

# 정상 성인의 말초 혈액 림프구에 표현된 Humkv325-derived $\kappa$ 경쇄에서의 N-region addition

연세대학교 의과대학 내과학교실 류마티스내과

송준현 · 이찬희 · 이지수 · 이수곤

= Abstract =

## N-region Addition in Humkv325-derived Kappa Chain Transcripts Expressed in the PBLs of Normal Individuals

Jun-Hyun Song, Chan-Hee Lee, Jisoo Lee, Soo-Kon Lee

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

Complementarity determining region(CDR3) of immunoglobulin is the center of antigen binding site. Changes in the number of amino acids of CDR3 may result in change in antigen binding specificity and affinity. The majority of immunoglobulin  $\kappa$  chain has 9 or 10 amino acid codons in the CDR3 region. Immunoglobulin  $\kappa$  chain containing CDR3 with 11 amino acid codons cannot be made without N-region addition. The aims of this study were to evaluate the presence of immunoglobulin  $\kappa$  light chain with 11 amino acid codons in its CDR3 domain expressed in the peripheral blood lymphocytes(PBLs) of normal individuals and to correlate amino acid codon length in CDR3 region with age and sex. RNA was isolated from PBLs of normal individuals and  $\kappa$  chain was PCR amplified. Amino acid length of CDR3 region was determined by polyacrylamide gel electrophoresis. A low but constant expression of immunoglobulin  $\kappa$  chain with 11 amino acid codons in CDR3 region in normal individuals was found (mean  $\pm$  SD=11.72  $\pm$  1.80%). Significant correlation was not found between amino acid length in CDR3 region of  $\kappa$  chain and age or sex. These findings suggest that the concept that N-region addition in  $\kappa$  light chain does not occur due to absence of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) needs to be reconsidered. The existence of long CDR3  $\kappa$  chain in PBLs of normal individuals may reflect that CDR diversity in is quite common. Amino acid length of  $\kappa$  chain CDR3 is not regulated during development and there is no influence of sex on the expression of  $\kappa$  chain containing CDR3 with 11 amino acids.

**Key Words:** Immunoglobulin  $\kappa$  chain, N-region addition, normal PBL

### 서 론

면역글로불린(immunoglobulin)은 2개의 동일한 중쇄(heavy chain)와 2개의 동일한 경쇄(light chain)가 이중설파이드결합(disulfide bond)에 의

하여 환상 모양을 이루고 있는 당단백질이다. 면역글로불린은 분자 간에 서로 다른 아미노산 서열을 보이는 가변부위(variable region)와 아미노산 서열이 분자간에 일정한 불변부위(constant region)로 나눌 수 있다. 가변부위는 다시 면역글로불린 분자 간에 특별히 아미노산 서열의 변화가

Correspondence and Reprint request to Soo-Kon Lee, MD, PhD. Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, CPO Box 8044, Seoul, Korea

심한 세 곳의 초가변부위(hypervariable region) 혹은 상보성 결정부위(complementarity determining region, CDR)와 상보성 결정부위 사이에 삽입되어 있는 비교적 아미노산 서열의 변이가 적은 골격부위(framework region, FR)로 구분할 수 있다. 상보성 결정부위는 항원 결합 부위로서 상보성 결정부위의 구조적 변화는 항원의 특이성, 항원-항체의 결합력 등에 변화를 일으킬 수 있는 중요한 부위로 알려져 있다. 이 중 제3 상보성 결정부위(CDR3)는 항원 결합 부위의 중앙에 위치하며 여러 종류의 면역글로블린 유전자에 의하여 형성되어 특별히 구조적 변화가 다양하다. CDR3 구역에서 아미노산 염기 혹은 아미노산 수의 변화는 항체의 특이성이나 결합력에 변화를 가져올 수 있다.<sup>12</sup>

면역글로블린 중쇄의 경우 V-D 및 D-J 재배합 때 각 유전자 분절의 결합 부위에 새로운 코돈을 형성할 수 있는데 대표적인 예로 non-germline encoded nucleotide(N-region) addition을 들 수 있으며 이는 경쇄 유전자 재배합 과정에서는 관찰되지 않는 현상으로 알려져 있다. 즉 초기의 B전구 세포(precursor B cell)에서 면역글로블린 중쇄의 재조합이 일어나게 되며 이 때 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소의 작용으로 V(D)J 결합 부위에서 G/C base가 자주 이용되는 N-region addition이 일어나서 결합 부위의 변이가 다양하게 형성된다. 확실한 기전은 알 수 없으나 중쇄의 재조합이 일어난 후  $\kappa$  경쇄의 재조합이 일어나게 되고 이 때에는 TdT의 발현이 중지된 상태이기 때문에 N-region addition은 일어나지 않으며 결합 부위의 아미노산 수의 변이는 제한되어 있다고 알려져 왔다.<sup>3,4</sup>

면역글로블린 경쇄는  $\kappa$  혹은  $\lambda$  쇠로 구성된다.  $\kappa$  경쇄의 CDR3는 면역글로블린의 89번째 코돈(codon)에서 97번째 코돈까지의 부위로 정의되어지며  $\kappa$  경쇄의 CDR3의 아미노산 길이는  $\kappa$  유전자 분절의 재조합 과정 중 exonuclease의 활성화에 의하여 재조합 유전자의 말단 부위에서 nucleotide가 몇 개씩 절단되게 되므로 대부분 9개의 아미노산을 가지게 되며 N-region addition이 없는  $\kappa$  경쇄의 경우 CDR3 아미노산 수가 11개인 경우는 이론적으로 불가능하다. 즉, 정상적인 말초 혈액<sup>9</sup>, 마우스 태아 간장<sup>6</sup>에서  $\kappa$  경쇄의 junctional N-region addition의 기전은 없다고 생각하여 왔으나, 최근 정상인의  $\kappa$  경쇄에서 N-region

addition이 관찰되었고<sup>7,8</sup>, 류마티스관절염의 활막 조직의 B 세포에서도  $\kappa$  경쇄의 재조합 시에 N-region addition이 존재할 뿐 아니라 11개의 아미노산으로 이루어진 CDR3를 가진  $\kappa$  경쇄가 정상인에 비하여 많이 증가되어 있음이 보고된 바 있다.<sup>9,10</sup> 이 결과들은  $\kappa$  경쇄 유전자 결합 부위의 다양성이 기존에 생각했던 것보다는 훨씬 다양하다는 것을 의미하며 CDR3의 아미노산 수가 자가면역기전에 기여할지도 모른다는 것을 시사할 수 있었다. 특히 항원 선택 혹은 면역글로블린 dysregulation이 있을 것으로 추정되고 있으나, 이러한 해석은 연령 혹은 성별에 따르는 정상인에서의  $\kappa$  경쇄 표현정도에 대한 정확한 정보가 없이는 무의미할 수 있다.

Humkv325는 80여개의 Vk중 VkIII 가계에 속하는 유전자 분절로서  $\kappa$  경쇄 가운데 정상에서도 비교적 흔하게 사용되어 지며 특히 류마티스 인자 등의 자가항체 생성에 자주 사용되는 것으로 알려져 있다.<sup>11,10</sup>

본 실험은 다수의 cDNA 시료에서 CDR3의 아미노산 수의 변이를 손쉽게 측정하는 방법을 개발하고, Humkv325  $\kappa$  경쇄의 염기 서열을 시발체로 한 중합 효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 정상인의 말초 혈액 림프구로부터 면역글로블린 경쇄의 CDR3의 아미노산 수를 측정함으로써 아미노산수 11개의 CDR3를 가진  $\kappa$  경쇄의 존재 유무와 간접적으로 N-region addition의 존재 유무를 조사하고, 연령 및 성별에 따르는 아미노산 수 11개의 CDR3를 가진  $\kappa$  경쇄의 표현 정도의 상관성을 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

자가면역질환의 병력이 없는 건강한 성인 14명을 대상으로 하였으며 연령은 10대에서 60대에 고르게 분포하도록 하였다.

### 2. 말초 혈액 림프구 분리

20ml의 말초 혈액을 채취하여 heparin 처리를 한 후 단백질을 Ficoll-Hypaque 밀도구배 원심분리<sup>13</sup>에 의하여 분리하였다.

### 3. 총RNA분리

분리된 말초 혈액 단백구로부터 총RNA는

N-REGION ADDITION IN KAPPA CHAINS EXPRESSED IN NORMAL PBL

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for PCR

LSK-16	5'-CCA CCG GCG AGC TCG TGT TGA CGC AGT CTC CA-3'
LSK-19	5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA A-3'
LSK-41	5'-GAT TTT GCA GT(g/t) TAT TAC TGT-3'
H-170	5'-CCA GAA TTC AAC TGC TCA TCA GAT GGC GGG AAG-3'
Actin-1	5'-CAC AGA GCC TCG CCT TTG-3'
Actin-2	5'-TGG ATA GCA ACG TAC ATG-3'
Actin-3	5'-GCG ATA TCA TCA TCC ATG-3'

Table 2. Percent of  $\kappa$  chains containing CDR3 with 11 amino acids in normal PBL

Subject	Sex/Age	% of total radioactivity
1	M/14	9.28
2	M/24	11.98
3	M/34	14.32
4	M/48	13.53
5	M/53	11.41
6	M/69	11.56
7	F/24	10.70
8	F/26	9.06
9	F/32	14.40
10	F/44	14.43
11	F/48	10.98
12	F/54	11.08
13	F/57	10.86
14	F/69	10.45
Mean $\pm$ SD		11.72 $\pm$ 1.80

acid guanidinium thiocyanate를 이용하여 분리하였다<sup>10</sup>. 림프구  $1 \times 10^7$ 에 변성용액(denaturing solution: 4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate(pH=7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol) 600 $\mu$ l를 첨가하여 세포를 깨뜨린 후 2M sodium acetate(pH 4.5) 60 $\mu$ l를 첨가하고 이어서 phenol 600 $\mu$ l와 chloroform/isoamyl alcohol 49:1 용액 120 $\mu$ l를 첨가하여 원침시킨 후 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 침전 시켜 얻었다. 분광광도계(spectrophotometer) 260nm에서 광학밀도치(O.D.)를 측정하여 분리된 RNA의 농도를 결정하고, 일부를 formaldehyde를 포함하는 agarose gel에 전기 영동하여 18S 및 28S 라이보솜 RNA(rRNA)의 띠를 확인하였다.

4. 상보적 DNA(cDNA)의 생성

MMLV Reverse Transcriptase kit(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하고 oligo d(T)를 시발체로하여 정상인의 말초 혈액으로부터 분리

한 총 RNA 10 $\mu$ g에 대하여 first strand cDNA를 합성하였으며 제조 회사의 protocol에 준하여 반응 혼합액은 20 $\mu$ l의 용적으로 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 상보적 DNA의 생성 여부는 생성된 시료에 actin primer(Actin 1, Actin 2, Table 1)를 이용하여 제 1단계 PCR을 시행한 후 Southern blotting후 Actin 3(internal oligonucleotide, Table 1)를 probe로 하여 확인 하였다.

5. 제1단계 PCR

PCR은 1 $\mu$ l의 first strand cDNA를 주형(template)으로 사용하고 2.5U의 AmpliTaq polymerase(Perkin-Elmer-Cetus, Emeryville, CA, USA)를 사용하였다. Mg<sup>++</sup>은 1.0 mM의 농도로 하고 각각의 시발체는 100 pmole씩을 사용하였다. 반응 회수는 25회로 증폭하였고(Perkin-Elmer, Model 9600) 94 $^{\circ}$ C에서 변성 반응(denaturation) 30초, 50 $^{\circ}$ C에서 스루기 반응(annealing) 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 연장 반응(extension) 1분, 그리고 최종 연장 반응은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간으로 하였으며, 오염의 가능성을 조사하기 위하여 주형이 없는 튜브(tube)를 동시에 포함시켰다. Humkv325 유전자로부터 유래된 전사체(Humkv325-derived transcripts)를 증폭시키기 위하여 LSK-19(anti-sense  $\kappa$  oligonucleotide, Table 1)와 Humkv325 배아 유전자(gerpiline gene)의 leader 및 제1 골격부위(framework I)의 염기 서열을 이용하여 합성한 LSK-16(sense 5' oligonucleotide, Table 1)을 시발체로 사용하였다.

6. 제2단계 PCR

Humkv325 유전자로부터 유래된 전사체의 CDR3의 길이를 알기 위하여 제2단계 PCR을 시행하였다. LSK-16의 3'에 nesting하는 gerpiline Humkv325-derived framework III의 염기 서열을 이용하여 제작된 LSK-41(Table 1)과 LSK-19의 5'에 nesting하는  $\kappa$  oligonucleotide인 H-170(Table 1)을 시발체로 사용하여 유전자 증폭을 시행하

**Fig. 1.** Dose dependent increase of second round PCR products of size marker clones. 1pg of 6S10, 10pg of 28S1, 100pg of 5S2 and 1ng of 10S2 plasmid were used for second round PCR as templates. Each points represents the mean  $\pm$ SD from three different experiments.

였다. H-170 시발체는 T4 kinase(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 32P로 end labeling하였다. 제2단계 PCR은 1 $\mu$ l의 제1단계 PCR 산물을 사용하였고, 방사성 표지된 H-170은 각 반응 당 3pmole, LSK-41은 10pmole의 양을 사용하였다. 반응 회수는 15회로 증폭하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 변성 반응 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 스루기 반응 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 연장 반응 1분, 그리고 최종 연장 반응은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간으로 하였으며, 오염 조절을 위하여 주형이 없는 튜브를 동시에 포함시켰다.

### 7. 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동(Polyacrylamide gel electrophoresis) 및 CDR3의 길이 분석

제2단계 PCR 후 2-4 $\mu$ l의 방사성 산물을 6% 변성 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기 영동하고 겔을 건조시켜 Kodak AR film에 하루 밤 정도 자가 방사 기록한 후 현상하여 띠를 확인하였다.  $\kappa$ 경쇄 CDR3의 아미노산 길이 표지자로서 기왕에 염기 서열이 보고되어 CDR3의 아미노산 수를 알고 있는 Humkv325에서 유래한  $\kappa$  전사체 클론을 동일한 조건으로 제2단계 PCR을 시행하여 CDR3 길이에 대한 크기표지자(size marker)로 사용하였다. 6S10은 8개, 28S1은 9개, 5S2는 10개 그리고 10S2는 11개의 아미노산 길이를 가진 clone들이었다<sup>10,17</sup>. 각 띠의 방사성은 Phosphor

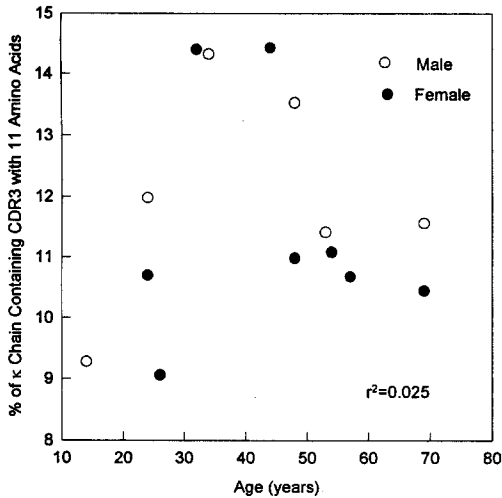
**Fig. 2.** Representative polyacrylamide gel electrophoresis of second round PCR products derived from normal PBLs. As a CDR3 size marker, cloned  $\kappa$  cDNA with CDR3 of 8, 9, 10 and 11 amino acid were used(left column). The CDR3 lengths for all  $\kappa$  chains ranged from 8-11 amino acids. There was constitutive expression of  $\kappa$  chains containing CDR3 of 11 amino acids in normal PBLs. Each of the CDR3 bands seen on the gel were always 3 base pairs apart. Majority was  $\kappa$  chains containing CDR3 of 9 amino acids followed by 10 in normal PBLs.

Imager System(Biorad)을 이용하여 각 줄에서의 여러 가지 CDR3 길이에 따른 밀도와 총 CDR3 밀도와의 퍼센트로 산출하였다.

### 8. 통계분석

연령에 따른 각 CDR3의 퍼센트와의 상관관계는 Spearman의 상관계수식을 이용하여 계산하였으며 성별간의 차이는 Mann-Whitney U검증을 이용하였고 유의수준은 p값 0.05미만으로 하였다.

## N-REGION ADDITION IN KAPPA CHAINS EXPRESSED IN NORMAL PBL



**Fig. 3.** Correlation between age and percentage of  $\kappa$  chains containing CDR3 with 11 amino acids. Significant correlation was not found between age and amino acid codon length in CDR3 region of  $\kappa$  chain.

### 결 과

#### 1. 면역글로불린 $\kappa$ 경쇄의 CDR3 아미노산 수 결정을 위한 2단계 PCR의 타당성

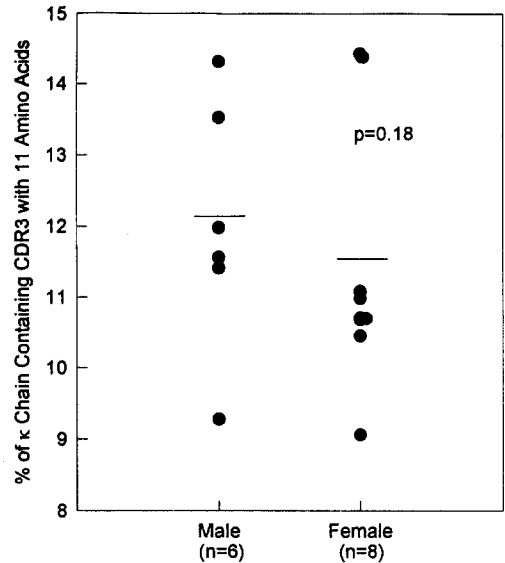
6S10, 28S1, 5S2, 10S2 cDNA 클론들을 각각 1, 10, 100, 1000 pg의 양으로 주형으로 사용하였을 때, 각각의 CDR3의 PCR 산물은 각각의 CDR3 길이와 일치되고 증폭된 DNA의 양도 dose-dependent한 상관관계를 보여 주었다( $r=0.98$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 1).

#### 2. 정상인의 말초 혈액 림프구 면역글로불린 $\kappa$ 경쇄 CDR3의 길이 분석

정상인 남자 6명과 정상인 여자 8명의 말초 혈액으로부터 림프구를 분리하여 제2단계 PCR을 시행한 결과 4개의 명확한 띠가 관찰 되었으며 이는 각각 CDR3의 아미노산 길이가 8, 9, 10 및 11개에 해당하는 띠였다. 이것은 대부분의 정상 림프구에 표현된  $\kappa$  경쇄에서의 재조합 과정은 in frame임을 알 수 있는 것이다. 이러한 양상은 14예의 정상인에서 공통된 현상이었다(Fig. 2).

CDR3의 각 띠의 밀도를 측정 한 결과 면역글로불린  $\kappa$  전사체에서 11개의 아미노산을 가진 CDR3는 평균 11.72%에서 관찰되었다(Table 2).

#### 3. CDR3 아미노산 수가 11개인 $\kappa$ 경쇄의 발현과 연령과의 관계



**Fig. 4.** Correlation between sex and percentage of  $\kappa$  chains containing CDR3 with 11 amino acids. Mean percentage of  $\kappa$  chain containing CDR3 with 11 amino acids in male was greater than in female, but significant correlation was not found between sex and amino acid codon length in CDR3 region of  $\kappa$  chain.

14세부터 69세까지의 정상인 남자와 24세부터 69세까지의 정상인 여자를 대상으로 연령별로  $\kappa$  전사체에서 11개의 아미노산을 가진 CDR3의 밀도를 측정 한 결과 연령과는 의미 있는 상관관계를 보이지 않았다( $r^2=0.025$ )(Fig. 3).

#### 4. CDR3 아미노산 수가 11개인 $\kappa$ 경쇄의 발현과 성별과의 관계

면역글로불린  $\kappa$  경쇄에서 11개의 아미노산 수를 가진 CDR3는 정상인 남자의 경우 평균 12.01%, 정상인 여자의 경우 11.50%에서 관찰되었으며 11개의 아미노산 수를 가진 CDR3는 남녀 간에 의미 있는 차이를 보이지 않았다( $p=0.18$ , Mann-Whitney U test)(Fig. 4).

### 고 찰

본 연구에서는 CDR3 아미노산 수가 11개로, 일반적으로 보고된 CDR3 아미노산 수인 9개 혹은 10개보다도 긴  $\kappa$  경쇄가 평균 11.72% 정상인의 말초 혈액 림프구에 존재하는 것을 관찰하였다. 본 연구의 결과는  $\kappa$  경쇄 CDR3 형성 과정에

-----														
<-- Humkv325					-->   <-- Jk					-->				
<-- CDR 3					--> <-- FR 4					-->				
-----														
89	90	91	92	93	94	95	96	97	-----> Codon number					
CAG	CAG	TAT	GGT	AGC	TCA	CCT	CC	G	TGG	ACG	.... Jk1			
CAG	CAG	TAT	GGT	AGC	TCA	CCT	CC	TG	TAC	ACT	.... Jk2			
CAG	CAG	TAT	GGT	AGC	TCA	CCT	CC	A	TTC	ACT	.... Jk3			
CAG	CAG	TAT	GGT	AGC	TCA	CCT	CC	G	CTC	ACT	.... Jk4			
CAG	CAG	TAT	GGT	AGC	TCA	CCT	CC	G	ATC	ACC	.... Jk5			

Fig. 5. Nucleotide sequences of germline Humkv325(3' portion) and 5Jks(5' portion) at the recombination junction. Nucleotides in the box represents sequences that may be cut during recombination. If the boxed sequences deleted, CDR3 amino acid lengths of 9 are formed, and if no nucleotide deletion occurs, CDR3 with 10 amino acids are formed.

TdT의 활성이 없기 때문에  $\kappa$  경쇄의 CDR3 형성 과정에 N-region addition이 없으며 따라서 아미노산 수의 변이가 제한되어 있다는 기존의 개념과<sup>10)</sup>는 차이가 있다. Kabat에 의해 정리된 뉴클레오타이드 서열 결정에 의한 CDR3 아미노산 수를 관찰하여 보았을 때<sup>10)</sup> 130개의 보고된  $\kappa$  경쇄서열 가운데 CDR3가 8, 9 혹은 10개의 아미노산인 경우가 96%이었고 CDR3 아미노산 수가 11개인 경우는 관찰되지 않았다.

이러한 현상은 면역글로블린  $\kappa$  경쇄의 재조합 과정에서 N-region addition이 없는 것에 기인하며 따라서 N-region addition이 없는  $\kappa$  경쇄의 경우 CDR3 아미노산 수가 11개인 경우는 이론적으로 불가능하다. 예를 들어 Humkv325 유전자 분절의 경우 일반적으로 VJ 연합이 일어날 때에 각 유전자 분절의 말단에서 수개의 뉴클레오타이드가 절단되기 때문에 보통은 CDR3의 아미노산 수가 9개가 되며 뉴클레오타이드가 배아 상태로 연결되더라도 CDR3의 아미노산 수는 10개가 된다 (Figure 5).

Kabat의 염기 서열 결과와 본 연구에서의 밀도 결과를 비교하는 것이 연구 방법의 차이로 어려우나 본 연구에서는 N-region addition이 드물지 않다고 하는 것이다. 최근 정상 성인의 cDNA library에서 2%의  $\kappa$  경쇄<sup>9)</sup>, CD5+ B cell의 경우 11%의  $\kappa$  경쇄<sup>9)</sup>에서 CDR3 아미노산 수가 11개인

경우가 발견되어 실제로 CDR3 아미노산 수가 11개인 경우가 정상말초혈액에서 존재하며 아마도 CD5+ B cell에서 주로 이러한 현상이 관찰될 것으로 추정할 수 있으나 이 점은 추후 연구를 통해 밝혀져야 할 부분으로 생각된다.

정상인의 말초 혈액 림프구에서 CDR3의 아미노산 수가 11개인  $\kappa$  경쇄가 발견되는 기전으로는 두 가지의 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째,  $\mu$ 중쇄의 재조합이 일어난 이후  $\kappa$  경쇄의 재조합이 일어날 때 실제로 TdT가 존재하는데 그동안 TdT의 활성을 증명하는 유세포분석 및 Northern blot등의 검사 방법의 예민도가 TdT의 존재를 확인하기에 충분히 높지 않았을 수 있다<sup>20)</sup>. 둘째, 실제  $\mu$ 중쇄보다  $\kappa$  경쇄가 먼저 재조합 될 수도 있으며<sup>21)</sup> 이 때에는 TdT가 활성화된 상태이므로  $\kappa$  경쇄에서 N-region addition이 일어나고 CDR3의 아미노산 수가 11인 전사체가 형성될 수 있다는 것이다.

본 연구에서는 정상 성인에서 CDR3의 아미노산 수가 11인  $\kappa$  경쇄의 표현 정도는 연령이나 성별과는 무관한 것으로 관찰되었다. 즉  $\kappa$  경쇄의 N-region addition은 전 연령층에서 또한 남녀에서 일반적으로 나타나는 현상이라는 점이다. 이 점은 류마티스관절염 등의 염증 조직 혹은 말초 혈액에서 CDR3의 아미노산 수가 11인 전사체의 표현 증가가 면역글로블린 유전자 재조합

과정의 dysregulation에 의한 것이 라는 가설<sup>22)</sup>에 반대되는 결과이다. 즉 CDR3의 아미노산 수가 11인 전사체의 표현 증가는 개인적인 유전적 특징이 아니고 항원에 의하여 선택되어진 면역 반응의 결과로 해석 될 수 있다. 한편 나이가 많아 질수록 자가면역현상 및 자가면역질환의 빈도가 높아지고, 특히 여자의 경우 임상적인 자가면역 질환이 많이 발생하게 되며 따라서 CDR3의 아미노산 수가 11개인  $\kappa$  경쇄가 나이와 성별에 따라서 변화할 수 있다는 가설에 상반된 것으로 CDR3의 아미노산 수가 11개인  $\kappa$  경쇄를 생성하는 B림프구가 직접 질병을 유발시키기 보다는 CDR3의 아미노산 수가 11개인  $\kappa$  경쇄를 생성하는 B림프구가 염증 조직에서 항원에 의하여 선택될 것이라는 후자의 가설을 뒷받침하는 증거로 사료될 수도 있다.

결론적으로 본 연구에서는 Humkv325  $\kappa$  경쇄의 염기 서열을 시발체로 하여 중합효소연쇄반응을 시행하여 다수의 cDNA 시료에서 손쉽게 CDR3의 아미노산 수를 측정할 수 있는 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동을 이용하여 면역글로블린  $\kappa$  경쇄의 CDR3의 아미노산 수를 측정하였으며, 정상인의 말초 혈액 림프구에서 CDR3의 아미노산 수가 11개인  $\kappa$  경쇄의 면역글로블린  $\kappa$  경쇄 전사체가 높지는 않으나 모든 시료에서 표현되고 있음을 알았다. 이것은 정상적으로 CDR3의 다양성 형성 이전에 관여하지 않는 것으로 알려진 N-region addition의 존재가 정상인 말초 혈액 림프구의  $\kappa$  경쇄 재조합에서 흔히 나타남을 의미하는 것이다. 향후 정상인 및 자가면역질환에서 관찰되는 CDR3의 아미노산 수가 11개인  $\kappa$  경쇄의 핵산 염기 및 아미노산의 서열 차원에서의 비교 연구를 통하여  $\kappa$  경쇄에서의 N-region addition의 의미에 관하여 연구되어야 할 것으로 생각된다.

**Acknowledgment**

본 연구는 1994학년도 연세대학교 의과대학 일반과제 연구비(94-38)의 지원으로 이루어졌음.

**참고 문헌**

1) Chothia C and Lesk AM: Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-917, 1987.  
 2) Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M,

Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D and Tulip WR: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-883, 1989.  
 3) Elliott M and Kearney JF: Idiotypic regulation of development of the B cell repertoire. *Ann N Y Acad Sci* 651:336-345, 1992.  
 4) Huling S, Fournier GR, Feren A, Chuntharapai A and Jones AL: Ontogeny of the secretory immune system: maturation of a functional polymeric immunoglobulin receptor regulated by gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4260-4264, 1992.  
 5) Klein R, Jaehichen R and Zachau HG: Expressed human immunoglobulin kappa genes and their hypermutation. *Eur J Immunol* 23: 3248-3271, 1993.  
 6) Ramsden DA, Paige CJ and Wu GE: Kappa light chain rearrangement in mouse fetal liver. *J Immunol* 153:1150-1160, 1994.  
 7) Victor KD and Capra JD: An apparently common mechanism of generating antibody diversity: length variation of the VL-JL junction. *Molecular Immunology* 31:39-46, 1994.  
 8) Weber JC, Blaison G, Martin T, Knapp AM and Pasquali JL: Evidence that the V $\kappa$ III gene usage is nonstochastic in both adult and newborn peripheral B cells and that peripheral CD5+ adult B cells are oligoclonal. *J Clin Invest* 93:2093-2105, 1994.  
 9) Martin T, Blaison G, Levallois H and Pasquali JL: Molecular analysis of the VIII-J $\kappa$  junctional diversity of polyclonal rheumatoid factors during rheumatoid arthritis frequently reveals N addition. *Eur J Immunol* 22:1773-1779, 1992.  
 10) Lee SK, Bridges SL, Jr., Kirkham PM, Koopman WJ and 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.  
 11) Chen PP, Albrandt K, Orida NK, Radoux V, Chen EY, Schrantz R, Liu F-T and Carson DA: Genetic basis for the cross-reactive idiotypes on the light chains of human IgM anti-IgG au-

- toantibodies. Proc Natl Acad Sci USA 83:8318-8322, 1986.
- 12) Jirik FR, Sorge J, Fong S, Heitzmann JG, Curd JG, Chen PP, Goldfien R and Carson DA: Cloning and sequence determination of a human rheumatoid factor light-chain gene. Proc Natl Acad Sci USA 83:2195-2199, 1986.
  - 13) Radoux V, Chen PP, Sorge JA and Carson DA: A conserved human gerpline V $\kappa$  gene directly encodes rheumatoid factor light chains. J Exp Med 164:2119-2124, 1986.
  - 14) Chen PP, Robbins DL, Jirik FR, Kipps TJ and Carson DA: Isolation and characterization of a light chain variable region gene for human rheumatoid factor. Brief Definitive Report 166:1900-1905, 1987.
  - 15) Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21:77-89, 1968.
  - 16) Chompczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-159, 1987.
  - 17) Lee SK, Bridges SL, Jr., Koopman WJ and Schroeder HW, Jr.: The immunoglobulin kappa light chain repertoire expressed in the synovium of a patient with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 35:905-913, 1992.
  - 18) Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. Nature 302:575-581, 1983.
  - 19) Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. and Foeller, C. Sequences of proteins of immunological interest, Bethesda, Maryland:U. S. Department of Health and Human Services, 1991. Ed. 5th pp. 2387.
  - 20) George JF, Jr. and Schroeder HW, Jr.: Developmental regulation of D $\beta$  reading frame and junctional diversity in TCR $\beta$  transcripts from human thymus. J Immunol 148:1230-1239, 1992.
  - 21) Kubagawa H, Cooper MD, Carroll AJ and 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.
  - 22) Lee SK, Bridges SL, Jr., Chwae YJ, Choi IH, Koopman WJ and Schroeder HW, Jr.: Immunoglobulin V $\kappa$ III light chain transcripts from rheumatoid arthritis(RA) synovial tissue are enriched for CDR 3 domains with 11 amino acids. Arthritis Rheum 37:S395, 1994.(Abstract)
  - 23) Bridges SL, Jr., Lee SK, Johnson ML, Lavelle JC, Fowler PG, Koopman WJ and Schroeder HW, Jr.: Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin  $\kappa$  light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and normal individuals. J Clin Invest 1995.