

# HLA 제 2 항원계 유전자 다형성(genomic polymorphism)과 질병감수성의 연관

연세대학교 의과대학 미생물학교실

김 세 종

— Abstract —

## HLA Class II Variants and Disease Associations

Se-Jong Kim

*Department of Microbiology Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

The HLA class II region encodes a series of polymorphic glycoproteins that form cell surface heterodimers each consisting of one  $\alpha$  and one  $\beta$  chain. These class II molecules are encoded by genes clustered within three loci. DP, DQ, and DR are functionally implicated as regulatory signals in intercellular communication during the immune responses.

The phenotypic hallmark of the HLA complex is a high degree of structural and functional polymorphism. Detailed analysis of such polymorphisms should aid in understanding the molecular basis for associations between HLA and diseases.

We have used techniques of restriction enzyme fragment analysis by Southern blotting to investigate polymorphisms associated with DQ  $\beta$  class II genes on haplotypes expressing the HLA-DR4 and -DQw3 specificities. The endonucleases Hind III and Bam HI were used to identify a specific DQ  $\beta$  genomic polymorphism that precisely corresponds with the reactivity of a monoclonal antibody A-10-83, previously shown to define a serologic split of DQw3. This study identifies two allelic DQ variants. DQw3.1 and DQw3.2.

We used these specific genotypic markers to investigate the genomic basis of the association of DR4 with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and seropositive juvenile rheumatoid arthritis (JRA). The DR4 positive IDDM demonstrate the predominant expression of DQw3.2 and the very rare expression of DQw3.1. However, in haplotype matched siblings from two IDDM families, all of the DR4 positive siblings display a IDDM-associated DQw3.2 allele. Thus, both affected and healthy individuals can carry the same haplotypes and genomic markers, demonstrating that these specific allelic variants are genetic elements that indicate a increased risk of IDDM but are not in fact disease specific. We contrasted this result with a similar analysis of patients with another DR4-associated disease, JRA. In contrast to the preponderance of the DQw3.2 allele in IDDM, the JRA patients expressed either the DQw3.1 or the DQw3.2 allele and sometimes both, without apparent association with disease expression.

The different genomic markers reported here within HLA-DQ region potentially may implicate in an analysis of HLA-associated function and disease susceptibility.

**Key Words:** HLA class II genes, polymorphisms, disease associations.

서 론

의학분야에 종사하는 사람에게 항상 의문을 던져

주고 있으며 아직도 확실한 해답을 주지 못하고 있는 것중의 하나가 특정질환이 어떤 사람에게는 잘 발병하고 또 다른 사람에게는 잘 발병되지 않는 이유에 대한 해답일 것이다. 많은 연구자들이 질병에 대한

감수성을 유전적 요인과 연관을 지어 설명하려고 노력하였다. 그러나 질병에 대한 감수성을 결정지어주는 유전적 요소를 규명하는 것은 대단히 복잡하고 또 여러 가지 다른 측면에서 분석하여야 한다.

마우스에서 Gross 바이러스에 의한 백혈병에 대한 감수성 여부가 H-2 복합체내에 존재하는 인자의 영향을 받고 있음이 보고<sup>16)</sup>된 이래 면역반응을 지배하는 유전자(Ir genes)가 주요 조직적합 항원제(Major Histocompatibility Complex: MHC)와 밀접하게 연관되어 있음이 동물실험에서 알려져 있다<sup>17)</sup>. 사람에게 있어서는 특정미생물 감염에 대한 감수성에 영향을 줄 수 있는 유전자가 사람의 MHC인 HLA 복합체와 연관되어 있을 가능성을 시사해 주어<sup>18)</sup> 많은 질환들에서 HLA 항원과의 연관성이 보고되고 있다<sup>19)</sup>. 이들 HLA 항원과의 연관은 몇몇 질환을 제외하고 대부분의 질환들이 HLA-D region 산물인 제 2 항원군(Class II)과 연관성을 나타내고 있다<sup>20)</sup>.

최근에 사람의 MHC인 HLA에 대한 생리작용, 생화학적특성 및 분자생물학 분야의 발전으로 몇몇 면역질환들의 유전적 요인을 찾아 보려는 계기가 마련되었다.

질환에 대한 면역반응의 유전적 기반을 연구하는 한 분야로 질병과 MHC내의 유전자들에 의하여 만들어지는 molecule 과의 관계를 분석하는 방법이 있다. 동종형질청을 이용하여 몇몇 자가면역성 질환에서 이들 질환과 높은 비율로 연관되어지는 제 2 항원군의 항원이 보고되고 있어 이들 질병 감수성의 면역기전을 규명할 수 있는 돌파구를 제공하였다. 그러나 이러한 phenotypic specificity와의 연관만으로는 정확하게 HLA 복합체내의 어떤 유전적 요소들이 관계있는지를 알 수가 없다. 이러한 문

제를 해결하기 위하여는 분자생물학적 연구에 의하여 HLA 제 2 항원군의 분자생물학적 구조 및 그 구조에 의하여 생길 수 있는 기능을 알아야 한다. 분자생물학적 측면에서의 연구는 제 2 항원을 다량 인기가 비교적 어려우므로 지연되어 왔으나 recombinant DNA technique 들이 제 2 항원군의 특성을 알아내는데 이용되어 이들의 유전적 다형성(genetic polymorphism) 및 그 기능을 연구하는데 크게 기여하게 되었다. 유전적 다형성을 규명하는데는 여러 가지 방법이 있으나 DNA sequencing과 Southern blot hybridization<sup>21)</sup> 두 방법을 우선적으로 내세울 수 있다. 제한효소(restriction enzymes)를 이용하여 RFLP(restriction fragment length polymorphism)을 관찰하여 비교적 쉽게 실험집단에서 유전적 다형성을 찾을 수 있는 Southern blot hybridization을 이용하여 찾은 variants를 중심으로 질병과의 연관을 기술하려고 한다.

#### HLA-D region의 구조 및 기능

사람의 주요 조직적합 항원제를 HLA 복합체라하며 제6번째 염색체상에 위치하고 있다(Fig. 1). HLA 복합체는 HLA-A, B, C 및 D 등 네개의 loci가 있으며 HLA-A, B 및 C loci의 산물을 HLA 제 1 항원제(Class I)이라 부르고 HLA-D region product를 HLA 제 2 항원제이라 하며 HLA-D region에는 적어도 세개의 loci가 있다. 처음에는 MLR-S 유전자로 알려진 HLA-D region은 H-2의 I-region과 상동하며 혼잡임파구 배양의 반응에 관여한다<sup>22)</sup>. HLA-D는 보체의존 세포독성 검사법에 의하여 확인되는 제 1 항원군과는 달리 혼잡임파구 배양법(mixed lymphocyte reaction: MLR)에 의하여 확

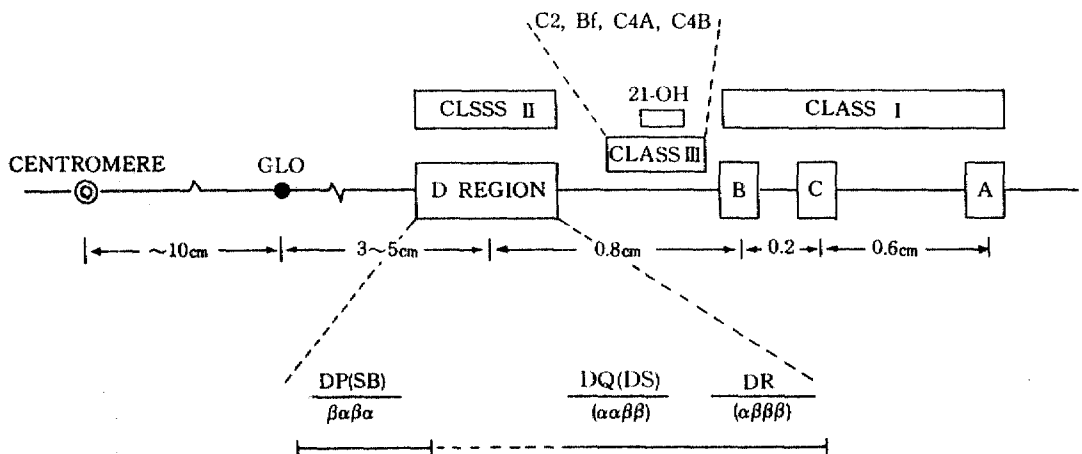


Fig. 1. Chromosome No. 6 and the HLA genetic region.

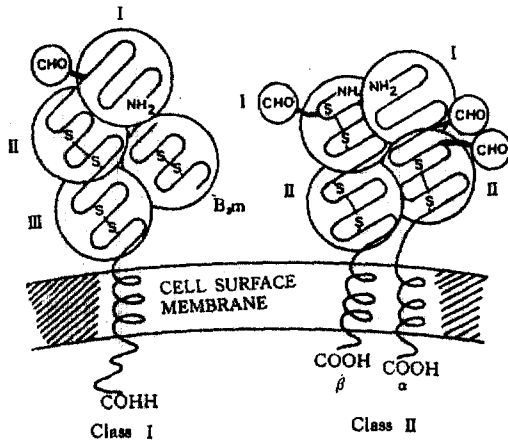


Fig. 2 Proposed quaternary structures of class I and class II antigens.

인되었다<sup>20</sup>. 그후 중산모 혈청에 MLR을 억제하는 항체가 있고 이러한 동종항혈청에 의하여 확인된 B림파구 표면항원은 HLA-D와 연관이 있음을 알게되어 D-related 즉 HLA-DR이라 부르게 되었다<sup>21</sup>. 동종항혈청으로 또 다른 항원이 규명되어 DC 혹은 MB 항원<sup>22, 23</sup> 그리고 2차 혼합림파구 배양 (secondary MLR 혹은 primed lymphocyte techni-

que: PLT)에 의하여 또 다른 항원이 규명되어 SB<sup>24</sup> 라고 하였다. International Histocompatibility Workshop (1984)의 Nomenclature Committee에서 DC 혹은 MB를 HLA-DQ 그리고 SB를 HLA-DP로 명명하였다<sup>25</sup>. HLA 제 2항원군의 항원은 하나의  $\alpha$  chain과 하나의  $\beta$  chain이 비공유결합으로 heterodimer를 이루고 있는 다형성 glycoprotein이다 (Fig. 2).  $\alpha$  chain은 약 34,000 daltons의 분자량을 가진 glycoprotein이며 비교적 polymorphic하지 않은데 반하여  $\beta$  chain은 분자량 약 29,000 daltons의 glycoprotein으로서 매우 polymorphic하여 동종항혈청으로 인정되는 주된 항원특성을 나타내고 있다. 이들 glycoprotein의 carboxy terminal는 세포 안쪽에, 배수성부위(hydrophobic portion)은 세포형질막 사이에, 그리고 amino-terminal은 세포 바깥쪽에 있다.

이들 HLA 제 2항원군의 molecules는 self 및 non-self에 대한 면역반응을 조절하는 중요한 요소이다. 혈청학적 방법, 생물학적 방법 및 분자생물학적 방법으로 HLA 제 2항원군의 molecules는 세 가지 즉 HLA-DR, DQ 및 DP로 나뉘며 마우스와 비교하면 마우스에는 2가지의 제 2항원군 즉 I-A와 I-E가 있으며 이들은 17번째 염색체상의 H-2

HLA-D region										
DP(SB)			DQ(DC)				DR			DZ
←Centromere	2 $\alpha$	1 $\alpha$	$\alpha$ DX	$\alpha$	DQ	$\alpha$	$\alpha$			
	2 $\beta$	1 $\beta$		$\beta$	$\beta$	1 $\beta$	2 $\beta$	3 $\beta$		
		234aa		232aa	229aa	237aa			229aa	
	DPw4?	DP			DQw1	DR	W52			
					DQw2		(MT2)			
					DQw3		W53			
				very polymorphic		DR1 has one less $\beta$ gene	(MT3)	?	pseudo gene	
			limited polymorphism							limited expression ? more $\beta$ chains

DP1 $\alpha$ , DP2 $\alpha$ , DR $\alpha$ , DZ $\alpha$ , little if any polymorphism.

\*Possible recombination hot spots.

Fig. 3. A schematic map of the HLA-D region. This map is based on the general consensus of the work of many different laboratories. The numbers in front of  $\alpha$  or  $\beta$  such as 2 $\alpha$  or 1 $\alpha$ , simply identify different genes. The order of DX and DQ(DC) within the DQ region is that suggested by the lack of linkage disequilibrium between DX  $\alpha$  variations and DC and DR variations. 234aa etc., indicate the number of amino acids predicted by the nucleotide sequence. The position of DZ is not clearly defined, though it is somewhere between the DP region and HLA-B.

I region에 위치하고 있다. DR은 I-E와 상동하며 DQ는 I-A와 상동하다. 그러나 아직 마우스의 H-2 제 2 항원군 중에서 DP와 상동한 항원은 확인되지 않고 있다. DR, DQ 및 DP 항원은 DQ내 및 DP와 DQ사이에 각각 recombinatorial hot spots (Fig. 3)가 있어서 DP는 DR과 연관불균형(linkage disequilibrium)이 없으나 DR과 DQ는 밀접한 연관 불균형을 보이고 있다<sup>1)</sup>.

HLA-DR, DQ 및 DP 각각에 대한  $\alpha$  및  $\beta$  gene에 대한 genomic cDNA가 보고되고 이들을 이용한 Southern blotting hybridization방법을 이용하여 HLA-D region에는 적어도 6개  $\alpha$  genes와 7개  $\beta$  genes이 있음이 알려지었다<sup>2)</sup>. 즉 HLA-DR region에는 한개의 비다형성(non-polymorphic)  $\alpha$  유전자와 3개의  $\beta$  유전자가 있는데 이중 하나의  $\beta$  유전자는 pseudogene일 것으로 생각하고 있다. HLA-DQ region에는 2개의  $\alpha$  유전자와 2개의  $\beta$  유전자가 있는데  $\alpha$  유전자중 하나는 DR의  $\alpha$  유전자와는 달리 비교적 다형성을 보이고 있다. HLA-DP region에는 2개의  $\alpha$  유전자와 2개의  $\beta$  유전자가 있다. DR, DQ 및 DP  $\alpha$  유전자와는 다른 또 하나의  $\alpha$  유전자(DZ  $\alpha$  gene)이 보고되었으나 이  $\alpha$  유전자에 대하여는 아직 잘 모르고 있다.

#### DR4 haplotypes의 다형성

HLA typing reagent로서 동중항혈청(alloantisera)를 이용하여 나타나는 반응의 양성에 따라 통상적으로 HLA-DR 항원을 DR1부터 DRw14로 부르고 있다. 혈청학적 방법으로 규명된 DR1-DRw14는 homozygous typing cells(HTC)을 이용한 혼합 입과구 배양(MLC) 방법으로 규명한 HLA-D specificities들과 대체적으로 밀접하게 연관되어 있다. 그러나 DR 항원과 Dw specificity의 연관이 비교적 밀

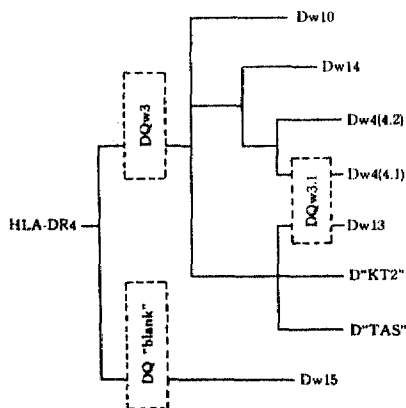


Fig. 4. The DR4-associated family of haplotype.

접하지 못하며 다양성을 나타내고 있다 (Table 1). HLA-DR4 항원양성인 사람들에서 여러 가지 다른 HLA-Dw specificities와 연관이 있어서 적어도 다섯개의 Dw specificities(Dw4, Dw10, Dw13, Dw14, 및 Dw15)와 연관되어 있다<sup>3, 4)</sup>.

Table 1. HLA Dw and DR Associations

Dw1	DR1
Dw2, Dw12	DR2
Dw3	DR3
Dw4, Dw10, Dw13, Dw14, Dw15	DR4
Dw5	DRw11(5)
Dw6, Dw18, Dw19	DRw13(w6)
Dw9, Dw16	Dw14(w6)
Dw7, Dw11, Dw17	DR7
Dw8	DRw8

근래에 HLA-DR4 HTC을 이용하여 이들이 가지고 있는  $\beta$  chain을 two-dimensional gel electrophoresis를 이용하여 6가지의 electrophoretic  $\beta$  chain variants가 있음을 보고하였다<sup>11, 16, 19)</sup>. 이 결과는 DR4 HTC들이 가지고 있는 D-region gene products중에 적어도 DR4 동중항혈청과 양성반응하는 DR4 epitope를 공통으로 가지고 있으며 이외에 각 DR4 HTC들은 그들 특유의 다른 HLA 제 2항원을 가지고 있음을 말한다. 즉 DR4는 여러 가지의 haplotype을 포함하고 있음을 말해준다. 그러므로 HLA-DR4 항원과 연관되어 있는 질병에 있어서 DR4 항원 자체만으로는 질병과 관계되는 특유 인자로서는 불충분하다. Two-dimensional gel electrophoresis를 이용하여 2항원군의 다변성(diversity)를 알아낼 수 있다고 하지만 어떤 molecule의 경우에는 amino acid 배열에 차이는 있으나 이 차이가 neutral amino acid substitution에 의한 것일 경우 전반적인 전하(electronic charge)에는 차이가 없으므로 전기영동법으로는 그 차이를 확인할 수가 없다. 또 질병과 HLA 항원의 연관에 있어서 연관과 유관한 유전자가 HLA 유전자의 noncoding region에 있을 가능성도 있다. 위에 거술한 이유로 많은 연구자들이 DR haplotype 내에서도 genotype의 차이가 있는지를 연구하고 있으며<sup>13, 14, 23, 27)</sup> 이러한 genotypic variant를 질병과 연관하여 많은 연구를 하고 있다<sup>5, 21, 23, 24)</sup>.

#### DQw3와 DR4의 연관 불균형

서론에서 말한바와 같이 DQ는 DR과 강한 연관 불균형(linkage disequilibrium)을 보이고 있으므로

**Table 2.** HLA DR-DQ association

DRw13(DRw6) DRw14(DRw6)	DR1 DR2 DRw10	DQw1
DR3	DR7	DQw2
DRw11(DR5) DRw12(DR5)	DR4 DRw9	DQw3
DRw8  DRw52	  DRw53	

Less frequent DR-DQ associations

DR3	DQw1(South Am.)
DR4	DQ blank(Oriental)
DRw11(5)	DQw1(All Pop.)
DRw13(w6)	DQw3(All Pop.)
DRw14(w6)	DQw3(All Pop.)
DR7	DQw3(All Pop.)
DRw8	DQw1(Oriental)
DRw8	DQw3(All Pop.)

대체로 같은 DR 항원을 가지고 있는 세포들은 같은 DQ 항원을 가지고 있다(Table 2).

HLA-DR4 양성세포는 Dw4, Dw10, Dw13, Dw14 혹은 Dw15 specificities와 연관되어 있으며 대부분의 DR4 세포는 HLA-DR4-DQw3 양성이나 DR4-Dw15 세포는 HLA-DR4-DQ-blank이다(Fig. 4). Monoclonal antibody를 이용한 sequential immune precipitation 방법으로 HLA-DR4와 연계되어 있는 DQw3는 DR4와 다른 별개의 HLA 제 2 항원군 molecule 일 뿐만아니라 DR molecules에서와 같이 DQ molecules의 structural variability를 나타내고 있다<sup>16, 17</sup>. 그러나 일부의 DwQ3 세포는 DR5, DR7, DRw8, DRw9 혹은 DRw12를 가지고 있다. 즉 DQw3 specificity가 자기 다른 HLA-DR 및 D세포에 표현되어 DQw3세포도 다양한 표현형(heterogenous phenotype)를 나타내고 있다<sup>18</sup>.

**2 개의 DQw3 allelic variants: DQw3.1 과 DQw3.2**

HLA-DQw3 specificity는 Dw15 specificity를 제외한 모든 HLA-DR4 homozygous cell lines과 DR5, DR7, DRw8, DRw9, 및 DRw12등을 가지고 있는 몇몇 haplotypes 등의 일부분에서 표현된

다. 근래에 DQw3 molecules가 DR4와 DR5 양성 세포들에서 분리된 것이 서로 다를 뿐만아니라 DR4 haplotype 중에서도 HLA-D specificity에 따라  $\beta$  chain의 구조적 차이가 있음을 보고하고 있다<sup>19</sup>. 즉 DQw3 molecule이 polymorphic하다고 할 수 있다. 이에 본 연구자는 DQw3 specificity를 가지고 있는 여러 가지 haplotypes에서 얻은 genomic DNA를 제한효소로 소화처리 시킨후 DQ  $\beta$  cDNA probe와 hybridization 시키어 DQ  $\beta$ 의 RFLP 존재유무를 알아보려고 하였다.

HLA-DQw3 specificity를 가지고 있는 세포에서 얻은 DNA를 Hind III 혹은 Bam HI 제한효소로 소화시킨 후 DQ  $\beta$  cDNA probe로 hybridize 시키어 3.4 kb Hind III RFLP를 나타낸 DQw3-positive cell 들은 모두 6.9/3.7kb Bam HI RFLP를 나타내었다(Fig. 5). 3.4kb Hind III RFLP는 3.2kb Hind III fragment와 그리고 6.9/3.7kb Bam HI RFLP는 12kb Bam HI fragment와 각각 allele임을 family segregation analysis에서 확인할 수 있었다. 또한 3.4kb Hind III 및 6.9/3.6kb Bam HI RFLP는 monoclonal antibody A-10-83<sup>19</sup> 반응과 완전히 일치됨을 관찰하였으며 이 variant를 "DQw3.1"이라 부르고 allele인 3.2kb Hind III 및 12kb Bam HI fragment를 나타내는 세포의 DQw3를 "DQw3.2"라고

**Fig. 5.** Southern blot analysis of Bam HI-digested(A) and Hind III-digested(B) genomic DNA from 18 HLA-DR4 HCL, hybridized with a DQ $\beta$  cDNA probe. HCL designations are given above the lanes.

하였다<sup>14</sup>). DQw3.1 및 DQw3.2 allele는 DR4+, DQw3+ haplotype을 가지고 있는 가족에서 유전 분리(segregation)되는 것을 확인하였다(Fig. 6).

**HLA 제2 할원계 유전자 다형성(genomic polymorphism)과 질병의 연관**

위에서 기술한 DQw2.1과 DQw3.2 allele를 DR4

와 연관된 질환인 Insulin dependent diabetes mellitus(IDDM)과 juvenile rheumatoid arthritis(JRA)에서 검사하여 봄으로써 이들 질환과 연관이 있는 genotypic marker로서의 이용을 알아보고자 하였다<sup>15</sup>. IDDM과 HLA-DR4와의 연관에 대하여는 많은 연구가 되어있다<sup>16,17</sup>. IDDM은 DR4+, Dw4+ phenotypes과 강하게 연관되어 있으며 IDDM의 발병 위험도는 DR3/4이면서 Dw3/Dw4 heterozygous인 사람에서 더욱 높다<sup>18</sup>. 17명의 IDDM 환자에서 얻은 DNA를 Bam HI 제한효소로 처리한 후 DQ cDNA로 hybridize 시켜어 DQw3의 allele인 두가지 즉 DQw3.1과 DQw3.2를 대표하는 polymorphic bands를 확인하였다<sup>19</sup>. 17명 IDDM 환자 중 2명에서만 DQw3.1 allele를 나타내었다. 즉 DQw3.2 allele를 가지고 있는 DR4 haplotype은 IDDM이 발병할 위험도가 높은 것으로 생각된다.

JRA는 IDDM과 마찬가지로 DR4와 연관되어 있는 질병이면서 DR4-Dw4 및 DR4-DR14 haplotypes를 보이고 대부분의 JRA 환자는 이들 두 DR4 haplotype의 heterozygous 즉 DR4-Dw4/DR4-Dw14을 나타내고 있다<sup>4, 19, 20, 20</sup>. 또한 DQw3 variants의 비율도 IDDM에서는 DQw3.2 allele가 월등히 높은 비

**Fig. 6.** Bam HI RFLP and A-10-83 seroreactivity in family HAR. Bam HI endonuclease digestion of genomic DNA is shown for five family members in which A-10-83 seroreactivity segregates with a maternal DQw3\* haplotype. The HLA phenotypes shown are A11, B27, DR9, DQw3 (a); A28, B37, DR10, DQw1 (b); A11, B44, DR7, DQw2 (c); and A28, B35, DR4, DQw3(3.1) (d).

**Table 3.** DR4-related allelic markers for DQ locus polymorphisms associated with disease

Locus:	DQ β2	
Allele:	DQw3.1	DQw3.2
Informative RFLP:	6.9/3.7kb Bam HI	12kb Bam HI 3.4kb Hind III
Disease Association:		
IDDM	0~8%	92~100%
JRA (seropositive)	64%	91%

cDNA probe로 hybridize 시키어 haplotype이 같은 자식들에서 DQ  $\beta$  variants 차이를 본 실험에서 임상적으로 IDDM이 유발된 경우나 건강한 경우 모두에서 IDDM-associated DQw3.2 allele를 볼 수가 있었다(Fig. 8).

즉 이러한 결과는 DQw3.2 allele가 IDDM이 생길수 있는 위험도를 나타낼 수는 있으나 아직도 질병특이의 genetic marker라고는 할 수 없다. 그러나 HLA 제 2 항원군 molecules들의 variations들이 여러 가지 다른 HLA와 연관된 기능을 조절하고 있으므로 HLA-DQ내에 여러 가지의 genomic markers를 규명할 수 있음은 HLA와 질병의 연관을 분자생물학적 측면에서 이해하는데 이용될 수 있다.

### 참 고 문 헌

- 1) Albert E and Mayr W: Brief summary of the Ninth International Histocompatibility Workshop. *Tissue Antigens* 25: 3, 1985.
- 2) Bach FH and van Rood JJ: The major histocompatibility genetics and biology. *N. Engl. J. Med.* 295: 872, 1976.
- 3) Benacerraf B and McDevitt HO: Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*, 175: 273, 1972.
- 4) Bertrams J and Baur MP: Insulin-dependent diabetes mellitus. In *Histocompatibility Testing 1984*. E.D. Albert et al., ed., pp. 348-358. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1984.
- 5) Bodmer WF, Albert E, Bodmer JG, Dausset J, Kissmeyer-Nielsen F, Jayr W, Payne R, Van Rood JJ, Trnka Z and Walford RL: Nomenclature for factors of the HLA system 1984. *Immunogenetics*, 20: 593, 1984.
- 6) Cohen D, Cohen O, Marcadet A, Font MP, Massart C, Hors J, Deschamps I and Dausset J: Association of class I and class II MHC restriction fragment polymorphism with HLA-related diseases. In *Histocompatibility Testing 1984*. E.D. Albert. et al., pp 557-558, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1984.
- 7) Corte G, Cabali F, Damiant G, Bargellesi A, Tosi R and Sorrentino R: Human Ia molecules carrying DC1 determinants differ in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits from Ia molecules carrying DR determinants. *Nature*. 292: 357, 1981.
- 8) Dobloug JH, Forre O and Thorsby E: HLA-

Fig. 8. Genomic DNA from IDDM patients and sibling from one family. Haplotypes are as shown, where a=A1, B8, DR3; b=A3, B8, DR3; c=A2, B15, DR4; and d=A10, B27, DR1, Asterisks indicate individuals with IDDM.

올로 나타나는데 반하여 DQw3양성인 JRA 환자에서는 정상건강인과 비슷한 비율로 DQw3.1 및 DQw3.2 alleles를 나타내고 있다(Fig. 7 및 Table 3).

### 결 론

본 연구에서 찾아낸 DQ allelic variants같은 genotypic markers를 이용함으로써 특정질환들과 연관되어 있는 phenotype이 유사한 HLA haplotypes들의 분자생물학적 특성을 알아볼 수 있게 됐다. 위에서 예로 들은 HLA-DR4와 강하게 연관되어 있는 두 가지 질병도 DR variants로 확실히 구별이 가능하게 되었다. 그러나 IDDM 환자가 있는 두 가족을 대상으로 이들에게서 얻은 Bam HI 처리 DNA를 DQ  $\beta$

- DRw4 and rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1: 548, 1979.
- 9) Fritz HB, Rich SS, Barbosa J and Segall M: Insulin-dependent diabetes-associated HLA-D region encoded determinants. *Hum. Immunol.* 12: 59, 1985.
  - 10) Giles RC, Hurley CK and Capra JD: Primary structural variation among serologically indistinguishable DS antigens. The MB3-bearing molecule in DR4 cells differs from the MB3 bearing molecule in DR5 cells. *J. Immunol.* 133: 1, 1984.
  - 11) Groner JP, Watson AJ and Bach FH: Dw/LD-related molecular polymorphism of DR4-chains. *J. Exp. Med.* 157: 1687, 1983.
  - 12) Holbeck SL, Kim SJ, Silver J, Hansen JA and Nepom GT: HLA-DR4-associated haplotypes are genotypically diverse within HLA. *J. Immunol.* 135: 637, 1985.
  - 13) Karr RW, Rodey GE, Lee T and Schwartz BD: Association of HLA-DRw4 with rheumatoid arthritis in black and white patients. *Arthritis Rheum.* 23: 1241, 1980.
  - 14) Kim SJ, Holbeck SL, Nisperos B, Hansen JA, Maeda H and Nepom GT: Identification of a polymorphic variant associated with HLA-DQw3 and characterized by specific restriction sites within DQ  $\beta$  chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8139, 1985.
  - 15) Lilly F, Boyse EA and Old LJ: Genetic basis of susceptibility to viral leukemogenesis. *Lancet*. 11: 1207, 1968.
  - 16) Maeda H and Hirata R: Molecular identifications of HLA-DR4, MT3, and TB21 antigens on HLA-DR4 homozygous B cell lines. *J. Immunol.* 132: 574, 1984.
  - 17) McDevitt HD and Bodmer WF: HL-A, immune response genes, and disease. *Lancet*. 1: 1269, 1974.
  - 18) Nepom GT, Nepom BS, Antonelli P, Mickelson E, Silver J, Goyert SA and Hansen JA: The HLA-DR4 family haplotypes consists of a series of distinct DR and DS molecules. *J. Exp. Med.* 159: 394, 1984.
  - 19) Nepom BS, Nepom GT, Mickelson E, Antonelli P and Hansen JA: Electrophoretic analysis of human HLA-DR antigens from HLA-DR4 homozygous cell lines: Correlation between  $\beta$ -chain diversity and HLA-D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 6962, 1983.
  - 20) Nepom BS, Nepom GT, Mickelson E, Schaller JG, Antonelli P and Hansen JA: Specific HLA-DR4-associated histocompatibility molecules characterize patients with seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 74: 287, 1984.
  - 21) Nepom BS, Palmer J, Kim SJ, Hansen JA, Holbeck SL and Nepom GT: Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between DR4 positive IDDM and DR4 positive JRA. Submitted for publication. 1985.
  - 22) Nose Y, Sato K, Nakagawa N, Kondoh K, Inouye H and Tsuji K: HLA-D clusters associated with DR4 in the Japanese population. *Hum. Immunol.* 5: 199, 1982.
  - 23) Owerbach D, Hagglof B, Lermark A and Holmgren G: Susceptibility to insulin-dependent diabetes defined by restriction enzyme polymorphism of HLA-D region genomic DNA. *Diabetes.* 33: 958, 1984.
  - 24) Owerbach D, Lermark A, Platz P, Ryder SP, Rask L, Peterson PA and Ludvigsson J: HLA-D region  $\beta$ -chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin dependent diabetic individuals. *Nature.* 303: 815, 1983.
  - 25) Owerbach D, Lermark A, Rask L, Peterson PA, Platz P and Svejgaard A: Detection of HLA-D homozygous typing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 3758, 1983.
  - 26) Reinsmoen NL and Bach FH: Five HLA-D clusters associated with HLA-DR4. *Hum. Immunol.* 4: 249, 1982.
  - 27) Shackelford DA, Mann DL, van Rood JJ, Ferrara GB and Strominger JL: Human B cell alloantigens DC1, MT1 and LB12 are identical to each other but distinct from the HLA-DR antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4566, 1981.
  - 28) Shaw S, Johnson AH and Shearer GM: Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic



- proliferative and cytotoxic responses. *J. Exp. Med.* **152** : 565, 1980.
- 29) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 503, 1975.
- 30) Stastny P: Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **298** : 869, 1978.
- 31) Stastny P, Ball EJ, Dry DJ and Nunez G: The human immune response region(HLA-D) and disease susceptibility. *Immunological Rev.* **70** : 113, 1983.
- 32) Suzuki M, Yabe T, Satake M, Juji T and Hamaguchi H: Two-dimensional gel electrophoretic analysis of the MT3 and DR4 molecules from different D-typed cells. *J. Exp. Med.* **160** : 751, 1984.
- 33) Svejgaard A, Platz P and Ryder LP: HLA and disease 1982-A survey. *Immunological Rev.* **70** : 193, 1983.
- 34) Svejgaard A and Ryder LP: HLA genotype distribution and genetic models of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. Humn. Genet.* **45** : 293, 1981.
- 35) Tosi R, Tanagaki N, Centis N, Ferrara GB and Pressman D: Immunological dissection of human Ia molecules. *J. Exp. Eed.* **148** : 1592, 1978.
- 36) Van Leeuwan A, Schnit HRE and van Rood JJ: Typing for MLC(LD). II. The selection of nonstimulator cells by MLC inhibition tests using SD-identical stimulator cells(MISIS) and fluorescence antibody studies. *Transplant. Proc.* **5** : 1539, 1973.
- 37) Wake CT, Long EO and Mach B: Allelic polymorphism and complexity of the genes for HLA-DR  $\beta$  chains-direct analysis for HLA-DNA hybridization. *Nature.* **300** : 372, 1982.
- 38) Yunis EJ and Amos DB: Three dosely linked genetic systems relevant to transplantation. *Proc. Natl. Acod. Sci. USA.* **68** : 3031, 1971.