

성장과정에 따른 면역글로블린 Kappa 경쇄 제3상보성결정부위 아미노산 길이의 다양성

연세대학교 의과대학 내과학교실 류마티스내과

이지수 · 송창호 · 이찬희 · 이수곤

= Abstract =

Length Diversity in CDR3 Domain of Immunoglobulin Kappa Chain during the Human Development

Jisoo Lee, Chang-Ho Song, Chan-Hee Lee and Soo-Kon Lee

Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, CPO Box 8044, Seoul, Korea

The third complementarity determining region (CDR3) of the immunoglobulin (Ig) kappa (κ) chain is known to be located at the center of antigen binding groove and critical for antibody specificity. Ig κ chain has been characterized by limited junctional diversity due to the absence of N-region addition resulting in relative conservation of CDR3 lengths with 9 or 10 amino acids. CDR3 region of 11 amino acids is only possible with N-region addition. Recently, κ transcripts with 11 amino acids CDR3 was found to be expressed in normal individuals, and in autoimmune disease such as rheumatoid arthritis, the fraction of 11 amino acids CDR3 of humkv325-derived κ chains was overexpressed compared to conventional adult peripheral B cells. However, the significance of this bias is difficult to interpret without a clear understanding of normal repertoire of CDR3 length during development. The purpose of this study is to determine whether developmental regulation of CDR3 amino acids codon lengths exists in κ chains expressed in the fetal liver, cord blood, and adult peripheral blood lymphocytes (PBL). Lymphocytes were separated from fetal liver, cord blood and adult PBL and cDNA was generated from extracted mRNA. PCR-based CDR3 fingerprinting assay was performed with V_{κ} I-IV family specific primers. CDR3 length diversity of Ig κ chain increases as the development proceeds. The length diversity most frequently occurred in V_{κ} III family derived transcripts including 11 amino acids CDR3. κ transcripts with 11 amino acids CDR3 were consistently expressed in both fetal and adult Ig repertoire.

These results support the hypothesis that κ chain CDR3 length is developmentally regulated and implicates the diversity of antigen-antibody specificity generation. *Korean J. Immunol.* 20, 3: 309~316, 1998

Key Words: Immunoglobulin kappa chain, CDR3 length diversity, Development

서 론

B 림프구는 수 많은 종류의 다양한 항원을 인지하기 위해 특이적으로 여러가지 기전을 사용하여 항체 레퍼토리의 다양성을 형성한다. 일차적으로 면역글로블린의 다양성은 중쇄 (heavy chain)와 경쇄 (light chain)의 가변부위 (variable region)를 결정하는 특이한 V_H , D, J_H 및 V_L , J_L 유전자 분절들의 무작위 재조합에 의해 형성된다¹⁾. 사람 면역글로블린 κ 경쇄 가변부위에는 약 50개의 유전자가 존재하며 그 중에 28개가 기능을 하는 V_{κ} 유전자가 있으며 염기서열의 유사성에 따라 4~6개의 유전자계 (family)

로 나눌 수 있다^{2~3)}. 이런 배아 (germline) V_{κ} 유전자 분절들이 5개의 J_{κ} 유전자 분절 중 한 개와 무작위 재조합되어 다양한 κ 경쇄의 조합을 만들어 낸다. 재조합 과정 중 결합부위에서는 배아유전자 상태 그대로 결합하지 않고 여러 개의 염기가 첨가되거나 소실되어 결합부위 다양성 (junctional diversity)이 일어나며, 이 또한 항체의 다양성 형성에 기여한다. 항체 레퍼토리는 아직 기전이 밝혀져 있지는 않으나 체세포 돌연변이에 의해 더욱 다양화된다⁴⁾. 면역글로블린 중쇄의 가변부위의 형성은 경쇄보다 다양한 것으로 알려져 있다. V와 J 유전자분절의 수는 비슷하지만 중쇄 가변부위의 재조합에 관여하는 D 유전자 분절이 추가로 존재하며, 재조합 과정 중 TdT (term-

*Correspondence and reprint request to Soo Kon Lee, M.D., PhD. Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, CPO Box 8044, Seoul, 120-752, Korea

*This study was supported by a research grant from Korean Science and Engineering Foundation (971-0705-040-1)

inal deoxynucleotidyl transferase) 효소가 작용하여 $V_H(D)_H$ 결합부위에 G/C 염기가 자주 이용되는 N-region 첨가현상이 일어나서 결합부위의 다양성을 형성하기 때문이다⁵⁻⁶⁾. 반면에 경쇄의 재조합 과정에서는 TdT의 발현이 중지된 상태로 알려져 있어 N-region 첨가는 일어나지 않으며⁷⁾, 따라서 V_L-J_L 결합부위의 아미노산 수의 변이는 제한되어 있다고 알려져 왔다^{1,8)}.

면역글로불린의 제3상보성결정부위 (complementarity determining region 3, CDR3)는 항원 결합부위의 중앙에 위치하며 여러 종류의 면역글로불린 유전자가 재조합의 과정에 의하여 형성되는 부위이기 때문에 특별히 구조적 변화가 다양하다⁷⁾. κ 경쇄의 CDR3는 89번째 codon에서 97번째 codon까지의 부위로 정의되어지며⁷⁾, κ 경쇄의 CDR3 아미노산 수는 κ 유전자분절의 재조합 과정 중 exonuclease의 활성화에 의하여 재조합 유전자의 말단부위에서 nucleotide가 몇 개씩 절단되게 되므로 대부분 9개의 아미노산으로 구성되며 nucleotide가 절단되지 않고 배아 상태로 연결되게 되면 10개의 아미노산을 형성하게 된다 (Figure 1). 따라서 가장 흔하게 관찰되는 κ 경쇄의 CDR3 아미노산 수는 9개로 구성되며 길어야 10개로서 CDR3의 아미노산 수가 11개 이상인 경우에는 N-region 첨가의 기전이 관여하지 않고는 불가능하다.

최근 정상인에서 V_L-J_L 결합부위의 아미노산 수의 변이가 비교적 흔하게 관찰되며 일부에서 TdT 활성도를 시사하는 N-region 첨가가 존재함이 관찰되었다¹¹⁻¹²⁾. 또한 자가면역질환인 류마티스 관절염 환자의 B 림프구 항원수용체의 κ 경쇄에서 N-region 첨가가 존재함이 관찰되었다⁹⁻¹⁰⁾. 한편, 자가면역 질환인 류마티스 관절염의 활막 조직의 B 림프구에서 N-region에 의해 생성된 비정상적으로 긴 κ 경쇄의 표현이 증가되어 있었으며 이들 경쇄는 클론성 팽창을 하고 있는 것이 관찰되었다¹⁰⁻¹¹⁾. 이러한 결과들은 κ 경쇄 유전자 결합부위의 변이가 기존에 알려졌던 것 보다 훨씬 다양하며 길이가 긴 CDR3가 항원-항체 특이성에 이상을 일으켜 자가면역 기전에 기여할 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 그러나 이런 병리적 현상에 대한 이해는 정상인의 항체 레퍼토리에 대한 이해 없이는 불가능하다. 태아기는 다양한 외부항원에 노출되는 성인기와는 달리 자가항원에만 노출되어 있는 시기로 결합부위의 다양성이 성인기와는 차이가 있을 것으로 예상된다. 그러나 이에 대한 연구는 아직까지 체계적으로 이루어진 바가 없다. 본 연구에서는 정상인에서 κ 경쇄의 결합부위 다양성 형성과정을 보다 자세히 이해하기 위해 성장단계를 태아기와 성인기로 나누어 CDR3 아미노산 수의 변이를 측정하였다.

본 연구에서는 많은 수의 시료에서 CDR3 아미노산 수의 변이를 손쉽게 측정하는 방법인 2단계 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 CDR3 finger-print 법을 이용하여 태아기와 성인기의 B 림프구로부터 $V_H-V_HJ_H$ 유전자계-특이 시발체 (primer)로 증폭시킨 면역글로불린 경쇄 CDR3 아미노산 길이를 측정함으로써 결합부위 다양성을 분석하고, 아미노산 수 11개의 CDR3를

가진 κ 경쇄를 측정하여 간접적으로 N-region 첨가의 존재 유무를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

태아 간조직, 제대혈, 정상 성인의 말초혈액 B 림프구를 대상으로 하였다. 정상 태아 간조직의 B 림프구는 면역학적 혹은 감염성 질환의 증거가 없는 산모에서 사산된 태아 간조직 5예에서 얻었으며, 제대혈의 B 림프구는 정상 질식분만을 한 건강한 산모의 태반 제대혈 5예에서 얻었다. 정상 성인의 말초혈액 B 림프구는 자가면역질환의 병력이 없는 건강한 성인 5예에서 얻었다.

2. 림프구의 분리

말초혈액과 제대혈은 각각 20ml 채취하였다. 태아 간조직은 잘게 자른 후 mesh에 통과시키고 인산 완충식염수 (PBS, pH 7.4)로 씻어 간조직 세포를 얻었다. 말초혈액, 제대혈, 태아 간조직 세포를 heparin 처리한 후 단핵구를 Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation에 의하여 분리하였다.

3. 총 RNA 분리

말초혈액, 제대혈, 태아 간 조직으로부터 분리한 림프구로부터 총 RNA는 Rneasy Total RNA Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, U.S.A.)를 이용하여 분리하였다. 분광광도계 (spectrophotometer) 260nm에서 광학밀도치 (O.D.)를 측정하여 RNA 획득량을 측정하였고, 일부는 formaldehyde를 포함하는 RNA 변성 agarose 겔에 전기영동하여 18S 및 28S 두 개의 라이보솜 RNA (rRNA) 띠를 관찰하여 RNA 분리와 손상정도를 확인하였다.

4. 상보적 DNA (cDNA)의 생성

MMLV reverse transcriptase kit (BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 사용하고 oligo d (T)를 시발체로 하여 말초혈액, 제대혈, 태아 간조직으로부터 분리한 총 RNA 10 μ g에 대하여 first strand cDNA를 합성하였다. 제조회사 (BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)의 protocol에 준하여 반응혼합액은 20 μ l의 용적으로 37 $^{\circ}$ C에서 60분 간 반응시켰다. First strand cDNA의 생성여부를 점검하기 위하여 actin을 증폭시켰다. Actin을 증폭시키기 위해서 primer actin 1, 2를 사용하였고 hybridization을 위하여 actin 3를 사용하였다 (Table 1). PCR 조건은 반응횟수는 30회로 증폭하였고 94 $^{\circ}$ C에서 변성반응 (denaturation) 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 스루기 반응 (annealing) 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 연장반응 (extension) 1분, 그리고 최종연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간으로 하였다.

5. 제1단계 PCR

각각의 PCR 반응은 1 μ l의 first strand cDNA를 주형으로

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers

LSK-58	Hu V _κ 1	5'-CGGGATCCATGGACATGAGGGTCCYCGCTCAGC-3'
LSK-59	Hu V _κ 2	5'-CGGAATTCATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGG-3'
LSK-60	Hu V _κ 3	5'-CGGAATTCATGGAARCCCCAGCKCAGCTTCTCT-3'
		5'-CGGAATTCATGGTGTTCAGACCCAGGTCTCA-3
LSK-61	Hu V _κ 4	
LSK-62	Hu C _κ	5'-GCTCTAGATTTCAACTGCTCATCAGATGG-3'
LSK-64	Hu V _κ 1,3,4	5'-CGGAATTCACTCTCACCATCAGCAG-3'
LSK-65	Hu V _κ 2	5'-CGGAATTCACACTGAAAATCAGC-3'
LSK-66	Hu C _κ	5'-GCTCTAGACAGATGGTGCAGCCAC-3'
Actin-1		5'-CACAGAGCCTCGCCTTTG-3'
Actin-2		5'-TGGATAGCAACGTACATG-3'
Actin-3		5'-GCGATATCATCATCCATG-3'

사용하고 2.5 Unit의 Taq DNA polymerase (Boeringer-Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하였다. Mg⁺⁺은 1.5mM의 농도로 하였고 각각의 시발체는 100pmol 씩을 사용하였다. 반응횟수는 30 cycle (Perkin-Elmer, Model 9600, U.S.A), 94℃에서 변성반응 1분, 67℃에서 스루기 반응 1분, 72℃에서 연장반응 1분, 그리고 최종 연장반응은 72℃에서 7분간으로 하였으며, 오염의 가능성을 조사하기 위하여 주형이 없는 튜브 (tube)를 동시에 포함시켰다. V_κI, V_κII, V_κIII, V_κIV 유전자계-특이 유전자로부터 유래된 전사체를 증폭시키기 위하여 LSK-62 (anti-sense C_κ oligonucleotide, Table 1)와 V_κI, V_κII, V_κIII, V_κIV 배아 유전자의 leader 및 제1골격부위 (framework I)의 염기서열을 이용하여 합성한 LSK-58, LSK-59, LSK-60, LSK-61 (sense 5' oligonucleotide, Table 1)을 시발체로 사용하였다.

6. 제2단계 PCR

V_κI, V_κII, V_κIII, V_κIV 유전자계-특이 전사체의 CDR3 아미노산 길이를 알기 위하여 제2단계 PCR을 시행하였다. LSK-58, LSK-60, LSK-61의 3'에 nesting하는 V_κI, V_κIII, V_κIV 배아 유전자로부터 유래된 제3골격부위의 염기서열을 이용하여 제작된 LSK-64 (Table 1), LSK-59의 3'에 nesting하는 V_κII의 제3골격부위의 염기서열을 이용하여 제작된 LSK-65 (Table 1), LSK-62의 5'에 nesting하는 C_κ oligonucleotide인 LSK-66 (Table 1)을 시발체로 사용하여 유전자 증폭을 시행하였다. 이때 LSK-66 시발체는 T4 kinase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A)를 사용하여 ³²P로 end labeling 하였다. 제2단계 PCR은 5μl의 제1단계 PCR 산물을 사용하였고, 방사선 표지된 LSK-66과 LSK-64는 각 반응당 10 pmole의 양을 사용하였다. 반응 횟수는 15회로 증폭하였고 94℃에서 변성반응 1분, 50℃에서 스루기 반응 1분, 72℃에서 연장반응 1분 그리고 최종 연장반응은 72℃에서 7분간 하였다. DNA의 오염을 평가하기 위하여 주형이 없는 튜브를 동시에 PCR 하였다.

7. 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 (polyacrylamide gel electrophoresis) 및 CDR3 아미노산 수의 분석

제2단계 PCR 후 4ml의 방사성 산물을 6% 변성 폴리아크릴아마이드 겔에 전기 영동하고 겔을 건조시킨 후에 Fuji IP MP film에 4시간 정도 자가 방사 기록한 후 Phosphor Imager (BAS-2500, Fuji, Japan)을 이용하여 띠를 관찰하였다. 이때 CDR3 아미노산 길이 표지자로서 이미 CDR3 아미노산 수를 알고 있는 humkv325에서 유래된 전사체 클론을 동일한 조건으로 제2단계 PCR을 시행하여 CDR3 길이에 대한 크기 표지자 (size marker)로 사용하였다. 6S10은 8개, 28S1은 9개, 5S2는 10개, 10S2는 11개의 아미노산 수의 CDR3를 가진 클론들이었다¹²⁾.

결 과

1. 태아 간조직, 제대혈, 정상성인의 말초혈액 B 림프구 면역글로불린 κ 경쇄 CDR3의 길이 분석

2단계 nested PCR을 이용하여 태아 간조직, 제대혈, 정상성인 말초혈액 각각 5예로부터 V_κI, V_κII, V_κIII, V_κIV 유전자계-특이 V_κ 전사체를 만든 후 CDR3 부위를 증폭한 결과 1개에서 4개의 명확한 띠가 관찰되었으며 각 띠는 CDR3의 아미노산 길이 8, 9, 10, 및 11개에 해당되는 띠였다 (Fig. 2). 이것은 대부분의 정상 림프구에 표현된 κ 경쇄의 재조합 과정은 in frame임을 알 수 있었다. 주된 띠는 9개 아미노산 길이의 CDR3였고 10개, 8개, 11개 순으로 관찰되었다. CDR3의 아미노산 길이의 분포는 Table 2에 제시되었다.

2. 성장단계에 따른 면역글로불린 κ 경쇄 CDR3 아미노산 길이의 다양성

V_κI, V_κII, V_κIII, V_κIV 유전자계-특이 V_κ 전사체 CDR3 아미노산 길이를 각 성장과정에 따라 분석한 결과 두 개 이상의 CDR3 길이의 다양성을 보이는 V_κ 전사체는 태아 간조

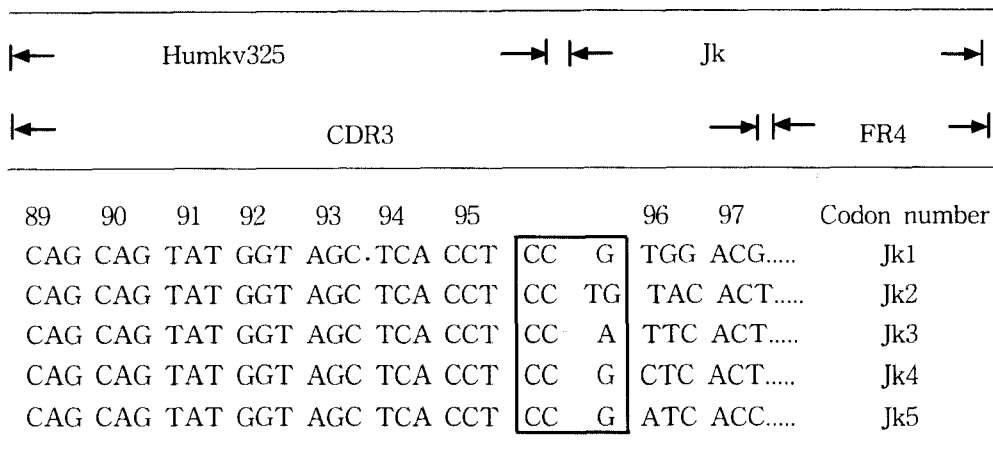


Fig. 1. Nucleotide sequences of germline humkv325 (3' portion) and 5 J κ s (5' portion) at the recombination junction. Nucleotides in the box represent sequences that may be cut during recombination. If the boxed sequences are deleted, CDR3 with 9 amino acids are formed, and if no nucleotide deletion occurs, CDR3 with 10 amino acids are formed.

Table 2. CDR3 length distribution of kappa transcripts derived from fetal liver, cord blood, and normal adult PBL

Sample	Family	V _κ I				V _κ II				V _κ III				V _κ IV			
	CDR3 length (a.a)	8	9	10	11	8	9	10	11	8	9	10	11	8	9	10	11
Fetal Liver	25wk		X				X			X	X	X	X				X
	34wk		X				X	X		X	X	X					X
	32wk		X				X			X	X	X					X
	23wk		X				X				X	X					X
	18wk	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X				X
Cord Blood	1		X				X	X		X	X	X					X
	2	X			X		X			X	X	X	X	X	X		X
	3		X				X			X	X	X					X
	4		X				X	X		X	X	X				X	X
	5		X				X			X	X	X					X
Normal Adult	25/F		X			X	X	X		X	X				X	X	
	31/F	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	31/F	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X		X	X	
	33/M		X				X	X			X	X				X	X
	38/F	X	X				X	X		X	X	X	X	X	X	X	X

직에서 40% (8/20), 제대혈에서 50% (10/20), 정상 성인 말초혈액에서 85% (17/20)로 태아기에서 성인기로 성장 단계가 진행함에 따라 CDR3 길이의 다양성이 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 두개 이상의 CDR3 길이의 다양성을 보이는 V_κ 전사체를 각 family에 따라 분석한 결과 CDR3 길이의 다양성은 V_κIII 유전자계-특이 전사체에서 가장 흔하게 나타났으며 V_κIV, V_κII, V_κI 순이었다 (Fig. 4).

3. CDR3 아미노산 수가 11개인 κ 경쇄의 발현

면역글로불린 κ 경쇄에서 11개의 아미노산 수를 가진

CDR3는 태아 간조직의 경우 10% (2/20), 제대혈의 경우 5% (1/20), 정상성인의 경우 15% (3/20)로 태아기와 성인기에서 모두 관찰되었다. 11개 아미노산 수의 CDR3는 모두 V_κIII 유전자계-특이 전사체에서만 발견되었다.

고 찰

많은 수의 시료에서 κ 경쇄 CDR3 길이의 변이를 관찰하기 위하여 본 연구에서는 2단계 PCR을 이용한 CDR3

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of second round PCR products derived from fetal liver (A), cord blood (B), and normal adult PBL (C). As a CDR3 size marker, cloned κ cDNA with CDR3 of 8, 9, 10, and 11 amino acids were used (left column). Each of the CDR3 bands seen on the gel were always 3 base pairs apart. The majority was κ chains containing CDR3s of 9 amino acids but the CDR3 lengths for κ chains ranged from 8-11 amino acids.

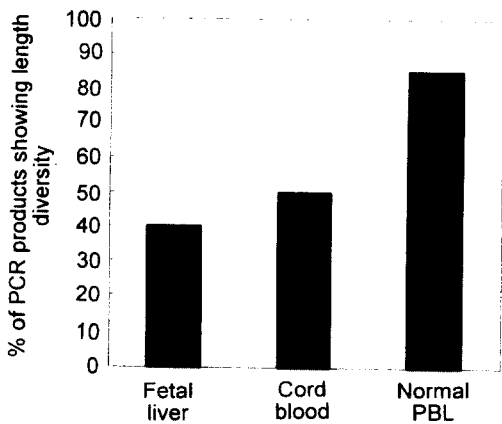


Fig. 3. Percentage of PCR amplification products containing length diversity of 2 or more CDR3 codon lengths in various stages of development. V_{κ} - J_{κ} joins with length diversity of 2 or more CDR3 codon length increased in the order of fetal liver, cord blood and normal adult PBL.

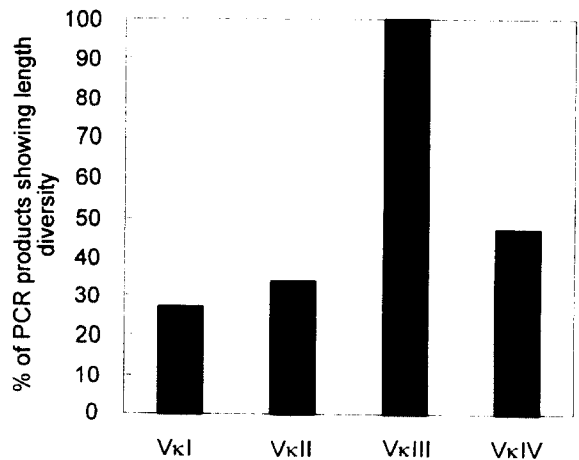


Fig. 4. Percentage of PCR amplification products containing length diversity of 2 or more CDR3 codon lengths according to family specific V_{κ} gene segment. Length diversity occurred most frequently in V_{κ} III segment, following in the order of V_{κ} IV, V_{κ} II, V_{κ} I.

finger-print 법을 사용하였다. κ 경쇄 CDR3 아미노산 수를 관찰하기 위해서는 B 림프구에 대한 hybridoma, EB

virus transformation, 혹은 특정 조직의 B 림프구의 세포로부터 각각의 κ 경쇄를 cloning하여 염기서열을 조사하는

방법이 사용되어져 왔다. 그러나 이러한 방법은 시간과 노력 및 경비가 많이 소요되는 작업으로 많은 수의 시료의 분석에 적용하기에는 어려움이 많았다. 본 연구에서 사용한 CDR3 finger-print 법은 유전자계-특이 κ 경쇄의 염기서열을 시발체로 한 nested PCR을 이용하여 여러 림프구의 RNA 시료에서 간편하게 CDR3의 아미노산 수를 측정할 수 있고, 또한 간접적으로 N-region의 존재를 조사할 수 있다. CDR3 finger-print 법의 타당성을 증명하기 위해 기존에 CDR3 부위의 아미노산 수를 알고 있는 κ 경쇄의 clone 들을 이용해 표준 실험을 시행하였는데 각각의 띠는 각각의 CDR3 아미노산 수를 정확히 반영한다는 것을 알 수 있었다 (자료 보이지 않음). 따라서 CDR3 finger-print 법은 간편하게 각 아미노산 수의 CDR3를 가지고 있는 κ 전사체를 측정할 수 있어 많은 수의 시료에서 CDR3 부위의 아미노산 수를 분석하는 연구에 적용될 수 있다¹³⁻¹⁵.

본 연구에서는 κ 경쇄 CDR3 길이의 다양성이 정상인에서 흔히 관찰되는 현상이며 태아기에서 성인기로 성장 단계가 진행함에 따라 그 다양성이 증가하는 것을 관찰하였다. Kabat 등이 보고한 165개의 사람 면역글로불린 경쇄 염기서열에서는 대부분 (83.0%) 9개 아미노산 길이의 CDR3를 가지고 있었고 CDR3 아미노산 수가 11개인 경우는 관찰되지 않았다⁷. 그러나 최근 정상성인에서 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위의 변이가 기존에 알려진 것 보다 훨씬 다양하다는 것이 여러 연구자들에 의해 관찰되었다⁹⁻¹¹. Victor 등은 태아 간 조직과 정상성인 말초혈액 2예에서 PCR로 $V_{\kappa}III$ 와 $V_{\kappa}I$ 전사체를 증폭시켰는데 41개 클론 중 14개 (34%)에서 CDR3 길이의 다양성을 관찰하였다¹⁰. 본 연구에서도 CDR3 길이의 다양성을 보이는 V_{κ} 전사체가 정상성인 말초혈액에서 85%로 정상인의 κ 경쇄에서도 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위의 다양성이 발생한다는 최근 결과들을 뒷받침해 주고 있다.

태아기는 다양한 외부 항원에 노출되는 성인기와는 달리 자가항원에 노출되어 있는 시기로 V (DJ) 결합부위의 다양성도 성인기와는 차이가 있을 것으로 예상할 수 있는 바, 태아기의 면역글로불린 V (DJ) 결합부위의 다양성에 관한 연구는 주로 중쇄를 중심으로 보고되어 있고 경쇄에서는 거의 보고된 바 없다. 태아기의 중쇄 V_HDJH 결합부위에는 N-region 첨가가 거의 없어 결합부위 항체 레퍼토리는 비교적 제한되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁷. Gu 등이 마우스에서 다양한 계통발생 시기에서 전형적인 B 림프구 수용체 중쇄의 N-region 첨가를 분석하였는데 태아기에는 N-region 첨가가 거의 관찰되지 않았으며, 성인기로 진행할수록 증가하는 것을 발견하였다¹⁷. Holmberg 등도 갓 태어난 BALB/c 마우스에서 만든 B 림프구 hybridoma의 분석에서 Gu 등과 비슷한 결과를 보고하였다¹⁶. 태아기의 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위에 관한 연구로는 Ramsden 등이 마우스 태아 간조직 B 림프구로부터 얻은 133개의 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위의 클론들을 분석하였는데 N-region 첨가는 발견하지 못했다¹⁸. 반면, Weber 등은 제대혈 림프구로부터 얻은 38개의 κ 경쇄 클론 중 16개 (42%)에서, 정상성인 클론 46개 중 16개 (42%)에서 한 개 또는 두개의

코돈이 삽입된 것을 관찰하여 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위의 다양성이 기존에 보고된 것 보다 다양한 것을 관찰하였으나 태아기와 성인기 간의 차이는 관찰되지 않았다⁹. 그러나, 본 연구에서는 태아 간조직에서 40%, 제대혈에서 50%, 정상성인 말초혈액에서 85%로, 중쇄에서와 마찬가지로 κ 경쇄 CDR3 길이의 다양성이 태아기에서 성인기로 성장단계가 진행함에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 여러 개체에서 얻은 분석으로 단일환자의 B 림프구 RNA 시료로부터 cloning하여 κ 경쇄의 염기서열을 조사한 이전 연구결과보다는 포괄적인 분석이다. 이 결과의 의미는 태아기의 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합 부위의 다양성에 관한 연구가 매우 드물어 일반화된 확신을 제시할 수는 없으나, 주로 자가항원에 노출되어 있는 태아기에는 항체 레퍼토리의 형성은 배아유전자를 그대로 사용하는 이디오타입망에 의해 이루어지므로 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위 다양성이 제한되어 있으며, 외부 항원에 대한 노출이 증가되는 성인기로 진행할수록 다양한 항원에 반응하는 항체 형성의 필요성에 의해 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ 결합부위 다양성도 증가하는 것으로 설명할 수 있다¹⁹.

면역글로불린 κ 경쇄에서 11개 아미노산 수를 가진 CDR3는 태아기와 성인기에서 모두 빈도는 낮지만 지속적으로 관찰되었다. 본 연구의 결과는 κ 경쇄 CDR3 형성 과정에 TdT의 활성이 없기 때문에 κ 경쇄의 CDR3 형성 과정에 N-region 첨가가 없다는 기존의 결과와는 차이가 있다⁴. 이러한 정상인의 말초혈액 림프구에서 CDR3의 아미노산 수가 11개인 κ 경쇄가 발현되는 현상을 두가지로 설명해 볼 수 있다. 첫째로 μ 중쇄의 재조합이 일어난 후 κ 경쇄의 재조합이 일어나는 pre-B 세포 단계에서 실제로 N-region 첨가를 일으킬 수 있는 충분한 양의 TdT가 존재하고 있으나 TdT의 활성도가 낮아 기존의 유세포 분석이나 Northern blot 등으로는 검출되지 않았을 가능성이 있다²⁰. Fluorescence-activated cell sorting 을 이용한 연구에서 핵의 TdT와 세포질의 μ 중쇄를 동시에 발현하고 있는 적은 pre-B 세포 분획이 관찰된 바 있다²¹. 둘째로, 정상 pro-B 림프구 단계에서 실제 μ 중쇄보다 κ 경쇄가 먼저 재조합 될 수도 있으며 이 때에는 TdT가 활성인 상태이므로 κ 경쇄에서 N-region 첨가가 일어나고 CDR3의 아미노산 수가 11개인 κ 전사체가 형성될 수 있다는 것이다. Kubagawa 등이 처음으로 κ 경쇄의 재조합은 일어났으나 중쇄는 배아상태 또는 DH-JH 재조합만 일어난 pro-B cell line을 보고하였다²². 이런 cell line은 B 림프구 계통발생의 대체경로 (alternative pathway)의 결과로 발생한다고 생각되고 있으며 N-region 첨가가 있는 κ 전사체는 이런 대체경로의 후손 (progeny)으로 생각되고 있다²³.

본 연구에서 V_{κ} 전사체를 각 유전자계 별로 분석한 결과 CDR3 길이의 다양성은 $V_{\kappa}III$ 유전자계에서 가장 흔하게 관찰되었고 11개 아미노산 수의 CDR3는 모두 $V_{\kappa}III$ 유전자계-특이 전사체에서만 발견되었다. 이에 대한 해석은 정확히 할 수 없으나 두가지 가능성이 있다. 첫째로 $V_{\kappa}III$ 가 말초혈액 B 림프구에서 가장 흔하게 표현되는 V_{κ} 유전자계이므로 단순히 많이 사용되는 유전자에서 확률

적으로 CDR3의 다양성이 흔히 발생하고, 11개 아미노산 길이의 V_{κ} 전사체가 관찰되었을 점이다. V_{κ} III 유전자계는 성인 말초혈액 B림프구의 약 30%에서 발현되고 있다^{24~25)}. 또 다른 가능성은 pre-B cell 단계에서 구조적 특성상 자가항원과 친화력이 많은 V_{κ} III 계 유전자가 자가 항원에 의해 면역글로블린 레파토리를 유지하는 특수한 환경에서 자가면역 반응을 유지하기 위한 한 수단으로 CDR3의 길이 다양성을 증가시킨다고 생각해 볼 수 있다. 이에 대한 근거로는 V_{κ} III 유전자계에 속하는 humkv325 유전자는 태아기와 신생아기의 B 림프구²⁶⁾, CD5+ B 림프구²⁷⁾, 자가항체를 형성하는 B 림프구^{28~29)}, 낮은 등급의 악성 B 림프구성 종양 등의 특수한 상황에서 고도로 제한되어 사용되며³⁰⁾, 또한 이 등¹²⁾은 대표적인 자가면역 질환인 만성 류마티스 환자의 활막조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리의 screening 을 통해 클론성 팽창을 하는 전사체들을 발견하였는데 이들은 모두 humkv325로부터 유래된 전사체였고 11개 아미노산 길이의 CDR3를 포함하고 있었다.

본 연구를 통하여 V_{κ} - J_{κ} 결합부위의 다양성은 성장 초기부터 지속적으로 일어나는 보편적인 현상으로 성장단계가 진행함에 따라 다양성이 증가되며, V_{κ} - J_{κ} 결합부위 다양성 형성과정에 V_{κ} III 유전자분절이 흔히 사용되고 있음을 알 수 있었다. 이런 성장과정에 따른 정상적인 항체 다양성 형성 과정에 대한 정보는 류마티스 관절염을 포함하는 B 림프구에 의해 매개되는 각종 자가면역 질환의 발병기전을 이해하는데 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD: Development of primary antibody repertoire. *Science* 238: 1079-1087, 1987.
- Klein R, Jaehichen R, Zachau HG: Expressed human immunoglobulin kappa genes and their hypermutation. *Eur J Immunol* 23: 3248-3271, 1993.
- Schable KF, Zachau HG: The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374: 1001-1022, 1993.
- Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 14: 575-581, 1983.
- Sanz I: Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 147: 1720-1729, 1991.
- 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* 173: 395-407, 1991.
- Kabat EA, Wu TT, Reid Miller M, Perry HM, Gottesman KS: Sequence of proteins of immunological interest. National Institute of Health, Washington D.C., p165-462 1991.
- Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, Alt FW, Baltimore D: Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in B cells. *Nature* 311: 752-755, 1984.
- Weber JC, Blaison G, Martin T, Knapp AM, Pasquali JL: Evidence that the V_{κ} III gene usage is non-stochastic in both adult and newborn peripheral B cells and that peripheral CD5+ adult B cells are oligoclonal. *J Clin Invest* 93: 2093-2105, 1994.
- Victor KD, Capra JD: An apparently common mechanism of generating antibody diversity: length variation of the V_L - J_L junction. *Mol Immunol* 31: 39-46, 1994.
- Bridges SL Jr, Lee SK, Johnson ML, Lavell JC, Prichard GF, Koopman WJ, Schroeder HW Jr: Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin κ light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and in normal individuals. *J Clin Invest* 96: 831-841, 1995.
- 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* 93: 361-370, 1994.
- Bridges SL Jr, Lavelle JC, Lee SK, Byer S, Schroeder HW Jr: 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* 815: 423-426, 1997.
- Kim DS, Han BH, Lee SK, Lee HK, Chwae YJ, Lee KY: Evidence for selection of 11 amino acid CDR3 domains in V kappa III-derived immunoglobulin light chains in Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol* 26: 350-354, 1997.
- Lee SK, Song CH, Kim JB, Chwae YJ, Choi IH, Bridges SL Jr, Schroeder HW Jr: Enhanced expression of immunoglobulin kappa light chains with unusually long CDR3 regions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 25: 1067-1071, 1998.
- Holmberg D, Andersson A, Carlsson L, Forsgren S: Establishment and functional implications of B cell connectivity. *Immunol Rev* 110: 89-103, 1989.
- Gu H, Forster I, Rajewsky K: Sequence homologies, N sequence insertion and J_H gene utilization in V_H D J_H joining: implications for the joining mechanism and the ontogenic timing of Ly-1 B cell and B-

- CLL progenitor generation. *EMBO J* 9: 2133-2140, 1990.
- 18) Ramsden DA, Paige CJ, Wu GE: κ light chain rearrangement in mouse fetal liver. *J Immunol* 153: 1150-1160, 1994.
 - 19) Schroeder HW Jr, Mortari F, Shiokawa S, Kirkham P, Elgavish RA, Bertrand PE III: Developmental regulation of the human antibody repertoire. *Ann NY Acad Sci* 764: 242-60, 1995.
 - 20) George JF Jr, Schroeder HW Jr: Developmental regulation of D β reading frame and junctional diversity in TCR β transcripts from human thymus. *J Immunol* 148: 1230-1239, 1992.
 - 21) Nishimoto N, Kubagawa H, Cooper MD: Comparison of pre B cell differentiation in normal and X-linked agammaglobulinemia (XLA) individuals. *Fed Proc* 5: 1346a, 1991 (Abstr)
 - 22) Kubagawa H, Cooper MD, Carroll AJ, Burrows PD: Light chain gene expression before heavy-chain gene rearrangement in pre-B cells transformed by Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 2356-2360, 1989.
 - 23) Schroeder HW Jr, Burrows PD, Cooper MD, Kubagawa H: N region addition and unusual CDR3 length distributions in κ -chain only pre-B cells. *J Cell Biochem S17B*: 235, 1992 (Abstr).
 - 24) Meindl A, Klobeck HG, Ohnheiser R, Zachau HG: The V κ gene repertoire in the human germline. *Eur J Immunol* 20: 1855-1863, 1990.
 - 25) Pargent W, Meindl A, Thiebe R, Mitzel S, Zachau HG: The human immunoglobulin κ locus. Characterization of duplicated O regions. *Eur J Immunol* 21: 1821-1832, 1991.
 - 26) Schroeder HW Jr, Hillson JL, Perlmutter RM: Early restriction of the human antibody repertoire. *Science* 238: 791-793, 1987.
 - 27) Kipps TJ: The CD5 cell. *Adv Immunol* 47: 117-185, 1989.
 - 28) Radoux V, Chen PP, Sorge JA, Carson DA: A conserved human germline V κ gene directly encodes rheumatoid factor light chains. *J Exp Med* 164: 2119-2124, 1986.
 - 29) Crowley JJ, Goldfien RD, Schrohenloher RE, Spiegelberg HL, Silverman GJ, Mageed RA, Jefferis R, Koopman WJ, Carson DA, Fong S: Incidence of three cross-reactive idiotypes on human rheumatoid factor paraproteins. *J Immunol* 140: 3411-3418, 1988.
 - 30) Schroeder HW Jr., Dighiero G: Clues to the pathogenesis of CLL through analysis of B cell CLL antibody repertoire. *Immunol Today* 15: 288-294, 1994.
-