한 유전자와 더 잘 반응하여 그것이 선택적으로 더 많이 증폭될 수 있는 위험이 있어 repertoire 분석에는 한계점이 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해 본 연구에서는 single cell PCR 방법을 선택했는데, 자극받지 않은 비활성 B 림프구에서도 genomic DNA를 증폭해낼 수 있고, 세포와 세포간 일대일로 germline sequence를 직접 비교할 수 있는 장점 때문에 B 림프구 repertoire 분석에 있어 이상적인 연구 방법이다. 하지만, single cell PCR은 많은 비용과 시간과 인력이 필요하며, 낮은 증폭 효율성 등의 어려움이 있다.

Kappa 경쇄의 CDR3 길이는 일반적으로 9개에서 10개의 아미노산으로 알려져 있다. Kappa경쇄의 CDR3는 면역글로불린의 89번째 코돈(codon)에서 97번째 코돈까지의 부위로 정의되어지며, kappa경쇄의 CDR3의 아미노산 길이는 kappa 유전자 분절의 재조합 과정 중 exonuclease 활성화에 의하여 재조합 유전자의 말단 부위에서 nucleotide가 몇 개씩 절단되게 되므로 대부분 9개의 아미노산을 가지

게 되며 N-region addition이 없는 kappa경쇄의 경우는 11개의 아미노산은 이론적으로 불가능하다. CDR3는 Vk유전자 분절에서 기인된 23개의 염기와 Jk유전자 분절에서 유래된 최고 8개의 염기로 이루어지는데(Jk1,3,4,5: 7개; Jk2: 8개), 11개의 아미노산을 만든다고 가정 한다면 33개의 염기가 필요한데, Vk와 Jk에서 최대한 제공한다해도 그 중 31개밖에 제공할 수 없으므로, N-addition이 없이는 11개 아미노산을 포함하는 CDR3를 만들 수 없게 된다.²⁵ TdT에 의한 N-region addition은 중쇄의 유전자 재조합이 일어나는 pro-B 세포기에 일어나며, 경쇄의 재조합은 중쇄의 재조합이 일어난 후인 Pre-B 세포기에 일어나는데, 이때에는 TdT의 발현이 중지된 상태로 N-region addition이 일어나지 않아 kappa 경쇄의 CDR3 결합 부위의 아미노산 수의 변이는 제한되어 있다고 알려져 왔다. 최근 B 림프구 분화과정 중 골수나 태아의 간 등에서 pro-B 세포기와 pre-B 세포기 단계에서만 표현된다고 알려진 recombination activation gene-1 (RAG-1), RAG-2의 m-RNA와 단백질 발현이 이차면역반응 기관인 비장의 germinal center에서 발견되었는데,³⁴⁻⁴³ 이는 항원에 대한 면역글로불린의 다양성과 특이성을 높이기 위해 유전자 재조합이 이차 면역반응 기관에서도 일어나는 것으로 해석되고 있다.⁴⁴⁻⁴⁶ 류마티스 관절염 환자의 활막조직에서도 이차 면역기관인 림프절에서 보이는 germinal center 유사 구조가 관찰되고, 이것이 일종의 germinal center의 역할을 한다고 알려져 있다.

류마티스 관절염 환자의 활막에서 말초혈액보다 kappa경쇄의 11개 아미노산을 가진 CDR3가 더 많다는 발견은,²⁴ 원인 항원의 자극에 의해 일종의 면역기관인 활막에서 면역글로불린의 이차적 유전자재조합이 일어나고 있음을 시사하는 소견일 가능성이 있다. 11개 아미노산 CDR3에 대한 또 다른 가설은 류마티스 관절염 환자에서 정상인과 달리 골수에서 경쇄의 Vk-Jk 유전자 재조합시 N-region addition이 존재하며, 그 B 림프구가 말초혈액으로 나와 류마티스 관절염을 일으키는 원인이 되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 전자는 류마티스 관절염이 항원에 의해 유발되었다는 반증이 되며, 후자는 류마티스 관절염은 유전적 소인을 가진 질병이라는 반증이 될 것이다. 본 연구결과는 전자를 시사하였다. 11개 아미노산으로 구성된 CDR3를 가진 sequence가 류마티스 관절염 환자의 골수와 말초혈액에서 보이고, 정상인의 골수와 말초혈액에서도 관찰되었다. CDR3이 11개 아미노산으로 구성된 kappa 경쇄는 류마티스 관절염 특이적인 소견이 아니며, 류마티스 관절염 환자와 정상인에서 모두 관찰되는 보편적인 소견이었다. 특기할 만한 것은 정상적인 B 림프구의 기능을 갖고 있는 productive

sequence의 경우 11개 아미노산을 함유한 CDR3를 가진 kappa 경쇄가 류마티스 관절염환자의 말초혈액에서는 관찰되는 반면, 정상인의 말초혈액에서는 관찰되지 않은 점이다. 이는 류마티스 관절염 환자의 말초혈액에서 정상인의 말초혈액에서보다 11개 아미노산을 함유한 CDR3를 가진 kappa 경쇄가 많다는 기존의 연구결과에 부합되는 결과이다.²⁴ 정상인에서 더 많은 말초혈액내 mature B 림프구들을 대상으로 repertoire 분석이 이루어진다면 그 중에는 11개 CDR3를 가진 mature B 림프구가 발견될 수 있겠지만, 본 연구에서 분석된 자료의 확률에 의거하면, 류마티스 관절염 환자의 말초혈액에 11개 아미노산으로 구성된 CDR3를 함유하는 B 림프구가 정상인의 말초혈액에서 보다 많이 존재한다는 것이다. 즉, 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수에서는 11개 아미노산 CDR3가 같은 확률로 만들어지는데 비해, 말초혈액에서는 류마티스 관절염 환자에서 보다 많이 관찰된다는 사실은 11개 아미노산 CDR3를 가진 B 림프구가 말초에서 선택되어졌을 가능성이 있다. 항원에 대한 특이성과 친화도가 높은 B림프구가 선택되어졌을 수도 있고, 항원의 지속적인 자극에 대해 활막에서 이차적 유전자 재조합의 과정이 일어나 11개 아미노산 CDR3가 생성되었을 수도 있다. 이는 류마티스 관절염이 항원에 의해 특정한 B 림프구가 선택되어지거나 면역글로불린 유전자의 이차적 유전자 재조합이 일어나는 'antigen-driven response'의 면역반응^{17,20}이 일어나고 있는 질병임을 시사하는 소견으로 생각된다.

하지만, 흥미로운 것은 productive sequence의 Vk 유전자 사용이다. 류마티스 인자를 생성하는 것으로 알려진 A27(humkv325) 유전자가^{29,30} 류마티스 관절염 환자의 골수 immature B 림프구 repertoire에서는 전체의 11.1%에서 사용되었고, 말초혈액의 mature B 림프구 repertoire에서는 전체의 27.8%에서 사용되었다. 이에 반해 정상인의 골수 immature B 림프구는 전체의 4.5%가 말초혈액의 mature B 림프구는 전체의 12%가 이 유전자를 사용하였다. 항원에 노출되기 전인 골수 내 immature B 림프구 repertoire에서 류마티스 관절염 환자와 정상인 사이에 A27 유전자를 갖고 있는 B 림프구의 repertoire가 상이하다는 점은 류마티스 관절염 환자가 유전적인 소인을 갖고 있을 가능성을 시사하는 소견이라 할 수 있다. 본 연구에서 분석되었던 류마티스 관절염 환자는 병력이 6년된 진단당시 류마티스인자가 높았던 환자였다. 한편, 류마티스 관절염 환자의 A27 유전자의 사용은 말초혈액의 mature B 림프구에서 더욱 두드러진다. 이는 말초에서 A27 유전자를 사용하는 B 림프구가 선택되어 증폭되어졌을 가능성을 시사하는 결과라고 할 수 있다. 유전자 사용에 대한 결과 분석에서 비록 통계적으로 A27 유전

자의 사용이 류마티스 관절염 환자와 정상인 사이에 유의한 차이를 보이지는 않았지만, 이는 분석된 sequence 수가 적음에 기인되는 문제로 생각된다.

Pro-B 세포기에만 나타나는 것으로 보고되었던 N-region addition이 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수의 immature B 림프구의 CDR3 부위에서 관찰되었다. 과거의 학설로는 경쇄의 유전자 재조합 시에는 TdT가 존재하지 않기 때문에 N-region addition이 없다고 하였지만,²⁵ 본 연구에서 골수의 immature B 림프구 repertoire를 조사해보니 골수내 20~39%의 immature B 림프구들이 N-region addition을 갖고 있었다. 또한, N-region addition은 류마티스 관절염 환자에만 특이적으로 나타나는 소견은 아니었으며 정상인에서도 발견되었다. 골수밖의 환경에 노출된 적이 없는 immature B 림프구들에 N-region addition을 있다는 사실은 골수내에서 일어나는 면역글로블린 kappa 경쇄의 유전자 재조합 과정중 TdT가 관여한다는 증거가 될 수 있을 것이다.

V. 결 론

류마티스 관절염 환자와 특이 질병력이 없었던 건강한 성인에서 골수세포와 말초혈액세포를 채취하여, 세포 표지자인 CD19, IgM, IgD를 가지고 MACS와 FACS를 이용 immature B 림프구와 mature B 림프구를 분리하고, single cell PCR 과 direct sequencing을 통해 immature B 림프구와 mature B 림프구의 면역 글로블린 kappa 경쇄 sequence들의 repertoire를 분석하였다.

CDR3 부위에 대부분 9개와 10개 아미노산을 함유하고 있었으나, CDR3에 11개 아미노산을 함유하는 kappa 경쇄 유전자가 류마티스 관절염 환자의 골수내 immature B 림프구와 말초 혈액의 mature B 림프구에서 모두 발견되었고, 정상인에서도 immature B 림프구와 mature B 림프구에서 모두 관찰되었다. 그러나, 11개 아미노산 CDR3를 가진 productive sequence는 류마티스 관절염 환자의 말초혈액에서는 발견된 반면 정상인의 말초혈액에서는 발견되지 않았다. 류마티스 관절염 환자와 정상인 간의 immature B 림프구의 kappa 경쇄 CDR3 부위의 아미노산 길이는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. N-addition은 류마티스 관절염 환자나 정상인의 골수 immature B 림프구와 말초 mature B 림프구에서

모두 관찰되었다.

이는 류마티스 관절염이 면역글로불린 유전자의 유전적 소인을 갖고 있는 병이라기보다는 항원에 의해 면역반응이 유도되는 병임을 시사하는 소견으로 생각된다. 면역글로불린 kappa경쇄의 11개 아미노산 CDR3 생성에 류마티스 관절염 환자와 정상인의 골수에서 kappa 경쇄의 유전자 재조합 과정 중 N-addition이 기여함을 관찰하였다.

참 고 문 헌

1. Alspaugh MA, Tan EM. Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus antigens in sera and fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1981;67:1134-40.
2. Cohen BJ, Buckley MM, Clewley JP, Jones VE, Puttick AH, Jacoby RK. Human parvovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986;45:832-8.
3. Venables PJW. Infection and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1989;1:15-20.
4. Takagi T, Jasin HE. Interactions between anticollagen antibodies and chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1992;35:224-30.
5. Tao W, Bothwell ALM. Development of B cell lineage during a primary anti-hapten immune response. *J Immunol* 1990;145:3216-22.
6. Arend WP. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:595-7.
7. Fox DA. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:598-609.
8. Gause A, Gundlach K, Zdichavsky M, Jacobs G, Koch B, Hopf T, et al. The B lymphocyte in rheumatoid arthritis: analysis of rearranged V κ genes from B cells infiltrating the synovial membrane. *Eur J Immunol* 1995;25:2775-82.
9. Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berk C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:221-5.
10. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001;167:4710-4718.
11. Dorner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15:246-252.
12. Pistoia V, Corcione A. Relationships between B cell cytokine production in secondary lymphoid follicles and apoptosis of germinal center B lymphocytes. *Stem Cells*. 1995;13:487-500.
13. Metlay JP, Pure E, Steinman RM. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: A comparison of the function of dendritic cells and

- B lymphocytes. *Adv Immunol.* 1989;47:45-116.
14. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 1999;162:3053-3062.
 15. Yamada M, Wasserman R, Reichard BA, Shane S, Caton AJ, Rovera G. Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes. *J Exp Med* 1991;173:395-407.
 16. Lee SK, Bridges SL Jr, Koopman WJ, Schroeder WJ Jr. The immunoglobulin kappa light chain repertoire expressed in the synovium of a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:905-913.
 17. Ermel RW, Kenny TP, Chen PP, Robbins DL. Molecular analysis of rheumatoid factors derived from rheumatoid synovium suggests an antigen-driven response in inflamed joints. *Arthritis Rheum* 1993; 36:380-388.
 18. Bridges SL Jr, Lee SK, Johnson ML, Lavelle JC, Fowler PG, Koopman WJ, et al. Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin k light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and normal individuals. *J Clin Invest* 1995;96: 831-841.
 19. Bridges SL, Jr, Lee SK, Koopman WJ, Schroeder HW, Jr. Analysis of immunoglobulin gamma heavy chain expression in synovial tissue of a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:631-641.
 20. Lee SK, Bridges SL Jr., Kirkham PM, Koopman WJ, Schroeder HW Jr., Evidence of antigen receptor-influenced oligoclonal B lymphocyte expansion in the synovium of a patient with longstanding rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994; 93:361-370.
 21. Bridges SL Jr. Frequent N addition and clonal relatedness among immunoglobL in lambda light chains expressed in rheumatoid arthritis synovia and PBL, and the influence of V lambda gene segment utilization on CDR3 length. *Mol Med* 1998;4:525-553.
 22. Bridges SL, Lavelle JC, Lee SK, Byer S, Schroeder HW. CDR3 fingerprinting of immunoglobulin kappa light chains expressed in rheumatoid arthritis. Evidence of antigenic selection or dysregulation of gene rearrangement in B cells.

- Ann NY Acad Sci 1997;815:423-426.
23. Clausen BE, Bridges SL Jr, Lavelle JC, Fowler PG, Gay S, Koopman WJ, et al. Clonally-related immunoglobulin VH domains and nonrandom use of DH gene segments in rheumatoid arthritis synovium. 1998; Mol Med 4:240-257.
 24. Lee SK, Song CH, Kim JB, Chwae YJ, Choi IH, Bridges SL, Jr, et al. Enhanced expression of immunoglobulin kappa light chains with unusually long CDR3 regions in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1998;25:1067-1071.
 25. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed. Bethesda: US Department of Health and Human Services; 1991:2387-2597.
 26. Weber JC, Blaison G, Martin T, Knapp AM, Pasquali JL. Evidence that the VκIII gene usage is nonstochastic in both adult and newborn peripheral B cells and that peripheral CD5+ adult B cells are oligoclonal. J Clin Invest 1994;93:2093-105.
 27. Victor KD, Randen I, Thompson K. Forre O, Natvig JB, Fu SM, et al. Rheumatoid factors isolated from patients with autoimmune disorders are derived from germline genes distinct from those encoding the WA, PO and BLA cross reactive idiotypes. J Clin Invest 1991;87:1603-13.
 28. 송준현, 이찬희, 이지수, 이수곤. 정상 성인의 말초 혈액 림프구에 표현된 Humkv 325-derived K 경쇄에서의 N-region addition. 대한 면역학회지 1996;18:215-222.
 29. Chen PP, Albrandt K, Orida NK, Radoux V, Liu FT, Carson DA. Genetic basis for the cross-reactive idiotypes on the light chains of human IgM anti-IgG autoantibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:8318-22.
 30. Klein R, Jaenichen R, Zachau HG. Expressed human immunoglobulin kappa genes and their hypermutation. Eur J Immunol 1993;23:3248-62.
 31. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J Exp Med 1970;132:211-50.
 32. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 1989;342:877-83.
 33. Ghia P, Boekel E, Sanz E, Hera A, Rolink A, Melchers F: Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene

- loci. *J Exp Med* 1996;184:2217-2229.
34. Gilfillan S, Bachmann M, Trembleau S, Adorini L, Kalinke U, Zinkernagel R, et al. Efficient immune responses in mice lacking N-region diversity. *Eur J Immunol* 1995;25:3115-3122.
 35. Han S, Dillon SR, Zheng B, Shimoda M, Schlissel MS, Kelsoe G. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 1997;278:301-305.
 36. Han S, Zheng B, Schatz DG, Spanopoulou E, Kelsoe G. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag 2 expression in germinal center B cells. *Science* 1996;274:2094-2097.
 37. Hertz M, Kouskoff V, Nakamura T, Nemazee D: V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature* 1998;394:292-295.
 38. Hikida M, Mori M, Takai T, Tomochika K-I, Hamatani K, Ohmori H. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science* 1996;274:2092-2094.
 39. Hikida M, Ohmori H. Rearrangement of λ light chain gene in mature B cells in vitro and in vivo. Function of reexpressed recombination-activating gene(RAG) products. *J Exp Med* 1998;187:795-799.
 40. Li Y-S, Hayakawa K, Hardy RR. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in Bone Marrow and Fetal liver. *J Exp Med* 1993;178:951-960.
 41. Nakamura F, Tatsumi E, Tani A, Kumagai S, Kosaka Y, Sano K, et al. Coexpression of cell-surface immunoglobulin(sIg), terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and recombination activating gene 1(RAG-1): two cases and derived cell lines. *Leukemia* 1996;10:1159-1163.
 42. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, Adjacent 2 genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;248:1517-1523.
 43. Papavasiliou FP, Casellas R, Suh H, Qin XF, Besmer E, Pelanda R, et al. V(D)J recombination in mature B cells: A mechanism for altering antibody responses. *Science* 1997;278:298-301.

44. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 1993;177:999-1008.
45. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381:751-758.
46. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177:1009-1020.

Abstract

11-Amino Acid CDR3 of Immunoglobulin Kappa Light Chain expressed in a Patient with Rheumatoid Arthritis

Yong-Beom Park

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor **Soo-Kon Lee**)

11-amino acid CDR3 of the immunoglobulin kappa light chain is observed in the peripheral blood and the synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA). The mechanism for the existence of 11-amino acid CDR3 of immunoglobulin kappa light chain in RA is unclear. One hypothesis involves genetic determination and another involves antigen-driven activation. This study was undertaken to test both hypotheses and to investigate the possible mechanism for 11-amino acid CDR3 of the immunoglobulin kappa light chain in RA.

We analyzed the B cell repertoires of immature B cells from bone marrow lymphocytes (BML) and mature B cells from peripheral blood lymphocytes (PBL) in a patient with seropositive RA and a healthy control. Using MACS and FACS with cell markers of CD19, IgM, and IgD, immature B cells from BML and mature B cells from PBL were sorted. Single cell PCR and nucleotide sequence analysis for the variable regions of immunoglobulin kappa light chains were performed. The repertoires of immature B cells and mature B cells were analyzed and compared between RA and control.

Most CDR3 of immunoglobulin kappa chains from RA and control contained 9-amino acid or 10-amino acid. Sequences for 11-amino acid CDR3 were found in both immature B cells and mature B cells from RA and control. However,

productive sequences with 11-amino acid in CDR3 were found only in the PBL of RA, not in the PBL of control. The amino acid lengths in CDR3 of immunoglobulin kappa light chains from immature B cells were not significantly different between RA and control. N-nucleotide additions were found in immature B cells of bone marrow and mature B cells of peripheral blood in RA and control.

These results support the hypothesis that antigen-driven B cell activation occurs in RA. N-nucleotide additions exist in the gene rearrangement of immunoglobulin kappa light chains in the bone marrow.

Key Words: Rheumatoid arthritis, immunoglobulin kappa light chain, CDR3, gene rearrangement, N-addition, single cell PCR